

Extrakte aus Fliegenmaden und ihre Wirkung auf die Biologie chronischer Wunden

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Falk Peer Gestmann
aus Duisburg

Duisburg, August 2015

aus dem Institut für Zellbiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Gedruckt mit der Genehmigung der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Referent: Prof. Dr. William F. Martin

Korreferent: Prof. Dr. Heinz Mehlhorn i.R.

Tag der mündlichen Prüfung:

Meiner Familie

1. Inhaltsverzeichnis

1. Inhaltsverzeichnis	1
2. Abkürzungsverzeichnis.....	5
3. Einleitung.....	11
3.1. Aufbau der menschlichen Haut.....	11
3.2. Phasen der primären, kutanen Wundheilung	11
3.3. MMP in der kutanen Wundheilung.....	13
3.4. Ursachen für Störungen im kutanen Wundheilungsgeschehen.....	15
3.5. Bakterien und bakterielle Biofilme in chronischen Wunden	16
3.6. Larven von <i>Lucilia sericata</i> in der Behandlung chronischer Wunden	18
3.7. Zielsetzung dieser Arbeit	20
4. Material und Methoden	21
4.1. Medien und Kits	21
4.2. Verbrauchsmaterialien.....	21
4.1. Referenz-Bakterienstämme	22
4.2. Geräteliste	23
4.3. Chemikalien und Enzyme	23
4.4. Zellkulturmethoden	25
4.4.1. Zellpassage, Zellzahl- und Vitalitäts-Bestimmung.....	25
4.4.2. Serumreduzierte Kultur von Fibroblasten	25
4.4.3. Einfrieren von Zellen.....	25
4.4.4. Proliferations-/Vitalitätsversuche mit primären Fibroblasten	26
4.4.5. MTT-Test	26
4.4.6. Mikroskopische Auswertung des zellulären Wachstums.....	26
4.5. Herstellung von Extrakten aus Larven von <i>Lucilia sericata</i>	27
4.5.1. Anzucht von Larven von <i>Lucilia sericata</i>	27
4.5.2. Herstellung von Sterilfiltraten.....	27
4.5.3. Gefriertrocknung der Sterilfiltrate.....	29
4.5.4. Gewinnung der Exkrete/Sekrete von Fliegenmaden	30

4.6.	Therapieversuch an menschlichen Patienten.....	30
4.6.1.	Gewinnung und Asservierung von Exsudaten aus Ulcera von Patienten ..	31
4.7.	Arbeiten mit Bakterien	32
4.7.1.	Isolation, Differenzierung und Resistenztestung von Bakterien aus Patientenwunden.....	32
4.7.2.	Vorkultur von Bakterien	32
4.7.3.	Agardiffusionstest auf Wachstumsinhibition	33
4.7.4.	Microbroth dilution assay zum Test auf Wachstumsinhibition	33
4.7.5.	Mikrotiter Biofilm-Formierungsassay	34
4.8.	Proteinbiochemische Methoden	35
4.8.1.	Ermittlung von Proteinkonzentrationen.....	35
4.8.2.	Ermittlung spezifischer Proteinkonzentrationen mittels Proteinmicroarray.	35
5.	Ergebnisse.....	37
5.1.	Herstellung lyophilisierter Extrakte aus Fliegenmaden.....	37
5.2.	Aus Patientenwunden isolierte Bakterienspezies	42
5.3.	Bakterielle Besiedlungen der Patientenwunden im Behandlungsverlauf.....	43
5.3.1.	Patient 1	43
5.3.2.	Patient 2.....	44
5.3.3.	Patient 3.....	45
5.3.4.	Patient 4.....	45
5.3.5.	Patient 5.....	45
5.3.6.	Patient 6.....	46
5.3.7.	Patient 7	47
5.3.8.	Patient 8.....	47
5.3.9.	Patient 9.....	48
5.3.10.	Patient 10.....	48
5.4.	Wirkung von Madenextrakten auf Bakterienisolate aus Patientenwunden	49
5.5.	Wirkung von Madenextrakten auf die Bildung bakterieller Biofilme	53
5.6.	Einfluss von Madenextrakten auf die Vitalität von primären Fibroblasten	55

5.7.	MMP- und TIMP-Level in Wundexsudaten während der Behandlung mit Madenextrakten.....	60
5.7.1.	Patient 1.....	61
5.7.2.	Patient 2.....	64
5.7.3.	Patient 3.....	67
5.7.4.	Patient 4.....	68
5.7.5.	Patient 5.....	69
5.7.6.	Patient 6.....	73
5.7.7.	Patient 7.....	76
5.7.8.	Patient 8.....	79
5.7.9.	Patient 9.....	82
5.7.10.	Patient 10.....	85
5.8.	Klinischer Verlauf der Behandlung von Patientenwunden.....	88
5.8.1.	Patient 1.....	89
5.8.2.	Patient 2.....	91
5.8.3.	Patient 3.....	93
5.8.4.	Patient 4.....	94
5.8.5.	Patient 5.....	95
5.8.6.	Patient 6.....	100
5.8.7.	Patient 7.....	101
5.8.8.	Patient 8.....	103
5.8.9.	Patient 9.....	104
5.8.10.	Patient 10.....	107
6.	Diskussion.....	109
6.1.	Extraktherstellung.....	109
6.2.	Wirkung von Madenextrakten auf primäre humane Zellen.....	110
6.3.	Bakterielle Besiedlung von Patientenwunden.....	112
6.4.	Resistenzen in bakteriellen Isolaten aus Patientenwunden.....	114
6.5.	Effekte von Madenextrakten auf das bakterielle Wachstum.....	117
6.6.	Wirkung von Madenextrakten auf bakterielle Biofilme.....	119

6.7.	Die Bedeutung von Bakterien und Biofilmen für sekundär heilende Wunden ...	122
6.8.	MMP-Level in Wundexsudaten und Kulturmedien.....	123
6.8.1.	MMP-10	125
6.8.2.	MMP-3	126
6.8.3.	MMP-13	127
6.8.4.	MMP-8	127
6.8.5.	MMP-1	129
6.8.6.	MMP-9	130
6.8.7.	MMP-2	132
6.8.8.	TIMP-1, -2 und -4.....	133
6.1.	Klinischer Verlauf der behandelten Patientenwunden	135
6.2.	Zusammenfassende Betrachtung	138
7.	Zusammenfassung	142
8.	Abstract.....	144
9.	Literaturverzeichnis.....	146
10.	Anhang	172
10.1.	Antibiogramme.....	182
10.2.	Datentabellen MMP-Messungen	189
11.	Danksagung.....	200
12.	Veröffentlichungen.....	201
12.1.	Buchkapitel	201
12.2.	Poster und Kongressbeiträge	201
12.3.	Vorträge	202
12.4.	Populärwissenschaftliche Artikel	202
13.	Versicherung an Eides Statt	203

2. Abkürzungsverzeichnis

“	<i>Inch</i> , Zoll
°C	Temperatur in Grad Celsius
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
3MRGN	Gegen drei von vier Leitsubstanzen (Antibiotika) multiresistente gramnegative Stäbchen
AHL-12	N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserin-Lacton
AmpC	Klasse C Cephalosporinase
ArBI	Leerer Array
ArPr	Mit Probe beladener Array
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
AXYLO	<i>Achromobacter xylosoxidans</i>
BCA	<i>Bicinchoninic acid assay</i> , Bicinchoninsäure Test
bFGF	<i>Basic fibroblast growth factor</i> , basischer Fibroblasten-Wachstumsfaktor
BM	Basalmembran
BSA	Bovines Serum Albumin
CA	Celluloseacetat
ca.	Circa
CCN	<i>CTGF Cyr61 nov</i>
CITKOS	<i>Citrobacter koseri</i>
CLSI	<i>Clinical and Laboratory Standards Institute</i>
cm²	Quadratzenimeter
CTGF	<i>Connective tissue growth factor</i> , Bindegewebs-Wachstumsfaktor
Cyr61	<i>Cystein-rich protein 61</i> , Cystein-reiches Protein 61

demin.	Demineralisiert
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
eap	Extrazelluläre Adhärenz-Proteine
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	<i>Epidermal growth factor</i> , epidermaler Wachstumsfaktor
ELISA	<i>Enzyme-linked immunosorbend assay</i> , enzymgekoppelter Immunadsorptionstest
ENFIS	<i>Enterococcus faecalis</i>
EPS	Extrazelluläre polymere Substanzen
ES	Exkrete/Sekrete
EUCAST	<i>The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing</i>
EW	Erwartungswert
EZM	Extrazelluläre Matrix
FGF	<i>Fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FKS	Fötales Kälberserum
g	Gramm, mittlere Erdbeschleunigung
GF	Glasfaser
GF+	Sartopure GF+
GMP	<i>Good manufacturing practice</i> , gute Herstellungspraxis
Gr.	Gruppe
h	<i>Hour</i> , Stunde
HaCaT	<i>Human adult low calcium high temperature (keratinocytes)</i> , menschliche Erwachsenen niedrig Kalzium hoch-temperatur Keratinozyten
HB-EGF	<i>Heparin binding EGF</i> , Heparin bindender EGF

HD	Hemidesmosomen
HGF	<i>Hepatocyte growth factor</i> , Hepatozyten Wachstumsfaktor
HUVEC	<i>Human umbilical vein endothelial cells</i> , humane Nabelschnur Endothelzellen
I	Intermediär
JAK2	Janus Kinase 2
KGF	<i>Keratinocyte growth factor</i> , Keratinozyten-Wachstumsfaktor
kGy	Kilogray
KLEB	<i>Klebsiella pneumoniae</i>
Konz.	Konzentration
KZ	Keratinozyten
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid(e)
mA	Milliampere
mbar	Millibar
MDT	<i>Maggot débridement therapy</i> , Madentherapie
mg	Milligramm
MHK	Minimale wachstumshemmende Konzentration
min	Minute
MiQ	Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards
ml	Milliliter
mmol	Millimol
MMP	Matrixmetalloproteinase(n)
MRSA	Methicillinresistenter <i>Staphylococcus aureus</i> = ORSA
MSSA	Methicillinsensitiver <i>Staphylococcus aureus</i>
MT	<i>Membrane type</i> , Membran Typus

MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
MW	Mittelwert
n	Anzahl
NHDF	Normale humane dermale Fibroblasten
nm	Nanometer
nov	<i>Nephroblastoma overexpressed gene</i> , im Nephroblastom überexprimiertes Gen
OD	Optische Dichte
OprD/M	<i>Outer membrane porin D/M</i> , Außenmembran Porin D/M
P	Patient
p.a	Per Analysis
pAVK	Periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i> , Polymerase Kettenreaktion
PDGF	<i>Platelet derived growth factor</i> , von Thrombozyten stammender Wachstumsfaktor
PE	Polyethylen
PES	Polyethersulfon
pg	Picogramm
pH	Potentia hydrogenii
Pip	Piperacillin
PMN	Polymorphonukleäre Granulozyten
PMT	<i>Photo multiplier tube</i> , Photonenelektronenvervielfacher
PP	Polypropylen
PP2	Sartopure 2
PQS	<i>Pseudomonas Quinolone Signal</i> , Pseudomonaden Quinolon Signal

PRETT	<i>Providencia rettgeri</i>
PROMIR	<i>Proteus mirabilis</i>
PS	Polystyrol
PYO	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>
QRDR	<i>Quinolone Resistance-Determining Regions</i> , Quinolon-Resistenz bestimmende Region
R	Resistent
RF	Referenzfaktor
ROS	<i>Reactive oxygen species</i> , reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
S	Sensibel
sei	<i>Styphylcoccal enterotoxin I</i> , Staphylokokken-Enterotoxin-I
SG PES	Sartoguard PES
SMAD2	<i>Mothers against decapentaplegic homolog 2</i>
sog.	sogenannt
SOP	<i>Standard operating procedure</i> , Standardvorgehensweise
SP2	Sartopore 2
STAAUR	<i>Staphylococcus aureus</i>
Stabw.	Standardabweichung
syn.	Synonym
Taz	Tazobactam
TGF	<i>Transforming growth factor</i> , transformierender Wachstumsfaktor
TIMP	<i>Tissue inhibitors of metalloproteinases</i> , Gewebeinhibitoren der Metalloproteinasen
TMP/SMZ	Trimethoprim/Sulfamethoxazol
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i> , Tumornekrosefaktor

TSB	Tryptische Soja Bouillon
VEGF	<i>Vascular endothelial growth factor</i> , vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor
VRE	Vancomycinresistenter Enterococcus
X_{norm}	Normalisierte Messwerte
X_{real}	Reale Messwerte

3. Einleitung

3.1. Aufbau der menschlichen Haut

Die Haut ist das flächenmäßig größte und gleichzeitig schwerste Organ des Menschen. Sie schützt die darunterliegenden Gewebe vor äußeren Einflüssen und übernimmt wichtige Funktionen in der Flüssigkeits- und Wärmeregulation des gesamten Organismus und besitzt Funktionen in Wahrnehmung thermischer und chemischer Reize sowie mechanischer Reize (Braun-Falco et al. 2005; Godin und Touitou 2007; Hurkmans et al. 1985; Kanitakis 2002). Die Haut kann grob in Epidermis, Dermis und subkutanes Fett- und Bindegewebe gegliedert werden. Der Hauptzelltyp des mehrschichtigen Plattenepithels der Epidermis sind Keratinozyten, wobei die oberste Schicht der Epidermis aus abgestorbenen Zellen besteht. In der darunter liegenden Bindegewebsschicht treten Fibroblasten als Hauptzelltyp auf. Im Gegensatz zur Epidermis befindet sich in der Dermis ein Geflecht von sowohl Blut- als auch Lymphgefäßen (Jung 1995). Eine Unterbrechung dieser Barriere macht die darunter liegenden Gewebe für äußere Einwirkungen angreifbar. Eine Gewebedurchtrennung der Haut, aber auch von Schleimhäuten sowie anderen Geweben und Organen, wird als Wunde bezeichnet. Es wird zwischen einfachen Wunden, die nur auf die Haut begrenzt sind, und komplizierten Wunden unterschieden, wobei letztere durch die Durchtrennung von Gefäßen, Muskeln und Nerven charakterisiert sind (Kujath und Michelsen 2008).

3.2. Phasen der primären, kutanen Wundheilung

Im Zuge der Wundheilung kann die Unterbrechung dieser Barriere repariert und deren Wiederherstellung in verschiedene Phasen eingeteilt werden (Abbildung 1). Als eine erste Reaktion auf die Gewebedurchtrennung und den damit einhergehenden Verletzungen von Kapillaren erfolgt der Austritt von Blut, Lymphe und Gewebswasser in den Wundspalt. Unter Beteiligung von Thrombozyten und verschiedenen Gerinnungsfaktoren erfolgt der Verschluss dieser Gefäße. Diese Phase wird häufig synonym mit Hämostase, Gerinnungs- oder Exsudationsphase bezeichnet (Falanga 2005; Schmidt et al. 2004; Singer und Clark 1999). Durch die Sekretion von Thrombin durch Thrombozyten kann Fibrinogen zu Fibrin gespalten werden, wodurch ein Fibrinpfropf entsteht, der den Wundspalt verschließt und auch als temporäre extrazelluläre Matrix (EZM) dient. Weitere Bestandteile dieses Pfropfs sind Fibronectin, Vitronectin und Thrombospondin. Der Fibrinpfropf dient zudem als Speicher für Wachstumsfaktoren und Zytokine, die durch degranulierende Thrombozyten freigesetzt werden. Sauerstoffmangel infolge der Hämostase führt zu einem erhöhten

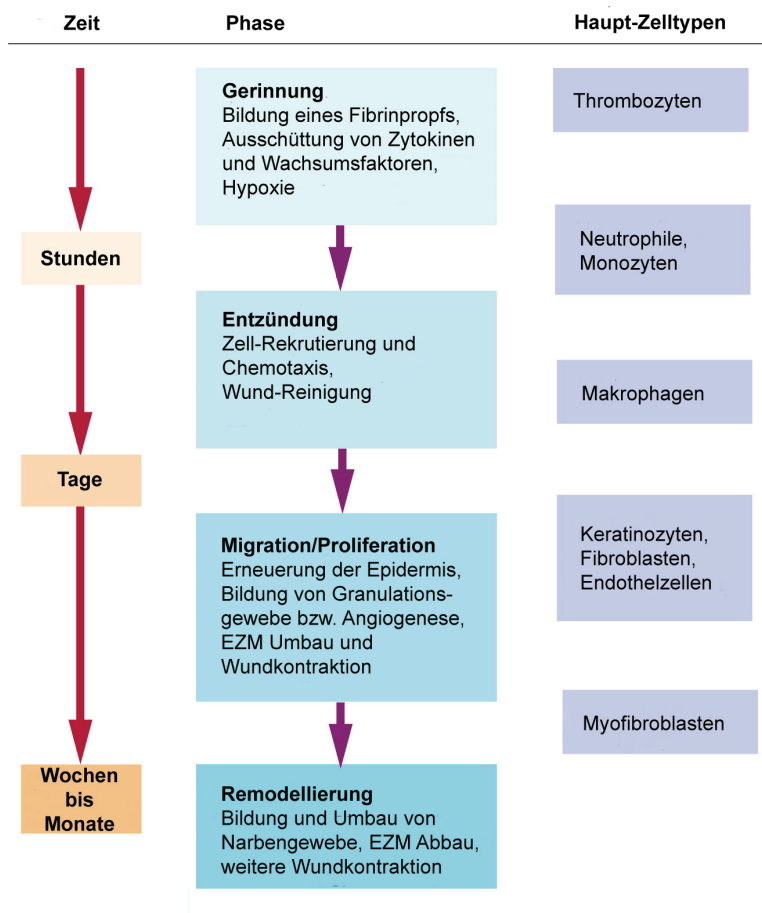


Abbildung 1: Schematische Darstellung der kutanen Wundheilung. Die Darstellung zeigt eine Einteilung der zeitlich überlappenden Phasen der Wundheilung und die wichtigsten Vorgänge in den jeweiligen Phasen sowie die beteiligten Zelltypen. **EZM** = Extrazelluläre Matrix. Verändert nach (Falanga 2005).

Kohlendioxid-Druck und einem Absinken des pH-Werts. Es bilden sich generell durch Rötung, Schwellung und Schmerzen Anzeichen einer physiologischen Entzündung (Scheithauer und Riechelmann 2003a).

Durch die Abgabe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren durch Thrombozyten, aber auch durch Spaltprodukte des Fibrins, werden polymorphonukleäre neutrophile Granulozyten (Neutrophile) als erste Zellen des Immunsystems bereits ca. 24 Stunden nach Wundentstehung in den Wundspalt gelockt. Sie sind unter anderem an der Phagozytose von Bakterien und der Wundreinigung beteiligt. Zusätzlich sekretieren sie pro-inflammatorische Zytokine wie TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) und das Interleukin 1 β . Beide wiederum stellen frühe Signale für Fibroblasten und Keratinozyten dar. Unter physiologischen Bedingungen wandern etwas verzögert (nach ca. 48 Stunden) Monozyten und Makrophagen, aber auch Lymphozyten in den Wundbereich ein, die wiederum große Mengen verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren, z.B. FGF (*fibroblast growth factor*), TGF- α und TGF- β (*transforming growth factor- α / β*) sekretieren, die für die anschließende Migrations-/Proliferationsphase notwendig sind (Park und Barbul 2004; Scheithauer und Riechelmann 2003a; Vilcek et al. 1986). Der von Thrombozyten abgegebene PDGF (*platelet-derived growth factor*) sowie TGF- β_1 kennzeichnen diese

Phase. Durch sie wird auch die Migration und Proliferation von Keratinozyten vom Wundrand sowie von Fibroblasten eingeleitet (Martin 1997; Singer und Clark 1999). Verschiedene Matrixmetalloproteinasen (MMP), die nahezu alle Bestandteile der temporären EZM spalten können, bauen diese wieder ab (Kahari und Saarialho-Kere 1999; Nagase und Woessner 1999). Makrophagen und Endothelzellen sekretieren VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und bFGF (*basic fibroblast growth factor*), was zum Einsprossen neuer Blutgefäße führt, die den Wundspalt mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgen (Sunderkotter et al. 1994). Vom Wundrand migrieren weitere Keratinozyten ein und verschließen den Wundbereich mit einer Neoepidermis. Hinter der Migrationsfront befindet sich eine Zone aus sich teilenden Keratinozyten. Der Vorgang wird unter anderem durch die Wachstumsfaktoren EGF (*epidermal growth factor*), TGF- α , HB-EGF (*heparin binding-EGF*) und KGF (*keratinocyte growth factor*) gesteuert, wobei die Bildung eines mehrschichtigen Epithels angeregt wird (Blotnick et al. 1994; Martin 1997; Singer und Clark 1999). Im Anschluss an die Reepithelisierung erfolgt eine Remodellierungs-Phase, in der Fibroblasten zu Myofibroblasten differenzieren, die vermehrt „ α -smooth muscle actin“ exprimieren und dem Wundbereich eine gesteigerte Elastizität verleihen. Diese Phase dauert bis zu einem Jahr an (Grinnell 1994; Welch et al. 1990). Verschiedene MMP tragen in dieser Phase maßgeblich zur Remodellierung von Typ I, Typ II und Typ V Kollagenfibrillen bei, die über TGF- β gesteuert wird. Nach der Verknüpfung der Myofibroblasten wird vermutlich durch PDGF aus Fibroblasten die Wundkontraktion eingeleitet (Montesano und Orci 1988; Scheithauer und Riechelmann 2003a).

3.3. MMP in der kutanen Wundheilung

Die Familie der MMP umfasst 25 Mitglieder von zinkabhängigen, extrazellulären Endopeptidasen, die alle als strukturelle Gemeinsamkeit ein Propeptid, eine katalytische Domäne und eine Zink-Bindungsstelle aufweisen. Es treten 24 dieser MMP bei Säugetieren auf (Chen und Parks 2009; Martins et al. 2013; Overall und Lopez-Otin 2002). Die für die Wundheilung wichtigsten MMP sind Kollagenasen (MMP-1, MMP-8 und MMP-13), Gelatinasen (MMP-2 und MMP-9) und die Stromelysine (MMP-3 und MMP-10). MMP werden von verschiedenen Zelltypen (Keratinozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Monozyten, Lymphozyten und Makrophagen) exprimiert. Abbildung 2 zeigt eine Übersicht der Expression der verschiedenen MMP in der kutanen Wundheilung sowie die Zuordnung zu bestimmten Zelltypen. Die Transkription wird hauptsächlich durch Zytokine/Wachstumsfaktoren (Interleukine, Interferone, EGF, KGF, FGF, VEGF, PDGF, HGF (*hepatocyte growth factor*), TNF- α , TGF- β) eingeleitet (Martins et al. 2013; Yan und Boyd 2007). Aktiviert werden die in ihrer latenten Form vorliegenden MMP durch verschiedenen Serinproteinasen, aber auch durch andere MMP. Die Regulation von MMP

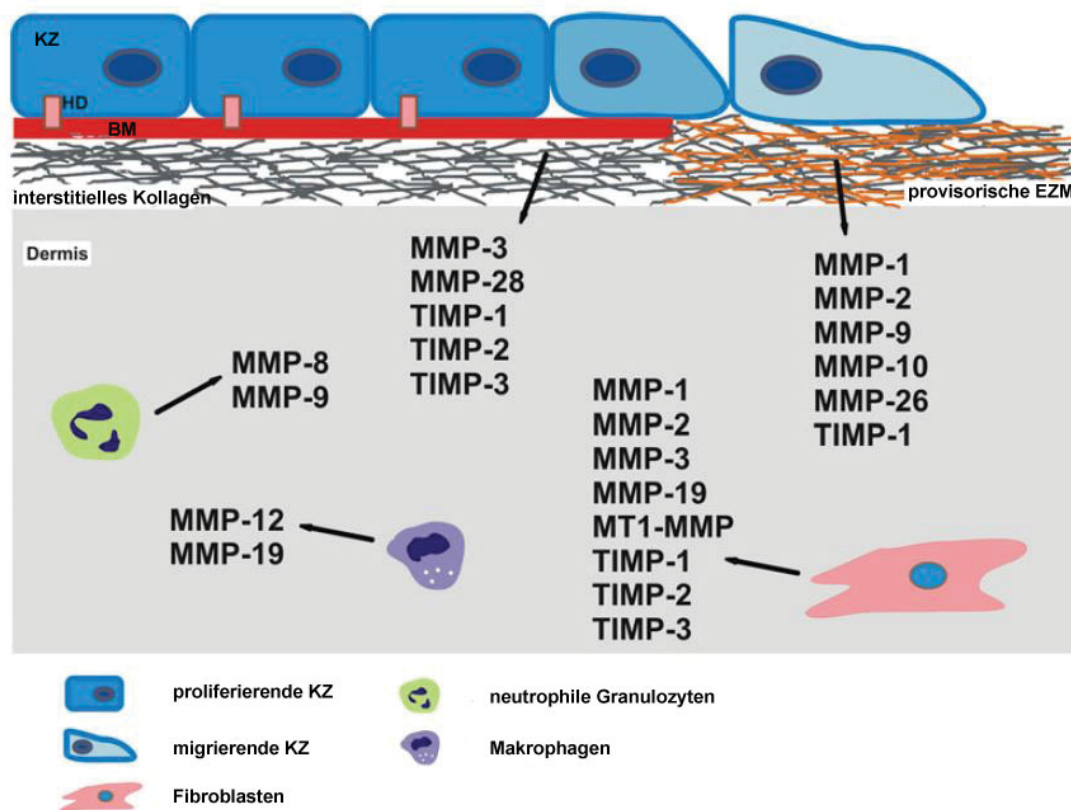


Abbildung 2: Expression und Lokalisation von MMP und TIMP in der kutanen Wundheilung. Überblick über die wichtigsten, an der kutanen Wundheilung beteiligten Zellen und der Lokalisation der Expression verschiedener MMP und TIMP. MMP = Matrixmetalloproteinase; MT = membrane type; TIMP = tissue inhibitors of metalloproteinases; KZ = Keratinozyten; HD = Hemidesmosomen; BM = Basalmembran; EZM = extrazelluläre Matrix. Abbildung verändert nach Martins et al. (2013).

kann über verschiedene im Plasma enthaltene Proteinaseinhibitoren gesteuert werden (α 2-Makroglobulin, α 1-Proteinase oder Thrombospondin-1 und -2), aber hauptsächlich durch spezifische TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) (Baker et al. 2002; Martins et al. 2013; Sottrup-Jensen und Birkedal-Hansen 1989).

Die unterschiedlichen MMP übernehmen eine Vielzahl verschiedener Funktionen, wie z.B. die Freisetzung und Aktivierung, aber auch die Deaktivierung von Zytokinen und Wachstumsfaktoren, die zum Teil in der EZM gespeichert sind. Darüber hinaus sind sie an der Remodellierung der EZM beteiligt. Sie sind notwendig für die Migration von Keratinozyten, Fibroblasten, Neutrophilen und anderen Zellen des Immunsystems (Martins et al. 2013). Es scheint gesichert zu sein, dass sich chronische Wunden durch die anhaltende Stimulation des angeborenen Immunsystems in einem Status der chronischen Inflammation befinden (Pukstad et al. 2010). Durch die Verlängerung dieser Phase kommt es zu einer Störung des Gleichgewichts der verschiedenen Zytokine, Wachstumsfaktoren, reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und Proteinasen. ROS können Zellen direkt schädigen, führen aber auch zu einer vermehrten Expression verschiedener MMP (-1, -2, -3, -9, -13), wodurch ein Wundverschluss verlangsamt bzw. verhindert wird (Bournelis 2012; Eming et al. 2007; Majno 1998; Schreml et al. 2010; Weiss 1989; Wysocki et al. 1993). Zudem scheint

es auch mit steigendem Alter einen Anstieg in der Expression der MMP-2 und -9 in Wunden zu geben (Ashcroft et al. 1997). Es lassen sich auch drastisch erhöhte Level der Neutrophilen-Elastase und Plasmin in Wundexsudaten nachweisen, die zusammen mit den erhöhten MMP-Leveln die Degradation von Wachstumsfaktoren und neu gebildeter EZM katalysieren (James et al. 2003; Kurtagic et al. 2009; Lauer et al. 2000; Palolahti et al. 1993; Wysocki und Grinnell 1990).

3.4. Ursachen für Störungen im kutanen Wundheilungsgeschehen

Der Prozess der primären und physiologischen Wundheilung ist ein äußerst komplexer Vorgang, bei dem eine Vielzahl beteiligter Zelltypen und eine bei weitem größere Anzahl verschiedener Zytokine, Wachstumsfaktoren, Anheftungsfaktoren und Proteinasen, z.T. zeitlich überlappend und koordiniert, benötigt werden. Störungen in diesem vielschichtigen und kompliziert organisierten Prozess können diesen verlangsamen, aufhalten oder gar umkehren. Verschiedene Faktoren können sich zu einer Wundheilungsstörung manifestieren. Aber auch wenn keine Störung vorliegt, können z.B. sehr großflächige Wunden zu sekundär heilenden Wunden gezählt werden. Ein Verschluss erfolgt dann nicht mehr primär vom Wundrand ausgehend, sondern vielmehr durch ein Auffüllen des Wundbereichs durch Granulationsgewebe (Scheithauer und Riechelmann 2003b). Faktoren, die die Wundheilung negativ beeinflussen, können in lokale (intrinsische) und systemische (extrinsische) Faktoren unterschieden werden. Zu den intrinsischen Faktoren zählen unter anderem Wundinfektionen, Fremdkörper im Wundbereich (z.B. Nahtmaterial), Ischämie, venöser Bluthochdruck, ionisierende Strahlungen, lokale Toxine und Tumorerkrankungen (Malignome). Es können beispielsweise aber auch bestimmte OP-Techniken dazu gezählt werden. Dem gegenübergestellt können Therapien mit Cortisonen oder Chemotherapeutika, Fehlernährungen, andere Tumorerkrankungen, Urämie, Ikterus und Alkoholismus ursächlich zu einer Chronifizierung beitragen. Hinzu kommen genetisch bedingte Prädispositionen und die vermutlich wichtigste Ursache, das Alter. Bei über 60-jährigen wird schätzungsweise mit bis zu dreifach erhöhten Störungen der Wundheilung gerechnet. Fibroblasten, denen eine wichtige Rolle in allen Phasen der kutanen Wundheilung zuteilwird, treten im Verlauf der Alterung in verringerter Anzahl auf und teilen sich langsamer. Hierdurch kommt es in allen Phasen zu Störungen im koordinierten Ablauf dieser Prozesse (Lawrence 1992; Scheithauer und Riechelmann 2003b). Wunden, die über drei Wochen, aber weniger als drei Monate bestehen, können als kompliziert und Wunden, die über drei Monate bestehen, als chronisch bezeichnet werden (Dissemond 2006). Chronische Wunden stellen für die betroffenen Patienten eine erhebliche Belastung dar, die mit einem massiven Verlust der Lebensqualität einhergeht. Hinzu kommen häufig lange Behandlungszeiten und steigende Kosten für das Gesundheitssystem. Etwa 2 % der in

Deutschland für das Gesundheitssystem anfallenden Kosten werden durch die Behandlung von Ulcera der Beine verursacht. Der Großteil der Ulcera ist durch venöse Störungen des Blutabfluss (Ulcus cruris venosum), aber auch durch arterielle Durchblutungsstörungen (Ulcus cruris arteriosum), häufig in Verbindung mit dem diabetischen Fußsyndrom, auf Grundlage einer Diabetes mellitus, verursacht. Die Prävalenz des Ulcus cruris venosum liegt in der deutschen Bevölkerung bei etwa 0,8 %, die der peripheren arteriellen Durchblutungsstörungen bei etwa 3 bis 10 %. Etwa 2 bis 10 % der an einer Diabetes Erkrankten zeigen ein diabetisches Fußsyndrom. Aufgrund uneinheitlicher Definitionen für das Vorhandensein dieser Erkrankungen lassen sich jedoch keine exakten Werte ermitteln. Etwa 60 % der rezidiven diabetischen Fuß-Ulcera machen eine Amputation unumgänglich (Herber et al. 2007; Medicine 2008; Morbach et al. 2012; Nord 2006; Rüttermann et al. 2013). Losgelöst von diesen Hauptursachen für chronische Ulcera der Unterschenkel sind diese Wunden vor allem durch die verlängerte Dauer der Eröffnung anfällig für bakterielle Besiedlungen/Infektionen (Dissemond 2014).

3.5. Bakterien und bakterielle Biofilme in chronischen Wunden

Die Ulcera umgebenden Hautbereiche und die Bereiche der Ulcera teilen zwar einen Großteil ihrer bakteriellen Flora, jedoch besitzen die Ulcera als solche häufig eine reduzierte Diversität auf Art und Gattungsniveau. Hinzu kommen einige opportunistische Bakterienspezies, die zwar in und außerhalb der Wunde gefunden werden können, aber in den Wundbereichen in höherer Dichte auftreten (Gontcharova et al. 2010). Zu den häufigsten in Wunden auftretenden bakteriellen Spezies scheinen *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* und *Proteus mirabilis* zu zählen (Dissemond et al. 2004). Eine mit Bakterien besiedelte Wunde ist jedoch nicht gleichzeitig auch infiziert. Ob ein Fortschreiten von einer besiedelten zu einer kritisch besiedelten oder sogar infizierten Wunde vorliegt, hängt unter anderem von der Immunantwort des Patienten, der Summe verschiedener Bakterienspezies, der Dichte der Besiedlung und der Virulenz der verschiedenen Spezies ab (Edwards und Harding 2004). Bakterielle, extrazelluläre Adhärenz-Proteine (eap), z.B. von *S. aureus*, nehmen direkten Einfluss auf die Reparaturmechanismen in der Wundheilung (Athanasopoulos et al. 2006). Die Organisation wundbesiedelnder Bakterien in Biofilmen (Abbildung 3) vermittelt diesen zudem einen Schutz vor externen Einflüssen, wie z.B. Antibiotika. Biofilme bestehen zu einem großen Teil extrazellulären polymeren Substanzen, die in Verbindung mit Wasser eine Art Hydrogel bilden (McCarty et al. 2012). Bestimmte wundbesiedelnde Bakterien wie *P. aeruginosa* sind in der Lage, voll funktionsfähige Biofilme in nur zehn Stunden zu bilden (Harrison-Balestra et al. 2003).

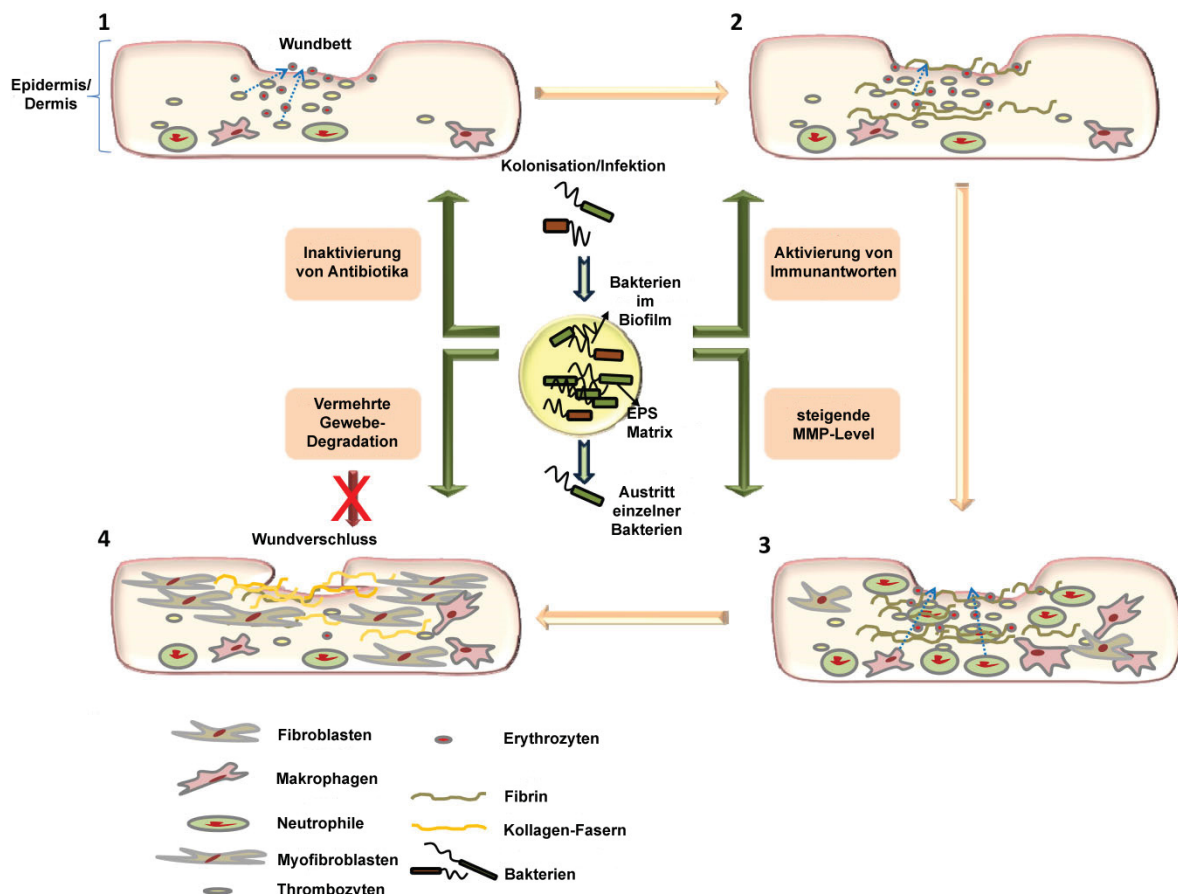


Abbildung 3: Verhinderung des Wundverschlusses durch bakterielle Biofilme. (1) Gefäßverschluss durch Thrombozyten und (2) anfängliche Formierung des Fibrinpfropfs. (3) Infiltration durch Immunzellen und lokale Entzündungsreaktion. (4) Wundverschluss und Abnahme inflammatorischer Signale. MMP = Matrixmetalloproteinase; EPS = extrazelluläre polymere Substanzen. Verändert nach McCarty et al. (2012).

Biofilme vermitteln dabei den bakteriellen Gemeinschaften nicht nur Schutz vor Antibiotika und Desinfektiva, sondern auch vor dem Immunsystem des kolonisierten Wirts selbst. Hierbei ist das Eindringen von Neutrophilen in die Biofilm-Matrix und die Phagozytose der beinhalteten Bakterien nicht ausgeschlossen, wird aber in den reifen Biofilmen gemindert (Gunther et al. 2009). Kennzeichnend für den Einfluss bakterieller Biofilme (aber auch planktonisch auftretender Bakterien) auf die kutane Wundheilung sind eine verlängerte Aktivierung pro-inflammatorischer Immunantworten, steigende Level der MMP-Konzentrationen und hierdurch sowie durch bakterielle Virulenzfaktoren bedingte Degradation von Geweben (McCarty et al. 2012), Komponenten der EZM durch Elastase (Grinnell und Zhu 1996) und damit verbunden auch die Verhinderung einer Reepithelisierung (Schierle et al. 2009). Diese pro-inflammatorischen Immunantworten werden durch das verstärkte Auftreten von Monozyten und Makrophagen bedingt und lassen sich unter anderem durch das Auftreten von z.B. TNF- α und den Interleukinen -1 und -6 in der Wundflüssigkeit nachweisen (Eming et al. 2007). Einige Signalmoleküle des „quorum sensing“, einer Art Kommunikation zwischen Bakterien (Fuqua et al. 1994), können die Wundheilung zusätzlich beeinflussen. Vor allem Signale von *P. aeruginosa* verringern die Migration von Fibroblasten und Keratinozyten (Jacobsen et al. 2012) und

stehen in einem direkten Zusammenhang mit der Erhöhung der Chemotaxis in Neutrophilen (Kahle et al. 2013) sowie der Größe (Nakagami et al. 2011) und der Bestehensdauer von Wunden (Gjodsbol et al. 2006). Es besteht sogar die Hypothese, dass in Biofilmen organisierte *P. aeruginosa* und die unvollständige Eradikation durch Neutrophile einer der Hauptfaktoren für die Nicht-Wirksamkeit von Antibiotika gegen *P. aeruginosa* sind (Bjarnsholt et al. 2008).

3.6. Larven von *Lucilia sericata* in der Behandlung chronischer Wunden

Für die Behandlung chronischer Wunden steht aktuell eine Vielzahl unterschiedlicher Strategien zur Verfügung. Während bis in die 1960er Jahre eine trockene Wundbehandlung als das Mittel der Wahl galt (Protz 2014), hat sich bis heute die feuchte Wundbehandlung als Goldstandard durchgesetzt. Hierfür stehen heute eine nahezu unüberschaubare Auswahl verschiedener Wundauflagen und die Hydratisierung unterstützende Hydrogele für stark und weniger stark exsudierende Wunden zur Verfügung. Beim Auftreten von Nekrosen oder Wundbelägen, die sich als besonders persistent erweisen, ist häufig ein Débridement (Wundtoilette) notwendig, durch welches diese Beläge entfernt werden. Fibrinbeläge sind zwar Teil des physiologischen Wundheilungsprozess, jedoch kann die Qualität der enthaltenden EZM nicht äußerlich beurteilt werden (Abschnitt 3.2). Fibrinbeläge werden häufig dem, durch Feuchttherapie unterstütztem, Abbau durch endogene Proteinase im Rahmen eines autolytischen Débridement überlassen (Davidson 2015). Für nekrotische Beläge steht meist nur ein chirurgisches Débridement zur Verfügung.

Neben diesen Methoden kann auch ein biochirurgisches Débridement angewendet werden. Hierzu werden Larven der Goldfliege *Lucilia sericata* entweder als Freiläufer oder in sog. Biobags auf die Wundareale gesetzt. Diese Larven, wie auch viele andere Larven der Calliphoridae, verfügen über eine extrakorporale Verdauung (Mehlhorn und Gestmann 2011), so dass es sich hierbei vordergründig aufgrund des Vorhandenseins verschiedener bereits identifizierter Proteinase um ein enzymatisches Débridement handelt (Doerler et al. 2012). Fliegen der Art *L. sericata*, aber auch anderer nah verwandter Arten (z.B. *Lucilia cuprina*), legen ihre Eier bevorzugt auf Kadavern, aber auch in parasitischer Weise (Myiasis), auf Wunden z.B. von Schafen ab (Heath und Tenquist 1971; Pekelder 1991). Hier findet binnen weniger Tage nach zwei Larval-Häutungen die Entwicklung zur Puppe statt, aus der temperaturabhängig nach wenigen Tagen die Fliege schlüpft (Mehlhorn und Piekarski 1998). Belegbare Beobachtungen einer Myiasis beim Menschen gehen auf den französischen Hofchirurgen Ambroise Paré zurück „*Pare speaking of the Battle of St. Quentin. 1557, says: „the wounds of the hurt people were greatly stincking, and full of*

wormes with gangrene and putrifaction“ (Goldstein 1931). Erste belegbare, positive Effekte einer humanen Myiasis gehen auf den obersten Chirurgen Napoleons Baron Larrey zurück, der berichtet, dass Maden, die während der Schlacht in Wunden belassen wurden, Infektionen verhinderten und die Heilung der Wunden beschleunigten (Sherman und Pechter 1988).

Die wissenschaftliche Auseinandersetzung und die Aufklärung der möglichen Wirkprinzipien nahm zu Beginn der 30er Jahre des 20. Jahrhunderts ihre Anfänge, als begonnen wurde, aufgrund der noch nicht entdeckten bzw. noch nicht industriell verfügbar gemachten Antibiotika, wie Penicillin und Sulfonamide, lebende, sterile Maden erfolgreich in der Behandlung chronischer Osteomyelitis einzusetzen (Baer 1931). Bereits 1931 wurden eine proteolytische Wirkung (Kollagen) und eine antibakterielle Wirksamkeit als die verantwortlichen Mechanismen postuliert (Hobson 1931; Weil et al. 1933). Livingston (1935) gelang es, einen zumindest kurzzeitig haltbaren und erhitzten Extrakt aus den Larven von *L. sericata* herzustellen. Mit der industriellen Nutzbarmachung des Penicillins und anderer Antibiotika geriet die Therapie mit lebenden Fliegenmaden in Vergessenheit und wurde erst mit der zunehmenden Entwicklung von Antibiotikaresistenzen eine attraktive Alternative. Die weitere Aufklärung der Wirkmechanismen wird seit etwa Mitte der 80er Jahre wieder verfolgt (Sherman und Pechter 1988).

Zum heutigen Zeitpunkt sind folgende Wirkprinzipien der Applikation lebender Maden und ihrer Exkrete/Sekrete umfassend untersucht, und es wurden bereits einige Moleküle identifiziert, die für bestimmte Eigenschaften der Madentherapie verantwortlich zu sein scheinen. Im besonderen Hinblick auf antibakterielle Effekte, die von lebenden Maden ausgehen, herrschen widersprüchliche Meinungen, dennoch scheinen sich als Hauptwirkprinzipien

- ein enzymatisches Débridement,
- antibakterielle Effekte,
- die Stimulation der Wundheilung und
- die Inhibition der Biofilmbildung bzw. die Förderung des Zusammenbruchs eben dieser

in der wissenschaftlichen Gemeinschaft als geltend verankert zu haben (Sherman 2009). Darüber hinaus scheinen sie Einfluss auf bestimmte Zellen des Immunsystems zu nehmen (van der Plas et al. 2009; van der Plas et al. 2007) und auch eine Wirkung auf die Blutgerinnungskaskade zu haben (Kahl et al. 2015), sowie eine Nuklease zu beinhalten, die extrazelluläre DNA spaltet. Neben ihren positiven Einflüssen auf die Wundheilung hat die Madentherapie auch einige Nachteile und Einschränkungen gegenüber anderen

Therapiemethoden. Maden können z.B. nicht in Leibeshöhlen und auch nicht bei Wunden eingesetzt werden, die eine Neigung zur Blutung haben und/oder in der Nähe größerer Blutgefäße liegen. Zudem zeigt eine Studie, dass sehr alte Patienten, Patienten mit sehr tiefen Wunden oder mit chronischen Durchblutungsstörungen der Unterschenkel nicht von den Vorzügen der Madentherapie profitieren (Steenvoorde et al. 2007; Steenvoorde und van Doorn 2008). Darüber hinaus können Maden nicht auf Wunden eingesetzt werden, die mit *P. aeruginosa* besiedelt sind, da Signale des „quorum sensing“ toxisch für die Maden sind (Andersen et al. 2010a). Neben diesen Kontraindikationen stellt die Tatsache, dass sich lebende, motile Tiere auf der ohnehin mitunter sehr schmerzhaften Wunde befinden und man tatsächlich einer aktiven extrakorporalen Verdauung unterliegt, einen nachvollziehbaren Ekelfaktor dar.

3.7. Zielsetzung dieser Arbeit

Ein Hauptziel dieser Arbeit ist es, einen sterilen Extrakt aus den Larven (Larve III) der Goldfliege *Lucilia sericata* zu generieren, der nach Möglichkeit die vorteilhaften Eigenschaften der klassischen Madentherapie beinhaltet und dabei Kontraindikationen lebender Maden und Nachteile dieser ausschließt. Wie bereits durch Livingston (1935) beschrieben, soll der Extrakt auf über 60°C erhitzt werden. Der Extrakt soll zudem durch Entzug von Wasser und einer Behandlung mit γ -Strahlen lagerfähig gemacht werden.

Nach Zustimmung einer Ethikkommission sollen bis zu zehn freiwillige Patienten mit chronischen Ulcera der Unterschenkel im Rahmen individueller Heilversuche mit diesem Extrakt behandelt und damit untersucht werden, ob sich positive Effekte auf die Wundheilung zeigen. Im Rahmen dieser Heilversuche sollen auch regelmäßige Proben der Wundexsudate genommen werden und die Wunden durch regelmäßige Abstrichnahme auf ihre bakterielle Kolonisation hin überprüft werden.

Es soll des Weiteren überprüft werden, ob von dem Extrakt antibakterielle Effekte gegen die aus diesen Wunden isolierten Bakterien ausgehen und ob die Fähigkeit zur Bildung bakterieller Biofilme dieser Bakterien durch den Extrakt beeinflusst wird sowie ob von dem Extrakt pro-proliferative Effekte auf humane Fibroblasten ausgehen.

Durch Analysen der Wundexsudate im Hinblick auf das Vorhandensein der MMP-1, -2, -3, -8, -9, -10 und -13 sowie TIMP-1, -2 und -4 soll im Falle einer Verbesserung der Wundheilung geprüft werden, ob und inwiefern sich Änderungen in den Konzentrationen dieser Faktoren ergeben und ob sich daraus mögliche diagnostische oder prognostische Marker ableiten lassen.

4. Material und Methoden

4.1. Medien und Kits

Bezeichnung	Bezugsquelle/Zusammensetzung
Biofilm-Medium	8,5 g Bacto Tryptone; 1,5 g Bacto Soytone; 2 g Glukose; 2,5 g Natriumchlorid, 1,25 g Dikaliumhydrogenphosphat bei pH 7,3
Columbia Blut-Agar	bioMerieux, Nürtingen, Deutschland
DMEM <i>high glucose</i> , mit L-Glutamin und Natrium-Pyruvat	Biowest SAS, Nuaillé, Frankreich
<i>Dulbecco's Phosphate buffered saline</i> (PBS)	Biowest SAS, Nuaillé, Frankreich
Fötale Kälberserum (FKS)	Biowest SAS, Nuaillé, Frankreich
<i>Human MMP Array Q1</i>	Raybiotech, Norcross, USA
MacConkey Agar	bioMerieux, Nürtingen, Deutschland
<i>Micro BCA Protein Assay Kit</i>	Thermo Fischer scientific, Oberhausen, Deutschland
Piperacillin/Tazobactam (Tazobac EF 4g/0,5g)	Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland
Tryptische Soja Bouillon (TSB) 1 L	17,0 g Bacto Tryptone; 3,0 g Bacto Soytone; 2,5 g Glukose; 5,0 g Natriumchlorid, 2,5 g Dikaliumhydrogenphosphat bei pH 7,3

4.2. Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Bezugsquelle
eSwab™-Entnahmesysteme	Copan Flock Technologies srl., Brescia, Italien
Filterplättchen (Sensi-Disc™)	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Flachbodenmikrotiterplatten (Falcon™)	Corning Incorporated Life sciences, Acton, USA
Flachbodenmikrotiterplatten (Nunclon™)	Thermo Fisher Scientific Inc., Oberhausen, Deutschland
Gewebekulturflaschen T-25	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Gewebekulturflaschen T-75	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland

Glasfaserfilter Typ A/B und Typ A/D	Pall Corporation, Port Washington, USA
Glas-Vials 3 ml Fiolax®	PharMediPack Direkt GmbH & Co. KG, Stolberg-Breinig, Deutschland
Kryoröhrchen	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland
Lyostopfen GL 14	PharMediPack Direkt GmbH & Co. KG, Stolberg-Breinig, Deutschland
Rundbodenmikrotiterplatten	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen, Deutschland
Sartoguard PES Membranfiltercapsulen	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Sartopore 2 Membranfiltercapsulen	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Sartopure GF Plus MidiCap Membranfiltercapsulen	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Schraubkappen GL 14	PharMediPack Direkt GmbH & Co. KG, Stolberg-Breinig, Deutschland
Serologische Pipetten	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland
Spritzenvorsatzfilter CA (0,45 µm; 0,2 µm)	VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland
Urinbecher 200 ml	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht, Deutschland

4.1. Referenz-Bakterienstämme

Bezeichnung	Bezugsquelle
<i>Proteus mirabilis</i> (ATCC®29906™)	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> Rosenbach (ATCC® 25923™)	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
<i>Staphylococcus aureus</i> subsp. <i>Aureus</i> Rosenbach (ATCC® 33592™)	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland
<i>Streptococcus pyogenes</i> Rosenbach (ATCC® 12344™)	LGC Standards GmbH, Wesel, Deutschland

4.2. Geräteliste

Bezeichnung	Hersteller/Bezugsquelle
Begasungsbrutschrank (Modell BB6220)	Heraeus, Hanau, Deutschland
Druckausgleichsbehälter	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
ELISA-Reader (NanoQuant infinite m200)	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
ELISA-Reader (Sunrise™)	Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz
Filterkerzengehäuse 10“	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Gefriertrocknungsanlage (Lyosystem I GT2)	(Leybold-Heraeus, Hanau, Deutschland)
Gefriertrocknungsanlage (Sublimator 3x4x5)	Zirbus Technology GmbH, Bad Grund, Deutschland
GenePix 4000B Microarray-Scanner	Molecular Devices LLC, Sunnyvale, USA
Homogenisator (Ultra-Turrax T25)	IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Messermühle (GRINDOMIX GM 300)	Retsch Technology GmbH, Haan, Deutschland
Nephelometer (DensiCHEK™ plus)	bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland
Spektralphotometer (DU-640)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland
Stahlschläuche und Muffen	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Vakuumpumpe	Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland
Zentrifuge (Avanti J-25)	Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland

4.3. Chemikalien und Enzyme

Bezeichnung	Bezugsquelle
2-Propanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Bacto Soytone	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Bacto Tryptone	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Dikaliumhydrogenphosphat	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

Essigsäure	Thermo Fisher Scientific Inc., Oberhausen, Deutschland
Ethanol (96 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Formaldehyd (37 %)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Glukose	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
Kristallviolett	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland
Trypsin/EDTA-Lösung (0,25 %)	Biowest SAS, Nuaille, Frankreich
Wasser als Spüllösung	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
α -Chymotrypsin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland

4.4. Zellkulturmethoden

In dieser Arbeit wurden ausschließlich primäre normale humane dermale Fibroblasten (NHDF) von drei verschiedenen Spendern verwendet, die freundlicherweise von der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf zur Verfügung gestellt wurden. Die Kultivierung erfolgte im Begasungsbrutschrank (Modell BB6220, Heraeus, Hanau, Deutschland) bei 37°C und 5 % CO₂-Gehalt. Die Zellen wurden entweder in serumhaltigem Zellkulturmedium DMEM (*Dulbecco's modified Eagle's medium*) mit 10 % FKS (fötales Kälberserum) oder unter serumreduzierten Bedingungen kultiviert (0,1 % FKS). Die Kultur erfolgte zudem ohne Zugabe von Antibiotika.

4.4.1. Zellpassage, Zellzahl- und Vitalitäts-Bestimmung

Nach Erreichen eines zu ca. 80 % konfluenten Zellrasens wurde das Medium vollständig entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen. Die Ablösung vom Untergrund erfolgte durch die Zugabe einer Trypsin/EDTA-Lösung (Biowest SAS, Nuaille, Frankreich) und einer Inkubation von bis zu 8 min bei 37°C. Der Ablösevorgang wurde periodisch lichtmikroskopisch überprüft und dann durch die Zugabe des doppelten Volumen an serumhaltigen (10 % FKS) Mediums gestoppt. Zur Bestimmung der Zellzahl bzw. der Vitalität der Zellen, wurden 20 µl der Zellsuspension entnommen und mit 20 µl einer 0,4 %en Trypanblau-Lösung gemischt (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Schnelldorf, Deutschland). Der Prozentsatz von lebenden Zellen an der Gesamtzellzahl wurde lichtmikroskopisch mittels einer Neubauer-Zählkammer bestimmt. Die primären NHDF wurden bis maximal zur 8. Passage verwendet. Als Passagendauer wurde der Zeitraum betrachtet, den eine Kultur, die mit einem Zehntel der Zellen einer zu 80 % konfluenten T-75 Kulturflasche angeimpft wurde, benötigte, um selber 80 % Konfluenz zu erreichen.

4.4.2. Serumreduzierte Kultur von Fibroblasten

Für die serumreduzierte Kultur der NHDF wurden die Zellen nach dem Ablösen und dem Stoppen des AblöSENS durch Zentrifugation bei 500xg sedimentiert, das Medium entfernt und die Zellen in PBS resuspendiert. Nach erneuter Sedimentierung bei 500xg wurden die Zellen in serumreduziertem Kulturmedium (0,1 % FKS) resuspendiert und die Zellzahl bestimmt.

4.4.3. Einfrieren von Zellen

Zum Einfrieren der Zellen wurden 2x10⁵ Zellen in Kulturmedium unter Zusatz von 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO) aufgenommen und in speziellen Kryoröhrchen (VWR

International GmbH, Darmstadt) in flüssigem Stickstoff gelagert. Das Einfrieren erfolgte hierbei in auf -80°C vorgekühltem 2-Propanol.

4.4.4. Proliferations-/Vitalitätsversuche mit primären Fibroblasten

Nachdem wie in 4.4.1 und 4.4.2 vorgegangen wurde, wurden je 100 µl mit 2.500, 5.000 oder 10.000 Zellen in Minimalmedium (DMEM mit 0,1 % FKS) in die Kavitäten von 96-Well Mikrotiterplatten (Thermo Fisher Scientific Inc., Oberhausen, Deutschland) gegeben und für 48 h bei 37°C und 5 % CO₂ vorinkubiert. Die Aussaat der Zellen erfolgte für zur Untersuchung jeder Substanz und Konzentration als Quintupel, sowie nur Minimalmedium beinhaltender Kavitäten als Triplikat (Vehikelkontrollen). Es folgte die jeweilige Zugabe von 50 µl der zu untersuchenden Substanz, gelöst in Minimalmedium und eine weitere Inkubation für 96 h.

4.4.5. MTT-Test

Das wasserlösliche, gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl Tetrazoliumbromid (MTT) kann von lebenden Zellen zu einem violetten, wasserunlöslichen Formazansalz abgebaut werden (Mosmann 1983). Die violetten Kristalle können jedoch in verschiedenen organischen Lösungsmitteln (z.B. DMSO) gelöst werden. Nachdem wie in 4.4.4 vorgegangen wurde, wurde eine MTT-Lösung in vorgewärmten Voll- oder Minimalmedien (5 mg/ml) hergestellt und zum Abscheiden unlöslicher Bestandteile bzw. möglicher Kontaminationen durch Spritzenvorsatzfilter (VWR International GmbH, Langenfeld, Deutschland), mit einer Abscheiderate von 0,22 µm filtriert. Von dieser Lösung wurden 50 µl zu jedem Versuchsansatz gegeben und für weitere 3 h bei 37°C und 5 % CO₂ inkubiert. Hiernach wurde das Kulturmedium durch Umstürzen der Mikrotiterplatten entfernt und Flüssigkeitsreste durch Abstreifen auf Filterpapier entfernt. Durch Zugabe von 150 µl DMSO und 5 minütigem Schütteln auf einem gyroskopischen Schüttler wurden die frisch geformten Formazan-Kristalle gelöst und die Intensität der Färbung der Lösung spektralphotometrisch (Sunrise, Tecan Deutschland GmbH, Crailsheim) bei einer Testwellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 630 nm ermittelt. Die Messwerte der jeweiligen Vehikel-Kontrollen (4.4.4) wurden von den Messwerten subtrahiert und die Mittelwerte (arithmetisches Mittel) sowie die Standardabweichung berechnet.

4.4.6. Mikroskopische Auswertung des zellulären Wachstums

Zur Überprüfung des Einflusses von Madenextrakten oder der Exkrete/Sekrete von *Lucilia sericata* auf die Adhäsion und/oder die Vitalität von NHDF wurden in zu 4.4.4 parallelen

Versuchen nach Entfernen des Kulturmediums die Zellen durch Zugabe von 75 µl einer 4 %igen Formaldehyd-Lösung für 20 min bei RT am Kulturuntergrund fixiert. Nach Entfernen der Fixierlösung erfolgte die Färbung für 20 Minuten bei RT durch Zugabe von 75 µl einer 1 %igen Kristallviolett-Lösung (ad 70 % Ethanol). Die Kristallviolett-Lösung wurde entfernt und die Mikrotiterplatten zweimal in einem 2 L Becherglas mit Leitungswasser gewaschen und über Nacht auf Papiertüchern getrocknet. Unter dem Lichtmikroskop erschienen die so gefärbten Zellen blau/violett.

4.5. Herstellung von Extrakten aus Larven von *Lucilia sericata*

Die exakten Protokolle zur Anzucht der Larven und zur Herstellung des Extrakts sind Eigentum der Firmen Alpha-Biocare GmbH (Düsseldorf, Deutschland) und Agiltera GmbH & Co. KG (Dormagen, Deutschland), und wurden zur Verfügung gestellt. Sie unterliegen aufgrund der möglichen Anmeldung von Patenten der Geheimhaltung. Aus diesem Grund kann die hierfür verwendete Methodik nur teilweise dargelegt werden.

4.5.1. Anzucht von Larven von *Lucilia sericata*

Um eine möglichst gleichbleibende Qualität der Larven zu gewährleisten, wurden diese von einem auf die Zucht der Larven spezialisierten Hersteller (Agiltera GmbH & Co. KG Dormagen, Deutschland) bezogen. Es wurde mit jeder produzierten Larvencharge sichergestellt, dass es sich um die Larve III von *Lucilia sericata* handelt. Die Anzucht der Larven erfolgte nach GMP (*good manufacturing practice*) und eigens dafür entwickelten SOP (*standard operating procedures*). Hierzu zählten unter anderem die ständige Überwachung der Luftfeuchtigkeit und Temperatur im Zucht- und in den Lagerräumen, aber auch das Einhalten eines Tag-Nachtrhythmus während der Zucht. Die beim Transport getöteten oder nicht vital erscheinenden Larven wurden manuell aussortiert. Die gebrauchsfertigen Larven wurden in flüssigen Stickstoff eingestreut und in geeigneten Gefäßen bei -80°C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

4.5.2. Herstellung von Sterilfiltraten

Die Larven aus 4.5.1 wurden mit Wasser als Spüllösung (Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) extrahiert. Der Gewebsaufschluss erfolgte mit einer Messermühle (Grindomix GM 300, Retsch Technology GmbH, Haan, Deutschland). Im Wesentlichen erfolgten hiernach verschiedene Erhitzungs- und Zentrifugations-Schritte, um potenziell vorhandene Bakterien abzutöten, Enzyme, vor allem Proteinasen und etwaig vorhandene Viren, zu deaktivieren und Präzipitate und andere wasserunlösliche Bestandteile zu entfernen. Es

wurden eine Vielzahl von Filterpapieren, Filtercapsulen, Filterpads und Filterkerzen in verschiedenen nominalen und absoluten Abscheideraten kombiniert, um eine Kombination von Methoden und Materialien zu ermitteln, mit denen es möglich war, eine solche Menge an Extrakt herzustellen, die dazu ausreicht, einen oder mehrere Patienten über einen Zeitraum von etwa acht Wochen zu behandeln. Die Filtrationsleistung wurde mittels einer speziellen Apparatur anhand von Differentialdruck-Messungen vor und nach den Filtern und dem Gewicht des erzielten Filtrats gemessen (Abbildung 4). Zudem wurden die Extraktionsschritte so angepasst, dass diese so kurz wie möglich waren, damit die Vermehrung von potenziell vorhandenen Bakterien verhindert wird und um die manuelle Herstellung auf einen Arbeitstag zu beschränken. Das so erstellte Feinfiltrat wurde einer anschließenden Endpunktfiltration durch eine Filtercapsule mit einer absoluten Abscheiderate von $0,2\ \mu\text{m}$ (Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland) unter Reinraumbedingungen unterzogen. Fototafel 1 zeigt den Aufbau hintereinander geschalteter Filterelemente zur Erzeugung von Sterilfiltraten.

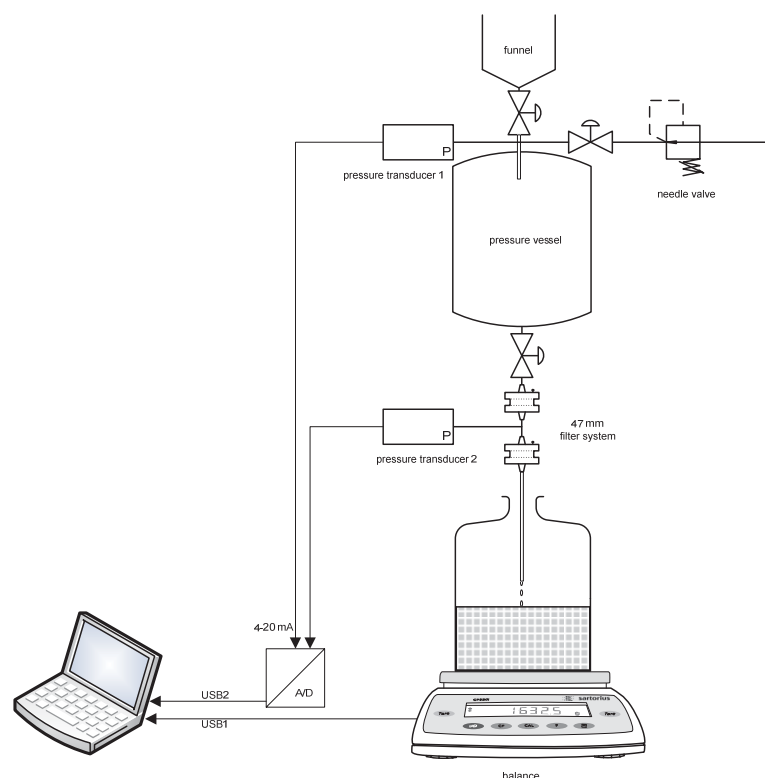
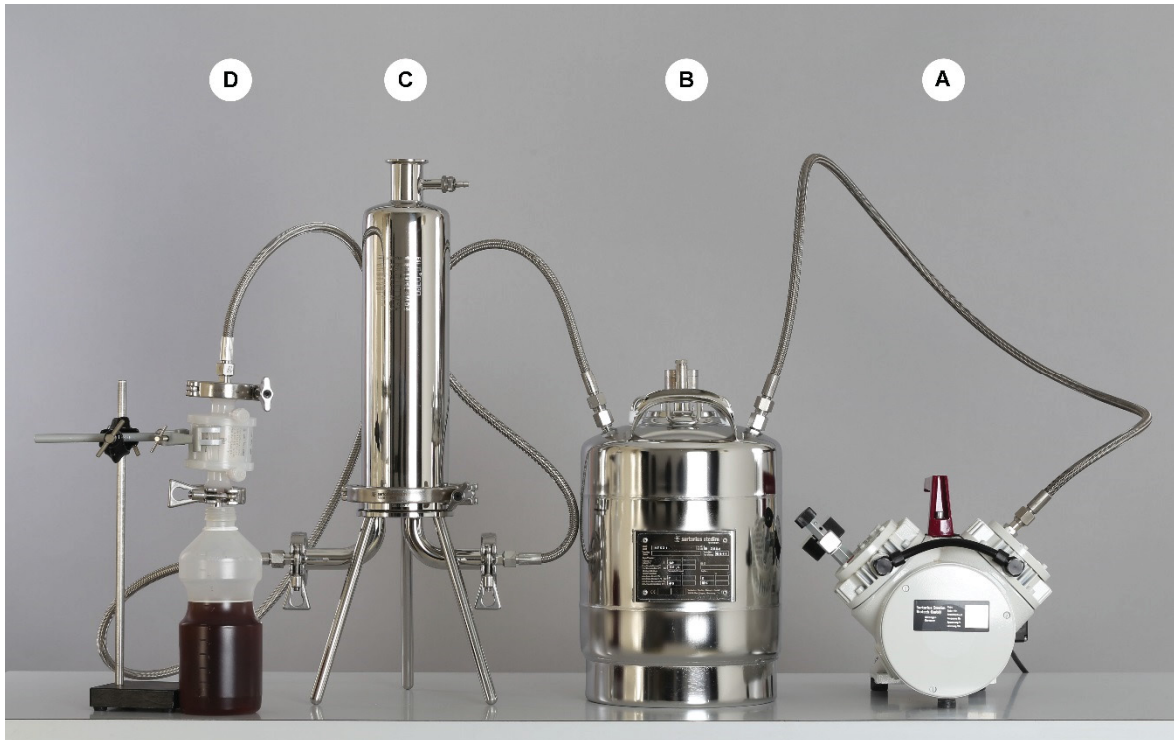


Abbildung 4: Aufbau einer Apparatur zur Ermittlung der Filterleistung. Die zu filtrierende Lösung (*funnel*) gelangt über ein Ventil in das Druckgefäß (*pressure vessel*), dem nach einem weiteren Ventil in druckdichten Filterhaltern (*47 mm filter system*) die zu testenden Filter nachgeschaltet sind. Über einen Analog-/Digitalwandler (A/D) können die anliegenden Drücke vor und nach dem Filter während der Filtration computergestützt mittels Drucksensoren (*pressure transducer*) aufgezeichnet werden. Gleichzeitig wird das Gewicht des Filtrats durch eine digitale Waage (*balance*) aufgezeichnet. Der Druck kann über eine beliebige Quelle erzeugt werden (*needle valve*). Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Sartorius Stedim Biotech GmbH (Göttingen, Deutschland).



Fototafel 1: Exemplarischer Filtrationsaufbau. In Filtrationsrichtung von rechts nach links: **A** = Vakuumpumpe; **B** = Druckausgleichsbehälter; **C** = Filterkerzengehäuse; **D** = Filtercapsule mit Auffangbehälter. Foto mit freundlicher Genehmigung von Steffen Köhler.

4.5.3. Gefriertrocknung der Sterilfiltrate

Um die Extrakte möglichst frei von Zusatzstoffen zu halten und möglichst lange lagerfähig zu machen, ohne dass Stoffe als Präservative zugefügt werden, ist es notwendig, dass im Extrakt vorhandene Wasser zu entziehen. Hierdurch kann erreicht werden, dass chemischen Reaktionen, die zu einem Abbau der im Extrakt enthaltenen Stoffe führen könnten und die bei Raumtemperatur spontan und in großer Geschwindigkeit ablaufen, die Reaktionsgrundlage entzogen wird und diese Prozesse verlangsamt werden. Die Gefriertrocknung wird zum einen zur Haltbarmachung sensibler Arzneimittel verwendet (Zimmer 2003), aber auch zu Aroma- und Geschmackspräservierung von Genussmitteln wie löslichem Kaffee (Hartung 1993). Hierzu wurde in der frühen Testphase das Sterilfiltrat in Glaskolben, Rollrandflaschen oder T-25 Zellkulturflaschen überführt, die dann durch Eintauchen in flüssigen Stickstoff schlagartig eingefroren wurden. Das Gefriertrocknen erfolgte zunächst mit einer Lyosystem I GT2 (Leybold-Heraeus, Hanau, Deutschland) Gefriertrocknungsanlage. Die Energiezufuhr erfolgte unkontrolliert ebenso wie das angelegte Vakuum. Die Belüftung der Vakuumkammer erfolgte per Raumluft, und die Proben wurden verschlossen bei -20°C gelagert.

Im späteren Verlauf der Extrakt-Entwicklung wurden die Extrakte, die für die Behandlung von Wunden eingesetzt werden sollten, in einem Gefriertrockner Modell 3x4x5 (Zirbus

technology GmbH, Bad Grund, Deutschland) getrocknet. Hierzu wurden spezielle Gefriertrocknungs-Vials aus Fiolax mit 3 ml Fassungsvermögen und Chlorbutyl-Stopfen zur Gefriertrocknung verwendet, die vor der aseptischen Befüllung zur Sterilisation einer γ -Strahlenbehandlung (Synergy Health Ede B.V, Ede, Niederlande) mit bis zu 10 kGy unterzogen wurden. Die Befüllung dieser Vials erfolgte unter Reinraumbedingungen. Das Einfrieren der befüllten Vials erfolgte bei dieser Methode direkt in der Gefriertrocknungsanlage. Durch die Verwendung von beheiz- bzw. kühlbaren Stellflächen in Verbindung mit Temperaturfühlern im Gefriergut sowie einer elektronischen Steuerung zur Regulation konnten die Trocknungen unter kontrollierten Bedingungen vollzogen werden. Ein geeignetes Protokoll für die Einstellung der verschiedenen Parameter musste empirisch ermittelt werden. Der Verschluss der Vials erfolgte unter evakuierten Bedingungen durch das hydraulischen Anheben der Stellflächen und den dadurch verbundenen mechanischen Verschluss. Die Vials wurden manuell durch Aufdrehen von Schraubkappen verschlossen, um ein ungewolltes Entfernen der Stopfen zu verhindern, mit Etiketten versehen und durch Verpackung in Umkartons gegen äußere mechanische Einwirkung geschützt und einer erneuten γ -Strahlenbehandlung (Synergy Health Ede B.V, Ede, Niederlande) unterzogen. Die so hergestellten gebrauchsfertigen Extrakte wurden nach dieser Behandlung, durch Resuspendierung in Kochsalzlösung und Ausplattieren auf Nährböden (Abschnitt 4.7.2) auf Sterilität überprüft.

4.5.4. Gewinnung der Exkrete/Sekrete von Fliegenmaden

Da eine Vielzahl der mutmaßlichen Wirkmechanismen der Madentherapie auf eine Akkumulation bestimmter biologisch aktiver Moleküle in den Exkreten/Sekreten zurückzuführen zu sein scheint, wurden diese bei einigen Experimenten in die Versuchsschemata mit einbezogen. Zur Gewinnung dieser wurde nach der Methode von Barnes et al. (2010) vorgegangen. Hierzu wurden Larven (Larve III) im Verhältnis 1 g/ml in demin. Wasser bei 30°C für eine 1 h inkubiert. Diese Lösung wurde 5 Minuten bei 7.826xg zentrifugiert und durch 0,2 μ m Filter filtriert. Die Lagerung erfolgte aliquotiert in der Gasphase eines Flüssigstickstofftanks.

4.6. Therapieversuch an menschlichen Patienten

Die Teilnahme aller Patienten an einem individuellen Heilversuch erfolgte freiwillig und ohne jede Art von Zwang. Die zuständige Ethikkommission hat nach Einreichung eines Ethikantrags ihre schriftliche Zustimmung zur Durchführung der Heilversuche an den Patienten, der Exsudat- und Abstrichnahme sowie der Generierung von wissenschaftlichen

Daten aus diesen Materialien und Ergebnissen sowie deren Veröffentlichung zugestimmt. Die Patienten wurden mündlich über das Studienprotokoll aufgeklärt und ihnen wurde eine schriftliche Version davon überlassen. Die Patienten haben ihre schriftliche Zustimmung zur Teilnahme gegeben und konnten diese auch jederzeit widerrufen und gegebenenfalls den Heilversuch abbrechen. Die Patienten unterlagen für die Dauer der Behandlung einer zusätzlichen Versicherung, die sie gegen etwaige Folgen der Behandlung absicherte. Die Behandlung der Patienten sowie die Probennahme erfolgte durch die Ärzte der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf und/oder durch geschultes und dazu befugtes Personal, durch den Patienten selbst und/oder einen Familienangehörigen. Die Veröffentlichung der Daten erfolgte und erfolgt in jedem Fall in anonymisierter Form.

4.6.1. Gewinnung und Asservierung von Exsudaten aus Ulcera von Patienten

Zur Gewinnung und späteren Analyse von möglichen Mediatoren der Wundheilung wurde Wundflüssigkeit (Exsudat) aus den Wunden der behandelten Patienten vor Beginn der Behandlung sowie in jeder Behandlungswoche gewonnen. Zur Gewinnung des Exsudats wurden nach Entfernen des Verbandsmaterials die Wunden zunächst mit steriler physiologischer Kochsalzlösung gespült und vorsichtig getrocknet. Von sterilen 200 ml Urinbechern (Sarstedt AG & Co., Nümbrecht) wurden die Böden an der 20 ml Markierung entfernt, so dass eine Umrandung entstand, die auf den Wundbereich gesetzt werden konnte. Die Wunden wurden dann für zwei Minuten durch Auftropfen einer physiologischen Kochsalzlösung benetzt und die Flüssigkeiten mit Spritzen abgezogen. Um die Exsudate für die anschließende Sterilfiltration zu klären, aber das Platzen der enthaltenen zellulären Bestandteile zu verhindern, wurden die Exsudate in geringem Schwerefeld bei 500xg für fünf Minuten zentrifugiert und die Überstände in neue Gefäße überführt. Die Überstände wurden anschließend durch Spritzenvorsatzfilter mit zunächst 0,45 µm und folgend 0,22 µm Porendurchmesser (VWR International GmbH, Langenfeld) und mit niedriger Proteinadsorptionsrate filtriert. Das Sterilfiltrat wurde dann in 100 µl und 500 µl Aliquots und speziellen Cryogefäßen zur tiefkalten Lagerung (VWR International GmbH, Langenfeld) portioniert und in der Gasphase eines Flüssigstickstofftanks gelagert. Ein Teil der Proben wurde bei -80°C gelagert.

4.7. Arbeiten mit Bakterien

4.7.1. Isolation, Differenzierung und Resistenztestung von Bakterien aus Patientenwunden

Die Abstriche der Patientenwunden erfolgten im OP-Bereich der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf durch die behandelnden Ärzte. Alle weiteren Arbeiten die zur Anreicherung und Isolation von Bakterien dienen, wurden im Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf durchgeführt.

Die Isolation der Bakterien erfolgte nach den mikrobiologisch-infektiologischen Qualitätsstandards (MiQ 6b) für Infektionen der Haut und der subkutanen Weichgewebe (Becker et al. 2013). Abstriche von Patientenwunden wurden mit sterilen eSwab™-Entnahmesystemen (Copan Flock Technologies srl., Brescia, Italien), bestehend aus einem Flockfaser-Abstrichtupfer und Amies-Medium, genommen. Diese Nylon-Tupfer haben gegenüber herkömmlichen Watte-Tupfern den Vorteil, dass sie das enthaltene Probenmaterial bei Kontakt mit einem Flüssigmedium vollständig abgeben und dieses nicht im Tupferkern verloren geht. Die Entnahme erfolgte durch Abrollen des Tupfers über einen ca. 1 cm² großen Wundbereich vom Wundrand und der Wundmitte mit der Methode von Levine et al. (1976). Die Tupfer wurden in das Flüssigmedium überführt und fest verschlossen. Die Tupfer wurden automatisiert auf Columbia-Agar mit 5 % Schafblut (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) und MacConkey-Agar (Oxoid Deutschland GmbH, Wesel, Deutschland) ausgestrichen und für 48 h bei 37°C inkubiert. Die Beurteilung und Differenzierung einschließlich Resistenztestung erfolgte durch die in der Diagnostik tätigen Ärzte und MTAs des Instituts. Die Wundabstriche wurden wie diagnostische Proben beurteilt und entsprechend differenziert. Die Identifizierung und Resistenztestung erfolgte automatisiert mittels VITEK II® (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) bzw. durch Agardiffusion bei Pseudomonaden. Die Beurteilung der Resistenzen erfolgte nach CLSI (*Clinical and Laboratory Standards Institute*) (CLSI 2014). Die Bakterienisolate wurden wöchentlich auf neue Kulturplatten überimpft.

4.7.2. Vorkultur von Bakterien

Columbia-Agar Platten mit 5 % Schafblut (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) wurden mit je 3 bis 5 Kolonien der Dauerkulturen der jeweiligen Isolate durch Ausstreichen angeimpft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Einstellung der Zellzahl erfolgte spektralphotometrisch nach der Methode von McFarland (McFarland 1907) in physiologischer Kochsalzlösung. Die Suspensionen wurden auf 0,5° McFarland eingestellt

(DensiCHEK™ plus, bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland), was einer ungefähren Zellzahl von $1,5 \times 10^8$ Zellen entspricht. Die so gewonnene Bakteriensuspension wurde innerhalb von 20 Minuten für die weiteren Versuche verwendet.

4.7.3. Agardiffusionstest auf Wachstumsinhibition

Columbia-Agar Platten mit 5 % Schafblut (bioMérieux Deutschland GmbH, Nürtingen, Deutschland) wurden mittels steriler Baumwolltupfer mit den Bakteriensuspensionen aus Abschnitt 4.7.2 angeimpft. Sterile und unbeschickte Filterplättchen (Sensi-Disc™, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland) wurden mit 10 µl der zu testenden Substanz beschickt, und auf die präparierten Columbia-Agar so platziert, dass ausreichend Abstand zwischen den verschiedenen Plättchen bestand. Die so angerfertigten Versuchsansätze wurden 24 h bei 37°C inkubiert und die dabei entstandenen Hemmhofdurchmesser, sofern vorhanden, mit einer Schieblehre ausgemessen.

4.7.4. Microbroth dilution assay zum Test auf Wachstumsinhibition

Die bakteriellen Isolate wurden wie in 4.7.2 vorkultiviert und je nach Wachstumseigenschaften zehnfach weiter vorverdünnt, so dass nach Inkubation eine OD_{600nm} von maximal 2 erreicht werden konnte. Der Madenextrakt wurde direkt in TSB (Tryptische Soja Bouillon) gelöst. Piperacillin/Tazobactam (Pfizer Deutschland GmbH, Berlin, Deutschland) wurde zunächst nach Herstellerangabe in isotonischer Kochsalzlösung gelöst und aliquotiert bei -80°C als Stammlösung gelagert. Die weiteren Verdünnungen wurden mit TSB durchgeführt. Die in 4.5.4 gewonnenen Exkrete/Sekrete der Larven wurden unter aseptischen Bedingungen entweder mit einem Zehntel Volumen zehnfach konzentrierter oder mit einem Zehntel Volumen einfacher TSB versetzt. Der lyophilisierte Madenextrakt wurde direkt im Kulturmedium gelöst.

Jeweils 100 µl der in TSB befindlichen Substanz wurden in unbehandelten Polystyrol Rundboden-Mikrotiterplatten (Corning Incorporated Life sciences, Acton, USA) als Triplikate vorgelegt und mit 5 µl der jeweiligen Bakteriensuspension aus 4.7.2 inokuliert. Als Referenz und zur Überprüfung der Sterilität der verwendeten Medien und Ansätze wurden parallel hierzu Triplikate identischer Ansätze ohne Inokulation angefertigt. Die Platten wurden bei 37°C für 24 h inkubiert und die Messung der Trübheit erfolgte spektralphotometrisch (Modell Sunrise™, Tecan Group Ltd., Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 600 nm abzüglich der klaren Vehikel-Kontrollen.

4.7.5. Mikrotiter Biofilm-Formierungsassay

Bei den Versuchen zur Ermittlung einer Einflussnahme von Madenextrakten auf die Bildung bakterieller Biofilme wurde in Anlehnung an die Methode von van der Plas et al. (2008) vorgegangen, die wiederum auf der Methode von O'Toole und Kolter (1998) beruht. Die lyophilisierten Madenextrakte wurden in Biofilm-Medium aufgenommen bzw. die Piperacillin/Tazobactam Stammlösung wurde in Biofilm-Medium verdünnt. 100 µl dieser Lösungen bzw. Biofilm-Medium alleine wurden in Rundboden-Mikrotiterplatten (Modell Falcon™, Corning Incorporated Life sciences, Acton, USA) vorgelegt. Bakterienkulturen wurden wie in 4.7.2 vorkultiviert und für einige Bakterienisolate zehnfach weiter verdünnt. Einige Isolate zeigten nach dem gewählten Testzeitraum von 24 h eine geringe Biofilmbildung und wurden nicht weiter vorverdünnt. Die Versuchsansätze wurden mit je 5 µl der Bakterien-Suspensionen angeimpft. Die Inkubation erfolgte für 24 h bei 37°C. Nach diesem Zeitraum wurde das Medium entfernt und die Kavitäten der Mikrotiterplatten dreimal mit jeweils 300 µl Leitungswasser gespült. Im Anschluss hieran wurden 125 µl einer 1 %igen ethanolischen Kristallviolett-Lösung in jede Kavität gegeben und für 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Entfernen der Kristallviolett-Lösung wurde weitere viermal mit 300 µl Leitungswasser gewaschen, so dass augenscheinlich keine Blaufärbung der Spüllösung mehr zu sehen war. Die so angefärbten Biofilme wurden fotografisch dokumentiert. Die Kavitäten wurden mit 200 µl einer 30 %igen Essigsäure versetzt und es wurde für weitere 15 Minuten inkubiert (Abbildung 5). Die Lösungen wurden in frische Flachboden-Mikrotiterplatten übertragen und die Absorptionen bei einer Wellenlänge von 570 nm und einer Referenzwellenlänge von 620 nm gemessen.

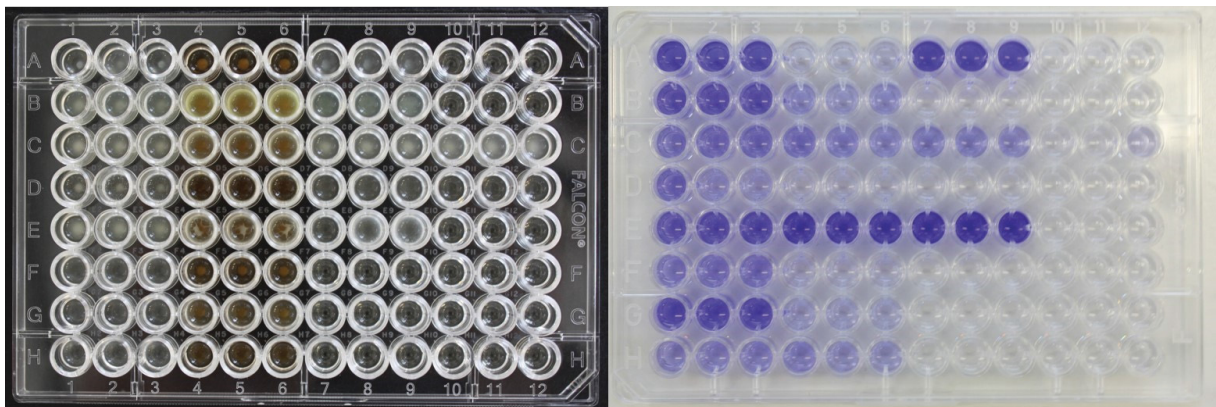


Abbildung 5: Aufbau von Biofilm-Experimenten. Auf der linken Abbildung sind die in Biofilm-Medium gewachsenen Biofilme zu sehen (Spalte 1 bis 3, 4 bis 6, 7 bis 9 und 10 bis 12 jeweils als Triplikate desselben Versuchs. In den Zeilen A bis H befinden sich jeweils unterschiedliche Isolate). Die rechte Abbildung zeigt den aus den Biofilmen extrahierten und in 30 %iger Essigsäure gelösten Farbstoff (Kristallviolett).

4.8. Proteinbiochemische Methoden

4.8.1. Ermittlung von Proteinkonzentrationen

Die Ermittlung von Proteinkonzentrationen erfolgte mit dem BCA-Assay (*bicinchoninic acid assay*) nach der Methode von Smith et al. (1985) unter Verwendung des „*Micro BCA Protein Assay Kit*“ (Thermo Fischer scientific, Oberhausen, Deutschland). Hierzu wurden 5 bzw. 10 µl der zu messenden Probe auf 500 µl mit demin. Wasser aufgefüllt und mit weiteren 500 µl der Reaktionsansätze gemischt und für 60 Minuten bei 60°C inkubiert. Die Messungen erfolgten als Triplikate der 5 und 10 µl Proben bei einer Wellenlänge von 562 nm spektralphotometrisch (Beckman Du-640, Beckman Coulter GmbH, Krefeld, Deutschland). Die Bestimmung der Proteinkonzentrationen erfolgte anhand der Mittelwerte der Messwerte an einer nach Herstellerangaben bestimmten Eichkurve bekannter Proteinstandards (bovines Serum Albumin).

4.8.2. Ermittlung spezifischer Proteinkonzentrationen mittels Proteinmicroarray

Die Wundexsudate aus 4.6.1 wurden nach deren Asservierung auf das Vorhandensein der Matrixmetalloproteinasen (MMP) MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-9, MMP-10, MMP-13 sowie deren Inhibitoren TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 mittels Objektträger basierendem Microarray *Human MMP Array Q1* (Raybiotech Inc., Norcross, USA) untersucht. Im Wesentlichen handelt es sich hierbei um einen multiplexen Sandwich-ELISA bei dem ein quantitativer, spezifischer Antikörpernachweis eines bestimmten Antigens erfolgt, mit dem Vorteil, dass beim Einsatz geringer Probenmengen gleichzeitig mehrere Antigene analysiert werden können. Hierzu wurde nach Herstellerangaben vorgegangen. Für das Messen der Analyte wurden 100 µl der verschiedenen Proben je nach Proteinkonzentration verdünnt oder unverdünnt auf den Array aufgetragen und für 20 h bei 4°C inkubiert. Nach Entfernen der Proben wurde die Arrayoberfläche fünfmal mit dem im Kit enthaltenen Waschpuffer I und zweimal mit Waschpuffer II für jeweils 5 Minuten unter leichtem Rütteln gewaschen. Nach Zugabe des Zweitantikörpers wurde für weitere 20 h bei 4°C inkubiert. Nach erneutem Waschen der Arrayoberfläche erfolgte die Zugabe eines Streptavidin konjugierten Cy3 äquivalenten Farbstoffes für 60 min in Dunkelheit. Nach Entfernen des ungebundenen Farbstoffes erfolgten weitere Waschschrte und die Trocknung der Arrays durch Zentrifugation bei 500xg. Die Messung der Fluoreszenz wurde mit einem GenePix 4000B Microarray-Scanner (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, USA) bei einer Wellenlänge von 532 nm und einer Pixelgröße von 20 durchgeführt. Die Erfassung der Daten erfolgte mittels der Software GenePix Pro Ver. 6.0.1.08 (Molecular Devices LLC, Sunnyvale, USA) bei einer Laserleistung von 33 % und einer PMT-Spannung von 600 Volt.

Die Zuordnung der einzelnen Messpunkte wurde halbautomatisch durch Verwendung einer Koordinatendatei des Herstellers und durch manuelle Überprüfung/Korrektur jedes einzelnen Messpunkts verwirklicht. Die Subtraktion der Fluoreszenz des Hintergrunds erfolgte radiär für jedes Feature. Jeder Array auf jedem Objektträger enthielt zwei als Quadrupel aufgebrauchte Sätze von Kontrollversuchen (POS1, POS2), die zur Normalisierung jedes Arrays verwendet wurden.

Hierzu wurde zunächst aus den Mittelwerten (MW) von POS1 und POS2 eines ohne Probenmaterial durchgeführten Arrays (ArBI) ein Quotient als Referenzfaktor (RF) gebildet:

$$RF = \frac{MW_{ArBIPOS1}}{MW_{ArBIPOS2}}$$

Durch die POS1 und POS2 Messwerte der mit Probenmaterial beladenen Arrays (ArPr) und den Referenzfaktor kann ein Erwartungswert (EW) formuliert werden

$$EW = \frac{MW_{ArPrPOS1} + MW_{ArPrPOS2} * RF}{2}$$

mit dessen Hilfe dann für reale Messwerte (X_{real}) normalisierte Werte (X_{norm}) mit

$$X_{norm} = X_{real} * \frac{MW_{ArBIPOS1}}{EW}$$

ermittelt werden können (Angaben nach Hersteller). Unter Zuhilfenahme von nach Herstellerangaben angefertigten Eichkurven für die verschiedenen MMP und TIMP ließen sich anhand der normalisierten Messwerte die unbekanntes spezifischen Proteinkonzentrationen im Probenmaterial ermitteln. Es erfolgte hieraus die Berechnung der Mittelwerte (arithmetisches Mittel) sowie der Standardabweichung.

5. Ergebnisse

5.1. Herstellung lyophilisierter Extrakte aus Fliegenmaden

Um einen Extrakt aus Fliegenmaden herzustellen, der einer problemlosen Sterilfiltration unterzogen werden kann, wurde eine Vielzahl verschiedener Arbeitsschritte in diversen Versuchsansätzen durchgeführt. Die Ergebnisse der unterschiedlichen Versuchsaufbauten von generellen Machbarkeitsversuchen sind in Tabelle 1 zusammengefasst. Ziel war es, zunächst eine Methode zu entwickeln, mit der es möglich ist kleinere Mengen Fliegenmaden (ca. 50 bis 200 g) zu extrahieren und einer möglichst verlustfreien Sterilfiltration zuzuführen, um diese dann später auf eine Menge hochzurechnen, mit der eine solche Menge Extrakt herzustellen war, die ausreichte, um eine Serie von bis zu zehn Patienten zu behandeln, sowie weitere Laborversuche mit exakt dieser Charge zu ermöglichen. Zudem sollte die Herstellungsdauer aufgrund der Verwendung biologischer Materialien möglichst kurz sein und eine Zentrifugation nach Möglichkeit vermieden werden.

Der einfache Gewebeaufschluss mit einem Stab-Homogenisator mit Rotor/Stator-Prinzip (Ultra-Turrax T25, IKA®-Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland) mit nachgeschaltetem Abpressen durch Mullkompressen (Tabelle 1, Prozess 1) ermöglichte eine schnelle und effektive Separation der groben Feststoffe von den flüssigen Bestandteilen. Der darauf folgende Erhitzungsschritt hatte die Bildung erheblicher Mengen Präzipitats zur Folge, die über diverse Filterkombinationen üblicher quantitativer und qualitativer Laborfilter im Membranformat mittels Gravitation entfernt wurden. Hierdurch konnte eine anteilige Klärung des Filtrats erreicht werden. Das grobe Filtrat war jedoch nur im Ansatz sterilfiltrierbar. Das Vertauschen des zweiten und dritten Arbeitsschritts (Prozess 2) verschlechterte die Filtrierbarkeit durch Sterilfilter mit nominalen Abscheideraten von 0,45/0,22 µm.

In einem dritten Prozess wurde die Homogenisierung mittels Stab-Homogenisators durch die steuerbare Zerkleinerung in einer Messermühle ersetzt und ein weiterer Erhitzungsschritt dem Prozess hinzugefügt. Nach dieser weiteren Präzipitation wurde erneut mittels Gravitation durch verschiedene Faltenfilter filtriert, bis ein augenscheinlich klares Filtrat erzeugt wurde, das aber noch nicht vollständig sterilfiltrierbar war. Im Folgenden wurden neben Faltenfiltern verschiedene 10“ Filterkerzen aus verschiedenen Materialien und verschiedener Hersteller für Testfiltrationen verwendet unter anderem aus Edelstahl (Membranfilter), Polyethylen (Tiefenfilter), Polypropylen (Tiefenfilter) sowie mit gebundener und bindemittelfreier Glasfaser. Im Anschluss daran wurde zusätzlich durch

Glasfaserfilterscheiben mit einer nominalen Abscheiderate von 3 und 1 μm filtriert. Hierdurch zeigte sich eine deutlich verbesserte Filtrierbarkeit durch Filter mit nominalen Abscheideraten von 0,45/0,22 μm .

Tabelle 1: Übersicht verschiedener Arbeitsschrittkombinationen zur Extrakt-Herstellung.

Arbeitsschritt	Prozess 1	Prozess 2	Prozess 3	Prozess 4	Prozess 5
1 Aufschluss	Rotor/Stator	Rotor/Stator	Messermühle	Messermühle	Messermühle
2	Abpressen (manuell)	Erhitzen 60°C	Erhitzen 60°C	Erhitzen 60°C	Erhitzen 60°C
3	Erhitzen 60°C	Abpressen (manuell)	Abpressen (mechanisch)	Abpressen (mechanisch)	Zentrifugation
4	Filtrationen (Gravitation)	Filtrationen (Gravitation)	Erhitzen > 60°C	Erhitzen > 60°C	Erhitzen > 60°C
5	Filtrationen (Druck)	Filtrationen (Druck)	Vorfiltrationen (Gravitation)	Zentrifugation	Zentrifugation
6			Vorfiltrationen (Sog)	Vorfiltrationen (Sog)	Vorfiltrationen (Druck)
7			Endpunktfiltration (Druck)	Endpunktfiltration (Druck)	Filtration (Druck)

Mit dieser Prozessanordnung wurde zwar eine Endpunktfiltration erzielt, jedoch konnte selbst bei kleinen Volumina (100 ml) ein vollständiges Verblocken der Filter nicht verhindert werden. Zudem zeigte sich in Wiederholungsversuchen, dass sich das Verblocken nach verschiedenen Filtrationsvolumina einstellte. Die Filtration mit Differentialdruckmessung mit vergleichbaren industriellen Filtern (Abbildung 6, PP2+SP2) zeigte ein nahezu sofortiges Verblocken der verwendeten Sterilfilter, die über absolute Abscheideraten von 0,2 μm verfügten.

In den darauf folgenden Versuchsansätzen wurden die nur wenig standardisierbaren bzw. aufwendigen Arbeitsschritte des mechanischen Abpressens und das gravitationsgestützte Filtrieren durch Falten-/Membranfilter über einen vierten Prozess hin zu einem fünften Prozess ersetzt. Nachdem eine Methode zur grundlegenden Machbarkeit einer solchen Extraktion entwickelt worden war, konnte im Folgenden mittels Differentialdruckmessungen der tatsächliche Verlust der Filterleistung an den jeweiligen Filtern ermittelt werden.

In Abbildung 6 sind Filtrationsversuche unter Verwendung verschiedener industrieller Filter in verschiedenen Kombinationen zusammengefasst. Angesichts des zu filtrierenden Testvolumens von ca. 0,2 L bei einer Filterfläche von 13,5 cm² pro Filter zeigten Polypropylen Tiefenfilter, Polyethersulfon Membranfilter und die Kombination aus Glasfaser Tiefenfilter mit nachgeschaltetem Polyethersulfon Membran-Sterilfilter eine für das Volumen nicht ausreichende Filtrationsleistung.

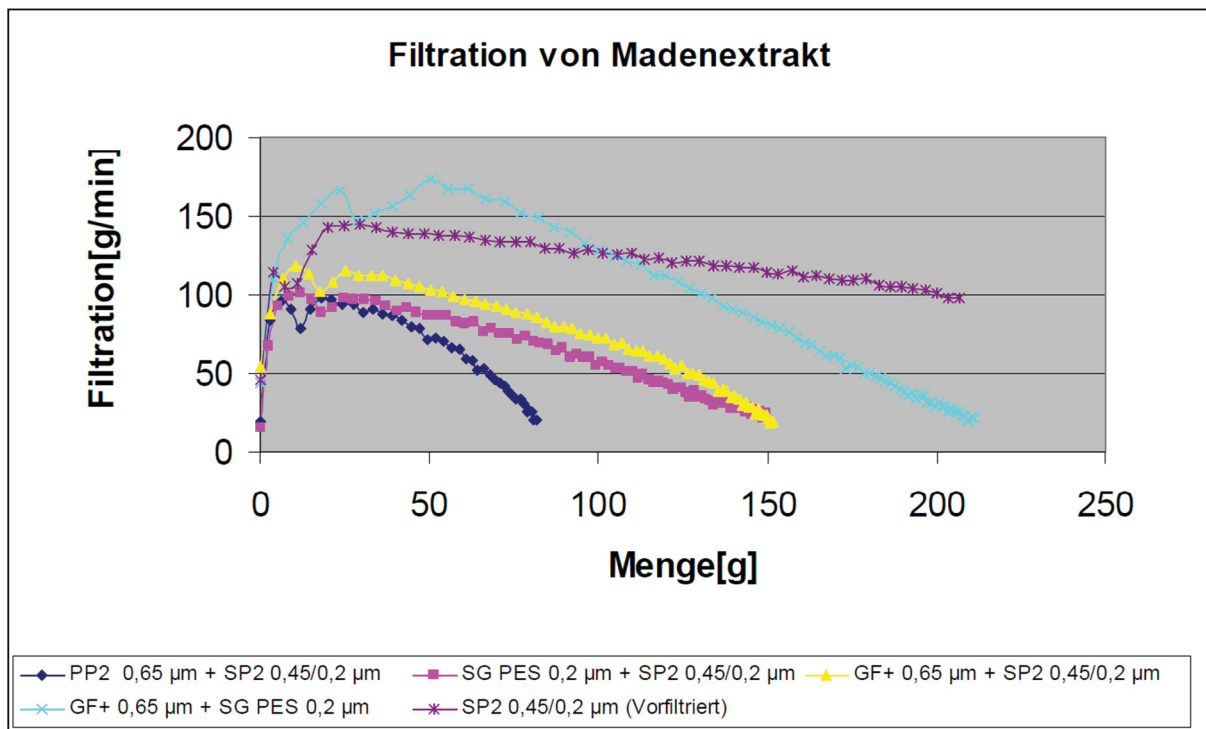


Abbildung 6: Filtration von Madenextrakt unter Verwendung verschiedener Filterkombinationen. PP2 = Sartopure PP2 / Tiefenfilter / Polypropylen; GF+ = Sartopure GF+ / Tiefenfilter / Glasfaser; SG PES = Sartoguard PES / Membranfilter als Vorfilter / Polyethersulfon; SP2 = Sartopore 2 / Membranfilter / Sterilfilter / Polyethersulfon. Abbildung mit freundlicher Genehmigung der Sartorius Stedim Biotech GmbH, Göttingen, Deutschland. Autoren: Ralf Marialke und Dr. Nicole Merforth.

Die Kombination aus Glasfaser Tiefenfilter gefolgt von einem Polyethersulfon-Membranfilter mit nominaler Abscheiderate von 0,2 µm mit anschließender Endpunktfiltration durch Polyethersulfon-Membranfilter mit absoluten Abscheideraten von 0,45 und 0,2 µm lieferte eine Kombination aus Filtermaterialien, die eine ausreichende Filtrationsleistung für das Zielvolumen von 0,2 L lieferte. Auf Grundlage dieser Daten konnte die für größere Volumina benötigte Filterfläche geschätzt und sterile Filtercapsulen zur Herstellung pharmakologischer Produkte für die Extrakterstellung ausgewählt werden.

Um den so erzeugten Sterilfiltraten schonend das enthaltene Wasser zu entziehen, wurden diese in 2 ml Aliquots verschiedenen Gefriertrocknungsprotokollen unterzogen (Abschnitt 4.5.3).

Aufgrund der hohen Schichtdicken des zu erzielenden Gefrierkuchens, wurde hierfür ein langsames Protokoll entwickelt (Tabelle 2). Zudem musste der Gefrierpunkt des Filtrats für ein angemessenes Protokoll zunächst empirisch ermittelt werden.

Tabelle 2: Gefriertrocknungsprotokoll eines Madenextrakts.

Phase	Kammerdruck [mbar]	Temperatur Stellflächen [°C]	Dauer [min]
Einfrieren	Normaldruck	Bis -80°C	120
Haupttrocknung	0,120	-30	240
	0,120	-25	240
	0,120	-20	240
	0,120	-15	120
	0,120	-10	120
	0,120	-5	120
	0,120	5	120
	0,120	10	120
	0,120	15	120

Ein zu schnelles Zuführen von Energie führte zu unzureichender Trocknung, was entweder zu einem vollständigen Zusammenbruch des Trocknungskuchen führte (Fototafel 2B) oder ein Abreißen des Kuchens von den Wänden der Glasgefäße bewirkte. Die biologischen Eigenschaften dieser Lyophilisate wurden, wie in 4.4.4 beschrieben, untersucht. Die Abbildung 7 zeigt den Verlauf einer gelungenen Trocknung und die Fototafel 2A den hierbei erzielten Gefriertrocknungskuchen.

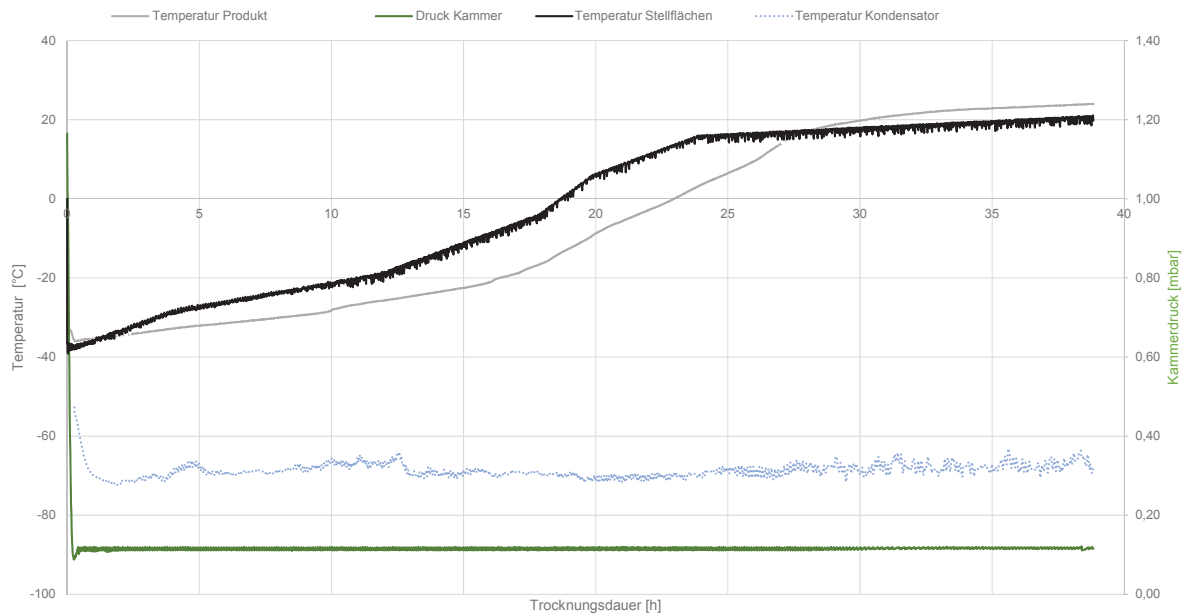
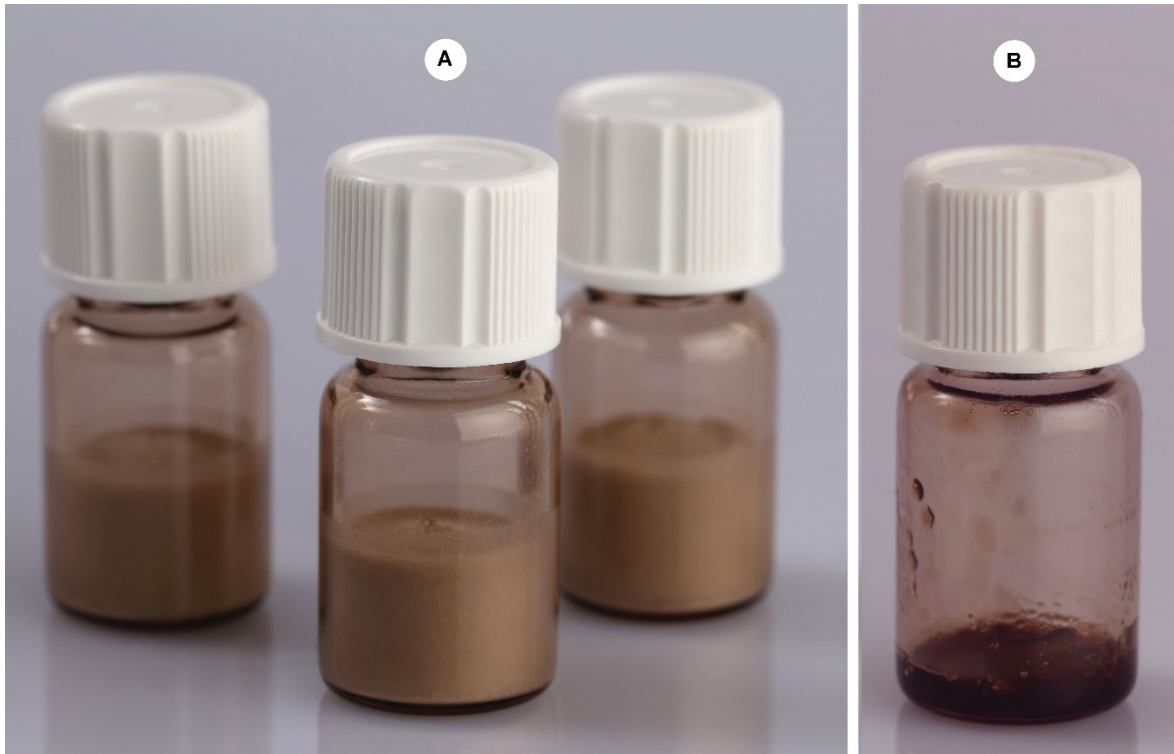


Abbildung 7: Typischer Verlauf der Gefriertrocknung eines Madenextrakts. Nach dem Einfrieren wurde ein Vakuum von 0,120 mbar angelegt. Durch kontrolliertes Erwärmen der Stellflächen wurde die zur Sublimation von Wasser notwendige Energie stufenweise hinzugefügt. Das direkt in den gasförmigen Zustand übergegangene Wasser schlägt dann am deutlich kälteren Kondensator (ca. -70°C) nieder. Die grüne Linie gibt an der sekundären y-Achse den Kammerdruck wieder. Blaue Punkte zeigen die Kondensator-Temperatur. Die schwarze und die graue Linie zeigen die Temperaturen der Stellflächen bzw. die durchschnittliche, über gleichmäßig verteilte Temperaturfühler ermittelte, Produkt-Temperatur.

Die in Gläschen befindlichen, im Vakuum verschlossenen und einer γ -Strahlen-Behandlung unterzogenen Lyophilisate zeigten bei Resuspendierung in Wasser und in den verwendeten Kulturmedien eine vollständige und spontane Lösungsfähigkeit. Die Kontrolle auf bakterielles Wachstum durch Resuspendierung in Bakterien-Anreicherungsmedium zeigte bei der Inkubation in Flüssigmedium und in der Kultur auf Nährböden keine Anzeichen für ein bakterielles Wachstum. Dies war unmittelbar nach der γ -Strahlen-Behandlung und zu allen Testzeitpunkten nach drei, sechs und zwölf Monaten Lagerung der Fall.



Fototafel 2: Gefriergetrockneter Madenextrakt in 3,5 ml Glas-Vials. A = Erfolgreich lyophilisierter Madenextrakt mit einheitlich ausgebildeten Gefrier Trocknungskuchen, der sich nicht von der Glaswand ablöst. B = Kollabierter Gefrier Trocknungskuchen nach nicht ausreichender Trocknung.

5.2. Aus Patientenwunden isolierte Bakterienspezies

Im Laufe der Therapieversuche der Patienten wurden vor und in zweiwöchigem Abstand während der Behandlung Abstriche vom äußeren Wundrand sowie im Bereich der Wundmitte genommen. Die verschiedenen Bakterienspezies wurden, wie in Abschnitt 4.7 beschrieben, kultiviert und zur Erstellung von Antibiotikaresistenzprofilen in Form von Antibiogrammen verwendet. Die Wunden waren dauerhaft oder intermittierend mit verschiedenen bakteriellen Spezies besiedelt. Die Unterscheidung von Isolaten der gleichen Spezies erfolgte anhand der Antibiogramme. Die am häufigsten isolierten Bakterienspezies waren *Pseudomonas aeruginosa* (aus Wunden von 7 von 10 Patienten), *Staphylococcus aureus* (aus 6 von 10 Patientenwunden) und *Proteus mirabilis* (aus 2 von 10 Patientenwunden) (Abbildung 8). Alle *S. aureus*-Isolate erwiesen sich als methicillinsensitiv (MSSA). Die Spezies *Achromobacter xylosoxidans*, *Enterococcus faecalis*, *Citrobacter koseri*, *Providencia rettgeri*, Streptokokken der Gruppe G und *Klebsiella pneumoniae* wurden jeweils nur aus Wunden eines Patienten isoliert. Neben diesen Einfach- und Mehrfachbefunden beinhalteten die Abstriche (teilweise zeitlich vorübergehend) andere bakterielle Spezies, die Teil der Hautflora sind und daher nicht für weitere Analysen und Bewertungen verwendet wurden.

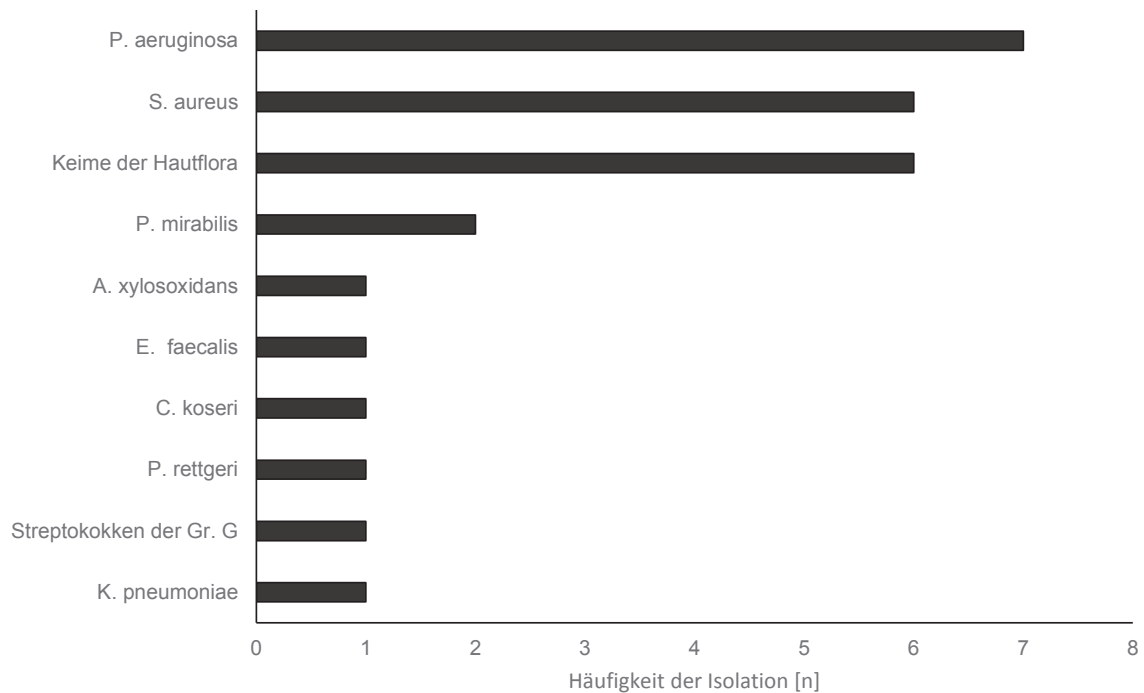


Abbildung 8: Häufigkeiten verschiedener Bakterienspezies aus Patientenwunden während des Behandlungszeitraums. Vor Beginn der Behandlung und in jeder zweiten Behandlungswoche wurde Abstriche von den Wundrändern und der Wundmitten der Patientenwunden genommen und die darin enthaltenen Bakterienspezies mittels Standardmethoden kultiviert und isoliert. Die Charakterisierung als individuelles Isolat erfolgte über die jeweiligen Antibiogramme.

5.3. Bakterielle Besiedlungen der Patientenwunden im Behandlungsverlauf

5.3.1. Patient 1

Der erste Patient zeigte vor Beginn des Heilversuches sowohl in der Wundmitte als auch im Bereich des Wundrands eine identische Bakterienflora, die aus *Achromobacter xylosoxidans*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis* und anderen Bakterienspezies der Hautflora bestand (Tabelle 3). Die Intensität der Besiedlung der Wunde war jedoch in der Wundmitte bei *A. xylosoxidans* und *E. faecalis* tendenziell höher. Im Wesentlichen konnte während der Behandlung mit Madenextrakt eine kontinuierliche Abnahme der wundbesiedelnden Bakterien nachgewiesen werden. Bereits nach zwei Wochen Behandlung konnten *A. xylosoxidans* und *E. faecalis* weder am Wundrand noch in der Wundmitte nachgewiesen werden. Dieser Zustand hatte Bestand bis zur letzten Probenahme nach sechs Wochen. Die Besiedlung durch *P. mirabilis* und *P. aeruginosa* war nach vier Wochen Behandlung auf ein sehr geringes Niveau reduziert. Nach vier Wochen Behandlungsdauer konnte *S. aureus* in geringer Intensität sowohl am Wundrand als auch in der Wundmitte nachgewiesen werden. Aufgrund fehlender lokaler Infektionszeichen wurde der *S. aureus* Nachweis als Kolonisation bewertet. Eine

Probennahme nach acht Wochen war allerdings aufgrund der weiteren therapeutischen Behandlung in Form einer Spalthauttransplantation nicht möglich. Aufgrund der unterschiedlichen Antibiotogramme der *P. aeruginosa* Isolate, wurde angenommen, dass es sich um zwei unterschiedliche Isolate handelte.

Tabelle 3: Isolierte Bakterienspezies aus Wunden von Patient 1 im Behandlungsverlauf.

Dauer der Behandlung (Wochen)	0		2		4		6	
	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte
<i>A. xylosoxidans</i>	++	+++	-	-	-	-	-	-
<i>E. faecalis</i>	+	++	-	-	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	+	+	+++	++	-	-	+	-
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	+	++	+	+	±	+
Keime der Hautflora	0	-	0	0	-	-	-	-
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	±	+

+++ = reichlich; ++ = mäßig; + = vereinzelt; ± = ganz vereinzelt; - = keine Kolonien; 0 = keine Intensität

5.3.2. Patient 2

Die Besiedlung der Wunden von Patient 2 bestand vor Beginn der Behandlung aus *P. aeruginosa*, *S. aureus* und *Citrobacter koseri*. Für *P. aeruginosa* und *S. aureus* war diese Besiedlung am Wundrand zunächst etwas ausgeprägter, während für *C. koseri* sich die Besiedlung in der Wundmitte als ausgeprägter erwies (Tabelle 4). Sowohl am Wundrand, als auch in der Wundmitte konnten dieselben Bakterienspezies isoliert werden. Die Besiedlung durch *P. aeruginosa* und *C. koseri* nahm sowohl am Wundrand als auch der Wundmitte zunächst etwas zu, ging aber gegen Ende der Behandlung auf das Ausgangsniveau zurück. *S. aureus* konnte bereits ab der 2. Behandlungswoche weder am Wundrand noch in der Wundmitte nachgewiesen werden. Die Antibiotogramme der isolierten Spezies (Tabelle 15; Anhang) wiesen keine besonders ausgeprägten Antibiotikaresistenzen auf. Eine Probennahme in der achten Behandlungswoche konnte aufgrund einer Therapieumstellung nicht durchgeführt werden.

Tabelle 4: Isolierte Bakterienspezies aus Wunden von Patient 2 im Behandlungsverlauf.

Dauer der Behandlung (Wochen)	0		2		4		6	
	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte
<i>P. aeruginosa</i>	++	+	+++	+++	++	++	-	++
<i>S. aureus</i>	++	+	-	-	-	-	-	-
<i>C. koseri</i>	++	+++	+++	+++	++	++	++	++

+++ = reichlich; ++ = mäßig; + = vereinzelt; ± = ganz vereinzelt; - = keine Kolonien; 0 = keine Intensität

5.3.3. Patient 3

Die Wunde des 3. Patienten zeigte zu Beginn der Behandlung eine ausgeprägte Besiedlung sowohl des Wundrands als auch der Wundmitte mit *P. aeruginosa* sowie mit im Behandlungsverlauf auftretenden anderen Keimen der Hautflora (Tabelle 5). Das *P. aeruginosa* Isolat erwies sich als resistent gegen drei von vier Leitsubstanzen (Acylureidopenicilline, Cephalosporine der dritten und vierten Generation sowie Chinolone), jedoch sensibel gegenüber allen getesteten Carbapenemen und war daher als 3MRGN (multiresistente gramnegative Stäbchen) einzustufen (Tabelle 16; Anhang). Die Behandlung wurde in der 3. Woche abgebrochen, so dass keine weiteren Proben genommen werden konnten.

Tabelle 5: Isolierte Bakterienspezies aus der Wunde von Patient 3 im Behandlungsverlauf.

Dauer der Behandlung (Wochen)	0		2	
	Rand	Mitte	Rand	Mitte
Isolat				
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	+	++
Keime der Hautflora	-	-	-	++

+++ = reichlich; ++ = mäßig; + = vereinzelt; ± = ganz vereinzelt; - = keine Kolonien; 0 = keine Intensität

5.3.4. Patient 4

Zu Beginn der Behandlung des vierten Patienten war die behandelte Wunde im Bereich der Wundmitte und des Wundrands mit *P. aeruginosa* besiedelt. Das Isolat zeigte keine Antibiotikaresistenzen (Tabelle 16; Anhang). Da die Behandlung mit Madenextrakt vor der nächsten Probennahme nach zwei Wochen abgebrochen wurde, lagen keine weiteren Daten bezüglich der bakteriellen Besiedlung vor.

5.3.5. Patient 5

Die Wunde von Patient 5 war zu Beginn der Behandlung mäßig stark mit *P. aeruginosa* sowohl am Wundrand als auch in der Wundmitte besiedelt. Diese Besiedlung ging in den ersten vier Wochen der Behandlung kontinuierlich zurück (Tabelle 6). Zwischen der vierten und sechsten Behandlungswoche kam es vorübergehend zu einer Besiedlung durch *S. aureus*, was in der achten Behandlungswoche nicht mehr nachgewiesen werden konnte. Im gleichen Zeitraum kam es aber zu einer erneuten Besiedlung durch *P. aeruginosa*. Aufgrund des Resistenzprofils wurde angenommen, dass es sich bei dem zweiten Isolat um ein anderes Isolat handelte. Beide Isolate traten in der Wundmitte und am Wundrand auf. In der ersten und zweiten sowie der sechsten und achten Behandlungswoche konnten andere Keime der Hautflora vereinzelt isoliert werden. Das *P. aeruginosa* Isolat (initial) war

sensibel für alle getesteten Antibiotika (Tabelle 16; Anhang). Das zwischen Behandlungswoche sechs und acht auftretende Isolat zeigte sich dagegen resistent gegen Imipenem und Meropenem. Das *S. aureus* Isolat wies zudem einige Resistenzen gegen Fluorchinolone auf.

Tabelle 6: Isolierte Bakterienspezies aus der Wunde von Patient 5 im Behandlungsverlauf.

Dauer der Behandlung (Wochen)	0		2		4		6		8	
	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte
<i>P. aeruginosa</i>	++	++	++	±	±	-	-	-	++	+++
Keime der Hautflora	-	0	0	-	-	-	0	0	0	0
<i>S. aureus</i>	-	-	-	-	-	-	++	++	-	-

+++ = reichlich; ++ = mäßig; + = vereinzelt; ± = ganz vereinzelt; - = keine Kolonien; 0 = keine Intensität

5.3.6. Patient 6

Zu Beginn der Behandlung zeigten die Wunden bei Patient 6 im Bereich des Wundrands eine ausgeprägte Besiedlung durch *Providencia rettgeri* und *P. aeruginosa* neben vereinzelt Streptokokken der Gruppe G und Keimen der Hautflora (Tabelle 7). Aufgrund der speziellen Form der Wunde war eine Unterscheidung zwischen Wundrand und Wundmitte nur schwer möglich, daher wurde zunächst nur ein Abstrich genommen. *P. rettgeri* konnte bereits nach zwei Wochen Behandlung und für den ganzen Behandlungszeitraum nicht mehr nachgewiesen werden. Die Intensität der Besiedlung durch *P. aeruginosa* nahm bereits nach zwei Wochen Behandlung deutlich ab und reduzierte sich innerhalb von vier Wochen auf ein Minimum. Nach sechs Wochen der Behandlung kam es zu einer erneuten intensiven Besiedlung durch *P. aeruginosa* und *Klebsiella pneumoniae*. Zu diesem Zeitpunkt wurde auch versucht eine Unterscheidung zwischen Wundrand und Wundmitte zu treffen, was sich in leichten Unterschieden der Intensität der Besiedlung äußerte. Anhand des Resistenzprofils der *P. aeruginosa* Isolate ließ sich feststellen (Tabelle 17; Anhang), dass es sich bei der Besiedlung ab der sechsten Woche um ein anderes, sensibleres Isolat handelte. Die Besiedlung durch das zweite *P. aeruginosa* Isolat konnte innerhalb der beiden letzten Behandlungswochen fast vollständig, die Besiedlung durch *K. pneumoniae* vollständig reduziert werden. Die zu Beginn der Behandlung auftretenden Streptokokken der Gruppe G konnten während des gesamten Behandlungszeitraums, andere Keime der Hautflora erst wieder in der zweiten Hälfte der Behandlung isoliert werden.

Tabelle 7: Isolierte Bakterienspezies aus Wunden von Patient 6 im Behandlungsverlauf.

Dauer der Behandlung (Wochen)	0		2		4		6		8	
Isolat	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte
<i>P. rettgeri</i>	+++		-		-		-		-	-
<i>P. aeruginosa</i>	+++		+		±		+++	++	+	+
Streptokokken (G)	0		0		0		0		+	-
Keime der Hautflora	0		-		-		0	0	0	0
<i>K. pneumoniae</i>							+++	++	-	-

+++ = reichlich; ++ = mäßig; + = vereinzelt; ± = ganz vereinzelt; - = keine Kolonien; 0 = keine Intensität

5.3.7. Patient 7

Die Wunde von Patient 8 zeigte vor Beginn der Behandlung eine ausgeprägte Besiedlung mit *S. aureus*, und zwar sowohl am Wundrand als auch in der Wundmitte (Tabelle 8). Innerhalb der ersten beiden Behandlungswochen ging die Besiedlung im gesamten Wundbereich vollständig zurück. Innerhalb der nächsten vier Behandlungswochen konnte *S. aureus* nur vereinzelt in den verschiedenen Wundbereichen nachgewiesen werden. Erst nach acht Behandlungswochen konnte in beiden Wundbereichen *S. aureus* wieder in mäßiger bis starker Intensität nachgewiesen werden. Die Isolate nach zwei und nach acht Wochen waren aber beide sensibel für alle getesteten Antibiotika, (Tabelle 18; Anhang). Aufgrund des Fehlens lokaler Infektionszeichen wurde das Isolat als kolonisierend betrachtet. Es ist anzunehmen, dass es sich um ein identisches Isolat handelte.

Tabelle 8: Isolierte Bakterienspezies aus Wunden von Patient 7 im Behandlungsverlauf.

Dauer der Behandlung (Wochen)	0		2		4		6		8	
Isolat	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte
<i>S. aureus</i>	+++	+++	-	-	+	+	+	+	++	+++

+++ = reichlich; ++ = mäßig; + = vereinzelt; ± = ganz vereinzelt; - = keine Kolonien; 0 = keine Intensität

5.3.8. Patient 8

Zu Beginn der Behandlung von Patient 8 zeigte die Wunden des Patienten eine starke Besiedlung mit *P. aeruginosa* in beiden Wundbereichen sowie eine mäßige Besiedlung des Wundrands mit *P. mirabilis* (Tabelle 9). Nach zwei Wochen der Behandlung konnte kein Nachweis einer *P. aeruginosa* Besiedlung mehr erbracht werden, diese trat jedoch erneut in abgeschwächter Intensität innerhalb der nächsten beiden Behandlungswochen auf, konnte aber im Anschluss bis zum Ende der Behandlung nicht mehr nachgewiesen werden. Die Intensität der Besiedlung durch *P. mirabilis* erhöhte sich zunächst innerhalb der ersten beiden Behandlungswochen, bildete sich in den nächsten beiden

Behandlungswochen zurück und verstärkte sich zum Ende der Behandlung hin. Die Isolate zeigten keine auffälligen Antibiotikaresistenzen. Das *P. aeruginosa* Isolat erwies sich zwar als resistent gegenüber den nicht β -Lactam-Antibiotika Trimethoprim/Sulfamethoxazol, Ciprofloxacin und Gentamicin sowie gegen das β -Lactam-Antibiotikum Imipenem, war dafür aber empfindlich gegenüber Piperacillin und Ceftazidim. Das *P. mirabilis* Isolat war sensibel gegenüber den meisten getesteten Antibiotika außer Ciprofloxacin, Moxifloxacin und Tigecyclin (Tabelle 18; Anhang).

Tabelle 9: Isolierte Bakterienspezies aus Wunden von Patient 8 im Behandlungsverlauf.

Dauer der Behandlung (Wochen)	0		2		4		6		8	
	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte
<i>P. aeruginosa</i>	+++	+++	-	-	+	++	-	-	-	-
<i>P. mirabilis</i>	++	-	++	++	-	-	+	++	+++	+++
Keime der Hautflora	-	-	0		-	-	-	-	-	-

+++ = reichlich; ++ = mäßig; + = vereinzelt; ± = ganz vereinzelt; - = keine Kolonien; 0 = keine Intensität

5.3.9. Patient 9

Bei der Behandlung von Patient 9 konnten neben einem vorübergehenden Auftreten von anderen Keimen der Hautflora im Wesentlichen *S. aureus* als besiedelnde Spezies isoliert werden (Tabelle 10). Auffällig hierbei war die durchgehend höhere Intensität der Besiedlung am Wundrand gegenüber der Wundmitte. Die Intensität der Besiedlung nahm innerhalb der ersten vier Behandlungswochen auf ein mäßiges bis hohes Maß zu, wurde dann aber im weiteren Behandlungsverlauf schwächer. Das Isolat erwies sich als empfindlich für alle getesteten Antibiotika außer Fusidinsäure (Tabelle 19; Anhang).

Tabelle 10: Isolierte Bakterienspezies aus Wunden von Patient 9 im Behandlungsverlauf.

Dauer der Behandlung (Wochen)	0		2		4		6	
	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte
<i>S. aureus</i>	+++	-	+++	++	+++	++	++	+
Keime der Hautflora	-	0	0	-	-	-	-	-

+++ = reichlich; ++ = mäßig; + = vereinzelt; ± = ganz vereinzelt; - = keine Kolonien; 0 = keine Intensität

5.3.10. Patient 10

Die Wunde von Patient 10 wies zu Beginn der Behandlung eine ausgeprägte Besiedlung mit *S. aureus* auf und zwar sowohl am Wundrand als auch in der Wundmitte (Tabelle 11). Die Besiedlung verzeichnete einen leichten Rückgang nach zwei Behandlungswochen und konnte dann nach vier Behandlungswochen nicht mehr nachgewiesen werden. Im Verlauf

der abnehmenden Besiedlung durch *S. aureus* kam es zu einer zunehmenden Besiedlung durch *P. aeruginosa*. Das *S. aureus* Isolat erwies sich als sensibel für die meisten getesteten Antibiotika und zeigte nur Resistenzen gegen Penicillin, Levofloxacin und Moxifloxacin (Tabelle 19; Anhang). Das *P. aeruginosa* Isolat war dagegen sensibel für alle getesteten Antibiotika.

Tabelle 11: Isolierte Bakterienspezies aus Wunden von Patient 10 im Behandlungsverlauf.

Dauer der Behandlung (Wochen)	0		2		4		5		7	
	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte	Rand	Mitte
<i>S. aureus</i>	+++	+++	++	++	-	-	+	+	-	-
Keime der Hautflora	0	0	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>P. aeruginosa</i>	-	-	+	+++	+++	+++	+	+	++	+

+++ = reichlich; ++ = mäßig; + = vereinzelt; ± = ganz vereinzelt; - = keine Kolonien; 0 = keine Intensität

5.4. Wirkung von Madenextrakten auf Bakterienisolate aus Patientenwunden

Die subkultivierten Bakterienisolate aus Abschnitt 5.3 wurden verwendet, um in verschiedenen Versuchsansätzen mögliche, direkte antibakterielle Effekte des Extrakts und/oder der Exkrete/Sekrete experimentell zu ermitteln. Auf Grundlage der Antibiogramme (Tabelle 13 bis Tabelle 19, alle im Anhang) wurde Piperacillin/Tazobactam in allen Versuchsansätzen als Kontrolle zur vollständigen Wachstumshemmung eingesetzt, und es wurden neben den Patientenisolaten einige ATCC (*American Type Culture Collection*)-Referenzstämme in die Experimente eingeschlossen. Da nicht alle Isolate in der Dauerkultur im Flüssigkultur-Medium (tryptische Soja Bouillon) ein gleichbleibendes und ausreichend gutes Wachstum zeigten, wurden die nachfolgenden Versuche nur mit den Isolaten durchgeführt, die über gleichbleibende Wachstumseigenschaften verfügten.

Da einige Autoren (Barnes et al. 2010) Minimalmedium (10 %ig) verwenden, wurde zunächst auch die Wirkung von Minimalmedium auf das bakterielle Wachstum untersucht (Abbildung 27; Anhang). Hierzu wurden die Isolate von Patient 1 verwendet. Es zeigte sich, dass zwischen Medienkonzentrationen (TSB) und Trübung für die verwendeten Isolate (*S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *E. faecalis*, *P. mirabilis*) kein linearer Zusammenhang zwischen Medienkonzentration und Wachstum besteht. Eine Reduktion auf 50 % Medienanteil schien hierbei tolerierbar zu sein, eine Reduktion auf 10 % resultierte jedoch in einer unproportional starken Verminderung des Wachstums. In einem parallelen Versuch wurde der Einfluss eines als nicht proteolytisch und nicht antibakteriell aktiven Proteins (BSA), einer proteolytisch aktiven Serinproteinase (Chymotrypsin), der Exkrete/Sekrete von *Lucilia sericata* Larven und des Madenextrakts auf das bakterielle

Wachstum in Anwesenheit von 10 % TSB untersucht (Abbildung 28; Anhang). Es zeigte sich, dass ein in Minimalmedium (10 % TSB) resuspendierter Extrakt zu einem gegenüber dem Minimalmedium deutlich verbesserten aber in etwa mit Vollmedium gleichem Wachstum aller getesteten Bakterienspezies führte. Lediglich für *P. mirabilis* fiel dieser Effekt weniger stark aus. In Minimalmedium gelöstes BSA führte für *A. xylosoxidans* zu keinem verbesserten Wachstum gegenüber dem Minimalmedium. Bei allen anderen getesteten Spezies kam es zu einem besseren Wachstum im Vergleich zu Minimalmedium alleine. Dieser Effekt war jedoch deutlich geringer ausgeprägt als der durch den Madenextrakt hervorgerufene. Die mit Minimalmedium versetzten Exkrete/Sekrete führten ebenfalls zu einer deutlichen Verbesserung des Wachstums gegenüber dem Minimalmedium, blieb jedoch stets unterhalb der Wachstumsraten bei Vollmedium für alle Spezies außer *P. mirabilis*, die ein etwas reduziertes Wachstum zeigte. Die Anwesenheit von Chymotrypsin führte zu einem in etwa mit Minimalmedium vergleichbaren Wachstum. Da das Testverfahren bakteriolytische Effekte nicht ausschließen kann, die ebenfalls zu einer Trübung und damit zu einer Erhöhung der OD (optische Dichte) führen können, wurden exemplarisch für diesen Versuch die „colony forming units“ bestimmt, für die keine Reduktion gegenüber dem Minimalmedium ermittelt werden konnte. Aufgrund der nur geringfügigen Verbesserung der Präzision der Messergebnisse und des Fehlens zusätzlicher Aussagekraft sowie des erheblich gesteigerten Arbeits- und Materialaufwands wurde auf die Methode der „colony forming units“ im weiteren Verlauf verzichtet. Da der Madenextrakt stets zu einem verbesserten Wachstum gegenüber dem Minimalmedium führte, wurde auf die Verwendung von Minimalmedium verzichtet. Der Madenextrakt wurde für die weiteren Versuche in Vollmedium aufgenommen und dann mit dem Wachstum von Bakterien in Vollmedium alleine verglichen.

In weiteren „microbroth dilution assays“ mit Patienten-Isolaten und ATCC-Kontrollstämmen wurde für die erste Gruppe von Bakterien (*P. mirabilis* Isolate und ATCC-Stamm, *P. rettgeri*, *E. faecalis*, *A. xylosoxidans*, *S. pyogenes* ATCC und einem klinischen *Klebsiella oxytoca* Isolat) auch in der höchstmöglichen Extrakt-Konzentration keine Wachstumsinhibition (Ausbleiben einer Trübung des Mediums) festgestellt. Die Intensität der ermittelten Trübungen entsprach dabei stets der des Medium-Kontrollversuchs bzw. lag sogar darüber. Nur in Versuchen mit *A. xylosoxidans* konnte eine Verminderung der Intensität der Trübung, jedoch keine Wachstumsinhibition verzeichnet werden (Abbildung 9). Die Versuche unter Verwendung der beiden Piperacillin/Tazobactam Konzentrationen von 2/0,25 µg/ml bzw. 20/2,5 µg/ml lieferten in beiden Fällen ein Ausbleiben der Trübung und damit eine Wachstumsinhibition.

In den Versuchen mit einer zweiten Gruppe von Isolaten/Stamm (*P. aeruginosa* aus Wunden von Patient 3, 6 und 8; *S. aureus* aus Wunden von Patient 1, 5 und 7 sowie einem MRSA ATCC Stamm) konnte im „*microbroth dilution assay*“ ebenfalls kein antibakterieller Effekt durch den Madenextrakt nachgewiesen werden. Das Wachstum war in allen Versuchsansätzen vergleichbar oder sogar erhöht gegenüber der Mediumkontrolle (Abbildung 10).

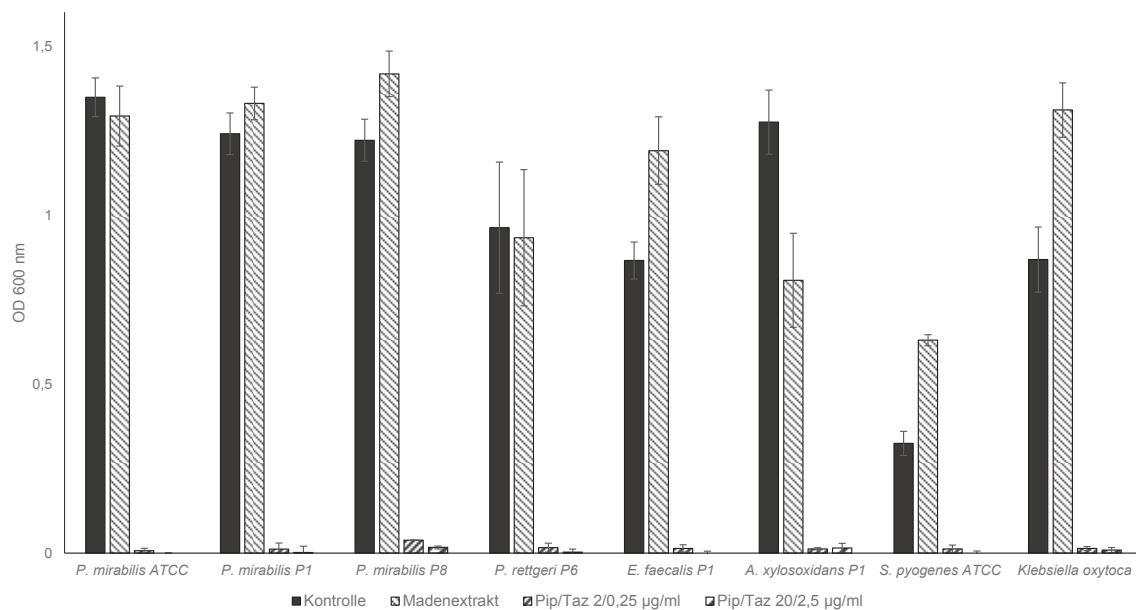


Abbildung 9: Microbroth dilution assay für *P. mirabilis* und andere Isolate. Die verschiedenen Isolate wurden 20 h bei 37 °C auf Blutagar vorkultiviert. 100 µl 100 %ige TSB, in 100 % TSB gelöster Madenextrakt und in 100 % TSB verdünntes Piperacillin/Tazobactam wurden in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit je 5 µl der jeweiligen, auf McFarland 0,5 eingestellten Bakterien-Suspension inokuliert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Messung der OD erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. Abgebildet sind die Mittelwerte minus der jeweiligen nicht-inokulierten Vehikel-Kontrollen sowie die Standardabweichung aus je n = 3 Messungen. **P** = Patient+Nummer; **Pip/Taz** = Piperacillin/Tazobactam; **TSB** = tryptische Soja Bouillon; **OD** = optische Dichte.

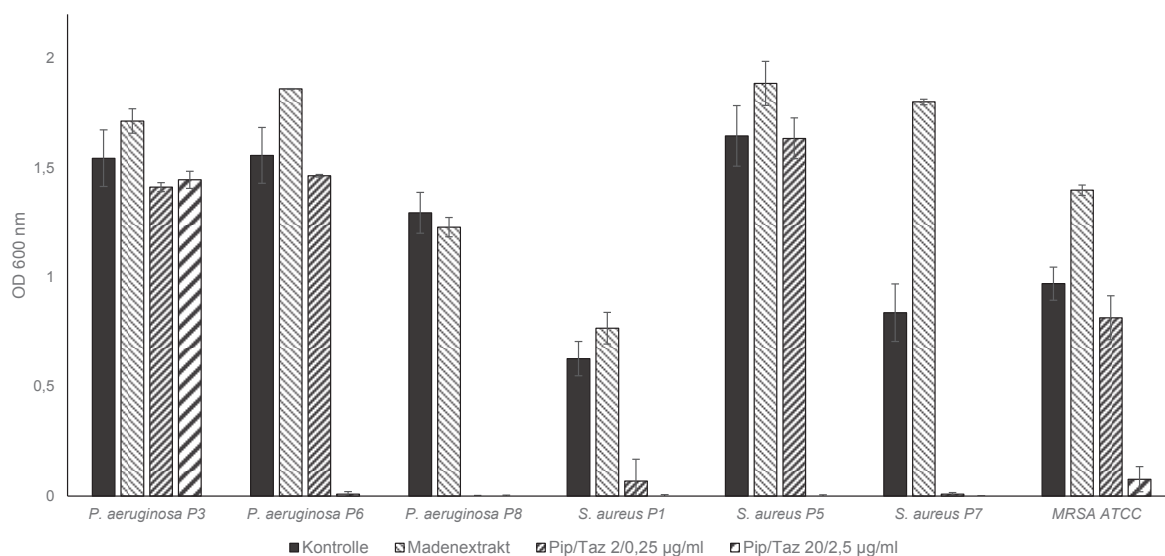


Abbildung 10: Microbroth dilution assay für *P. aeruginosa* und *S. aureus* Isolate. Die verschiedenen Isolate wurden 20 h bei 37 °C auf Blutagar vorkultiviert. 100 µl 100 %ige TSB, in 100 % TSB gelöster Madenextrakt und in 100 % TSB verdünntes Piperacillin/Tazobactam (Pip/Taz) wurden in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit je 5 µl der jeweiligen, auf McFarland 0,5 eingestellten Bakterien-Suspension inokuliert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Messung der OD erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. Abgebildet sind die Mittelwerte minus der jeweiligen nicht-inokulierten Vehikel-Kontrollen sowie die Standardabweichung aus je n = 3 Messungen. **P** = Patient+Nummer; **Pip/Taz** = Piperacillin/Tazobactam; **TSB** = tryptische Soja Bouillon; **OD** = optische Dichte.

Die *P. aeruginosa* Isolate zeigten ein Wachstum entsprechend ihrer Antibiotogramme, d.h. eine Wachstumsinhibition für das Isolat von Patient 8 fand sowohl bei 2/0,25 µg/ml als auch bei 20/2,5 µg/ml Piperacillin/Tazobactam statt, beim Isolat von Patient 6 nur bei 20/2,5 µg/ml Piperacillin/Tazobactam und beim Isolat von Patient 3 bei keiner der gewählten Konzentrationen statt. Ebenfalls konnte kein antibiotischer Effekt durch den Madenextrakt gegenüber den *S. aureus* Isolaten (Patient 1, 5, 7) sowie dem MRSA-Stamm ermittelt werden, sondern es führte vielmehr zu einem verbesserten Wachstum. Alle drei Patienten-Isolate (*S. aureus*) reagierten sensibel auf 20/2,5 µg/ml Piperacillin/Tazobactam und zum Teil auch auf 2/0,25 µg/ml, während der MRSA erwartungsgemäß auf keine dieser Konzentrationen mit vollständiger Wachstumsinhibition reagierte.

Die Untersuchungen auf eine Wachstumsinhibition in Form eines „zone of inhibition assays“ zeigten in keinem Versuchsansatz mit verschiedenen Extraktchargen sowie den Exkreten/Sekreten, weder bei den isolierten Stämmen, noch bei den Referenzstämmen einen Hemmhof. Sie lieferten damit auch keinen Hinweis auf einen antibakteriellen Effekt.

5.5. Wirkung von Madenextrakten auf die Bildung bakterieller Biofilme

Die Untersuchung eines potenziellen Einflusses des Madenextrakts auf die Bildung bakterieller Biofilme (Abschnitt 4.7.5) zeigte bei der ersten Gruppe von Bakterien (*P. mirabilis* Isolate und ATCC-Stamm, *P. rettgeri*, *E. faecalis*, *A. xylosoxidans*, *S. pyogenes* ATCC und einem klinischen *K. oxytoca* Isolat), dass für alle *P. mirabilis* Isolate/Stamm, *E. faecalis*, *S. pyogenes* und *K. oxytoca* die Bildung von Biofilmen in Anwesenheit des Madenextrakts verschlechtert wird (Abbildung 11). Im Vergleich hierzu konnte die Bildung von Biofilmen durch Piperacillin/Tazobactam Konzentrationen von 2/0,25 µg/ml als auch 20/2,5 µg/ml vollständig inhibiert werden. Für *A. xylosoxidans* konnte die Biofilmbildung nur durch Piperacillin/Tazobactam Konzentrationen von 20/2,5 µg/ml verhindert werden. Die Piperacillin/Tazobactam Konzentration von 2/0,25 µg/ml bzw. der Madenextrakt führten zu einer Verbesserung respektive einer etwa gleichstarken Biofilmbildung.

In der zweiten Gruppe der getesteten Bakterien (*P. aeruginosa* aus Wunden von Patient 3, 6 und 8; *S. aureus* aus Wunden von Patient 1, 5 und 7 sowie MRSA und MSSA ATCC Stämme) führte der Madenextrakt nur bei einem Isolat (*S. aureus* von Patient 5) zu einer vermehrten Biofilmbildung (Abbildung 12). Ein geringer bzw. kein inhibierender Einfluss auf die Biofilmbildung konnte für das *P. aeruginosa* Isolat von Patient 3 und den MSSA Stamm festgestellt werden, wobei für *P. aeruginosa* ein ähnlicher Effekt durch 2/0,25 µg/ml Piperacillin/Tazobactam hervorgerufen wurde, Konzentrationen von 20/2,5 µg/ml Piperacillin/Tazobactam führten aber in beiden Fällen zu einer vollständigen Verhinderung der Biofilmbildung. Auf die *P. aeruginosa* Isolate von Patient 6 sowie auf das *S. aureus* Isolat von Patient 1 konnte ein sehr stark inhibierender Effekt auf die Biofilmbildung, für das *P. aeruginosa* Isolat von Patient 8 und das *S. aureus* Isolat von Patient 7 sogar ein nahezu vollständig inhibierender Effekt gezeigt werden. Bei diesen Isolaten führte eine Piperacillin/Tazobactam Konzentration von 2/0,25 µg/ml zu einer vollständigen Verhinderung der Biofilmbildung. Für den vergleichsweise stark Biofilme bildenden MRSA Stamm konnte mit Madenextrakt eine Biofilmbildung nahezu vollständig verhindert werden, was nur mit einer Piperacillin/Tazobactam Konzentration von 20/2,5 µg/ml der Fall war, während Piperacillin/Tazobactam Konzentrationen von 2/0,25 µg/ml sogar zu einer Verbesserung der Biofilmbildung führten.

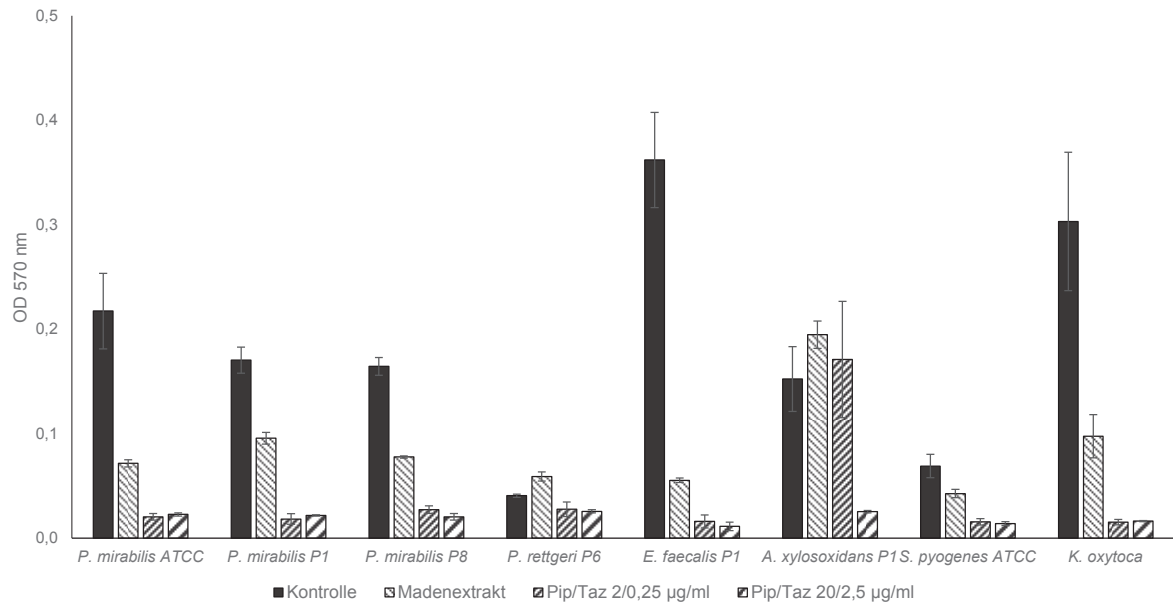


Abbildung 11: Biofilmbildung durch *P. mirabilis* und andere Isolate. Die verschiedenen Isolate wurden 20 h bei 37 °C auf Blutagar vorkultiviert. 100 µl Biofilm-Medium, in 100 % Biofilm-Medium gelöster Madenextrakt und in 100 % Biofilm-Medium verdünntes Piperacillin/Tazobactam wurden in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit je 5 µl der jeweiligen, auf McFarland 0,5 eingestellten Bakterien-Suspension inokuliert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Der Zellrasen wurde mit Kristallviolett angefärbt und in 30 % Essigsäure resuspendiert. Die Messung der OD erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm. Abgebildet sind die Mittelwerte minus der jeweiligen nicht-inokulierten Vehikel-Kontrollen sowie die Standardabweichung aus je n = 3 Messungen. **P** = Patient+Nummer; **Pip/Taz** = Piperacillin/Tazobactam; **OD** = optische Dichte.

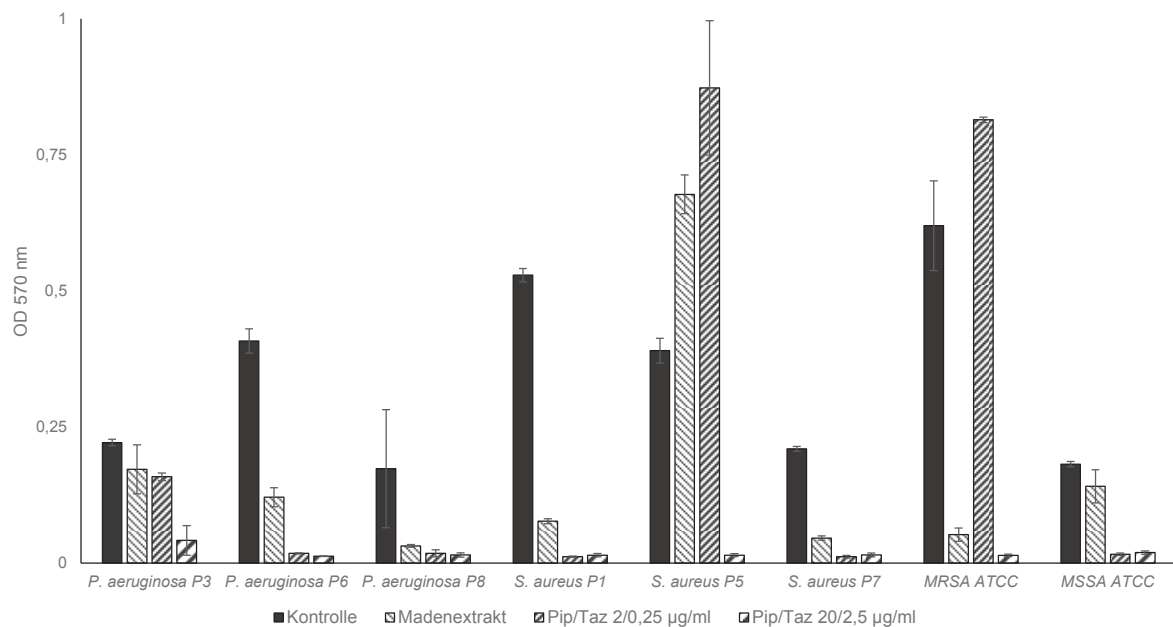


Abbildung 12: Biofilmbildung durch *P. aeruginosa* und *S. aureus*. Die verschiedenen Isolate wurden 20 h bei 37 °C auf Blutagar vorkultiviert. 100 µl Biofilm-Medium, in 100 % Biofilm-Medium gelöster Madenextrakt und in 100 % Biofilm-Medium verdünntes Piperacillin/Tazobactam wurden in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit je 5 µl der jeweiligen, auf McFarland 0,5 eingestellten Bakterien-Suspension inokuliert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Der Zellrasen wurde mit Kristallviolett angefärbt und in 30 % Essigsäure resuspendiert. Die Messung der OD erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 570 nm. Abgebildet sind die Mittelwerte minus der jeweiligen nicht-inokulierten Vehikel-Kontrollen sowie die Standardabweichung aus je n = 3 Messungen. **P** = Patient+Nummer; **Pip/Taz** = Piperacillin/Tazobactam; **OD** = optische Dichte.

5.6. Einfluss von Madenextrakten auf die Vitalität von primären Fibroblasten

Versuche mit Extrakten (Bournelis 2012), die wie in 4.5 hergestellt wurden, haben gezeigt, dass die Extrakte keinen oder einen sehr geringfügigen Einfluss auf die Proliferation von primären Fibroblasten und Keratinozyten unter serumreduzierten Bedingungen (1 % FKS) und einer Inkubationszeit von 72 h haben. Eigene Ergebnisse (Gestmann 2009) haben dies für diesen Versuchszeitraum bestätigt. Nach einer Vorinkubation von 48 h gefolgt von 96 h Inkubation mit verschiedenen Extrakten konnten hier leicht positive Effekte gezeigt werden. Da bereits Serumkonzentrationen zwischen 3 und 4 % anstelle der im Kulturmedium verwendeten 10 % FKS erheblichen Einfluss auf die Proliferation der Fibroblasten zeigten, wurde der Serumgehalt anstelle von 1 % auf ein notwendiges Maß von 0,1 % reduziert. FKS-Konzentrationen unterhalb von 0,1 % führten zu ausbleibender Adhäsion der Fibroblasten. Aufgrund der Annäherung an eine minimal notwendige FKS-Konzentration und der daraus resultierenden verringerten Adhäsion wurde das Medium nach der Vorkultur nicht entfernt, um ein Ablösen der Zellen durch den Mediumwechsel zu vermeiden.

Für die Durchführung der Versuche wurde wie in 4.4.4 und 4.4.5 beschrieben vorgegangen. Dabei wurden die Extrakt-Chargen verwendet, die auch bei der Behandlung von menschlichen Patienten Anwendung gefunden haben. Abbildung 13 zeigt den Vergleich der Wirkungen des Extraktes auf primäre Fibroblasten von drei verschiedenen Spendern, die unter serumreduzierten Bedingungen (mit 0,1 % FKS im Medium) für 48 h vorkultiviert worden waren und dann mit Extrakt, der in serumreduziertem Medium resuspendiert wurde, für 96 h behandelt wurden.

Es zeigte sich für Zellen aller drei Fibroblasten-Spender, dass im Vergleich zur Kontrolle konzentrationsabhängige Effekte auf die Vitalität vorliegen (Abbildung 13). Fibroblasten der Spender 2 und 3 reagierten bei Extrakt-Konzentrationen zwischen etwa 33 % und 8 % Madenextrakt im Medium mit einer erhöhten Vitalität von bis zu ca. 50 %. Bei Spender 1 war ein ähnlich positiver Effekt mit einer Verschiebung auf einen Konzentrationsbereich zwischen etwa 16,5 % und 4 % zu beobachten. Die Fibroblasten von Spender 1 reagierten zudem stärker auf die Anregung durch 3,4 % FKS im Kulturmedium. Im Vergleich zum Wachstum in Minimalmedium reagierten Fibroblasten von Spender 1 mit einem um etwa 150 % erhöhten Wachstum, die Fibroblasten der Spender 2 und 3 nur mit einer Erhöhung um etwa 50 %. Mit zunehmender Verdünnung wurden die durch den Madenextrakt hervorgerufenen Effekte aufgehoben. Die durch den Madenextrakt herbeigeführte Stimulation blieb bei allen drei Spendern unterhalb der durch Zugabe von 3,4 % FKS herbeigeführten Stimulation.

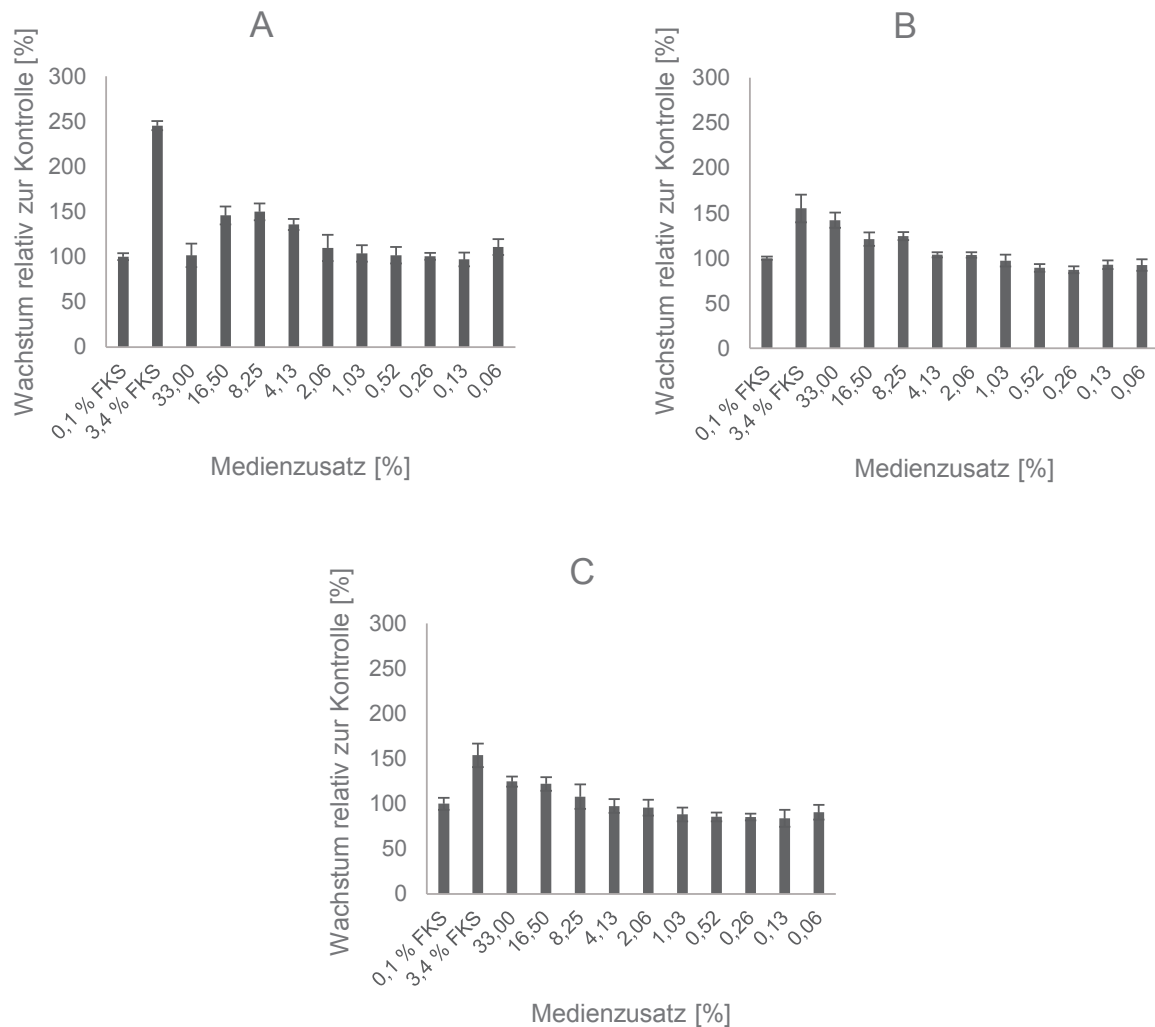


Abbildung 13: Wachstum von NHDF verschiedener Spender unter Einfluss von Madenextrakt in Mangelmedium. Wachstumsversuch nach 48 h Serumentzug (0,1 % FKS) und anschließender Anregung mit 0,1 % FKS (Kontrolle) oder 3,4 % FKS Endkonzentration bzw. sinkenden Madenextrakt Endkonzentrationen in Mangelmedium für 96 h (jeweils n = 5). Messung mittels MTT, Messwerte prozentual bezogen auf die Kontrolle. **(A)** NHDF von Spender 1, **(B)** NHDF von Spender 2, **(C)** NHDF von Spender 3. **FKS** = fötales Kälberserum; **MTT** = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; **NHDF** = normale humane dermale Fibroblasten.

In weiteren Versuchen wurde überprüft, ob mit Extrakt, der in Vollmedium resuspendiert wurde, ein Effekt erzielt werden kann, der den Effekt durch Zugabe von Vollmedium überschreiten kann. Der Versuch mit Fibroblasten zweier Spender zeigte, dass unter diesen Bedingungen keine Steigerung der Vitalität gegenüber der Anregung mit 3,4 % FKS alleine herbeizuführen war (Abbildung 14). Hierbei entsprach die Vitalität bei der höchsten getesteten Extrakt-Konzentration von 33 % immer noch etwa der nicht angeregten Kontrolle. Erst in Verdünnungen von bis zu 0,06 % konnte dieser Effekt vollständig aufgehoben werden.

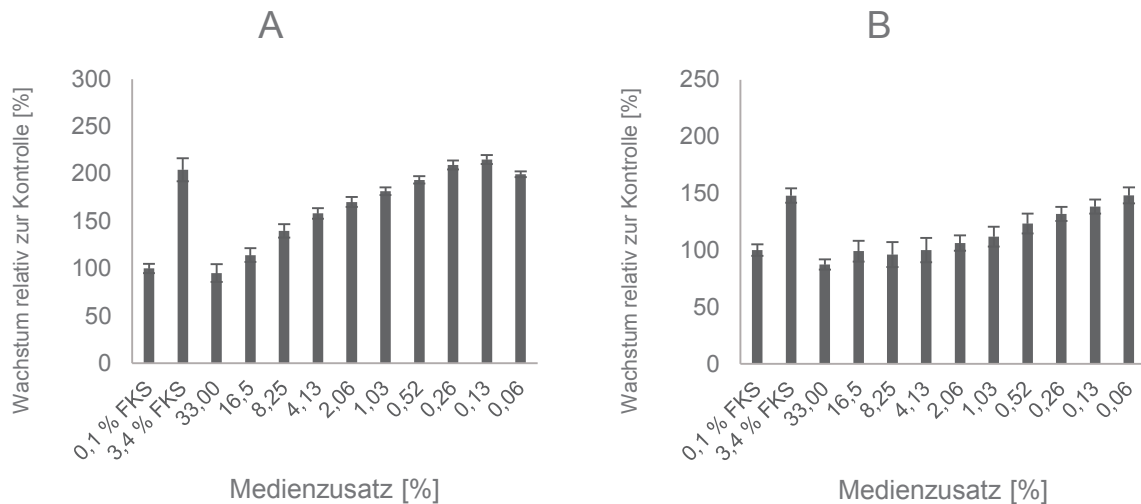


Abbildung 14: Wachstum von NHDF verschiedener Spender unter Einfluss von Madenextrakt in Vollmedium. Wachstumsversuch nach 48 h Serumentzug (0,1 % FKS) und anschließender Anregung mit 0,1 % FKS (Kontrolle) oder 3,4 % FKS Endkonzentration bzw. sinkenden Madenextrakt Endkonzentrationen in Vollmedium für 96 h (jeweils n = 5). Messung mittels MTT, Messwerte prozentual bezogen auf die Kontrolle. (A) NHDF von Spender 1, (B) NHDF von Spender 3. FKS = fötales Kälberserum; MTT = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; NHDF = normale humane dermale Fibroblasten.

Da geringfügig positive Effekte durch Madenextrakt in Minimalmedium gezeigt werden konnten, wurden, um mögliche positive Effekte der Exkrete/Sekrete (ES) auf das Wachstum bzw. die Vitalität von Fibroblasten zu untersuchen, die Exkrete/Sekrete zunächst unverdünnt und dann in höheren, mit Minimalmedium hergestellten Verdünnungen eingesetzt. Es zeigten sich oberhalb einer Exkret/Sekret-Konzentration von ca. 3,3 % im Medium starke negative Effekte auf die Fibroblasten aller drei Spender (Abbildung 15). Hierbei konnten für Zellen vom Spender 1 keine positiven Effekte im gesamten Konzentrationsbereich von 33,3 % bis 0,01 % gemessen werden. Die Fibroblasten von Spender 2 reagierten lediglich im Konzentrationsbereich von 0,01 bis 0,03 % Exkrete/Sekrete leicht positiv (ca. 10 % erhöhte Vitalität). Zellen von Spender 3 reagierten hierbei bei Exkret/Sekret-Konzentrationen im Medium von ca. 0,83 % bis 0,03 % mit einer leicht erhöhten Vitalität (bis maximal 25 %).

Die visuelle Kontrolle der mit Kristallviolett angefärbten Zellen (Fototafel 3) zeigte im Kontrollversuch für in Minimalmedium kultivierten Zellen (Spender 1) ein Verklumpen der Zellen in der Mitte und am Rand der Kulturfläche sowie eine kreisförmige Anordnung zwischen diesen beiden Bereichen (Fototafel 3, A). Die mit 3,4 % FKS behandelten Zellen bildeten während der Kultivierung einen zu etwa 80 bis 90 % konfluenten Zellrasen mit etwa gleichmäßig verteilten Klumpungen (Fototafel 3, B). Hohe Konzentrationen der Exkrete/Sekrete (6,67 % bis 33 %) im Medium führten zu einer Reduktion adhärerender Zellen sowie zu einer starken morphologischen Veränderung der Zellen von spindelförmig zu rund/ablösend (Fototafel 3, E). Dieser Effekt war erst bei einer Konzentration von etwa 0,03 % Exkrete/Sekrete im Medium soweit aufgehoben, dass eine Adhäsion der Zellen zu

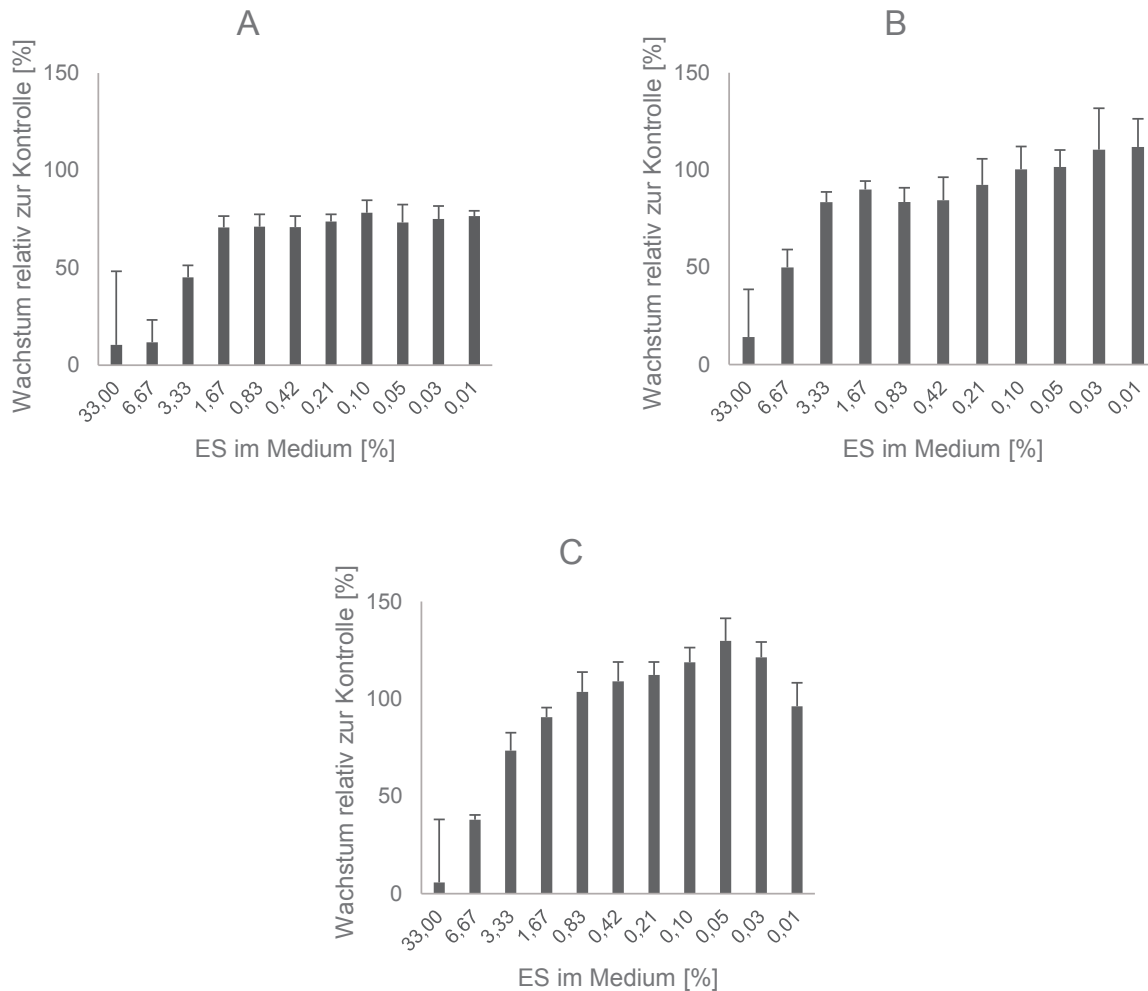
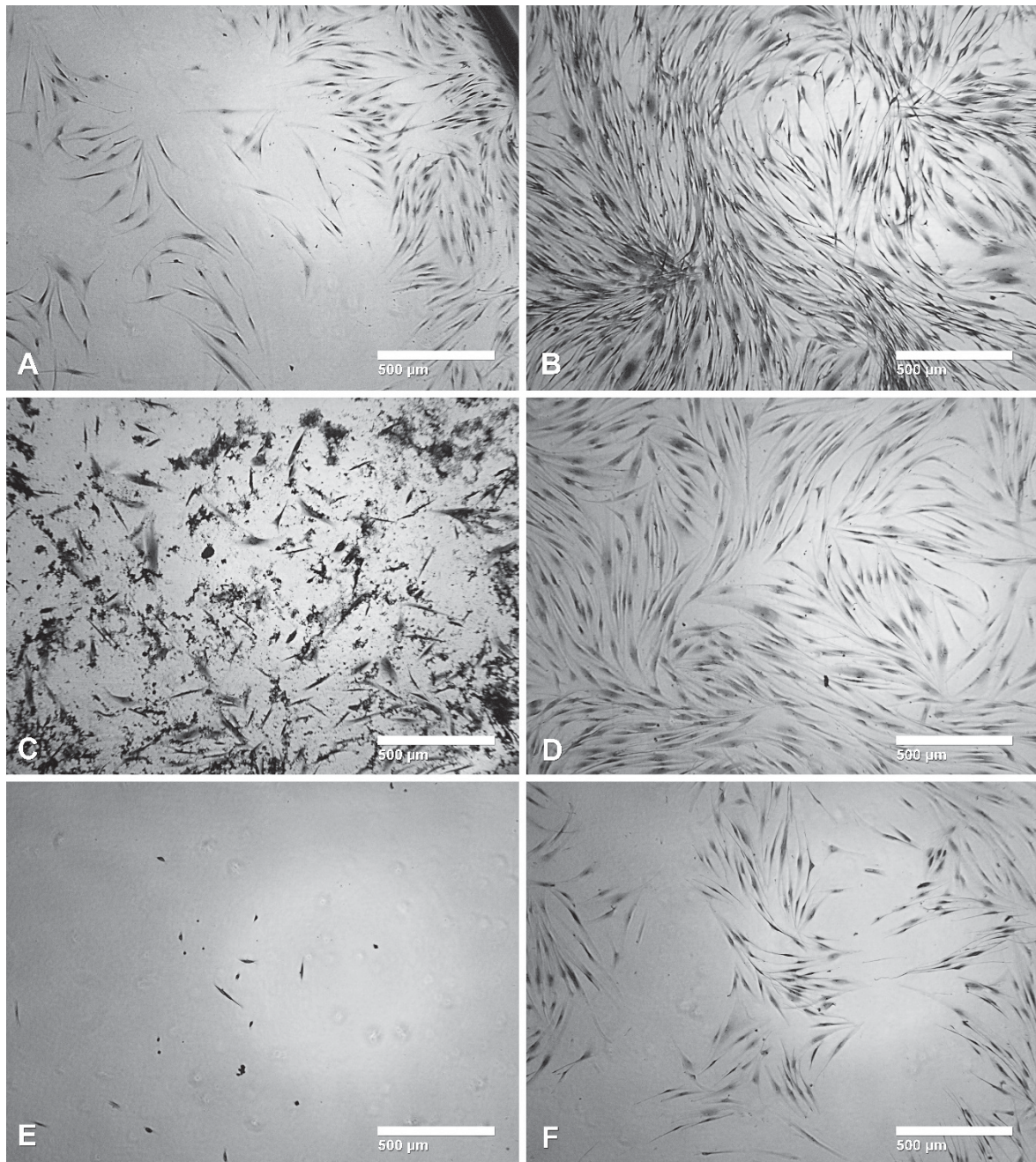


Abbildung 15: Wachstum von NHDF verschiedener Spender unter Einfluss von ES in Minimalmedium. Wachstumsversuch nach 48 h Serumentzug (0,1 % FKS) und anschließender Anregung mit 0,1 % FKS (Kontrolle) Endkonzentration bzw. sinkenden ES Endkonzentrationen in Mangelmedium für 96 h (jeweils n = 5). Messung mittels MTT, Messwerte prozentual bezogen auf die Kontrolle. (A) NHDF von Spender 1, (B) NHDF von Spender 2, (C) NHDF von Spender 3. **ES** = Exkrete/Sekrete; **FKS** = fötales Kälberserum; **MTT** = 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid; **NHDF** = normale humane dermale Fibroblasten.

beobachten war, die in etwa auch der flächenmäßigen Anordnung der Zellen in den Kontrollen entsprach (Fototafel 3, F).

Konzentrationen von 33 % Madenextrakt im Medium führten zu keiner morphologischen Veränderung der Zellen, jedoch wurde durch das Kristallviolett eine große Menge extrazellulärer Substanz angefärbt, die das Bild teilweise überlagert (Fototafel 3, C). Die Verteilung der Fibroblasten auf der Kulturfläche erschien hier gleichmäßig auf die Kulturfläche verteilt und nicht konzentriert auf den Rand und die Mitte der Kulturfläche. In geringer Konzentration (ca. 1 %) konnte ein dichter Zellrasen beobachtet werden (Fototafel 3, D), der in seiner Dichte etwa zwischen dem im Minimalmedium und dem in 3,4 % FKS kultivierten Rasen einzuordnen war.



Fototafel 3: Wachstum von NHDF (Spender 1) in 96-Well Mikrotiterplatten unter Einfluss von Madenextrakt oder Exkreten/Sekreten. Wachstumsversuch nach 48 h Serumentzug (0,1 % FKS) und anschließender Anregung mit 0,1 % FKS (A), 3,4 % FKS (B), 33 % Madenextrakt (C), ca. 1 % Madenextrakt (D), 33 % Exkrete/Sekrete (E) und 0,03 % Exkrete/Sekrete im Medium für 96 h. Fixiert mit 4 % Formaldehyd und gefärbt mit 1 % ethanolischem Kristallviolett. Bilder bei 32-facher Vergrößerung. FKS = fötales Kälberserum; NHDF = normale humane dermale Fibroblasten.

5.7. MMP- und TIMP-Level in Wundexsudaten während der Behandlung mit Madenextrakten

Die verschiedenen MMP- (Matrixmetalloproteinase) und TIMP-Level (*tissue inhibitors of metalloproteinases*), die in den Wundexsudaten der Patienten ermittelt wurden, unterschieden sich stark in den Proteinkonzentrationen, so dass diese Level zum Einen so dargestellt wurden, wie sie ermittelt wurden (Anhang, Abbildung 29 bis Abbildung 32) und zum anderen auf jeweils 100 µg Protein bezogen wurden (Abbildung 17 bis Abbildung 20). Um den Lesefluss nicht zu stark zu behindern, werden die Messwerte im Folgenden nur auf 10 pg/ml genau angegeben. Für eine ungefähre Einschätzung und spätere Vergleiche wurden zunächst die MMP- und TIMP-Konzentrationen im Medium kultivierter NHDF dreier Spender untersucht (Abbildung 16, Tabelle 20 im Anhang). Hierbei zeigte sich das vollständige Fehlen vom MMP-2 und TIMP-4 im Medium als Gemeinsamkeit für Zellen aller drei Spender. In Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze konnten MMP-8, -9 und -13 nachgewiesen werden, MMP-10 konnte nur bei den Spendern 2 und 3 in Konzentrationen von 200 pg/ml bzw. 270 pg/ml nachgewiesen werden. Für alle anderen MMP- und TIMP ließen sich keine eindeutigen Gemeinsamkeiten feststellen.

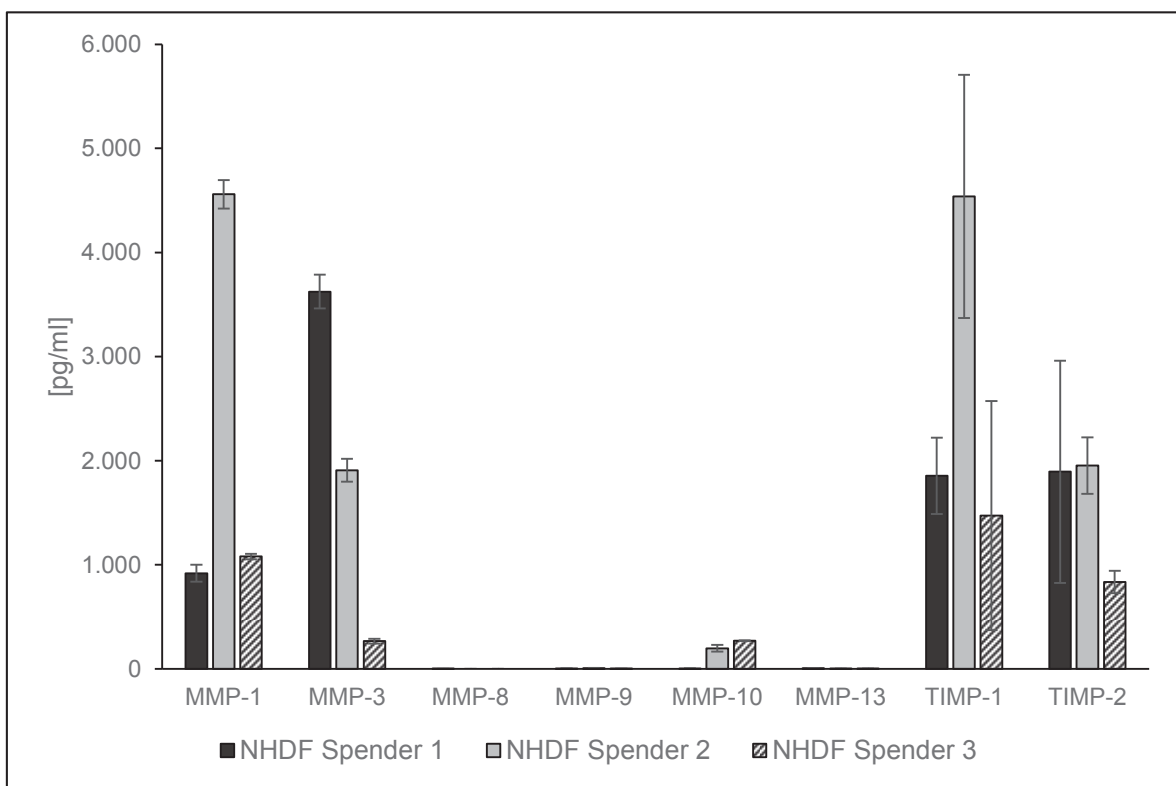


Abbildung 16: MMP- und TIMP-Konzentrationen im Kulturmedium von NHDF. Es wurden 2×10^5 NHDF dreier Spender 72 h bei 37°C und 5 % CO₂-Sättigung in DMEM mit 10 % FKS kultiviert. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Messwerte von DMEM mit 10 % FKS ohne Zellen wurden von den Messwerten mit Zellen subtrahiert. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*; **NHDF** = normale humane dermale Fibroblasten; **DMEM** = *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*; **FKS** = fötales Kälberserum.

Für MMP-1 lagen die Messwerte zwischen 920 pg/ml und 4.560 pg/ml, für MMP-3 zwischen 270 pg/ml und 3.630 pg/ml, für TIMP-1 zwischen 1.480 pg/ml und 4.540 pg/ml und für TIMP-2 zwischen 840 pg/ml und 1.950 pg/ml.

5.7.1. Patient 1

Bei der Untersuchung der Wundexsudate des ersten Patienten konnten im Allgemeinen alle zu untersuchenden Proteinase und deren Inhibitoren an einem oder mehreren Zeitpunkten der Probennahmen nachgewiesen werden. Bei der von der Proteinkonzentration abhängigen Darstellung der Messdaten (Abbildung 17; Tabelle 21, Anhang) zeigte sich für die MMP-1 eine starke Reduktion der Konzentration innerhalb der ersten Behandlungswoche von 36.750 pg/ml auf 10.900 pg/ml. In allen folgenden Behandlungswochen stieg diese Konzentration kontinuierlich bis auf 23.480 pg/ml in der achten Behandlungswoche an.

Für die Konzentration von MMP-2 zeigte sich im Laufe der ersten Woche der Behandlung ein ähnlicher Effekt. Konnten vor der Behandlung ca. 750 pg/ml als Konzentration ermittelt werden, sank diese auf ca. 50 pg/ml ab. In den darauf folgenden Wochen kam es alternierend zu einem starken Anstieg auf ca. 70 % des Ausgangsniveaus und in den darauf folgenden Wochen zu einem Absinken auf weniger als 10 % des Ausgangsniveaus.

Für MMP-3 konnte innerhalb der ersten Woche ebenfalls eine starke Reduktion der Konzentration von ca. 280 pg/ml auf 4 pg/ml gemessen werden. Bis zur dritten Woche erfolgte ein starker Anstieg auf 830 pg/ml, gefolgt von einer nahezu vollständigen Abwesenheit von MMP-3 bei allen weiteren Probennahmen.

MMP-10 konnte vor der Behandlung und auch während der ersten beiden Behandlungswochen in sehr geringen Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze nachgewiesen werden (maximal 14 pg/ml). In den beiden darauf folgenden Wochen erfolgte ein Anstieg auf maximal 230 pg/ml, bevor in der sechsten und achten Woche nur noch Konzentrationen von 40 pg/ml nachgewiesen werden konnten.

Im der ersten Woche der Behandlung zeigten MMP-8, MMP-9 und MMP-13 zunächst höhere Konzentrationen. Hierbei stieg die Konzentration von MMP-8 von 930 pg/ml um ein Zehnfaches auf 9.600 pg/ml an und sank dann bis zur dritten Behandlungswoche wieder auf 5.400 pg/ml ab. In der vierten Woche erfolgte dann ein starker Anstieg auf 31.610 pg/ml. In den darauf folgenden Wochen konnten dann noch Konzentrationen von 4.850 pg/ml bis maximal 6.920 pg/ml gemessen werden.

Die Konzentration von MMP-9 stieg in der ersten Woche von zunächst 67.080 pg/ml auf 107.020 pg/ml an und sank dann auf ein Niveau von 23.000 pg/ml mit Ausnahme der vierten Woche, in der eine Konzentration von 150.840 pg/ml gemessen werden konnte.

Die Konzentration von MMP-13 stieg in der ersten Woche von 210 pg/ml leicht auf 280 pg/ml an und konnte in allen folgenden Wochen nur noch in sehr geringen Konzentrationen von maximal 50 pg/ml gemessen werden.

Der Inhibitor TIMP-1 konnte in der ersten Woche in etwa derselben Konzentration wie zu Beginn der Behandlung gemessen werden (21.770 pg/ml zu 21.890 pg/ml). Die Konzentrationen sanken zunächst innerhalb von zwei Wochen auf 10.540 pg/ml ab und stiegen in der vierten Woche auf ca. 26.550 pg/ml an und sanken erneut in den beiden folgenden Wochen auf minimal 9.270 pg/ml ab.

TIMP-2 konnte in schwankenden Konzentrationen zwischen maximal 3.570 pg/ml und minimal 920 pg/ml gemessen werden. Hierbei zeigten sich die höchsten Messwerte zu Beginn der Behandlung (3.570 pg/ml) und in Woche vier (3.300 pg/ml).

Die TIMP-4 Konzentrationen sanken während der ersten vier Wochen kontinuierlich von anfänglich 200 pg/ml bis auf 8 pg/ml in der vierten Woche, bevor in der sechsten Woche ein erneuter Anstieg auf 80 pg/ml gemessen werden konnte.

Bei der von der Proteinkonzentration unabhängigen Betrachtung ließen sich neben den absoluten Werten der einzelnen Messungen einige Unterschiede erkennen (Tabelle 21, Anhang). Für die Konzentrationen von MMP-1 stimmten hier die beiden Verläufe in den Grundtendenzen überein, lediglich in Woche vier war hier ein deutliches Absinken der Konzentration festzustellen.

Für MMP-2 zeigte sich parallel hierzu ein Fehlen des Anstiegs der Konzentration in Woche vier, ebenso wie für MMP-9, TIMP-2 und MMP-10. Im Allgemeinen sanken die Konzentrationen von MMP-9 bei dieser Darstellung kontinuierlich von der ersten Behandlungswoche an (von 275.010 pg/ml auf minimal 72.100 pg/ml). Die Konzentration von MMP-8 vervielfachte sich hier innerhalb der ersten Behandlungswochen und sank erst dann. Für die Konzentration von TIMP-2 waren hier ab der ersten Behandlungswoche deutlich niedrigere Konzentrationen zu messen, es fehlte ebenfalls ein erneutes Ansteigen in der vierten Behandlungswoche.

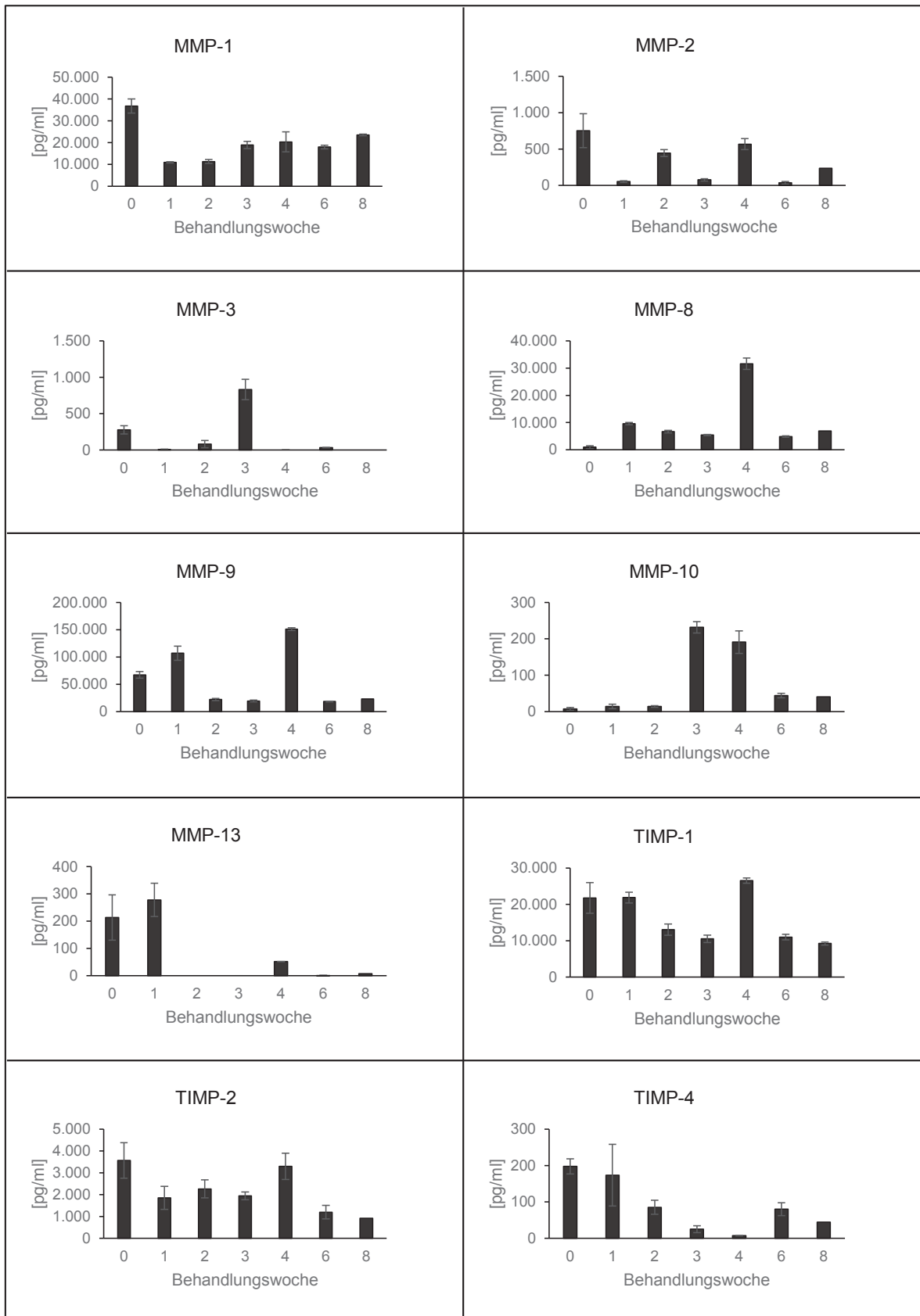


Abbildung 17: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 1 bezogen auf 100 µg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

5.7.2. Patient 2

Für den zweiten Patienten konnten (aus Gründen in seiner Person) Proben nur vor, innerhalb der ersten drei und der sechsten Behandlungswoche genommen werden. Die Untersuchung der Wundexsudate zeigte das vollständige Fehlen eines Nachweises von MMP-13 und TIMP-4 zu allen Zeitpunkten der Probennahmen. Für MMP-2 ließen sich nur Konzentrationen nah an der Nachweisgrenze (maximal 10 pg/ml) ermitteln. Bei der von der Gesamtproteinkonzentration abhängigen Auftragung der Messdaten (Abbildung 18; Tabelle 22, Anhang) konnte für MMP-1 zu Beginn der Behandlung eine Konzentration von 3.000 pg/ml ermittelt werden. In der ersten Woche der Behandlung wurden nur noch ca. 7 % (200 pg/ml) des Ausgangswertes gemessen. Dieser Wert stieg in der zweiten Woche auf 1.720 pg/ml an, bevor in der dritten und sechsten Behandlungswoche nur noch 500 pg/ml bzw. 450 pg/ml gemessen werden konnten.

MMP-3 konnte lediglich zu Beginn der Behandlung in einer Konzentration von 170 pg/ml gefunden werden, danach fehlte ein Nachweis in allen folgenden Behandlungswochen.

Über den ganzen Behandlungszeitraum tendenziell abnehmende Konzentrationen zeigten sich für MMP-10. Diese lagen zu Beginn der Behandlung bei einer Konzentration von 40 pg/ml vor und sanken innerhalb der ersten Woche der Behandlung auf ca. die Hälfte ab. Die Konzentrationen blieben unter diesem Niveau.

Für die MMP-8 und -9 sowie für TIMP-1 konnten ähnliche Verläufe der Konzentrationszu- bzw. -abnahmen im Verlauf der wöchentlichen Probennahmen beobachtet werden. Diese waren durch starke Zunahmen der Konzentrationen innerhalb der ersten Woche der Behandlung (MMP-8 von 300 pg/ml auf 1.600 pg/ml, MMP-9 von 1.530 pg/ml auf 10.340 pg/ml und TIMP-1 von 560 pg/ml auf 1.350 pg/ml) gekennzeichnet, auf die in der zweiten Behandlungswoche eine Abnahme auf etwa das doppelte Ausgangsniveau folgte. Bei den folgenden Probennahmen nach drei und sechs Wochen Behandlung konnten deutlich auf oberhalb des Ausgangsniveaus ansteigende Konzentrationen (MMP-8 maximal 2.040 pg/ml; MMP-9 maximal 13.120 pg/ml; TIMP-1 maximal 2420 pg/ml) berechnet werden.

Für TIMP-2 wurden vor Behandlungsbeginn und innerhalb der ersten drei Behandlungswochen schwankende Konzentrationen zwischen ursprünglich 350 pg/ml und 540 pg/ml beobachtet. Während der letzten Probennahme in Woche sechs der Behandlung wurde mit 790 pg/ml eine Konzentration ermittelt, die mehr als doppelt so hoch lag als zu Beginn der Behandlung.

Bei Nichtberücksichtigung der spezifischen Proteinkonzentrationen der einzelnen Proben (Abbildung 30; Tabelle 22, beide im Anhang) zeichnet sich für MMP-1, -2, -3, und -10 ein

vergleichbares Bild. Im Wesentlichen unterscheiden sich die Darstellungen in den maximal ermittelten Konzentrationen, die hier allerdings ca. zehnmal höher lagen.

Für MMP-8 und -9 zeichnete sich hier ein etwas unterschiedliches Bild ab. Die Konzentrationen lagen etwa doppelt so hoch wie bei der auf die Proteinkonzentration bezogenen Darstellung, und es zeigten sich für MMP-8 Konzentrationen zwischen minimal 3.030 pg/ml und maximal 4.100 pg/ml, für MMP-9 zwischen minimal 17.630 pg/ml und 26.500 pg/ml.

TIMP-1 und TIMP-2 wiesen vor Behandlungsbeginn höhere Konzentrationen auf. Für TIMP-1 lag die Konzentration vor Beginn der Behandlung bei 7.040 pg/ml. Bei den folgenden Probennahmen konnten abwechselnd Konzentrationen zwischen minimal 2.560 pg/ml und maximal 4.970 pg/ml gemessen werden. Bei TIMP-2 lag die Konzentration bei zunächst 4.330 pg/ml aber in den folgenden Behandlungswochen konnten Konzentrationen zwischen minimal 850 pg/ml und maximal 1.900 pg/ml gemessen werden.

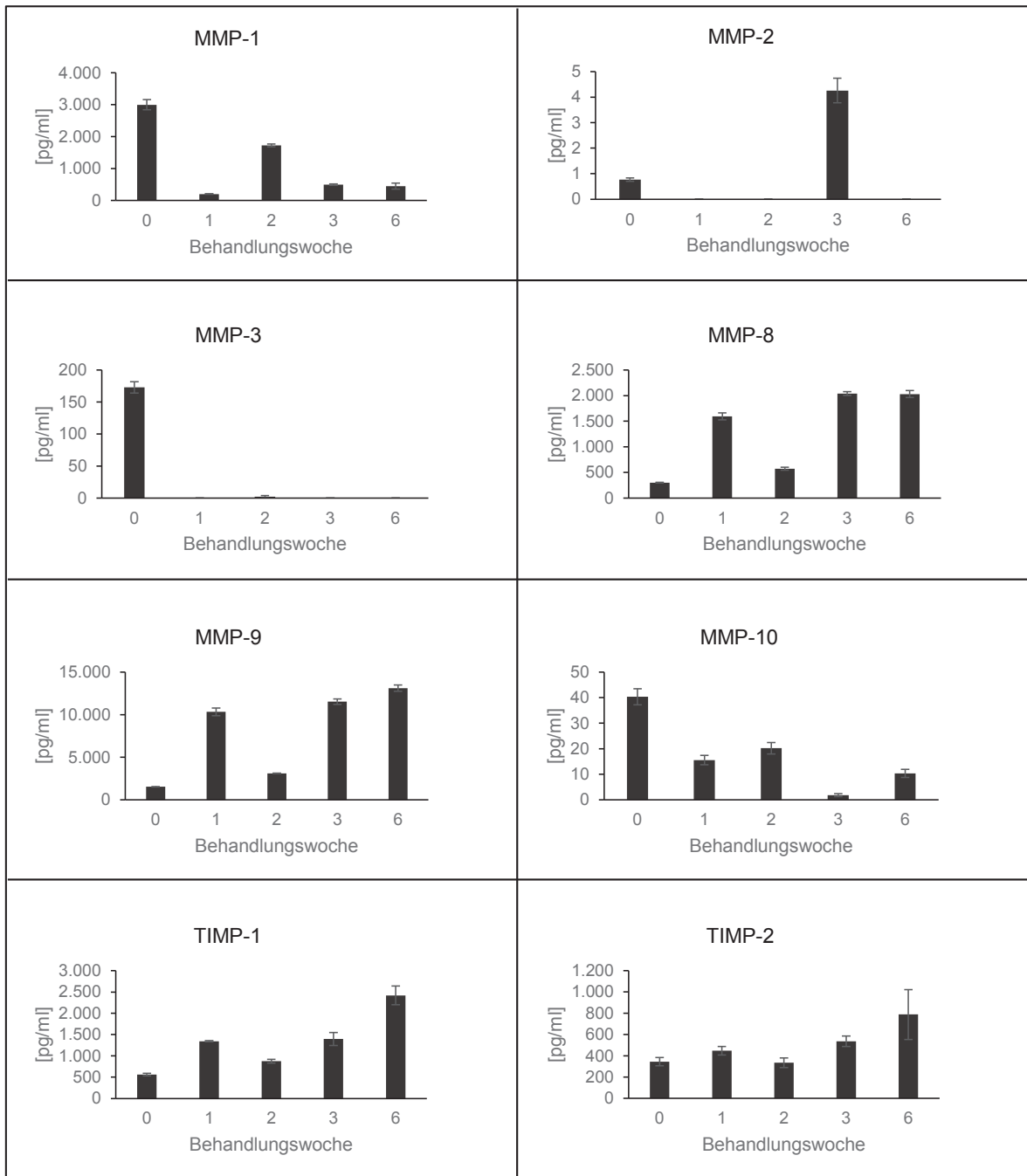


Abbildung 18: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 2 bezogen auf 100 µg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = tissue inhibitors of metalloproteinases.

5.7.3. Patient 3

Die Analyse der Exsudate des dritten Patienten zeigte im relativ kurzen Behandlungszeitraum von nur zwei Wochen im Wesentlichen das Auftreten aller untersuchten MMP und TIMP zu einem oder mehreren Zeitpunkten. Die Analyse der auf die Proteinkonzentration bezogenen Auftragung (Abbildung 19; Tabelle 23, Anhang) erbrachte zudem folgende Auffälligkeiten:

Die MMP-10 Konzentrationen lagen vor und in der ersten Behandlungswoche nahe an der Nachweisgrenze bei Werten unter 10 pg/ml. In der zweiten Woche der Behandlung war hierfür ein Anstieg auf 180 pg/ml zu verzeichnen. Die Konzentrationen von MMP-3 lagen bei allen drei Probennahmen sehr nahe an der Nachweisgrenze.

Für die Analyte MMP-1 und -2, sowie TIMP-1 und -2 war ein Anstieg der Konzentrationen innerhalb der ersten Woche der Behandlung zu messen (MMP-1 2.040 zu 1.210 pg/ml, MMP-2 630 pg/ml zu 430 pg/ml, TIMP-1 24.800 pg/ml zu 18.420 pg/ml, TIMP-2 3.320 pg/ml zu 1.650 pg/ml). Diesem Anstieg der Konzentrationen folgte in der zweiten Behandlungswoche ein Absinken der Konzentrationen auf ein Niveau unterhalb des Ausgangsniveaus. Im Gegensatz hierzu konnte für TIMP-4 ein temporäres Absinken der Konzentration in der ersten Behandlungswoche ermittelt werden (100 pg/ml zu 30 pg/ml).

Die MMP-8, -9 und -13 wiesen über den zweiwöchigen Behandlungsverlauf sinkende Konzentrationen auf (MMP-8 von 25.840 pg/ml auf 4.070 pg/ml, MMP-9 von 78.750 pg/ml auf 49.530 pg/ml, MMP-13 von 190 pg/ml auf 10 pg/ml).

Bei Nichtberücksichtigung der unspezifischen Proteinkonzentration (Abbildung 31) zeigten sich für die meisten Analyte zwar Unterschiede in den spezifischen Proteinkonzentrationen, jedoch stimmten die Tendenzen der einzelnen Verläufe überein. Eine Ausnahme hiervon bildeten MMP-8 und -9. Für diese lagen die Messwerte zu Beginn der Behandlung unterhalb der Messwerte in der ersten Behandlungswoche.

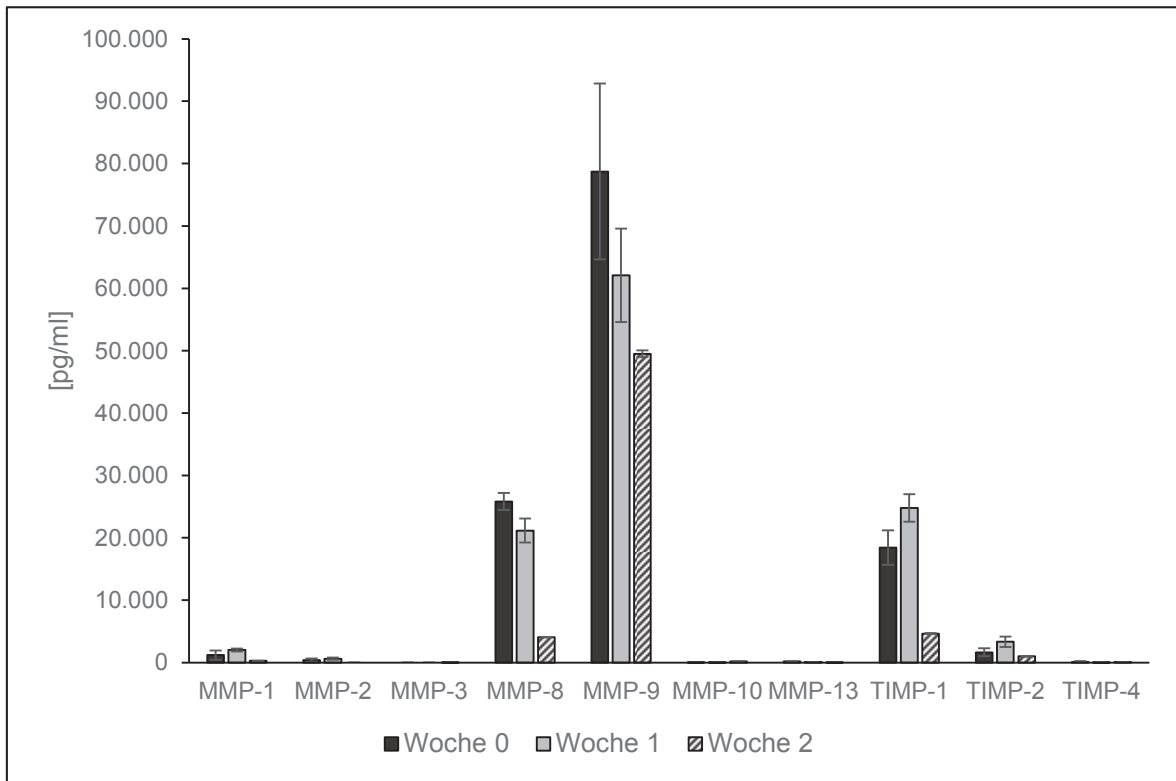


Abbildung 19: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 3 bezogen auf 100 µg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

5.7.4. Patient 4

Da die Behandlung von Patient 4 in der 2. Behandlungswoche abgebrochen wurde, konnten MMP- und TIMP-Level nur vor und nach einer Behandlungswoche ermittelt werden. Bei der von der Proteinkonzentration abhängigen Untersuchung (Abbildung 20; Tabelle 24 im Anhang) zeigten sich MMP-13 und TIMP-4 als nicht vorhanden und MMP-2, -3 und -10 als nahezu nicht nachweisbar.

Es zeigte sich bei der Betrachtung der auf die Proteinkonzentration gewichteten Daten gleichbleibende Konzentrationen (ca. 330 pg/ml) von MMP-1. Die Konzentrationen von MMP-8 haben sich in diesem Zeitraum von ca. 1.100 pg/ml auf 570 pg/ml und die Level von MMP-9 von 7.060 pg/ml auf 3.200 pg/ml halbiert. Ebenfalls in geringerer Konzentration konnte TIMP-2 mit 150 pg/ml zu ca. 100 pg/ml nachgewiesen werden. Mehr als verdoppelt hatte sich die Konzentration von TIMP-1 mit 210 pg/ml auf 500 pg/ml. Bei der Analyse der ungewichteten Daten (Abbildung 32 und Tabelle 24, beides im Anhang) verdoppelte sich die Konzentration von MMP-1 (970 pg/ml auf 2.410 pg/ml). Die Konzentration von MMP-8 nahm leicht zu (3430 pg/ml auf 3880 pg/ml), und die Konzentration von MMP-9 war etwa gleichbleibend (22.000 pg/ml zu 21.910 pg/ml). Alle anderen Tendenzen verliefen parallel zu den gewichteten Daten.

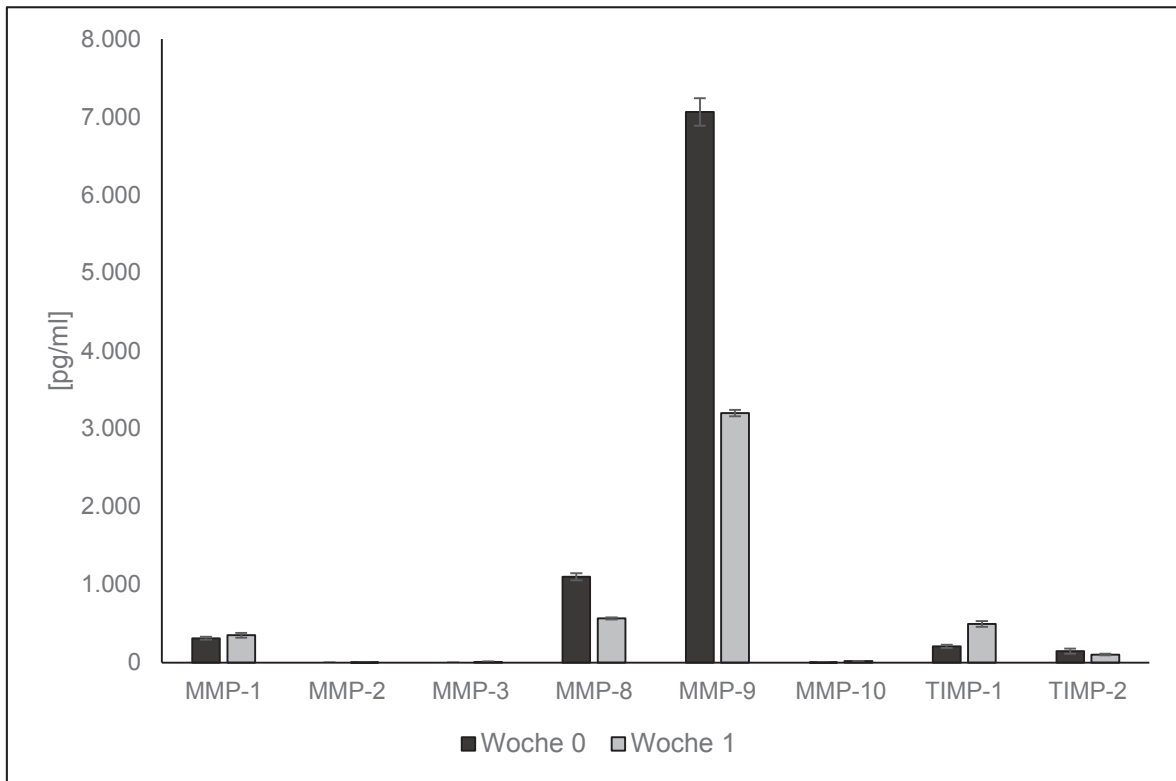


Abbildung 20: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 4 bezogen auf 100 µg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

5.7.5. Patient 5

Die Untersuchung der Wundexsudate von Patient 5 zeigte die Anwesenheit aller zu untersuchenden MMP und TIMP zu allen Zeitpunkten der Probennahmen. Bei Betrachtung der auf 100 µg Protein bezogenen Daten (Abbildung 21; Tabelle 25, Anhang) zeigte sich im Exsudat zu Beginn des Heilversuchs ein besonders hohes Level an MMP-1 (98.340 pg/ml), das innerhalb der ersten Behandlungswoche auf weniger als die Hälfte (43.820 pg/ml) absank. Bei der Messung in den Behandlungswochen zwei bis fünf erhöhten sich diese Werte wieder auf in etwa das Ausgangsniveau (minimal 86.670 pg/ml bis maximal 117.640 pg/ml), bevor in Behandlungswoche sechs eine erneute Verminderung des Niveaus auf ca. 23.100 pg/ml gemessen werden konnte. In der achten Behandlungswoche konnte wiederum ein Anstieg auf 87.200 pg/ml festgestellt werden.

Ein allerdings in den Dimensionen der Messwerte unterschiedliches aber dennoch vergleichbares Muster zeigten die Proteinasen MMP-2, für die in etwa eine Verdopplung der Konzentration (250 pg/ml zu 480 pg/ml), und MMP-9, für die in etwa eine Verdreifachung der kalkulierten Messwerte innerhalb der ersten Behandlungswoche gemessen werden konnte (23.900 pg/ml zu 75.810 pg/ml). Hierauf folgte in Behandlungswoche drei ein Anstieg auf etwa das Vierfache des Ausgangsniveaus. In den

folgenden beiden Behandlungswochen sanken diese Werte wieder auf bzw. etwas unter die anfänglichen Konzentrationen (MMP-2), bevor ein erneuter Anstieg des Spiegels auf etwa das Doppelte (MMP-2) bis Vierfache (MMP-9) des jeweiligen Ausgangsniveaus erfolgte. Bei der letzten Probennahme in der achten Behandlungswoche konnten für MMP-9 wieder Werte entsprechend des Ausgangsniveaus und für MMP-2 Werte, die einem Fünftel des Ausgangsniveaus entsprachen, gemessen werden.

Ebenfalls vergleichbare Verläufe zeigten die Konzentrationen von MMP-8 und TIMP-1. Für MMP-8 bewegten sich die Messwerte insgesamt zwischen 4.360 pg/ml und 7.490 pg/ml, allerdings mit Ausnahme der dritten Behandlungswoche, in der ein Anstieg auf 10.510 pg/ml zu verzeichnen war.

Für TIMP-1 bewegten sich die Konzentrationen zwischen 9.550 pg/ml und 15.230 pg/ml mit einem Anstieg in der dritten Behandlungswoche auf etwa 24.670 pg/ml.

Die Konzentrationen von MMP-3 stiegen im Wesentlichen zunächst von 1.230 pg/ml auf 2.290 pg/ml an, bevor sie in der vierten Behandlungswoche wieder in etwa das Ausgangsniveau erreichten. Es erfolgte ein weiterer Anstieg auf 2.720 pg/ml in der fünften Behandlungswoche, bevor in der sechsten bzw. achten Behandlungswoche Werte von 860 pg/ml bzw. 1.670 pg/ml gemessen werden konnten.

Die Messwerte für MMP-10 und MMP-13 lagen nahe der Nachweisgrenze. Hierbei zeigte sich für MMP-13 ein in wöchentlichen Abständen alternierendes Auf- und Absteigen der Messwerte, bei dem sich die Konzentrationen stets zumindest verdoppelten oder halbierten (26 bis 99 pg/ml), bevor die Konzentration in Woche fünf und sechs auf einem Niveau von ca. 70 pg/ml stabil blieb und dann in Woche acht erneut auf ca. 40 pg/ml absank.

Für MMP-10 zeigte sich in der ersten Behandlungswoche ein Niveau, das in etwa dem Ausgangsniveau entsprach (36 pg/ml bzw. 30 pg/ml), bevor dieses in den nächsten beiden Behandlungswochen auf ungefähr das Doppelte anstieg (77 pg/ml bzw. 66 pg/ml). Hiernach sank das Niveau auf 5 pg/ml in Woche vier ab, bevor es in Woche fünf auf 97 pg/ml, also auf das Zwanzigfache, anstieg. In den folgenden drei Behandlungswochen sank die Konzentration stetig auf 5 pg/ml bis zur achten Behandlungswoche.

Die Konzentrationen des Inhibitors TIMP-2 sanken während des gesamten Behandlungsverlaufs von einem anfänglichen Niveau von 1.760 pg/ml auf 770 pg/ml mit Ausnahme von Woche fünf, in der eine vorübergehende Erhöhung ermittelt werden konnte.

Die ermittelten Konzentrationen des Inhibitors TIMP-4 schwankten während des gesamten Behandlungszeitraums zwischen 60 pg/ml und 110 pg/ml, wobei auch hier ein Anstieg auf

180 pg/ml (ähnlich dem bei MMP-3 und MMP-10 sowie TIMP-2) in Behandlungswoche fünf zu beobachten war.

Bei Außerachtlassung der jeweiligen Proteinkonzentrationen zeigten sich mit Blick auf die Amplitude der Differenzen einige Unterschiede (Abbildung 33 und Tabelle 25, beides im Anhang). Lediglich MMP-9 zeigt bei dieser Darstellung ein über den ganzen Behandlungszeitraum konstantes Niveau (92.560 bis 107.770 pg/ml).

Alle anderen Analyte zeigten bei dieser Darstellung (meist in wöchentlichen Abständen) stark variierende Konzentrationen mit der Gemeinsamkeit, dass in der ersten Behandlungswoche eine starke Reduktion um etwa den Faktor vier erfolgte (MMP-1, -8, -10, TIMP-1, -2 und -4). Dieser Effekt war weniger stark ausgeprägt bei MMP-3 und fehlte völlig bei MMP-13.

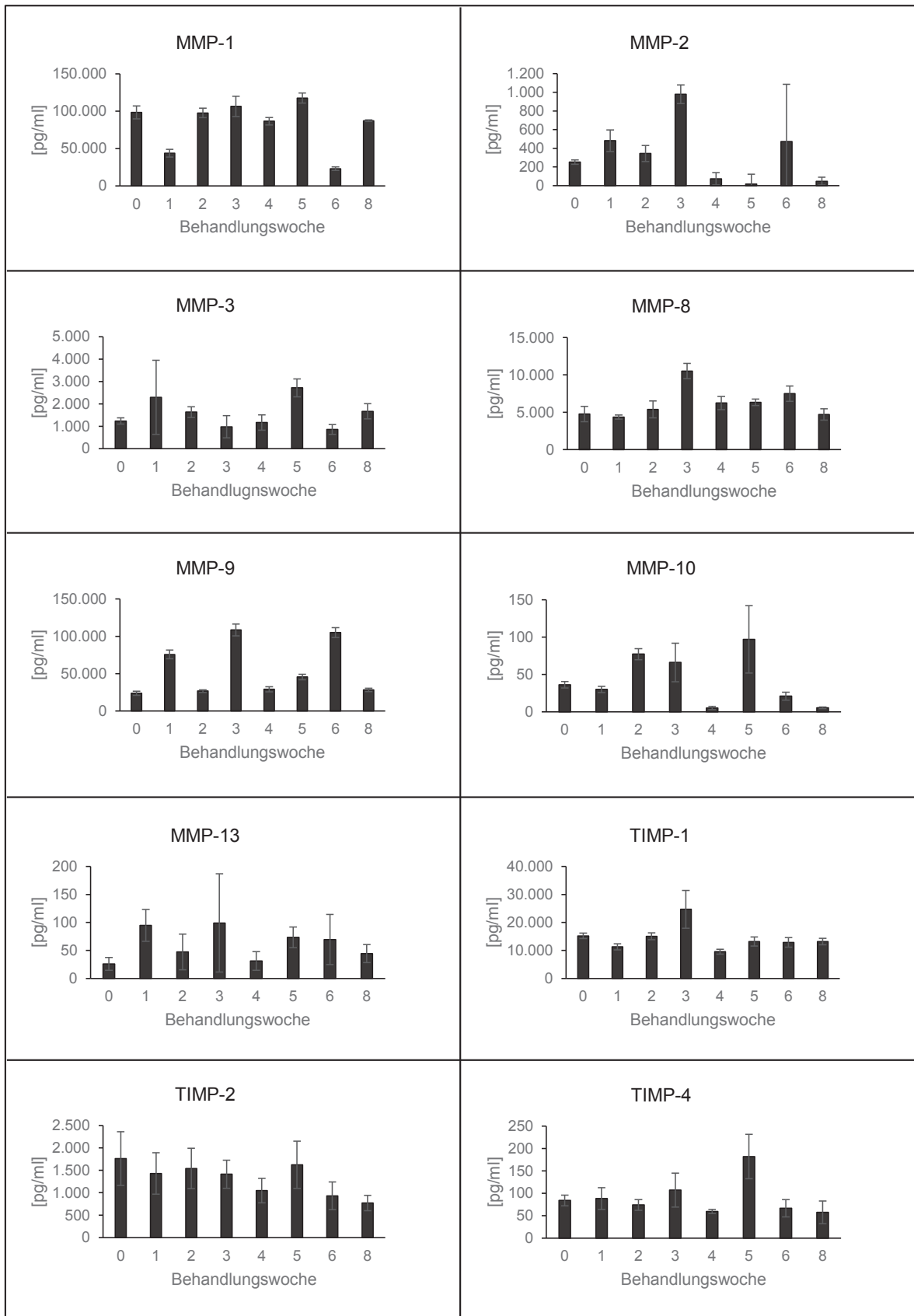


Abbildung 21: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 5 bezogen auf 100 µg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

5.7.6. Patient 6

Die auf 100 µg Protein gewichtete Analyse der Wundexsudate von Patient 6 konnte fast alle untersuchten MMP und TIMP zu einem oder zu mehreren Zeitpunkten im Exsudat nachweisen. Die Ausnahme bildet hierbei MMP-10, die nur in Konzentrationen nahe der Nachweisgrenze gemessen werden konnte (Abbildung 22; Tabelle 26, Anhang).

Ein vergleichbares Muster in den Veränderungen der Konzentrationen konnte für MMP-2, MMP-3, MMP-13 und TIMP-4 ermittelt werden. Es zeigte sich eine deutliche Reduktion der Konzentrationen in den Exsudaten ab der ersten Behandlungswoche, die bis zur dritten Behandlungswoche anhielt, bevor ein deutlicher Anstieg der Konzentrationen auf oberhalb des Ausgangsniveaus stattfand. In den Behandlungswochen fünf bis sieben konnten auf Wunsch des Patienten keine Proben genommen werden. In der achten Behandlungswoche lagen Konzentrationen wieder deutlich unterhalb der Ausgangswerte vor der Behandlung.

Für MMP-2 konnte vor Behandlungsbeginn eine Konzentration von 3.170 pg/ml gemessen werden, die für drei Behandlungswochen auf Werte zwischen 400 pg/ml und 670 pg/ml absank und dann wieder auf ungefähr das Doppelte des Ausgangswerts auf 6.500 pg/ml anstieg. Für MMP-3 sanken die Konzentrationen von anfänglich ca. 5.690 pg/ml auf minimal 1.000 pg/ml und stiegen dann in Behandlungswoche vier auf ein Maximum von 10.400 pg/ml an. Die Konzentration von MMP-13 betrug vor Behandlungsbeginn zunächst 870 pg/ml und sank auf minimal 60 pg/ml, bevor diese auf ca. 1.450 pg/ml anstieg. Die Werte für TIMP-4 sanken von anfänglich 650 pg/ml auf minimal 150 pg/ml mit einem maximalen Anstieg auf 2.720 pg/ml in Woche vier.

Für den Inhibitor TIMP-2 zeichnete sich ein ähnliches Bild ab, wobei die Konzentrationen von zunächst ca. 2.590 pg/ml auf minimal etwa 970 pg/ml absanken und in Woche vier auf 4.010 pg/ml anstiegen.

Ebenfalls vergleichbar waren die Verläufe der ermittelten Konzentrationen von MMP-8 und MMP-9. Auffällig waren hierbei eine Reduktion der Konzentrationen innerhalb der ersten Behandlungswoche und ein fast vollständiges Fehlen des Nachweises in Woche vier. Für MMP-8 lag der Ausgangswert bei 65.330 pg/ml und sank auf 18.980 pg/ml ab. Für MMP-9 lag der Anfangswert bei ca. 389.600 pg/ml und reduzierte sich auf nicht mehr als 79.550 pg/ml.

Für MMP-1 konnte als einzige Proteinase ein deutlicher Anstieg von 19.430 pg/ml um ungefähr das Doppelte auf 42.860 pg/ml innerhalb der ersten Behandlungswoche ermittelt werden. In den folgenden Behandlungswochen konnte ein sich abwechselnder Auf- und Abstieg deutlich unter bzw. oberhalb der Messwerte des Ausgangsniveaus ermittelt

werden. Gegen Ende des Heilversuchs lag die Konzentration von MMP-1 im Exsudat in etwa auf dem Niveau vor der Behandlung.

Bei der Betrachtung der direkt ermittelten von der Gesamtproteinkonzentration unabhängigen spezifischen Proteinkonzentrationen zeigte sich ein anderes Bild (Abbildung 34; Tabelle 26, beide im Anhang). In dieser Darstellung verliefen die Änderungen in den Konzentrationen der Proteinase MMP-1, MMP-8, MMP-10 und aller gemessenen Inhibitoren TIMP-1, TIMP-2, und TIMP-4 in etwa parallel. Kennzeichnend war hierbei das Ansteigen in der ersten, dritten und achten Behandlungswoche auf ein deutlich höheres Niveau im Vergleich zur jeweils vorhergegangenen Woche.

Die Proteinase MMP-2 und MMP-3 wiesen hierbei einen ebenfalls parallelen Verlauf auf, der sich durch eine starke Verringerung der Konzentrationen in der zweiten Behandlungswoche, gefolgt von einem Anstieg auf das Ausgangsniveau in der dritten Woche und einem erneuten Absinken zu den weiteren Messpunkten in der vierten und achten Behandlungswoche beschreiben lässt.

MMP-9 wurde bei dieser direkten Messung nahezu im gesamten Behandlungszeitraum in konstanter Konzentration nachgewiesen. Eine Ausnahme war die vierte Behandlungswoche, in der nur ein sehr geringer Wert ermittelt wurde. Die Konzentration von MMP-13 zeigte hierbei eine über die gesamte Behandlung hinweg sinkende Tendenz.

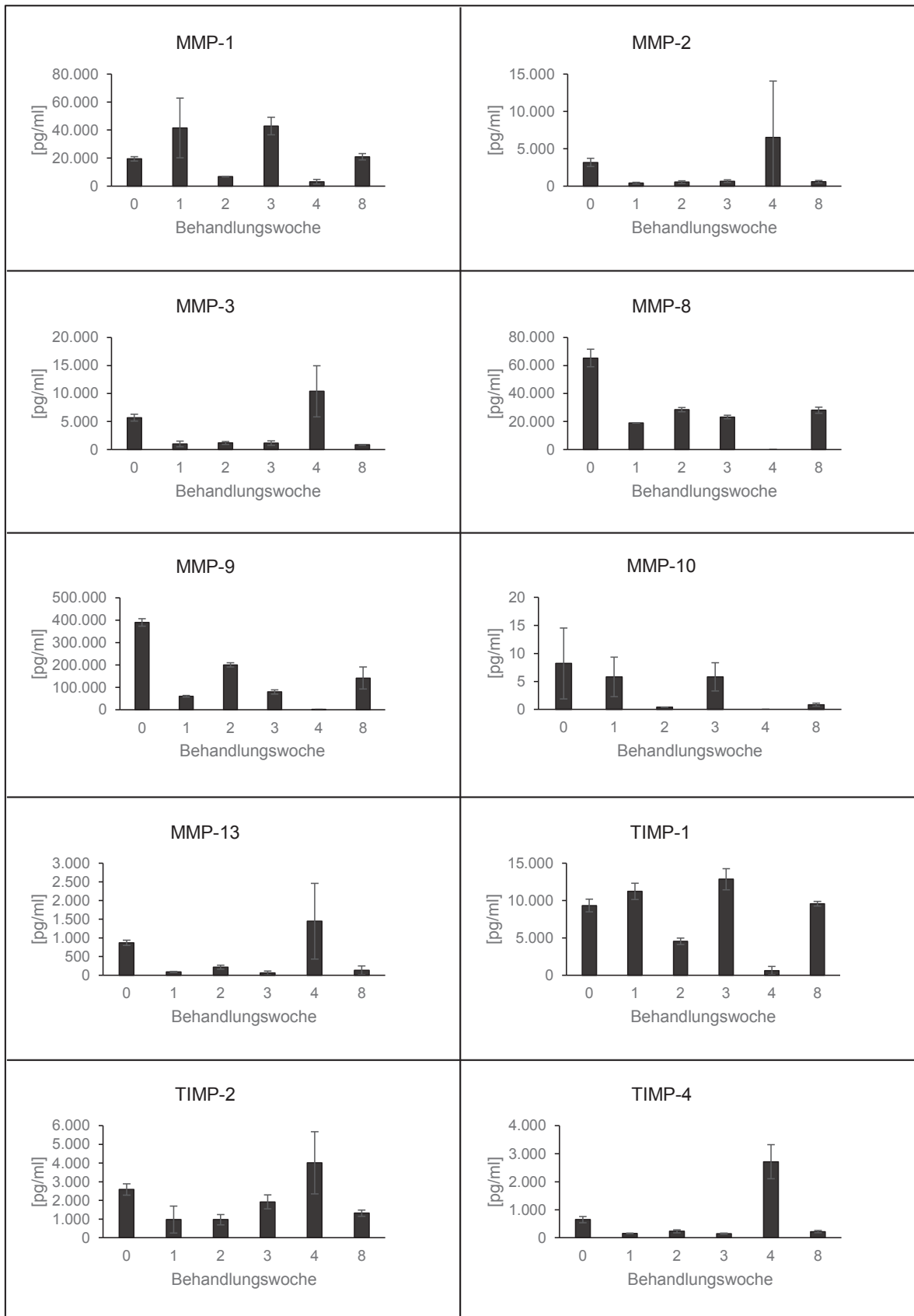


Abbildung 22: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 6 bezogen auf 100 µg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

5.7.7. Patient 7

In den Wundexsudaten von Patient 7 konnten alle MMP und TIMP nachgewiesen werden. Lediglich die ermittelten Konzentrationen für MMP-10 lagen sehr nahe an der Detektionsgrenze. Werden die Messdaten auf eine Proteinkonzentration von 100 µg/ml bezogen, lassen sich einige spezielle Beobachtungen machen (Abbildung 23; Tabelle 27, Anhang).

Für MMP-1 konnten vor Behandlungsbeginn und innerhalb der ersten beiden Behandlungswochen relativ konstante, hohe Konzentrationen zwischen 83.300 pg/ml und 119.100 pg/ml gemessen werden. In Woche drei erfolgte ein starkes Absinken der Konzentration auf ca. 6.000 pg/ml, bevor die Konzentration in Woche vier erneut auf etwa 74.480 pg/ml anstieg und in Woche fünf einen Wert von 108.470 pg/ml erreichte. Hierauf konnte in der nächsten Woche eine wiederum starke Reduktion der Konzentration nachgewiesen werden (22.470 pg/ml), der jedoch ein deutlicher Anstieg auf 103.970 pg/ml in Woche sieben und der Nachweis einer Konzentration von 1.910 pg/ml in der achten Behandlungswoche folgte.

MMP-13 konnte in nur geringen Konzentrationen nachgewiesen werden (maximal 170 pg/ml), die sich im Wesentlichen um einen Wert von ca. 100 pg/ml bewegten. Parallel zu MMP-1 konnte für MMP-13 in der dritten und achten Behandlungswoche kein Nachweis erbracht werden.

Die Konzentration von MMP-8 lag in den ersten drei Wochen der Behandlung zwischen Werten von 9.350 pg/ml bis 15.340 pg/ml. In Woche vier konnte eine deutliche Erhöhung der Konzentration (26.640 pg/ml) beobachtet werden, bevor in Woche fünf eine deutlich reduzierte Konzentration (7.030 pg/ml) beobachtet wurde. Hierauf folgten in Woche sechs ein starker Anstieg auf 37.430 pg/ml und ein erneut verringerter Wert in den folgenden beiden Behandlungswochen.

Für MMP-9 zeigten sich steigende Konzentrationen, die sich in der fünften Behandlungswoche etwa verdoppelt hatten (von 30.430 pg/ml auf 61.080 pg/ml). Nach einem Absinken auf etwa das Ausgangsniveau, konnte in der sechsten Behandlungswoche in etwa eine Verdreifachung der Konzentration (111.880 pg/ml) ermittelt werden, die dann in den nächsten beiden Wochen der Behandlung auf 50.500 pg/ml absank.

Die Konzentrationen von MMP-2 lagen bis zur zweiten Behandlungswoche bei 490 pg/ml bis 690 pg/ml. Hierauf folgte ein starker Anstieg der Konzentration auf ca. 1.630 pg/ml. Dieser sank dann innerhalb von zwei Behandlungswochen auf ca. 120 pg/ml. In den folgenden drei Wochen erfolgte ein gradueller Anstieg der Konzentrationen auf maximal 1.100 pg/ml.

Die Konzentration von MMP-3 in den Wundexsudaten blieb in den ersten beiden Behandlungswochen vergleichbar mit der zu Beginn der Behandlung ermittelten Konzentration (2.690 pg/ml bis 3.390 pg/ml). Diese sank dann in der dritten Woche der Behandlung deutlich ab (470 pg/ml), war dann vergleichbar mit MMP-1 und MMP-13. Ein erneuter leichter Anstieg der Konzentration war in Woche fünf zu verzeichnen (2.510 pg/ml). Dieser Wert halbierte sich in den beiden Folgewochen nahezu (1.480 pg/ml). In der achten Woche fand aber ein erneuter Anstieg (4.580 pg/ml) statt.

Die Konzentrationen von TIMP-1 im Exsudat waren über den gesamten Behandlungszeitraum tendenziell abnehmend (14.510 pg/ml vor Behandlung bis 60 pg/ml in Woche acht), jedoch gab es in den Wochen drei und sechs zwischenzeitlich angestiegene Konzentrationen (13.220 pg/ml bzw. 12.690 pg/ml). Ebenfalls abnehmend waren die Konzentrationen von TIMP-2 (2.000 pg/ml vor Behandlung bis 0 pg/ml in Woche acht). Auch hier fand ein zwischenzeitlicher Anstieg der Konzentration in Woche fünf statt (1.230 pg/ml).

Es zeigte sich für TIMP-4 eine Konzentration von 190 pg/ml, die in den folgenden zwei Behandlungswochen auf etwa ein Viertel absank (50 pg/ml). Dieses Muster wiederholte sich in den folgenden Wochen, bis in der achten Woche kein Nachweis mehr gegeben war.

Werden die Messwerte nicht auf die Proteinkonzentration bezogen (Abbildung 35 und Tabelle 27, beides im Anhang), zeigte sich für MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-8, MMP-10 und MMP-13 tendenziell ein ähnliches Bild. Für MMP-9 lagen die Messwerte vor und während der ersten sieben Behandlungswochen auf etwa demselben Niveau von ca. 100.000 pg/ml. In dieser Zusammenstellung ähneln sich die Verläufe der Konzentrationen der Inhibitoren TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 zunehmend, so dass ein generell abnehmender Trend bis zum vollständigen Fehlen in der achten Behandlungswoche zu beobachten war.

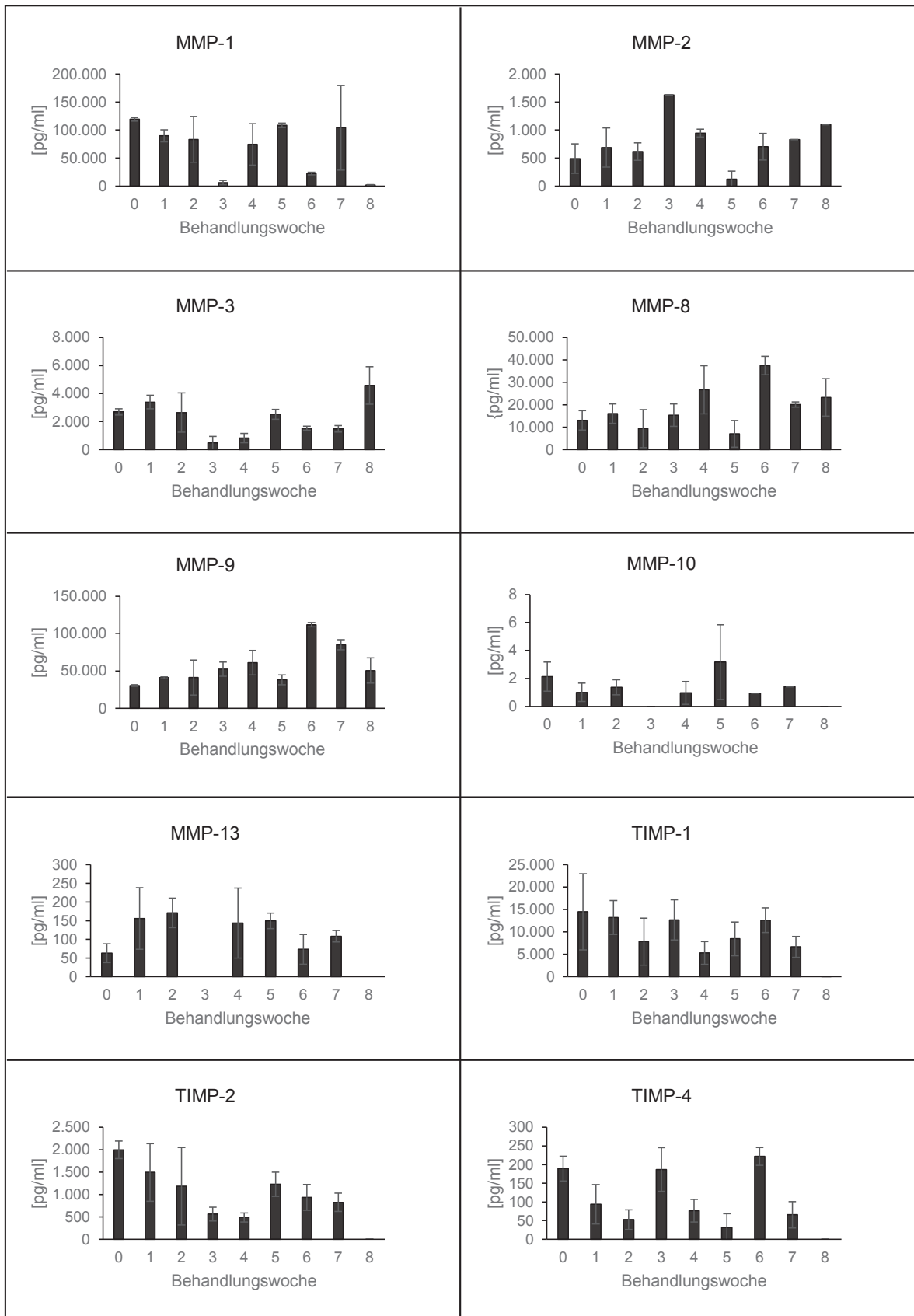


Abbildung 23: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 7 bezogen auf 100 µg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

5.7.8. Patient 8

Während der Behandlung des achten Patienten konnten generell alle untersuchten Proteinase und deren Inhibitoren zu mindestens einem Zeitpunkt im Exsudat nachgewiesen werden (Abbildung 24; Tabelle 28 im Anhang). Verglichen mit allen gemessenen Proteinase wurde MMP-10 in relativ geringen Konzentrationen von maximal 116 pg/ml zu Behandlungsbeginn gemessen. Im Verlaufe der Behandlung nahm diese Konzentration kontinuierlich bis zum Ende der Behandlung auf ca. 10 pg/ml ab.

Für MMP-3 konnte zu Beginn der Behandlung kein Nachweis erfolgen. Lediglich in Woche drei konnte eine Konzentration von ca. 300 pg/ml ermittelt werden. Während aller anderen Behandlungswochen fehlte der Nachweis. Ein ähnlicher Verlauf konnte für MMP-1 ermittelt werden. Hierfür erfolgte vor Beginn der Behandlung ebenfalls kein Nachweis. In der ersten Behandlungswoche konnten dann aber 5.640 pg/ml im Wundexsudat nachgewiesen werden und in der zweiten Woche mit 79.610 pg/ml eine etwa vierzehnfach höhere Konzentration. In den folgenden Behandlungswochen sank die Konzentration im Exsudat auf unter 5.000 pg/ml ab, bis in Woche sieben schließlich kein Nachweis mehr möglich war.

In ebenfalls sehr geringen Konzentrationen konnte MMP-13 nachgewiesen werden. Hierfür konnten zu Beginn der Behandlung eine Konzentration von ca. 100 pg/ml nachgewiesen werden. Hier schwankten die Konzentrationen in den folgenden sechs Behandlungswochen zwischen 17 pg/ml und 72 pg/ml, bis gegen Ende der Behandlung kein Nachweis mehr erfolgte.

Die Konzentration von MMP-9 lag vor der Behandlung bei 122.650 pg/ml. Auch hier wurden in den nächsten Wochen stark schwankende Werte (minimal 61.660 pg/ml bis 100.460 pg/ml) gemessen.

Für MMP-8 konnten in den ersten beiden Behandlungswochen steigende Werte von 6.900 pg/ml auf maximal 16.420 pg/ml ermittelt werden, die aber bis zum Behandlungsende kontinuierlich wieder auf 9.180 pg/ml absanken.

Ebenfalls in den ersten beiden Wochen steigende Konzentrationen konnten für TIMP-1 ermittelt werden (von 12.060 pg/ml auf maximal 23.350 pg/ml). Zwischen der zweiten und dritten Behandlungswoche sank diese Konzentration jedoch auf etwa die Hälfte des Ausgangslevels (6.360 pg/ml) ab. Über diese Konzentration hinaus stiegen die Messwerte auch bis zum Ende der Behandlung nicht mehr an. TIMP-4 konnte zu Beginn der Behandlung nicht nachgewiesen werden, es zeigten sich aber innerhalb der ersten beiden Behandlungswochen steigende Konzentrationen auf maximal etwa 240 pg/ml. In den darauf folgenden Behandlungswochen konnten nur deutlich geringere Konzentrationen von maximal 66 pg/ml nachgewiesen werden, bevor in der siebten Woche ein erneuter Anstieg

auf 520 pg/ml gemessen werden konnte. Im Gegensatz zu TIMP-1 und TIMP-4 sank die Konzentration an TIMP-2 innerhalb der ersten Behandlungswoche von ca. 3.100 pg/ml auf ca. 800 pg/ml. Bis zur siebten Behandlungswoche, in der ein Anstieg auf ca. 1.400 pg/ml zu verzeichnen war, stiegen die ermittelten Konzentrationen nicht über 1.000 pg/ml.

Bezieht man die ermittelten Konzentrationen nicht auf die vorliegenden Proteinkonzentrationen, so zeigen sich einige abweichende Beobachtungen (Abbildung 36 und Tabelle 28, beides im Anhang). Im Vergleich zu den gewichteten Daten zeigen sich hier für die Proteinase MMP-9, MMP-10, MMP-13 und den Inhibitor TIMP-2 deutliche Anstiege innerhalb der ersten Behandlungswoche. Die übrigen Verläufe entsprechen hierbei, unabhängig von den absoluten Konzentrationen, in etwa denen der gewichteten Daten.

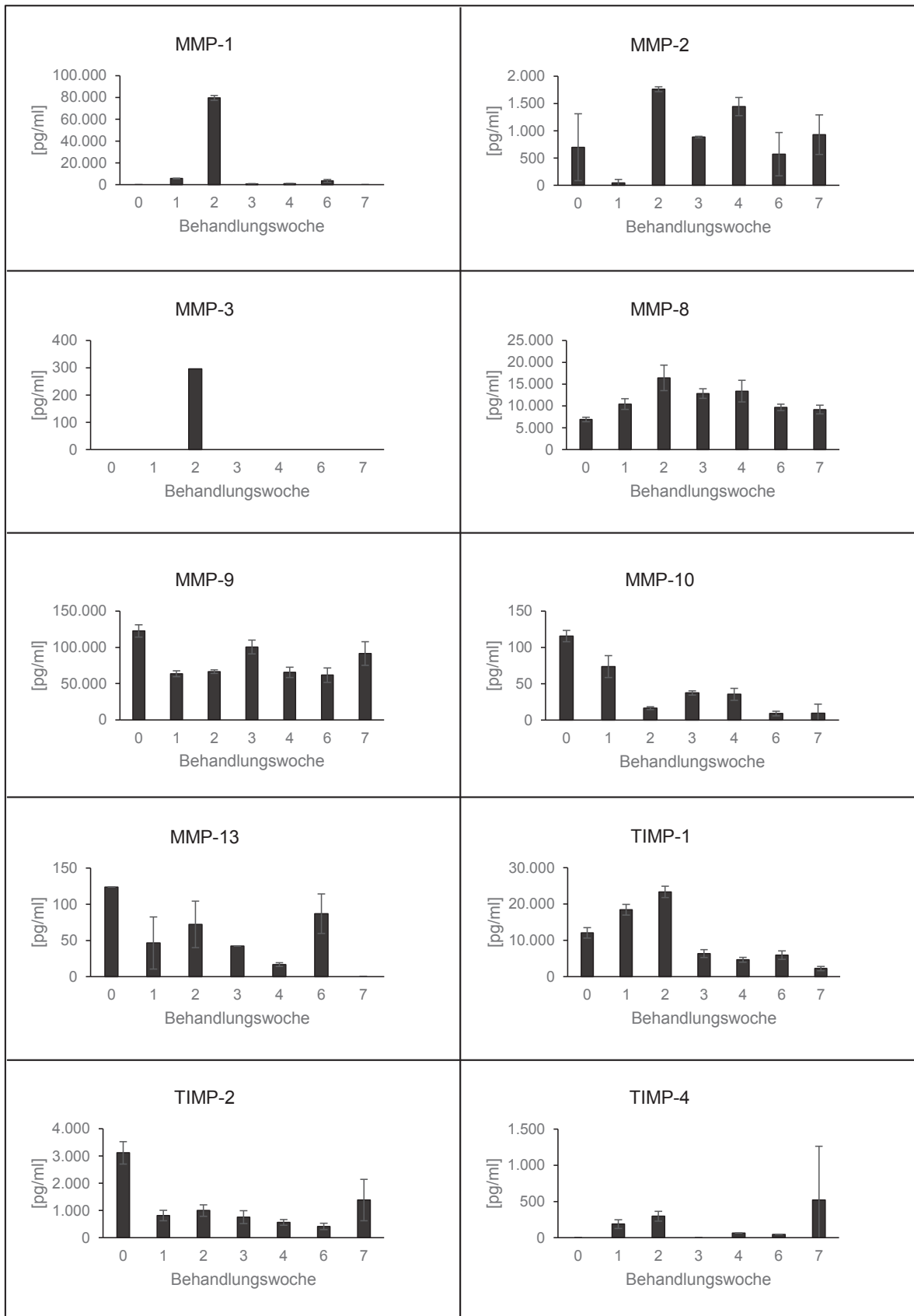


Abbildung 24: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 8 bezogen auf 100 µg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

5.7.9. Patient 9

Bei der Untersuchung der Exsudate von Patient 9 zeigte sich das Fehlen von MMP-13 während des gesamten Behandlungszeitraums. Bei der auf die Gesamtproteinkonzentration bezogene Darstellung wurden MMP-2 und TIMP-4 zudem mit unter 5 pg/ml und unter 10 pg/ml nur sehr nahe an der Nachweisgrenze des Testsystems nachgewiesen (Abbildung 25;Tabelle 29 im Anhang).

MMP-3 zeigte sich vor Behandlungsbeginn nur in einem geringen Level von etwa 20 pg/ml, in etwa der sechsfachen Menge (120 pg/ml) in der ersten Behandlungswoche und fehlte völlig in allen anderen Behandlungswochen. MMP-10 zeigte einen ähnlich starken Anstieg von ca. 150 pg/ml vor Behandlung auf etwa 980 pg/ml in Woche eins. In den beiden folgenden Behandlungswochen konnte MMP-10 in Konzentrationen von 540 pg/ml und 970 pg/ml nachgewiesen werden, bevor das Level auf ca. das Ausgangsniveau zurückging und dort auch bis zum Ende der Behandlung verblieb.

Die Konzentration von MMP-1 lag zu Beginn bei 6.870 pg/ml und sank in den ersten vier Behandlungswochen kontinuierlich auf etwa 70 pg/ml ab. Bis zur Behandlungswoche sechs erfolgte ein erneuter Anstieg auf etwa 1.360 pg/ml, bis in Woche sieben kein Nachweis von MMP-1 mehr erfolgen konnte.

Ein ähnlicher Verlauf zeigte sich für TIMP-2, dessen Level von anfänglich etwa 1.120 pg/ml innerhalb der ersten vier Wochen der Behandlung kontinuierlich auf 140 pg/ml absank. Es erfolgte ein leichter Anstieg der Konzentration auf ca. 400 pg/ml in Behandlungswoche sechs, bevor in Woche sieben nur noch 15 pg/ml gemessen werden konnten. Für die Konzentrationen des Inhibitors TIMP-1 zeigte sich eine vergleichbare, kontinuierliche Abnahme von 2.410 pg/ml vor Behandlungsbeginn auf 600 pg/ml in Woche fünf, bevor ein erneuter Anstieg auf ca. 1.770 pg/ml in Behandlungswoche sechs erfolgte. In Woche sieben war kein Nachweis mehr möglich.

Für die Level an MMP-8 und MMP-9 zeigten sich vergleichbare Verläufe im Zuge der Behandlung, gekennzeichnet durch in etwa gleichbleibende Konzentrationen dieser Proteinase innerhalb der ersten drei Behandlungswochen gefolgt von einem Anstieg in Woche vier der Behandlung. Für MMP-8 lagen diese Werte zunächst zwischen 1.290 pg/ml und 1.410 pg/ml und stiegen dann auf 1.820 pg/ml an. Für MMP-9 lagen die Werte zunächst zwischen 8.990 pg/ml und 10.220 pg/ml und stiegen in der vierten Woche auf 15.860 pg/ml an. Die Level beider Proteinase sanken in Woche fünf deutlich unter das Niveau vor Behandlungsbeginn gefolgt von einem erneuten Anstieg auf in etwa das Ausgangsniveau in Woche sechs und einem erneuten Absinken auf Werte unterhalb des Ausgangsniveaus.

Die von der Proteinkonzentration unabhängige Untersuchung der Exsudate (Abbildung 37 und Tabelle 29, beides im Anhang) von Patient 9 zeigte unterschiedliche absolute Proteinkonzentrationen für die gemessenen Proteinase, aber für die meisten Analyte, mit Ausnahme von MMP-8, -9 und -10, denselben tendenziellen Verlauf.

Für MMP-8 und -9 erscheint der Verlauf der ermittelten Konzentrationen in dieser Darstellung parallel zu TIMP-1. Für MMP-10 war im Unterschied zu den gewichteten Proben kein erneuter Anstieg der Konzentration in Woche drei festzustellen.

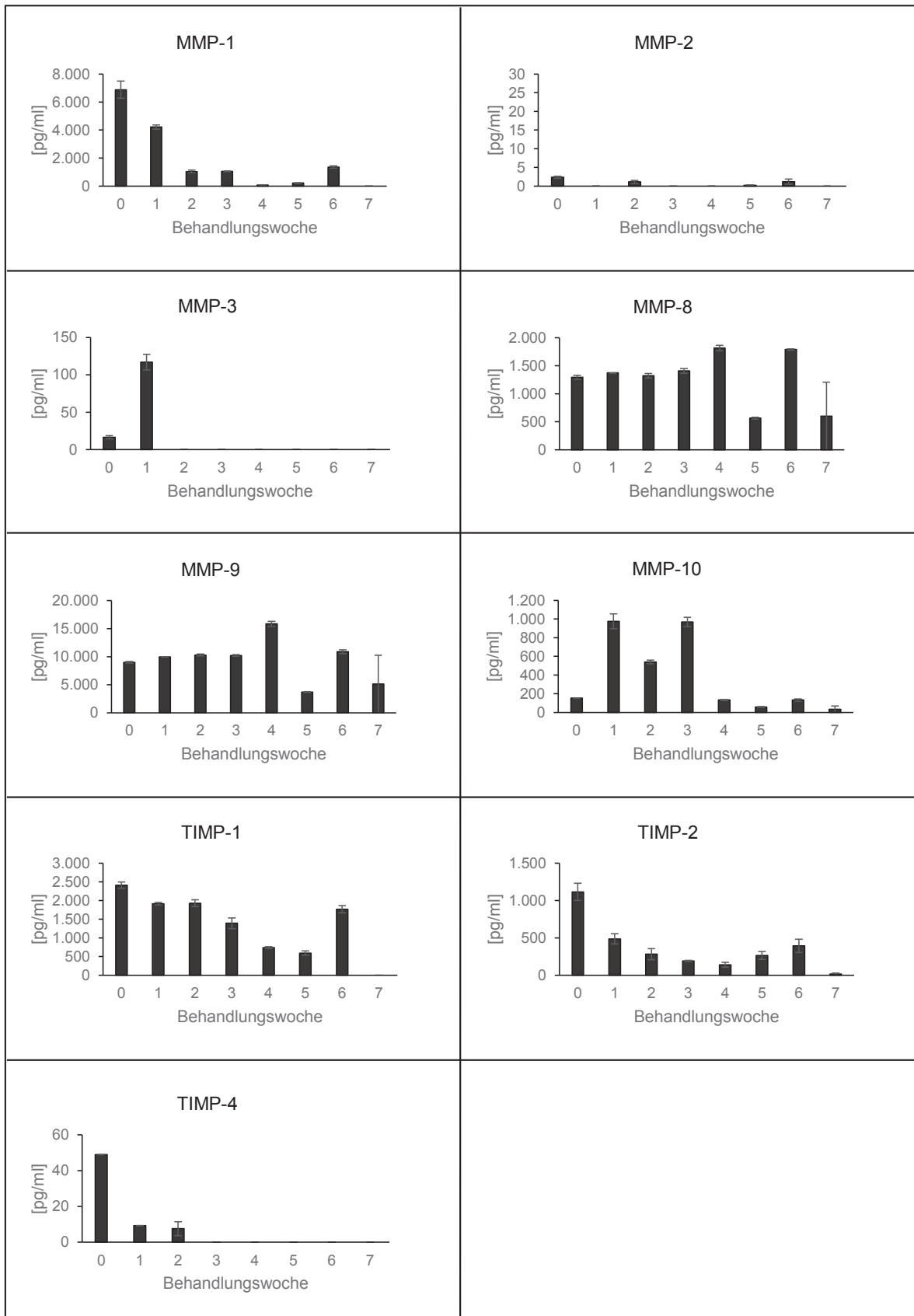


Abbildung 25: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 9 bezogen auf 100 µg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

5.7.10. Patient 10

Die auf die Gesamtproteinkonzentration bezogene Analyse der Wundexsudate (Abbildung 26; Tabelle 30, Anhang) des vierten Patienten zeigte im Wesentlichen das Auftreten aller untersuchten MMP und TIMP in den Proben. Hierbei konnten MMP-2 und MMP-13 nur in sehr geringen Mengen (MMP-2 maximal 17 pg/ml, MMP-13 maximal 13 pg/ml) nachgewiesen werden.

Für MMP-1, -3 und -10 konnte in der ersten Behandlungswoche ein Anstieg der Konzentrationen auf ca. das doppelte (MMP-3 von 130 pg/ml auf 240 pg/ml) bzw. das dreifache (MMP-1 von 6.520 pg/ml auf 19.470 pg/ml, MMP-10 von 250 pg/ml auf 760 pg/ml) Ausgangsniveau beobachtet werden. In der zweiten Woche der Behandlung konnte eine Verringerung dieser Konzentrationen auf Werte unterhalb des Ausgangsniveaus festgestellt werden (MMP-1 5.060 pg/ml, MMP-3 80 pg/ml, MMP-10 140 pg/ml). In den folgenden Behandlungswochen bis hin zum Ende der Behandlung schwankten die Konzentrationen für MMP-1 zwischen minimal 1.820 pg/ml und maximal 7.820 pg/ml, für MMP-3 zwischen minimal 12 pg/ml und maximal 170 pg/ml und für MMP-10 zwischen 150 pg/ml und 500 pg/ml.

Es zeigten für sich MMP-8 und MMP-9 parallel sinkende und steigende Konzentrationen über den ganzen Behandlungszeitraum hinweg. Hierbei konnten die höchsten Werte vor Behandlung sowie in den Wochen drei und sechs ermittelt werden. Für MMP-8 lagen die Konzentrationen zwischen 1.700 pg/ml und maximal 3.970 pg/ml, für MMP-9 konnten Werte zwischen 10.090 pg/ml und 26.070 pg/ml nachgewiesen werden.

Die Konzentration des Inhibitors TIMP-2 stieg in den ersten beiden Behandlungswochen von anfänglich 400 pg/ml auf etwa das Dreifache (1.270 pg/ml) an. In den vier folgenden Wochen konnten zwischen 470 pg/ml und 800 pg/ml schwankende Konzentrationen gemessen werden, bevor die Konzentration bei der letzten Probennahme in etwa das Ausgangsniveau erreichte (350 pg/ml). Die Konzentrationen des Inhibitors TIMP-1 sanken über den ganzen Behandlungszeitraum von anfänglich 3.180 pg/ml auf 1.860 pg/ml leicht ab.

Für TIMP-4 konnten Konzentrationen zwischen 8 pg/ml und 20 pg/ml ermittelt werden, die nahe am Detektionslimit lagen, aber in ihrem Verlauf dem An- und Abstiegen der Konzentration von MMP-8 und MMP-9 ähnelten.

Bei Außerachtlassung der Gesamtproteinkonzentrationen (Abbildung 38; Tabelle 30, Anhang) zeigten sich für MMP-1, -2, -3, -10, -13 sowie TIMP-2 keine erheblichen Unterschiede bezüglich der allgemeinen Tendenzen der Konzentrationsänderungen

gegenüber der Auftragung in Abhängigkeit von der Proteinkonzentration. Leidglich die absoluten Beträge variierten hier.

Die Konzentrationen von MMP-8 und -9 zeigten hingegen eine deutlich geringere Variabilität und reichten für MMP-8 von 9.800 pg/ml bis 12.460 pg/ml und für MMP-9 von 60.390 pg/ml bis 84.040 pg/ml.

Die Konzentrationen der beiden Inhibitoren TIMP-1 und -4 zeigten nach einer Zunahme in der ersten Behandlungswoche eine tendenzielle Abnahme gegenüber den Ausgangsniveaus.

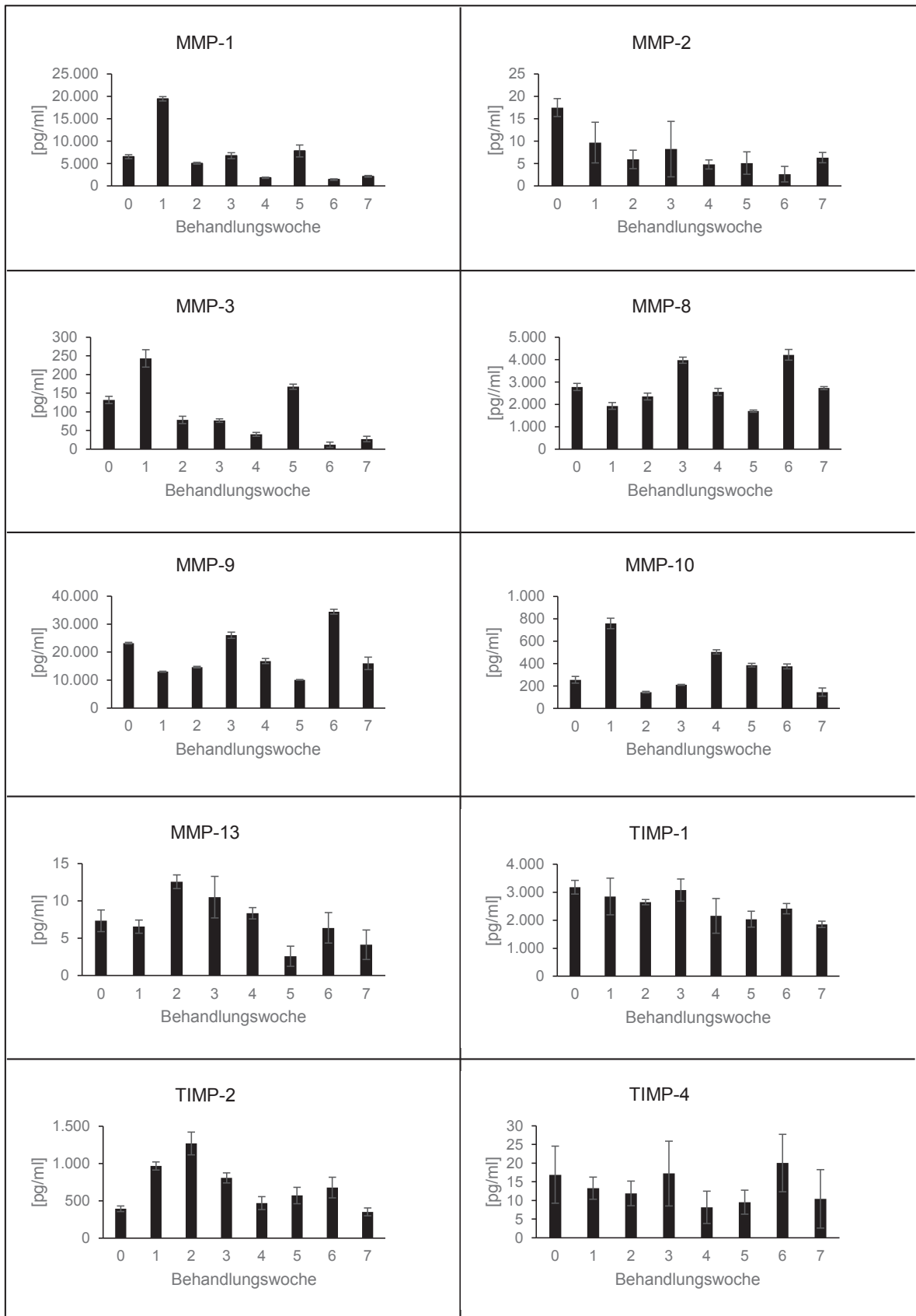


Abbildung 26: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 4 bezogen auf 100 μg Gesamtprotein. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je $n = 4$ Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

5.8. Klinischer Verlauf der Behandlung von Patientenwunden

Es wurden insgesamt zehn Patienten im Rahmen individueller Heilversuche mit Madenextrakt behandelt. In Tabelle 12 findet sich eine Übersicht über einige grundlegende Eigenschaften der Patienten. Es erfolgte die Behandlung von fünf weiblichen und fünf männlichen Patienten. Das durchschnittliche Alter der weiblichen Patienten lag bei 66 Jahren, das der männlichen Patienten bei 74 Jahren (Gesamtdurchschnitt 70 Jahre). Wie lang die verschiedenen Ulcera bestanden, konnte nicht in allen Fällen eindeutig geklärt werden, da die Angaben teilweise nur durch die Patienten selber gemacht wurden. Bei Angabe einer Dauer von „mehreren Jahren“ wurde ein Wert von über 24 Monaten angenommen. Alle behandelten Wunden bestanden seit mindestens drei Monaten und maximal seit über drei Jahren. Bei vorsichtiger Schätzung betrug die mittlere Dauer des Bestehens der Ulcera fünfzehn Monate. Die Hälfte der Patienten wurde dreimal wöchentlich im OP der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf behandelt. Vier der Patienten konnten ihre Wunden zweimal wöchentlich selbst (oder durch einen Angehörigen) behandeln und wurden dann einmal wöchentlich in der Hautklinik behandelt. Nur ein Patient übernahm die Behandlung seiner Wunden vollständig selbst. Bei zwei Patienten wurden die Heilversuche aufgrund schlechter „compliance“ oder schlechtem Ansprechen auf die Anwendung bereits nach zwei Wochen beendet. Bei einem Patienten wurde aufgrund einer kritischen Besiedlung mit *P. aeruginosa* der Heilversuch nach ca. sieben Wochen zugunsten einer anderen Therapie abgebrochen.

Tabelle 12: Übersicht über die behandelten Patienten. Die Tabelle zeigt eine Übersicht über das Alter, das Geschlecht, die Art der Wunden und deren Bestehensdauer, die Dauer der Behandlung mit Madenextrakt sowie durch wen die Anwendung erfolgte. Durchschnittsalter der Patienten: ♀ = 66 Jahre, ♂ = 74 Jahre, ♀+♂ = 70 Jahre.

Patient	Geschlecht	Alter [Jahren]	Art der Wunden	Ulcera bestanden seit:	Behandlungsdauer	Anwendung durch
					[Wochen]	
1	♀	46	Ulcerum crurum	ca. 12 Monaten	8	Hautklinik
2	♀	72	Ulcerum crurum	ca. 12 Monaten	7	Hautklinik
3	♀	74	Ulcerum crurum	> 6 Monaten	2	Hautklinik
4	♂	84	Ulcus cruris venosum	> 12 Monaten	2	Hautklinik
5	♂	78	Ulcus cruris mixtum	ca. 18 Monate	8	Patient/Hautklinik
6	♂	65	Ulcerum crurum	> 24 Monaten	8	Patient/Hautklinik
7	♀	61	Exzision	ca. 3 Monaten	8	Hautklinik
8	♀	79	Ulcerum crurum venosa	> 36 Monaten	8	Hautklinik
9	♂	73	Ulcerum crurum hypertonicus	3 Monaten	8	Patient/Hautklinik
10	♂	72	Ulcerum crurum varicosum	> 24 Monaten	8	Patient/Hautklinik

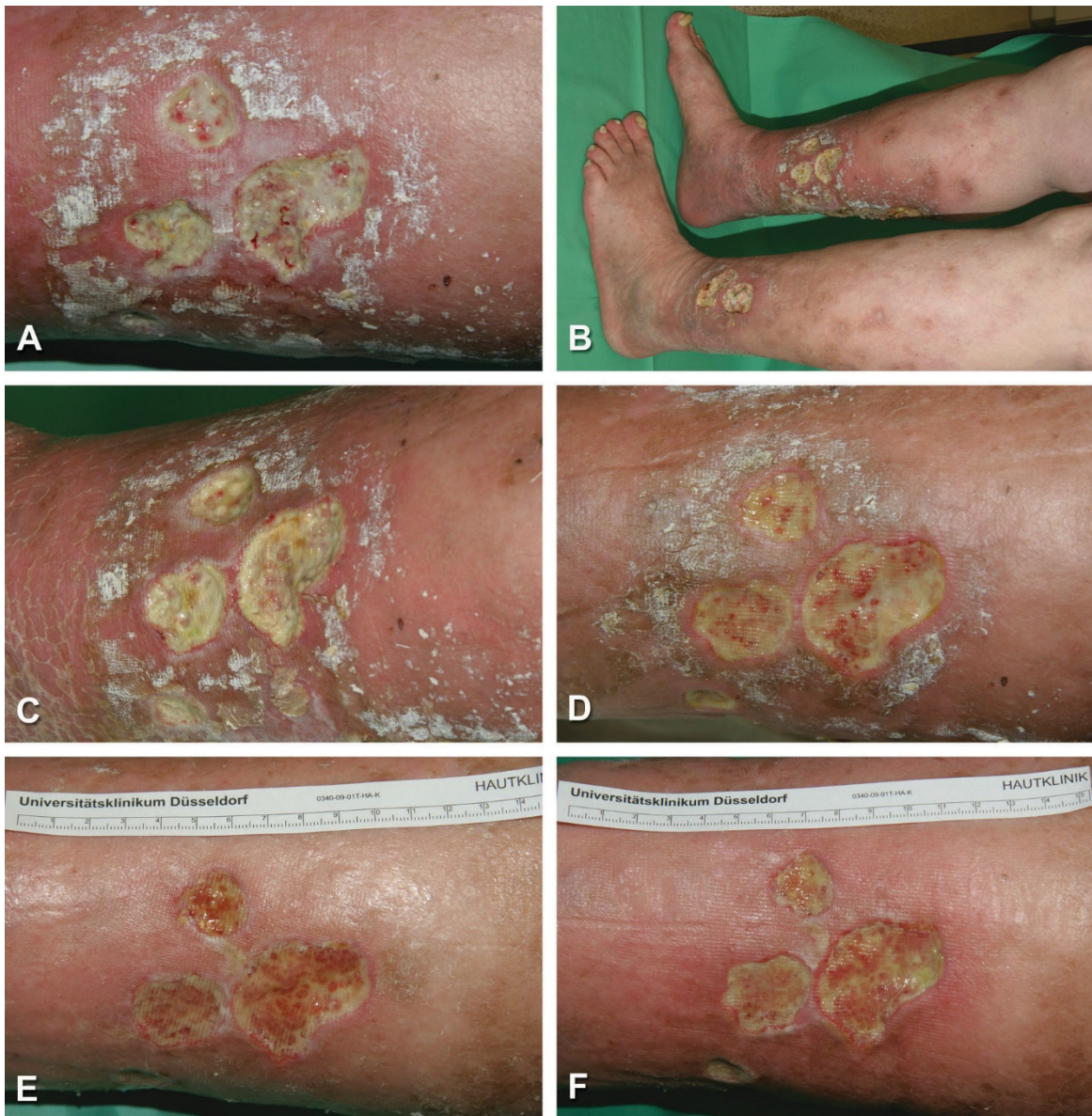
5.8.1. Patient 1

Die 46 Jahre alte Patientin litt seit etwa einem Jahr unter beidseitigen, fibrinös belegten Ulcera crurum der Unterschenkel bei bestehender Polyarteriitis nodosa (Kussmaul-Maier-Krankheit), einer Vaskulitis der mittelgroßen Arterien. Periphere arterielle Verschlusskrankheiten (pAVK) lagen nicht vor, und eine Diabeteserkrankung war nicht bekannt. Zudem klagte die Patientin über starke Schmerzen im Bereich der Ulcera.

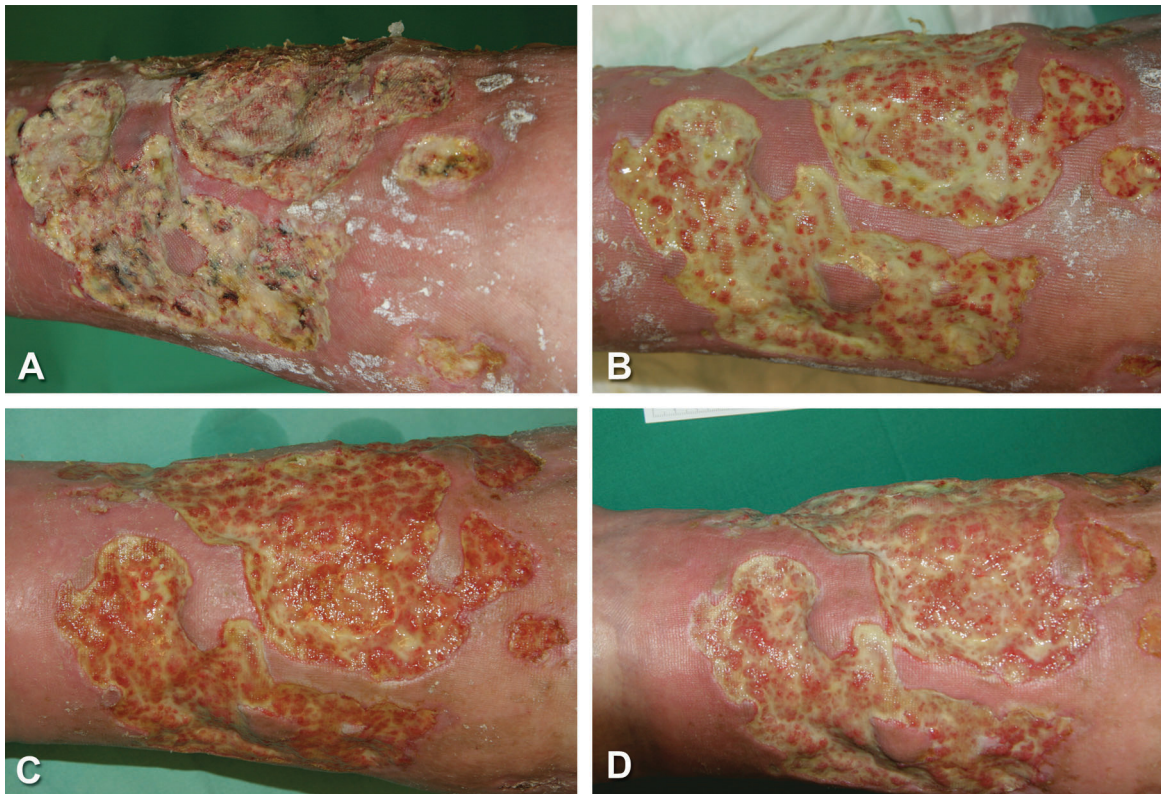
Ein großes Ulcus (Fototafel 5 A) sowie ein Bereich mit kleineren Ulcera (Fototafel 4 A und B) waren am rechten Unterschenkel deutlicher ausgeprägt. Diese zeigten zudem eine uneinheitliche Färbung der fibrinösen Belege, die punktuell nekrotische Tendenzen aufwiesen. In Hinblick auf das Patientenwohl wurde der Heilversuch zunächst im Bereich der kleineren Ulcera am rechten Unterschenkel begonnen.

Nach zwei Wochen Behandlung der kleineren Ulcera zeigten sich diese als weniger mit Fibrin belegt und auch weniger stark exsudierend (Fototafel 4 C). Der behandelte Wundbereich stellte sich als etwas sauberer dar, im Sinne einer Reduktion der Wundbeläge gegenüber dem in Größe und Form vergleichbaren Wundbereich im Bereich des linken Unterschenkels. Da die Patientin gut auf die Behandlung ansprach, wurde die Behandlung mit Madenextrakt auf das wesentlich größere Ulcus am rechten sowie die kleineren Ulcera am linken Unterschenkel ausgeweitet.

Nach weiteren zwei Wochen der Behandlung aller Ulcera-Bereiche zeigten sich die fibrinösen Beläge als deutlich reduziert und auch als wesentlich einheitlicher in der Färbung. Die punktuell auftretenden nekrotischen Tendenzen waren nicht mehr vorhanden. Durch den fibrinösen Belag hindurch zeigte sich Granulationsgewebe, und zwar sowohl im Bereich der kleineren Ulcera beider Unterschenkeln als auch des flächenmäßig größeren Ulcus am rechten Unterschenkel (Fototafel 4 D und Fototafel 5 B). Dieser Trend der Abnahme der fibrinösen Beläge und der Zunahme des durchscheinenden Granulationsgewebes setzte sich in den nächsten beiden Behandlungswochen fort (Fototafel 4 E, Fototafel 5 C). Zudem zeigten sich alle Ulcera in ihrer Tiefe verringert. Erst nach den letzten beiden Behandlungswochen des Heilversuchs zeigte sich eine leichte Zunahme der Fibrinbeläge (Fototafel 4 F und Fototafel 5 D). Für diesen Behandlungsabschnitt abschließend zeigten beide Wundbereiche eine massiv bessere Konditionierung des Wundgrunds, so dass die Wunden im weiteren Therapieverlauf mit einem abdeckenden Spalthauttransplantat zum Verschluss gebracht werden konnte.



Fototafel 4: Wunden von Patient 1 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die Innenseite des rechten Unterschenkels der Patientin. Die Behandlung der Wunden der Patientin erfolgte dreimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen vor Behandlung (A+B), nach zwei Wochen (C), nach vier Wochen (D), nach sechs Wochen (E) und nach acht Wochen (F) Behandlung.



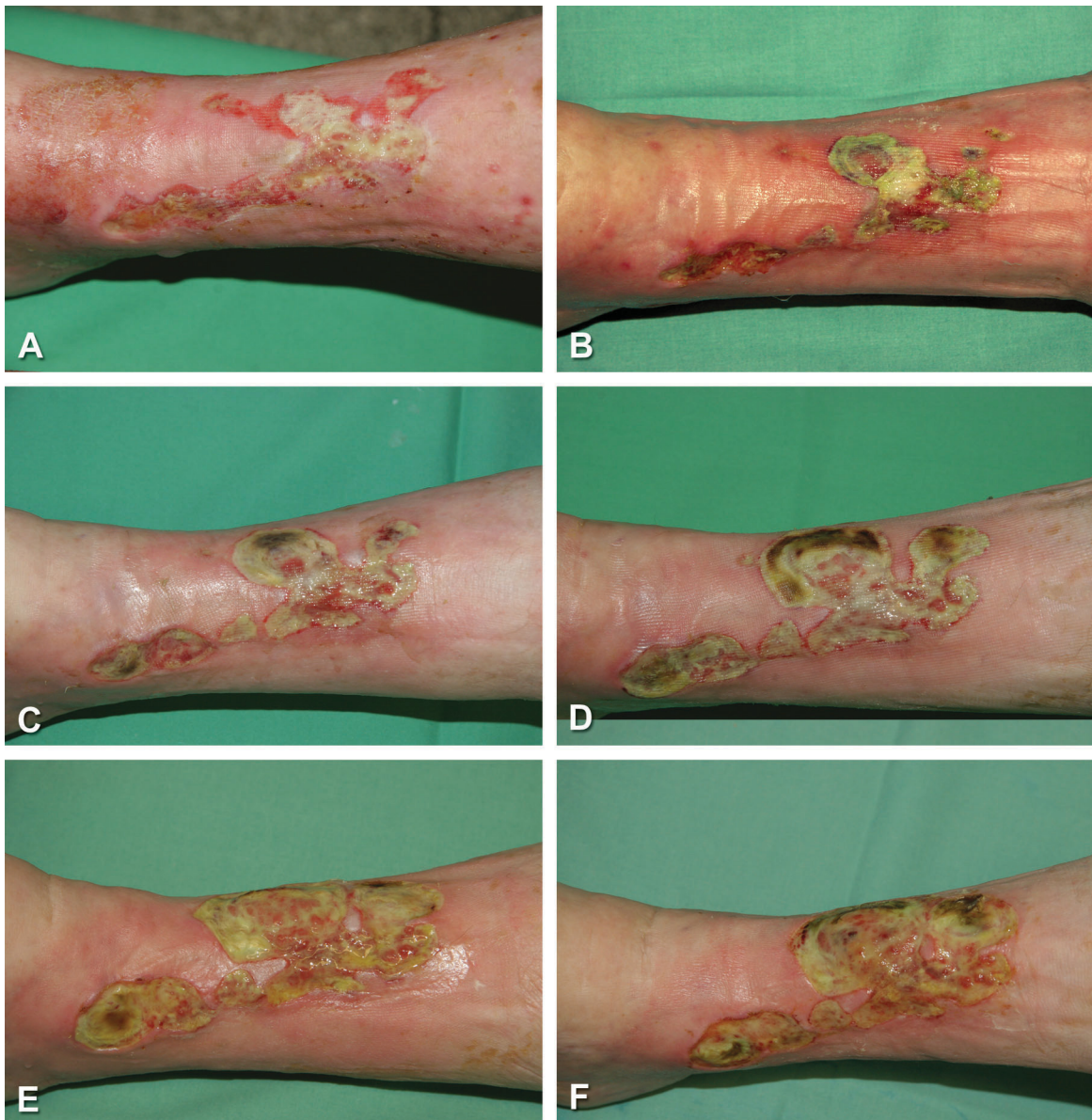
Fototafel 5: Weitere Wunden von Patient 1 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die Außenseite des rechten Unterschenkels der Patientin. Die Behandlung der Wunden der Patientin erfolgte dreimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen vor Behandlung (A), nach zwei Wochen (B), nach vier Wochen (C) und nach sechs Wochen (D) Behandlung.

5.8.2. Patient 2

Die 72 jährige Patientin litt zu Beginn des Heilversuchs unter Ulcera crurum unbekanntem Ursprungs an beiden Unterschenkeln. Die bis zu 10 cm im Durchmesser großen Ulcera zeigten sich seit über einem Jahr als therapierefraktär. Die Patientin litt zudem unter arterieller Hypertonie und chronischer Urtikaria. Das Vorliegen von pAVK war ausgeschlossen. Die Patientin hatte bereits drei Monate zuvor ein Spalthauttransplantat zur Wundabdeckung erhalten.

Das unscharf abgegrenzte Ulcus am rechten Unterschenkel zeigte sich vier Wochen vor Behandlungsbeginn als leicht gerötet und etwa zur Hälfte mit fibrinösen Belägen bedeckt. Zudem waren die Wundränder stellenweise mazeriert (Fototafel 6 A). Der Zustand der Wunden verschlechterte sich in den nächsten vier Wochen dahingehend, dass unmittelbar vor Behandlungsbeginn mit dem Madenextrakt die Wunde beinahe vollständig mit fibrinösen Belägen bedeckt war, die punktuelle Nekrosen aufwiesen, und sich zudem die Wundfläche vergrößerte (Fototafel 6 B). Im Weiteren zeigten die schmierigen Beläge eine eindeutige Grünfärbung. Die Fotos nach zwei, vier, sechs und acht Wochen Behandlung (Fototafel 6, C, D, E, F) zeigen eine weitere Vergrößerung des Wundareals.

Es zeigte sich ebenfalls eine Zunahme der nekrotischen Tendenzen. Die fibrinösen Beläge und deren auffällige Grünfärbung war in etwa während der gesamten Behandlung gleichbleibend. In der Wundmitte zeigten sich stellenweise hypergranulierende Bereiche. Aufgrund des Verdachts einer Infektion mit *P. aeruginosa* (siehe Abschnitt 5.3.2) erfolgte nach der Behandlung mit Madenextrakt eine Antibiotika-Therapie sowie eine intensive topische Therapie des Wundbereichs. Nach erfolgter Antibiose und konventioneller Therapie konnte der Wundbereich aber dennoch durch ein Spalthauttransplantat geschlossen werden.



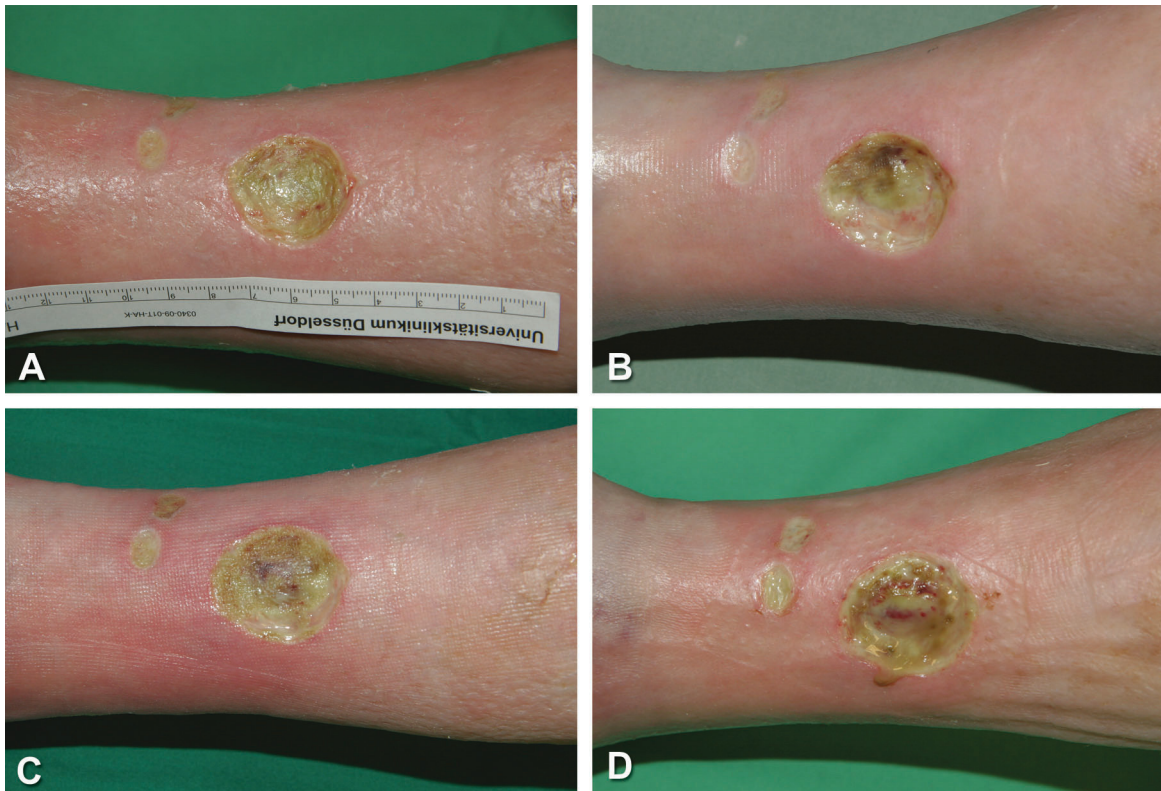
Fototafel 6: Wunden von Patient 2 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen das Schienbein bzw. Teile der Innenseite des rechten Unterschenkels der Patientin. Die Behandlung der Wunden der Patientin erfolgte dreimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen vier Wochen vor Behandlung (A), unmittelbar vor Behandlung (B), nach zwei Wochen (C), nach vier Wochen (D), nach sechs Wochen (E) und nach acht Wochen (F) Behandlung.

5.8.3. Patient 3

Zu Beginn des Heilversuchs hatte die 74 Jahre alte Patientin mehrere, in Größe variierende Ulcera crurum der Unterschenkel, die seit über sechs Monaten bestanden. Aufgrund einer Vielzahl an Begleiterkrankungen war der Ursprung der Ulcera nicht eindeutig bestimmbar. Am ehesten erschienen die Ulcera rheumatischen Ursprungs zu sein. Darüber hinaus litt die Patientin unter Stauungsdermatitis und Vaskulitis im Bereich der Ulcera der beiden Unterschenkel. Zudem waren Typ II Diabetes, eine refraktäre Anämie, Bluthochdruck und eine Herzinsuffizienz als weitere Begleiterkrankungen und eine Vielzahl an Medikamentenunverträglichkeiten (unter anderem Penicillin und Jod) bekannt.

Behandelt wurde das grünlich, stark fibrinös belegte und exsudierende Ulcus am rechten Unterschenkel (3,5 cm bis 4 cm Durchmesser), der nach Patientenaussage sehr schmerzhaft war (Fototafel 7 A). Unmittelbar vor Behandlungsbeginn zeigte sich bereits eine leichte Verschlechterung des Wundzustands unter konventioneller Therapie, was sich in einer verstärkten Belagbildung mit leichten nekrotischen Tendenzen und einer verstärkten Grünfärbung äußerte (Fototafel 7 B).

In dem nur etwa zwei Wochen andauernden Heilversuch konnte keine augenscheinliche Vergrößerung oder Verkleinerung der Ulcera festgestellt werden. Die bereits vor dem Therapieversuch mit Madenextrakt beobachtete Tendenz der Zunahme der Beläge setzte sich in dieser Zeit fort (Fototafel 7 C und D). Tendenziell ließ sich eine geringfügige Abflachung des Wundgrundes und unter dem Fibrinbelag liegendes Granulationsgewebe erkennen. Da die Patientin, wie schon vor Beginn des Heilversuchs, über starke Schmerzen klagte, konnte sie nicht davon überzeugt werden, den Wundverband nicht zu entfernen. Der Heilversuch wurde zugunsten anderer Therapieformen abgebrochen, da unter diesen Bedingungen der Madenextrakt keine Wirkung entfalten konnte.

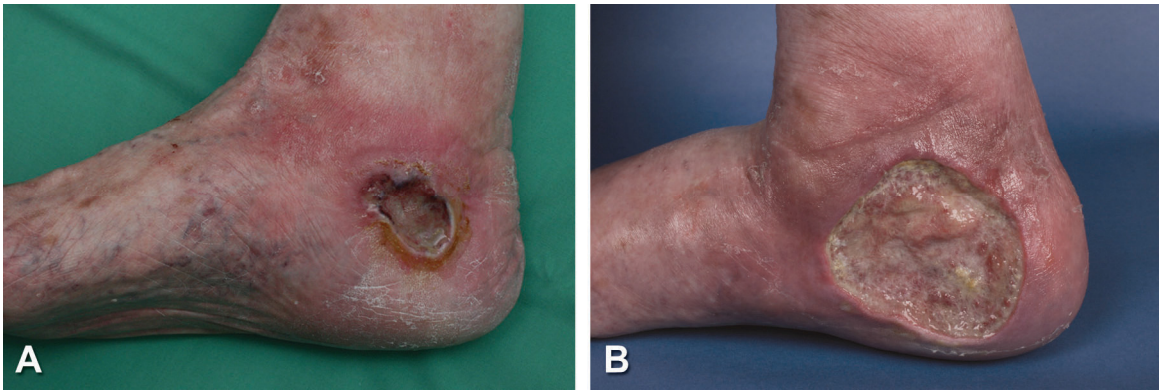


Fototafel 7: Wunde von Patient 3 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die Außenseite des linken Unterschenkels. Die Behandlung der Wunden der Patientin erfolgte dreimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen eine Woche vor Behandlung (A), unmittelbar vor Behandlung (B), nach einer Woche (C) und nach zwei Wochen (D) Behandlung.

5.8.4. Patient 4

Der 85 jährige Patient hatte zu Beginn der Behandlung ein Ulcus cruris venosum am rechten Innenknöchel. Der Patient wies zudem Bluthochdruck und multiple Typ IV Sensibilisierungen auf.

Die anfänglich fibrinös belegte Wunde am Innenknöchel mit kleineren nekrotischen Bereichen am oberen Wundrand (Fototafel 8 A) sprach nicht gut auf den Therapieversuch mit Madenextrakt an. Innerhalb der ersten beiden Behandlungswochen, kam es zu einer leichten Vergrößerung des Wundareals und einer Rötung des Wundrands, so dass die Therapie abgebrochen wurde. Hierauf folgte alternativ ein biochirurgisches Débridement mittels lebender Fliegenmaden (Fototafel 8 B)



Fototafel 8: Wunden von Patient 4 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die Außenseite des rechten Unterschenkels. Die Behandlung der Wunden des Patienten erfolgte dreimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen vor Behandlung (A) und nach einer Woche abgebrochener Behandlung mit Madenextrakt und anschließendem biochirurgischen Débridement mit lebenden Fliegenmaden (B).

5.8.5. Patient 5

Die allgemeine Anamnese des 78 Jahre alten Patienten zeigte ein seit etwa achtzehn Monaten persistierendes, flächenmäßig ausgeprägtes Ulcus cruris mixtum des linken medialen Unterschenkels. Der Patient litt unter pAVK Stufe IV und erlitt schon mehrere Thrombosen, unter anderem der Arteria dorsalis pedis.

Weitere relevante Begleiterkrankungen waren Bluthochdruck, Polycythaemia vera (Vaquez-Osler-Krankheit) sowie das postthrombotische Syndrom. Das Ulcus des Patienten umfasste vor Beginn der Behandlung beinahe den gesamten medialen, linken Unterschenkel, so dass nur ein schmaler Bereich intakter Haut die beiden flankierenden Bereiche trennte, der an der dünnsten Stelle nur etwa einen Zentimeter breit war und einen mazerierten Wundrand aufwies (Fototafel 9 A). Aufgrund der dreidimensionalen Ausbreitung des Ulcus sind die Fotos des Behandlungsverlaufes auf drei Fototafeln verteilt dargestellt. Fototafel 9 zeigt hierbei die frontale Aufsicht auf das linke Schienbein, Fototafel 10 die Innenseite des linken Unterschenkels und Fototafel 11 die Außenseite des linken Unterschenkels.

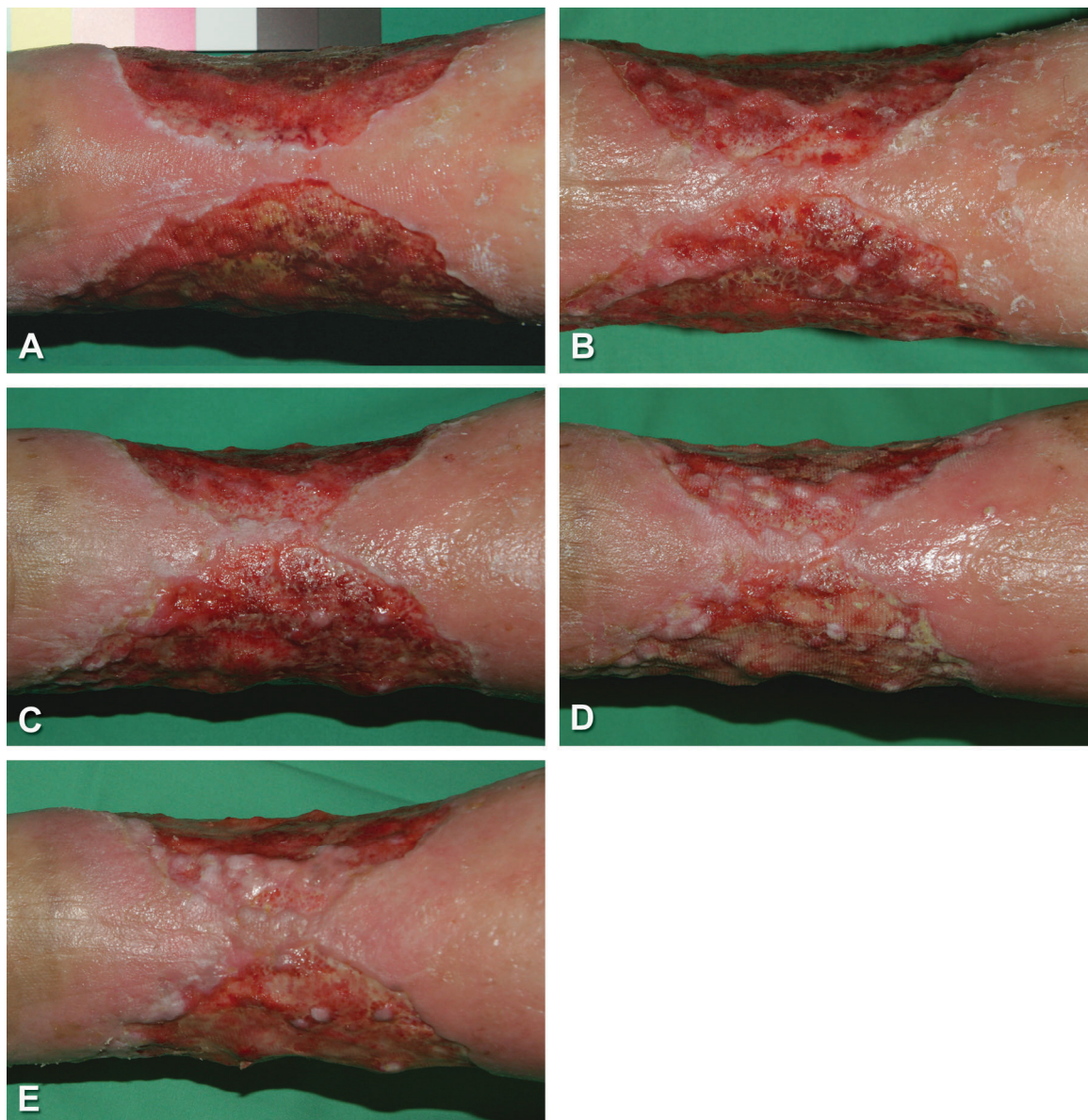
Das Ulcus war beinahe vollständig mit Fibrinbelag bedeckt, zeigte dabei aber an manchen Stellen einen besonders ausgeprägten Belag. Im zentralen Bereich der Außenseite fanden sich zudem stellenweise leicht nekrotische Abschnitte. Die Beläge wiesen außerdem, außen stärker als innen, eine leichte bis mittelstarke Grünfärbung auf. Die Anwendung des Madenextrakts erfolgte nach Anleitung zweimal wöchentlich durch den Patienten selber, sowie einmal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Nach zwei Wochen des Heilversuchs zeigte sich der gesamte Wundbereich als weniger stark mit Fibrin belegt, so dass dieser Belag vor allem im Bereich des Innenschenkels

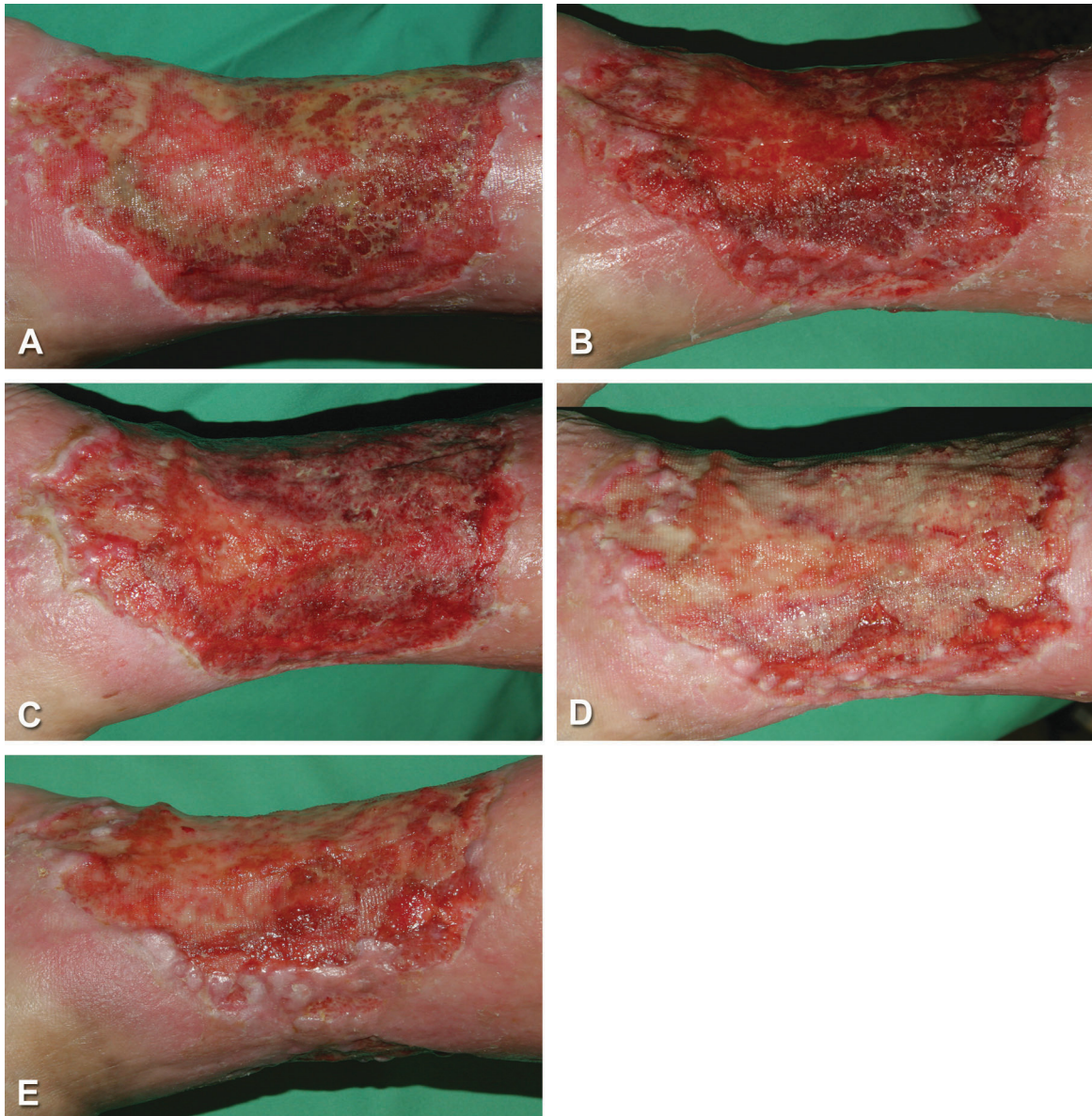
nahezu vollständig abwesend war (Fototafel 10 B). Die nekrotischen Tendenzen am äußeren Unterschenkel waren ebenfalls wie die Grünfärbung in allen Wundbereichen abnehmend. Die Mazerationen im Bereich des Schienbeins waren nicht mehr vorhanden, und der schmale Bereich intakter Haut erschien etwas schmaler als zu Beginn der Behandlung, wobei von diesem Bereich ausgehend neue, weniger rot gefärbte punktuelle Bereiche neuen Gewebes vom Wundgrund aufzusteigen schienen (Fototafel 9 B).

Nach fünf Wochen Behandlung (Fototafel 9 C, Fototafel 10 C, Fototafel 11 C) schien der Fibrinbelag zuzunehmen, wobei die Abdeckung von der Wundmitte her gleichmäßiger erschien und die anfängliche Grünfärbung nicht mehr vorhanden war. Die Ausbildung von, dem Eindruck nach, aufsteigenden Gewebsinseln war nicht mehr auf den schmalen frontalen Teil des Schienbeins beschränkt sondern schien sich vielmehr auf den gesamten Wundrand auszuweiten.

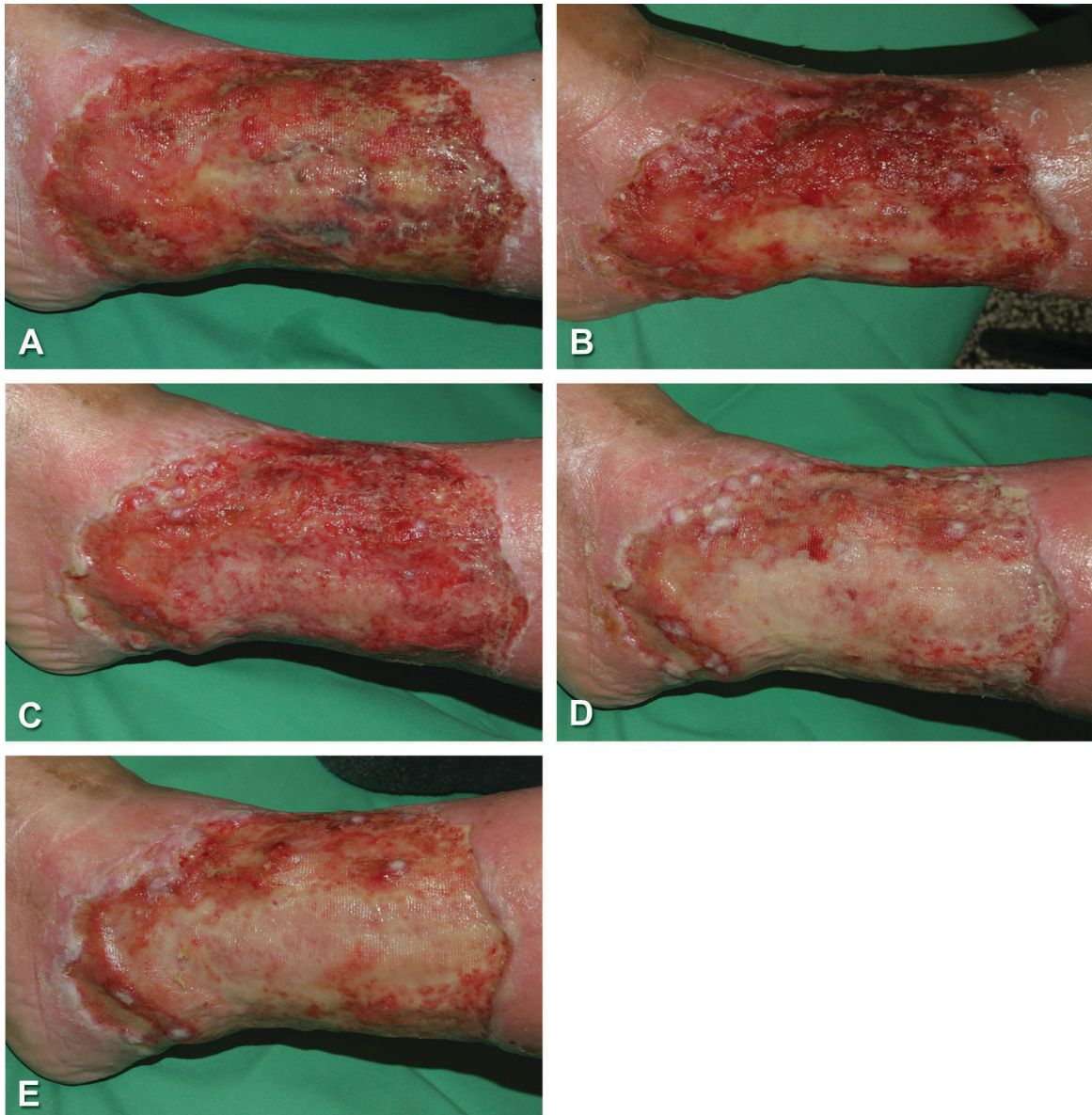
In der siebten Behandlungswoche war die Wunde von der Mitte ausgehend stark und relativ gleichmäßig fibrinös belegt (Fototafel 9 D, Fototafel 10 D, Fototafel 11 D). Es zeigten sich im gesamten Randbereich der Wunde zunehmend kleinere Gewebsinseln, deren Zwischenräume sich auch langsam mit Gewebe zu füllen begannen. Die vom Wundrand ausgehende Bildung neuer Gewebsinseln setzte sich auch in der achten Behandlungswoche fort (Fototafel 9 E, Fototafel 10 E, Fototafel 11 E). Die Fibrinbeläge zeigten sich hier schwächer ausgeprägt.



Fototafel 9: Wunden von Patient 5 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die frontale Aufsicht auf das linke Schienbein des Patienten. Die Behandlung der Wunden des Patienten erfolgte zweimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts durch den Patienten selbst und einmal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen vor Behandlung (A), nach zwei Wochen (B), nach fünf Wochen (C), nach sieben Wochen (D) und nach acht Wochen (E) Behandlung.



Fototafel 10: Wunden von Patient 5 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die Innenseite des linken Unterschenkels des Patienten. Die Behandlung der Wunden des Patienten erfolgte zweimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts durch den Patienten selbst und einmal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen vor Behandlung (A), nach zwei Wochen (B), nach fünf Wochen (C), nach sieben Wochen (D) und nach acht Wochen (E) Behandlung.



Fototafel 11: Wunden von Patient 5 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die Außenseite des linken Unterschenkels des Patienten. Die Behandlung der Wunden des Patienten erfolgte zweimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts durch den Patienten selbst und einmal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen vor Behandlung (A), nach zwei Wochen (B), nach fünf Wochen (C), nach sieben Wochen (D) und nach acht Wochen (E) Behandlung.

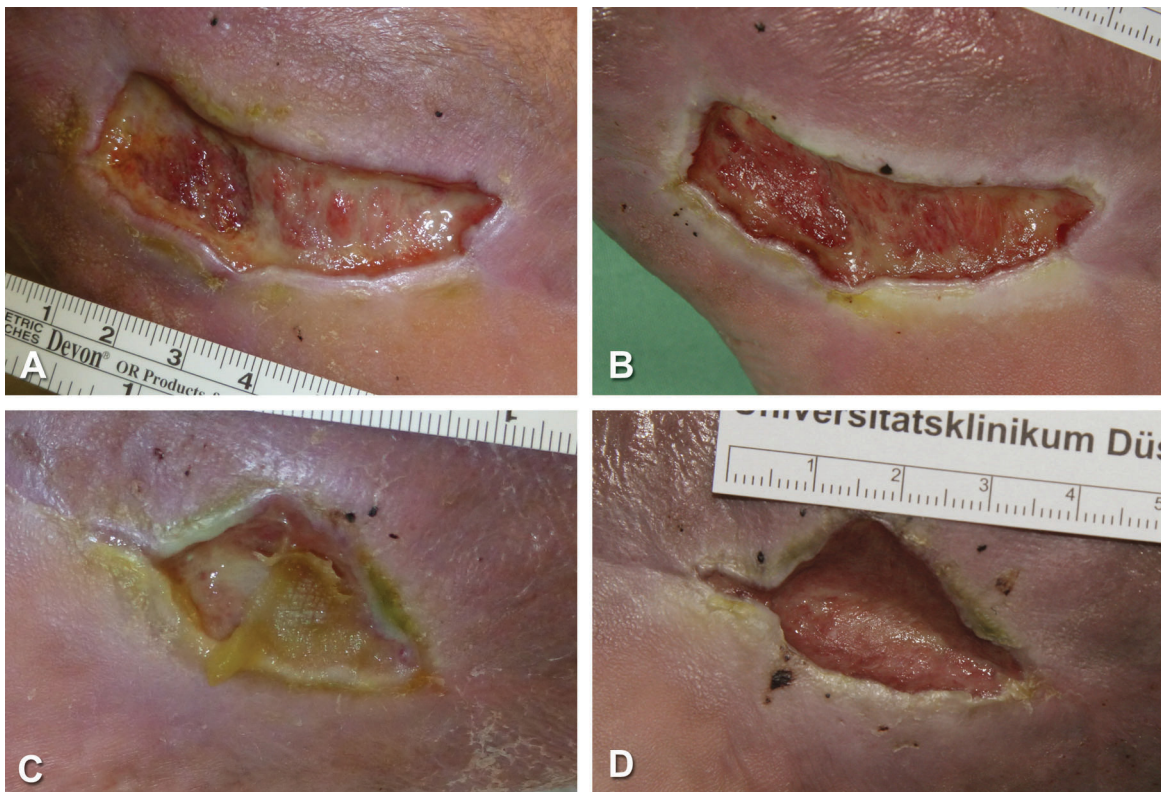
5.8.6. Patient 6

Der bei der Vorstellung 65 Jahre alte Patient zeigte Ulcera crurum, beidseitig an den Innenseiten der Unterschenkel, etwa auf Höhe der Fußknöchel. Nach Angabe des Patienten bestanden die Wunden bereits seit mehreren Jahren. Die Anwendung des Madenextrakts erfolgte dreimal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Beide Ulcera zeigten sich als stark exsudierend und, rechts mit starken und verkrusteten (Fototafel 12 C), links mit schmierigen (Fototafel 12 A), fibrinösen Belägen besetzt. Aufgrund bereits im Vorfeld bekannter starker Schmerzen beim Verbandswechsel und auf Wunsch des Patienten wurden die jeweiligen Behandlungen so kurz wie möglich gehalten, so dass Fotos nur vor und nach vier Wochen Behandlung gemacht werden konnten.

Es zeigte sich nach vier Wochen Behandlung die vollständige Entfernung der starken und verkrusteten Fibrinbeläge rechtsseitig (Fototafel 12 D) und die nahezu vollständige Entfernung dieser Beläge linksseitig (Fototafel 12 B).

Die Behandlung wurde bis zum Ende des vorgegeben Behandlungszeitraums (acht Wochen) fortgesetzt, jedoch konnten aus oben genannten Gründen keine weiteren Fotos der Wunden angefertigt werden.



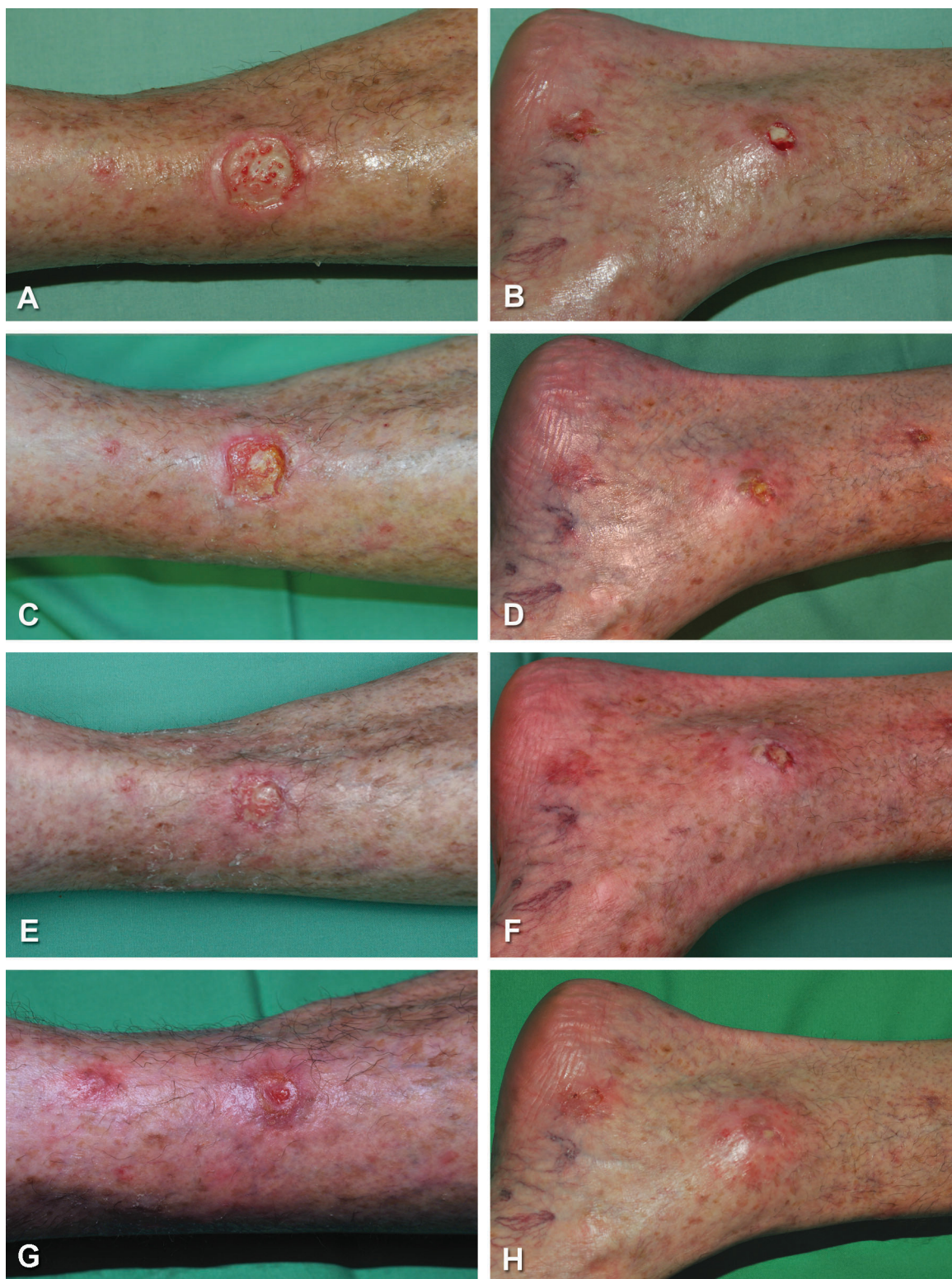
Fototafel 12: Wunden von Patient 6 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die Innenseiten beider Unterschenkel auf Höhe der Fußknöchel des Patienten. Die Behandlung der Wunden des Patienten erfolgte dreimal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen vor Behandlung des linken Knöchels (A) bzw. nach vier Wochen (B). Aufnahmen vor Behandlung des rechten Knöchels (C) bzw. nach vier Wochen (D).

5.8.7. Patient 7

Vor Beginn des Heilversuchs litt die 61 jährige Patientin unter lokal begrenzten Plattenepithelkarzinomen (aktinische Keratose) am linken Unterschenkel, für die keine Ausbreitung auf die Lymphknoten nachzuweisen war, so dass eine konsumierende Grunderkrankung ausgeschlossen wurde. Nach Exzision für weitere histologische Befunde, zeigten die Exzisionsstellen eine verstärkte Bildung von Fibrinbelag mit geringer Tendenz zur Bildung von Granulationsgewebe im Sinne einer primären Wundheilung. Da die Patientin eine Abdeckung des Wundbereichs mittels Spalthauttransplantation ablehnte, wurde nach etwa drei Monaten Persistenz die Anwendung von Madenextrakt als Therapieversuch vorgeschlagen und durchgeführt. Als mögliche relevante Begleiterkrankungen wurden Typ II Diabetes und Bluthochdruck angegeben.

Die Ulcera waren im Bereich des linken Schienbeins (Fototafel 13 A) und der Innenseite des linken Fußknöchels lokalisiert (Fototafel 13 B). Bei der Patientin wurden direkt zu Beginn des Therapieversuchs beide Wundbereiche behandelt. Es zeigte sich nach zwei Wochen der Behandlung mit Madenextrakt eine weniger stark ausgeprägte Abdeckung mit fibrinösen Belägen sowohl für den Wundbereich am Schienbein (Fototafel 13 C) als auch den kleineren Wundbereich an der Innenseite des Knöchels (Fototafel 13 D).

Nach etwa vier Wochen zeigte sich eine fast vollständige Abwesenheit der fibrinösen Beläge unter Bildung von Granulationsgewebe für die größere Wunde am Schienbein (Fototafel 13 E). Der kleinere Wundbereich zeigte hierbei immer noch fibrinösen Belag sowie einer Mazeration des Wundrands (Fototafel 13 F). Nach etwa sieben Wochen zeigten sich beide Wundbereiche als bereits mit einem dünnen Hautfilm verschlossen (Fototafel 13 G und H). Eine Mazeration des Wundrands der kleineren Wunde war nicht mehr zu beobachten. Die Behandlung wurde noch bis zum Ende des Behandlungszeitraums (acht Wochen) fortgeführt.



Fototafel 13: Wunden von Patient 7 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die frontale Aufsicht auf das Schienbein und die Innenseite des linken Fußknöchels der Patientin. Die Behandlung der Wunden der Patientin erfolgte dreimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen des linken Schienbeins vor Behandlung (A), nach zwei Wochen (C), nach vier Wochen (E) und nach sieben Wochen (G) Behandlung. Aufnahmen der Innenseite des linken Fußknöchels vor Behandlung (B), nach zwei Wochen (D), nach vier Wochen (F) und nach sieben Wochen (H) Behandlung.

5.8.8. Patient 8

Die zu Beginn des Heilversuchs 79 Jahre alte Patientin zeigte Ulcera crurum venosa an beiden Knöcheln (Malleolus medialis und Malleolus lateralis) seit mehr als drei Jahren. Die Ulcera waren zahlreich und variierten zwischen Größen von nur 0,7 cm x 0,5 cm bis ca. 14,5 cm x 5 cm. Etwa drei Monate zuvor mussten Crossektomien und Strippings der Venae saphena magna durchgeführt werden, und es erfolgte ein chirurgisches Débridement der Ulcera beider Beine. Mögliche relevante Begleiterkrankungen waren mit Bluthochdruck, Hyperproteinämie sowie einer Autoimmunthyreoiditis Hashimoto angegeben. Zudem wurde bei der Patientin eine chronische MRSA Kolonisation festgestellt.

Die Anwendung des Madenextrakts erfolgte nach Anleitung zweimal wöchentlich durch den Patienten selbst sowie einmal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Auf Patientenwunsch hin, wegen starker Schmerzen beim Verbandswechsel, wurden die wöchentlichen Behandlungen und Probennahmen in der Hautklinik so kurz wie möglich gehalten. Daher wurden Fotos der Wunden nur vor der Behandlung und nach sieben Wochen Behandlungszeit aufgenommen.

Vor Beginn der Behandlung zeigten sich die behandelten, etwa auf Höhe des Sprunggelenks gelegenen, stark exsudierenden Wundflächen rechtsseitig (ca. 4,5 cm x 2,5 cm; 5,5 cm x 2,5 cm, 3 cm x 5,5 cm; Fototafel 14 A) sowie linksseitig (ca. 14,5 cm x 5 cm; Fototafel 14 C) als deutlich mit schmierigen Fibrinbelägen besetzt. Der Wundrand zeigte sich zudem ödematös und gerötet.

Im Verlauf der Behandlung zeigten sich die fibrinösen Beläge als abnehmend, so dass sich nach sieben Wochen der Behandlung (Fototafel 14 B und D) die Beläge sichtbar zurückgebildet hatten. Die lateral an beiden Beinen gelegenen Wunden stellten sich zudem als sauberer bezüglich des Gesamt-Wundbilds und der Verschorfungen im proximalen Wundbereich dar. Darüber hinaus zeigten sich Anzeichen der Bildung von Granulationsgewebe sowie einer beginnenden Verkleinerung der Ulcera des rechten äußeren Unterschenkels vom Wundrand her.



Fototafel 14: Wunden von Patient 8 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die laterale Ansicht beider Fußknöchel der Patientin. Die Behandlung der Wunden der Patientin erfolgte dreimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen der Außenseite des rechten Fußknöchels vor Behandlung (A) und nach sieben Wochen (B) Behandlung. Aufnahmen der Außenseite des linken Fußknöchels vor Behandlung (C) und nach sieben Wochen (D) Behandlung.

5.8.9. Patient 9

Der vor Beginn des Heilversuchs 73 Jahre alte Patient litt unter Bluthochdruck und daraus resultierenden Ulcera crurum hypertonicus (Martorell Syndrom) am linken Unterschenkel, die bereits mit Hydrogelen und absorbierenden Wundauflagen zum Teil erfolgreich behandelt wurden, so dass eine Epithelisierung vom Rand her zu sehen war.

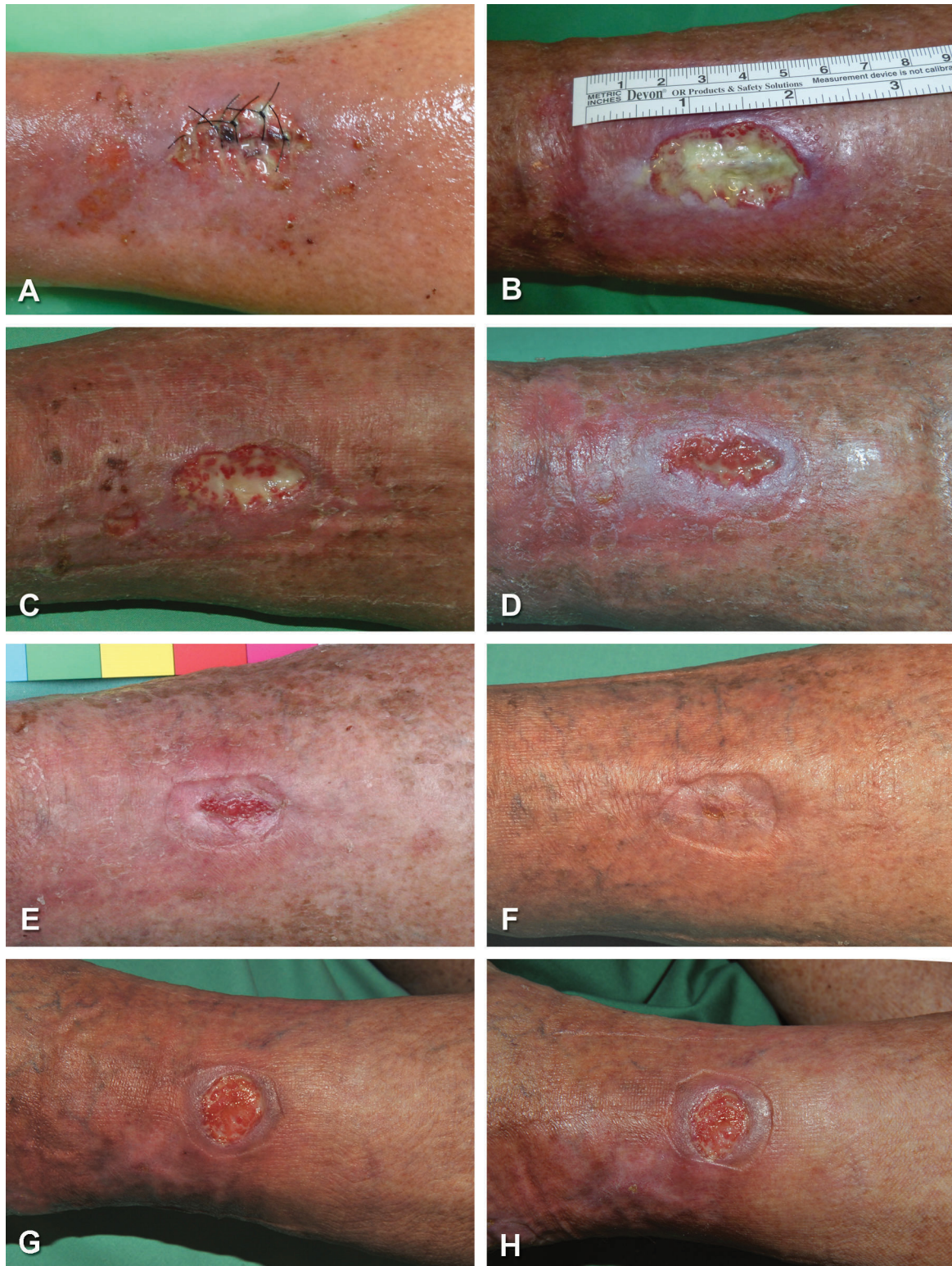
Bei einem neu aufgetretenen Ulcus (wenige Monate vor Behandlungsbeginn) am rechten Unterschenkel (Schienbein) erfolgte eine Spindelbiopsie. Sichtbar waren hier auch Erosionen der proximalen Wundbereiche (Fototafel 15 A, zwei Wochen vor Behandlung mit Madenextrakt). An dieser Stelle entwickelte sich innerhalb von zwei Wochen ein starker Fibrinbelag (Fototafel 15 B, unmittelbar vor Behandlung mit Madenextrakt), bei Vergrößerung der Wundfläche. Zu diesem Zeitpunkt zeigte sich die Wunde als mäßig exsudierend.

Die Anwendung des Madenextrakts erfolgte nach Anleitung zweimal wöchentlich durch den Patienten selbst sowie einmal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Bereits nach zwei Wochen der Behandlung mit Madenextrakt konnte eine Abnahme der Fibrinbeläge beobachtet werden. Gleichzeitig verkleinerte sich das Wundareal, und es zeigte sich vom Wundgrund aufsteigendes Granulationsgewebe (Fototafel 15 C). Die Erosionen der Haut im Wundbereich verkleinerten sich ebenfalls.

Dieser Trend setzte sich in den beiden folgenden Wochen fort, so dass nach vier Wochen Behandlung der Fibrinbelag nahezu vollständig abwesend war (Fototafel 15 D). Nach weiteren zwei Wochen Behandlung fehlte dieser dann vollständig, und es konnte eine zunehmende Reepithelisierung (vom Wundrand ausgehend) beobachtet werden (Fototafel 15 E). Am Ende des Behandlungszeitraums (acht Wochen) konnte ein nahezu vollständiger Verschluss des Wundareals gesehen werden, bei dem lediglich ein sehr kleiner Bereich in der Wundmitte noch geöffnet war (Fototafel 15 F).

Das bereits bestehende, linksseitige und teilweise erfolgreich behandelte Ulcus zeigte bei paralleler, konventioneller Behandlung ebenfalls nur eine geringe Abdeckung mit Fibrinbelag. Dieser zeigte jedoch im Vergleich nach sechs (Fototafel 15 G) und acht Wochen (Fototafel 15 H) zwar eine Tendenz zur Reepithelisierung, die aber deutlich geringer zu sein schien, als bei dem mit Madenextrakt behandelten, rechtsseitigen Ulcus.



Fototafel 15: Wunden von Patient 9 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die frontale Aufsicht auf das rechte Schienbein und die laterale Ansicht des rechten Unterschenkels des Patienten. Die Behandlung der Wunden des Patienten erfolgte zweimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts durch den Patienten selbst und einmal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen des rechten Schienbeins zwei Wochen vor Behandlung (A), unmittelbar vor der Behandlung (B), nach zwei Wochen (C), nach vier Wochen (D), nach sechs Wochen (E) und nach acht Wochen Behandlung (F). Die Bilder G und H zeigen den konventionell behandelten rechten Unterschenkel in lateraler Ansicht nach sechs bzw. acht Wochen paralleler Behandlung.

5.8.10. Patient 10

Der 72 Jahre alte Patient zeigte Ulcera crurum varicosum auf Höhe beider Knöchel (Malleolus medialis und lateralis), die mit schmierigen Fibrinbelägen besetzt waren und stark exsudierten sowie ödematösen Schwellungen der Unterschenkel. Nach Patientenangaben bestanden diese Wunden seit mehreren Jahren. In vorhergegangenen Therapien erfolgte eine Venenklappentransplantation im linken Unterschenkel sowie Crossektomien und Venenstrippings an Venen beider Unterschenkel. Eine Sklerotisierungstherapie zeigte nur mäßigen Erfolg. Thrombosen und eine relevante pAVK waren ausgeschlossen.

Die Anwendung des Madenextrakts erfolgte nach Anleitung zweimal wöchentlich durch den Patienten selbst, sowie einmal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf.

Die beiden behandelten Ulcera lagen zum einen linksseitig flankierend etwa auf Höhe des Sprunggelenks (Fototafel 16 A bis D) und zum anderen rechtsseitig an der Ferse (Fototafel 16 E bis H). Vor Beginn der Behandlung stellten sich beide Ulcera als stark exsudierend und mit mazerierten Wundrändern dar (Fototafel 16 A und E). Der proximale Wundbereich war zudem überlagert mit Verkrustungen, vermutlich älterer Reste der Fibrinbeläge. Nach vier Wochen der Behandlung mit Madenextrakt zeigten sich beide Ulcera nahezu frei von fibrinösen Belägen und deutlich geringerer Mazeration der Wundränder (Fototafel 16 B und F). Deutlich zu sehen war auch der granulierende Wundgrund. Eine flächenmäßige Abnahme der Wundfläche war nicht zu erkennen.

In der folgenden Behandlungswoche war eine Zunahme der Fibrinbeläge zu erkennen (Fototafel 16 C und G). Gleichzeitig nahmen die Ulcera in ihrer Tiefe ab und die Verkrustungen umgebener Hautbereiche schienen abzunehmen.

Nach Ende der achten Behandlungswoche (Fototafel 16 D und H) zeigten sich die Ulcera in etwa in derselben Art mit Fibrin belegt, wie in der fünften Behandlungswoche. Zudem zeigte sich in beiden Wundbereichen Granulationsgewebe und hatten deutlich an Tiefe verloren. Die wundumgebenden Bereiche zeigten sich als von älteren fibrinösen Verkrustungen befreit.



Fototafel 16: Wunden von Patient 10 im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt. Die Fotos zeigen die flankierte und mediale Ansicht beider Fußknöchel des Patienten. Die Behandlung der Wunden des Patienten erfolgte zweimal wöchentlich durch Aufträufeln des Madenextrakts durch den Patienten selbst und einmal wöchentlich in der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf. Aufnahmen des linken, lateralen Knöchels vor Behandlung (A), nach vier Wochen (B), nach fünf Wochen (C) und nach acht Wochen (D) Behandlung. Aufnahmen des medialen Fußknöchels vor Behandlung (E), nach vier Wochen (F), nach fünf Wochen (G) und nach acht Wochen (H) Behandlung.

6. Diskussion

6.1. Extraktherstellung

Ein Teil der Zielsetzung dieser Arbeit war es, einen Extrakt aus Larven der Goldfliege *Lucilia sericata* zu erzeugen, der die Eigenschaft besitzt, sterilfiltrierbar zu sein und der nach Möglichkeit lagerfähig ist. Hierdurch sollte es möglich gemacht werden, die positiven Effekte des etablierten Prinzips des biochirurgischen Débridement einer größeren Patientenpopulation durch Umgehen der nachteiligen Effekte zugänglich zu machen.

Um dies zu erreichen, war es zunächst notwendig sicherzustellen, dass die dazu benötigten Larven in kontrollierter Herstellung von einem dazu fähigen Produzenten nach „*Good Manufacturing Practice*“ (GMP) bezogen werden können. Auf Grundlage dieses Rohstoffes war es möglich, verschiedene Verfahrensschritte zur Herstellung eines solchen Extraktes zu erproben. Durch das empirische Erproben verschiedener Kombinationen der Arbeitsschritte zum Gewebsaufschluss, Erhitzen, Sedimentieren und Filtrieren war es möglich, einen flüssigen und sterilfiltrierbaren Extrakt zu erzeugen. Dies gelang unter anderem durch die Erprobung und Verwendung verschiedener kommerzieller Filterelemente, die hauptsächlich in der Herstellung pharmazeutischer Produkte Anwendung finden. In frühen, experimentellen Versuchsphasen wurden hierzu manuelle Arbeitsschritte nach und nach durch zeitlich gesteuerte und maschinell automatisierte Arbeitsschritte ersetzt. Durch die erarbeiteten Protokolle wurden manuelle, menschliche Fehler auf ein Minimum reduziert.

Um die Anwendung bei mehreren Patienten und weiteren Laborversuchen zu ermöglichen, musste der Extrakt lagerfähig gemacht werden. Hierzu wurde die Methode der Gefriertrocknung angewendet. Bei Materialien, die Proteine beinhalten, hat sich die Gefriertrocknung als schonende Methode seit Jahrzehnten etabliert (May und Leone 1963). Häufig werden hierzu Hilfsmittel zur Stabilisierung eingesetzt. So können zur Stabilisierung von Sekundärstrukturen und zur Aufrechterhaltung der biologischen Aktivität Zucker, wie z.B. Trehalose (Draber et al. 2014) und Maltose (Izutsu et al. 2004), den Proteinlösungen vor der Gefriertrocknung hinzugefügt werden. Zur Untersuchung intrinsischer Effekte durch Madenextrakte wurde auf die Beimengung von Zusatzstoffen verzichtet. Eine Studie von Jiang und Nail (1998) konnte zeigen, dass die biologische Aktivität von Proteinen nach der Gefriertrocknung aufrechterhalten werden kann, auch ohne derartige Zusätze zu verwenden. Obwohl die Extrakte sterilfiltriert, unter Reinraumbedingungen aliquotiert und gefriergetrocknet wurden, wäre es prinzipiell immer noch möglich, dass das Lyophilisat teilungsfähige Bakterien enthält. In Hinblick auf die Patientensicherheit und einer weiteren

Reduktion der sog. „*bioburden*“ erfolgte eine zusätzliche γ -Strahlen-Behandlung mit bis zu 10 kGy (Kilogray). Im Vergleich hierzu werden für Shiga-Toxin produzierende *Escherichia coli* Dezimalreduktionswerte von nur 0,31 kGy (Clavero et al. 1994) und beispielsweise für Viren als Erreger einer Form der Vogelgrippe nur bis zu 2,6 kGy benötigt (Brahmakshatriya et al. 2009).

Ein zusätzlicher Effekt der Behandlung mit γ -Strahlung kann hierbei eine mögliche Detoxifizierung sein. Es konnte bereits gezeigt werden, dass das Mycotoxin Ochratoxin A schon durch Dosen unter 10 kGy zerstört werden kann (Deberghes et al. 1995; Kumar et al. 2012). Bei der Resuspendierung in Flüssigkultur Anreicherungs-Medien (tryptische Soja Bouillon) sowie bei der Resuspendierung in sterilem Wasser und steriler physiologischer Kochsalzlösung und anschließender Inkubation auf Agar (Columbia Blutagar, MacConkey Agar) konnten keine Kulturen nachgewiesen werden. Zudem zeigten die Versuche mit den bakteriellen Isolaten aus Patientenwunden (Abschnitte 5.4 und 5.5) in den Kontrollversuchen nie ein/e Wachstum/Trübung der Lösungen, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die oben genannten Maßnahmen zur Reduktion/Elimination der „*bioburden*“ erfolgreich waren.

6.2. Wirkung von Madenextrakten auf primäre humane Zellen

Die Arbeit von Bournelis (2012) konnte mit humanen Fibroblasten und Keratinozyten, die aus Präputien gewonnen wurden, zeigen, dass vom Madenextrakt keine toxischen Effekte ausgehen. Die eigenen Versuche (Abschnitt 5.6) unter Verwendung ähnlicher Fibroblasten (NHDF = normale humane dermale Fibroblasten), die jedoch von drei anderen Spendern stammten, erbrachten ähnliche Resultate. Um möglichst unverfälschte Ergebnisse zu erzielen, wurde auf die präventive Gabe von Antibiotika im Kulturmedium verzichtet und der Serumgehalt im Medium von 1 % bei Bournelis (2012) auf 0,1 % reduziert. Hier zeigten sich bei in Minimalmedium hergestellten (0,1 % FKS) Extrakt-Konzentrationen von bis zu 33 % spenderabhängig positive Effekte, die sich in einer Erhöhung der Vitalität der Fibroblasten zwischen 50 % und 150 % gegenüber der Kultur in 0,1 % FKS haltigen Medien alleine widerspiegelte (Abbildung 13; Abschnitt 5.6). Die sich zeigenden Vitalitätserhöhungen blieben hierbei stets unterhalb der Anregung mit 3,4 % FKS im Medium. Im Vergleich hierzu blieb die Vitalität der Fibroblasten bei Auflösung und Zugabe von in Vollmedium gelöstem Extrakt spenderunabhängig unterhalb der Anregung durch 3,4 % FKS angeregten Vitalität, obwohl in beiden Versuchsansätzen exakt gleiche Serum-Konzentrationen vorlagen. Die Vitalität lag hierbei selbst bei hohen Extrakt-Konzentrationen von bis zu 33 % immer noch mindestens auf dem Niveau der nicht angeregten Kontrollen (0,1 % FKS) (Abbildung 14;

Abschnitt 5.6). Die mikroskopische Kontrolle der Inkubationsräume bestätigte dieses Resultat (Fototafel 3; Abschnitt 5.6).

Bei einem zytokininduzierten Effekt wäre hierbei zu erwarten gewesen, dass die Vitalität auf ein Niveau oberhalb der Anregung durch 3,4 % FKS im Medium steigt. Dennoch sind dies die ersten positiven Effekte auf Fibroblasten, die von Ganzkörperextrakten aus Larven von *Lucilia sericata* ausgehen (wenn auch nur im Vergleich zu sehr reduzierten Serumbedingungen), die bisher überhaupt beschrieben wurden.

Bisherige Studien beschränkten sich hauptsächlich auf die Untersuchung möglicher Einflüsse der Exkrete/Sekrete auf verschiedene Aspekte, die eine Relevanz für die Wundheilung besitzen könnten. Verschiedene Autoren kamen hierbei in unterschiedlichen Versuchsansätzen und Modellen zu unterschiedlichen Ergebnissen. So zeigte Prete (1997) für primäre, humane Fibroblasten unter Verwendung eines anderen Testsystems, das den Einbau eines radioaktiv markierten Nukleotids in neugebildete DNA mißt, mit 20-Hydroecdyson, der Hämolymphe und den Exkreten/Sekreten (späte Larve II) eine leichte Zunahme der Proliferation gegenüber Kontrollversuchen, die in etwa maximal 12 % der Stimulation durch EGF (*epidermal growth factor*) betrug. Prete (1997) zeigte zudem im Gegensatz zu Ergebnissen der vorliegenden Arbeit, dass die Stimulation durch die Kombination von EGF und jeweils 20-Hydroecdyson/Hämolymphe/Exkreten/Sekreten sogar noch erhöht werden könne, die jeweiligen Faktoren aber hitzelabil seien. Smith et al. (2006) stellten bei der Untersuchung der nativen Exkrete/Sekrete bei der Kultur von 3T3-Fibroblasten (Maus) und HaCaT (eine aneuploide, humane, immortalisierte Keratinozyten Zelllinie) unter Verwendung eines mit dieser Arbeit vergleichbaren MTT-Testsystems keine mitogenen Effekte, wohl aber motogene Effekte im Sinne einer Zunahme der Migration auf beide Zelltypen fest. Smith et al. (2006) konnten diesen Effekt durch Verwendung von Proteinase-Inhibitoren auf den Proteinase-Anteil der Exkrete/Sekrete zurückführen. Weitere Autoren konnten in ihren Studien ebenfalls belegen, dass die Exkrete/Sekrete der Larven (Larve I) scheinbar keine Effekte auf die Proliferation (Horobin et al. 2005) bzw. Vitalität (Horobin et al. 2003) von humanen, primären Fibroblasten zu haben scheinen. Sie konnten jedoch sowohl in zweidimensionalen (Horobin et al. 2005) und dreidimensionalen Modellversuchen (Horobin et al. 2006) eine Erhöhung der migratorischen Aktivität dieser Zellen nachweisen. Sie zeigten ebenfalls eine durch native Exkrete/Sekrete vermittelte, Verringerung der Adhäsion dieser Zellen an Fibronectin und Kollagen (Horobin et al. 2003) und in deutlich geringerem Maße auch für hitzebehandelte Exkrete/Sekrete. Im Vergleich hierzu zeigten die Versuche von Bournelis (2012) mit den in dieser Arbeit erzeugten und verwendeten Ganzkörperextrakten (Abschnitt 5.1) keine maßgebliche Beeinflussung der Adhäsion und Migration von primären, humanen Fibroblasten, jedoch aber teilweise eine

Wirkung auf die Adhäsion und Migration von primären, humanen Keratinozyten, was sich in einer Erhöhung der Adhäsion an Fibronectin äußerte. Bournelis (2012) konnte hierbei eine erhöhte Expression und Aktivität des Integrin- β_1 auf Proteinebene nachweisen.

Bexfield et al. (2010) isolierten Derivate von Aminosäuren (3-Guanidinopropionsäure, Histidin und Valinol) aus den nativen Exkreten/Sekreten (Larve III) und konnten für diese Substanzen kaum bzw. keine positiven Effekte auf die Proliferation von primären, humanen Fibroblasten, sondern konzentrationsabhängig (1 mmol/L bzw. 10 mmol/L) sogar negative Effekte zeigen. Dieselbe Studie von Bexfield et al. (2010) konnte für diese Substanzen jedoch für Konzentrationen bis zu 1 mmol/L proliferationsfördernde Effekte auf menschliche Endothelzellen (HUVEC = *human umbilical vein endothelial cells*) feststellen. Andere Autoren, die Untersuchungen der nativen Exkrete/Sekrete durchführten (Kahl 2014), konnten für HUVEC keine proliferationsfördernden und für die Fibroblasten Zelllinie (L929, Maus) sogar negative Effekte zeigen. Zudem zeigte Kahl (2014) zytotoxische Effekte der Exkrete/Sekrete auf HUVEC, jedoch nicht auf die Fibroblasten Zelllinie L929. Eine jüngste Studie (Polakovicova et al. 2015) konnte für native Extrakte aus den Speicheldrüsen der Larven mittels ultrastruktureller Untersuchungen der Interaktion zwischen primären, humanen Fibroblasten und einer künstlichen Kollagen/Hyaluronsäure-Membran eine Erhöhung der metabolischen Aktivität zeigen, und es wurde die Vermutung angestellt, dass hieraus einer verbesserte Reorganisation von Komponenten der EZM resultiere.

Die eigenen Untersuchungen des Einflusses der Exkrete/Sekrete der Larve III von *Lucilia sericata*, die nach der Methode von Barnes et al. (2010) gewonnen wurden, zeigten eine spenderunabhängige Reduktion der Vitalität von primären Fibroblasten um bis zu ca. 50 % (Abbildung 15; Abschnitt 5.6) bei Exkret/Sekret-Konzentrationen im Medium zwischen 33 % und 6,67 %. Begründet scheint dies durch ein Ablösen der Zellen vom Kulturgrund zu sein (Fototafel 3 E, Abschnitt 5.6), was sich mit dem Vorhandensein von einem *L. sericata* spezifischen Chymotrypsin I (Telford et al. 2011), mindestens einer als Sericase bezeichneten Serin-Proteinase (van der Plas et al. 2014) und eventuell einer Glycosidase (Telford et al. 2012) in den nativen Exkreten/Sekreten in Einklang bringen lässt.

6.3. Bakterielle Besiedlung von Patientenwunden

Die Abstrichnahme von Patientenwunden erfolgte mittels Flockfaser-Abstrichtupfer, was den momentanen Goldstandard darstellt (Abschnitt 4.7.1). Bei den Isolaten handelt es sich um entsprechend der MiQ (mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards 6b) kultivierbare Spezies (Becker et al. 2013). Eine aktuelle Studie, die die Probennahme durch Flockfaser-Abstrichtupfer, Biopsien und Wundabdrücke mittels Filterpapier untersuchte,

konnte keine signifikanten Unterschiede für die Identifizierung der verschiedenen bakteriellen Spezies mit den verschiedenen Methoden ermitteln (Gjodsbol et al. 2012). Frank et al. (2009) konnten beim Vergleich von Routine-Diagnostikmethoden zur molekularen Diagnostik mittels vergleichender Analyse und Sequenzierung der rDNA-Fragmente der kleinen Untereinheiten eine verringerte mikrobielle Diversität und Unterschiede in der Dominanz der verschiedenen Spezies nachweisen, jedoch auch, dass die Diversität zu einem großen Teil gut beschriebenen und Wund-assoziierten Bakterien zugeordnet werden kann. Sie kamen zu dem Ergebnis, dass nur etwa 0,5 % der ermittelten Sequenzen zu potentiell neuen Spezies des Mikrobioms gehören. Prinzipiell gilt die Technik von Levine et al. (1976), bei der ein Abstrichtupfer über ein etwa 1 cm² großes Wundareal gedreht wird, als momentaner Goldstandard. Es werden jedoch auch fortlaufend neue Techniken, wie z. B. der sog. Essener Kreisel entwickelt (Al Ghazal et al. 2014), bei dem der Abstrichtupfer in einer bestimmten kreisenden Bewegung vom Wundrand in immer kleiner werdenden Kreisen hin zur Wundmitte gedreht wird. Das Ergebnis der Studie von Al Ghazal et al. (2014), bei der die Ulcera von 50 Patienten mit dieser Methode untersucht wurden, zeigte hierbei eine signifikant erhöhte bakterielle Diversität gegenüber herkömmlich angewendeter Abstrich-Techniken mit besonderem Hinblick auf die Identifikation von MRSA Stämmen und zeigte darüber hinaus eine relativ gleichmäßige Verteilung der isolierten Spezies im gesamten Wundbereich. Die Untersuchung der Abstriche von Patientenwunden, die mit Madenextrakt behandelt wurden, zeigte bei Abstrichnahme vom Wundrand und der Wundmitte zu fast allen Zeitpunkten eine gleichmäßige Verteilung. Größtenteils konnten zwar vom Wundrand und der Wundmitte identische Spezies isoliert werden, jedoch unterschieden sich die semiquantitativen Einschätzungen in der Auswertung relativ häufig. So erfolgte der Nachweis von *P. mirabilis* bei Patient 1 in Woche sechs nur am Wundrand (Tabelle 3; Abschnitt 5.3.1), von *P. aeruginosa* bei Patient 2 in Woche sechs nur in der Wundmitte (Tabelle 4; Abschnitt 5.3.2), *P. mirabilis* bei Patient 8 zu Beginn der Behandlung am Wundrand (Tabelle 9; Abschnitt 5.3.8) und bei Patient 9 *S. aureus* zu Beginn der Behandlung nur am Wundrand (Tabelle 10; Abschnitt 5.3.9), so dass nicht von einer gleichmäßigen Verteilung der Isolate auf der Wundfläche ausgegangen werden kann.

Die Anzahl der in dieser Arbeit behandelten Patienten (n = 10) ist verglichen mit einigen Längsschnittstudien zur Erfassung von Wund-besiedelnden Bakterien relativ gering, spiegelt jedoch zumindest in Bezug auf die verschiedenen Spezies Gemeinsamkeiten mit einer in Deutschland durchgeführten retrospektiven Zehn-Jahres-Studie wider. Die Studie (Jockenhofer et al. 2014), die Wunden von 100 Patienten untersuchte, zeigt *S. aureus* (53 %) und *P. aeruginosa* (25 %) als häufigste Spezies. Die vorliegende Arbeit wies *S. aureus* bei sechs von zehn und *P. aeruginosa* bei acht von zehn Patienten nach. Bezieht

man die Neubesiedlung durch andere *P. aeruginosa* Isolate mit ein, konnte diese Art sogar noch öfter isoliert werden. Dieselbe Studie zeigte zudem MRSA bei 9 % der Patienten, der aber bei den hier vorgestellten Ergebnissen in keiner Probe nachgewiesen werden konnte. Eine weitere in Deutschland durchgeführte Untersuchung, die Abstriche chronischer Unterschenkelgeschwüre der letzten zehn Jahre analysierte, identifizierte *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *P. mirabilis* sowie *E. faecalis* als die am häufigsten Wund-besiedelnden Keime (Renner et al. 2012), was sich mit den vorliegenden Ergebnissen gut deckt. Zudem zeigt die Studie einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Dauer der Ulzeration und der mehrfachen Isolation von *P. aeruginosa* in der längsschnittlichen Untersuchung derselben Patienten.

Eine weitere Studie (Gjodsbol et al. 2006), die ebenfalls Patienten über eine Dauer von acht Wochen bei zweiwöchiger Probennahme verfolgte, konnte zumindest anhand der Diversität der Bakterien-Flora (nicht aber bei der prozentualen Zusammensetzung dieser) vergleichbare Ergebnisse zeigen. Zudem zeigten sie einen signifikanten Zusammenhang zwischen der Größe der Ulcera und der Besiedlung durch *P. aeruginosa* und stellen daraus die Vermutung auf, dass *P. aeruginosa* zu einer Vergrößerung der Wundfläche bzw. einer Verlängerung der Dauer der Ulzeration beiträgt. Bei der Behandlung mit Madenextrakt zeigte sich ebenfalls, dass für die Patienten mit den am kürzesten persistierenden Ulcera (Patient 7 und 9) von nur etwa drei Monaten während des gesamten Behandlungszeitraums auch keine Besiedlung mit *P. aeruginosa* festzustellen war. Das am kürzesten bestehende, mit *P. aeruginosa* besiedelte Ulcus bestand seit sechs Monaten (Patient 3). Das kreisförmige und 3,5 cm bis 4 cm im Durchmesser große Ulcus war im Vergleich mit beispielsweise den Ulcera von Patient 1 oder Patient 5 flächenmäßig eher als klein einzustufen. Mit einer ungefähren Fläche zwischen 9,6 cm² und 12,6 cm² lag das Ulcus auch deutlich unterhalb der von Gjodsbol et al. (2006) ermittelten, mit *P. aeruginosa* besiedelten, ungefähren Fläche zwischen 35 cm² bis 89 cm². Aufgrund der mit sechs Monaten noch relativ kurzen Dauer des Bestehens des Ulcus sowie der zunehmenden Belagbildung und Grünfärbung des Ulcus (Abschnitt 5.8.3) und der mikrobiologischen Isolation lässt sich hieraus als Ursache für die Persistenz möglicherweise eine zunehmende *P. aeruginosa* Besiedlung ableiten.

6.4. Resistenzen in bakteriellen Isolaten aus Patientenwunden

Die Resistenztestung erfolgte entsprechend den diagnostischen Kriterien für chronische Wunden, die Bewertung der gemessenen Werte bzw. Hemmhofdurchmesser nach EUCAST (*The European Committee on Antimicrobial Susceptibility Testing*).

Keines der *S. aureus*-Isolate zeigte eine phänotypische Resistenz gegen Oxacillin oder Cefoxitin, womit es als MRSA einzustufen gewesen wäre. Die *S. aureus*-Isolate der Patienten 1, 2 und 7 zeigten sich sogar sensibel für alle getesteten Antibiotika (Tabelle 13, Tabelle 14, Tabelle 15 und Tabelle 18; Anhang).

Dagegen zeigten die *S. aureus*-Isolate von Patient 9 und 10 Resistenzen gegen Penicillin, was sich mit dem Vorhandensein von Penicillinasen (β -Lactamasen) erklären lässt, die in der Lage sind, den β -Lactam Ring des Penicillins zu schneiden und bereits seit den 1940er Jahren bekannt sind (Woodruff und Foster 1945). Bei den Resistenzen gegen die Fluoroquinolone Levofloxacin und Moxifloxacin der Isolate von Patient 5 und 10 (Tabelle 16 und Tabelle 19; Anhang) scheint es sich um erworbene Resistenzen zu handeln, die bei einer Vielzahl bakterieller Spezies zu beobachten sind und auf Mutationen in Genen zur Synthese der DNA-Gyrase und der Topoisomerase IV, im Rahmen sog. „*Quinolone Resistance-Determining Regions*“ (QRDR) zurückzuführen sind (Sierra et al. 2002). Jedoch wurden auch schon Mutationen außerhalb dieser Regionen beschrieben, die eine Fluoroquinolon-Resistenz vermitteln (Ince und Hooper 2000; Sierra et al. 2002). Resistenzen gegen Erythromycin und Clindamycin sind vor allem für MRSA schon lange beschrieben (Wadsworth et al. 1992). Der Anteil erythromycinresistenter MSSA, die mit Haut- und Weichteilinfektionen in Deutschland assoziiert sind, ist mit 13,2 % jedoch relativ gering (Jones et al. 2003). Resistenzen gegen Clindamycin, wie bei dem MSSA-Isolat von Patient 5 nachgewiesen (Tabelle 16; Anhang), treten bei erythromycinresistenten Isolaten, wenn auch aufgrund der vorliegenden Datenlagen für dieses Isolat nicht nachweisbar, relativ häufig als induzierbare Resistenzen auf (Shoji et al. 2015). Die Resistenz ist vermittelt durch eine Methylase, die auch konstitutiv vorliegen kann. Hierbei spielen verschieden *erm*-Gene (*erythromycin ribosome methylase*) eine Rolle (Drinkovic et al. 2001; Leclercq 2002). Resistenzen gegen Trimethoprim/Sulfamethoxazol (Patient 5, Tabelle 16; Anhang) sind sehr lange bekannt (Nakhla 1972) und beruhen auf der Aktivität des Enzyms Dihydrofolatreduktase, das den Abbau der Substanzen katalysiert (Coughter et al. 1987).

Für die Resistenz gegen Fusidinsäure konnte der Zusammenhang zwischen der Verschreibung fusidinsäurehaltiger Präparate zur topischen Anwendung und der Zunahme der fusidinsäureresistenten MSSA-Isolate hergestellt werden (Mason und Howard 2004). Liu et al. (2012) konnten fusidinsäureresistente MSSA isolieren, die das Gen *fusB* tragen, das auf einem transposonähnlichen Fragment lokalisiert ist, während Chen et al. (2011) das Gen *fusC* als Übereinstimmung bei MRSA-Isolaten mit Fusidinsäure-Resistenzen fanden. Ellington et al. (2015) konnten darüber hinaus zeigen, dass die Verkäufe von fusidinsäurehaltigen Präparaten in Großbritannien zwischen 2006 und 2011 relativ konstant

blieben, die zusätzlichen Fusidinsäure-Resistenzen in MRSA-Isolaten aber um das Zwei- bis Vierfache anstiegen und fanden in ihrer Studie Hinweise auf die Bildung chimärer Resistenzkassetten für β -Lactam- und Fusidinsäure-Resistenzen.

Die ebenfalls häufig isolierte Spezies *P. mirabilis* besitzt intrinsische Resistenzen gegen Nitrofurantoin und Tetracycline, ist aber sensibel für β -Lactame, Aminoglykoside, Fluoroquinolone und Trimethoprim/Sulfamethoxazol (O'Hara et al. 2000). Das *P. mirabilis*-Isolat von Patient 1 zeigte ein Resistenzmuster, welches seinen intrinsischen Resistenzen entspricht (Tabelle 13; Anhang). Dagegen zeigte das *P. mirabilis*-Isolat von Patient 7 Resistenzen gegen die Fluoroquinolone (Gyrasehemmer) Ciprofloxacin und Moxifloxacin (Tabelle 18; Anhang), was dafür spricht, dass es sich um erworbene Resistenzen handelt. Die Zunahme an Resistenzen gegen Fluoroquinolone in *P. mirabilis* ist schon länger bekannt (Hernandez et al. 2000) und beruht vermutlich auf der Mutation bestimmter Genloci (*gyrA*, *gyrB*, *parE* und *parC*), die zu einer Veränderung der DNA-Gyrase und Topoisomerase IV führen (Harada et al. 2014; Weigel et al. 2002). Bei den Resistenzen gegen das Reserve-Antibiotikum Tigecyclin in den *P. mirabilis*-Isolaten von Patient 1 und 7 (Tabelle 13 und Tabelle 18; Anhang) handelt es sich um intrinsische Resistenzen, die vermutlich über die AcrRAB Efflux-Pumpe vermittelt sind (Visalli et al. 2003).

Die *P. aeruginosa*-Isolate der Patienten 4, 6 und 10 zeigten bei der Erstellung der Antibiotogramme keine phänotypischen Resistenzen gegen die getesteten Antibiotika (Tabelle 16, Tabelle 17 und Tabelle 19; Anhang) und das Isolat von Patient 5 nur intermediäre Empfindlichkeit gegen Imipenem und Meropenem (Tabelle 16; Anhang). *P. aeruginosa*-Stämme verfügen über ein ganzes Arsenal an intrinsischen Antibiotikaresistenzen, die über verschiedene Mechanismen funktionieren. Die äußere Membran von *P. aeruginosa* kann im Vergleich zu anderen Bakterien eine verringerte Permeabilität für eine Vielzahl Antibiotika besitzen, ein Breitspektrum-Efflux-Pumpen-System haben und kann über eine induzierbare AmpC- β -Lactamase verfügen (Kohler et al. 1996; Li et al. 2000; Sanders und Sanders 1992). Die AmpC- β -Lactamase ist unempfindlich gegenüber einer Vielzahl handelsüblicher β -Lactamase-Hemmern (Livermore 1995). Hierdurch ergibt sich ein natürlicher Phänotyp mit mehr oder weniger stark ausgeprägten Resistenzen gegen Aminopenicilline, Erst- und Zweitgenerations Cephalosporine, Tetrazyklinen, Chloramphenicol, Makroliden und Lincosamiden (Henrichfreise 2006), mit dem sich eine Vielzahl der ermittelten Resistenzen der Isolate erklären lassen. Die weiteren Resistenzen, die sich in den Antibiotogrammen der *P. aeruginosa*-Isolate finden lassen, sind als erworbene Resistenzen einzuordnen. Hierbei kann die Überexpression der Efflux-Systeme zu einer Kreuzresistenz oder verminderten Sensibilität für Piperacillin, Ceftazidim sowie Meropenem, die Modifikation der Typ II Topoisomerase zu verminderter

Sensibilität/Resistenz gegen Chinolone, der Verlust des Porins OprD zu Resistenzen gegen Carbapenemen (Henrichfreise 2006; Livermore 2002) und die vermehrte Expression der AmpC- β -Lactamase zu einer Erhöhung der Resistenz gegen ebenfalls Piperacillin und Ceftazidim führen (Henrichfreise 2006; Livermore 1995). Mit diesen Mechanismen lassen sich die meisten der festgestellten Resistenzen in den *P. aeruginosa*-Isolaten erklären. Eine Ausnahme bildete hierbei das Isolat von Patient 3. Dieses zeigte sich zwar empfindlich für Imipenem, Meropenem und Gentamicin (Tabelle 16; Anhang), aber resistent gegen alle anderen getesteten Antibiotika. Die intrinsische Resistenz und deren Ausprägung gegen das Reserve-Antibiotikum Tigecyclin ist vermutlich ebenfalls über einer der Efflux-Pumpen (OprM) zu erklären (Dean et al. 2003).

Das *Providencia rettgeri*-Isolat (syn. *Alcaligenes rettgeri*), das aus Wunden von Patient 6 isoliert wurde, besitzt eine eher untergeordnete klinische Bedeutung und wies lediglich intrinsische Resistenzen auf (Leclercq et al. 2013). Das in Wunden von Patient 1 gefundene *Achromobacter xylosoxidans*-Isolat gehört zu den Umweltkeimen. In einer in Deutschland durchgeführten Studie mit 76 Teilnehmern konnte *A. xylosoxidans* nur aus Wunden von einem Patienten als eines von 106 unterschiedlichen Isolaten gezeigt werden (Dissemond et al. 2004). Das Isolat verfügte über eine große Anzahl Antibiotikaresistenzen, die sich mit der Vielzahl als intrinsisch beschriebener Resistenzen vereinbaren lassen (Almuzara et al. 2010; Glupczynski et al. 1988; Holmes et al. 1977; Hu et al. 2015; Rolston und Messer 1990). Das *Citrobacter koseri*-Isolat, das aus den Wunden eines Patienten (Patient 2) isoliert werden konnte zeigte sich empfindlich für fast alle getesteten Antibiotika, war jedoch resistent gegen Piperacillin und intermediär resistent gegen Cefuroxim (Tabelle 15; Anhang), was sich mit einer natürlichen Resistenz vereinbaren lässt (Cullmann und Seibert 1986).

6.5. Effekte von Madenextrakten auf das bakterielle Wachstum

Es liegen zahlreiche Berichte über antibakterielle Effekte der Madentherapie gegen eine Vielzahl von unterschiedlichen Bakterien vor, die vor allem den Exkreten/Sekreten der Larven von *Lucilia sericata* und den darin enthaltenen Substanzen zuzuordnen sind (relevante Publikationen der letzten 20 Jahre) (Andersen et al. 2010b; Bexfield et al. 2004; Cerovsky et al. 2011; Daeschlein et al. 2007; Huberman et al. 2007a; Huberman et al. 2007b; Jaklic et al. 2008; Kerridge et al. 2005; Kruglikova 2011; Poppel et al. 2015; Thomas et al. 1999; Valachova et al. 2014a; Valachova et al. 2014b). Aufgrund der Vielzahl der wissenschaftlichen Arbeiten und den darin verwendeten Methoden fällt es schwer, diese Beobachtungen zu einem einheitlichen Bild zusammenzufügen. Vor allem die Gewinnung der Exkrete/Sekrete unterscheidet sich hierbei erheblich. Cazander et al. (2009) sowie

Barnes et al. (2010) unternahmen als Erste den Versuch, dieses uneinheitliche Bild in einen einheitlichen Zusammenhang zu bringen, weshalb sich die hier durchgeführten Versuche an den Vorschlägen von Barnes et al. (2010) orientieren, um eine bessere wissenschaftliche Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Zur Erprobung etwaiger vorhandener Effekte der in dieser Arbeit erzeugten Madenextrakte auf das bakterielle Wachstum wurden verschiedene Bakterien-Isolate aus Patientenwunden (*P. mirabilis* P1 und P8; *P. rettgeri*, *E. faecalis*; *A. xylosoxidans*; *P. aeruginosa* P1, P6, und P8; *S. aureus* P1, P5 und P7) und ein klinisches *K. oxytoca*-Isolat sowie drei ATCC-Stämme (*P. mirabilis*, *S. pyogenes* und ein MRSA-Stamm) getestet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente liefern keinen Hinweis auf antibakterielle Effekte, die direkt von diesem speziellen Ganzkörperextrakt aus Larven von *Lucilia sericata* ausgehen (Abbildung 9 und Abbildung 10). Hierbei war das Wachstum der verschiedenen Bakterienspezies im „*microbroth dilution assay*“ gleich dem Wachstum in den Kontrollversuchen oder lag in einigen Fällen sogar etwas oberhalb dessen. Lediglich *A. xylosoxidans* zeigte ein etwas verringertes Wachstum, eine Wachstumsinhibition konnte aber nicht nachgewiesen werden. Selbst bei einer Reduktion der Konzentration des Anzuchtmediums auf 10 % des standardmäßig verwendeten Mediums konnte in exemplarischen Versuchen kein wachstumshemmender Effekt auf die ausgewählten bakteriellen Isolate von *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *A. xylosoxidans*, *E. faecalis* und *P. mirabilis* gezeigt werden (Abbildung 28; Anhang). Auch unter Verwendung von „*zone of inhibition assays*“ und bei der Bestimmung der koloniebildenden Einheiten konnte kein antibakterieller Effekt gezeigt werden. Cazander et al. (2009) kamen mit einem, dem in dieser Arbeit vergleichbaren Flüssigkultur-Testsystem zu dem Schluss, dass von den Exkreten/Sekreten der Maden (sowohl Larve I und Larve III) und auch der Madentherapie als solcher keine antibakteriellen Effekte ausgehen. In der Arbeit von Cazander et al. (2009) zeigte sich in der Co-Kultur steriler Larven mit verschiedenen bakteriellen Isolaten sogar eine Verbesserung des bakteriellen Wachstums, was die Autoren auf eine Verbesserung der Nährstoff-Situation im Kulturmedium zurückführen und sich mit den in der vorliegenden Arbeit ermittelten Beobachtungen deckt. Ähnlich den Ergebnissen aus den eigenen Versuchen konnten Jaklic et al. (2008) bei Experimenten auf Grundlage von festen Agar-Kulturmedien keine antibakteriellen Effekte ermitteln. Nicht ausgeschlossen sind jedoch mögliche synergistische Effekte der Madenextrakte mit Antibiotika. Arora et al. (2011) zeigten geringe Effekte der nativen Exkrete/Sekrete der Larven von *Lucilia cuprina* gegen *S. aureus*, jedoch eine Verstärkung der Wirkung von Ciprofloxacin bei gleichzeitiger Anwendung der nativen Exkrete/Sekrete und Ciprofloxacin in Dosen unterhalb der minimalen wachstumshemmenden Konzentration (MHK).

Die Mehrheit der rezent publizierten Studien bezieht sich auf die Untersuchung antibakterieller Effekte unter Verwendung der unerhitzten Exkrete/Sekrete oder lebender Maden selbst, nicht aber auf erhitzte, gefriergetrocknete und γ -bestrahlte Extrakte. Huberman et al. (2007a) konnten Effekte sowohl gegen Gram-positive (MRSA) als auch Gram-negative Bakterien (*P. aeruginosa*, *K. pneumoniae*) durch Ganzkörperextrakte und der Hämolymphe steriler Larven und Larven, die aus chronischen Wunden entfernt wurden, zeigen. Sie ermittelten diese Effekte für zwei Fraktionen unterschiedlichen Molekulargewichts (3 bis 10 kDa und <1 kDa). Ein solcher Faktor ist das Peptid Lucifensin, das erfolgreich isoliert werden konnte, dessen MHK für *S. aureus* bei etwa 16 mg/L und für MRSA zwischen 8 mg/L und 128 mg/L liegt. Die Wirkung scheint auf einer Veränderung des Membranpotentials und einem Einstrom von K^+ -Ionen begründet zu sein (Andersen et al. 2010b).

6.6. Wirkung von Madenextrakten auf bakterielle Biofilme

Bakterielle Biofilme sind neben planktonisch auftretenden Bakterien eine grundlegende Form der Organisation des Zusammenlebens einzelner aber auch verschiedener bakterieller Spezies. Diese hauptsächlich aus extrazellulären, polymeren Substanzen bestehenden Biofilme gewähren den darin lebenden Bakterien Schutz vor äußeren Einflüssen wie z.B. auch Antibiotika (McCarty et al. 2012). James et al. (2008) stellten bei der Analyse von Biopsien aus chronischen Wunden (n = 50) und akuten Wunden (n = 16) unterschiedlicher Genese fest, dass chronische Wunden mit 60 % etwa zehnmal häufiger mit Biofilmen belegt sind als akute Wunden. James et al. (2008) konnten auch zeigen, dass die Biofilme aus verschiedenen bakteriellen Spezies bestehen (unter anderem sogar aus strikt anaeroben Spezies) und die Biofilme der chronischen Wunden dichtere, matrixumgebene Anordnungen von Bakterien zeigen als akute Wunden. In diesem Zusammenhang zeigten Fazli et al. (2011) im Vergleich von Wund-Biopsien von *P. aeruginosa*-Biofilm besetzten Wunden zu *S. aureus*-Biofilm besetzten Wunden deutlich mehr neutrophile Granulozyten im Bereich der *P. aeruginosa*-Zellen und stützen damit die Hypothese, dass *P. aeruginosa*-Biofilme einer der Hauptfaktoren für eine verlängerte inflammatorische Immunantwort sind und damit maßgeblich zu einer Beeinträchtigung/Verlangsamung des Wundheilungsgeschehens beitragen. Im Mausmodell konnte zudem belegt werden, dass *S. aureus*-Biofilme die Reepithelisierung von künstlich erzeugten Wunden wesentlich beeinflussen (Schierle et al. 2009). Das Auflösen solcher Biofilme bzw. das Verhindern der Bildung dieser Biofilme erscheint daher von essenzieller Bedeutung für die Heilung chronischer Wunden zu sein.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zeigen, dass der Madenextrakt die Fähigkeit zur Biofilmbildung fast aller getesteten Spezies *in vitro* verschlechtert (Abbildung 11 und Abbildung 12). Die Isolate *P. rettgeri* (Patient 6) und *S. pyogenes* (ATCC) zeigten im Vergleich zu den anderen getesteten Bakterien eine generell verminderte Biofilmbildung im gewählten Testzeitraum von 24 h. Eine Beschreibung von *P. rettgeri* als Biofilm-Bildner auf chronischen Wunden findet sich bisher nicht, sondern vielmehr im Zusammenhang bei der Bildung kristalliner Biofilme auf Kathetern (Broomfield et al. 2009). Für *S. pyogenes* ist die Unfähigkeit zur Bildung von Biofilmen auf abiotischen Oberflächen bekannt (Marks et al. 2014), womit sich die geringe Biofilmbildung in den durchgeführten Versuchen erklären lässt. Die Isolate, die nicht mit einer verringerten Biofilmbildung reagierten (*A. xylosoxidans* Patient 1, *P. aeruginosa* Patient 3) oder unter den gewählten Versuchsbedingungen zu einer vermehrten Biofilmbildung (*S. aureus* Patient 5) neigten, zeigten zum Einen stark ausgeprägte Antibiotikaresistenzen und zum Anderen denselben, zum Teil noch stärker ausgeprägten Effekt der verstärkten Biofilmbildung in Anwesenheit von nicht-wachstumsinhibitorischen Konzentrationen von Piperacillin/Tazobactam von 2/0,25 µg/ml (Abbildung 12). Hierauf reagierte auch der MRSA Stamm (ATCC) mit einer verstärkten Biofilmbildung im Vergleich zur Kontrolle – interessanterweise aber mit einer nahezu vollständig verhinderten Bildung eines Biofilms in Anwesenheit des Madenextrakts. Im Vergleich hierzu zeigten die Isolate/Stamm (*P. aeruginosa* Patient 3, *S. aureus* P5 und MRSA (ATCC)) im turbidometrischen Testverfahren auch kein verringertes Wachstum in Anwesenheit von Piperacillin/Tazobactam Konzentrationen von 2/0,25 µg/ml (Abbildung 10). Ein solcher Nachweis ist für MRSA in Verbindung mit sub-inhibitorischem Piperacillin/Tazobactam bisher noch nicht erbracht worden, wohl aber für sub-inhibitorische Konzentrationen von Oxacillin und Vancomycin (Mirani und Jamil 2011). In diesem Zusammenhang scheint Vancomycin die Biofilmbildung auf Nylon- und Silikon-Oberflächen und Oxacillin auf Glass-Oberflächen zu verstärken. Ein Effekt der verstärkten Biofilmbildung konnte für *P. aeruginosa* und *E. coli* bei sub-inhibitorischen Konzentrationen von Aminoglykosid-Antibiotika beobachtet werden und kann ebenfalls mit einem Resistenz-Mechanismus (*aminoglycoside response regulator (arr)*) in Zusammenhang gebracht werden (Hoffman et al. 2005). Es besteht daher Grund zur Annahme, dass die in der vorliegenden Arbeit beobachteten Effekte der verstärkten Biofilmbildung bei sub-inhibitorischen Antibiotika-Konzentrationen möglicherweise in direktem Zusammenhang mit dem vorliegenden Resistenz-Mechanismen stehen.

Es gibt verschiedene Hinweise darauf, dass sich in den Exkreten/Sekreten der Larven Faktoren befinden, die eine Bildung von Biofilmen verhindern und/oder den Zusammenbruch dieser herbeiführen können. Andere Autoren (van der Plas et al. 2008)

beobachteten bei ihren Untersuchungen von je einem *P. aeruginosa* (PA01) und einem oxacillin-sensitiven *S. aureus*-Stamm (ATCC 29213), dass die nativen Exkrete/Sekrete in unterschiedlichen Konzentrationen die Biofilmbildung durch *S. aureus* verhindern und in zehnfach höheren Konzentrationen den Zusammenbruch bereits gebildeter Biofilme herbeiführen können, aber dass *P. aeruginosa* zunächst mit verstärkter Biofilmbildung reagiert (< 10 h) und diese erst dann zusammenbrechen. Ein Erhitzen der Exkrete/Sekrete auf kurzzeitig bis zu 100°C hob diesen Effekt für dieses *S. aureus*-Isolat, jedoch nicht für das *P. aeruginosa*-Isolat auf, so dass van der Plas et al. (2008) zu dem Schluss gelangten, dass es sich bei den beteiligten Faktoren um unterschiedliche, hitzestabile bzw. hitzelabile Faktoren handeln müsse. Hierbei stellten van der Plas et al. (2008) fest, dass keine bakteriziden Effekte oder Effekte, die das „quorum sensing“ beeinflussen, vorliegen. Andere Autoren (Bohova et al. 2014) gelangten ebenfalls zu der Überzeugung, dass es sich bei den Faktoren, die sich auf die Bildung von Biofilmen von *S. aureus* auswirken, um hitzelabile Faktoren handeln müsse. Sie stellten bei ihren Untersuchungen auch fest, dass die nativen Exkrete/Sekrete keinen Einfluss auf die Bildung der Biofilme durch die Gram-negativen *Enterobacter cloacae* und *P. mirabilis* haben und dass eine auflösende Wirkung auf bereits etablierte Biofilme von *S. aureus*, *E. cloacae* und *P. mirabilis* in sehr hohen Konzentrationen der Exkrete/Sekrete besteht, die sich durch Erhitzen vollständig aufheben lässt. Im Gegensatz hierzu zeigen die in der vorliegenden Arbeit erzielten Ergebnisse Effekte auf die Biofilmbildung durch Gram-negative und Gram-positive durch erhitzte Madenextrakte.

In einer vergleichenden Studie von Tote et al. (2009), in der zwölf verschiedene Antibiotika in ihrer Wirkung auf Biofilme von *S. aureus* und *P. aeruginosa* und die Lebensfähigkeit der daraus herausgelösten Bakterien untersucht wurden, stellte sich heraus, dass zwar die Anzahl der lebensfähigen Bakterien durch die meisten Antibiotika reduziert wurde, aber die Biofilm-Matrix als solche in den meisten Fällen weniger beeinflussbar war und daher die Bildung dieser Matrix und deren Auflösung wichtige zusätzliche Faktoren in der Bekämpfung biofilmbildender Bakterien sind. Diese Hypothese unterstützend wurde ein biofilmauflösender Effekt durch die nativen Exkrete/Sekrete und eine erfolgreich antibiotikainduzierte Verringerung der aus den Biofilmen herausgelösten, koloniebildenden Einheiten von MSSA (ATCC 29213) festgestellt (van der Plas et al. 2010). Harris et al. (2013) führen den biofilmauflösenden Effekt auf die Wirkung von Chymotrypsin, das analog zu den Exkreten/Sekreten rekombinant gewonnen wurde, auf bakterielle Adhäsine zurück. Hierdurch lässt sich die Aufhebung des gegen Biofilme von *S. aureus* gerichteten Effekts durch Erhitzen der Exkrete/Sekrete erklären, was durch van der Plas et al. (2008) ermittelt wurde. Für die Biofilme eines klinischen *P. aeruginosa*-Isolats aus einer infizierten Wunde konnte von Jiang et al. (2012) beobachtet werden, dass sich die biofilmauflösenden Effekte

durch die Exkrete/Sekrete verstärken lassen, wenn diese von Larven gewonnen werden, die sich in Co-Kultur mit dem Isolat befinden.

Zusammenfassend, auf Grundlage der eigenen Ergebnisse und der Studien anderer Autoren, die an unterschiedlichen Bakterien-Isolaten durchgeführt wurden, kann behauptet werden, dass es anscheinend auf das spezielle Isolat aber möglicherweise auch auf die Methode, der Gewinnung der Exkrete/Sekrete ankommt, ob ein Effekt auf die Bildung/Zerstörung von Biofilmen vorliegt. Es konnte darüber hinaus erstmals der Beweis erbracht werden, dass ein erhitzter Ganzkörperextrakt aus Larven von *L. sericata* die Bildung von Biofilmen in den meisten Fällen der getesteten Bakterienspezies behindert. Zudem konnte herausgestellt werden, dass für die Isolate, für die durch Madenextrakt keine verminderte Biofilmbildung beobachtet werden konnte, die Begründung dafür möglicherweise in den speziell ausgeprägten Antibiotikaresistenzen zu finden ist.

6.7. Die Bedeutung von Bakterien und Biofilmen für sekundär heilende Wunden

Unabhängig von den nicht nachweisbaren antibakteriellen Effekten des speziellen Madenextrakts, verfügen aus Wunden isolierte Bakterien wie *S. aureus* und *P. aeruginosa* anscheinend über EZM-auflösende Proteinase (Wysocki et al. 2013). Diese Tatsache und die schlechtere Zugänglichkeit der Bakterien für das Immunsystem durch die höhere Organisationsstufe in Form von Biofilmen spielt in diesem Zusammenhang möglicherweise eine noch nicht ausreichend beachtete Rolle. Die Kenntnis über vorliegende Antibiotikaresistenzen gibt zwar Auskunft über die Möglichkeit einer antibiotischen Therapie im Falle einer Infektion, aber nicht zwangsläufig über die Virulenz des vorliegenden Stammes. Thompson und Brown (2014) zeigten eine Gleichverteilung von 35 virulenzassoziierten Genen für MRSA und MSSA, mit Ausnahme von *sei* (*staphylococcal enterotoxin I*). Zudem scheinen (zumindest *in vitro*) Bakterien-Stämme wie MRSA die Vitalität und die Fähigkeit zur Migration von NHDF maßgeblich zu beeinflussen. Kirker et al. (2012) beobachteten eine limitierte Migration und das Absterben von NHDF, die in Medium kultiviert wurden, das über planktonische oder Biofilm-bildende MRSA konditioniert wurde. In einem ähnlichen Ansatz konnten Kirker et al. (2009) für humane Keratinozyten unter Einfluss von biofilm- und nicht-biofilm-bildenden *S. aureus* konditionierten Medien eine Reduktion des Wundverschluss im „*scratch wound assay*“ und eine signifikant erhöhte Apoptose-Rate der Keratinozyten unter Einfluss des biofilmkonditionierten Mediums zeigen. Die Ergebnisse von Jacobsen et al. (2012) zeigen, dass das „*quorum sensing*“ von *P. aeruginosa* in der Lage ist, die Migration von Keratinozyten und Fibroblasten *in vitro* signifikant zu reduzieren. Diese Effekte stellten Jacobsen et al. (2012) durch die Kultur

dieser Zellen mit konditioniertem Kulturmedium fest, das mit bis zu 20 % mit Kulturmedium von *P. aeruginosa* angereichert war, die entweder in der Lage waren „*quorum sensing*“ Signale zu bilden oder nicht. Negative Effekte auf die Proliferation konnten Jacobsen et al. (2012) nur für Keratinozyten feststellen. Durch die Blockierung des „*quorum sensing*“ von *P. aeruginosa* mittels Inhibitoren, die aus z. B. Pflanzenwurzeln gewonnen werden können (Kim et al. 2015), aber auch aus anderen Bakterienspezies gewonnen wurden (*Chromobacterium violaceum*) (O'Loughlin et al. 2013), konnte eine verringerte Biofilmbildung und auch eine geringere Virulenz beobachtet werden. Für das Wundheilungsgeschehen hätte eine Verringerung der Biofilmbildung demnach mehrfache Bedeutung. Die weniger in Biofilmen sondern eher planktonisch organisierten Bakterien wären angreifbarer durch Antibiotika und vermutlich auch durch das Immunsystem des Patienten. Kahle et al. (2013) konnten feststellen, dass bestimmte Moleküle (N-(3-oxododecanoyl)-L-Homoserin-Lacton = AHL-12) des „*quorum sensing*“ von *P. aeruginosa* und anderer Gram-negativer in der Lage sind, polymorphonukleäre Granulozyten (PMN) chemotaktisch anzulocken. Zu diesem Ergebnis kamen auch andere Autoren, die das „*Pseudomonas Quinolone Signal*“ (PQS) dafür verantwortlich machen (Hansch et al. 2014).

Unabhängig von der Wechselwirkung zwischen Wirts-Immunsystem und bakteriellen Biofilmen stellten van der Plas et al. (2007) eine Reduktion verschiedener pro-inflammatorische Antworten durch Neutrophile fest, verursacht durch die nativen Exkrete/Sekrete, die sich durch Erhitzen der Exkrete/sekrete vollständig aufheben ließ. Durch eine Verringerung der Biofilmbildung und der möglicherweise daraus resultierenden verringerten Virulenz bzw. besseren Zugänglichkeit durch das Wirts-Immunsystem lassen sich einige der Ergebnisse der verbesserten klinischen Situation der behandelten Patientenwunden erklären.

6.8. MMP-Level in Wundexsudaten und Kulturmedien

Die NHDF-Zellen hatten vermutlich aufgrund der verschiedenen Spender und der sich leicht unterscheidenden Passagen, in der sie sich befanden, leicht unterschiedliche Teilungsraten. Die Konzentrationen, in denen die verschiedenen MMP (Matrixmetalloproteinasen) und TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*) im Kulturmedium der NHDF ermittelt werden konnten (Abbildung 16), scheinen spenderabhängig zu sein. Das Auftreten im Kulturmedium deckt sich aber mit den Ergebnissen von Tandara und Mustoe (2011), die das Auftreten aller auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten MMP und TIMP (außer TIMP-4) in Kulturmedien von primären Keratinozyten und Fibroblasten alleine sowie in Co-Kultur untersuchten. Eine frühere Arbeit von Vaalamo et al. (1997) belegt das Fehlen von MMP-13 in der *in vitro*

Kultivation von Fibroblasten auf Expressions-Ebene, was in der vorliegenden Arbeit auf Proteinebene nachvollzogen werden konnte.

Die Gewinnung von Wundexsudaten aus chronischen Wunden stellt eine besonders schwierige Aufgabe dar. Die unterschiedlichen Formen und Tiefen der Wundareale stellen hierbei eine Variable dar. Eine andere Variable ist die Frage, inwiefern durch die Probennahme die Wundheilung und das Wohlbefinden des Patienten beeinflusst werden und in welchem Verhältnis dies zur Generierung neuen Wissens steht. Eine aktuelle Studie von Ramsay et al. (2015) fasst die Vielzahl der unterschiedlichen Methoden zur Gewinnung von Wundexsudaten und den dabei verwendeten Parameter zur Methode der primären Gewinnung, der Sedimentation bei unterschiedlichen g-Zahlen, Sterilfiltration, Temperatur der Lagerung und der Einsatz von Proteinase-Inhibitoren zusammen und kritisiert dabei die Verwendung der zahlreichen unterschiedlichen Parameter.

Es wurde sich in der vorliegenden Arbeit für eine Probennahme in möglichst wöchentlichem Abstand entschieden, so dass möglichst umfangreiche Daten auch im zeitlichen Verlauf der Behandlung ermittelt werden konnten. In Hinblick auf das Patientenwohl und die Bereitschaft zur Teilnahme an weiteren Probennahmen wurden die Zeiträume zur Gewinnung der Wundexsudate möglichst kurz gehalten. Die hierzu entwickelte und verwendete Methode, bei der von sterilen 100 ml Urinbechern an Markierungen der Boden entfernt wurde und so kreisrunde Rahmen zur Umrandung einer definierten Wundfläche erzeugt wurden, ist bisher in der Literatur nicht beschrieben (Abschnitt 4.6.1). Die Gewinnung der Exsudate erfolgte durch Auftragen definierter Volumina steriler Kochsalzlösung und Rückgewinnung dieser innerhalb von nur zwei Minuten, so dass die zusätzlich in Anspruch genommene Zeit des Patienten auf ein Minimum reduziert werden konnte. Bei einer anderen häufig angewendeten Methode wird der Wundbereich vollständig mit abdeckenden Filmverbänden verschlossen und das Wundexsudat z.B. in Zeiträumen von 30 Minuten (Fernandez et al. 2008) bis zu 8 Stunden (Lauer et al. 2002) gesammelt, was bei wöchentlicher Probennahmen eine zu hohe Belastung bedeutet hätte. Zudem konnten hier die so frisch gewonnen Proben unter Kühlung sofort einer Sedimentation (500 x g) und anschließender Sterilfiltration und aliquotierter Lagerung bei tiefkalten Temperaturen zugeführt werden.

Es liegen eine Vielzahl synthetischer Substranaloga zur Untersuchung der Aktivität von MMP vor, jedoch werden diese meist, zwar in unterschiedlichen Mengen, von mehreren MMP umgesetzt, so dass bei komplex zusammengesetzten Wundexsudaten, die putativ mehrere unterschiedliche MMP gleichzeitig beinhalten, eine Unterscheidung nicht möglich ist. Um einen möglichst umfassenden Überblick über die in den Wundexsudaten vorhandenen Level verschiedener MMP und TIMP zu erhalten, wurde ein immunologisches

Testverfahren verwendet (Abschnitt 4.8.2), um Aufschluss über bereits ausführlich für das Milieu chronischer Wunden beschriebener, aber auch in bisherigen Untersuchungen möglicherweise vernachlässigter MMP zu erhalten. Die Analyse der vergleichenden Darstellungen der direkt gemessenen MMP- und TIMP-Konzentrationen (Abbildung 17 bis Abbildung 26) lieferte teilweise inkonsistente Ergebnisse und eine schlechte Vergleichbarkeit mit der Methodik bereits publizierter Studien, weshalb im Folgenden hauptsächlich die nicht auf die Gesamtproteinkonzentration bezogenen Daten (Abbildung 29 bis Abbildung 38; Anhang) diskutiert werden.

6.8.1. MMP-10

Zu Beginn der Heilversuche mit Madenextrakt wiesen die Exsudate der meisten Wunden MMP-10 (syn. Stromelysin-2) Konzentrationen unterhalb von 50 pg/ml auf. Die Wunden, die einen nahezu vollständigen Wundverschluss im Behandlungszeitraum aufwiesen (Patient 7 und Patient 9), zeigten auch ein uneinheitliches Bild der Konzentrationen von MMP-10 in den Exsudaten. In den Exsudaten von Patient 7 konnte MMP-10 in Konzentrationen von maximal 10 pg/ml nachgewiesen werden (Tabelle 27; Anhang). Die Exsudate von Patient 9 zeigten bereits in den ersten Behandlungswochen einen deutlichen Anstieg der MMP-10 Konzentrationen auf bis zu 2.370 pg/ml (unabhängig von der Gesamtproteinkonzentration), die erst gegen Ende der Behandlung auf unter 50 pg/ml absanken (Tabelle 29; Anhang). Eine ebenfalls deutliche Erhöhung der MMP-10 Konzentrationen in den ersten Behandlungswochen zeigten die Exsudate von Patient 10 (maximal 4.890 pg/ml), bei dem sich zwar eine bessere Konditionierung des Wundgrunds ergab, jedoch keine Reepithelisierung. Als auffällig erwies sich ein Ansteigen der MMP-10 Konzentrationen in Exsudaten von Patient 1 in der dritten Behandlungswoche (Tabelle 29; Anhang). Jüngste Studien (Rohani et al. 2015) in *MMP10* defizienten Knockout-Mäusen belegen eine wichtige Beteiligung von MMP-10 bei der über Makrophagen vermittelten Gewebe-Neuformierung und Narbenbildung in der primären Wundheilung, was für die messbare Erhöhung der MMP-10 Konzentrationen in den Exsudaten sprechen würde. Krampert et al. (2004) stellten MMP-10 als wichtigen Faktor bei der Migration von Keratinozyten am Wundrand fest, betonen aber, dass die Expression dieser Proteinase anscheinend einer ausgeprägten Regulierung bedarf. Hiermit ließe sich erklären, warum im größeren Anteil nur geringe bzw. schwankende Konzentrationen auf Proteinebene gemessen wurden.

6.8.2. MMP-3

MMP-3 (syn. Stromelysin-1) spielt eine wichtige Rolle in der Wundkontraktion und damit bei der Geschwindigkeit der Wundheilung durch Einflussnahme auf die Formation organisierter Aktin-Bündel in dermalen Fibroblasten und wird dabei aber auch in der proliferierenden Population der Keratinozyten an der Wundfront exprimiert (Bullard et al. 1999; Martins et al. 2013). Bei der Untersuchung heilender und nicht heilender Ulcera besteht anscheinend zwar ein Unterschied in den absoluten proteolytischen Aktivitäten, jedoch kein Unterschied im Hinblick auf die MMP-3 Konzentrationen innerhalb Wunden dieser beiden Gruppen (Meyer et al. 2008). Es gibt zwar einige Untersuchungen zu MMP-3 in akuten (Baker und Leaper 2000) und chronischen/diabetischen Wundexsudaten (Schmohl et al. 2012), jedoch ist MMP-3 in diesem Zusammenhang in deutlich geringerem Umfang gegenüber anderen MMP untersucht. In einem Großteil der Exsudat-Proben konnte MMP-3 gar nicht oder in nur sehr geringen Konzentrationen nachgewiesen werden. Bei Patient 3 und Patient 4 fehlte sie während des gesamten Behandlungszeitraums nahezu vollständig. Als Einmalbefund konnte sie bei Patient 2 nur vor der Behandlung (2.170 pg/ml), bei Patient 8 in Woche zwei der Behandlung (430 pg/ml) in den Exsudaten gezeigt werden. Bei Patient 9 lag sie vor der Behandlung in einer Konzentration von 60 pg/ml und nach einer Woche Behandlung mit 280 pg/ml vor. Bei Patient 1 erfolgte der Nachweis hauptsächlich vor der Behandlung (1.140 pg/ml) und in Woche drei (3.770 pg/ml). Bei Patient 9 und Patient 1 erfolgten die Nachweise gleichzeitig bei einem Anstieg mit MMP-10. In höheren (bis zu 10.350 pg/ml) und dynamischen Konzentrationen konnte MMP-3 in den Wundexsudaten von Patient 5, Patient 6, Patient 7 und Patient 10 ermittelt werden. Interessanterweise zeigten die dynamischen Veränderungen immer in parallelen Ausprägungen zu TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4, was für eine enge Regulierung dieser Proteinase spricht. Eine Untersuchung von Eguchi et al. (2008) konnte MMP-3 neben der Funktion als Peptidase eine bis dahin unbekannte Funktion als transkriptionsähnlicher Faktor als Trans-Regulator für CTGF (*connective tissue growth factor*) im Zellkern nachweisen. CTGF besitzt viele wichtige Funktionen für Prozesse wie Migration, Adhäsion, Proliferation, Angiogenese, Skelett-Entwicklung und Gewebe- und Wundheilung (Holbourn et al. 2008; Jun und Lau 2011). CTGF ist ein Mitglied der Gen-Familie CCN (*Connective tissue growth factor (CTGF), Cystein-rich protein (Cyr61), and Nephroblastoma overexpressed gene (nov)*) und ist in Verbindung mit chronischen, kutanen Wunden noch relativ unerforscht. Es gibt jedoch den Nachweis dafür, dass CTGF sowohl in akuten als auch chronischen Wunden exprimiert wird, jedoch nur in geringerem Maße in den chronischen Wunden (Minhas et al. 2011). Hiermit könnten sich die verbesserte Konditionierung der Wunden von Patient 5 und Patient 6 und der nahezu vollständige Wundverschluss bei Patient 7 erklären lassen. Darüber hinaus eröffnen sich hieraus

möglicherweise neue diagnostische Marker und therapeutische Ansätze unter Einbeziehung von MMP-3 und CTGF, z. B. in Wundflüssigkeiten.

6.8.3. MMP-13

MMP-13 (syn. Kollagenase-3) konnte generell in geringen Konzentrationen unterhalb von 1.000 pg/ml nachgewiesen werden (Tabelle 21 bis Tabelle 30; Anhang). In den Exsudaten von Patient 2, Patient 4 und Patient 9 konnte während der gesamten Behandlung kein Nachweis erfolgen, unabhängig davon, ob ein/e Reepithelisierung/Wundverschluss vorlag (Patient 9) oder nicht (Patient 2 und Patient 4). MMP-13 konnte aber auch in Wunden von Patienten nachgewiesen werden, die eine Zunahme an Granulationsgewebe zeigten (Patient 1, Patient 5) bzw. bei denen ein Reepithelisierung stattfand. Zusammenfassend zeigte sich also ein uneinheitliches Bild, das den Schluss zulässt, dass MMP-13 nicht maßgeblich an der Wundheilung beteiligt ist. Diese Annahme lässt sich stützen durch die Ergebnisse von Hartenstein et al. (2006), die bei der Untersuchung der Wundheilung bei *MMP13* defizienten Knockout-Mäusen keine Beeinträchtigung verschiedener Parameter der Wundheilung wie Reepithelisierung, inflammatorischer Immunantwort, Bildung von Granulationsgewebe, Angiogenese und der Wiederherstellung der Basalmembran feststellen konnten. Sie stellten jedoch auch fest, dass bei der Wundheilung in den MMP-13 defizienten Mäusen eine erhöhte Expression von MMP-8, einer anderen kollagenolytischen MMP vorliegt und vermuteten, dass diese die Funktion von MMP-13 weitestgehend übernehmen könne. Impola et al. (2005) konnten in ihren Untersuchungen von chronische Wunden (n = 31) keine Expression von MMP-13 in den Keratinozyten aber in 21 von 31 Bindegewebsproben feststellen, was eine weitere Erklärung für die eigenen Ergebnisse liefert. Vaalamo et al. (1997) stellten darüber hinaus fest, dass MMP-13 auch nicht in akuten Wunden und in der Epidermis chronischer Wunden exprimiert wird, jedoch in hohem Maße von tiefer sitzenden Fibroblasten am Wundgrund. Hiermit ließen sich die hohen und die höchsten gemessenen Konzentrationen (1.450 pg/ml) in Exsudaten aus den relativ tiefen Wunden von Patient 6 erklären (Fototafel 12; Abschnitt 5.8.6).

6.8.4. MMP-8

MMP-8 (syn. Kollagenase-2) wurde in Exsudaten aller Patienten nachgewiesen, und zwar in allen Proben bis auf eine (Patient 6 Woche vier). MMP-8 wird hauptsächlich von neutrophilen Granulozyten sekretiert und spielt eine wichtige Rolle in der kutanen Wundheilung (Gutierrez-Fernandez et al. 2007; Hartenstein et al. 2006; Martins et al. 2013). In *MMP8* defizienten Knockout-Mäusen kommt es im Zusammenhang mit der Wundheilung,

vermutlich über eine Veränderung des TGF- β Signalwegs, zu einer verzögerten Infiltration neutrophiler Granulozyten in den Wundbereichen und damit zu einer verlängerten Inflammations-Phase (Gutierrez-Fernandez et al. 2007). Tester et al. (2007) belegen *in vivo* die Notwendigkeit von MMP-8 für die Infiltration neutrophiler Granulozyten in einen mit Lipopolysacchariden (LPS) Gram-negativer angeimpften Bereich. Die Patientenwunden, die eine Reepithelisierung aufwiesen (Patient 7 und Patient 9), zeigten im Verlauf der Behandlung substantiell unterschiedlichen Gesamtlevel von MMP-8. Bei Patient 7 lagen die Konzentrationen bei bis zu 51.690 pg/ml (Tabelle 27), bei Patient 9 nur bei bis 4.690 pg/ml. Ein Zusammenhang im Verlauf des Nachweises von MMP-8 während der Behandlung der beiden Patienten konnte dabei nicht nachvollzogen werden. Die Wunden der beiden Patienten zeigten zwar beide eine Besiedlung mit dem Gram-positiven Bakterium *S. aureus*, es kann aber kein Zusammenhang mit der Intensität der bakteriellen Besiedlung (Tabelle 8 und Tabelle 10) und dem Nachweis von MMP-8 gezogen werden, so dass angenommen werden kann, dass die Level im Verlauf einer sekundären Wundheilung natürlichen Schwankungen unterliegen. Bei den Exsudaten von Patient 1 und Patient 8 zeigen sich Parallelen zwischen der Abnahme der Intensität der bakteriellen Besiedlung (hauptsächlich Gram-negative; Tabelle 3 und Tabelle 10) und einer Erhöhung der MMP-8 Konzentrationen in den Wundexsudaten, so dass sich dies in Übereinstimmung mit Tester et al. (2007) mit einer erhöhten Infiltration neutrophiler Granulozyten erklären lässt.

Die auffällige Grünfärbung der Wunden von Patient 2, Patient 3 und Patient 5 und der Nachweis der Besiedlung durch *P. aeruginosa* (Tabelle 4, Tabelle 5 und Tabelle 6) liefern den Nachweis über das Vorhandensein des Virulenzfaktors Pyocyanin. Durch die Produktion von Pyocyanin ist *P. aeruginosa* in der Lage, der angeborenen Immunabwehr durch Granulozyten durch Auslösung der Apoptose dieser zu entgehen (Allen et al. 2005). Hierbei wird der durch Pyocyanin eingeleitete Zelltod durch die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und die saure Sphingomyelinase in den Mitochondrien eingeleitet (Manago et al. 2015). Hiermit lassen sich die geringen Level von MMP-8 (ca. 4.000 pg/ml, ungewichtet) in den Exsudaten von Patient 2 bei durchgängiger Besiedlung und Grünfärbung der Wunde erklären. Patient 3 zeigte hierbei variable Level an MMP-3, was für eine mögliche Veränderung im Infiltrations-Verhalten durch neutrophile Granulozyten sprechen könnte, was mit einer Zunahme von Granulationsgewebe in der nur zweiwöchigen Behandlung (Abbruch wegen schlechter „compliance“) korrespondieren kann. Ebenso lassen sich hiermit die variablen MMP-8 in den Wundexsudaten von Patient 5 erklären, dessen sehr großflächige Wunde auch, vor allem im Bereich des Wundrands, gut auf die Behandlung mit Madenextrakt ansprach.

Hieraus leitet sich möglicherweise eine Erklärung für die beobachteten positiven Effekte ab. Die Änderungen in den MMP-8 Konzentrationen in den Exsudaten könnten einen Hinweis auf eine erneute/erhöhte Einwanderung neutrophiler Granulozyten sprechen und damit den Wechsel aus der Inflammations- in die Granulations-Phase anzeigen. Aufgrund der verschiedenen Methoden zur Gewinnung der Exsudate in den verschiedenen Studien kommen die unterschiedlichen Autoren zu unterschiedlichen Werten für die absoluten Konzentrationen, die für MMP-8 ermittelt wurden, so dass eine Beurteilung „hoher“ bzw. „niedriger“ Werte nur durch den direkten Vergleich mit nicht chronischen Wunden oder mit einer identischen Methode gewonnen Exsudate eine Aussagekraft besitzen.

6.8.5. MMP-1

Bei den Untersuchungen von MMP-1 (syn. Kollagenase-1) und MMP-8 in Exsudaten von heilenden und nicht heilenden Ulcera in einer Studie von Amato et al. (2013) konnte beobachtet werden, dass MMP-8 in einem deutlich größeren Verhältnis zu MMP-1 (mehr als das Zehnfache) in nicht heilenden Ulcera und in einem weniger stark ausgeprägten überschüssigen Verhältnis (etwa fünffach) in heilenden Ulcera auftritt, während sowohl MMP-1 als auch MMP-8 in nicht heilenden Ulcera überexprimiert zu sein scheinen. Dieses Verhältnis der gegenüber MMP-1 vermehrt auffindbaren Konzentrationen von MMP-8 konnte in den meisten Wundexsudaten nicht nachvollzogen werden, sondern spiegelte sich als eher gegenteilig wider. Lediglich die Exsudate von Patient 3 und Patient 8 zeigten einen mehr als zehnfachen Überschuss von MMP-8 über MMP-1 bei allen Probennahmen (Patient 3) oder zu einigen Zeitpunkten der Behandlung (Patient 8) (Tabelle 23 und Tabelle 28; beide im Anhang). Im Gegensatz zur Studie von Amato et al. (2013) konnten Nwomeh et al. (1998) bei der Untersuchung standardisierter akuter Wunden bei freiwilligen Patienten einen 100- bis 200-fachen Überschuss an MMP-8 gegenüber MMP-1 zeigen. Bei den beiden Patientenwunden, die eine Reepithelisierung zeigten, wechselten sich diese Überschüsse zwischen MMP-1 und MMP-8 ab und zeigten als Gemeinsamkeit mehr als das Zehnfache an MMP-8 bei Patient 7 bzw. das Fehlen von MMP-1 in Exsudaten von Patient 9 (Tabelle 27 und Tabelle 29; beide im Anhang). Interessanterweise wurde MMP-1 aus den Exsudaten der Wunden von Patient 9, dessen Wunde eine nahezu vollständige Reepithelisierung im Behandlungszeitraum zeigte, in den höchsten Konzentrationen vor Behandlungsbeginn ermittelt. Hierbei konnten über den ganzen Behandlungszeitraum sinkende Konzentrationen gemessen werden (Tabelle 29; Anhang), mit einem kurzen erneuten Anstieg der Konzentration in Woche sechs. MMP-1 begünstigt unter anderem die Migration von Keratinozyten auf fibrillärem Kollagen und wird unter anderem auch von Keratinozyten an der Migrationsfront gebildet (Pilcher et al. 1997; Saarialho-Kere et al.

1993), was eine Verringerung des Nachweis von MMP-1 bei Verkleinerung des Wundareals erklärt. In der ebenfalls nahezu vollständig verschlossenen Wunde von Patient 7 zeigten sich vor Beginn der Behandlung Konzentrationen an MMP-1 von bis zu 453.740 pg/ml (unabhängig von der Gesamtproteinkonzentration), was in etwa der zwanzigfachen Menge der ermittelten Konzentration in Proben von Patient 9 entspricht. Für die Proben zeigten sich zwar tendenziell sinkende Konzentrationen an MMP-1 bis zu einem drastisch verringerten Wert von 10.970 pg/ml in Woche drei der Behandlung, aber auch ein erneuter Anstieg der Konzentrationen auf bis zu 327.580 pg/ml, was sich mit den *in vitro* Untersuchungen von Reed et al. (2001) erklären lässt, die eine erhöhte Neigung zur MMP-1 und TIMP-1 Produktion unabhängig von ihrem Migrationsverhalten für Fibroblasten einiger älterer Patienten zeigen konnte, wofür auch die hohen TIMP-1 Konzentrationen sprechen, die bei Patient 7 mit 55.280 pg/ml (unabhängig von der Gesamtproteinkonzentration) auf dem höchsten Wert aller behandelten Patienten lag. Die veränderlichen MMP-1 Konzentrationen in den Exsudaten von Patient 1, Patient 5, Patient 6 und Patient 10 sprechen aber möglicherweise für eine veränderte Expression von MMP-1 von Fibroblasten am Wundgrund und könnte auf einen möglichen Wechsel in eine akute Phase der Wundheilung hindeuten. In diesem Zusammenhang haben Nwomeh et al. (1998) dynamische Veränderungen bei akuten Wunden beschrieben.

6.8.6. MMP-9

Es gibt Hinweise darauf, dass ein direkter Zusammenhang zwischen dem Grad der Besiedlung einer Wunde (kolonieformende Einheiten) und der Heilungs-Wahrscheinlichkeit besteht (Xu et al. 2007). Liu et al. (2009) vermuten, dass sogar ein direkter Zusammenhang zwischen Bakterienanzahl, der Erhöhung der MMP-9 (syn. Gelatinase B)-Konzentrationen und einer schlechten Prognose für die Wundheilung besteht. In *MMP9* defizienten Knockout-Mäusen konnte ihr dabei eine wichtige Rolle in der frühen Immunabwehr gegen *Streptococcus pneumoniae*-Infektionen zugeordnet werden (Hong et al. 2011). Zudem scheint MMP-9 den Wundverschluss durch Kontrolle der Zellteilung durch Einflussnahme auf den Signalgeber SMAD2 (*Mothers against decapentaplegic homolog 2*) zu behindern und eine verlängerte Inflammation zu begünstigen (Mohan et al. 2002).

Moor et al. (2009) zeigen siebenfach mal mehr MMP-9 im Wundexsudat als in Wundbiopsien, und Wysocki et al. (1993) stellten fünf bis zehnfach höhere MMP-9 Level in Wundexsudaten aus chronischen im Vergleich zu Wundexsudaten aus akuten Wunden fest und leiten aus der dem vermehrten Auftreten der aktivierten Form ab, dass es zu einer Ansammlung dieser komme und damit die Wundheilung verhindert werde. Diese Annahme konnte von Rayment et al. (2008) belegt und ein direkter Zusammenhang zwischen einer

positiven Wundheilungs-Prognose und weniger stark ausgeprägten MMP-9 Level festgestellt werden.

Die Exsudate von vier Patienten zeigten zu Beginn der Behandlung MMP-9 Konzentrationen bei oder über 100.000 pg/ml (unabhängig von der Gesamt-Proteinkonzentration). Den höchsten Wert zeigte hierbei Patient 1 mit 275.010 pg/ml. Bei vier Patienten lagen die Konzentrationen zwischen ca. 20.000 pg/ml bis 30.000 pg/ml und bei zwei Patienten bei etwas oberhalb von 80.000 pg/ml. In den Exsudaten von drei der zehn behandelten Patientenwunden konnten im Verlauf der Behandlung mit Madenextrakt deutlich sinkende Konzentrationen der MMP-9 gemessen werden. Hierbei korrelierten die sinkenden MMP-Level mit einer verbesserten Konditionierung des Wundgrunds (Patient 1 und Patient 10) oder sogar einer Reepithelisierung/Wundverschluss (Patient 9). Die MMP-9 Konzentrationen in Exsudaten von Patient 2 zeigten sich als im Verlauf der Behandlung und sich etwas verschlechternder Wundsituation als leicht steigend. Diese Ergebnisse lassen sich gut mit den Vermutungen von Rayment et al. (2008) der direkten Korrelation zwischen verbesserter Wundheilung und sinkender MMP-9 Konzentrationen vereinen. Bei vier Patienten blieben die MMP-9 Konzentrationen während der Behandlung auf etwa denselben Leveln von etwa 100.000 pg/ml (Patient 5, Patient 6 und Patient 7) und bei dem nur zwei Wochen behandelten Patienten 4 bei etwa 22.000 pg/ml. Die Wunden der Patienten 5 und 6 zeigten hierbei eine Verbesserung der Wundheilung (Fototafel 9, Fototafel 10, Fototafel 11 und Fototafel 12) und die Wunden von Patient 7 zeigte sich als nahezu vollständig verschlossen (Fototafel 13). Die MMP-9 Konzentration im Exsudat von Patient 9 zeigte sich erst bei der letzten Probenahme und fast vollständigem Verschluss der Wunde reduziert (19.700 pg/ml), so dass hier keine Übereinstimmung mit der Vermutung von Rayment et al. (2008) festgestellt werden kann. Beim Vergleich der bakteriellen Besiedlung der Wunden mit den MMP-9 Konzentrationen lässt sich auch kein direkter Zusammenhang feststellen. Auch bei vollständigem Fehlen des Nachweis von Bakterien (Patient 7 in Behandlungswoche 2; Tabelle 8) konnte MMP-9 in unveränderter Konzentration nachgewiesen werden. Bei der von der Proteinkonzentration unabhängigen Darstellung der Daten würden sich zwar dynamische Veränderungen der MMP-9 Konzentration zeigen, jedoch lassen sich die Daten nicht, wie von Xu et al. (2007) und Liu et al. (2009) bei der Untersuchung von diabetischen Wunde festgestellt, in einen schlüssigen Zusammenhang bringen. Dass ein solcher Zusammenhang bestehen könnte, soll nicht ausgeschlossen werden, jedoch stellt sich dieser in dem komplizierten Milieu chronischer Wunden möglicherweise als wesentlich komplexer dar. Einen Hinweis auf weiterführende Eigenschaften geben Gutierrez-Fernandez et al. (2007), die feststellten, dass MMP-9 und MMP-8 *in vivo* einen Komplex mit einem apparenten Molekulargewicht von etwa 150 kDa bilden. Die Funktion so geformter Komplexe ist jedoch unklar. Der

Nachweis über die Bildung dieser Komplexe konnte in der vorliegenden Arbeit nicht erbracht werden, jedoch fanden sich stets parallel ansteigende und sinkende Konzentrationen von MMP-8 und -9 in den Exsudaten der Patienten 2, 3, 4, 9 und 10 und das unabhängig von der Gesamt-Proteinkonzentration (Tabelle 22, Tabelle 23, Tabelle 24, Tabelle 29 und Tabelle 30; Anhang). In Studien anderer Autoren (Muller et al. 2008) konnten ebenfalls Gemeinsamkeiten bei der Ermittlung von MMP-8 und -9 Konzentrationen beobachtet werden. Das Fehlen des parallelen Verlaufs von MMP-9 zu MMP-8 spricht möglicherweise für eine zusätzliche Sekretion von MMP-9 durch im Wundrand lokalisierte Keratinozyten. In diesem Zusammenhang zeigten Mirastschijski et al. (2002), dass nicht unbedingt die exzessive Gelatinase-Aktivität von MMP-9 (und auch MMP-2) für die Persistenz der Wunden verantwortlich zu machen ist, sondern die räumliche Verteilung dieser. So ist bei Wund-Biopsien festgestellt worden, dass MMP-9 bei nicht heilenden Wunden gehäuft am Wundgrund, assoziiert mit neutrophilen Granulozyten und Makrophagen, aber nicht, wie im Gegensatz zu akut heilenden Wunden, am Wundrand auftritt (Mirastschijski et al. 2002). Neutrophile Granulozyten sekretieren MMP-9, benötigen sie aber nicht zur Infiltration des Wundbereichs (Felkel et al. 2001), sondern es wird hierdurch die Angiogenese entweder durch Aktivierung von z.B. TNF- α (*tumor necrosis factor- α*) und VEGF (*vascular endothelial growth factor*) oder durch proteolytische Erzeugung antiangiogenetischer Peptide aus anderen Proteinen, wie z. B. Endostatin aus Kollagen Typ XVIII, reguliert (Heljasvaara et al. 2005; Kato et al. 2001; Martins et al. 2013). Grundsätzlich sind auch Wechselwirkungen bakterieller Proteinasen mit verschiedenen MMP bekannt. Die Elastase von *P. aeruginosa* besitzt die Fähigkeit, Kollagen Typ I abzubauen und die MMP-1, -2, -3, und -9 in die aktive Form zu überführen und damit den Abbau von Kollagen zu verstärken (Nagano et al. 2001). Zu einem ähnlichen Schluss kamen auch Hao et al. (1999). Zusätzlich ist bekannt, dass die Bindung von Plasminogen an die Bindung von Rezeptoren auf der Bakterienmembran einiger Spezies erfolgt, unter anderem bei *S. aureus* (Kuusela und Saksela 1990) und Streptokokken der Gruppen A, B, C und G (Kuusela et al. 1992; Leigh und Lincoln 1997) und diese dadurch in der Lage sind, die MMP-1 abhängige Degradation der EZM zu aktivieren.

6.8.7. MMP-2

Aus Untersuchungen von Frossing et al. (2010) in *MMP2* defizienten Knockout-Mäusen geht hervor, dass MMP-2 keinen direkten und tragenden Einfluss auf die Heilung akuter Wunden zu haben scheint. Bei der Untersuchung der Wundexsudate der mit Madenextrakt behandelten Patienten zeigte sich MMP-2 in den Wundexsudaten der Patienten 2, 4, 9 als abwesend und in den Exsudaten von Patient 10 mit ca. 60 pg/ml als fast vollständig

abwesend und trat somit in Wunden, die Reepithelisierung zeigten (Patient 7), und in Wunden, die keinen Wundverschluss zeigten, auf. Dies lässt sich mit den Ergebnissen von Frossing et al. (2010) in Übereinstimmung bringen. Für Patient 7, bei dem eine Reepithelisierung beobachtet werden konnte, wurden ausgehend von 1.860 pg/ml im Verlauf der Behandlung sinkende Konzentrationen gemessen, ebenso wie bei Patient 5, der eine zunehmende Reepithelisierung vom Wundrand ausgehend zeigte (1.140 pg/ml zu Beginn der Behandlung). In den Exsudaten von Patient 3 zeigten sich dagegen ansteigende Konzentrationen an MMP-2 auf bis zu 1.130 pg/ml. Für Patient 8 konnten nach zwei Wochen der Behandlung ein Anstieg der MMP-2 Konzentrationen auf bis 2.540 pg/ml und wie bei Patient 1 und Patient 6 im Anschluss daran dynamische Veränderungen der MMP-2 Konzentrationen ermittelt werden. Unter physiologischen Bedingungen kommt MMP-2 eine Funktion in der Erhöhung der Migration in der Gewebe-Remodellierung zu (Giannelli et al. 1997), was die vorliegenden, uneinheitlichen Beobachtungen möglicherweise erklären könnte. MMP-2 ist nicht in Zellen der neuen Epithelfront akuter und chronischer Wunden lokalisiert, sondern findet sich vielmehr bei Fibroblasten und darunterliegenden Endothelzellen, während eine vermehrte Expression und Aktivierung in akuten Wunden vorzuliegen scheint (Mirastschijski et al. 2002). Wall et al. (2003) gelang der Nachweis einer unter anderem erhöhten MMP-2 Produktion durch Fibroblasten, die durch Biopsien aus Ulcera im Rahmen des diabetischen Fuß-Syndroms vorlagen und im Vergleich zu nicht diabetischen Ulcera gewonnen wurden. Im Zusammenhang mit den bekannten diabetischen Grunderkrankungen von Patient 2 und Patient 7 ist durch die Ergebnisse von Wall et al. (2003) das Auftreten von MMP-2 in den Wundexsudaten möglicherweise zu erklären. Nicht auszuschließen ist hierbei auch, dass undiagnostizierte Diabeteserkrankungen bei anderen Patienten vorlagen. Eine Eignung von MMP-2 als diagnostischer oder prognostischer Marker für die Wundheilung alleine scheint sich auf Grundlage der eigenen Ergebnisse und der Ergebnisse von Frossing et al. (2010) nicht anzubieten.

6.8.8. TIMP-1, -2 und -4

Die Untersuchung der MMP Inhibitoren TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 in den Wundexsudaten der behandelten Patienten zeigte bei vier Patienten (Patient 1, 5, 7 und 10) ein konsistentes Muster in generell sinkenden Konzentrationen aller drei Inhibitoren im Behandlungsverlauf. Bei zwei Patienten (Patient 8 und Patient 10) konnte ein Anstieg der Konzentrationen aller drei Inhibitoren in den ersten beiden Behandlungswochen beobachtet werden, bevor auch hier ein Absinken der Konzentrationen in den Exsudaten beobachtet wurde. Bei zwei weiteren Patienten (Patient 2 und Patient 6) zeigten sich dynamisch veränderliche

Konzentrationen dieser Inhibitoren. Fibroblasten aus den Wundbetten chronischer Wunden zeigen im Vergleich zu wundfernen Fibroblasten derselben Spender eine verringerte MMP-1 und MMP-2 Aktivität, die durch eine verstärkte Produktion der Inhibitoren TIMP-1 und TIMP-2 in diesen Zellen zu erklären ist und damit vermutlich zu einer fehlerhaften Reorganisation der EZM führt (Cook et al. 2000). Der Nachweis der sinkenden TIMP-1 und TIMP-2 Konzentrationen in den Wundexsudaten im Zusammenhang mit einer verbesserten Granulation bzw. Konditionierung des Wundgrunds steht daher vermutlich in direktem Zusammenhang mit einer verbesserten Reorganisation der EZM. TIMP-1 lag in den untersuchten Exsudaten in etwa zwei- bis zwanzigfach höheren Konzentrationen als TIMP-2 vor. TIMP-4 konnte teilweise in bis zu 200-fach niedrigeren Konzentrationen als TIMP-1 beobachtet werden, trat in äußerst geringen Konzentrationen auf oder fehlte in den Exsudaten völlig. Auf Grundlage der eigenen Ergebnisse und aufgrund des Mangels an Berichten über TIMP-4 im Zusammenhang mit der akuten kutanen Wundheilung (Martins et al. 2013; Vaalamo et al. 1999) im allgemeinen und der Analyse von Wundexsudaten im speziellen ist anzunehmen, dass TIMP-4 hierbei vermutlich eine untergeordnete Rolle zukommt.

Es konnte eine Vielzahl von Zusammenhängen zwischen dynamischen Veränderungen bzw. einem Absinken der TIMP-Konzentrationen und denen der verschiedenen MMP beobachtet werden. Hier zeigten vor allem die Kollagenase MMP-1 und die Stromelysine MMP-3 und -10 bei den meisten Patienten einen deutlichen Zusammenhang mit der Änderung der TIMP-Konzentrationen. Weniger deutlich zeigte sich dieser Zusammenhang in Verbindung mit MMP-13, die teilweise vollständig fehlte oder in nur sehr geringen Konzentrationen vorlag. Als Ausnahme zeigte sich ein Zusammenhang in parallel sinkenden MMP-9 und TIMP-Konzentrationen (Patient 1) im Behandlungsverlauf. Die MMP-9 Konzentration lag vor Beginn auf dem höchsten gemessenen Wert (275.010 pg/ml) und sank dann auf Werte unterhalb von etwa 90.000 pg/ml ab. Diese Zusammenhänge erklären sich dadurch, dass zwar alle vier Mitglieder der TIMP-Familie in der Lage sind, alle MMP zu inhibieren (Brew et al. 2000), jedoch Unterschiede in der Bindungsaffinität bestehen. TIMP-1 und -2 besitzen beispielweise eine zehnmal höhere Bindungsaffinität zu MMP-3 als zu MMP-10 (Batra et al. 2012).

Li et al. (2013) konnten bei ihren Untersuchungen von Exsudaten, die aus Wunden des diabetischen Fußsyndroms gewonnen wurden, nach vier Wochen relativ konstante TIMP-1 und TIMP-2 Konzentrationen bei deutlich reduzierten MMP-9 Konzentrationen bei Patienten feststellen, die eine gute Heilungstendenz zeigten, jedoch weniger stark sinkende MMP-9 Konzentrationen und stark ansteigende TIMP-1 Konzentrationen feststellen. Hieraus kalkulierte Li et al. (2013) einen Faktor der prognostische Aussagekraft über das

Heilungsverhalten der Wunden besitzt. Einen ähnlichen Faktor kalkulierten Muller et al. (2008) bei demselben Wundtypus und stellten hierbei auch Parallelen zwischen sinkenden MMP-1 und TIMP-1 Konzentrationen bei besserer Heilungstendenz der Wunde fest. Eine Anwendung dieser Faktoren auf die vorliegenden Ergebnisse lässt sich nicht plausibel durchführen, was vermutlich mit der speziellen Ätiologie der von Muller et al. (2008) und Li et al. (2013) untersuchten Wunden im Rahmen des diabetischen Fußsyndroms begründet ist. Bei der Kultur von Fibroblasten zeigt sich zudem eine Erhöhung der TIMP-2 Expression in hohen Passagen, während beispielsweise die MMP-2 Expression nahezu gleich bleibt (Zeng und Millis 1994). *In vitro* gealterte Fibroblasten zeigen zudem eine erhöhte Produktion des Plasminogen-Aktivators, womit zudem eine altersabhängige Störung der Instandhaltung der EZM erklärt ist (West et al. 1996) und auch eine Verstärkung der bakteriell induzierten Aktivierung der MMP-1 abhängigen Degradation der EZM.

Die vorliegenden Ergebnisse deuten unter Berücksichtigung von TIMP-1, TIMP-2 und TIMP-4 eher darauf hin, dass nicht unbedingt die MMP-Level als solche und auch nicht deren Verhältnisse als solche untereinander sondern vielmehr sinkende Konzentrationen der verschiedenen TIMP im Behandlungsverlauf einen prognostischen Charakter besitzen.

6.1. Klinischer Verlauf der behandelten Patientenwunden

Die Ulcera von Patient 1 zeigten ein gutes Ansprechen auf den Heilversuch mit Madenextrakt, so dass die Wundbereiche zwar keine Reepithelisierung zeigten, aber eine massive Zunahme an Granulationsgewebe und eine deutlich sichtbare Klärung des Wundbelags (Fototafel 4), bei dem die Wunden mit Spalthauttransplantaten erfolgreich verschlossen werden konnten. Die Patientin litt unter einer der Autoimmunerkrankung Polyarteriitis nodosa, von der bekannt ist, dass die kutanen Ulcera flächenmäßig große Ausmaße annehmen können und auch der erfolgreiche Einsatz von lebenden Maden nachgewiesen ist (Rozin et al. 2011). Hierbei handelt es sich um ein atypisches Ulcus, der Dermatologen vor eine spezielle Herausforderung stellt (Hoffman 2013) und für den sich keine Hinweise auf eine bisherige Untersuchung der MMP in den Wundexsudaten finden lassen.

Patient 2 zeigte bereits vor Beginn der Behandlung mit Madenextrakt eine fortschreitende Vergrößerung der Wundfläche und eine Besiedlung mit *P. aeruginosa* mit einem auffälligen Resistenzprofil, die sich im Verlauf der Behandlung zu einer Infektion entwickelte, was vermutlich gleichzeitig eine Erklärung für die Verschlechterung des Wundstatus liefert. In diesem Zusammenhang spielt der Virulenzfaktor Pyocyanin des *P. aeruginosa*-Isolats, der die Apoptose neutrophiler Granulozyten auslösen kann und damit dem angeborenen

Immunsystem entgehen kann, vermutlich eine entscheidende Rolle (Allen et al. 2005; Manago et al. 2015). Die Untersuchung der Wundexsudate zeigte im Vergleich zu anderen Patienten deutlich geringere MMP-8 und MMP-9 Konzentrationen, was auf eine mangelnde Infiltration durch neutrophile Granulozyten schließen lässt und diese Vermutung untermauert. Der vorliegende Bluthochdruck und die chronische Urtikaria, die mit einer Veränderung der Immunantwort durch verschiedene Zellen des Immunsystems einhergeht (Kay et al. 2014; Toubi et al. 2000), waren vermutlich die Ursache der Ulcera. Hierbei handelt es sich um das erste Kenntnis nach um die erste Beschreibung von MMP und TIMP-Konzentrationen aus Exsudaten einer kutanen Läsion, die mit einer chronischen Urtikaria assoziiert werden kann. Untersuchung der freien MMP-9 und TIMP-1 Konzentrationen im Plasma lassen darauf schließen, dass eine Erhöhung dieser Konzentrationen mit der Ernsthaftigkeit der Krankheit einhergeht (Kessel et al. 2005; Tedeschi et al. 2010), während andere Autoren eine Eignung von MMP-9 als diagnostischen Marker ausschließen (Altrichter et al. 2009).

Der dritte Patient, bei dem ein Therapieversuch mit Madenextrakt unternommen wurde, zeigte eine Vielzahl von Grunderkrankungen und zudem auch Schmerzmittel-Unverträglichkeiten aufgrund derer und bereits vor Behandlungsbeginn bestehender starker Schmerzen im Bereich des Ulcus und während der Verbandswechsel der Therapieversuch aufgrund mangelnder „compliance“ abgebrochen werden musste. Dennoch ließ sich in dem kurzen Behandlungszeitraum ein Abflachen des Wundgrunds und darunterliegendes Granulationsgewebe erkennen. Es zeigte sich parallel dazu bereits vor Behandlungsbeginn eine Kolonisation des Ulcus mit einem *P. aeruginosa*-Isolat, das über umfassende Antibiotikaresistenzen verfügte und zudem auch zur Bildung von Pyocyanin in der Lage war. Die ermittelten MMP-8 und MMP-9 Konzentrationen lassen jedoch auf eine wundgerechte Infiltration durch neutrophile Granulozyten schließen (Felkel et al. 2001; Tester et al. 2007), so dass die Bildung von Granulationsgewebe nicht beeinflusst war.

Der Therapieversuch des vierten Patienten wurde aufgrund schlechten Ansprechens auf den Madenextrakt, das vermutlich mit den multiplen Typ IV Sensibilisierungen im Zusammenhang gebracht werden kann, abgebrochen. In der Behandlung von Ulcera crurum sind eine ganze Reihe von, wenn auch teilweise vereinzelt auftretenden, Sensibilisierungen gegen verschiedene Materialien in der Wundbehandlung bekannt. Hierzu gehören Hydrogele (Carvalho et al. 2011), antibiotikahaltige Salben (Moreno Escobosa et al. 2009), Antiseptika (Calow et al. 2009), Hydrokolloidverbände (Koo et al. 2008) und iodhaltige Salben (Oiso et al. 2006), um nur einige Beispiele zu nennen. Generell entwickeln etwa 63 bis 80 % der Ulcus-Patienten eine einfache Sensibilisierung und etwa 51 bis 57 % im Verlaufe der teilweise mehrjährigen Behandlung multiple Sensibilisierungen (Carlsen et al. 2008; Machet et al. 2004; Saap et al. 2004; Tavadia et al. 2003; Zmudzinska

et al. 2006). In Hinblick auf das Patientenwohl erschien eine weitere Behandlung mit Madenextrakt nicht angemessen.

Das Ulcus von Patient fünf, für dessen Entstehen mehrere relevante Ursachen in einer pAVK, Bluthochdruck und das postthrombotische Syndrom zugrunde liegen, zeigte ein definitives Ansprechen auf den Therapieversuch mit Madenextrakt. In der Beobachtung der bakteriellen Besiedlung konnte das initial vorhandene pyocyaninbildende *P. aeruginosa*-Isolat gleichzeitig mit Verschwinden der Grünfärbung nicht mehr bei der Abstrichnahme nachgewiesen werden. Die Begründung hierbei liegt höchst wahrscheinlich im Einfluss des Madenextrakts auf die bakteriellen Biofilme. Mit vom Wundrand her zunehmender Bildung von Gewebsinseln zeigte sich auch eine Veränderung der Fibrinbeläge. Neben den putativen Ursachen für das Ulcus fällt noch die vorliegende Polycythaemia vera ins Gewicht. Für diese und andere myeloproliferative Erkrankungen zeigen jüngste Studien (Maral et al. 2015) Übereinstimmungen in einem Polymorphismus (Gln279Arg) für das für MMP-9 codierende Gen und bei über 95 % der Erkrankten eine Mutation im JAK2 (Janus Kinase 2), durch die eine unregulierte Kinase-Aktivität ausgelöst wird und die thromboembolische Komplikationen zur Folge hat (Nangalia et al. 2013). Mögliche Schlussfolgerungen aus dem Vorliegen dieses Polymorphismus, des für MMP-9 codierenden Gens, wären auf Grundlage dessen, dass relativ konstante Konzentrationen dieser MMP in den Exsudaten ermittelt werden konnten, dass diese Mutation für die Wundheilung nur untergeordnete Bedeutung besitzt oder aber, dass MMP-9 möglicherweise eine untergeordnete Bedeutung (zumindest als Marker) für die Wundheilung besitzt. Das Vorliegen des Polymorphismus kann jedoch auch nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Bei den Patienten 6, 8 und 10 zeigte der Therapieversuch mit Madenextrakt vor allem eine Verbesserung in der Konditionierung des Wundgrunds, was durch die Reduktion der Fibrinbeläge und der Bildung von Granulationsgewebe und einer Säuberung der wundumgebenen Bereiche gekennzeichnet war. Alle drei Patienten zeigten innerhalb des Behandlungszeitraums eine veränderliche Bakterien-Flora, bei der häufig der Nachweis der initial besiedelnden Bakterienspezies schon nach zwei Wochen nicht mehr erfolgen konnte, so dass die Begründung in der verbesserten Wundsituation in der nachweislichen Wirkung auf die bakteriellen Biofilme zu finden ist.

Die Ulcera von Patient 7 und 9 zeigten während der bis zu achtwöchigen Behandlung einen nahezu vollständigen Verschluss. Die Ulcera beider Patienten zeigten dabei eine intensive Kolonisation durch *S. aureus*, die sensibel für alle getesteten Antibiotika waren (bis auf Fusidinsäure beim Isolat von Patient 9), für die zumindest bei Patient 7 innerhalb der ersten beiden Behandlungswochen kein Nachweis mehr erbracht werden konnte und durch

Effekte der Extrakte auf die Bildung von Biofilmen erklärt werden kann. Hierbei zeigten bei Patient 9 gleichzeitig bestehende Ulcera, die nicht mit Madenextrakt, sondern konventionell mit absorbierenden Wundauflagen behandelt wurden, keine Tendenz zur Reepithelisierung. Möglicherweise sind hierfür die für den Madenextrakt durch Bournelis (2012) beschriebene Integrin- β_1 vermittelte und verbesserte Adhäsion durch Keratinozyten und die leicht positiven Effekte auf die Vitalität von primären Fibroblasten verantwortlich.

6.2. Zusammenfassende Betrachtung

Die in dieser Arbeit hergestellten Extrakte aus Larven von *Lucilia sericata* unterscheiden sich maßgeblich vom Verfahren des biochirurgischen Débridement mit lebenden Larven dieser Art. Dumville et al. (2009) waren in der Lage, in einer klinischen Studie mit 267 Ulcus-Patienten zu zeigen, dass bei der Anwendung von freilaufenden Maden und auch Maden in sog. Biobags kein Unterschied bezüglich der Zeit zur Heilung der schmierig belegten oder nekrotischen Ulcera verglichen zur Behandlung mit Hydrogelen besteht. In derselben Arbeit von Dumville et al. (2009) konnte belegt werden, dass auch kein positiver Effekt durch beide Varianten der Anwendung von lebenden Maden auf die Reduktion der bakteriellen Last in den Wunden, wohl aber ein signifikant positiver Effekt auf die Geschwindigkeit des Débridement aber auch ein negativer Effekt auf das Schmerzempfinden der Patienten während der Behandlung, im Vergleich zur Behandlung mit Hydrogelen besteht. Welche Komponenten diese Effekte erklären, bleibt jedoch bis heute unklar.

Livingston (1935) erhitzte beispielweise Maden der Art *L. sericata* und konnte aus seinen Experimenten schließen, dass es sich bei den „wirksamen“ Komponenten um hitzestabile Bestandteile handeln müsse. Das Erhitzen schließt aufgrund der biochemischen Eigenschaften von Proteinen gleichzeitig ein enzymatisches Débridement als Hauptwirkungsprinzip nahezu aus. Prete (1997) konnte die positiven Effekt auf Fibroblasten ebenfalls als hitzelabil zeigen und auch van der Plas et al. (2007) konnten die Reduktion pro-inflammatorischer Antworten durch Neutrophile als hitzelabil einstufen. Bohova et al. (2014) zeigten, dass hitzelabile Faktoren in den Exkreten/Sekreten vorliegen, die die Bildung bakterieller Biofilme beeinflussen, während van der Plas et al. (2008) sowohl hitzelabile als auch hitzestabile Faktoren hierfür verantwortlichen machen, so dass angenommen werden kann, dass eine enzymatische Beteiligung hierbei ausgeschlossen werden kann. Dennoch bleibt anzunehmen, dass ein gegen bakterielle Biofilme gerichteter Effekt einer der Wirkmechanismen der Madentherapie ist. Eine Wirkung, die die Bildung von bakteriellen Biofilmen verhindert, besitzen z.B. einige D-Aminosäuren wie D-Leucin, D-Methionin, D-Tyrosin und D-Tryptophan, die unter anderem von *Bacillus subtilis* produziert werden und in der Lage sind, Biofilme von *P. aeruginosa* und *S. aureus* aufzulösen

(Kolodkin-Gal et al. 2010), wenn sie in einem bestimmten Mischungsverhältnis auftreten. Es ist zudem beschrieben, dass sich durch solche Aminosäuren auch synergistische Effekte für einige Antibiotika gegen *P. aeruginosa* und *S. aureus* ergeben (Sanchez et al. 2014).

Unabhängig davon konnte in einem systematischen Vergleich konventioneller Therapieformen und der Madentherapie festgestellt werden, dass die Madentherapie die Heilung von Wunden, insbesondere dem diabetischen Fuß-Syndrom, aber auch von anderen Ulcera signifikant beschleunigt und die Wahrscheinlichkeit auf ein Abheilen erhöht (Sun et al. 2014). Viele Studien untersuchen relativ kleine Ulcera, wie z.B. Amato et al. (2013) mit maximal 19,1 cm², die verglichen mit Wunden von Patient 1 oder Patient 5, die beinahe den ganzen Unterschenkel umspannten, relativ klein sind. Eine Verbesserung der Wundheilung, gerade bei großflächigen und lang bestehenden Ulcera, ist nicht immer leicht optisch zu bestimmen. Gerade die Dauer des Bestehens der Ulcera macht eine Besiedlung durch Bakterien wie *P. aeruginosa* wahrscheinlicher (Gjodsbol et al. 2006), was ein Fortschreiten der Heilung ebenfalls nachteilig beeinflussen kann. Eine Verbesserung der Wundheilung ist in ersten Schritten nicht unbedingt an einer Verkleinerung der Ulcus-Fläche zu bemessen. Andere Faktoren, wie die Bildung von Granulationsgewebe am Wundgrund und damit einer Verringerung der Wundtiefe, aber auch der Status der im Wundexsudat vorhandenen Proteinase und Wachstumsfaktoren spiegeln hierbei eine Veränderung des Wundstatus wider. Eine visuelle Beurteilung des Wundstatus im Hinblick auf die mikrobielle Belastung bzw. einer lokalen Infektion ist unerlässlich, kann aber eine Abstrichnahme nicht ersetzen. Miller et al. (2011) konnten beispielsweise keinen Zusammenhang zwischen der visuellen Beurteilung und der mittels Abstrich ermittelten mikrobiellen Belastung feststellen. Vor allem die Besiedlung von biofilmbildenden Spezies, die teilweise über sehr ausgeprägte Antibiotikaresistenzen verfügen (wie in dieser Arbeit gezeigt), vermögen aber vermutlich auch durch verschiedene Virulenzfaktoren die Wundheilung nachteilig zu beeinflussen.

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass im Vergleich zu den anderen untersuchten MMP, hohe Level an MMP-9 und auch MMP-8 für die Wundheilung notwendig zu sein scheinen. Eine bessere Zugänglichkeit durch das Immunsystem zu wundbesiedelnden Bakterien, herbeigeführt durch die Verminderung der Biofilmbildung führt eventuell wieder zu einer natürlichen Regulierung der verschiedenen MMP durch unter anderem die natürlichen Inhibitoren (TIMP) dieser, was auch in dieser Arbeit beobachtet werden konnte. Hierdurch würde sich eine Verringerung der von Trengove et al. (1999) beschriebenen Degradation von Wachstumsfaktoren im Wundexsudat einstellen und eine Rückführung zu einer natürlichen Wundheilung erklären lassen.

Gemessen an der Tatsache, dass lebend applizierte Maden die Exkrete/Sekrete kontinuierlich in die Wunde und damit auch auf die dort vorhandenen Bakterien abgeben, scheint dies vordergründig den positiven Effekt der Madentherapie teilweise zu erklären. Zudem gibt es Hinweise darauf, dass die lebenden Maden durchaus in der Lage zu sein scheinen, auf ihre bakterielle Umgebung *in vitro* mit der Expression bestimmter antibakterieller Peptide zu reagieren (Altincicek und Vilcinskas 2009). Ob diese Peptide in ausreichender Menge von den Maden in die Wunde abgegeben werden, um eine bakterielle Kolonisation tatsächlich zu beseitigen oder diese tatsächlich nur das Überleben des Individuums sichern, sei dahingestellt. Das Fehlen antibakterieller Effekte durch die in dieser Arbeit erzeugten Ganzkörperextrakte, aber auch lebender Maden und deren Exkrete/Sekrete (Cazander et al. 2009; Jaklic et al. 2008) geben Grund zu Annahme, dass direkte antibakterielle Effekte durch einen wie in Abschnitt 4.5 erzeugten Extrakt oder die Exkrete/Sekrete tatsächlich nicht vorliegen. Eine topische Anwendung von Antibiotika birgt zudem die Gefahr, wie am Beispiel von MRSA und Fusidinsäure gezeigt, der Bildung chimärer Resistenzkassetten (Ellington et al. 2015). Für das bereits charakterisierte Lucifensin liegen z.B. die MHK für MRSA bereits bei bis zu 128 mg/L. Die Wirksamkeit von topisch eingesetzten Antiseptika kann zudem von biofilmbildenden Spezies (wie z.B. *S. aureus* und *P. aeruginosa*) erheblich eingeschränkt sein (Hajska et al. 2014). Einige Bakterienarten bzw. -stämme wirken sich aber auch negativ auf die Lebensfähigkeit der Larven aus. Dies konnte für einige Stämme von *Serratia marcescens* und *Serratia liquefaciens* beobachtet werden (O'Callaghan et al. 1996). Andersen et al. (2010a) konnten in diesem Zusammenhang zeigen, dass Komponenten des „quorum sensing“ von *P. aeruginosa* toxische Effekte auf die Larven ausüben und schlugen die Besiedlung mit *P. aeruginosa* als Kontraindikation für die Anwendung der Therapie mit lebenden Maden vor. In der vorliegenden Arbeit konnte *P. aeruginosa* am häufigsten aus Wunden isoliert werden. Auch andere Studien (Jockenhofer et al. 2014; Renner et al. 2012) zeigen *P. aeruginosa* nach *S. aureus* als häufigste wundbesiedelnde Spezies. Auf Grundlage der Ergebnisse der Behandlung und der Bestimmung der bakteriellen Spezies vor und nach der Behandlung von 30 Ulcus-Patienten mit lebenden Maden, kommen Jaklic et al. (2008) zu dem Schluss, dass sich die MDT sehr gut für die Behandlung von Wunden eignet, die mit Gram-positiven Bakterien (z.B. *S. aureus*) und weniger gut für Wunden eignet, die mit Gram-negativen Bakterien (z.B. *P. mirabilis* und *P. aeruginosa*) besiedelt sind. Renner et al. (2008) stellten fernerhin bei der Behandlung von Patienten, die unter Pyoderma gangraenosum litten fest, dass die Larven bei der Behandlung abstarben und führten dies auf die Kombination systemischer Gabe von Antibiotika und Immunsuppressiva zurück, woraus sich möglicherweise in Kombination mit bestimmten Zytokinen im Wund-Milieu (TNF- α = *tumor necrosis factor- α*) das Absterben der Larven ableiten lässt und schlagen

Pyoderma gangraenosum als Kontraindikation vor. Weitere nachteilige Effekte auf das Überleben der Maden scheinen von den in der Behandlung chronischer Wunden eingesetzten Hydrogelen auszugehen. Hierzu zeigten Thomas und Andrews (1999), dass sich fünf von sechs getesteten Hydrogelen (sogar auch nur als Behandlungsrückstand) negativ auf das Überleben der Larven auswirken.

Ein haltbarer Extrakt, der keine lebenden Larven beinhaltet, erweitert dadurch das Anwendungsspektrum enorm, da keine Rücksicht mehr auf das Überleben der Larven genommen werden muss. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen aber auch, dass die Anwendung eines Ganzkörperextrakts nicht die Ermittlung der bakteriellen Besiedlung im Wundbereich ersetzen kann und dass diese möglicherweise eine wichtige aber unterschätzte Rolle spielt. Aufgrund der aktuellen Lage in der Entwicklung und Verteilung von Antibiotikaresistenzen in Bakterien im Allgemeinen und im Hinblick auf nosokomiale Infektionen im Speziellen sollte dieser Überwachung ein besonderer Stellenwert zugeordnet werden.

7. Zusammenfassung

Lebende Larven der Goldfliege *Lucilia sericata* werden seit einigen Jahrzehnten wieder erfolgreich zur Behandlung chronischer, kutaner Wunden als sog. „Biochirurgisches Débridement“ eingesetzt. Die Bereitstellung von Larven in einer geeigneten Qualität erfordert einen hohen logistischen Aufwand und ist im Vergleich zu anderen Methoden des Wundmanagements relativ kostspielig. Darüber hinaus führt die Tatsache, dass sich lebende Maden in meist ohnehin sehr schmerzhaften Wundbereichen bewegen, häufig zu ihrer Ablehnung durch den Patienten aufgrund von Ekelempfinden. Des Weiteren gibt es Kontraindikationen zur Madentherapie, wie z.B. bei Besiedlung mit *P. aeruginosa* oder der Nähe von Wunden zu großen Blutgefäßen. Eine Fragestellung der vorliegenden Arbeit war es daher zu prüfen, ob es möglich ist, einen haltbaren, sterilen Ganzkörperextrakt aus den Larven von *L. sericata* herzustellen, um diese Einschränkungen der Madentherapie zu umgehen und diese Therapieform für eine größere Anzahl von Patienten verfügbar zu machen. Hierzu wurden Methoden zur Herstellung eines erhitzten, sterilen, durch Gefriertrocknung haltbar gemachten und γ -bestrahlten Ganzkörperextrakts entwickelt, der dann im Rahmen von bis zu achtwöchigen individuellen Heilversuchen an zehn freiwilligen Patienten getestet werden konnte. Hierbei wurde die bakterielle Besiedlung der behandelten Wunden im zweiwöchigen Abstand ermittelt. Durch eine eigens hierfür entwickelte Methode wurden wöchentlich Proben der Wundflüssigkeit genommen und auf das Vorhandensein der Matrixmetalloproteinasen (MMP) -1, -2, -3, -8, -9, -10, -13 sowie deren Inhibitoren TIMP (*tissue inhibitors of metalloproteinases*)-1, -2 und -4 untersucht, um hieraus mögliche neue diagnostische Marker zu identifizieren und neue Einblicke in das Geschehen der kutanen Wundheilung zu erhalten.

Acht von zehn Patientenwunden waren mit *P. aeruginosa* besiedelt. Diese Befunde wurden zahlenmäßig gefolgt von Besiedelungen mit *S. aureus* (alle oxacillinsensitiv) und *P. mirabilis*. Vor allem die *P. aeruginosa*-Isolate zeigten ausgeprägte intrinsische Antibiotikaresistenzen. Ein Isolat erwies sich als multiresistent gegen drei von vier Antibiotika-Klassen (3MRGN) außer Carbapenemen. Es konnte kein antibakterieller Effekt *in vitro* gezeigt werden, der vom Madenextrakt gegen diese Isolate ausging. Es wurde jedoch gezeigt, dass der Madenextrakt eine erhebliche, inhibierende Wirkung auf die Bildung von Biofilmen durch diese bakteriellen Isolate besitzt. Die ärztliche Behandlung von zwei Patienten wurde aufgrund schlechter „compliance“ bzw. aufgrund multipler Typ IV Sensibilisierung und einer daraus vermuteten Unverträglichkeit abgebrochen. Bei einem weiteren Patienten zeigte die Behandlung keine Wirkung. Bei allen anderen Patienten ließen sich deutliche Verbesserungen des Wundgrunds und/oder die Bildung von

Granulationsgewebe beobachten. Die Wunden von zwei Patienten zeigten eine nahezu vollständige Reepithelisierung. Bei der Analyse der Wundflüssigkeiten zeigten sich häufig dynamische Veränderungen der verschiedenen MMP im wöchentlichen Vergleich, aber eine generelle Eignung als Marker einer Variante dieser MMP konnte nicht festgestellt werden. Die hierfür häufig herangezogene Konzentration von MMP-9 zeigte sich gerade bei den reepithelisierten Wunden über den gesamten Behandlungszeitraum nahezu konstant.

Es zeigten sich außerdem häufig dynamische Veränderungen der Konzentrationen der verschiedenen TIMP im wöchentlichen Vergleich. Mit zunehmender Epithelisierung zeigten sich durchschnittlich sinkende Konzentrationen dieser TIMP als konsistent und bieten sich daher als Marker für weitere Untersuchungen an. Es wird angenommen, dass die positiven Effekte der Madenextrakte auf deren Wirkung gegen bakterielle Biofilme zurückzuführen sind, wobei die darin enthaltenen Bakterien leichter für das Immunsystem des Patienten zugänglich gemacht werden, was offenbar zu einer Beruhigung des Gleichgewichts zwischen MMP und TIMP führt. Bei der Untersuchung der Wirkung der Madenextrakte auf primäre humane Fibroblasten zeigten sich unter stark serumreduzierten Bedingungen zudem leichte positive Effekte auf die Vitalität, die jedoch stets unterhalb eines zytokininduzierten Stimulus lagen. Es wird angenommen, dass sich dies als unterstützender Effekt auf die kutane Wundheilung auswirkt.

8. Abstract

Since several decades the larvae of the green bottle fly *Lucilia sericata* are once again utilized in the so called “biosurgical débridement” of chronic cutaneous wounds. However, it takes an enormous logistic effort to make these maggots available in a proper quality at the time of use. This makes it very expensive in comparison to other therapeutic strategies of wound management. Furthermore the sensation of free crawling living maggots on the already painful wound area leads not seldom to denial due to the feeling of disgust. In addition there are some contraindications for maggot therapy such as colonization with bacteria like *P. aeruginosa* or the proximity to large blood vessels. One aspect of this study was to investigate, if it is possible to develop a stable, sterile extract of these larvae and thereby circumvent the limitations of the maggot therapy and making it accessible to a higher number of patients. A method was developed to create heated, sterile whole body extracts that were made stable by lyophilization and γ -radiation. These extracts were applied to ulcers of ten volunteering patients for periods of up to eight weeks. Ulcers were screened for bacterial colonization every other week and samples of wound exudates were taken on a weekly basis. Exudates were screened for concentrations of matrix metalloproteinases (MMP) -1, -2, -3, -8, -9, -10 and -13 as well as for tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP) -1, -2 and -4 in order to identify possible diagnostic or prognostic markers of cutaneous wound healing.

Eight out of ten ulcers were colonized by *P. aeruginosa* followed in number by colonization with *S. aureus* (all sensitive for oxacillin) and *P. mirabilis*. Most notably *P. aeruginosa* showed phenotypes of intrinsic antibiotic resistances. One isolate was even resistant to three of four groups of antibiotics (3MRGN) except carbapenems. No evidence was obtained for an antibiotic mode of action of the extracts against any of the isolates. However considerable inhibitory effects of the extracts on the formation of biofilms by these isolates could be observed. Therapy of two patients was terminated by the treating physician due to bad compliance or multiple type IV sensitization that may have led to incompatibility. The experimental therapy of one patient did not show any effect. The treatment of all other patients led to better conditioning of the wound bed and/or to the formation of granulating tissue. Wounds of two patients showed complete re-epithelization after eight weeks of treatment. The analysis of wound exudates frequently showed dynamic changes in the concentrations of the different MMP in a weekly manner. However, a general suitability of any of these MMP as a marker could not be observed. Especially the often used concentrations of MMP-9 showed in the re-epithelized wounds nearly constant concentrations during treatment. Concentrations of TIMP mostly showed dynamic changes

during the treatment but decreased with increasing re-epithelization suggesting its general suitability as a marker. It is assumed, that the beneficial effects of the here studied extracts are based on the reduction of the ability for formation of biofilms by the wound colonizing bacteria thus making them more vulnerable to the host immune defense consequently leading to a recovery of the balance between MMP and TIMP. Investigations of effects of the here developed extract on primary human fibroblasts showed some effects on fibroblast vitality. However, grade of effects always ranged below a cytokine induced stimulus. Thus it is assumed that this effect may as well support the cutaneous wound healing.

9. Literaturverzeichnis

- Al Ghazal P, Korber A, Klode J, Schmid EN, Buer J, Dissemond J (2014) Evaluation of the Essen Rotary as a new technique for bacterial swabs: results of a prospective controlled clinical investigation in 50 patients with chronic leg ulcers. *Int Wound J* 11(1):44-49
- Allen L, Dockrell DH, Pattery T, Lee DG, Cornelis P, Hellewell PG, Whyte MK (2005) Pyocyanin production by *Pseudomonas aeruginosa* induces neutrophil apoptosis and impairs neutrophil-mediated host defenses in vivo. *J Immunol* 174(6):3643-3649
- Almuzara M, Limansky A, Ballerini V, Galanternik L, Famiglietti A, Vay C (2010) In vitro susceptibility of *Achromobacter* spp. isolates: comparison of disk diffusion, Etest and agar dilution methods. *Int J Antimicrob Agents* 35(1):68-71
- Altincicek B, Vilcinskas A (2009) Septic injury-inducible genes in medicinal maggots of the green blow fly *Lucilia sericata*. *Insect Mol Biol* 18(1):119-125
- Altrichter S, Boodstein N, Maurer M (2009) Matrix metalloproteinase-9: a novel biomarker for monitoring disease activity in patients with chronic urticaria patients? *Allergy* 64(4):652-656
- Amato B, Coretti G, Compagna R, Amato M, Buffone G, Gigliotti D, Grande R, Serra R, de Franciscis S (2013) Role of matrix metalloproteinases in non-healing venous ulcers. *Int Wound J* [Epub ahead of print]
- Andersen AS, Joergensen B, Bjarnsholt T, Johansen H, Karlsmark T, Givskov M, Krogfelt KA (2010a) Quorum-sensing-regulated virulence factors in *Pseudomonas aeruginosa* are toxic to *Lucilia sericata* maggots. *Microbiology* 156(Pt 2):400-407
- Andersen AS, Sandvang D, Schnorr KM, Kruse T, Neve S, Joergensen B, Karlsmark T, Krogfelt KA (2010b) A novel approach to the antimicrobial activity of maggot debridement therapy. *J Antimicrob Chemother* 65(8):1646-1654
- Arora S, Baptista C, Lim CS (2011) Maggot metabolites and their combinatory effects with antibiotic on *Staphylococcus aureus*. *Ann Clin Microbiol Antimicrob* 10:6
- Ashcroft GS, Horan MA, Herrick SE, Tarnuzzer RW, Schultz GS, Ferguson MW (1997) Age-related differences in the temporal and spatial regulation of matrix

- metalloproteinases (MMPs) in normal skin and acute cutaneous wounds of healthy humans. *Cell Tissue Res* 290(3):581-591
- Athanasopoulos AN, Economopoulou M, Orlova VV, Sobke A, Schneider D, Weber H, Augustin HG, Eming SA, Schubert U, Linn T, Nawroth PP, Hussain M, Hammes HP, Herrmann M, Preissner KT, Chavakis T (2006) The extracellular adherence protein (Eap) of *Staphylococcus aureus* inhibits wound healing by interfering with host defense and repair mechanisms. *Blood* 107(7):2720-2727
- Baer WS (1931) The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larva of the blowfly). *J Bone Jt Surg* 13:438-475
- Baker AH, Edwards DR, Murphy G (2002) Metalloproteinase inhibitors: biological actions and therapeutic opportunities. *J Cell Sci* 115(Pt 19):3719-3727
- Baker EA, Leaper DJ (2000) Proteinases, their inhibitors, and cytokine profiles in acute wound fluid. *Wound Repair Regen* 8(5):392-398
- Barnes KM, Dixon RA, Gennard DE (2010) The antibacterial potency of the medicinal maggot, *Lucilia sericata* (Meigen): variation in laboratory evaluation. *J Microbiol Methods* 82(3):234-237
- Batra J, Robinson J, Soares AS, Fields AP, Radisky DC, Radisky ES (2012) Matrix metalloproteinase-10 (MMP-10) interaction with tissue inhibitors of metalloproteinases TIMP-1 and TIMP-2: binding studies and crystal structure. *J Biol Chem* 287(19):15935-15946
- Becker K, Podbielski A, Sunderkötter C, Berner R, Eckmann C, von Eiff C, Hartinger A, Kempf VAJ, Kühn J, Vogel U (2013) MiQ 6b: Infektionen der Haut und der subkutanen Weichgewebe - Teil II Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ) Qualitätsstandards in der mikrobiologischen-infektiologischen Diagnostik Im Auftrag der Deutschen Gesellschaft für Hygiene und Mikrobiologie (DGHM), Expertengremium Mikrobiologisch-infektiologische Qualitätsstandards (MiQ). 2nd edn. Urban & Fischer, München
- Bexfield A, Bond AE, Morgan C, Wagstaff J, Newton RP, Ratcliffe NA, Dudley E, Nigam Y (2010) Amino acid derivatives from *Lucilia sericata* excretions/secretions may contribute to the beneficial effects of maggot therapy via increased angiogenesis. *Br J Dermatol* 162(3):554-562

- Bexfield A, Nigam Y, Thomas S, Ratcliffe NA (2004) Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes Infect* 6(14):1297-1304
- Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jensen PO, Madsen KG, Phipps R, Krogfelt K, Hoiby N, Givskov M (2008) Why chronic wounds will not heal: a novel hypothesis. *Wound Repair Regen* 16(1):2-10
- Blotnick S, Peoples GE, Freeman MR, Eberlein TJ, Klagsbrun M (1994) T lymphocytes synthesize and export heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor and basic fibroblast growth factor, mitogens for vascular cells and fibroblasts: differential production and release by CD4+ and CD8+ T cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91(8):2890-2894
- Bohova J, Majtan J, Majtan V, Takac P (2014) Selective Antibiofilm Effects of *Lucilia sericata* Larvae Secretions/Excretions against Wound Pathogens. *Evid Based Complement Alternat Med* 2014:857360
- Bournelis E (2012) Menschliche Hautmodelle als Testverfahren zur Entwicklung von Medikationen zur Wundheilung durch Extrakte von *Lucilia sericata*. Dissertation, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Brahmakshatriya V, Lupiani B, Brinlee JL, Cepeda M, Pillai SD, Reddy SM (2009) Preliminary study for evaluation of avian influenza virus inactivation in contaminated poultry products using electron beam irradiation. *Avian Pathol* 38(3):245-250
- Braun-Falco O, Plewig G, Wolff HW, Burgdorf WHC, Landthaler M (2005) *Dermatologie und Venerologie*. 5th edn. Springer, Heidelberg, pp 3-6
- Brew K, Dinakarpandian D, Nagase H (2000) Tissue inhibitors of metalloproteinases: evolution, structure and function. *Biochim Biophys Acta* 1477(1-2):267-283
- Broomfield RJ, Morgan SD, Khan A, Stickler DJ (2009) Crystalline bacterial biofilm formation on urinary catheters by urease-producing urinary tract pathogens: a simple method of control. *J Med Microbiol* 58(Pt 10):1367-1375
- Bullard KM, Lund L, Mudgett JS, Mellin TN, Hunt TK, Murphy B, Ronan J, Werb Z, Banda MJ (1999) Impaired wound contraction in stromelysin-1-deficient mice. *Ann Surg* 230(2):260-265

- Calow T, Oberle K, Bruckner-Tuderman L, Jakob T, Schumann H (2009) Contact dermatitis due to use of Octenisept in wound care. *J Dtsch Dermatol Ges* 7(9):759-765
- Carlsen BC, Andersen KE, Menne T, Johansen JD (2008) Patients with multiple contact allergies: a review. *Contact Dermat* 58(1):1-8
- Carvalho R, Maio P, Amaro C, Santos R, Cardoso J (2011) Hydrogel allergic contact dermatitis and imidazolidinyl urea/diazolidinyl urea. *Cutan Ocul Toxicol* 30(4):331-332
- Cazander G, van Veen KE, Bernards AT, Jukema GN (2009) Do maggots have an influence on bacterial growth? A study on the susceptibility of strains of six different bacterial species to maggots of *Lucilia sericata* and their excretions/secretions. *J Tissue Viability* 18(3):80-87
- Cerovsky V, Slaninova J, Fucik V, Monincova L, Bednarova L, Malon P, Stokrova J (2011) Lucifensin, a novel insect defensin of medicinal maggots: synthesis and structural study. *Chembiochem* 12(9):1352-1361
- Chen CM, Huang M, Chen HF, Ke SC, Li CR, Wang JH, Wu LT (2011) Fusidic acid resistance among clinical isolates of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* in a Taiwanese hospital. *BMC Microbiol* 11:98
- Chen P, Parks WC (2009) Role of matrix metalloproteinases in epithelial migration. *J Cell Biochem* 108(6):1233-1243
- Clavero MR, Monk JD, Beuchat LR, Doyle MP, Brackett RE (1994) Inactivation of *Escherichia coli* O157:H7, salmonellae, and *Campylobacter jejuni* in raw ground beef by gamma irradiation. *Appl Environ Microbiol* 60(6):2069-2075
- CLSI (2014) Performance standards for antimicrobial susceptibility testing: 24th informational supplement M100-S24. Clinical and Laboratory Standards Institute 34(1):Wayne, PA
- Cook H, Davies KJ, Harding KG, Thomas DW (2000) Defective extracellular matrix reorganization by chronic wound fibroblasts is associated with alterations in TIMP-1, TIMP-2, and MMP-2 activity. *J Invest Dermatol* 115(2):225-233
- Coughter JP, Johnston JL, Archer GL (1987) Characterization of a staphylococcal trimethoprim resistance gene and its product. *Antimicrob Agents Chemother* 31(7):1027-1032

- Cullmann W, Seibert G (1986) Properties of an inducible beta-lactamase from *Proteus vulgaris*. Zentralbl Bakteriell Mikrobiol Hyg A 262(2):208-219
- Daeschlein G, Mumcuoglu KY, Assadian O, Hoffmeister B, Kramer A (2007) In vitro antibacterial activity of *Lucilia sericata* maggot secretions. Skin Pharmacol Physiol 20(2):112-115
- Davidson JR (2015) Current concepts in wound management and wound healing products. Vet Clin North Am Small Anim Pract 45(3):537-564
- Dean CR, Visalli MA, Projan SJ, Sum PE, Bradford PA (2003) Efflux-mediated resistance to tigecycline (GAR-936) in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. Antimicrob Agents Chemother 47(3):972-978
- Deberghes P, Betbeder AM, Boisard F, Blanc R, Delaby JF, Krivobok S, Steiman R, Seigle-Murandi F, Creppy E (1995) Detoxification of ochratoxin A, a food contaminant: Prevention of growth of *Aspergillus ochraceus* and its production of ochratoxin A. Mycotoxin Res 11(1):37-47
- Dissemond J (2006) [When is a wound chronic?]. Hautarzt 57(1):55
- Dissemond J (2014) [Chronic wounds and bacteria. Clinical relevance, detection and therapy]. Hautarzt 65(1):10-14
- Dissemond J, Schmid EN, Esser S, Witthoff M, Goos M (2004) [Bacterial colonization of chronic wounds. Studies on outpatients in a university dermatology clinic with special consideration of ORSA]. Hautarzt 55(3):280-288
- Doerler M, Reich-Schupke S, Altmeyer P, Stucker M (2012) Impact on wound healing and efficacy of various leg ulcer debridement techniques. J Dtsch Dermatol Ges 10(9):624-632
- Draber P, Sulimenko V, Sulimenko T, Draberova E (2014) Stabilization of protein by freeze-drying in the presence of trehalose: a case study of tubulin. Methods Mol Biol 1129:443-458
- Drinkovic D, Fuller ER, Shore KP, Holland DJ, Ellis-Pegler R (2001) Clindamycin treatment of *Staphylococcus aureus* expressing inducible clindamycin resistance. J Antimicrob Chemother 48(2):315-316

- Dumville JC, Worthy G, Bland JM, Cullum N, Dowson C, Iglesias C, Mitchell JL, Nelson EA, Soares MO, Torgerson DJ (2009) Larval therapy for leg ulcers (VenUS II): randomised controlled trial. *Bmj* 338(mar19 2):b773-b773
- Edwards R, Harding KG (2004) Bacteria and wound healing. *Curr Opin Infect Dis* 17(2):91-96
- Eguchi T, Kubota S, Kawata K, Mukudai Y, Uehara J, Ohgawara T, Ibaragi S, Sasaki A, Kuboki T, Takigawa M (2008) Novel transcription-factor-like function of human matrix metalloproteinase 3 regulating the CTGF/CCN2 gene. *Mol Cell Biol* 28(7):2391-2413
- Ellington MJ, Reuter S, Harris SR, Holden MT, Cartwright EJ, Greaves D, Gerver SM, Hope R, Brown NM, Torok ME, Parkhill J, Koser CU, Peacock SJ (2015) Emergent and evolving antimicrobial resistance cassettes in community-associated fusidic acid and meticillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Int J Antimicrob Agents* 45(5):477-484
- Eming SA, Krieg T, Davidson JM (2007) Inflammation in wound repair: molecular and cellular mechanisms. *J Invest Dermatol* 127(3):514-525
- Falanga V (2005) Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet* 366(9498):1736-1743
- Fazli M, Bjarnsholt T, Kirketerp-Moller K, Jorgensen A, Andersen CB, Givskov M, Tolker-Nielsen T (2011) Quantitative analysis of the cellular inflammatory response against biofilm bacteria in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 19(3):387-391
- Felkel C, Scholl U, Mader M, Schwartz P, Felgenhauer K, Hardeland R, Beuche W, Weber F (2001) Migration of human granulocytes through reconstituted basement membrane is not dependent on matrix metalloproteinase-9 (MMP-9). *J Neuroimmunol* 116(1):49-55
- Fernandez ML, Broadbent JA, Shooter GK, Malda J, Upton Z (2008) Development of an enhanced proteomic method to detect prognostic and diagnostic markers of healing in chronic wound fluid. *Br J Dermatol* 158(2):281-290
- Frank DN, Wysocki A, Specht-Glick DD, Rooney A, Feldman RA, St Amand AL, Pace NR, Trent JD (2009) Microbial diversity in chronic open wounds. *Wound Repair Regen* 17(2):163-172

- Frossing S, Rono B, Hald A, Romer J, Lund LR (2010) Skin wound healing in MMP2-deficient and MMP2 / plasminogen double-deficient mice. *Exp Dermatol* 19(8):e234-240
- Fuqua WC, Winans SC, Greenberg EP (1994) Quorum sensing in bacteria: the LuxR-LuxI family of cell density-responsive transcriptional regulators. *J Bacteriol* 176(2):269-275
- Gestmann F (2009) Extrakte aus Fliegenmaden und ihre potentielle Wirkung auf Wunden bzw. das Wachstum von Zellkulturen. Diplomarbeit, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
- Giannelli G, Falk-Marzillier J, Schiraldi O, Stetler-Stevenson WG, Quaranta V (1997) Induction of cell migration by matrix metalloprotease-2 cleavage of laminin-5. *Science* 277(5323):225-228
- Gjodsbol K, Christensen JJ, Karlsmark T, Jorgensen B, Klein BM, Kroghfelt KA (2006) Multiple bacterial species reside in chronic wounds: a longitudinal study. *Int Wound J* 3(3):225-231
- Gjodsbol K, Skindersoe ME, Christensen JJ, Karlsmark T, Jorgensen B, Jensen AM, Klein BM, Sonnedsted MK, Kroghfelt KA (2012) No need for biopsies: comparison of three sample techniques for wound microbiota determination. *Int Wound J* 9(3):295-302
- Glupczynski Y, Hansen W, Freney J, Yourassowsky E (1988) In vitro susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* to 24 antimicrobial agents. *Antimicrob Agents Chemother* 32(2):276-278
- Godin B, Touitou E (2007) Transdermal skin delivery: predictions for humans from in vivo, ex vivo and animal models. *Adv Drug Deliv Rev* 59(11):1152-1161
- Goldstein H (1931) Maggots in the treatment of wound and bone infections. 13(3)
- Gontcharova V, Youn E, Sun Y, Wolcott RD, Dowd SE (2010) A comparison of bacterial composition in diabetic ulcers and contralateral intact skin. *Open Microbiol J* 4:8-19
- Grinnell F (1994) Fibroblasts, myofibroblasts, and wound contraction. *J Cell Biol* 124(4):401-404

- Grinnell F, Zhu M (1996) Fibronectin degradation in chronic wounds depends on the relative levels of elastase, alpha1-proteinase inhibitor, and alpha2-macroglobulin. *J Invest Dermatol* 106(2):335-341
- Gunther F, Wabnitz GH, Stroh P, Prior B, Obst U, Samstag Y, Wagner C, Hansch GM (2009) Host defence against *Staphylococcus aureus* biofilms infection: phagocytosis of biofilms by polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Mol Immunol* 46(8-9):1805-1813
- Gutierrez-Fernandez A, Inada M, Balbin M, Fueyo A, Pitiot AS, Astudillo A, Hirose K, Hirata M, Shapiro SD, Noel A, Werb Z, Krane SM, Lopez-Otin C, Puente XS (2007) Increased inflammation delays wound healing in mice deficient in collagenase-2 (MMP-8). *FASEB J* 21(10):2580-2591
- Hajska M, Slobodnikova L, Hupkova H, Koller J (2014) In vitro efficacy of various topical antimicrobial agents in different time periods from contamination to application against 6 multidrug-resistant bacterial strains isolated from burn patients. *Burns* 40(4):713-718
- Hansch GM, Prior B, Brenner-Weiss G, Obst U, Overhage J (2014) The *Pseudomonas* quinolone signal (PQS) stimulates chemotaxis of polymorphonuclear neutrophils. *J Appl Biomater Funct Mater* 12(1):21-26
- Hao JL, Nagano T, Nakamura M, Kumagai N, Mishima H, Nishida T (1999) Effect of galardin on collagen degradation by *Pseudomonas aeruginosa*. *Exp Eye Res* 69(6):595-601
- Harada K, Niina A, Shimizu T, Mukai Y, Kuwajima K, Miyamoto T, Kataoka Y (2014) Phenotypic and molecular characterization of antimicrobial resistance in *Proteus mirabilis* isolates from dogs. *J Med Microbiol* 63(Pt 11):1561-1567
- Harris LG, Nigam Y, Sawyer J, Mack D, Pritchard DI (2013) *Lucilia sericata* chymotrypsin disrupts protein adhesin-mediated staphylococcal biofilm formation. *Appl Environ Microbiol* 79(4):1393-1395
- Harrison-Balestra C, Cazzaniga AL, Davis SC, Mertz PM (2003) A wound-isolated *Pseudomonas aeruginosa* grows a biofilm in vitro within 10 hours and is visualized by light microscopy. *Dermatol Surg* 29(6):631-635
- Hartenstein B, Dittrich BT, Stickens D, Heyer B, Vu TH, Teurich S, Schorpp-Kistner M, Werb Z, Angel P (2006) Epidermal development and wound healing in matrix metalloproteinase 13-deficient mice. *J Invest Dermatol* 126(2):486-496

- Hartung K-H (1993) Technologie-Transfer: Gefriertrocknung im Lebensmittelbereich. In: Essig D, Oschmann R (eds) Lyophilisation. vol 35, 1st edn. WVG, Stuttgart, pp 151-158
- Heath AC, Tenquist JD (1971) New insecticides: as sheep dips against *Lucilia sericata*. N Z Vet J 19(3):45-46
- Heljasvaara R, Nyberg P, Luostarinen J, Parikka M, Heikkila P, Rehn M, Sorsa T, Salo T, Pihlajaniemi T (2005) Generation of biologically active endostatin fragments from human collagen XVIII by distinct matrix metalloproteases. Exp Cell Res 307(2):292-304
- Henrichfreise B (2006) Antibiotika-Multiresistenz bei *Pseudomonas aeruginosa*. Dissertation, Rheinische Friedrich-Wilhelms-Universität Bonn
- Herber OR, Schnepf W, Rieger MA (2007) A systematic review on the impact of leg ulceration on patients' quality of life. Health and Quality of Life Outcomes 5:44-44
- Hernandez JR, Martinez-Martinez L, Pascual A, Suarez AI, Perea EJ (2000) Trends in the susceptibilities of *Proteus mirabilis* isolates to quinolones. J Antimicrob Chemother 45(3):407-408
- Hobson RP (1931) On an enzyme from blow-fly larvae (*Lucilia sericata*) which digests collagen in alkaline solution. Biochemistry 25:1458-1463
- Hoffman LR, D'Argenio DA, MacCoss MJ, Zhang Z, Jones RA, Miller SI (2005) Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. Nature 436(7054):1171-1175
- Hoffman MD (2013) Atypical ulcers. Dermatol Ther 26(3):222-235
- Holbourn KP, Acharya KR, Perbal B (2008) The CCN family of proteins: structure-function relationships. Trends Biochem Sci 33(10):461-473
- Holmes B, Snell JJ, Lapage SP (1977) Strains of *Achromobacter xylosoxidans* from clinical material. J Clin Pathol 30(7):595-601
- Hong JS, Greenlee KJ, Pitchumani R, Lee SH, Song LZ, Shan M, Chang SH, Park PW, Dong C, Werb Z, Bidani A, Corry DB, Kheradmand F (2011) Dual protective mechanisms of matrix metalloproteinases 2 and 9 in immune defense against *Streptococcus pneumoniae*. J Immunol 186(11):6427-6436

- Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI (2005) Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon the migration of human dermal fibroblasts over a fibronectin-coated surface. *Wound Repair Regen* 13(4):422-433
- Horobin AJ, Shakesheff KM, Pritchard DI (2006) Promotion of human dermal fibroblast migration, matrix remodelling and modification of fibroblast morphology within a novel 3D model by *Lucilia sericata* larval secretions. *J Invest Dermatol* 126(6):1410-1418
- Horobin AJ, Shakesheff KM, Woodrow S, Robinson C, Pritchard DI (2003) Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components. *Br J Dermatol* 148(5):923-933
- Hu Y, Zhu Y, Ma Y, Liu F, Lu N, Yang X, Luan C, Yi Y, Zhu B (2015) Genomic insights into intrinsic and acquired drug resistance mechanisms in *Achromobacter xylosoxidans*. *Antimicrob Agents Chemother* 59(2):1152-1161
- Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Block C, Galun R (2007a) Antibacterial properties of whole body extracts and haemolymph of *Lucilia sericata* maggots. *J Wound Care* 16(3):123-127
- Huberman L, Gollop N, Mumcuoglu KY, Breuer E, Bhusare SR, Shai Y, Galun R (2007b) Antibacterial substances of low molecular weight isolated from the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 21(2):127-131
- Hurkmans JF, Bodde HE, Van Driel LM, Van Doorne H, Junginger HE (1985) Skin irritation caused by transdermal drug delivery systems during long-term (5 days) application. *Br J Dermatol* 112(4):461-467
- Impola U, Jeskanen L, Ravanti L, Syrjanen S, Baldursson B, Kahari VM, Saarialho-Kere U (2005) Expression of matrix metalloproteinase (MMP)-7 and MMP-13 and loss of MMP-19 and p16 are associated with malignant progression in chronic wounds. *Br J Dermatol* 152(4):720-726
- Ince D, Hooper DC (2000) Mechanisms and frequency of resistance to premafloxacin in *Staphylococcus aureus*: novel mutations suggest novel drug-target interactions. *Antimicrob Agents Chemother* 44(12):3344-3350

- Izutsu K, Aoyagi N, Kojima S (2004) Protection of protein secondary structure by saccharides of different molecular weights during freeze-drying. *Chem Pharm Bull (Tokyo)* 52(2):199-203
- Jacobsen JN, Andersen AS, Krogfelt KA (2012) Impact of *Pseudomonas aeruginosa* quorum sensing on cellular wound healing responses in vitro. *Scand J Infect Dis* 44(8):615-619
- Jaklic D, Lapanje A, Zupancic K, Smrke D, Gunde-Cimerman N (2008) Selective antimicrobial activity of maggots against pathogenic bacteria. *J Med Microbiol* 57(Pt 5):617-625
- James GA, Swogger E, Wolcott R, Pulcini E, Secor P, Sestrich J, Costerton JW, Stewart PS (2008) Biofilms in chronic wounds. *Wound Repair Regen* 16(1):37-44
- James TJ, Hughes MA, Cherry GW, Taylor RP (2003) Evidence of oxidative stress in chronic venous ulcers. *Wound Repair Regen* 11(3):172-176
- Jiang KC, Sun XJ, Wang W, Liu L, Cai Y, Chen YC, Luo N, Yu JH, Cai DY, Wang AP (2012) Excretions/secretions from bacteria-pretreated maggot are more effective against *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *PLoS One* 7(11):e49815
- Jiang S, Nail SL (1998) Effect of process conditions on recovery of protein activity after freezing and freeze-drying. *Eur J Pharm Biopharm* 45(3):249-257
- Jockenhofer F, Chapot V, Stoffels-Weindorf M, Korber A, Klode J, Buer J, Kupper B, Roesch A, Dissemond J (2014) Bacterial spectrum colonizing chronic leg ulcers: A 10-year comparison from a German wound care center. *J Dtsch Dermatol Ges* 12(12):1121-1127
- Jones ME, Karlowsky JA, Draghi DC, Thornsberry C, Sahm DF, Nathwani D (2003) Epidemiology and antibiotic susceptibility of bacteria causing skin and soft tissue infections in the USA and Europe: a guide to appropriate antimicrobial therapy. *Int J Antimicrob Agents* 22(4):406-419
- Jun JI, Lau LF (2011) Taking aim at the extracellular matrix: CCN proteins as emerging therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov* 10(12):945-963
- Jung EG (1995) *Dermatologie - Duale Reihe*, 3rd edn. Hippokrates Verlag, Stuttgart

- Kahari VM, Saarialho-Kere U (1999) Matrix metalloproteinases and their inhibitors in tumour growth and invasion. *Ann Med* 31(1):34-45
- Kahl M (2014) Charakterisierung der Aktivität von Proteasen aus dem Maden-Exkretions-Produkt von *Lucilia sericata* in der humanen Blutgerinnung als Teilprozess der Wundheilung. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen
- Kahl M, Gokcen A, Fischer S, Baumer M, Wiesner J, Lochnit G, Wygrecka M, Vilcinskas A, Preissner KT (2015) Maggot excretion products from the blowfly *Lucilia sericata* contain contact phase/intrinsic pathway-like proteases with procoagulant functions. *Thromb Haemost* 114(2):[Epub ahead of print]
- Kahle NA, Brenner-Weiss G, Overhage J, Obst U, Hansch GM (2013) Bacterial quorum sensing molecule induces chemotaxis of human neutrophils via induction of p38 and leukocyte specific protein 1 (LSP1). *Immunobiology* 218(2):145-151
- Kanitakis J (2002) Anatomy, histology and immunohistochemistry of normal human skin. *Eur J Dermatol* 12(4):390-401
- Kato T, Kure T, Chang JH, Gabison EE, Itoh T, Itohara S, Azar DT (2001) Diminished corneal angiogenesis in gelatinase A-deficient mice. *FEBS Lett* 508(2):187-190
- Kay AB, Ying S, Ardelean E, Mlynek A, Kita H, Clark P, Maurer M (2014) Elevations in vascular markers and eosinophils in chronic spontaneous urticarial weals with low-level persistence in uninvolved skin. *Br J Dermatol* 171(3):505-511
- Kerridge A, Lappin-Scott H, Stevens JR (2005) Antibacterial properties of larval secretions of the blowfly, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 19(3):333-337
- Kessel A, Bishara R, Amital A, Bamberger E, Sabo E, Grushko G, Toubi E (2005) Increased plasma levels of matrix metalloproteinase-9 are associated with the severity of chronic urticaria. *Clin Exp Allergy* 35(2):221-225
- Kim HS, Lee SH, Byun Y, Park HD (2015) 6-Gingerol reduces *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation and virulence via quorum sensing inhibition. *Sci Rep* 5:8656
- Kirker KR, James GA, Fleckman P, Olerud JE, Stewart PS (2012) Differential effects of planktonic and biofilm MRSA on human fibroblasts. *Wound Repair Regen* 20(2):253-261

- Kirker KR, Secor PR, James GA, Fleckman P, Olerud JE, Stewart PS (2009) Loss of viability and induction of apoptosis in human keratinocytes exposed to *Staphylococcus aureus* biofilms in vitro. *Wound Repair Regen* 17(5):690-699
- Kohler T, Kok M, Michea-Hamzehpour M, Plesiat P, Gotoh N, Nishino T, Curty LK, Pechere JC (1996) Multidrug efflux in intrinsic resistance to trimethoprim and sulfamethoxazole in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 40(10):2288-2290
- Kolodkin-Gal I, Romero D, Cao S, Clardy J, Kolter R, Losick R (2010) D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science* 328(5978):627-629
- Koo FP, Piletta-Zanin P, Politta-Sanchez S, Milingou M, Saurat JH (2008) Allergic contact dermatitis to carboxymethylcellulose in Comfeel hydrocolloid dressing. *Contact Dermatitis* 58(6):375-376
- Krampert M, Bloch W, Sasaki T, Bugnon P, Rulicke T, Wolf E, Aumailley M, Parks WC, Werner S (2004) Activities of the matrix metalloproteinase stromelysin-2 (MMP-10) in matrix degradation and keratinocyte organization in wounded skin. *Mol Biol Cell* 15(12):5242-5254
- Kruglikova AA (2011) [Antimicrobial factors of hemolymph and excretion of larvae *Lucilia sericata* (meigen) (diptera, calliphoridae)]. *Zh Evol Biokhim Fiziol* 47(6):453-460
- Kujath P, Michelsen A (2008) Wounds - from physiology to wound dressing. *Dtsch Arztebl Int* 105(13):239-248
- Kumar S, Kunwar A, Gautam S, Sharma A (2012) Inactivation of *A. ochraceus* spores and detoxification of ochratoxin A in coffee beans by gamma irradiation. *J Food Sci* 77(2):T44-51
- Kurtagic E, Jedrychowski MP, Nugent MA (2009) Neutrophil elastase cleaves VEGF to generate a VEGF fragment with altered activity. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 296(3):L534-546
- Kuusela P, Saksela O (1990) Binding and activation of plasminogen at the surface of *Staphylococcus aureus*. Increase in affinity after conversion to the Lys form of the ligand. *Eur J Biochem* 193(3):759-765

- Kuusela P, Ullberg M, Saksela O, Kronvall G (1992) Tissue-type plasminogen activator-mediated activation of plasminogen on the surface of group A, C, and G streptococci. *Infect Immun* 60(1):196-201
- Lauer G, Sollberg S, Cole M, Flamme I, Sturzebecher J, Mann K, Krieg T, Eming SA (2000) Expression and proteolysis of vascular endothelial growth factor is increased in chronic wounds. *J Invest Dermatol* 115(1):12-18
- Lauer G, Sollberg S, Cole M, Krieg T, Eming SA (2002) Generation of a novel proteolysis resistant vascular endothelial growth factor165 variant by a site-directed mutation at the plasmin sensitive cleavage site. *FEBS Lett* 531(2):309-313
- Lawrence WT (1992) Clinical management of nonhealing wounds. In: Cohen IK, Diegelmann RF, Lindblad WJ (eds) *Wound healing – biochemical and clinical aspects*. Saunders, Philadelphia, pp 541-561
- Leclercq R (2002) Mechanisms of resistance to macrolides and lincosamides: nature of the resistance elements and their clinical implications. *Clin Infect Dis* 34(4):482-492
- Leclercq R, Canton R, Brown DF, Giske CG, Heisig P, MacGowan AP, Mouton JW, Nordmann P, Rodloff AC, Rossolini GM, Soussy CJ, Steinbakk M, Winstanley TG, Kahlmeter G (2013) EUCAST expert rules in antimicrobial susceptibility testing. *Clin Microbiol Infect* 19(2):141-160
- Leigh JA, Lincoln RA (1997) *Streptococcus uberis* acquires plasmin activity following growth in the presence of bovine plasminogen through the action of its specific plasminogen activator. *FEMS Microbiol Lett* 154(1):123-129
- Levine NS, Lindberg RB, Mason AD, Jr., Pruitt BA, Jr. (1976) The quantitative swab culture and smear: A quick, simple method for determining the number of viable aerobic bacteria on open wounds. *J Trauma* 16(2):89-94
- Li XZ, Zhang L, Poole K (2000) Interplay between the MexA-MexB-OprM multidrug efflux system and the outer membrane barrier in the multiple antibiotic resistance of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 45(4):433-436
- Li Z, Guo S, Yao F, Zhang Y, Li T (2013) Increased ratio of serum matrix metalloproteinase-9 against TIMP-1 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *J Diabetes Complications* 27(4):380-382

- Liu Y, Geng W, Yang Y, Wang C, Zheng Y, Shang Y, Wu D, Li X, Wang L, Yu S, Yao K, Shen X (2012) Susceptibility to and resistance determinants of fusidic acid in *Staphylococcus aureus* isolated from Chinese children with skin and soft tissue infections. *FEMS Immunol Med Microbiol* 64(2):212-218
- Liu Y, Min D, Bolton T, Nube V, Twigg SM, Yue DK, McLennan SV (2009) Increased matrix metalloproteinase-9 predicts poor wound healing in diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 32(1):117-119
- Livermore DM (1995) beta-Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clin Microbiol Rev* 8(4):557-584
- Livermore DM (2002) Multiple mechanisms of antimicrobial resistance in *Pseudomonas aeruginosa*: our worst nightmare? *Clin Infect Dis* 34(5):634-640
- Livingston SK (1935) Maggot extract and process of obtaining it. Us-Patent No: 2,022,890
- Machet L, Couhe C, Perrinaud A, Hoarau C, Lorette G, Vaillant L (2004) A high prevalence of sensitization still persists in leg ulcer patients: a retrospective series of 106 patients tested between 2001 and 2002 and a meta-analysis of 1975-2003 data. *Br J Dermatol* 150(5):929-935
- Majno G (1998) Chronic inflammation: links with angiogenesis and wound healing. *Am J Pathol* 153(4):1035-1039
- Manago A, Becker KA, Carpinteiro A, Wilker B, Soddemann M, Seitz AP, Edwards MJ, Grassme H, Szabo I, Gulbins E (2015) *Pseudomonas aeruginosa* Pyocyanin Induces Neutrophil Death via Mitochondrial Reactive Oxygen Species and Mitochondrial Acid Sphingomyelinase. *Antioxid Redox Signal* 22(13):1097-1110
- Maral S, Acar M, Balcik OS, Uctepe E, Hatipoglu OF, Akdeniz D, Altun HU, Kosar A, Gunduz M, Gunduz E (2015) Matrix Metalloproteinases 2 and 9 Polymorphism in Patients With Myeloproliferative Diseases: A STROBE-Compliant Observational Study. *Medicine (Baltimore)* 94(16):e732
- Marks LR, Mashburn-Warren L, Federle MJ, Hakansson AP (2014) *Streptococcus pyogenes* biofilm growth in vitro and in vivo and its role in colonization, virulence, and genetic exchange. *J Infect Dis* 210(1):25-34
- Martin P (1997) Wound healing--aiming for perfect skin regeneration. *Science* 276(5309):75-81

- Martins VL, Caley M, O'Toole EA (2013) Matrix metalloproteinases and epidermal wound repair. *Cell Tissue Res* 351(2):255-268
- Mason BW, Howard AJ (2004) Fusidic acid resistance in community isolates of methicillin susceptible *Staphylococcus aureus* and the use of topical fusidic acid: a retrospective case-control study. *Int J Antimicrob Agents* 23(3):300-303
- May D, Leone CA (1963) Serological "shelf-life" of serum proteins under various conditions of storage. *Trans Kans Acad Sci* 66:771-777
- McCarty SM, Cochrane CA, Clegg PD, Percival SL (2012) The role of endogenous and exogenous enzymes in chronic wounds: a focus on the implications of aberrant levels of both host and bacterial proteases in wound healing. *Wound Repair Regen* 20(2):125-136
- McFarland J (1907) The nephelometer: an instrument for estimating the number of bacteria in suspensions used for calculating the opsonic index and for vaccines. *JAMA-J AM MED ASSOC* XLIX(14):1176-1178
- Medicine GAfQi (2008) Diabetic foot - prevention and therapy 60. In: Gin (ed) Type-2-diabetes 2006 - National disease management guideline.
- Mehlhorn H, Gestmann F (2011) Extracts from Fly Maggots and Fly Pupae as a "Wound Healer". In: Mehlhorn H (ed) *Nature Helps. Parasitology Research Monographs*, vol 1. Springer Berlin Heidelberg, pp 325-348
- Mehlhorn H, Piekarski G (1998) *Grundriß der Parasitenkunde* 5th edn. Gustav Fischer Verlag, Stuttgart, Jena, Ulm
- Meyer FJ, Burnand KG, Abisi S, Tekoppele JM, van Els B, Smith A (2008) Effect of collagen turnover and matrix metalloproteinase activity on healing of venous leg ulcers. *Br J Surg* 95(3):319-325
- Miller CN, Carville K, Newall N, Kapp S, Lewin G, Karimi L, Santamaria N (2011) Assessing bacterial burden in wounds: comparing clinical observation and wound swabs. *Int Wound J* 8(1):45-55
- Minhas U, Martin TA, Ruge F, Harding KG, Jiang WG (2011) Pattern of expression of CCN family members Cyr61, CTGF and NOV in human acute and chronic wounds. *Exp Ther Med* 2(4):641-645

- Mirani ZA, Jamil N (2011) Effect of sub-lethal doses of vancomycin and oxacillin on biofilm formation by vancomycin intermediate resistant *Staphylococcus aureus*. *J Basic Microbiol* 51(2):191-195
- Mirastschijski U, Impola U, Jahkola T, Karlsmark T, MS AG, Saarialho-Kere U (2002) Ectopic localization of matrix metalloproteinase-9 in chronic cutaneous wounds. *Hum Pathol* 33(3):355-364
- Mohan R, Chintala SK, Jung JC, Villar WV, McCabe F, Russo LA, Lee Y, McCarthy BE, Wollenberg KR, Jester JV, Wang M, Welgus HG, Shipley JM, Senior RM, Fini ME (2002) Matrix metalloproteinase gelatinase B (MMP-9) coordinates and effects epithelial regeneration. *J Biol Chem* 277(3):2065-2072
- Montesano R, Orci L (1988) Transforming growth factor beta stimulates collagen-matrix contraction by fibroblasts: implications for wound healing. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85(13):4894-4897
- Moor AN, Vachon DJ, Gould LJ (2009) Proteolytic activity in wound fluids and tissues derived from chronic venous leg ulcers. *Wound Repair Regen* 17(6):832-839
- Morbach S, Furchert H, Groblinghoff U, Hoffmeier H, Kersten K, Klauke GT, Klemp U, Roden T, Icks A, Haastert B, Rumenapf G, Abbas ZG, Bharara M, Armstrong DG (2012) Long-term prognosis of diabetic foot patients and their limbs: amputation and death over the course of a decade. *Diabetes Care* 35(10):2021-2027
- Moreno Escobosa MC, Moya Quesada MC, Cruz Granados S, Amat Lopez J (2009) Contact dermatitis to antibiotic ointments. *J Investig Allergol Clin Immunol* 19(6):510-511
- Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods* 65(1-2):55-63
- Muller M, Trocme C, Lardy B, Morel F, Halimi S, Benhamou PY (2008) Matrix metalloproteinases and diabetic foot ulcers: the ratio of MMP-1 to TIMP-1 is a predictor of wound healing. *Diabet Med* 25(4):419-426
- Nagano T, Hao JL, Nakamura M, Kumagai N, Abe M, Nakazawa T, Nishida T (2001) Stimulatory effect of pseudomonal elastase on collagen degradation by cultured keratocytes. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 42(6):1247-1253

- Nagase H, Woessner JF, Jr. (1999) Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274(31):21491-21494
- Nakagami G, Morohoshi T, Ikeda T, Ohta Y, Sagara H, Huang L, Nagase T, Sugama J, Sanada H (2011) Contribution of quorum sensing to the virulence of *Pseudomonas aeruginosa* in pressure ulcer infection in rats. *Wound Repair Regen* 19(2):214-222
- Nakhla LS (1972) Resistance of *Staphylococcus aureus* to sulphamethoxazole and trimethoprim. *J Clin Pathol* 25(8):708-712
- Nangalia J, Massie CE, Baxter EJ, Nice FL, Gundem G, Wedge DC, Avezov E, Li J, Kollmann K, Kent DG, Aziz A, Godfrey AL, Hinton J, Martincorena I, Van Loo P, Jones AV, Guglielmelli P, Tarpey P, Harding HP, Fitzpatrick JD, Goudie CT, Ortmann CA, Loughran SJ, Raine K, Jones DR, Butler AP, Teague JW, O'Meara S, McLaren S, Bianchi M, Silber Y, Dimitropoulou D, Bloxham D, Mudie L, Maddison M, Robinson B, Keohane C, Maclean C, Hill K, Orchard K, Tauro S, Du MQ, Greaves M, Bowen D, Huntly BJ, Harrison CN, Cross NC, Ron D, Vannucchi AM, Papaemmanuil E, Campbell PJ, Green AR (2013) Somatic CALR mutations in myeloproliferative neoplasms with nonmutated JAK2. *N Engl J Med* 369(25):2391-2405
- Nord D (2006) [Cost-effectiveness in wound care]. *Zentralbl Chir* 131 Suppl 1:185-188
- Nwomeh BC, Liang HX, Diegelmann RF, Cohen IK, Yager DR (1998) Dynamics of the matrix metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds. *Wound Repair Regen* 6(2):127-134
- O'Callaghan M, Garnham ML, Nelson TL, Baird D, Jackson TA (1996) The Pathogenicity of *Serratia* Strains to *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *J Invertebr Pathol* 68(1):22-27
- O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM (2000) Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev* 13(4):534-546
- O'Loughlin CT, Miller LC, Siryaporn A, Drescher K, Semmelhack MF, Bassler BL (2013) A quorum-sensing inhibitor blocks *Pseudomonas aeruginosa* virulence and biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 110(44):17981-17986

- O'Toole GA, Kolter R (1998) Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Mol Microbiol* 28(3):449-461
- Oiso N, Fukai K, Ishii M (2006) Allergic contact dermatitis from iodine in a topical ointment. *Contact Dermatitis* 54(6):347-348
- Overall CM, Lopez-Otin C (2002) Strategies for MMP inhibition in cancer: innovations for the post-trial era. *Nat Rev Cancer* 2(9):657-672
- Palolahti M, Lauharanta J, Stephens RW, Kuusela P, Vaheri A (1993) Proteolytic activity in leg ulcer exudate. *Exp Dermatol* 2(1):29-37
- Park JE, Barbul A (2004) Understanding the role of immune regulation in wound healing. *Am J Surg* 187(5A):11-16
- Pekelder JJ (1991) [Myiasis in sheep]. *Tijdschr Diergeneeskd* 116(17):849-850
- Pilcher BK, Dumin JA, Sudbeck BD, Krane SM, Welgus HG, Parks WC (1997) The activity of collagenase-1 is required for keratinocyte migration on a type I collagen matrix. *J Cell Biol* 137(6):1445-1457
- Polakovicova S, Polak S, Kuniakova M, Cambal M, Caplovicova M, Kozanek M, Danisovic L, Kopani M (2015) The Effect of Salivary Gland Extract of *Lucilia sericata* Maggots on Human Dermal Fibroblast Proliferation within Collagen/Hyaluronan Membrane In Vitro: Transmission Electron Microscopy Study. *Adv Skin Wound Care* 28(5):221-226
- Poppel AK, Vogel H, Wiesner J, Vilcinskas A (2015) Antimicrobial Peptides Expressed in Medicinal Maggots of the Blow Fly *Lucilia sericata* Show Combinatorial Activity against Bacteria. *Antimicrob Agents Chemother* 59(5):2508-2514
- Prete PE (1997) Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sci* 60(8):505-510
- Protz K (2014) *Moderne Wundversorgung – Praxiswissen, Standards und Dokumentation*, 7th edn. Urban und Fischer Verlag, München
- Pukstad BS, Ryan L, Flo TH, Stenvik J, Moseley R, Harding K, Thomas DW, Espevik T (2010) Non-healing is associated with persistent stimulation of the innate immune response in chronic venous leg ulcers. *J Dermatol Sci* 59(2):115-122

- Ramsay S, Cowan L, Davidson JM, Nanney L, Schultz G (2015) Wound samples: moving towards a standardised method of collection and analysis. *Int Wound J*: [Epub ahead of print]
- Rayment EA, Upton Z, Shooter GK (2008) Increased matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) activity observed in chronic wound fluid is related to the clinical severity of the ulcer. *Br J Dermatol* 158(5):951-961
- Reed MJ, Ferrara NS, Vernon RB (2001) Impaired migration, integrin function, and actin cytoskeletal organization in dermal fibroblasts from a subset of aged human donors. *Mech Ageing Dev* 122(11):1203-1220
- Renner R, Sticherling M, Ruger R, Simon J (2012) Persistence of bacteria like *Pseudomonas aeruginosa* in non-healing venous ulcers. *Eur J Dermatol* 22(6):751-757
- Renner R, Treudler R, Simon JC (2008) Maggots do not survive in pyoderma gangrenosum. *Dermatology* 217(3):241-243
- Rohani MG, McMahan RS, Razumova MV, Hertz AL, Cieslewicz M, Pun SH, Regnier M, Wang Y, Birkland TP, Parks WC (2015) MMP-10 Regulates Collagenolytic Activity of Alternatively Activated Resident Macrophages. *J Invest Dermatol*: [Epub ahead of print]
- Rolston KV, Messer M (1990) The in-vitro susceptibility of *Alcaligenes denitrificans* subsp. *xylosoxidans* to 40 antimicrobial agents. *J Antimicrob Chemother* 26(6):857-860
- Rozin AP, Egozi D, Ramon Y, Toledano K, Braun-Moscovici Y, Markovits D, Schapira D, Bergman R, Melamed Y, Ullman Y, Balbir-Gurman A (2011) Large leg ulcers due to autoimmune diseases. *Med Sci Monit* 17(1):Cs1-7
- Rüttermann M, Maier-Hasselmann A, Nink-Grebe B, Burckhardt M (2013) Lokalthherapie chronischer Wunden: Bei Patienten mit peripherer arterieller Verschlusskrankheit, chronisch-venöser Insuffizienz und Diabetes mellitus. *Dtsch Arztebl International* 110(3):25-31
- Saap L, Fahim S, Arsenault E, Pratt M, Pierscianowski T, Falanga V, Pedvis-Leftick A (2004) Contact sensitivity in patients with leg ulcerations: a North American study. *Arch Dermatol* 140(10):1241-1246

- Saarialho-Kere UK, Kovacs SO, Pentland AP, Olerud JE, Welgus HG, Parks WC (1993) Cell-matrix interactions modulate interstitial collagenase expression by human keratinocytes actively involved in wound healing. *J Clin Invest* 92(6):2858-2866
- Sanchez CJ, Jr., Akers KS, Romano DR, Woodbury RL, Hardy SK, Murray CK, Wenke JC (2014) D-amino acids enhance the activity of antimicrobials against biofilms of clinical wound isolates of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob Agents Chemother* 58(8):4353-4361
- Sanders CC, Sanders WE, Jr. (1992) beta-Lactam resistance in gram-negative bacteria: global trends and clinical impact. *Clin Infect Dis* 15(5):824-839
- Scheithauer M, Riechelmann H (2003a) [Review part I: basic mechanisms of cutaneous woundhealing]. *Laryngorhinootologie* 82(1):31-35
- Scheithauer M, Riechelmann H (2003b) [Review part II: disorders in cutaneous woundhealing]. *Laryngorhinootologie* 82(1):36-39
- Schierle CF, De la Garza M, Mustoe TA, Galiano RD (2009) Staphylococcal biofilms impair wound healing by delaying reepithelialization in a murine cutaneous wound model. *Wound Repair Regen* 17(3):354-359
- Schmidt RF, Lang F, Thews G (2004) *Physiologie des Menschen*, 29th edn. Springer, Berlin
- Schmohl M, Beckert S, Joos TO, Konigsrainer A, Schneiderhan-Marra N, Löffler MW (2012) Superficial wound swabbing: a novel method of sampling and processing wound fluid for subsequent immunoassay analysis in diabetic foot ulcerations. *Diabetes Care* 35(11):2113-2120
- Schreml S, Szeimies RM, Prantl L, Karrer S, Landthaler M, Babilas P (2010) Oxygen in acute and chronic wound healing. *Br J Dermatol* 163(2):257-268
- Sherman RA (2009) Maggot Therapy Takes Us Back to the Future of Wound Care: New and Improved Maggot Therapy for the 21st Century. *J Diabetes Sci Technol* 3(2):336-344
- Sherman RA, Pechter EA (1988) Maggot therapy: a review of the therapeutic applications of fly larvae in human medicine, especially for treating osteomyelitis. *Med Vet Entomol* 2(3):225-230

- Shoji K, Shinjoh M, Horikoshi Y, Tang J, Watanabe Y, Sugita K, Tame T, Iwata S, Miyairi I, Saitoh A (2015) High rate of inducible clindamycin resistance in *Staphylococcus aureus* isolates--a multicenter study in Tokyo, Japan. *J Infect Chemother* 21(2):81-83
- Sierra JM, Marco F, Ruiz J, Jimenez de Anta MT, Vila J (2002) Correlation between the activity of different fluoroquinolones and the presence of mechanisms of quinolone resistance in epidemiologically related and unrelated strains of methicillin-susceptible and -resistant *Staphylococcus aureus*. *Clin Microbiol Infect* 8(12):781-790
- Singer AJ, Clark RA (1999) Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* 341(10):738-746
- Smith AG, Powis RA, Pritchard DI, Britland ST (2006) Greenbottle (*Lucilia sericata*) larval secretions delivered from a prototype hydrogel wound dressing accelerate the closure of model wounds. *Biotechnol Prog* 22(6):1690-1696
- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985) Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* 150(1):76-85
- Sottrup-Jensen L, Birkedal-Hansen H (1989) Human fibroblast collagenase-alpha-macroglobulin interactions. Localization of cleavage sites in the bait regions of five mammalian alpha-macroglobulins. *J Biol Chem* 264(1):393-401
- Steenvoorde P, Jacobi CE, Van Doorn L, Oskam J (2007) Maggot debridement therapy of infected ulcers: patient and wound factors influencing outcome - a study on 101 patients with 117 wounds. *Ann R Coll Surg Engl* 89(6):596-602
- Steenvoorde P, van Doorn LP (2008) Maggot debridement therapy: serious bleeding can occur: report of a case. *J Wound Ostomy Continence Nurs* 35(4):412-414
- Sun X, Jiang K, Chen J, Wu L, Lu H, Wang A, Wang J (2014) A systematic review of maggot debridement therapy for chronically infected wounds and ulcers. *Int J Infect Dis* 25:32-37
- Sunderkotter C, Steinbrink K, Goebeler M, Bhardwaj R, Sorg C (1994) Macrophages and angiogenesis. *J Leukoc Biol* 55(3):410-422

- Tandara AA, Mustoe TA (2011) MMP- and TIMP-secretion by human cutaneous keratinocytes and fibroblasts--impact of coculture and hydration. *J Plast Reconstr Aesthet Surg* 64(1):108-116
- Tavadia S, Bianchi J, Dawe RS, McEvoy M, Wiggins E, Hamill E, Urcelay M, Strong AM, Douglas WS (2003) Allergic contact dermatitis in venous leg ulcer patients. *Contact Dermatitis* 48(5):261-265
- Tedeschi A, Asero R, Lorini M, Marzano AV, Cugno M (2010) Plasma levels of matrix metalloproteinase-9 in chronic urticaria patients correlate with disease severity and C-reactive protein but not with circulating histamine-releasing factors. *Clin Exp Allergy* 40(6):875-881
- Telford G, Brown AP, Kind A, English JS, Pritchard DI (2011) Maggot chymotrypsin I from *Lucilia sericata* is resistant to endogenous wound protease inhibitors. *Br J Dermatol* 164(1):192-196
- Telford G, Brown AP, Rich A, English JS, Pritchard DI (2012) Wound debridement potential of glycosidases of the wound-healing maggot, *Lucilia sericata*. *Med Vet Entomol* 26(3):291-299
- Tester AM, Cox JH, Connor AR, Starr AE, Dean RA, Puente XS, Lopez-Otin C, Overall CM (2007) LPS responsiveness and neutrophil chemotaxis in vivo require PMN MMP-8 activity. *PLoS One* 2(3):e312
- Thomas S, Andrews A (1999) The effect of hydrogel dressings on maggot development. *J Wound Care* 8(2):75-77
- Thomas S, Andrews AM, Hay NP, Bourgoise S (1999) The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *J Tissue Viability* 9(4):127-132
- Thompson T, Brown PD (2014) Comparison of antibiotic resistance, virulence gene profiles, and pathogenicity of methicillin-resistant and methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* using a *Caenorhabditis elegans* infection model. *Pathog Glob Health* 108(6):283-291
- Tote K, Berghe DV, Deschacht M, de Wit K, Maes L, Cos P (2009) Inhibitory efficacy of various antibiotics on matrix and viable mass of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Int J Antimicrob Agents* 33(6):525-531

- Toubi E, Adir-Shani A, Kessel A, Shmuel Z, Sabo E, Hacham H (2000) Immune aberrations in B and T lymphocytes derived from chronic urticaria patients. *J Clin Immunol* 20(5):371-378
- Trengove NJ, Stacey MC, MacAuley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, Murphy G, Schultz G (1999) Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen* 7(6):442-452
- Vaalamo M, Leivo T, Saarialho-Kere U (1999) Differential expression of tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMP-1, -2, -3, and -4) in normal and aberrant wound healing. *Hum Pathol* 30(7):795-802
- Vaalamo M, Mattila L, Johansson N, Kariniemi AL, Karjalainen-Lindsberg ML, Kahari VM, Saarialho-Kere U (1997) Distinct populations of stromal cells express collagenase-3 (MMP-13) and collagenase-1 (MMP-1) in chronic ulcers but not in normally healing wounds. *J Invest Dermatol* 109(1):96-101
- Valachova I, Prochazka E, Bohova J, Novak P, Takac P, Majtan J (2014a) Antibacterial properties of lucifensin in *Lucilia sericata* maggots after septic injury. *Asian Pac J Trop Biomed* 4(5):358-361
- Valachova I, Takac P, Majtan J (2014b) Midgut lysozymes of *Lucilia sericata* - new antimicrobials involved in maggot debridement therapy. *Insect Mol Biol* 23(6):779-787
- van der Plas MJ, Andersen AS, Nazir S, van Tilburg NH, Oestergaard PR, Kroghfelt KA, van Dissel JT, Hensbergen PJ, Bertina RM, Nibbering PH (2014) A novel serine protease secreted by medicinal maggots enhances plasminogen activator-induced fibrinolysis. *PLoS One* 9(3):e92096
- van der Plas MJ, Baldry M, van Dissel JT, Jukema GN, Nibbering PH (2009) Maggot secretions suppress pro-inflammatory responses of human monocytes through elevation of cyclic AMP. *Diabetologia* 52(9):1962-1970
- van der Plas MJ, Dambrot C, Dogterom-Ballering HC, Kruithof S, van Dissel JT, Nibbering PH (2010) Combinations of maggot excretions/secretions and antibiotics are effective against *Staphylococcus aureus* biofilms and the bacteria derived therefrom. *J Antimicrob Chemother* 65(5):917-923
- van der Plas MJ, Jukema GN, Wai SW, Dogterom-Ballering HC, Lagendijk EL, van Gulpen C, van Dissel JT, Bloemberg GV, Nibbering PH (2008) Maggot excretions/secretions

- are differentially effective against biofilms of *Staphylococcus aureus* and *Pseudomonas aeruginosa*. *J Antimicrob Chemother* 61(1):117-122
- van der Plas MJ, van der Does AM, Baldry M, Dogterom-Ballering HC, van Gulpen C, van Dissel JT, Nibbering PH, Jukema GN (2007) Maggot excretions/secretions inhibit multiple neutrophil pro-inflammatory responses. *Microbes Infect* 9(4):507-514
- Vilcek J, Palombella VJ, Henriksen-DeStefano D, Swenson C, Feinman R, Hirai M, Tsujimoto M (1986) Fibroblast growth enhancing activity of tumor necrosis factor and its relationship to other polypeptide growth factors. *J Exp Med* 163(3):632-643
- Visalli MA, Murphy E, Projan SJ, Bradford PA (2003) AcrAB multidrug efflux pump is associated with reduced levels of susceptibility to tigecycline (GAR-936) in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 47(2):665-669
- Wadsworth SJ, Kim KH, Satishchandran V, Axelrod P, Truant AL, Suh B (1992) Development of new antibiotic resistance in methicillin-resistant but not methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus*. *J Antimicrob Chemother* 30(6):821-826
- Wall SJ, Sampson MJ, Levell N, Murphy G (2003) Elevated matrix metalloproteinase-2 and -3 production from human diabetic dermal fibroblasts. *Br J Dermatol* 149(1):13-16
- Weigel LM, Anderson GJ, Tenover FC (2002) DNA gyrase and topoisomerase IV mutations associated with fluoroquinolone resistance in *Proteus mirabilis*. *Antimicrob Agents Chemother* 46(8):2582-2587
- Weil RGC, Simon J, Sweadner WR (1933) A biological, bacteriological and clinical study of larval or maggot therapy in the treatment of acute and chronic pyrogenic infections. *Am J Surg* 19:36-48
- Weiss SJ (1989) Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320(6):365-376
- Welch MP, Odland GF, Clark RA (1990) Temporal relationships of F-actin bundle formation, collagen and fibronectin matrix assembly, and fibronectin receptor expression to wound contraction. *J Cell Biol* 110(1):133-145
- West MD, Shay JW, Wright WE, Linskens MH (1996) Altered expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during cellular senescence. *Exp Gerontol* 31(1-2):175-193

- Woodruff HB, Foster JW (1945) Microbiological Aspects of Penicillin: VII. Bacterial Penicillinase. *J Bacteriol* 49(1):7-17
- Wysocki AB, Bhalla-Regev SK, Tierno PM, Jr., Stevens-Riley M, Wiygul RC (2013) Proteolytic activity by multiple bacterial species isolated from chronic venous leg ulcers degrades matrix substrates. *Biol Res Nurs* 15(4):407-415
- Wysocki AB, Grinnell F (1990) Fibronectin profiles in normal and chronic wound fluid. *Lab Invest* 63(6):825-831
- Wysocki AB, Staiano-Coico L, Grinnell F (1993) Wound fluid from chronic leg ulcers contains elevated levels of metalloproteinases MMP-2 and MMP-9. *J Invest Dermatol* 101(1):64-68
- Xu L, McLennan SV, Lo L, Natfaji A, Bolton T, Liu Y, Twigg SM, Yue DK (2007) Bacterial load predicts healing rate in neuropathic diabetic foot ulcers. *Diabetes Care* 30(2):378-380
- Yan C, Boyd DD (2007) Regulation of matrix metalloproteinase gene expression. *J Cell Physiol* 211(1):19-26
- Zeng G, Millis AJ (1994) Expression of 72-kDa gelatinase and TIMP-2 in early and late passage human fibroblasts. *Exp Cell Res* 213(1):148-155
- Zimmer A (2003) Galenische Formulierung rekombinanter Wirkstoffe. *Pharm unserer Zeit* 32(5):384-389
- Zmudzinska M, Czarnecka-Operacz M, Silny W, Kramer L (2006) Contact allergy in patients with chronic venous leg ulcers-- possible role of chronic venous insufficiency. *Contact Dermatitis* 54(2):100-105

10. Anhang

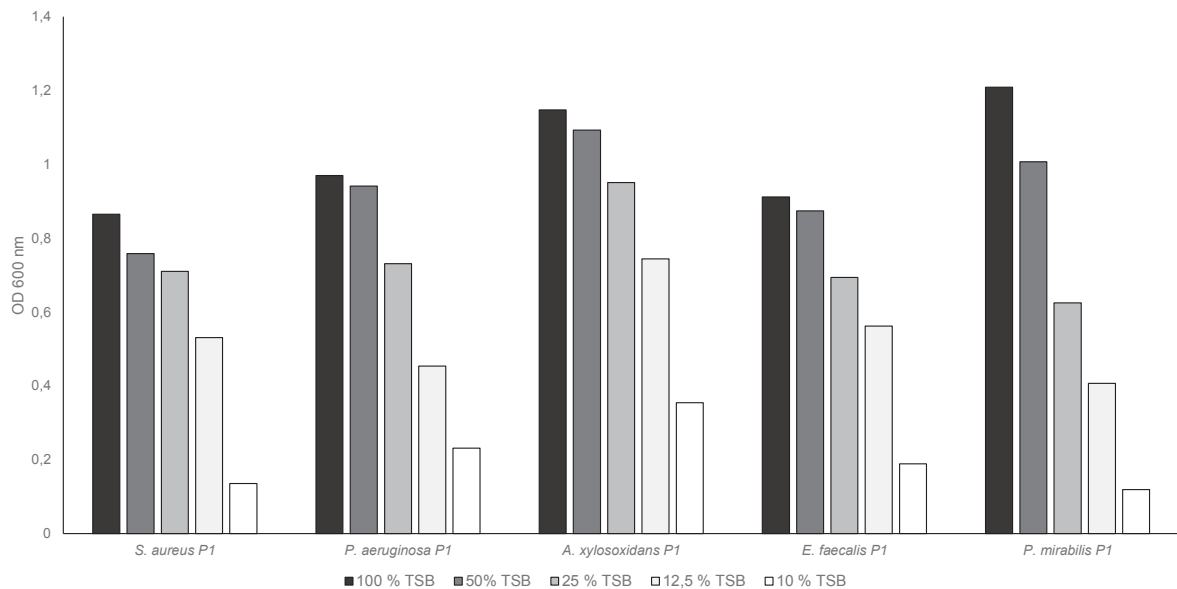


Abbildung 27: Bakterielleres Wachstum (*microbroth dilution assay*) in Abhängigkeit der Medienkonzentration. Die verschiedenen Isolate wurden 20 h bei 37 °C auf Blutagar vorkultiviert. 100 µl 100 %ige TSB bzw. absteigende Konzentrationen von TSB wurden in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit je 5 µl der jeweiligen, auf McFarland 0,5 eingestellten Bakterien-Suspension inokuliert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Messung der OD erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. P = Patient+Nummer; TSB = tryptische Soja Bouillon; OD = optische Dichte.

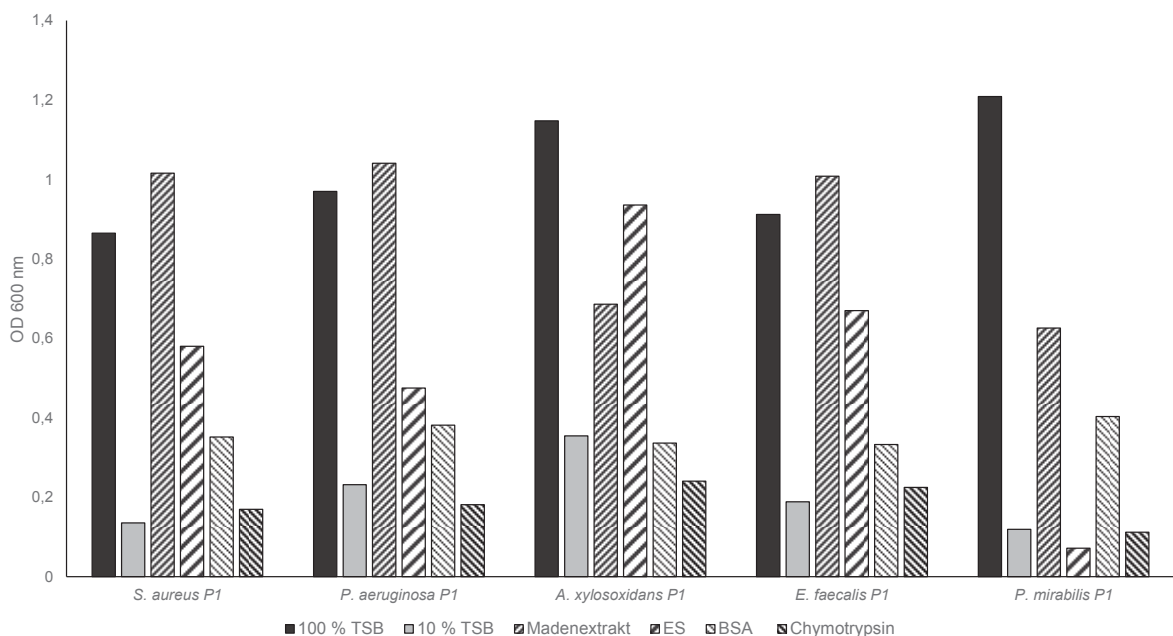


Abbildung 28: Einfluss verschiedener Parameter auf das bakterielle Wachstum (Trübung) unter reduzierten Medienkonzentrationen. Die verschiedenen Isolate wurden 20 h bei 37 °C auf Blutagar vorkultiviert. 100 µl 100 %ige TSB, 10 %ige TSB; jeweils in 10 % TSB gelöster Madenextrakt, ES, 30 mg/ml BSA und 5 µg/ml Chymotrypsin wurden in Mikrotiterplatten vorgelegt und mit je 5 µl der jeweiligen, auf McFarland 0,5 eingestellten Bakterien-Suspension inokuliert und für 24 h bei 37 °C inkubiert. Die Messung der OD erfolgte photometrisch bei einer Wellenlänge von 600 nm. P = Patient+Nummer; TSB = tryptische Soja Bouillon; ES = Exkrete/Sekrete; BSA = bovines Serum Albumin; OD = optische Dichte.

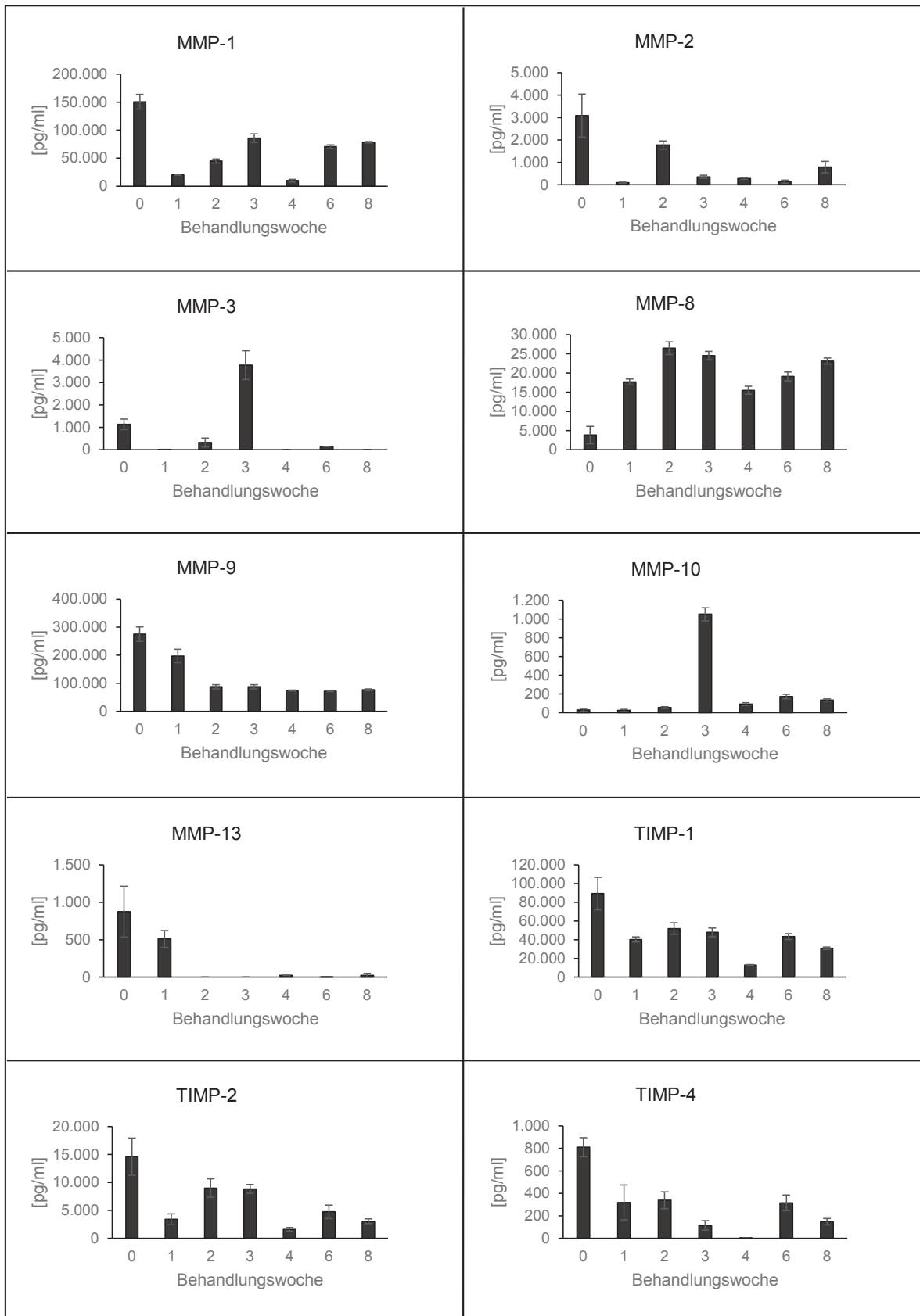


Abbildung 29: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 1. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus $n = 4$ Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

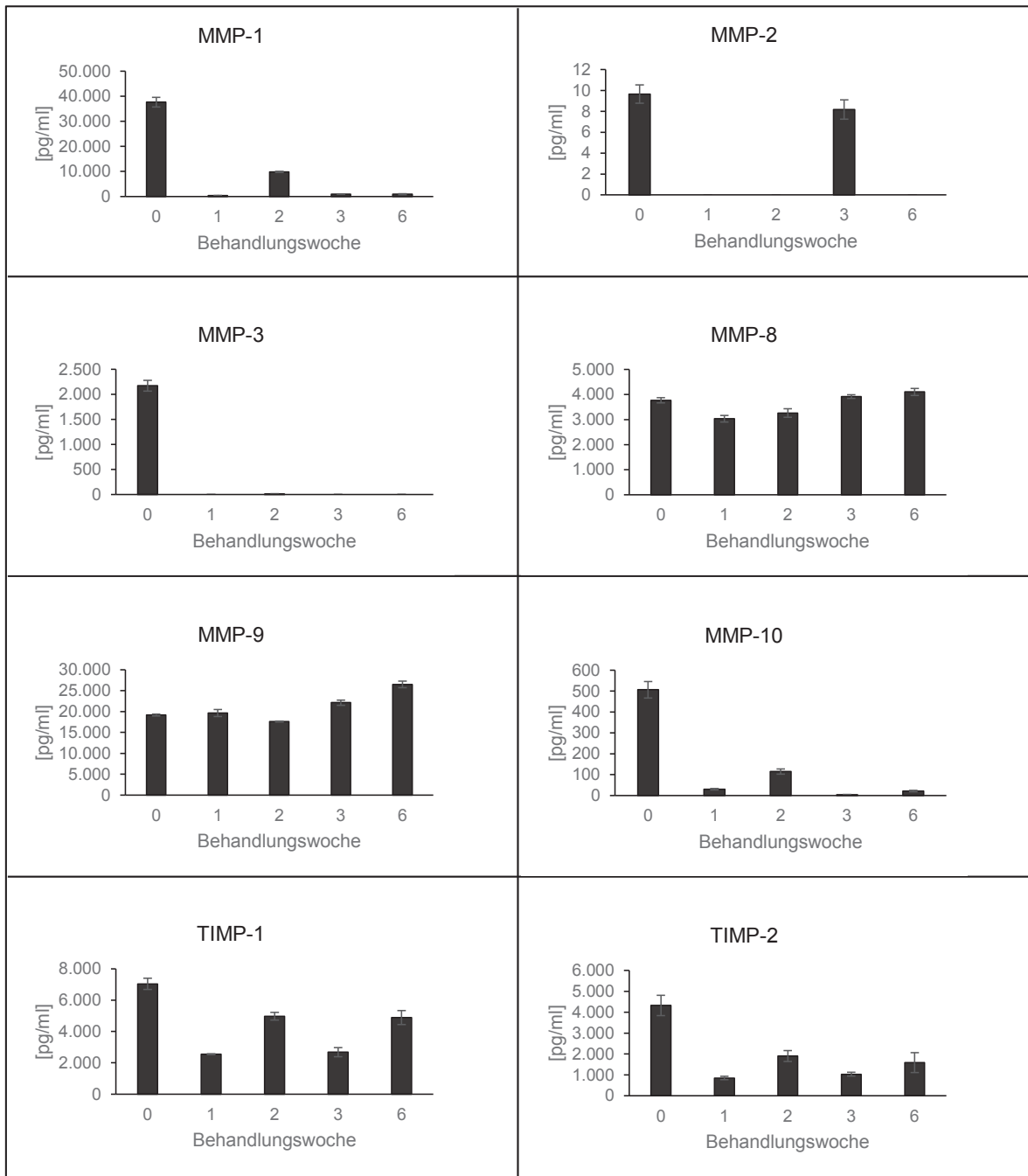


Abbildung 30: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 2. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je $n = 4$ Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

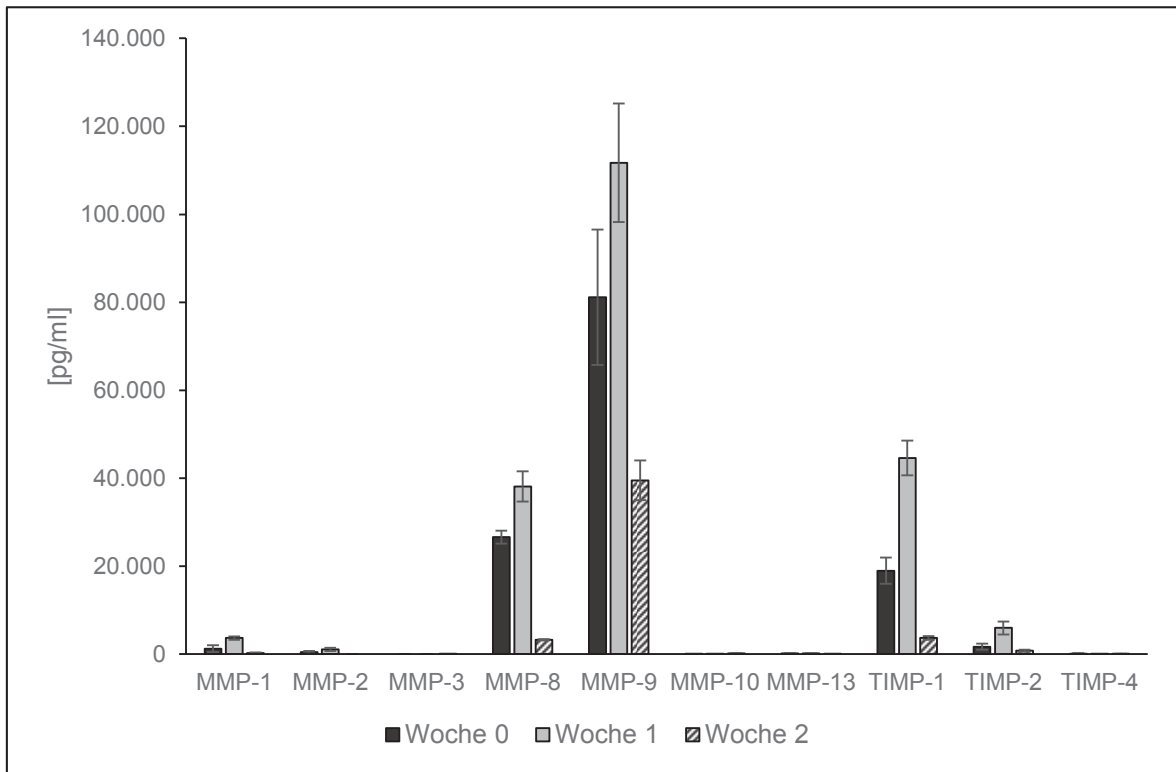


Abbildung 31: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 3. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

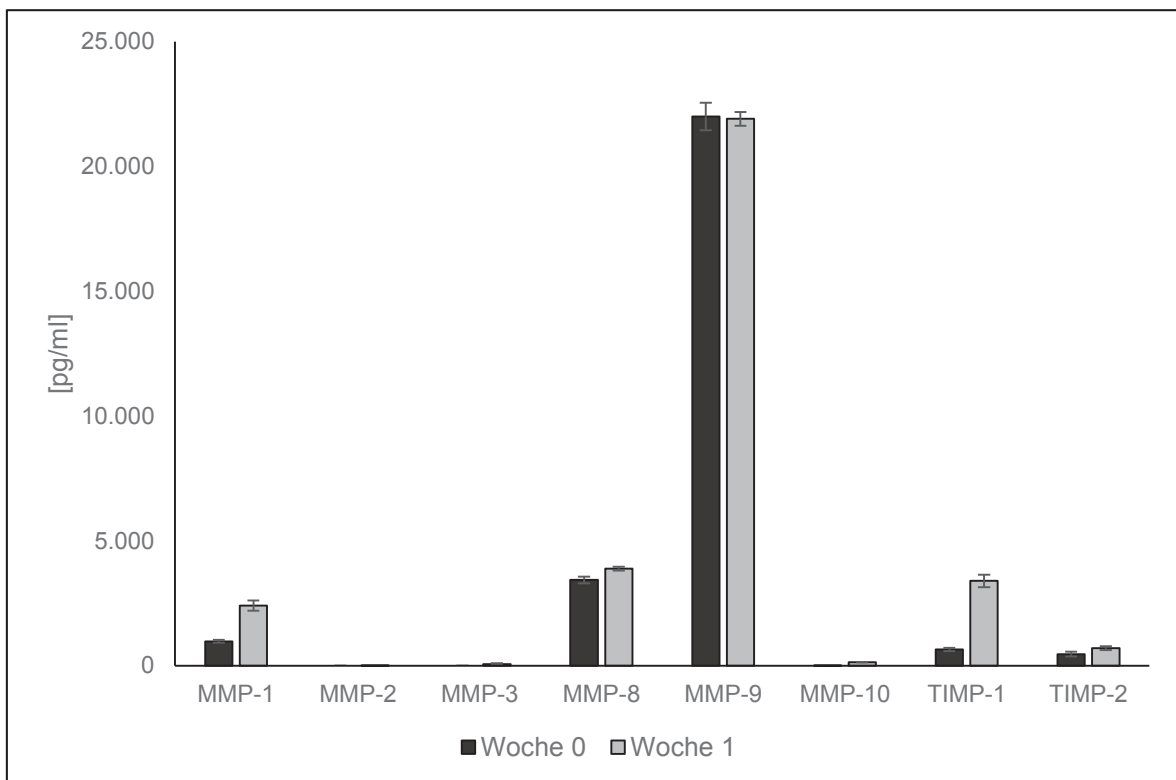


Abbildung 32: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 4. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

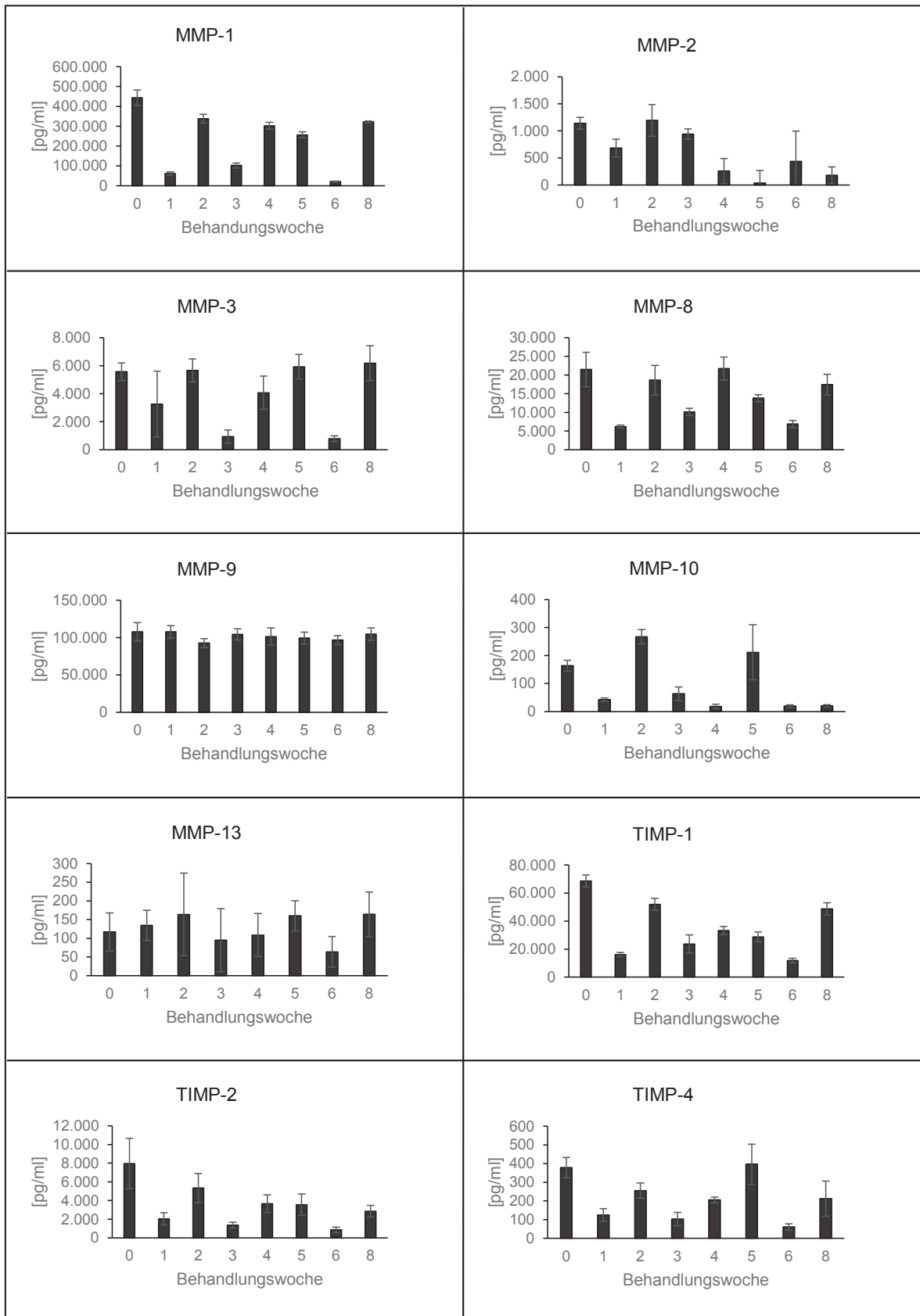


Abbildung 33: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 5. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je $n = 4$ Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

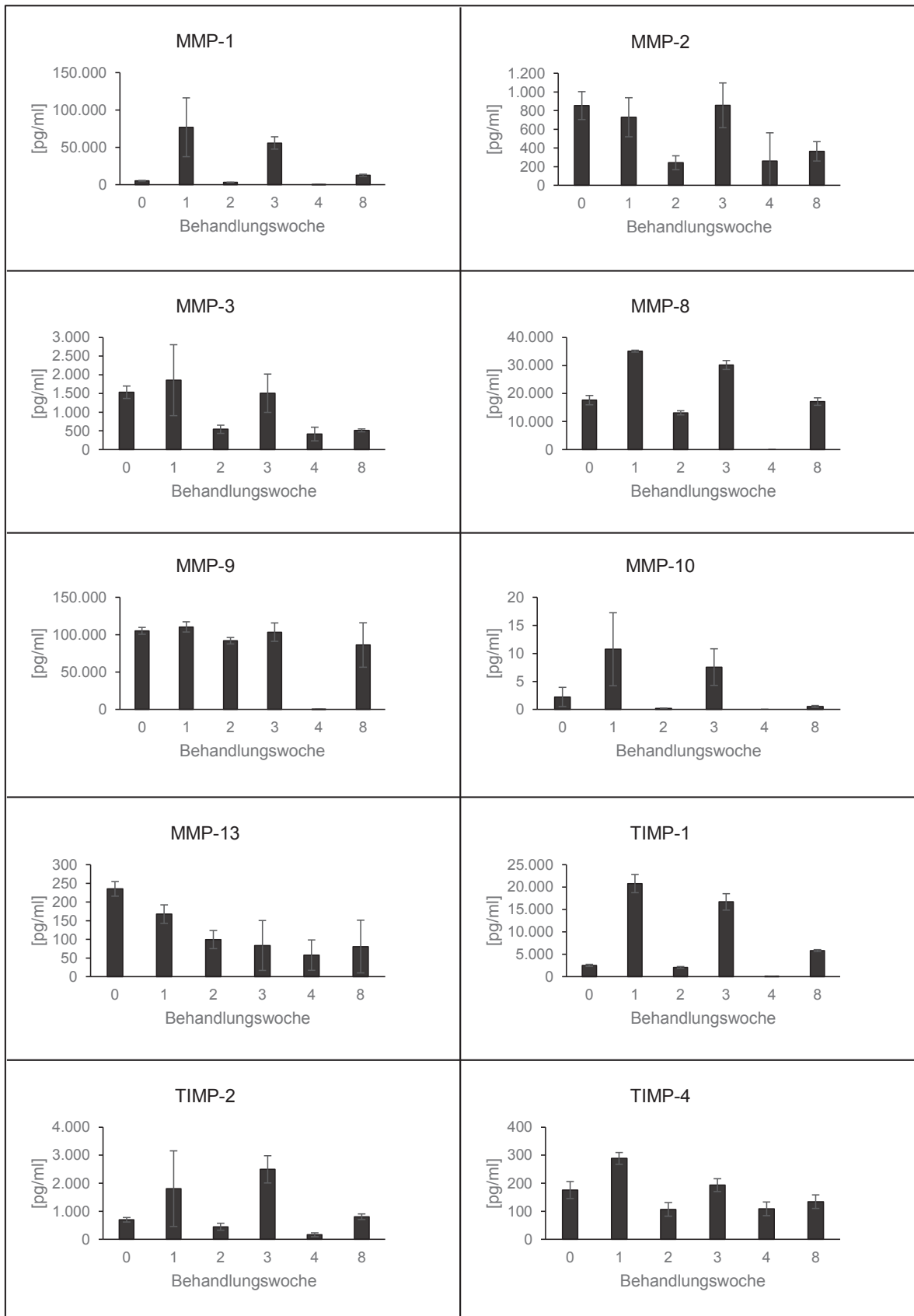


Abbildung 34: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 6. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

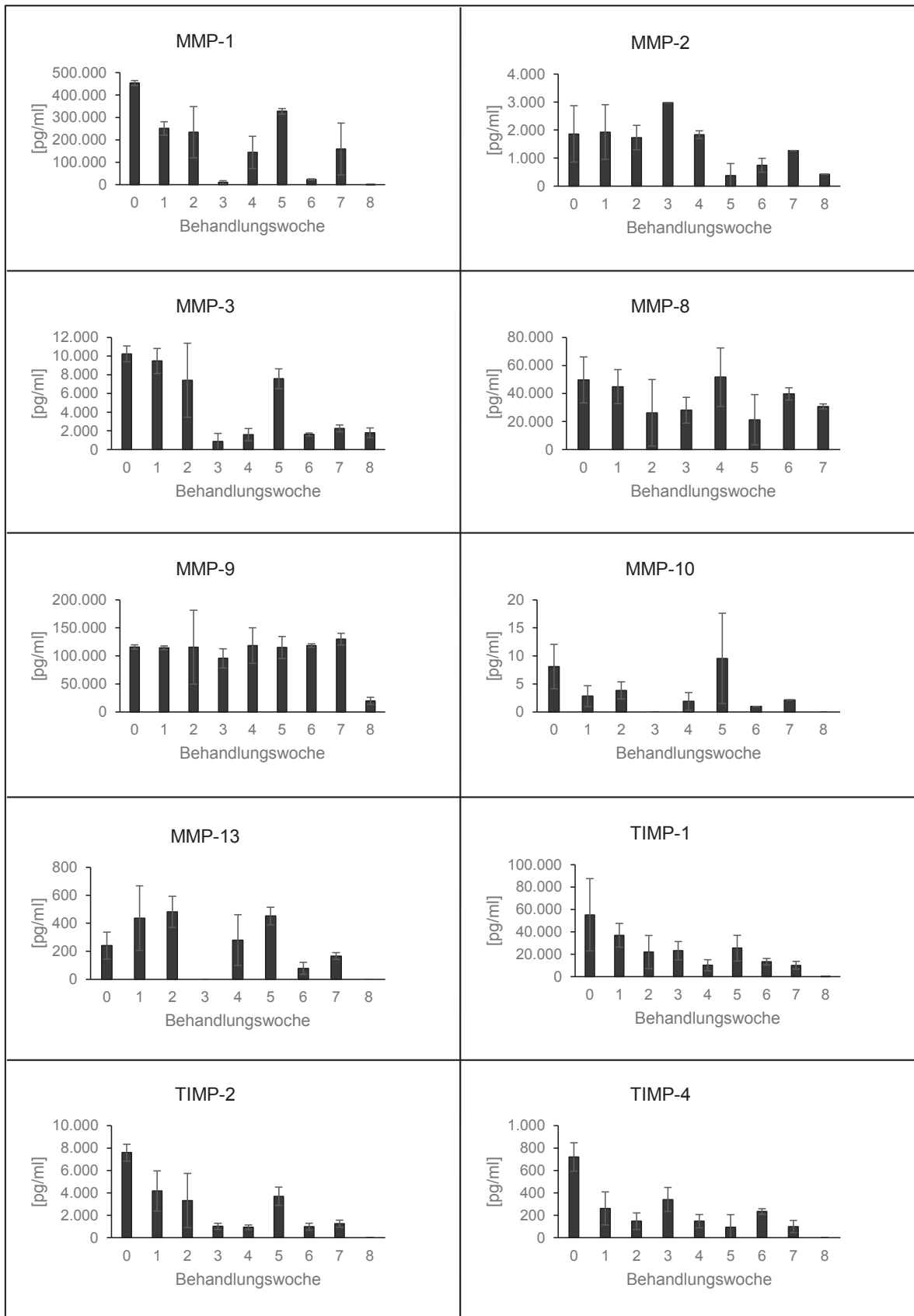


Abbildung 35: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 7. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

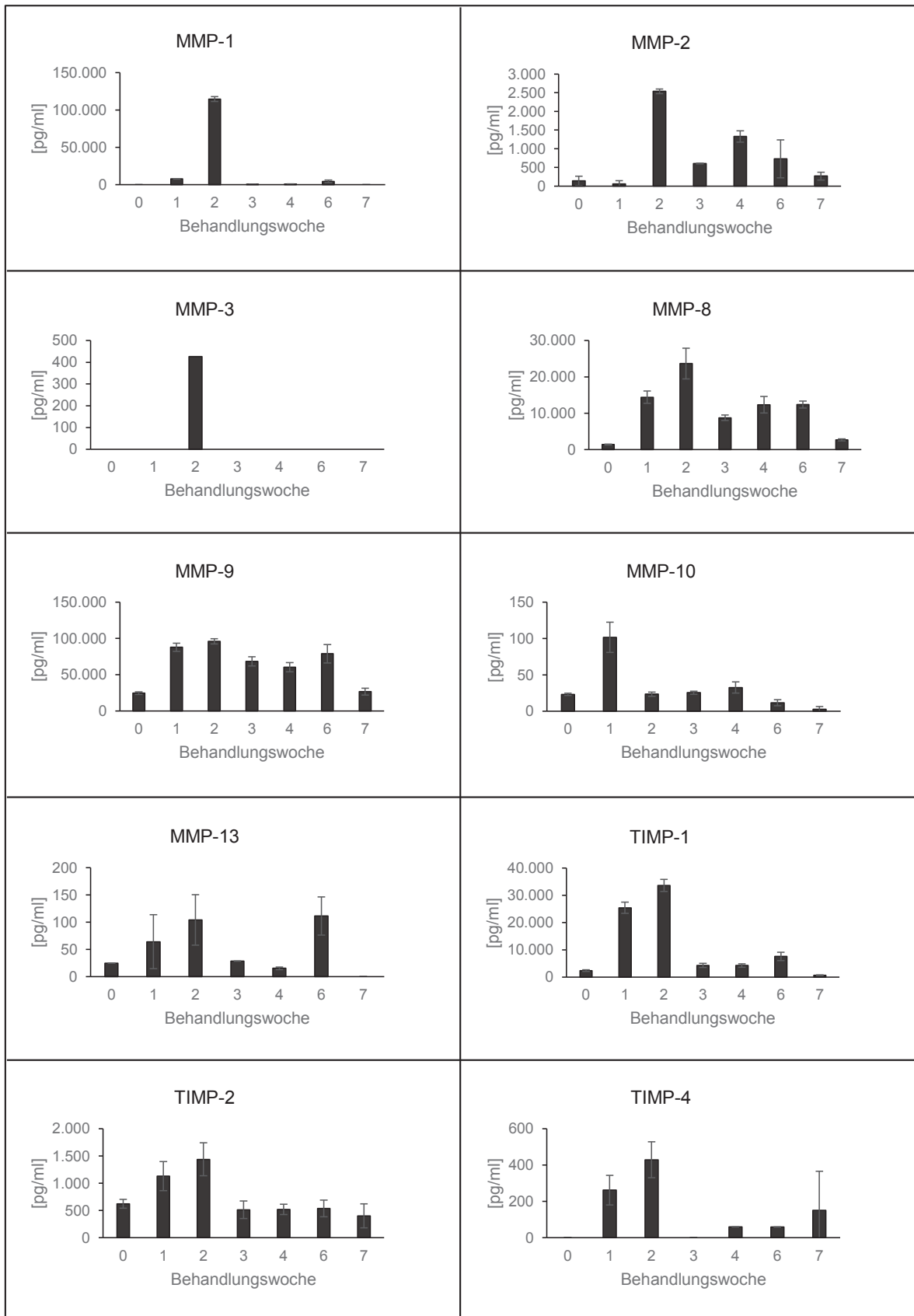


Abbildung 36: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 8. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

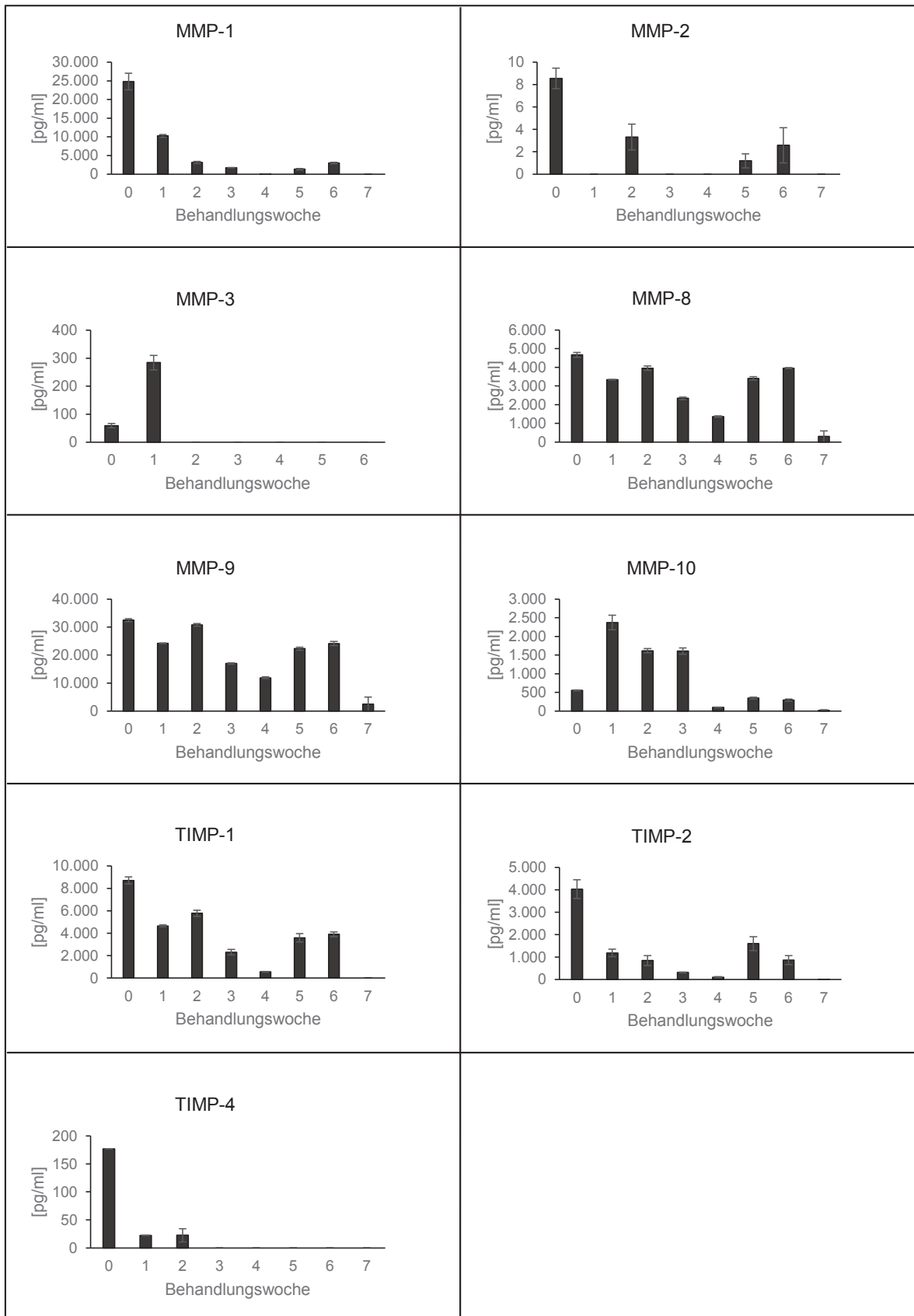


Abbildung 37: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 9. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

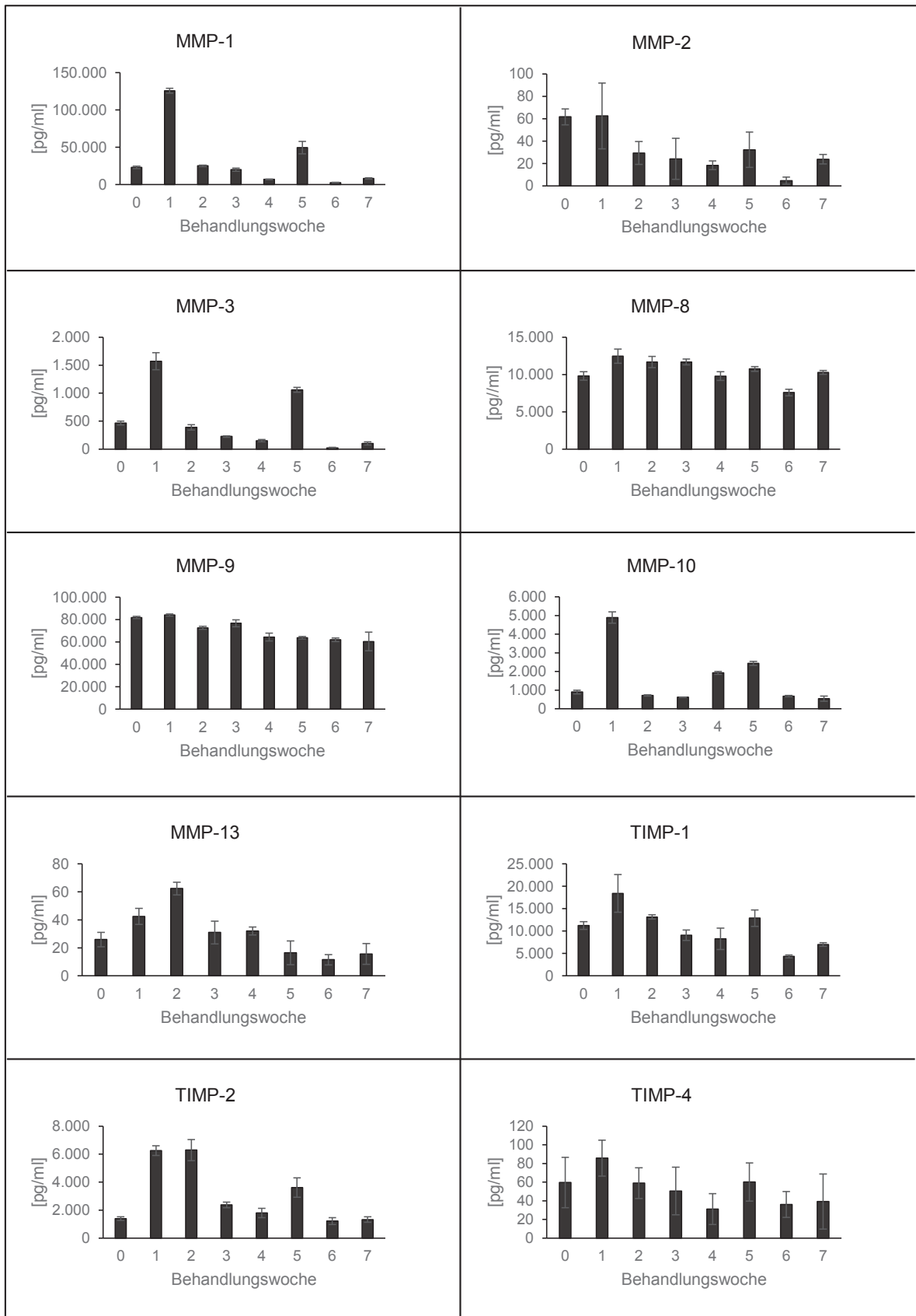


Abbildung 38: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 10. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je $n = 4$ Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

10.1. Antibiotogramme

Tabelle 13: Antibiotogramme der Bakterien-Isolate von Patient 1. Abkürzungen: PROMIR = *Proteus mirabilis*; AXILO = *Achromobacter xylosoxidans*; STAAUR = *Staphylococcus aureus*; R = resistent; S = sensibel; I = intermedieär; * = nicht nach CLSI Standard ermittelt; TMP/SMZ (Co-Trim) = Trimethoprim/Sulfamethoxazol.

Patient 1 Substanz	Resistenz PROMIR	[mg/L]	Patient 1 Substanz	Resistenz AXILO	[mg/L]	Patient 1 Substanz	Resistenz STAAUR	[mg/L]
Ampicillin/Amoxicillin	S	<=2	Ampicillin/Amoxicillin	I	16	Penicillin	S	0,06
Ampicillin+Subactam	S	<=2	Ampicillin+Subactam	S	<=2	Oxacillin	S	<=0,25
Piperacillin	S	<=4	Piperacillin+Tazobactam	S	<=4	Ampicillin+Subactam	S	
Piperacillin+Tazobactam	S	<=4	Cefuroxim	R	>=64	Piperacillin+Tazobactam	S	
Cefuroxim	S	<=1	Cefotaxim/Ceftriaxon	S	>=64	Cefazolin	S	
Cefotaxim/Ceftriaxon	S	<=1	Ceftazidim	R	8	Cefuroxim	S	
Ceftazidim	S	<=1	Imipenem	S		Imipenem	S	
Imipenem	S	0,5	Meropenem	S	1	Meropenem	S	
Meropenem	S	<=0,25	Gentamicin	R	<=0,25	Gentamicin	S	<=0,5
Ertapenem	S	<=0,5	Tobramycin	R	>=16	Levofloxacin	S	<=0,12
Gentamicin	S	<=1	Levofloxacin	R		Moxifloxacin	S	<=0,25
Ciprofloxacin	S	<=0,25	Ciprofloxacin	R	>=4	TMP/SMZ (Co-Trim)	S	
Moxifloxacin	S	0,5	Moxifloxacin	R	>=8	Erythromycin	S	<=0,25
TMP/SMZ (Co-Trim)	S	<=20	TMP/SMZ (Co-Trim)	S	<=20	Clindamycin	S	<=0,25
Tigecyclin	R	4	Colistin*	I		Vancomycin	S	1
						Teicoplanin	S	<=0,5
						Linezolid	S	2
						Fusidinsäure*	S	<=0,5
						Fosfomycin*	S	<=8
						Rifampicin	S	<=0,5
						Tetracyclin	S	<=1
						Mupirocin*	S	<=2
						Tigecyclin	S	<=0,12

Tabelle 14: Antibiogramme weiterer Bakterien-Isolate von Patient 1. Abkürzungen: **PYO** = *Pseudomonas aeruginosa*; **ENFIS** = *Enterococcus faecalis*; **R** = resistent; **S** = sensibel; * = nicht nach CLSI Standard ermittelt.

Patient 1 Substanz	Resistenz PYO	Patient 1 Substanz	Resistenz PYO	Patient 1 Substanz	Resistenz ENFIS
Piperacillin	S	Piperacillin	S	Ampicillin/Amoxicillin	S
Piperacillin+Tazobactam	S	Piperacillin+Tazobactam	S	Ampicillin+Sulbactam	S
Ceftazidim	S	Ceftazidim	S	Piperacillin	S
Cefepim	S	Cefepim	S	Mezlocillin	S
Aztreonam	S	Aztreonam	S	Piperacillin+Tazobactam	S
Imipenem	S	Imipenem	R	Meropenem	S
Meropenem	S	Meropenem	R		
Gentamicin	R	Gentamicin	R		
Tobramycin	S	Tobramycin	S		
Levofloxacin	R	Levofloxacin	R		
Ciprofloxacin	R	Ciprofloxacin	R		
Colistin*	S	Colistin*	S		

Tabelle 15: Antibiogramme der Bakterien-Isolate von Patient 2. Abkürzungen: **PYO** = *Pseudomonas aeruginosa*; **CITKOS** = *Citrobacter koseri*; **STAAUR** = *Staphylococcus aureus*; **R** = resistent; **S** = sensibel; **I** = intermediär; * = intermediär; * = nicht nach CLSI Standard ermittelt; **TMP/SMZ (Co-Trim)** = Trimethoprim/Sulfamethoxazol.

Patient 2 Substanz	Resistenz PYO	[mg/L]	Patient 2 Substanz	Resistenz CITKOS	[mg/L]	Patient 2 Substanz	Resistenz STAAUR	[mg/L]
Ampicillin+Sulbactam	R	>=32	Ampicillin+Sulbactam	S	<=2	Oxacillin	S	<=0,25
Piperacillin	S	<=4	Piperacillin	R	64	Ampicillin+Sulbactam	S	<=2
Piperacillin+Tazobactam	S	<=4	Piperacillin+Tazobactam	S	<=4	Piperacillin+Tazobactam	S	<=4
Cefuroxim	R	>=64	Cefuroxim	I	16	Cefazolin	S	
Cefotaxim/Ceftriaxon	R	8	Cefotaxim/Ceftriaxon	S	<=1	Cefotaxim/Ceftriaxon	S	16
Ceftazidim	S	<=1	Ceftazidim	S	<=1	Imipenem	S	<=0,25
Imipenem	S	2	Imipenem	S	<=0,25	Meropenem	S	<=0,25
Meropenem	S	<=0,25	Meropenem	S	<=0,25	Gentamicin	S	<=0,5
Gentamicin	S	<=1	Ertapenem	S	<=0,5	Tobramycin	S	<=1
Ciprofloxacin	S	<=0,25	Gentamicin	S	<=1	Levofloxacin	S	0,25
Moxifloxacin	S	<=0,25	Ciprofloxacin	S	<=0,25	Moxifloxacin	S	<=0,25
TMP/SMZ (Co-Trim)	R	80	Moxifloxacin	S	<=0,25	TMP/SMZ (Co-Trim)	S	<=20
Tigecyclin	R	>=8	TMP/SMZ (Co-Trim)	S	<=20	Erythromycin	S	<=0,25
			Tigecyclin	S	<=0,5	Clindamycin	S	<=0,25
						Vancomycin	S	1
						Teicoplanin	S	<=0,5
						Linezolid	S	2
						Fusidinsäure*	S	<=0,5
						Fosfomycin*	S	<=8
						Rifampicin	S	<=0,5
						Tetracyclin	S	<=1
						Mupirocin*	S	<=2
						Tigecyclin	S	<=0,12

Tabelle 16: Antibiogramme der Bakterien-Isolate der Patienten 3, 4 und 5. Abkürzungen: **PYO** = *Pseudomonas aeruginosa*; **STAAUR** = *Staphylococcus aureus*; **R** = resistent; **S** = sensibel; **I** = intermediär; * = nicht nach CLSI Standard ermittelt; **TMP/SMZ (Co-Trim)** = Trimethoprim/Sulfamethoxazol.

Patient 3		Patient 4		Patient 5		Patient 5	
Substanz	Resistenz [mg/L]	Substanz	Resistenz [mg/L]	Substanz	Resistenz [mg/L]	Substanz	Resistenz [mg/L]
Ampicillin/Amoxicillin	R	Piperacillin	S	Piperacillin	S	Penicillin	R
Ampicillin+Sulbactam	R	Piperacillin+Tazobactam	S	Piperacillin+Tazobactam	S	Oxacillin	S
Piperacillin	R	Ceftazidim	S	Ceftazidim	S	Ampicillin+Sulbactam	S
Piperacillin+Tazobactam	R	Imipenem	S	Cefepim	S	Piperacillin+Tazobactam	S
Cefuroxim	R	Meropenem	S	Aztreonam	S	Cefazolin	S
Cefotaxim/Ceftriaxon	R	Gentamicin	S	Imipenem	I	Cefuroxim	S
Ceftazidim	R	Ciprofloxacine	S	Meropenem	I	Imipenem	S
Imipenem	S			Gentamicin	S	Meropenem	S
Meropenem	S			Tobramycin	S	Gentamicin	S
Gentamicin	S			Levofloxacin	S	Tobramycin	S
Ciprofloxacine	I			Ciprofloxacine	S	Levofloxacin	R
Moxifloxacin	R			Collistin*	S	Moxifloxacin	R
TMP/SMZ (Co-Trim)	R					TMP/SMZ (Co-Trim)	R
Tigecyclin	R					Erythromycin	R
						Clindamycin	R
						Vancomycin	S
						Teicoplanin	S
						Linezolid	S
						Fusidinsäure*	S
						Fosfomycin*	S
						Rifampicin	S
						Tetracyclin	S
						Mupirocin*	S
						Tigecyclin	S

Tabelle 17: Antibiogramme der Bakterien-Isolate von Patient 6. Abkürzungen: **PYO** = *Pseudomonas aeruginosa*; **KLEB** = *Klebsiella pneumoniae*; **STAAUR** = *Staphylococcus aureus*; **PRETT** = *Providencia rettgeri*; **R** = resistent; **S** = sensibel; **I** = intermediär; * = nicht nach CLSI Standard ermittelt; **TMP/SMZ (Co-Trim)** = Trimethoprim/Sulfamethoxazol.

Patient 6 Substanz	Resistenz [mg/L] PYO	Patient 6 Substanz	Resistenz [mg/L] PYO	Patient 6 Substanz	Resistenz [mg/L] KLEB	Patient 6 Substanz	Resistenz [mg/L] PRETT
Piperacillin	S	Piperacillin	S	Ampicillin/Amoxicillin	R	Ampicillin/Amoxicillin	<=2
Piperacillin+Tazobactam	S	Piperacillin+Tazobactam	S	Ampicillin+Sulbactam	S	Ampicillin+Sulbactam	<=2
Ceftazidim	S	Ceftazidim	S	Piperacillin	R	Piperacillin	<=4
Cefepim	S	Cefepim	S	Piperacillin+Tazobactam	S	Piperacillin+Tazobactam	<=4
Aztreonam	I	Aztreonam	S	Cefuroxim	S	Cefuroxim	<=1
Imipenem	R	Imipenem	S	Cefotaxim/Ceftriaxon	S	Cefotaxim/Ceftriaxon	<=1
Meropenem	R	Meropenem	S	Ceftazidim	S	Ceftazidim	<=1
Gentamicin	R	Gentamicin	S	Imipenem	S	Imipenem	2
Tobramycin	R	Tobramycin	S	Meropenem	S	Meropenem	<=0,25
Levofloxacin	R	Levofloxacin	S	Ertapenem	S	Ertapenem	<=0,5
Ciprofloxacin	R	Ciprofloxacin	S	Gentamicin	S	Gentamicin	<=1
Colistin*	S			Ciprofloxacin	S	Ciprofloxacin	<=0,25
				Moxifloxacin	S	Moxifloxacin	0,5
				TMP/SMZ (Co-Trim)	S	TMP/SMZ (Co-Trim)	<=20
				Tigecyclin	S	Tigecyclin	>=8

Tabelle 18: Antibiogramme der Bakterien-Isolate von Patient 7 und 8. Abkürzungen: **PYO** = *Pseudomonas aeruginosa*; **STAAUR** = *Staphylococcus aureus*; **PROMIR** = *Proteus mirabilis*; **R** = resistent; **S** = sensibel; **I** = intermeditär; * = intermeditär; * = nicht nach CLSI Standard ermittelt; **TMP/SMZ (Co-Trim)** = Trimethoprim/Sulfamethoxazol.

Patient 7 Substanz	Resistenz STAAUR	[mg/L]	Patient 7 Substanz	Resistenz PROMIR	[mg/L]	Patient 8 Substanz	Resistenz PYO	[mg/L]
Penicillin	S	<=0,03	Ampicillin/Amoxicillin	S	<=2	Piperacillin	S	<=4
Oxacillin	S	<=0,25	Ampicillin+Sulbactam	S	<=2	Piperacillin+Tazobactam	S	<=4
Ampicillin+Sulbactam	S		Piperacillin	S	<=4	Ceftazidim	S	<=1
Piperacillin+Tazobactam	S		Piperacillin+Tazobactam	S	<=4	Imipenem	R	>=16
Cefazolin	S		Cefuroxim	S	<=4	Meropenem	I	4
Cefuroxim	S		Cefotaxim/Ceftriaxon	S	<=1	Gentamicin	R	8
Imipenem	S		Ceftazidim	S	<=1	Ciprofloxacilin	R	>=4
Meropenem	S		Imipenem	S	<=0,25	TMP/SMZ (Co-Trim)	R	>=320
Gentamicin	S	<=0,5	Meropenem	S	<=0,25			
Levofloxacin	S	0,25	Ertapenem	S	<=0,5			
Moxifloxacin	S	<=0,25	Gentamicin	S	<=1			
TMP/SMZ (Co-Trim)	S	<=10	Ciprofloxacilin	R	2			
Erythromycin	S	<=0,25	Moxifloxacin	R	>=8			
Clindamycin	S	<=0,25	TMP/SMZ (Co-Trim)	S	<=20			
Vancomycin	S	1	Tigecyclin	R	4			
Teicoplanin	S	<=0,5						
Linezolid	S	2						
Fusidinsäure*	S	<=0,5						
Fosfomycin*	S	<=8						
Rifampicin	S	<=0,5						
Tetracyclin	S	<=1						
Mupirocin*	S	<=2						
Tigecyclin	S	<=0,12						
Daptomycin	S	<=0,25						

Tabelle 19: Antibiogramme der Bakterien-Isolate von Patient 9 und 10. Abkürzungen: **PYO** = *Pseudomonas aeruginosa*, **STAAUR** = *Staphylococcus aureus*, **R** = resistent; **S** = sensibel; * = nicht nach CLSI Standard ermittelt; **TMP/SMZ (Co-Trim)** = Trimethoprim/Sulfamethoxazol.

Patient 9 Substanz	Resistenz STAAUR	[mg/L]	Patient 10 Substanz	Resistenz STAAUR	[mg/L]	Patient 10 Substanz	Resistenz PYO
Penicillin	R		Penicillin	R	>=0,5	Piperacillin	S
Oxacillin	S	<=0,25	Oxacillin	S	<=0,25	Piperacillin+Tazobactam	S
Ampicillin+Sulbactam	S		Ampicillin+Sulbactam	S		Ceftazidim	S
Piperacillin+Tazobactam	S		Piperacillin+Tazobactam	S		Cefepim	S
Cefazolin	S		Cefazolin	S		Imipenem	S
Cefuroxim	S		Cefuroxim	S		Meropenem	S
Imipenem	S		Imipenem	S		Gentamicin	S
Meropenem	S		Meropenem	S		Tobramycin	S
Gentamicin	S	<=0,5	Gentamicin	S	<=0,5	Amikacin	S
Levofloxacin	S	0,25	Levofloxacin	R	>=8	Levofloxacin	S
Moxifloxacin	S	<=0,25	Moxifloxacin	R		Ciprofloxacin	S
TMP/SMZ (Co-Trim)	S	<=10	TMP/SMZ (Co-Trim)	S	<=10		
Erythromycin	S	<=0,25	Erythromycin	S	1		
Clindamycin	S	<=0,25	Clindamycin	S	0,25		
Vancomycin	S	2	Vancomycin	S	2		
Teicoplanin	S	<=0,5	Teicoplanin	S	<=0,5		
Linezolid	S	2	Linezolid	S	2		
Fusidinsäure*	R	>=32	Fusidinsäure*	S	<=0,5		
Fosfomycin*	S	<=8	Fosfomycin*	S	<=8		
Tetracyclin	S	<=1	Tetracyclin	S	<=1		
Mupirocin*	S	<=2	Mupirocin*	S	<=2		
Tigecyclin	S	0,25	Tigecyclin	S	<=0,12		
Daptomycin	S	<=0,25	Daptomycin	S	1		
Rifampicin	S	<=0,5	Rifampicin	S	<=0,03		

10.2. Datentabellen MMP-Messungen

Tabelle 20: MMP- und TIMP-Konzentrationen im Kulturmedium von NHDF. Es wurden 2×10^5 NHDF dreier Spender 72 h bei 37°C und 5 % CO₂ in DMEM mit 10 % FKS kultiviert. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Messwerte von DMEM mit 10 % FKS ohne Zellen wurden von den Messwerten mit Zellen subtrahiert. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je $n = 4$. DMEM = *Dulbecco's modified Eagle's medium*; NHDF = normale humane dermale Fibroblasten; FKS = fötales Kälberserum; Konz. = Konzentration; Stabw. = Standardabweichung; MMP = Matrixmetalloproteinase; TIMP = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

Spender	1		2		3	
	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]
MMP-1	920	83	4559	136	1080	26
MMP-3	3625	163	1909	109	267	23
MMP-8	1	0	0	0	0	0
MMP-9	1	5	5	4	1	1
MMP-10	3	3	198	33	271	2
MMP-13	5	2	3	2	2	1
TIMP-1	1855	366	4539	1168	1474	1100
TIMP-2	1894	1068	1954	272	835	107

Tabelle 21: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 1. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = tissue inhibitors of metalloproteinases.

Ungewichtete Messdaten [pg/ml]														
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	6	8	Standardabweichung [pg/ml]						
								0	1	2	3	4	6	8
MMP-1	150706	20064	44916	85780	9939	70552	78451	13264	481	3554	7584	2240	3273	1234
MMP-2	3085	96	1770	354	278	143	790	956	20	188	69	38	67	258
MMP-3	1135	8	320	3774	0	133	0	232	10	202	641	0	0	0
MMP-8	3838	17657	26451	24530	15492	19109	23103	2266	747	1666	1087	1027	1158	809
MMP-9	275010	196924	87270	87373	73911	72106	76646	25600	23752	7594	7757	1294	1758	3304
MMP-10	30	25	55	1051	93	172	135	16	11	10	71	15	24	12
MMP-13	874	511	0	0	25	4	24	340	112	0	0	0	2	26
TIMP-1	89261	40271	51884	47861	13011	43349	30952	17308	2693	6178	4580	360	3110	1318
TIMP-2	14619	3415	8989	8838	1616	4736	3066	3332	969	1634	803	296	1218	425
TIMP-4	811	320	339	114	4	316	148	86	156	76	42	0	70	29

Bezogen auf 100 µg Protein [pg/ml]														
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	6	8	Standardabweichung [pg/ml]						
								0	1	2	3	4	6	8
MMP-1	36758	10905	11314	18894	20283	17907	23488	3235	261	895	1670	4572	831	369
MMP-2	752	52	446	78	568	36	236	233	11	47	15	77	17	77
MMP-3	277	4	81	831	0	34	0	57	5	51	141	0	0	0
MMP-8	936	9596	6663	5403	31616	4850	6917	553	406	420	240	2096	294	242
MMP-9	67076	107024	21982	19245	150839	18301	22948	6244	12909	1913	1709	2641	446	989
MMP-10	7	14	14	231	191	44	40	4	6	2	16	31	6	4
MMP-13	213	278	0	0	52	1	7	83	61	0	0	0	0	8
TIMP-1	21771	21887	13069	10542	26552	11002	9267	4221	1463	1556	1009	734	789	395
TIMP-2	3566	1856	2264	1947	3298	1202	918	813	527	412	177	605	309	127
TIMP-4	198	174	85	25	8	80	44	21	85	19	9	0	18	9

Tabelle 22: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 2. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

Ungewichtete Messdaten [pg/ml]		Standardabweichung [pg/ml]								
Behandlungswoche	0	1	2	3	6	0	1	2	3	8
MMP-1	37625	379	9784	948	907	1970	19	245	38	187
MMP-2	10	0	0	8	0	1	0	0	1	0
MMP-3	2172	0	12	0	0	110	0	9	0	0
MMP-8	3767	3031	3257	3918	4104	106	128	173	72	141
MMP-9	19180	19653	17634	22143	26506	237	851	116	608	766
MMP-10	506	30	115	3	21	40	4	13	1	3
TIMP-1	7040	2556	4970	2681	4891	358	27	247	292	447
TIMP-2	4329	852	1903	1032	1593	484	77	261	93	473
Bezogen auf 100 µg Protein [pg/ml]										
Behandlungswoche	0	1	2	3	8	0	1	2	3	8
MMP-1	2998	199	1723	494	449	157	10	43	20	92
MMP-2	1	0	0	4	0	0	0	0	0	0
MMP-3	173	0	2	0	0	9	0	2	0	0
MMP-8	300	1595	573	2041	2032	8	68	30	38	70
MMP-9	1528	10344	3105	11533	13122	19	448	21	317	379
MMP-10	40	16	20	2	10	3	2	2	1	2
TIMP-1	561	1345	875	1396	2421	29	14	44	152	221
TIMP-2	345	448	335	538	789	39	40	46	49	234

Tabelle 23: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 3. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **Konz.** = Konzentration; **Stabw.** = Standardabweichung; **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

Ungewichtet Behandlungs woche	Bezogen auf 100 µg/ml Protein											
	0			1			2			Behandlungs woche		
	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]
MMP-1	1248	802	3664	396	229	129	MMP-1	1212	736	2036	220	287
MMP-2	439	279	1127	352	0	0	MMP-2	427	256	626	196	0
MMP-3	0	0	0	0	5	4	MMP-3	0	0	0	0	6
MMP-8	26612	1491	38106	3449	3251	130	MMP-8	25836	1368	21170	1916	4073
MMP-9	81108	15378	111721	13486	39522	4498	MMP-9	78746	14108	62067	7492	49526
MMP-10	5	7	10	3	139	71	MMP-10	5	7	5	2	175
MMP-13	193	31	166	0	11	2	MMP-13	187	28	92	0	14
TIMP-1	18968	3012	44632	3965	3699	463	TIMP-1	18416	2763	24796	2203	4636
TIMP-2	1702	702	5973	1497	802	259	TIMP-2	1653	644	3318	832	1005
TIMP-4	106	152	47	11	80	53	TIMP-4	103	139	26	6	100

Tabelle 24: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 4. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **Konz.** = Konzentration; **Stabw.** = Standardabweichung; **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

Behandlungswoche	Bezogen auf 100 µg/ml Protein						Ungewichtete Messdaten					
	0			1			0			1		
	Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]		Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]		Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]		Konz. [pg/ml]	Stabw. [pg/ml]	
MMP-1	313	18		351	30	MMP-1	974	56		2405	203	
MMP-2	0	0		0	0	MMP-2	0	0		1	1	
MMP-3	0	0		9	5	MMP-3	0	0		63	34	
MMP-8	1101	45		567	12	MMP-8	3431	139		3884	81	
MMP-9	7062	176		3198	41	MMP-9	22003	549		21905	281	
MMP-10	4	3		20	1	MMP-10	11	10		135	4	
TIMP-1	209	19		495	37	TIMP-1	650	59		3393	252	
TIMP-2	148	32		102	10	TIMP-2	461	100		702	72	

Tabelle 25: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 5. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = tissue inhibitors of metalloproteinases.

Ungewichtete Messdaten [pg/ml]										Standardabweichung [pg/ml]								
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	8	8	Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	8
MMP-1	443531	62226	337705	102299	301627	256457	21256	322565	38922	MMP-1	38922	7312	22015	12923	17190	14673	2035	3993
MMP-2	1142	684	1194	940	258	38	436	178	108	MMP-2	108	164	293	96	231	232	561	157
MMP-3	5572	3254	5661	941	4068	5925	792	6176	627	MMP-3	627	2348	822	474	1190	872	204	1245
MMP-8	21480	6194	18643	10091	21731	13815	6889	17427	4642	MMP-8	4642	384	3941	985	3064	957	945	2794
MMP-9	107765	107656	92579	104230	101409	99362	96625	104656	12270	MMP-9	12270	8144	6062	7654	11511	7977	6129	8204
MMP-10	164	42	267	63	18	212	19	20	20	MMP-10	20	6	26	25	8	98	5	4
MMP-13	117	134	164	95	109	160	64	164	51	MMP-13	51	40	111	84	58	40	41	60
TIMP-1	68687	16095	51998	23686	33284	28792	11852	48770	4313	TIMP-1	4313	1540	4212	6497	2979	3504	1611	4375
TIMP-2	7957	2033	5340	1359	3656	3543	857	2854	2705	TIMP-2	2705	656	1556	299	946	1148	283	632
TIMP-4	378	125	256	103	206	397	61	212	54	TIMP-4	54	34	41	36	15	108	18	94

Bezogen auf 100 µg Protein [pg/ml]										Standardabweichung [pg/ml]								
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	8	8	Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	8
MMP-1	98344	43821	97603	106562	86674	117641	23104	87180	8630	MMP-1	8630	5149	6363	13461	4940	6731	2212	1079
MMP-2	253	482	345	979	74	17	474	48	24	MMP-2	24	116	85	100	66	106	610	42
MMP-3	1236	2292	1636	980	1169	2718	861	1669	139	MMP-3	139	1654	237	494	342	400	222	337
MMP-8	4763	4362	5388	10512	6245	6337	7489	4710	1029	MMP-8	1029	271	1139	1026	881	439	1027	755
MMP-9	23895	75814	26757	108573	29140	45579	105027	28286	2721	MMP-9	2721	5735	1752	7973	3308	3659	6662	2217
MMP-10	36	30	77	66	5	97	21	5	4	MMP-10	4	4	7	26	2	45	5	1
MMP-13	26	95	47	99	31	74	69	44	11	MMP-13	11	29	32	88	17	18	45	16
TIMP-1	15230	11334	15028	24672	9564	13207	12882	13181	956	TIMP-1	956	1085	1217	6768	856	1607	1751	1182
TIMP-2	1764	1431	1543	1415	1051	1625	932	771	600	TIMP-2	600	462	450	312	272	527	308	171
TIMP-4	84	88	74	107	59	182	66	57	12	TIMP-4	12	24	12	38	4	50	19	25

Tabelle 26: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 6. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

Ungewichtete Messdaten [pg/ml]													
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	8	Standardabweichung [pg/ml]						
							Behandlungswoche	0	1	2	3	4	8
MMP-1	5245	76821	3107	55720	123	12785	MMP-1	435	39397	58	8222	66	1345
MMP-2	855	729	242	856	260	364	MMP-2	150	210	75	240	302	104
MMP-3	1536	1856	543	1509	416	513	MMP-3	169	949	113	513	182	38
MMP-8	17639	35114	13110	30212	0	17113	MMP-8	1687	332	698	1594	0	1328
MMP-9	105192	110447	91955	103418	36	86277	MMP-9	4500	6974	4272	12265	16	29853
MMP-10	2	11	0	8	0	1	MMP-10	2	7	0	3	0	0
MMP-13	235	168	99	84	58	81	MMP-13	19	25	24	67	41	71
TIMP-1	2520	20787	2085	16708	25	5840	TIMP-1	229	2019	197	1837	22	188
TIMP-2	699	1810	447	2497	161	804	TIMP-2	81	1347	128	487	67	100
TIMP-4	176	289	107	193	109	134	TIMP-4	30	21	24	22	24	24

Bezogen auf 100 µg Protein [pg/ml]													
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	8	Standardabweichung [pg/ml]						
							Behandlungswoche	0	1	2	3	4	8
MMP-1	19427	41525	6754	42862	3070	20959	MMP-1	1611	21296	126	6325	1656	2204
MMP-2	3167	394	526	659	6499	597	MMP-2	554	113	163	184	7562	170
MMP-3	5687	1003	1180	1161	10402	842	MMP-3	625	513	245	394	4558	62
MMP-8	65328	18980	28500	23240	0	28054	MMP-8	6247	179	1517	1226	0	2177
MMP-9	389599	59701	199901	79553	895	141437	MMP-9	16665	3770	9286	9435	412	48940
MMP-10	8	6	0	6	0	1	MMP-10	6	4	0	3	0	0
MMP-13	871	91	216	64	1447	133	MMP-13	72	13	53	51	1014	116
TIMP-1	9333	11236	4532	12852	628	9574	TIMP-1	847	1092	429	1413	560	308
TIMP-2	2589	978	973	1921	4013	1319	TIMP-2	299	728	278	374	1664	163
TIMP-4	651	156	232	149	2715	220	TIMP-4	111	11	53	17	611	40

Tabelle 27: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 7. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

Ungewichtete Messdaten [pg/ml]										Standardabweichung [pg/ml]									
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	7	8
MMP-1	453737	251146	234094	10967	144496	327579	23819	159071	747	MMP-1	11447	30036	114666	7189	71664	12051	2547	115782	238
MMP-2	1862	1927	1731	2974	1834	371	745	1270	428	MMP-2	1004	977	435	0	138	437	251	0	0
MMP-3	10249	9494	7421	863	1596	7589	1614	2265	1786	MMP-3	842	1345	3961	856	642	1054	155	360	521
MMP-8	49753	44854	26277	28079	51689	21231	39690	30688	9070	MMP-8	16420	12172	23769	9211	20802	17961	4368	1812	3243
MMP-9	115946	114453	115593	95612	118496	115132	118594	130026	19696	MMP-9	3926	3261	65791	17210	31646	19697	3021	10383	6577
MMP-10	8	3	4	0	2	10	1	2	0	MMP-10	4	2	2	0	2	8	0	0	0
MMP-13	241	437	481	0	279	452	78	166	0	MMP-13	96	230	111	0	182	62	42	23	0
TIMP-1	55275	37005	22007	23227	10312	25549	13377	10192	24	TIMP-1	32321	10599	14776	8165	4957	11373	2899	3526	13
TIMP-2	7604	4179	3329	1027	946	3709	992	1263	0	TIMP-2	747	1797	2429	279	197	821	307	315	0
TIMP-4	721	262	148	342	149	94	235	101	0	TIMP-4	127	148	74	107	59	112	25	54	0

Bezogen auf 100 µg Protein [pg/ml]										Standardabweichung [pg/ml]									
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	7	8
MMP-1	119091	89695	83308	5993	74482	108470	22471	103968	1914	MMP-1	3004	10727	40806	3928	36940	3990	2403	75674	611
MMP-2	489	688	616	1625	945	123	702	830	1097	MMP-2	264	349	155	0	71	145	237	0	0
MMP-3	2690	3391	2641	471	822	2513	1522	1481	4579	MMP-3	221	480	1410	468	331	349	146	235	1335
MMP-8	13058	16019	9351	15344	26644	7030	37444	20057	23257	MMP-8	4310	4347	8459	5034	10723	5947	4121	1185	8315
MMP-9	30432	40876	41136	52247	61081	38123	111881	84984	50502	MMP-9	1030	1165	23413	9404	16312	6522	2850	6787	16864
MMP-10	2	1	1	0	1	3	1	1	0	MMP-10	1	1	1	0	1	3	0	0	0
MMP-13	63	156	171	0	144	150	73	108	0	MMP-13	25	82	39	0	94	21	40	15	0
TIMP-1	14508	13216	7832	12692	5316	8460	12619	6662	60	TIMP-1	8483	3785	5258	4462	2565	3766	2735	2305	33
TIMP-2	1996	1492	1185	561	488	1228	936	825	0	TIMP-2	196	642	865	152	102	272	290	206	0
TIMP-4	189	94	53	187	77	31	222	66	0	TIMP-4	33	53	26	58	30	37	24	35	0

Tabelle 28: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 8. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

Ungewichtete Messdaten [pg/ml]										Standardabweichung [pg/ml]						
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	6	7	0	1	2	3	4	6	7		
MMP-1	0	7779	114633	496	864	4402	0	0	350	3224	150	302	1730	0		
MMP-2	140	61	2537	603	1329	730	269	123	87	64	10	152	507	105		
MMP-3	0	0	427	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
MMP-8	1379	14384	23651	8718	12314	12378	2660	102	1690	4210	744	2293	939	289		
MMP-9	24530	87768	95926	68309	60362	78924	26524	1708	5601	3564	6429	6475	12676	4716		
MMP-10	23	102	24	25	33	12	3	2	21	3	2	8	4	4		
MMP-13	25	64	104	29	16	111	0	0	50	46	0	2	35	0		
TIMP-1	2412	25437	33619	4326	4287	7634	658	293	2029	2231	737	618	1518	164		
TIMP-2	623	1131	1440	514	521	538	402	83	266	301	162	94	153	220		
TIMP-4	0	262	430	0	61	59	151	0	82	99	0	0	0	215		

Bezogen auf 100 µg Protein [pg/ml]										Standardabweichung [pg/ml]						
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	6	7	0	1	2	3	4	6	7		
MMP-1	0	5637	79606	729	939	3439	0	0	253	2239	220	329	1352	0		
MMP-2	698	44	1762	887	1445	570	929	614	63	44	15	165	396	363		
MMP-3	0	0	296	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0		
MMP-8	6896	10424	16424	12821	13385	9670	9172	511	1224	2923	1094	2493	734	997		
MMP-9	122648	63600	66615	100455	65611	61660	91463	8541	4059	2475	9454	7039	9903	16262		
MMP-10	116	74	16	37	35	9	9	8	15	2	3	8	3	13		
MMP-13	124	47	72	42	17	87	0	0	36	32	0	3	27	0		
TIMP-1	12062	18433	23347	6362	4660	5964	2270	1463	1470	1549	1083	671	1186	564		
TIMP-2	3117	819	1000	756	566	421	1387	413	193	209	238	102	119	759		
TIMP-4	0	190	298	0	66	46	521	0	59	69	0	0	0	740		

Tabelle 29: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 9. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = *tissue inhibitors of metalloproteinases*.

Ungewichtete Messdaten [pg/ml]		Standardabweichung [pg/ml]														
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7
MMP-1	24825	10251	3117	1752	49	1334	3005	0	2206	361	272	32	8	173	167	0
MMP-2	9	0	3	0	0	1	3	0	1	0	1	0	0	1	2	0
MMP-3	59	284	0	0	0	0	0	0	8	26	0	0	0	0	0	0
MMP-8	4669	3334	3950	2338	1362	3405	3957	295	130	11	119	68	36	93	27	295
MMP-9	32460	24213	30770	16972	11892	22279	24092	2512	499	92	482	247	341	525	713	2512
MMP-10	554	2370	1616	1607	100	347	295	17	10	193	55	83	4	25	27	17
TIMP-1	8709	4654	5775	2313	554	3591	3901	0	314	86	277	238	20	365	216	0
TIMP-2	4034	1185	847	319	105	1604	870	8	416	166	222	15	24	311	198	8
TIMP-4	177	22	23	0	0	0	0	0	0	0	12	0	0	0	0	0

Bezogen auf 100 µg Protein [pg/ml]		Standardabweichung [pg/ml]														
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	7	0	1	2	3	4	5	6	7
MMP-1	6877	4218	1042	1055	66	221	1360	0	611	148	91	19	11	29	76	0
MMP-2	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
MMP-3	16	117	0	0	0	0	0	0	2	11	0	0	0	0	0	0
MMP-8	1293	1372	1321	1409	1816	565	1790	603	36	5	40	41	49	15	12	603
MMP-9	8992	9964	10291	10224	15856	3695	10902	5127	138	38	161	148	455	87	322	5127
MMP-10	153	975	540	968	133	58	133	35	3	80	18	50	5	4	12	35
TIMP-1	2412	1915	1932	1394	739	595	1765	0	87	36	93	143	27	60	98	0
TIMP-2	1117	488	283	192	140	266	394	15	115	69	74	9	32	52	89	15
TIMP-4	0	9	8	0	0	0	0	0	0	0	4	0	0	0	0	0

Tabelle 30: MMP- und TIMP-Konzentrationen in Exsudaten von Patient 10. Die Ermittlung der MMP- und TIMP-Konzentrationen erfolgte mittels Protein-Microarray. Angegeben sind Mittelwerte und die Standardabweichung aus je n = 4 Messungen pro Behandlungswoche. **MMP** = Matrixmetalloproteinase; **TIMP** = tissue inhibitors of metalloproteinases.

Ungewichtete Messdaten [pg/ml]										Standardabweichung [pg/ml]									
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	5	6	7		
MMP-1	23030	125769	25081	19853	6985	49406	2547	8047	1644	3233	958	1976	390	8410	323	740			
MMP-2	62	63	29	24	18	32	5	24	7	29	10	18	4	16	3	4			
MMP-3	465	1571	389	225	152	1058	21	102	35	151	48	14	19	43	12	27			
MMP-8	9801	12463	11666	11678	9790	10748	7576	10274	563	949	764	390	578	312	435	252			
MMP-9	81850	84039	72640	76647	64382	63742	61952	60385	1015	990	1363	3236	3465	1094	1555	8375			
MMP-10	898	4893	713	618	1929	2435	675	545	105	303	33	13	73	108	39	140			
MMP-13	26	42	62	31	32	16	12	16	5	6	5	8	3	9	4	7			
TIMP-1	11220	18413	13132	9058	8268	12876	4345	6995	864	4222	479	1172	2382	1811	326	422			
TIMP-2	1393	6246	6293	2374	1798	3617	1221	1327	134	347	759	199	329	691	248	197			
TIMP-4	60	86	59	51	31	60	36	39	27	19	16	26	17	20	14	30			

Bezogen auf 100 µg Protein [pg/ml]										Standardabweichung [pg/ml]									
Behandlungswoche	0	1	2	3	4	5	6	7	8	0	1	2	3	4	5	6	7		
MMP-1	6524	19469	5057	6753	1824	7817	1415	2134	466	500	193	672	102	1331	179	196			
MMP-2	17	10	6	8	5	5	3	6	2	5	2	6	1	2	2	1			
MMP-3	132	243	78	76	40	167	12	27	10	23	10	5	5	7	7	7			
MMP-8	2776	1929	2352	3972	2556	1701	4209	2725	159	147	154	133	151	49	242	67			
MMP-9	23187	13009	14645	26071	16810	10086	34418	16017	287	153	275	1101	905	173	864	2221			
MMP-10	254	757	144	210	504	385	375	145	30	47	7	4	19	17	22	37			
MMP-13	7	7	13	11	8	3	6	4	1	1	1	3	1	1	2	2			
TIMP-1	3179	2850	2648	3081	2159	2037	2414	1856	245	654	97	399	622	287	181	112			
TIMP-2	395	967	1269	807	469	572	678	352	38	54	153	68	86	109	138	52			
TIMP-4	17	13	12	17	8	10	20	10	8	3	3	9	4	3	8	8			

11. Danksagung

Ich möchte mich sehr herzlich bei Prof. Dr. W. F. Martin für die Übernahme des Erstgutachtens bedanken. Bei Herrn Prof. Dr. H. Mehlhorn möchte ich mich ebenso herzlich für die Involvierung in dieses und andere sehr interessante Projekte und die Übernahme des Zweitgutachtens bedanken.

Ein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeitern der Hautklinik des Universitätsklinikums Düsseldorf unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. B. Homey für die exzellente Kooperation. Insbesondere danke ich Herrn PD Dr. P. A. Gerber, Herrn Dr. N.P. Hoff und Frau Dr. T. Jansen. An dieser Stelle möchte ich mich auch bei den Patienten bedanken, die bereitwillig an den Heilversuchen teilgenommen haben.

Für die weitere Kooperation möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene des Universitätsklinikums Düsseldorf unter Leitung von Herrn Prof. Dr. K. Pfeffer und ganz besonders bei Frau Dr. S. Petersdorf für die ausgezeichnete Zusammenarbeit und die vielen intensiven Gespräche bedanken. Nicht weniger herzlich möchte ich mich bei Prof. Dr. C. R. MacKenzie bedanken, der mich als Mentor während der Doktorandenzeit betreut hat.

Bei Prof. Dr. J. D'Haese möchte ich mich sehr herzlich für das Bereitstellen eines Laborplatzes nach Auflösung des Instituts und seine thematischen Anregungen bedanken. Ich möchte mich auch bei den vielen ehemaligen Mitgliedern des Instituts „Zoologie II“ für die letzten Jahre bedanken, ganz besonders aber bei Frau Agnes Papala und Frau Sinem Kanber sowie Frau Susanne Walter aber auch bei der biologischen Diskussionsgruppe „Moorenstraße“ unter Leitung von Dr. Denis Delic sowie Frau Lisa und Herrn Dr. Martin Leyendecker, die mir öfters weiterhalfen. Zudem möchte ich mich bei Herrn Predrag Marinovski für Brot und Tischtennisspiele bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meiner Freundin Margarita, die mir stets liebevoll zur Seite gestanden hat und mir in meinem Vorhaben stets volle Unterstützung hat zukommen lassen. Ich möchte mich auch bei meiner Mutter und meiner Familie bedanken, die mir stets zur Seite standen und den Rücken freihielten.

Ich möchte auch Herrn Dr. Alija und Frau Tanja Repic sowie allen meinen Freunden meinen Dank für die Unterstützung in der Freizeitgestaltung aussprechen. „*Last but not least*“ bedanke ich mich bei meinem engsten und ältesten Freund, Herrn Dr. Marcel Noack, den mir das Schicksal zur rechten Zeit zur Seite gestellt hat, fürs Freund sein, aber auch für die gemeinsamen Mittwoch-Abende zusammen mit Herrn Kristof Becker.

12. Veröffentlichungen

12.1. Buchkapitel

Förster M, Gestmann F, Mehlhorn H, Sievert K, Messler S, Neuhausen N, Petersdorf S, Pfeffer K (2012) Flies as Vectors of Parasites Potentially Inducing Severe Diseases in Humans and Animals. In: Mehlhorn H (ed) Arthropods as Vectors of Emerging Diseases. Parasitology Research Monographs, vol 3. Springer Berlin Heidelberg, p 227-253

Gestmann F, Förster M, Mehlhorn H, Sievert K, Messler S, Neuhausen N, Petersdorf S, Pfeffer K (2012) Flies as Vectors of Microorganisms Potentially Inducing Severe Diseases in Humans and Animals. In: Mehlhorn H (ed) Arthropods as Vectors of Emerging Diseases. Parasitology Research Monographs, vol 3. Springer Berlin Heidelberg, p 195-226

Mehlhorn H, Gestmann F (2011) Extracts from Fly Maggots and Fly Pupae as a “Wound Healer”. In: Mehlhorn H (ed) Nature Helps. Parasitology Research Monographs, vol 1. Springer Berlin Heidelberg, p 325-348

12.2. Poster und Kongressbeiträge

Petersdorf S, Gestmann F, MacKenzie C, Pfeffer K, Mehlhorn H (2014) Birds as vectors of various human pathogenic parasites. 24th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2014). Barcelona

Hoff NP, Jansen T, Buhren BA, Gestmann F, Schrupf H, Homey B, Mehlhorn H, Gerber PA (2014) Larveel als neue Strategie für das Management von chronischen Wunden. Fälle Fakten Pharmaka. 17. Tagung der Dermatologischen Wissenschafts- und Fortbildungsakademie NRW (DWFA 2014). Köln

Petersdorf S, Gestmann F, Mehlhorn H, Pfeffer K, MacKenzie C (2013) No spread of multi-resistant Enterobacteriaceae through flies and birds yet. 23rd European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases (ECCMID 2013). Berlin

Hoff NP, Gerber PA, Jansen MT, Buhren BA, Gestmann F, Schrupf H, Bölke E, Mehlhorn H, Homey B, (2013) Herstellung eines lyophilisierten Extraktes aus der Larve der Goldfliege *Lucilia sericata*: Eine neue Strategie für das Management von chronischen Wunden. 16. Jahreskongress der Deutschen Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. (DGFW 2013). Bielefeld

12.3. Vorträge

Gestmann F, Mehlhorn H, Petersdorf S, Pfeffer K (2012) Endemic flies and (migratory) birds as possible vectors for agents of diseases in the region of Düsseldorf and Duisburg. GIQS. SafeGuard-Konferenz. Wageningen.

Gestmann F (2010) Methods to use Extracts of Fly Maggots and Pupae for Covering non or bad healing Wounds. Joint Meeting of the German Societies of Parasitology and Protozoology. Duesseldorf

12.4. Populärwissenschaftliche Artikel

Norman NP, Jansen T, Buhren BA, Schrumpf H, Gestmann F, Bölke E, Homey B, Mehlhorn H, Gerber PA (2014) Lyophilisiertes Fliegenlarvenextrakt für das Management chronischer Wunden. Haut 14(4):120-124

13. Versicherung an Eides Statt

Ich versichere an Eides Statt, dass die Dissertation von mir selbständig und ohne unzulässige fremde Hilfe unter Beachtung der „Grundsätze zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf“ erstellt worden ist.

Ich habe die Dissertation keiner anderen Fakultät vorgelegt und auch keine vorherigen erfolglosen oder erfolgreichen Promotionsversuche unternommen.

Duisburg, den 04.08.2015

Falk Peer Gestmann