

„Diagnostics beyond bacteria“ – Wundabstriche zur Analyse biomolekularer Krankheitsmuster in chronischen Wunden

Julian-Dario Rembe, Waseem Garabet, Jan-Wilm Lackmann, Matthias Augustin, Joachim Dissemond, Sebastian Alexander Scharf, Anna Rommerskirchen, Tobias Wienemann, Wiebke Ibing, Hubert Schelzig & Ewa K. Stuermer

Article - Version of Record



Suggested Citation:

Rembe, J.-D., Garabet, W., Lackmann, J.-W., Augustin, M., Dissemond, J., Scharf, S. A., Rommerskirchen, A., Wienemann, T. H. G., Ibing, W., Schelzig, H., & Stuermer, E. K. (2024). „Diagnostics beyond bacteria“ – Wundabstriche zur Analyse biomolekularer Krankheitsmuster in chronischen Wunden. *Gefäßchirurgie*, 29(5), 269–279. <https://doi.org/10.1007/s00772-024-01122-8>

Wissen, wo das Wissen ist.

This version is available at:

URN: <https://nbn-resolving.org/urn:nbn:de:hbz:061-20241203-111617-1>

Terms of Use:

This work is licensed under the Creative Commons Attribution 4.0 International License.

For more information see: <https://creativecommons.org/licenses/by/4.0>

Gefäßchirurgie 2024 · 29:269–279
<https://doi.org/10.1007/s00772-024-01122-8>
 Angenommen: 18. Juli 2024
 Online publiziert: 29. Juli 2024
 © The Author(s) 2024



„Diagnostics beyond bacteria“ – Wundabstriche zur Analyse biomolekularer Krankheitsmuster in chronischen Wunden

Julian-Dario Rembe¹ · Waseem Garabet¹ · Jan-Wilm Lackmann² · Matthias Augustin³ · Joachim Dissemond⁴ · Sebastian Alexander Scharf⁵ · Anna Rommerskirchen⁵ · Tobias Wienemann⁵ · Wiebke Ibing¹ · Hubert Schelzig¹ · Ewa K. Stuermer⁶

¹ Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie, Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD), Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland; ² Cologne Excellence Cluster for Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases (CECAD), Universität Köln, Köln, Deutschland; ³ Institut für Versorgungsforschung in der Dermatologie und bei Pflegeberufen (IVDP), Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), Hamburg, Deutschland; ⁴ Klinik und Poliklinik für Dermatologie, Venerologie und Allergologie, Universitätsklinikum Essen, Essen, Deutschland; ⁵ Institut für Medizinische Mikrobiologie und Krankenhaushygiene, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, Düsseldorf, Deutschland; ⁶ Klinik und Poliklinik für Gefäßmedizin, Universitäres Herz- und Gefäßzentrum, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf (UKE), Hamburg, Deutschland

Zusammenfassung

Hintergrund: Patientenindividuelle Therapieansätze sind in der Versorgung von Menschen mit chronischen Wunden wichtig. Die Heterogenität zugrunde liegender Krankheitsprofile ebenso wie die Diversität des Wundmilieus erschweren generalisierbare Ansätze. Während molekulare Analyseverfahren wie Hochdurchsatzverfahren (OMICS) zunehmend verbreiteter und besser verfügbar sind, hat die Analyse von objektiven biomolekularen Krankheitsmustern weitestgehend keinen Eingang in die alltägliche Diagnostik und Therapiesteuerung gefunden.

Fragestellung: Die Nutzung von Wundabstrichen für die Analyse von Biomarkern und Krankheitsmustern in kutanen Wunden wurde evaluiert.

Material und Methoden: Es erfolgte die Analyse einer Probekohorte aus dem multizentrischen „Wound-BIOME“-Projekt. Das Projekt zielt auf die Erforschung des lokalen Wundmilieus verschiedener Entitäten, Heilungstendenzen und Regenerationsstadien auf biomolekularer Ebene ab. Hierzu wurde ein alltagstaugliches Protokoll zur Probengewinnung und -handhabung entwickelt und erprobt. Des Weiteren wurden Machbarkeitsanalysen für Multiplex-Immunoassays, Proteomics und Metagenomanalysen (Mikrobiom) durchgeführt.

Ergebnisse: Trotz Heterogenität zwischen den Proben konnten ausreichende Mengen Protein und mikrobielle DNA mit adäquater Qualität extrahiert werden, um biomolekulare Muster zu analysieren. Erste Analysen von deskriptiven Proteinsignaturen und mikrobieller Taxonomie zeigen vielversprechende Ansätze für zukünftige individuelle, objektive Diagnostik und gezielte therapeutische Interventionen.

Schlussfolgerung: Standardisierte Wundabstriche zeigen sich insgesamt gut geeignet, um Probenmaterial für die Analyse des komplexen Wundmilieus mittels verschiedener Hochdurchsatzverfahren zu gewinnen.

Schlüsselwörter

Personalisierte Medizin · Wundheilung · Immunoassay · Proteomics · Metagenomics



QR-Code scannen & Beitrag online lesen

Hinführung zum Thema

Die Diagnose und Behandlung von chronischen Wunden stellen nach wie vor eine Herausforderung im klinischen Alltag dar. Die fortschreitende Entwicklung und verbesserte Verfügbarkeit molekularer Analyseverfahren eröffnen jedoch neue Möglichkeiten zur systematischen Charakterisierung von Wunden auf molekularer Ebene. Hochdurchsatzverfahren wie verschiedene Multiplex- und OMICS-Ansätze (Proteomics, Transcriptomics, Microbiomics) können der Heterogenität und Komplexität des Wundmilieus entgegenzutreten [2, 4].

In diesem Zusammenhang gewinnt die Untersuchung der biomolekularen Signatur von chronischen Wunden zunehmend an Bedeutung. Akute und chronische Wunden unterscheiden sich nicht nur in ihrem zeitlichen Verlauf, sondern auch in ihrer molekularen Zusammensetzung und ihrem Heilungsprozess [6]. Prolongierte Inflammation [25], destruktives proteolytisches Milieu [11], chronische Biofilminfektion [14] oder dysregulierte zelluläre Phänotypverschiebungen [8] sind mechanistische Probleme, die genannt werden können. Die Identifizierung spezifischer Biomarker, die mit der Wundentität, dem Heilungsprozess oder fehlregulierten Prozessen korrelieren, könnte daher einen wichtigen Beitrag zur personalisierten Wundbehandlung leisten. Hierfür benötigt es jedoch einen geeigneten und ubiquitär verfügbaren Zugang zu biologischem Material.

Wundabstriche bieten hier eine einfach anzuwendende und schmerzfreie Möglichkeit, eine Vielzahl von Biomolekülen aus dem Wundmilieu zu extrahieren. Zu diesen Biomolekülen zählen Proteine, DNA, RNA und metabolische Produkte [7]. In der mikrobiologischen Diagnostik sind Wundabstriche fest etabliert und liefern wichtige therapeutische Informationen [18].

Die vorgestellte Arbeit untersucht, inwiefern Wundabstrichen für weitere diagnostische Anwendungsbereiche verwendet werden können – spezifisch zur Analyse der Signatur akuter und chronischer Wunden. Wir demonstrieren eine mögliche, alltagstaugliche Methode zur Probenahme und -verarbeitung sowie die

Ergebnisse erster Machbarkeitsanalysen bzgl. Materialmenge, -qualität und grundlegender Auswertung. In diesem Kontext beleuchten wir potenzielle Anwendungen dieser potenziellen diagnostischen Option.

Material und Methoden

Studiendesign und Rekrutierung

Diese observative, nicht-interventionelle, multizentrische Kohortenstudie stellt die erste Machbarkeitsanalyse des ‚Wound-BIOME‘-Projekt („Breakdown, Identification and Observation of the Micro-Environment in acute and chronic Wounds“) dar. Hierbei handelt es sich um ein multizentrisches Projekt mit dem Ziel ein besseres Verständnis der biomolekularen Signaturen des komplexen Wundheilungsprozesses zu entwickeln. Hierzu werden moderne Analyseverfahren angewandt, um diese für Diagnostik und Therapie objektiv und individuell nutzbar zu machen.

In dieser Studie wurden Protokolle für die Wundvorbereitung, Abstrichentnahme und Weiterverarbeitung der Proben entwickelt und getestet. Die Etablierung eines einheitlichen Protokolls dient der Varianzreduktion in der Probenakquise, damit die technische Handhabung möglichst wenig Bias in die Analyseergebnisse einbringt. Gleichzeitig muss der Prozess einfach und stabil gehalten sein, um perspektivisch außerhalb universitärer Zentren und im ambulanten Setting regulär nutzbar zu sein. **Abb. 1** stellt den Prozess schematisch dar.

Für die Machbarkeitsanalysen wurden Probekohorten rekrutiert, um Abläufe, Qualität, Quantität und Eignung der Proben für biomolekulare Analyseverfahren zu evaluieren (**Tab. 1**). Hierbei handelte es sich um je mindestens 12 Proben für Immunoassay- und Proteomanalysen und 6 für Metagenomic. Zusätzlich wurden klinisch-demografische Begleitdaten (z. B. Alter, Wundgröße, -entität) erhoben sowie die Wunden bzgl. Heilungstendenz, Heilungsphase und mikrobieller Belastung klinisch kategorisiert, um Analysen zur Korrelation durchzuführen.

Aufgrund des explorativen Studiendesigns wurden die Ein- und Ausschlusskri-

terien breit formuliert (**Tab. 2**). Positive Ethikvoten der beteiligten Studienzentren Universität Witten/Herdecke (Nr. 11/2018), Essen (Nr. 18-8432-BO), Hamburg (Nr. PV5883) und Düsseldorf (Nr. 2020-1012) wurden im Vorfeld eingeholt und alle rekrutierten Patientinnen und Patienten im Vorfeld ausführlich schriftlich aufgeklärt.

Prozess der Probengewinnung

Abstrichtupfer

Die Abstrichentnahme erfolgte mittels einzeln verpackten, humane DNA-/RNA-freien FLOQSwabs®-Tupfern (Copan Diagnostics Inc., Murrieta, USA) mit aufgesprayter Nylon®-Faserstruktur. Es handelt sich hierbei um die am weitesten verbreiteten Abstrichtupfer in der mikrobiologischen Diagnostik und wurden bereits in früheren Studien angewandt [7, 13]. Sie ermöglichen eine gute Abgabe der gewonnenen Probe in geeignete Transportmedien.

Probengefäß und Transportmedium

Als Probengefäß wurden übliche Eppendorf-Tubes (1,5 ml; Eppendorf SE, Hamburg) verwendet, welche mit 1 ml Transportmedium befüllt wurden. Für Proben zur Proteinanalyse wurde als Transportmedium phosphatgepufferte Salzlösung (PBS) mit einem universellen Protease-/Phosphataseinhibitor (PPC1010; Sigma-Aldrich, Merck KGaA, Darmstadt) als Degradierungsschutz verwendet.

Für Proben zur RNA-/DNA-Analyse erfolgte der Transport in RNAlater™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) zur Stabilisierung und Schutz der RNA/DNA. Die Probenbehälter wurden im Vorfeld vorbereitet und bis zur Verwendung bei 7°C im Kühlschrank aufbewahrt.

Probenlagerung

Nach erfolgter Probenakquise wurde die gewonnene Probe inklusive Tupferspitze innerhalb von maximal 2 h auf –18 bis –20°C eingefroren und innerhalb von spätestens 24 h auf –80°C. Es wurde insbesondere darauf geachtet, dass möglichst wenige Einfrier-/Abtauzyklen stattfinden, um die Stabilität der Proteine und Nukleinsäuren möglichst wenig zu gefährden.

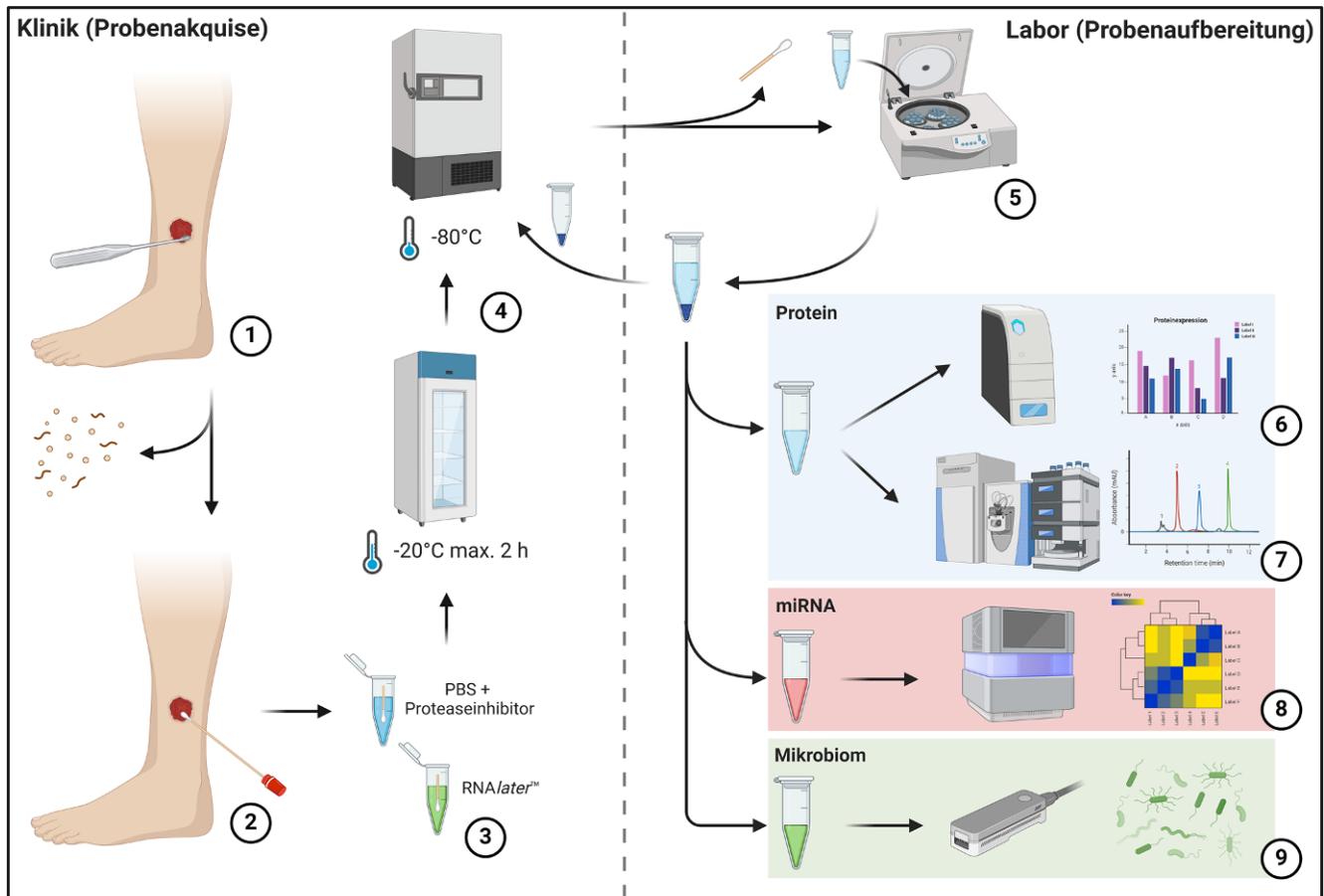


Abb. 1 ▲ Prozess der Probengewinnung und -aufbereitung sowie Zuführung zu „Down-stream-Analysen“: (1) mechanische Reinigung des Wundbetts, (2) Abstrichentnahme mittels FLOQSwab® nach Essener Kreisel, (3) Einbringen in Transportmedien, (4) Einfrieren, (5) Probenaufbereitung, (6) Multiplex-Immunoassay, (7) Proteomik, (8) Small-RNA-Sequencing, (9) Metagenomik (*miRNA* Mikro-RNA). (Erstellt mit BioRender.com)

Abstrichtechnik und Entnahmeprotokoll

Um bei der Gewinnung der Abstrichproben eine möglichst geringe Variabilität zwischen rekrutierenden Zentren zu generieren, wurde ein exaktes Ablaufprotokoll entworfen (■ Tab. 3).

Als Abstrichtechnik wurde der „Essener Kreisel“ [3] festgelegt, da diese Technik die gesamte Wundfläche einschließt, wodurch eine holistische Gesamtsignatur gewonnen werden kann. Der Tupferkopf wird dabei immer wieder rotiert, so dass eine vollständige Sättigung des Abstrichtupfers erfolgt.

Probenaufbereitung für weiterführende Analysen

Generelle Probenprozessierung und -aliquotierung

Zur Aufbereitung der Wundabstrichproben erfolgte ein einmaliger Auftau-/Abtauzyklus, bei dem der Abstrichtupfer entfernt, zelluläre und Detritusanteile abzentrifugiert und die Proben für geplante Down-stream-Analysen aliquotiert wurden. Dabei wurden die Proben mit dem noch enthaltenen Tupfer gevortexed, um möglichst viele Analyte vom Swab in das Transportmedium freizusetzen (95–98% der gebundenen Analyte). Der Abstrichtupfer wurde anschließend entfernt und 2 Zentrifugationsschritte zur Entfernung von Detritusanteilen durchgeführt: 10.000 xg für 15 min bei 4°C (für RNA/DNA: 500 xg für 15 min) und erneut bei 10.000 xg für 15 min (für RNA/DNA:

2000 xg für 10 min) nach Überführung in ein neues Gefäß.

Down-stream-Analysen der Proben

Quantitäts- und Qualitätsanalysen und Probenmaterial

Um eine ausreichende Analytmenge und -qualität in den Proben zu gewährleisten, wurden entsprechende Messungen durchgeführt. Die Gesamtproteinmenge pro Probe wurde mittels Bradford-Assay (Coomassie [Bradford] Protein Assay Kit, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, USA) gemessen.

Die Extraktion und Aufreinigung von mikrobieller DNA erfolgte mittels DNeasy PowerSoil Pro Kit (Qiagen N.V., Hilden, Deutschland). Die Quantifizierung von doppelsträngiger DNA vor Metagenomsequenzierung erfolgte mittels Fluoreszenz-basierter Messung mit dem Qubit™

Tab. 1 Charakteristika Probekohorte und erfolgte Analysen pro Probe

ID	Ätiologie	Status	Zentrum	Immunoassay	Proteom	Mikrobiom
P003	DFS	NH	UWH	✓	–	✓
P011	AVK	NH	UWH	✓	✓	✓
P012	AVK	NH	UWH	–	✓	✓
P020	CVI	NH	UWH	–	✓	✓
P027	WHST	NH	UKE	✓	✓	–
P031	CVI	NH	UKE	✓	✓	✓
P037	PG	NH	UKE	✓	✓	–
P039	AVK	NH	UKES	✓	–	–
P040	PG	NH	UKES	✓	✓	–
P041	WHST	H	UKES	✓	✓	–
P042	CVI	NH	UKES	✓	✓	–
P078	DFS	H	UKES	✓	–	✓
P097	AW	H	UKD	✓	✓	–
P102	AW	H	UKD	–	✓	–
P102	AW	H	UKD	✓	✓	–

H heilend, *NH* nicht-heilend, *DFS* diabetisches Fußsyndrom, *AVK* periphere arterielle Verschlusskrankheit, *CVI* chronisch venöse Insuffizienz, *WHST* postoperative Wundheilungsstörung, *PG* Pyoderma gangraenosum, *AW* akute Wunde, *UWH* Universität Witten/Herdecke, *UKE* Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf, *UKES* Universitätsklinikum Essen, *UKD* Universitätsklinikum Düsseldorf

Tab. 2 Ein- und Ausschlusskriterien

Einschlusskriterien	Ausschlusskriterien
PatientInnen ≥ 18 Jahre	PatientIn < 18 Jahre
Wundfläche ≥ 1,5 cm ²	Wundfläche < 1,5 cm ²
Vorliegen einer Wunde, welche entweder länger als 8 Wochen unter adäquater Therapie („chronisch“) besteht ODER aufgrund ihrer Grunderkrankung als chronisch anzusehen ist ^a Nicht kürzer als 24 h und nicht länger als 6 Tage nach traumatischem Ereignis/chirurgischer Intervention („akut“) besteht	Trockene Nekrose Schwangerschaft und Stillzeit Maligne Genese der Wunde (z. B. ulzerierender Weichteiltumor)

^aGemäß der aktuellen Definition der Initiative Chronische Wunden e. V. (ICW; [3])

Flex Fluorometer (Invitrogen by Thermo Scientific™, Waltham, USA).

Multiplex-Immunoassays

Um die Konzentration mehrerer Immuno-marker zu bestimmen, erfolgte die Durchführung von Multiplex-Immunoassays. Hierfür wurde das Luminex MAGPIX System mit der xMAP®-Technologie (DiaSorin S.p.A., Saluggia, Italy) und ProcartaPlex™ Multiplex-Immunoassay-Kits (Thermo Scientific™, Waltham, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um eine auf magnetischen Beads basierende Methode. Die Beads sind mit Capture-Antikörpern für spezifische Analyte beschichtet. Nach Zugabe und Bindung der Analyte werden Detektionsantikörper zugegeben. Nach Zugabe und Bindung von Streptavidin-Phycoerythrin (PE) kann der gebildete

Komplex im MAGPIX analysiert werden. Die Messung erfolgt dabei mit einer CCD-Kamera („charge-coupled device“). Die Quantifizierung erfolgt anschließend mittels der integrierten xPONENT-Software. Mit dieser Methode können bis zu 50 Analyte gleichzeitig in einer einzelnen Probe gemessen werden, wobei eine Probenmenge von 50 µl ausreicht. Insgesamt wurden 36 verschiedene Analyte gemessen (z.B. Interleukin 6 [IL-6], Matrixmetalloproteinase 9 [MMP-9], TIMP-1 [„tissue inhibitor of metalloproteinase 1“], VEGF [„vascular endothelial growth factor“]).

Proteomics

Zur Identifizierung aller in der Abstrichprobe vorliegenden Proteine („Proteom-Profiling“) wurde die Methode der „Bottom-

Tab. 3 Stichpunktartiger Ablauf der Probengewinnung inklusive kritischer Punkte

Probengewinnung und -asservierung

- Entfernung Verbandmaterial von Wunde
Ausschließlich Verwendung neutraler Spüllösungen zum Lösen von Belägen und Verbänden vor Probenentnahme (Verhinderung Probenverfälschung)
- Mechanische Reinigung/ggf. scharfes Débridement der Wunde und Entfernung von Belägen (zur Probenentnahme des tatsächlichen Wundgrund)
- Kein scharfes Débridement, um Blutungen zu vermeiden bzw. bei ungewollter Blutung zuerst vollständige Blutstillung (Verhinderung eines Samplings des Blutprofils)
- Abstrich nach Essener Kreisel mit Tupfer bis Kopf sichtbar gesättigt
Nutzung von max. 5 ml neutrale Flüssigkeit (z. B. 0,9% NaCl) zur Befeuchtung des Wundbetts vor Probenentnahme möglich
- Einbringen des gesättigten Tupfers in Transportbehälter, Abbrechen an Sollbruchstelle und Behälter verschließen
- Einfrieren auf mindestens –18 °C innerhalb von 2 h und auf –80 °C innerhalb 24 h

up-shotgun-Proteomic“ verwendet. Hierbei wurden vorliegende Proteine in der Probe aufgereinigt und konzentriert sowie anschließend durch eine enzymatische Verdauung (mittels Trypsin) in Peptide zerkleinert. Die Messung der Peptide erfolgte anschließend mittels Massenspektrometrie (MS) in der Tandem-MS-Technik (MS/MS) mit vorgeschalteter Nanoflüssigchromatografie (nLC) und DDA-Messansatz („data-dependent acquisition“).

Für die Probenaufarbeitung wurde eine Kombination der S-trap-Methode und der STAGE-tip-Methode verwendet. Je nach vorliegender Proteinkonzentration in der Probe wurde das S-Trap™ Mini (100–300 µg/ml) oder Micro Spin (< 100 µg/ml) Säulenverdau Protokoll (ProtiFi LLC, Fairport, USA) angewendet. Zur weiteren Aufreinigung der Probe (Entfernung Salze und Detergenzien des ersten Protokolls) schloss sich als zweiter Schritt das STAGE-tip-Protokoll [12] an.

Die Messungen erfolgten auf der Orbitrap Exploris™ 480 (Thermo Scientific, Waltham, MA, USA). Die gemessenen Massenspektren (Chromatogramme) der Peptide wurden anschließend zur Proteini-identifikation bioinformatisch mit Peptid-/Proteindatenbanken abgeglichen. Hierfür

wurde das Softwarepaket MaxQuant [19] verwendet.

Metagenomics – Mikrobiom

Zur Bestimmung des Wund-Mikrobioms erfolgte eine metagenomische Analyse der Abstrichproben mit Hilfe der Nanopore-Sequenzierungstechnologie. Dabei können nicht nur kultivierbare Mikroorganismen detektiert werden, sondern basierend auf der mikrobiellen DNA alle vorliegenden Mikroorganismen. Nach DNA-Extraktion folgte die Erstellung einer DNA-Library mit dem Native Barcoding Kit 24 V14 (SQK-NBD114.24; Oxford Nanopore Technologies, Oxford, United Kingdom).

Für die Sequenzierung wurde die Nanopore-Technologie [22] auf dem PromethION mit R10-Nanoporen und V14-Chemie verwendet (Oxford Nanopore Technologies). Diese Technologie ist ein schnelles und genaues Verfahren zur Sequenzierung von Nukleinsäuren, die für ihre Fähigkeit bekannt ist, Long-read-Daten zu erzeugen, welche für metagenomische Studien geeignet sind. Die Sequenzierrohdaten wurden bioinforma-

tisch prozessiert und einer Qualitätskontrolle unterzogen. Anschließend wurde eine Klassifizierung der metagenomischen Proben vorgenommen.

Statistische Analysen

Für die Analyse der Ergebnisse der Multiplex-Immunoassays wurde GraphPad Prism (Version 10.2.3; GraphPad Software LLC, Boston, USA) verwendet. Die Werte sind als Mittelwerte \pm SEM („standard error of mean“) dargestellt. Die Skala wurde zur Veranschaulichung aufgrund unterschiedlicher Referenzskalen auf eine \log_{10} -Basis angepasst. Die Ergebnisse wurden anhand multipler ungepaarter t-Tests mit einem Holm-Sidak-Post-hoc-Test für multiple Vergleiche analysiert.

Die Ergebnisse der Proteomics-Analysen wurden mit Perseus (Version 1.6.15.0) analysiert [20]. Nach Datenbereinigung und -annotation erfolgte die Entfernung von fehlenden Werten in den Proben (80% valide Werte in wenigsten einer Gruppe). Anschließend wurden fehlende Daten aus der Normalverteilung impu-

tiert. Eine Normalisierung erfolgte mittels Mediansubtraktion. Die statistische Analyse differentiell exprimierter Proteine wurde mittels multiplen t-Tests mit False-discovery-Rate (FDR = 0,05)-Kontrolle durchgeführt.

Bei der Auswertung der Metagenomanalysen wurde eine taxonomische Klassifikation der Reads mit Kraken2 [24] sowie Approximation der Abundanzen mittels Bracken [9] durchgeführt. Eine Verifizierung der Ergebnisse erfolgte mittels Mapping (minimap2). Eine detaillierte Beschreibung des bioinformatischen Prozesses findet sich bei Spohr et al. [16]. Zur Visualisierung der mikrobiellen Spezies in den Wundabstrichen erfolgte die Erstellung von gestapelten Balkendiagrammen mittels des Python-basierten Altair-Pakets [21].

Ergebnisse

Quantität und Qualität – Protein

Die Gesamtmenge der vorliegenden Proteine in den Wundabstrichproben lag im

Hier steht eine Anzeige.

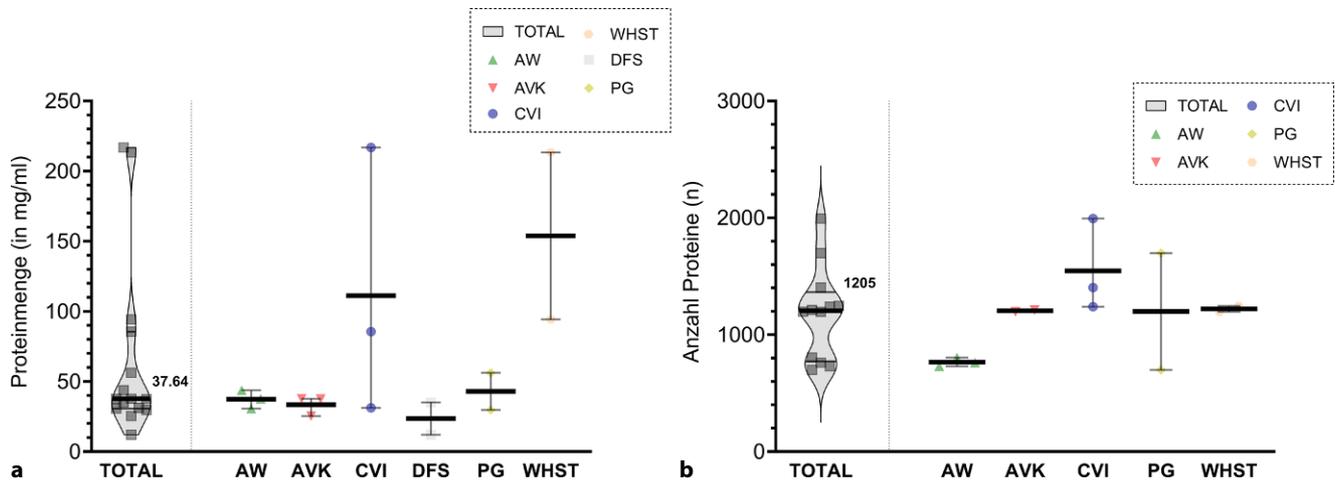


Abb. 2 ▲ Gemessene Gesamtproteinmengen (a) in den Abstrichproben ($n = 15$) sowie einzelnen Entitäten und Anzahl identifizierter Proteine in Wundabstrichproben (b). (AW akute Wunden; AVK arterielle Verschlusskrankheit; CVI chronisch venöse Insuffizienz; PG Pyoderma gangraenosum; WHST postoperative Wundheilungsstörung)

Median bei 37,64 (11,99–216,80) mg/ml. Dabei zeigte sich die Proteinmenge heterogen über die Entitäten hinweg, alle Wundabstriche ergaben jedoch mindestens 10 mg/ml, was eine ausreichende Quantität für mehrere Analysen ist (Abb. 2a). Die Anzahl der Proteinidentifikation in der Proteomik (Abb. 2b) über alle Proben hinweg lag im Median bei 1205 (Range 700–1994).

Quantität und Qualität – DNA

Bei der DNA-Extraktion konnte ebenfalls eine gewisse Probenheterogenität festgestellt werden (Tab. 4 und Abb. 5). Dabei zeigten sich Unterschiede in der gewonnenen DNA-Menge je nach Extraktion aus dem Probenüberstand oder Pellet (vgl. Abb. 1). Schlussendlich wurde entschieden, Zellpellet und Überstand für zukünftige metagenomische Analysen zu poolen. So konnte im Mittel $61,49 \pm 61,37$ ng/ μ l DNA aus den Wundabstrichproben isoliert werden.

Multiplex-Immunoassays

Die Analyse von Zytokinen, Chemokinen, Matrixmetalloproteasen (MMP) und Wachstumsfaktoren ergab im Vergleich zwischen heilenden und nicht-heilenden Wunden mehrere signifikante Unterschiede (Abb. 3) und belegt damit die erfolgreiche Analyse hinsichtlich inflammatorischer Marker. Proinflammatorische

Zytokine wie IL-17a, IL-1 α und IL-18 zeigten sich signifikant erhöht in nicht-heilenden Wunden ($p \leq 0,05$).

Erhöhte proinflammatorische Anzeichen zeigen auch die Ergebnisse der Bereiche Chemokine, MMP und Wachstumsfaktoren. Während sich nahezu alle Wachstumsfaktoren signifikant reduziert in nicht-heilenden Wunden zeigen ($p \leq 0,05$), sind die insbesondere während der Inflammation aktiven Chemokine (CCL-2, -3, -4 und CXCL10) in nicht-heilenden Wunden erhöht exprimiert. Hingegen ist das ebenfalls in die inflammatorische Antwort involvierte CXCL-8 in dieser Probekohorte signifikant erhöht in heilenden Wunden.

Ähnlich zeigen die analysierten MMP überwiegend eine höhere Konzentration in nicht-heilenden Wunden als in heilenden Wunden, wobei MMP-7 und MMP-13 signifikant sind ($p \leq 0,05$). MMP-8 wiederum zeigt sich in dieser Probekohorte in heilenden Wunden signifikant erhöht. Der „tissue inhibitor of metalloproteinase 1“ (TIMP-1) wiederum als Gegenspieler der MMP zeigt sich in nicht-heilenden Wunden reduziert, in dieser Kohorte allerdings nicht statistisch signifikant.

Proteomics

Die Analyse der Proteomdaten zeigt vielversprechende explorative Ansätze. Insgesamt konnten über 2907 verschiedene Proteine identifiziert werden, darunter rele-

vante Proteine des Regenerationsprozesses: Treiber und Bausteine der Geweberegeneration (z. B. Kollagen, Laminin und Keratin) und Proteine der Immunabwehr wie antimikrobielle Peptide (z. B. α -Defensin), Enzyme (z. B. Myeloperoxidase), Komplementfaktoren oder Immunglobuline. Diese und weitere relevante identifizierte Proteine lassen erfolgreich einen tiefgreifenden Blick in das Proteom kutaner Wunden mittels Wundabstrichen werfen.

So können beispielsweise Subgruppierungen wie akute und chronische Wunden anhand ihrer Proteinsignatur in einer PCA erfolgreich voneinander differenziert werden (Abb. 4a). Erste Untersuchungen der differenziell exprimierten Proteine (Abb. 4b) ergaben 106 signifikante differenziell abundante Proteine im Vergleich zwischen akuten und chronischen Wunden, wobei 10 signifikant reduziert exprimiert (z. B. Filamin-C) und 96 signifikant erhöht (z. B. Galectin-10, Neutrophil Defensin 3) vorliegen. Diese Ergebnisse ermöglichen Einblicke, welche Vorgänge in chronischen Wunden gestört sind und welche potenziellen Biomarker für weiterführende Analysen selektiert werden können.

Metagenomics – Mikrobiom

Die Sequenzierung des Mikrobioms von Wundabstrichen ermöglicht einen tiefen Einblick in die Vielfalt und relative Häufig-

Tab. 4 Mengen der extrahierten Gesamt-DNA aus Wundabstrichproben		
Probe	Qubit	
	Konzentration (ng/µl)	
	Überstand	Pellet
P003	7,12	0,22
P011	10,40	5,18
P012	10,80	3,32
P020	63,20	110,00
P031	13,90	98,60
P078	20,40	25,80

keit der verschiedenen mikrobiellen Taxa in den jeweiligen Wundentitäten (■ Abb. 5).

Hervorzuheben ist hier die Verwendung einer Sequenzierungsmethode, der Nanopore-Technologie, welche besonders lange Read-Längen produziert. Im Gegensatz zu Verfahren, die kurze Sequenzen erzeugen (z. B. Illumina) oder auf einer rein kulturellen Differenzierung der Erreger beruhen, ergibt sich hier ein sehr differenziertes Bild des Mikrobioms. Konkret konnten häufig mit Wundinfektionen assoziierte Spezies (Staphylokokken, Pseudomonaden, Streptokokken) nachgewiesen werden. Darüber zeigten einige Proben auch seltener mit Wundinfektionen assoziierte Erreger (Proteus, Klebsiella) sowie einige Anaerobier (Bacteroides, Anaerococcus, Finegoldia), deren Relevanz für die Stagnation der Wundheilung, die Entwicklung von Wundinfektionen und als Mitglieder mikrobieller Gemeinschaften (Biofilm) zu diskutieren sind.

Diskussion

Es existieren wenige bis keine validen und erprobten diagnostischen Ansätze zur Analyse des komplexen chronischen Wundmilieus oder Evaluation des Erfolgs der Lokaltherapie. Dabei wurde das Potenzial verschiedener Ansätze bereits in der Vergangenheit als Chance für individuelle und gezielt gesteuerte Therapie postuliert und vielversprechende Arbeiten dazu publiziert [10, 15, 17, 23].

In dieser Studie haben wir uns darauf fokussiert, die Nutzbarkeit der lokalen Wundabstriche über ihr mikrobiologisch-diagnostisches Anwendungsgebiet hinaus zu untersuchen. Der Wundabstrich ist dabei ein bekanntes, zugängliches und einfach anzuwendendes Werkzeug, das im medizi-

nischen Alltag allgegenwärtig ist. Es ist für PatientInnen kostengünstig und wenig invasiv. Daher eignet es sich im Gegensatz zu anderen Ansätzen (z. B. Gewebebiopsie) hervorragend zur Probengewinnung aus Wunden. Die Vision ist die Identifikation biomolekularer Marker und Signaturen für die Diagnostik pathologischer Prozesse in der Wundheilung sowie Gewinnung von therapeutischen Steuerparametern zur Objektivierung der Wundtherapie. Frühere Studien und auch kommerzielle Ansätze (z. B. WOUNDCHek™) haben ebenfalls erste Analysen der Inflammation [13], des Proteoms [1, 5] und Mikrobioms [18] aus Wundabstrichen durchgeführt und vielversprechende Ergebnisse demonstriert. Studien, die ebenfalls auf Basis der Analyse des Wundmilieus aus Wundexsudat gearbeitet haben, konnten potenzielle Biomarker identifizieren, welche Heilungstendenzen (z. B. MMP-13 oder GM-CSF [„granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“]; [17]) oder Wundinfektionen anzeigen könnten [15].

Hierauf aufbauend wurde das „Wound-BIOME“-Projekt initiiert, mit dem Ziel, das Verständnis des komplexen Wundmilieus mittels der Analyse und Vereinigung der beteiligten biologischen Ebenen (Proteom, Mikrobiom, Transkriptom etc.) weiterzuentwickeln und robuste diagnostische Parameter zu identifizieren, die zukünftig eine objektiv gesteuerte Lokaltherapie unterstützen können. Die Ergebnisse dieser Studie stellen die erfolgreiche Erprobung des standardisierten Abstrichprotokolls zur Probengewinnung sowie die positiven Ergebnisse der Machbarkeitsanalyse dar (■ Abb. 1). Das Protokoll ist unkompliziert und zeitsparend, nicht komplexer als die mikrobiologische Abstrichentnahme und benötigt keinen Aufarbeitungsprozess des Anwenders. Die positiven und hochwertigen Ergebnisse der Metagenomanalysen können ein differenziertes Bild der vorherrschenden mikrobiellen Belastung generieren (■ Abb. 5). Gleiches gilt für die Quantität und Qualität von isolierten Proteinen, wobei auch die Ergebnisse der Proteomik zeigen wie wertvoll solche Analysen zukünftig für die Diagnostik und Therapiesteuerung sein können (■ Abb. 2). So können spezifische Proteinsignaturen einzelner Wundentitäten differenziert werden und ermöglichen

ggf. unklare Entitäten und Grunderkrankungen besser und schneller zuzuordnen ohne die Notwendigkeit einer Biopsie (■ Abb. 4). Ebenso könnten solche Signaturen dazu beitragen in Mischulzerationen vorherrschende pathologische Prozesse herauszukristallisieren oder Biomarker bzw. Markernetzwerke liefern, welche Stadien des Heilungsprozesses anzeigen, um einen Progress der Wunde zu monitoren. Der bis dato am meisten erforschte Bereich der Immunoassays zur Überwachung pro- oder antiinflammatorischer oder proteolytischer Milieuverschiebungen konnte auch in dieser Studie erfolgreich analysiert und dargestellt werden (■ Abb. 3). Der Nachweis gleichwertiger Ergebnisse unterstützt die Validität unseres Ansatzes.

Selbstverständlich zeigen die Ergebnisse vorerst nur, dass die geplanten Ansätze an einer kleinen Probenkohorte ($n=12$) nutzbare und valide Ergebnisse erzielen können. Die geringe Probenzahl, die diesen Ergebnissen zugrunde liegt, muss als Limitation beachtet werden. Auch sind die Analysen aus Wundabstrichproben in vielen der beschriebenen methodischen Bereiche nur sehr wenig erforscht, so dass gerade hinsichtlich Robustheit, Reproduzierbarkeit und Validität bestätigende Studien folgen müssen. Die hier gezeigten Ergebnisse differenzieller Analysen sind daher initiale, explorative Ergebnisse, die es in einen größeren Kontext zu setzen gilt.

Im nächsten Schritt werden die gewonnenen Erkenntnisse auf die gesamte Kohorte des „Wound-BIOME“-Projekts ($n=120$ PatientInnen) zur Verifizierung erweitert. Dabei werden die präsentierten Analysen tiefergehend exploriert, um relevante Marker zu identifizieren.

Ein weiterer wichtiger Schritt ist die bioinformatische Vereinigung der jeweils analysierten biologischen Ebenen in sog. Multi-OMICS-Ansätzen, um nicht nur einzelne Schichten zu betrachten, sondern zu versuchen die komplexen Prozesse in ihrer räumlich und zeitlich interagierenden Auflösung zu betrachten. Schlussendlich darf auch die ökonomische Seite nicht außer Acht gelassen werden. Während die Probenakquise insgesamt günstig und wenig komplex ist und OMICS-Analysen stetig besser zugänglich und günstiger werden, bleiben Einrichtungen, die die notwendige Expertise und Ressourcen haben, um

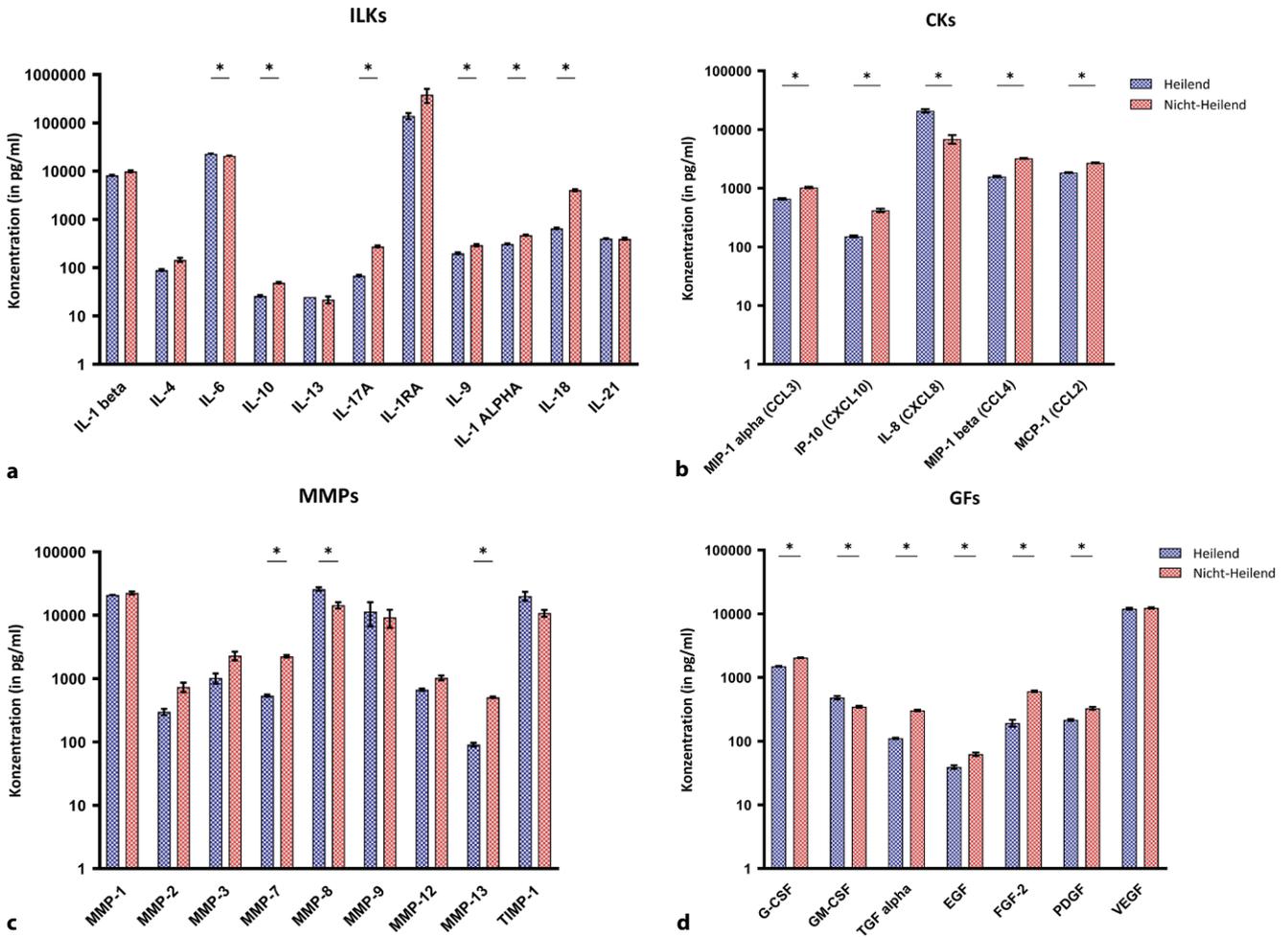


Abb. 3 Multiplex-Immunoassay-Analysen für Interleukine (ILKs), Chemokine (CKs), Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Wachstumsfaktoren (GFs) für heilende ($n=4$) vs. nicht-heilende ($n=8$) Wunden (MIP „macrophage inflammatory protein“, EGF „epidermal growth factor“, PDGF „platelet derived growth factors“, VEGF „vascular endothelial cell growth factor“, FGF „fibroblast growth factor“, TIMP „tissue inhibitor of matrix-metalloproteinase“, G-CFS „granulocyte-colony stimulating factor“, IP „interferon-gamma induced protein 10“, MCP „monocyte chemoattractant protein-1“, TGF „transforming growth factor“, GM-CSF „granulocyte-macrophage colony-stimulating factor“)

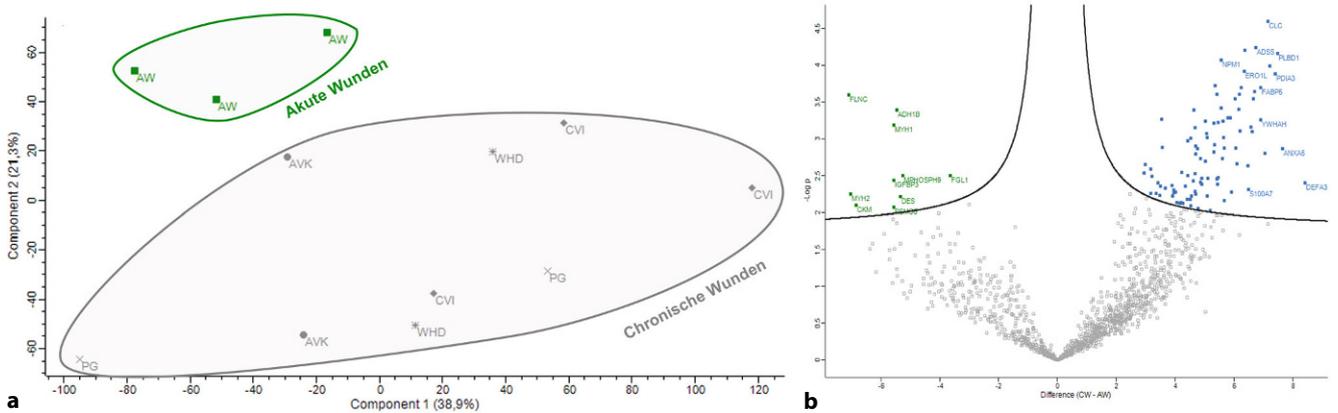


Abb. 4 Analysen der Proteomsignatur ermöglicht Clusterdifferenzierung mittels „principal component analysis“ (PCA; a) und Analyse signifikant erhöhter (blau) und erniedrigter (grün) Proteine (b) in akuten und chronischen Wunden (DFS diabetisches Fußsyndrom, AVK periphere arterielle Verschlusskrankheit, CVI chronisch venöse Insuffizienz, WHST postoperative Wundheilungsstörung, PG Pyoderma gangraenosum, AW akute Wunde)

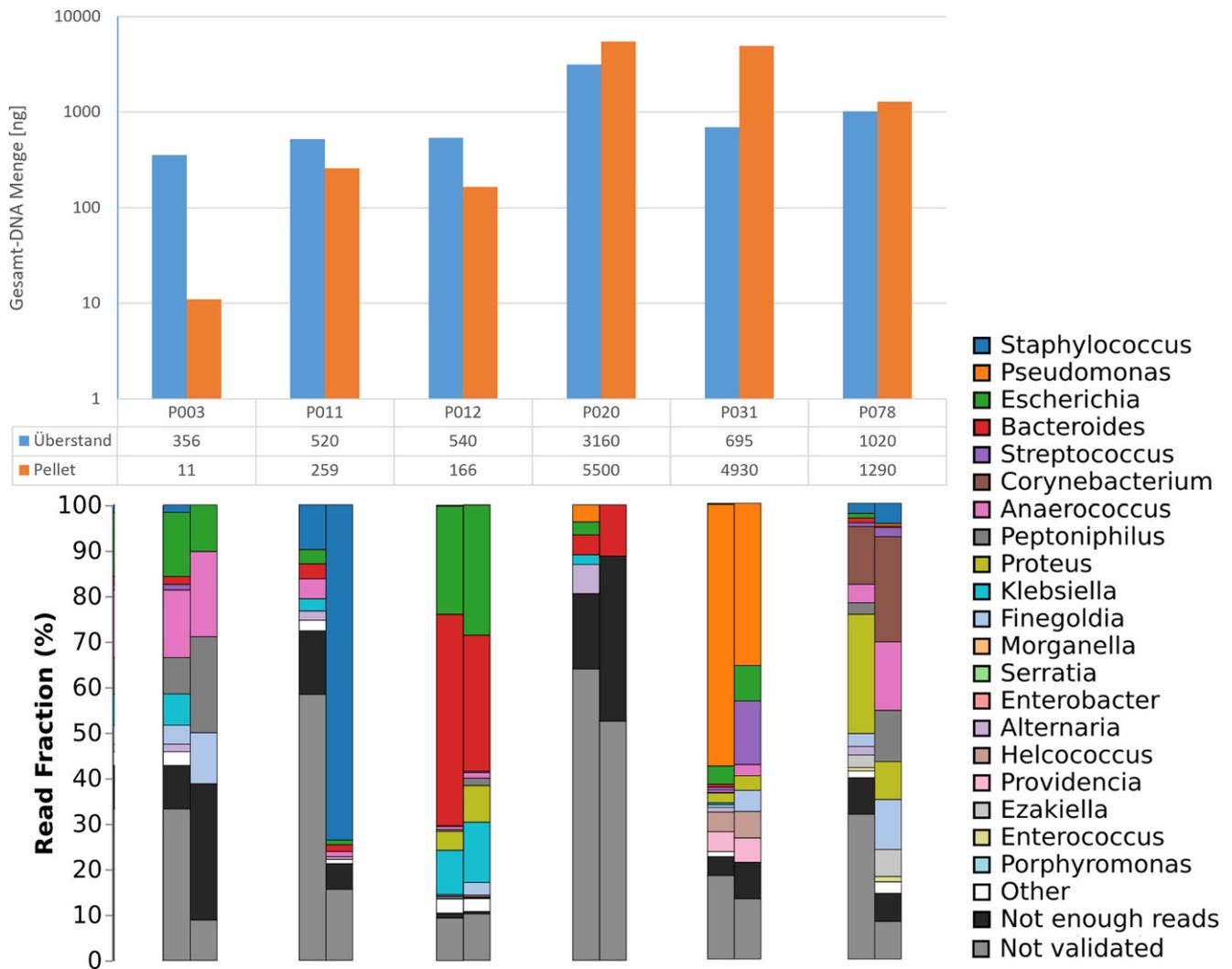


Abb. 5 ▲ Menge extrahierter Gesamt-DNA in Überstand und Pellet (*oben*) und fraktionelle Verteilung nachgewiesener mikrobieller Gattungen (*unten*)

komplexe Signaturen zu analysieren bisher universitären Zentren vorbehalten.

Hinsichtlich potenzieller Kosten für umfangreiche Analysen können nur eingeschränkte Aussagen getroffen werden. Dies hängt häufig von Probenmenge, Komplexität der Analysen und fest etablierter Pipelines ab. Automatisierte und standardisierte Abläufe sowie weitere Verbesserungen der Technologie können hier zukünftig Kosten reduzieren, wie es auch im Falle des Humangenomprojekts über die vergangenen Jahrzehnte der Fall war. Aktuell kann je nach Einrichtung eine Proteomics-Analyse bereits für Kosten unter 50€ pro Probe erfolgen. Angesichts der Kosten fokussiert sich der Anwendungsbereich daher natürlich in der nahen Zukunft vorrangig auf chro-

nisch Wunden, welche tatsächlich unter optimaler Wundtherapie keine Heilungstendenz zeigen. Es gilt daher zukünftig auch die Komplexität der Analysen weiter zu reduzieren und standardisierte Laboralgorithmen auf verschiedenen Plattformen zu erproben, um die hier dargestellten möglichen Diagnostika alltagstauglich zu machen.

Fazit für die Praxis

- Objektive und zielgerichtete Marker zur Diagnostik und Therapiesteuerung fehlen in der modernen Wundbehandlung.
- Abstrichproben eignen sich, um Proben für komplexe biomolekulare Untersuchungen des Wundmilieus zu generieren.
- Die bisherigen Vorgehensweisen im klinischen Alltag müssen nur wenig angepasst

werden, um valide und wertvolle Proben zu gewinnen.

- Mit modernen Hochdurchsatzverfahren (OMICS) kann ein tiefer Einblick in das heterogene und komplexe Milieu chronischer Wunden gewonnen werden, der die Entwicklung fehlender diagnostischer Werkzeuge über Wundabstriche ermöglichen kann.
- Das Potenzial des „Wund-OMICS“-Ansatzes objektiver diagnostischer Steuerparameter für eine individualisierte Wundtherapie zur Ergänzung und Erweiterung klinisch-praktischer Expertise statt eines Trial-and-error-Ansatzes ist klar zu erkennen und die weiteren Studien im Rahmen des „Wound-BIOME“-Projekts werden dieses Potenzial weiterverfolgen.

Korrespondenzadresse

**Dr. med. Julian-Dario Rembe**

Klinik für Gefäß- und Endovaskularchirurgie,
Universitätsklinikum Düsseldorf (UKD),
Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Moorenstraße 5, 40225 Düsseldorf,
Deutschland
julian-dario.rembe@med.uni-duesseldorf.de

Förderung. Die Studie wurde in Teilen finanziert durch Sach- und Personalmittel (JDR) im Rahmen des Ph.D. Biomedizin Programmes der Privaten Universität Witten/Herdecke (Zentrum für Biomedizinische Ausbildung und Forschung – ZBAF), durch die Interne Forschungsförderung der Fakultät für Gesundheit der Privaten Universität Witten/Herdecke (Antrags-Nr. IFF 202-21) sowie das „Senior Clinician Scientist“ Programm der Forschungskommission der Medizinischen Fakultät an der Heinrich-Heine-Universität (HHU) Düsseldorf (Antrags-Nr. 2021-28).

Funding. Open Access funding enabled and organized by Projekt DEAL.

Einhaltung ethischer Richtlinien

Interessenkonflikt. J.-D. Rembe, W. Garabet, J.-W. Lackmann, M. Augustin, J. Dissemond, S.A. Scharf, A. Rommerskirchen, T. Wienemann, W. Ibing, H. Schelzig und E.K. Stuermer geben an, dass kein Interessenkonflikt besteht.

Alle beschriebenen Untersuchungen am Menschen oder an menschlichem Gewebe wurden mit Zustimmung der zuständigen Ethikkommission, im Einklang mit nationalem Recht sowie gemäß der Deklaration von Helsinki von 1975 (in der aktuellen, überarbeiteten Fassung) durchgeführt. Es wurden entsprechende Ethikvoten der beteiligten Studienzentren vor Beginn der Probengewinnung und -bearbeitung eingeholt: Private Universität Witten/Herdecke (Nr. 11/2018), Universität Duisburg-Essen (Nr. 18-8432-BO), Ärztekammer Hamburg (Nr. PV5883) und Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf (Nr. 2020-1012). Die Studien-durchführung erfolgte nach den Prinzipien der „Good Clinical Practice“ (GCP). Von allen beteiligten Patient/-innen liegt eine Einverständniserklärung vor.

Open Access. Dieser Artikel wird unter der Creative Commons Namensnennung 4.0 International Lizenz veröffentlicht, welche die Nutzung, Vervielfältigung, Bearbeitung, Verbreitung und Wiedergabe in jeglichem Medium und Format erlaubt, sofern Sie den/die ursprünglichen Autor(en) und die Quelle ordnungsge-

Diagnostics beyond bacteria – wound swabs for the analysis of biomolecular disease patterns in chronic wounds

Background: Patient-specific therapeutic approaches are important in the care of people with chronic wounds. The heterogeneity of underlying disease profiles as well as the diversity of the wound microenvironment make generalizable approaches difficult. While molecular analysis methods such as high-throughput methods (OMICS) are increasingly widespread and more available, the analysis of objective biomolecular disease patterns has largely not found its way into everyday diagnostics and therapy management.

Objectives: Evaluation of the use of wound swabs for the analysis of biomarkers and disease patterns in cutaneous wounds.

Materials and methods: A sample cohort from the multicenter Wound-BIOME project was analyzed. The project aims to investigate the local wound microenvironment of different entities, healing tendencies, and regeneration stages on a biomolecular level. To this end, a protocol for sample collection and handling suitable for everyday use was developed and tested. Furthermore, feasibility analyses for multiplex immunoassay, proteomics, and metagenome analyses (microbiome) were carried out.

Results: Despite heterogeneity between samples, sufficient amounts of protein and microbial DNA with adequate quality could be extracted to analyze biomolecular patterns. Initial analyses of descriptive protein signatures and microbial taxonomy patterns show promising approaches for future individualized, objective diagnostics and targeted therapeutic interventions.

Conclusions: Standardized wound swabs are generally well suited for obtaining sample material for the analysis of the complex wound environment using various high-throughput methods.

Keywords

Personalized medicine · Wound healing · Immunoassay · Proteomics · Metagenomics

mäß nennen, einen Link zur Creative Commons Lizenz beifügen und angeben, ob Änderungen vorgenommen wurden.

Die in diesem Artikel enthaltenen Bilder und sonstiges Drittmaterial unterliegen ebenfalls der genannten Creative Commons Lizenz, sofern sich aus der Abbildungslegende nichts anderes ergibt. Sofern das betreffende Material nicht unter der genannten Creative Commons Lizenz steht und die betreffende Handlung nicht nach gesetzlichen Vorschriften erlaubt ist, ist für die oben aufgeführten Weiterverwendungen des Materials die Einwilligung des jeweiligen Rechteinhabers einzuholen.

Weitere Details zur Lizenz entnehmen Sie bitte der Lizenzinformation auf <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/deed.de>.

Literatur

1. Bekeschus S, Lackmann JW, Gumbel Detal (2018) A Neutrophil Proteomic Signature in Surgical Trauma Wounds. *Int J Mol Sci* 19:
2. Broszczak DA, Sydes ER, Wallace D, Parker TJ (2017) Molecular Aspects of Wound Healing and the Rise of Venous Leg Ulceration: Omics Approaches to Enhance Knowledge and Aid Diagnostic Discovery. *Clin Biochem Rev* 38:35–55
3. ICWEV (2023) Standards der ICW – Diagnostik und Therapie chronischer Wunden. In, Online
4. Edsberg LE (2009) Proteomic Approaches for Studying the Phases of Wound Healing. In: Gefen A (Hrsg) *Bioengineering Research of Chronic Wounds: A Multidisciplinary Study Approach*. Springer Berlin Heidelberg, Berlin, Heidelberg, S343–362
5. Edsberg LE, Wyffels JT, Brogan MS, Fries KM (2012) Analysis of the proteomic profile of chronic pressure ulcers. *Wound Repair Regen* 20:378–401
6. Frykberg RG, Banks J (2015) Challenges in the treatment of chronic wounds. *Adv Wound Care* 4:560–582
7. Harvey J, Mellody KT, Cullum N et al (2022) Wound fluid sampling methods for proteomic studies: A scoping review. *Wound Repair Regen* 30:317–333
8. Krzyszczyk P, Schloss R, Palmer A, Berthiaume F (2018) The Role of Macrophages in Acute and Chronic Wound Healing and Interventions to Promote Pro-wound Healing Phenotypes. *Front Physiol* 9:419
9. Lu J, Rincon N, Wood DE et al (2022) Metagenome analysis using the Kraken software suite. *Nat Protoc* 17:2815–2839
10. Luanraksa S, Jindatanmanusan P, Boonsiri T et al (2018) An MMP/TIMP ratio scoring system as a potential predictive marker of diabetic foot ulcer healing. *J Wound Care* 27:849–855
11. McCarty SM, Percival SL (2013) Proteases and delayed wound healing. *Adv Wound Care* 2:438–447
12. Rappsilber J, Ishihama Y, Mann M (2003) Stop and go extraction tips for matrix-assisted laser desorption/ionization, nanoelectrospray, and LC/MS sample pretreatment in proteomics. *Anal Chem* 75:663–670

13. Schmohl M, Beckert S, Joos TO et al (2012) Superficial wound swabbing: a novel method of sampling and processing wound fluid for subsequent immunoassay analysis in diabetic foot ulcerations. *Diabetes Care* 35:2113–2120
14. Schultz G, Bjarnsholt T, James GA et al (2017) Consensus guidelines for the identification and treatment of biofilms in chronic nonhealing wounds. *Wound Repair Regen* 25:744–757
15. Serena TE, Bayliff SW, Brosnan PJ et al (2021) Bacterial protease activity as a biomarker to assess the risk of non-healing in chronic wounds: Results from a multicentre randomised controlled clinical trial. *Wound Repair Regen* 29:752–758
16. Spohr P, Scharf S, Rommerskirchen A et al (2024) Insights into gut microbiomes in stem cell transplantation by comprehensive shotgun long-read sequencing. *Sci Rep* 14:4068
17. Stacey MC, Phillips SA, Farrokhya F, Swaine JM (2019) Evaluation of wound fluid biomarkers to determine healing in adults with venous leg ulcers: A prospective study. *Wound Repair Regen* 27:509–518
18. Travis J, Malone M, Hu H et al (2020) The microbiome of diabetic foot ulcers: a comparison of swab and tissue biopsy wound sampling techniques using 16S rRNA gene sequencing. *BMC Microbiol* 20:163
19. Tyanova S, Temu T, Cox J (2016) The MaxQuant computational platform for mass spectrometry-based shotgun proteomics. *Nat Protoc* 11:2301–2319
20. Tyanova S, Temu T, Sinitcyn P et al (2016) The Perseus computational platform for comprehensive analysis of (prote)omics data. *Nat Methods* 13:731–740
21. Vanderplas J, Granger B, Heer J et al (2018) Altair: interactive statistical visualizations for Python. *JOSS* 3:1057
22. Wang Y, Zhao Y, Bollas A et al (2021) Nanopore sequencing technology, bioinformatics and applications. *Nat Biotechnol* 39:1348–1365
23. Westby MJ, Norman G, Watson REB et al (2020) Protease activity as a prognostic factor for wound healing in complex wounds. *Wound Repair Regen* 28:631–644
24. Wood DE, Lu J, Langmead B (2019) Improved metagenomic analysis with Kraken 2. *Genome Biol* 20:257
25. Zhao R, Liang H, Clarke E et al (2016) Inflammation in chronic wounds. *Int J Mol Sci* 17(12):2085

Hinweis des Verlags. Der Verlag bleibt in Hinblick auf geografische Zuordnungen und Gebietsbezeichnungen in veröffentlichten Karten und Institutsadressen neutral.



HOT TOPICS DER SCHMERZMEDIZIN

Webinar-Reihe „Hot Topics der Schmerzmedizin“

In der Webinar-Reihe „Hot Topics der Schmerzmedizin“ beleuchten wir regelmäßig aktuelle schmerzmedizinische Themen mit Expert*innen aus verschiedenen Fachgebieten. Als Teilnehmer*innen können Sie mitdiskutieren, indem Sie Ihre Fragen an die Expert*innen im Chat stellen. Die Teilnahme an den Webinaren ist nach Registrierung kostenfrei. Informieren Sie sich über die nächsten Termine und melden Sie sich an.

www.springermedizin.de/webinare-schmerzmedizin/18592486

Folgende Themen stehen on demand für Sie bereit:

- Chronische Unterbauch- und Viszeralschmerzen
- Schulterschmerz gezielt managen
- Zu jung für chronische Schmerzen – (Kopf-)schmerz bei Kindern und Jugendlichen
- Das ABC der Tumorschmerztherapie in der Praxis
- Volkskrankheit Rückenschmerz – Multimodale Therapieansätze und Prävention in der Praxis
- Nichtopioidanalgetika: Pharmakologie trifft Klinik
- Herausforderung chronische neuropathische Schmerzen - Diagnostik, Therapie, Prävention
- Cannabinoide in der Schmerztherapie - gezielt und verantwortungsvoll einsetzen
- Therapiespektrum bei Arthroseschmerz ausnutzen
- Achtsamkeit und Bewältigung chronischer Schmerzen
- Schmerz bei rheumatischen Erkrankungen
- Kopfschmerzen und Migräne
- u.a.

Die Webinar-Reihe „Hot Topics der Schmerzmedizin“ wird produziert von Springer Medizin und der Deutschen Schmerzgesellschaft e.V.

