

Evaluierung von bismuthhaltigen
Wundmaterialien hinsichtlich
Biokompatibilität und Biofunktionalität

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät

der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Franziska Veltman

geboren am 21.03.1995 in Jena

Gutachter

1. PD Dr. med. Uta-Christina Hipler, Universitätsklinikum Jena
2. Prof. Dr. med. habil. Uwe Wollina, Städtisches Klinikum Dresden, Standort Dresden
Friedrichstadt
3. Prof. Dr. med. Wolfgang Pfister, Klinikum Weimar

Tag der öffentlichen Verteidigung: 07.12.2020

Abschluss Examen: 06.07.2021

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1 Zusammenfassung	9
2 Einleitung.....	11
2.1 Die Haut des Menschen	11
2.1.1 Der Begriff Wunde.....	11
2.1.2 Die Wundheilung.....	12
2.1.2.1 Die physiologischen Wundheilungsphasen	12
2.1.2.2 Begünstigende Faktoren einer gestörten Wundheilung.....	14
2.1.3 Die Wundversorgung	15
2.1.3.1 Die Versorgung akuter Wunden.....	16
2.1.3.2 Die Lokalthherapie der chronischen Wunden: Das <i>M.O.I.S.T.</i> Konzept	16
2.1.3.3 Anforderungen an Wundauflagen	17
2.2 Der medizinische Nutzen von Silber	18
2.3 Bismuth als chemisches Element.....	19
2.4 Die Verwendung von Bismuth in der Medizin.....	20
2.5 Die Wundauflagen Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais, Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i> und Xeronet.....	21
2.6 Die zu untersuchenden Bakterien	24
3 Ziele der Arbeit	26
4 Materialien	27
4.1 Chemikalien und andere genutzte Materialien.....	27
4.2 Geräte und Software	29
5 Methoden	34
5.1 Evaluierung der Biokompatibilität der Wundauflagen Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais, Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i> , Xeronet und des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat (Norm ISO 10993).....	34
5.1.1 Die verwendete <i>HaCaT</i> -Zelllinie und deren Stammhaltung und Versuchskultivierung	34
5.1.2 Die Herstellung der Testkonzentrationen bzw. der Materialextrakte der eingesetzten Wundauflagen.....	38

5.1.3 Ansetzen der Mikrotiterplatte mit den hergestellten Wundauflagen Testkonzentrationen bzw. der Materialextrakte	38
5.1.4 Ansetzen der Mikrotiterplatte mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat	40
5.1.5 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels Lumineszenz ATP- <i>Detections-Kit</i>	42
5.1.6 Bestimmung der Protein-Konzentration mittels BC <i>Assay Protein Quantitation Kit</i>	44
5.1.7 Bestimmung der LDH-Konzentration mittels CytoTox96® <i>Non Radioactive</i> <i>Cytotoxicity Assay</i>	46
5.1.8 <i>EnzymimmunoAssay</i> zur quantitativen Bestimmung von humanem Interleukin-8 (IL-8) und humanem Interleukin-6 (IL-6).....	50
5.2 Evaluierung der Biofunktionalität der Wundauflagen Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais, Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i> und Xeronet.....	50
5.2.1 Prüfung der Wundauflagen auf antibakterielle Wirkung entsprechend des <i>Japanese</i> <i>Industrial Standard (JIS L 1902:2002)</i>	50
5.2.1.1 Vorbereitung der Untersuchungen entsprechend der Norm <i>JIS L 1902:2002</i> ..	51
5.2.1.2 Versuchsdurchführung entsprechend der Norm <i>JIS L 1902:2002</i>	52
5.2.2 Prüfung der Wundauflagen auf antibakterielle Wirkung entsprechend der <i>Standard</i> <i>Test Method of the American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC</i> <i>100-2004)</i>	55
5.2.2.1 Vorbereitung der Untersuchungen entsprechend der Norm <i>AATCC 100-2004</i>	56
5.2.2.2 Versuchsdurchführung entsprechend der Norm <i>AATCC 100-2004</i>	57
5.3 Statistische Auswertung der Messwerte	58
6 Ergebnisse	61
6.1 Ergebnisse der Testung der Wundauflagen auf Biokompatibilität.....	61
6.1.1 Vergleich der Referenz Acticoat Flex 3 mit Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i> und Xeronet.....	61
6.1.2 Ergebnisse der Untersuchungen der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat	71
6.2 Ergebnisse der Testung der Wundauflagen auf Biofunktionalität.....	74
6.2.1 Ergebnisse der Untersuchung der Wundauflagen entsprechend des <i>Japanese</i> <i>Industrial Standard (JIS L 1902:2002)</i>	74

6.2.1.1 Antibakterielle Wirkung der Wundauflagen auf <i>Staphylococcus aureus</i> entsprechend der Norm <i>JIS L 1902:2002</i>	75
6.2.1.2 Antibakterielle Wirkung der Wundauflagen auf <i>Klebsiella pneumoniae</i> entsprechend der Norm <i>JIS L 1902:2002</i>	76
6.2.2 Ergebnisse der Untersuchung der Wundauflagen entsprechend der <i>Standard Test Method of the American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC 100-2004)</i>	78
6.2.2.1 Antibakterielle Wirkung der Wundauflagen auf <i>Staphylococcus aureus</i> entsprechend der Norm <i>AATCC 100-2004</i>	79
6.2.2.2 Antibakterielle Wirkung der Wundauflagen auf <i>Klebsiella pneumoniae</i> entsprechend der Norm <i>AATCC 100-2004</i>	80
7 Diskussion	83
7.1 Diskussion der Methoden.....	84
7.2 Diskussion der Ergebnisse der Testung auf Biokompatibilität und Biofunktionalität ...	87
8 Schlussfolgerung	93
9 Literaturverzeichnis	95
10 Anhang.....	106
10.1 Weitere Ergebnisse der Untersuchung der Biokompatibilität.....	106
10.1.1 Ergebnisse der Wundauflage Acticoat Flex 3	106
10.1.2 Ergebnisse der Wundauflage Xeroform® <i>Petrolatum Dressing</i>	110
10.1.3 Ergebnisse der Wundauflage Xeronet.....	114
10.1.4 Ergebnisse des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat	118
10.2 Abbildungsverzeichnis.....	122
10.3 Tabellenverzeichnis	125
10.4 Lebenslauf	127
10.5 Danksagung	130
10.6 Ehrenwörtliche Erklärung	131

Abkürzungsverzeichnis

^{212}Bi	Bismuth-Isotop mit der Massenzahl 212
^{213}Bi	Bismuth-Isotop mit der Massenzahl 213
^{51}Cr	Chrom-Isotop mit der Massenzahl 51
CO_2	Kohlenstoffdioxid
Cu^{1+} -Ion	einwertiges Kupfer-Ion
Cu^{2+} -Ion	zweiwertiges Kupfer-Ion
LC_{50}	Letale Konzentration
Mg^{2+} -Ion	zweiwertiges Magnesium-Ion
NAD^+	oxidierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid
%	Prozent
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
<i>AATCC 100-2004</i>	<i>Standard Test Method of the American Association of Textile Chemists and Colorists</i> , Amerikanische Norm
Abb.	Abbildung
ADT	Agar-Diffusionstest
<i>Ag</i>	<i>argentum</i> , Silber
AMP	Adenosinmonophosphat
<i>Aqua dest.</i>	<i>Aqua destillata</i> , Destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
ATPasen	Adenosintriphosphatasen
<i>BCA</i>	<i>bicinchoninic acid</i> , Bicinchoninsäure
Bi	Bismuth
<i>BLK</i>	<i>Blank</i> , Blindprobe
<i>BSA</i> -Stocklösung	<i>Bovine serum albumin</i> , Rinderserumalbumin
<i>BSS</i>	<i>bismuth subsalicylate</i> , Bismuthsubsalylylat
bzw.	beziehungsweise
Ca	Calcium
<i>CBS</i>	<i>colloidal bismuth subcitrate</i> , Kolloidales Bismuthsubzitat
cm	Zentimeter
CXC	Chemokinrezeptoren
DIN	Deutsches Institut für Normung
<i>DMEM</i>	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
<i>DNA</i>	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure

DNase	Desoxyribonuklease
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>ESBL</i>	<i>Extended-Spectrum-Beta-Lactamasen</i>
evtl.	eventuell
<i>FGF</i>	<i>Fibroblast growth factor</i> , Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FKS	Fetales Kälberserum
h	Stunde
<i>HaCaT</i>	<i>Human adult low Calcium High Temperature</i> , Humane Zellen bei niedrigem Calciumgehalt und hohen Temperaturen kultiviert
HCl	Salzsäure
IL-1/6/8	Interleukin-1/-6/-8
ISO	Internationale Organisation für Normung
<i>IU</i>	<i>international unit</i> , internationale Einheit
<i>JIS L 1902:2002</i>	<i>Japanese Industrial Standard</i> , Japanische Norm
KBE	Kolonie bildende Einheit
kg	Kilogramm
L	Liter
LDH	Lactatdehydrogenase
<i>LQbATP</i>	<i>luminescent quantification of bacterial ATP</i> , Methode der Lumineszenzquantifizierung von bakteriellem ATP
m	Meter
M	Molar
µg	Mikrogramm
mg	Milligramm
min	Minute
µL	Mikroliter
mL	Milliliter
MLN	Mikroplattenlasernephelometrie
µM	Mikrometer
mol	Mol
MRSA	Methicillin-resistenter <i>Staphylococcus aureus</i>
N	Normalität
NaCl	Natriumchlorid
NADH + H ⁺	reduzierte Form von Nicotinamidadenindinukleotid

nm	Nanometer
nM	Nanomol
O ₂	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
<i>PBS</i>	<i>Dulbecco's phosphate-buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
pg	Pikogramm
PK	Positivkontrolle
PPi	Pyrophosphat/Diphosphat
PSF	Penicillin/Streptomycin/Fungizone-Lösung
<i>RNA</i>	<i>ribonucleic acid</i> , Ribonukleinsäure
<i>ROS</i>	<i>reactive oxygen species</i> , Reaktive Sauerstoffspezies
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
<i>SOP</i>	<i>Standard Operating Procedure</i>
Tab.	Tabelle
<i>TGF-α</i>	<i>Transforming growth factor alpha</i> , transformierender Wachstumsfaktor <i>alpha</i>
<i>TGF-β</i>	<i>Transforming growth factor beta</i> , transformierender Wachstumsfaktor <i>beta</i>
<i>TNF-α</i>	<i>Tumor necrosis factor alpha</i> , Tumornekrosefaktor <i>alpha</i>
TRIS	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
<i>u</i>	<i>unified atomic mass unit</i> , atomare Masseneinheit
u.a.	unter anderem
rpm	Umdrehungen pro Minute
v.Chr.	vor Christus
VRE	Vancomycin-resistente Enterokokken
<i>W.A.R.-Score</i>	<i>Wounds at Risk-Score</i>
<i>w/o</i>	<i>without</i> , ohne
z.B.	zum Beispiel
ZZ	Zellzahl
<i>α</i>	<i>alpha</i>
<i>β</i>	<i>beta</i>

1 Zusammenfassung

Durch zunehmenden, teils unkalkulierten Einsatz von Antibiotika und dadurch ansteigende multiresistente Bakterien, gewinnen in der modernen Wundversorgung antibakterielle Wundmaterialien an Bedeutung. Hierzu zählen metallversetzte Wundauflagen.

Ziel dieser Arbeit war die Testung der Biokompatibilität und Biofunktionalität der Wundauflagen Acticoat Flex 3, Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet. Da das silberhaltige Acticoat Flex 3 bereits ein großes Anwendungsspektrum bei Verbrennungen und Hauttransplantationen besitzt, liegt ein besonderes Interesse auf den beiden bismuthhaltigen Wundauflagen Xeroform® *Petrolatum Dressing* und dem noch nicht angewendeten Xeronet im Vergleich zu Acticoat Flex 3 (Chaloupka et al. 2010, Konop et al. 2016).

Die Biokompatibilität beschreibt die Qualität eines Biomaterials, keine toxischen oder schädlichen Wirkungen auf biologische Systeme zu haben (Dorland 1974). Die Verträglichkeit der Wundauflagen konnte mithilfe der *HaCaT*-Zelllinie getestet werden. Aufgrund der ähnlichen Eigenschaften zu den menschlichen Keratinozyten werden sie für diese Testzwecke genutzt. Aus allen drei Wundauflagen wurden Extraktionsverhältnisse in den Testkonzentrationen von 0,1%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75% und 100% durch Schütteln für 24h bei 37°C hergestellt. Ebenfalls wurde der Reinstoff Bismuth Tribromphenat in den Konzentrationen von 0,625µg/mL, 1,25µg/mL, 2,5µg/mL, 5µg/mL und 10µg/mL untersucht. Entsprechend der DIN Norm ISO 10993-5:2007 erfolgte die Testung auf *in vitro*-Zytotoxizität der Wundauflagen.

Nach Inkubation der Testkonzentrationen der Wundauflagen mit den *HaCaT*-Zellen erfolgte die Messung von drei verschiedenen Parametern. Mittels Lumineszenz *ATP-Detections-Kit* wurde der ATP-Gehalt als Marker für die Zellaktivität bestimmt. Dieser ist proportional zur *HaCaT*-Zellzahl. Anhand des *BC Assay Protein Quantitation Kit* gelang mittels Farbreaktion der Nachweis des Proteins in den Zellen. Gehen Zellen zu Grunde, sinkt deren Protein-Gehalt durch Denaturierung. Der Nachweis des Enzyms LDH erfolgte anhand einer Farbreaktion im *CytoTox96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay*. Je mehr LDH nachzuweisen war, desto größer war der Zelluntergang der *HaCaT*-Zellen, da LDH bei der Zelllyse freigesetzt wird. Anhand der gemessenen Konzentrationen von ATP, Protein und LDH konnte auf den prozentualen *HaCaT*-Zell-Gehalt und damit auf die Zytotoxizität der Wundauflagen geschlussfolgert werden. Zur Beurteilung der Verträglichkeit der Auflagen wurden somit drei Parameter bestimmt.

Die Untersuchungen zeigten, dass in den Konzentrationen von 0,1% bis 10% der Acticoat Flex 3 Auflage eine Biokompatibilität nachzuweisen war. Xeroform® *Petrolatum Dressing* wirkte in den Testkonzentrationen 0,1% bis 25% biokompatibel. Unter Xeronet fanden sich gleiche Ergebnisse wie bei Xeroform® *Petrolatum Dressing*. Zusätzlich war die Konzentration von 75% Xeronet biokompatibel. Gegenüber der Acticoat Flex 3 Auflage zeigten beide bismuthhaltigen Auflagen in niedrigeren Konzentrationen deutlich geringere oder keine zytotoxischen Effekte auf die *HaCaT*-Zellen. Die Testung der Biokompatibilität erfolgte an *in vitro*-Zellen.

Die Fähigkeit einer Substanz oder eines Materials, eine gewisse Funktion oder Wirkung auszulösen, wird als Biofunktionalität beschrieben. Die Untersuchung dieser Wirkungsweise aller Wundauflagen erfolgte an den Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae*. Ausgewählt wurden diese beiden Vertreter, da sie für einen Großteil der nosokomialen Erkrankungen und Wundinfektionen verantwortlich sind. Zudem sind bereits Antibiotikaresistenzen dieser Keime bekannt. Genannt seien beispielhaft die MRSA Stämme. Die Untersuchungen der Biofunktionalität erfolgten entsprechend der Normen *Japanese Industrial Standard (JIS L 1902:2002)* und *Standard Test Method of the American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC 100-2004)*. Hiermit konnte die Berechnung der *antibakteriellen Gesamtaktivität* und der *Keimreduktion* der Wundauflagen im Vergleich zur Referenzprobe Polyester ermöglicht werden.

Entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002* wurde nachgewiesen, dass alle drei Wundauflagen eine starke *antibakterielle Gesamtaktivität* gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* aufwiesen. Durch die Untersuchung entsprechend der Norm *AATCC 100-2004* konnte gezeigt werden, dass alle drei Wundauflagen eine 100%-ige *Keimreduktion* des Bakteriums *Staphylococcus aureus* hervorriefen. Acticoat Flex 3 und Xeronet reduzierten ebenfalls die Keimlast von *Klebsiella pneumoniae* um 100%. Unter Einsatz des Xeroform® *Petrolatum Dressings* betrug die Reduktion knapp 90,43%. Alle drei Wundauflagen besaßen damit auf *Klebsiella pneumoniae* eine starke *Keimreduktion*.

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit konnte eine gute Effektivität und Sicherheit der bismuthhaltigen Wundauflagen Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet gezeigt werden. Die direkte Übertragung dieser Erkenntnisse auf den medizinischen Einsatz der Auflagen auf menschlicher Haut ist jedoch nicht möglich. Für präzisere Aussagen sind Testungen an 3D-Hautmodellen unerlässlich.

2 Einleitung

2.1 Die Haut des Menschen

Die Haut besitzt eine Gesamtfläche von bis zu 2m² und ein Gewicht von 3,5kg bis 10kg und stellt damit das größte menschliche Organ dar. Sie ist das begrenzende Organ des Menschen zur Umwelt und ist durch Falten, Haare und Furchen gekennzeichnet (Moll (Hrsg.) 2005). Sie besteht aus *Cutis* und der darunterliegenden *Subcutis* (Unterhaut). Die *Cutis* wiederum setzt sich aus *Epidermis* (Oberhaut) und *Dermis* (Lederhaut) zusammen. Die Schichten bestehen aus unterschiedlichen Zellen mit verschiedenen Aufgaben.

Die *Epidermis* ist die obere, mehrschichtig verhornende Schicht der Haut. Sie ist gefäßlos, aber nervenfaserreich. Sie wird zum Proliferationsgewebe gezählt. Den größten Anteil der dort vorkommenden Zellen bilden die Keratinozyten. Sie sind in der Lage, sich zu differenzieren und zu verhornen (Moll (Hrsg.) 2005).

Die darunterliegende *Dermis* besteht aus Bindegewebsfasern und verschiedenartigen Zellen, die sich in der dermalen Matrix, einer gelartigen Grundsubstanz, befinden (Moll (Hrsg.) 2005). Die *Dermis* setzt sich aus dem *Stratum papillare* (papilläre Schicht) sowie dem *Stratum reticulare* (retikuläre Schicht) zusammen.

Die *Subcutis* ist reich an Binde- und Fettgewebe. In ihr verlaufen Nervenendigungen und epifasziale Leitungsbahnen. Sie dient als Polster, Wärmespeicher und Isolator. Sie besitzt Mechanorezeptoren in Form von Vater-Pacini-Körperchen (Moll (Hrsg.) 2005).

Aufgaben der Haut sind neben der Aufrechterhaltung des Wasser- und Elektrolyt-Gleichgewichts die Thermoregulation, die Reizaufnahme, der Schutz vor Austrocknung und Hitze, sowie die Funktion des Säureschutzmantels zur Aufrechterhaltung des pH-Wertes von 5,7 (Moll (Hrsg.) 2005). Ihre wohl wichtigste Funktion ist der Schutz gegen mechanische Beanspruchung, Noxen und Mikroorganismen der Außenwelt (Wild und Auböck (Hrsg.) 2007).

2.1.1 Der Begriff Wunde

Wunden sind akute Substanzdefekte, die traumatisch in primär gesunder, nicht vorgeschädigter Haut entstehen (Wild und Auböck (Hrsg.) 2007).

Etwa 1% bis 2% der Bevölkerung in den westlichen Industriestaaten leiden an chronischen Wunden, deren Gründe vielfältig sind (Dissemond 2015). Weltweit existiert noch keine einheitliche Definition des Begriffes der chronischen Wunde, jedoch beschreibt die S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. (DGfW) den

Ausdruck wie folgt: „Eine chronische Wunde wird als Integritätsverlust der Haut und einer oder mehrerer darunterliegenden Strukturen mit fehlender Abheilung innerhalb von acht Wochen definiert“ (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung (Hrsg.) 2012). Die drei häufigsten Varianten einer chronischen Wunde stellen das diabetische Fußsyndrom, der *Dekubitus* und das *Ulcus cruris* dar (Dissemond 2015).

Alle Wunden, die nicht chronisch sind, werden als akute Wunden bezeichnet (Runge-Werner et al. 2015). Zu den akuten Wunden werden u.a. Schürf-, Platz-, Riss-, Schnitt- und Stichwunden gezählt (Lange und Wessel 2014).

2.1.2 Die Wundheilung

2.1.2.1 Die physiologischen Wundheilungsphasen

Als physiologische Wundheilung wird ein zeitlich und regionär kontrolliertes, komplexes Geschehen bezeichnet, dessen primäres Ziel es ist, die Integrität und Funktion des geschädigten Gewebes wiederherzustellen (Dissemond et al. 2014). Nach einer Verletzung werden unmittelbar biologische Reaktionsketten aktiviert und synchronisiert, um eine Reparatur zu gewährleisten. Die Wundheilung ist von vielen Faktoren abhängig und wird in mehrere Phasen eingeteilt, die oftmals zeitgleich ablaufen (Gurther et al. 2008):

1. Exsudationsphase = Entzündliche Phase
2. Proliferationsphase = Granulationsphase
3. Regenerationsphase = Epithelisierungsphase
4. Reifungsphase = *Remodeling*

Die Reifungsphase wird auch als Teil der Regenerationsphase gesehen (Runge-Werner et al. 2015).

Die **Exsudationsphase** setzt mit dem Beginn der Verletzung ein. An den beschädigten Gefäßwänden adhären Thrombozyten, die ein Thrombozytenaggregat bilden, Plättchenfaktoren freisetzen und damit die Gerinnungskaskade in Gang setzen. Es entsteht ein Blutgerinnsel aus Fibrinpolymeren. Es verschließt die Wunde und bildet eine provisorische Matrix für den nachfolgenden Kollagenaufbau. Prostaglandin- und Histaminfreisetzung führen zu einer Vasodilatation sowie zu einer gesteigerten Gefäßpermeabilität. Ödembildung und Exsudation sind das Ergebnis, wodurch zerstörte Zellen und Bakterien einfacher abtransportiert werden können. Leukozyten werden durch chemotaktische Signale, u.a. von Thrombozyten ausgeschütteten Mediatoren, angelockt und wandern in die Wunde ein. Neutrophile

Granulozyten verhindern Wundinfekte, indem sie Bakterien eliminieren und defektes Gewebe abbauen. Zudem setzen sie Entzündungsmediatoren wie *TNF- α* und IL-1 frei, welche wiederum Fibroblasten und Epithelzellen aktivieren. Makrophagen produzieren verschiedene Zytokine und Wachstumsfaktoren. *TNF- α* , *TGF- α* , *TGF- β* , IL-1, IL-6 und *FGF* seien beispielhaft genannt. Diese Faktoren führen zur Rekrutierung und Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen, wodurch die **Proliferationsphase** eingeleitet wird (Runge-Werner et al. 2015, Wild und Auböck (Hrsg.) 2007). Sie beginnt etwa drei Tage nach der Verletzung und ist durch die Bildung eines Granulationsgewebes gekennzeichnet. Makrophagen und Fibroblasten wandern aus dem umliegenden Gewebe in die Wunde ein und es kommt zur Einsprossung von Blutgefäßen. Die provisorische Matrix dient zunächst als Zellanker für die einwandernden Zellen und schüttet Zytokine und Wachstumsfaktoren aus, um die neuen Zellen zur Aktivierung, Zellteilung, Migration und Differenzierung anzuregen. Nach der Einwanderung der Fibroblasten wird mit der Synthese von Matrixproteinen begonnen. Das neue Gewebe besteht nun hauptsächlich aus Kollagen Typ III Fasern, aber auch aus Glykoproteinen, Glykosaminoglykanen und Adhäsionsproteinen (Runge-Werner et al. 2015, Wild und Auböck (Hrsg.) 2007).

Modifizierte Fibroblasten wie Fibrozyten und Myofibroblasten kontrahieren und führen durch Straffung der Kollagenfasern zu einer Annäherung der gesunden Wundränder und damit zur Wundverkleinerung. Dies wird als Wundkontraktion bezeichnet (Runge-Werner et al. 2015, Wild und Auböck (Hrsg.) 2007).

In der **Regenerationsphase/Reifungsphase** kommt es zur Umwandlung des Proliferationsgewebes in Narbenmaterial. Matrixmetalloproteinasen, die auch beim Umbau der provisorischen Matrix eine Rolle spielen, bauen die Kollagenfasern vom Typ III zu stabileren Typ I Fasern um. Durch chemotaktische Signale aus dem Proliferationsgewebe wandern Keratinozyten vom Wundrand ein und fördern die Reepithelisierung des Gewebes. Gleichzeitig erfolgt die Bildung einer neuen Basallamina (Runge-Werner et al. 2015, Wild und Auböck (Hrsg.) 2007).

Nach zwei Jahren ist die gesamte Wundheilung beendet und die maximale Reißfestigkeit der Narbe erreicht. Es entsteht eine blasse, wasser- und gefäßarme Narbe, die sich nicht auf normalem Hautniveau befindet (Runge-Werner et al. 2015, Wild und Auböck (Hrsg.) 2007).

Wenn die Wundheilungsphasen nicht oder nicht komplett durchlaufen werden, kann es zur Entstehung einer chronischen Wunde kommen. Oftmals findet eine Stagnation der Wundheilung in der Exsudationsphase statt (Klein et al. 2013).

2.1.2.2 Begünstigende Faktoren einer gestörten Wundheilung

Die Wundreparatur ist einer der komplexesten biologischen Prozesse des Lebens, bei dem viele verschiedene Zellen, Stoffe und Faktoren mit- und nebeneinander arbeiten müssen (Gurther et al. 2008). Kommt es dabei zu einem Ungleichgewicht von proinflammatorischen und inhibitorischen Komponenten, kann eine schlechte Wundheilung die Folge sein (Klein et al. 2013). Pathogene Faktoren, die zu einer gestörten Wundheilung führen und das Abheilen von chronischen Wunden verlangsamen können, werden in lokale und systemische Faktoren unterteilt (siehe Tab. 1).

Tab. 1: Ausgewählte Faktoren für eine gestörte Wundheilung

Lokale Faktoren	Systemische Faktoren
Verbliebene Fremdkörper in der Wunde, Ödeme, Nekrosen, Krusten, Fibrin	Mangelernährung (Eiweißmangel, Vitaminmangel)
Lokale Gewebshypoxie (pAVK, Mikroangiopathien)	Stoffwechselstörungen (Diabetes mellitus, Metabolisches Syndrom)
Spezifische Hauterkrankungen im Wundbereich	Herz-Kreislaufstörungen (Gerinnungsstörung)
Neubildungen im Wundbereich	Medikamente, die die Wundheilung stören/verzögern (Zytostatika, Glykokortikoide)
Austrocknung und Unterkühlung der Wunde	Systemische Erkrankungen des Immunsystems (z.B. Tumore)
Vorschädigung des Gewebes (Bestrahlung, Traumen)	Chemische und physikalische Einflüsse (Drogen, Ionisierende und chemische Strahlung, Lösungsmittel, thermische Einflüsse)
Erhöhte Druckbelastung und fehlende Ruhigstellung im Wundgebiet (Gelenkbewegung)	Zunehmendes biologisches Alter (Atrophie der Dermis, Abnahme der Zellproliferation)
Besiedlung durch Mikroben (Bakterien, Pilze, Parasiten)	Rauchen

(Dissemond et al. 2014, Klein et al. 2013, Runge-Werner et al. 2015, Wicke et al. 2007, Wild und Auböck (Hrsg.) 2007).

Die größte Rolle bei der Störung der Wundheilung stellt die spezifische Virulenz der verschiedenen Bakterien und die breite bakterielle Flora dar (Klein et al. 2013). Nahezu jede chronische Wunde ist mit Bakterien besiedelt. Sie stellt eine andauernde Eintrittspforte für Bakterien dar, was zu einer klinisch relevanten Infektion führen kann (Dissemond 2014). Daher ist die Einteilung von Wunden in problematisch kolonisierte Wunden, in Wunden mit erhöhtem

Infektionsrisiko und in Wundinfektionen von großer Bedeutung. Zur Bewertung und Differenzierung dienen u.a. die klassischen Kardinalsymptome einer Entzündung wie *dolor, rubor, tumor, calor* und *functio laesa*. Um dies zu optimieren wurde von einer Expertengruppe der so genannte *W.A.R.-Score* entwickelt. Dies ist ein klinischer Test, bei dem anhand von endo- und exogenen Faktoren ein Punktwert für jede Wunde errechnet wird, der die Höhe des Wundinfektionsrisikos angibt (Jockenhöfer et al. 2014).

Ein Problem bei Wundinfektionen stellen multiresistente Erreger dar. Beim Nachweis dieser Keime besteht ein erhöhtes Risiko für lokale und systemische Komplikationen, woraus eine verzögerte Heilung resultiert (Dissemond 2014).

2.1.3 Die Wundversorgung

Das oberste Ziel bei der Behandlung von Wunden ist ein rascher, funktionell und ästhetisch zufrieden stellender Wundverschluss. Voraussetzung hierfür ist das Verständnis für die grundlegenden Wundheilungsprozesse (Wild und Auböck (Hrsg.) 2007).

Es ist essentiell, die zugrunde liegenden Ursachen der Wundentstehung zu ermitteln und diese unter Beachtung der Leitlinien kausal zu therapieren. Zur kausalen Therapie einer chronischen Wunde gehören beispielsweise die Diagnostik und die optimale Einstellung eines *Diabetes mellitus* oder anderer Stoffwechselerkrankungen und gegebenenfalls die Verbesserung der Durchblutungssituation. Durch eine effektive Wundbehandlung wird die Lebensqualität der betroffenen Patienten erheblich gesteigert (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung (Hrsg.) 2012, Runge-Werner et al. 2015).

Neben der Kausaltherapie spielt die stadiengerechte Lokaltherapie eine wichtige Rolle. Die Prophylaxe von Infektionen wird durch Einsatz von Antiseptika gewährleistet (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung (Hrsg.) 2012). Die Lokaltherapie beinhaltet die Schmerzlinderung und Wundreinigung, gegebenenfalls ein *Debridement* und die Biochirurgie bei chronisch kontaminierten Wunden mithilfe von Fliegenmaden der Gattung *Lucilia sericata* (Dissemond et al. 2014, Wild und Auböck (Hrsg.) 2007). Gerade in der Lokaltherapie ist die Wahl eines geeigneten Wundtherapeutikums und einer Wundaufgabe von besonderer Bedeutung. Standardwundverbände, wie Schaumstoffkompressen und Alginat, sowie spezielle Wundaufgaben, die hyaluronsäurehaltig oder bakterizid mit Silber oder Bismuth versetzt sind, finden ihren Einsatz (Runge-Werner et al. 2015, Wild und Auböck (Hrsg.) 2007).

2.1.3.1 Die Versorgung akuter Wunden

Der wichtigste Punkt bei der Versorgung von akuten Wunden ist es, den Wundheilungsprozess zu unterstützen, Sterilität zu gewährleisten und sekundäre Wundinfektionen durch Eindringen von Keimen und Fremdkörpern zu verhindern (Runge-Werner et al. 2015).

Trockene Wunden erhalten eine trockene Wundtherapie, feuchte Wunden hingegen werden feucht behandelt (Runge-Werner et al. 2015).

Bei oberflächlichen Verletzungen sollte die Wunde und deren Umgebung mit steriler 0,9%-iger NaCl-Lösung oder sterilem Wasser gereinigt werden. Zur Abdeckung dient ein steriles Pflaster oder ein Verband mit sterilen Kompressen. Nach Bedarf kann ein Gewebekleber genutzt werden. Bei tieferen, komplexeren akuten Wunden werden z.B. vorhandene Fremdkörper entfernt. Falls nötig, führt der Chirurg ein *Debridement* durch und setzt Nähte, gegebenenfalls eine Drainage (Lange und Wessel 2014).

2.1.3.2 Die Lokalthherapie der chronischen Wunden: Das *M.O.I.S.T.* Konzept

Für die Diagnostik und Therapie von chronischen Wunden nutzt man das 2003 vom *Wound Bed Preparation Advisory Board* definierte und seitdem international etablierte *T.I.M.E.* Konzept (Dissemond et al. 2017a, Wild und Auböck (Hrsg.) 2007). Hierbei steht jeder Buchstabe für einen Oberbegriff, der wiederum die zu diagnostizierende und zu behandelnde Zielstruktur beschreibt: T= *tissue* (Gewebe), I= *infection/inflammation* (Infektion/Entzündung), M= *moisture* (Exsudation), E= *edge* (Wundrand) (Wild und Auböck (Hrsg.) 2007). In den letzten Jahren wurden weitere Aspekte der Wundversorgung untersucht und neue Therapieoptionen entwickelt, wodurch das gut bewährte *T.I.M.E.* Prinzip leicht modifiziert wurde und 2017 das *M.O.I.S.T.* Konzept entstand. Die Begriffe Gewebe, Infektion/Entzündung und Exsudation sind ebenfalls im neuen Konzept enthalten. Der Wundrand wurde durch die Buchstaben O und S ersetzt. Sie stehen für *oxygen* (Sauerstoffbalance) und *support* (Unterstützung) (Dissemond et al. 2017a). Genauere Erklärungen und einige Therapiebeispiele des *M.O.I.S.T.* Konzeptes sind in der untenstehenden Tabelle aufgeführt (siehe Tab. 2).

Tab. 2: Behandlungsoptionen des *M.O.I.S.T.* Konzeptes

<p>M Exsudationsmanagement</p>	<p>Balance der Feuchtigkeit einer Wunde, Vermeidung von Sekretstau mit Mazeration der Wundumgebung -trockene Wunden: Wundgele wie Hydrogele zum Anfeuchten -feuchte Wunden: Alginat- und Schaumstoffe zur Aufnahme des Wundexsudats</p>
<p>O Sauerstoffbalance</p>	<p>Hypoxie bekämpfen und Sauerstoffbalance wiederherstellen -Hämoglobin-Sprays, Oxygenierung</p>
<p>I Infektionskontrolle</p>	<p>Eradikation und antimikrobielle Strategien zur Infektionsprophylaxe -lokal: antimikrobielle Wundverbände mit Silber oder Bismuth, Antiseptika, medizinischer Honig und hypochlorige Lösungen -systemisch: Antibiotikum</p>
<p>S Unterstützung des Heilungsprozesses</p>	<p>durch spezielle Wundtherapeutika aktiv in den Wundheilungsprozess eingreifen -Anpassung von pH-Wert, Wachstumsfaktoren, Entzündungsmediatoren; Hautersatzverfahren</p>
<p>T Gewebemanagement</p>	<p>Wundgrundkonditionierung -<i>Debridement</i> und Wundreinigung mit steriler 0,9%-iger Kochsalzlösung oder Ringerlactat-Lösung -physikalische Hilfsmittel wie Vakuum-Versiegelung</p>

(nach Dissemond et al. 2017a, Dissemond 2017).

2.1.3.3 Anforderungen an Wundauflagen

Wundauflagen stellen schon lange keine einfache Wundabdeckung mehr dar. Sie bestehen aus speziellen Substanzen und können mit medizinischen Wirkstoffen versetzt sein, die durch unterschiedliche Technologien den physiologischen Wundheilungsprozess unterstützen und beschleunigen (Runge-Werner et al. 2015).

Die getesteten Wundauflagen sollen einerseits die Wunde vor Bakterien und mechanischer Beanspruchung von außen schützen und andererseits die Keimverschleppung von der Wunde

nach außen verhindern. Eine weitere Aufgabe ist die Förderung des Gasaustausches und das Bereitstellen einer optimalen Temperatur für die Wundheilung. Bei niedriger Temperatur sind die Reparaturprozesse in der Wunde vermindert. Zudem soll durch Einsatz eines Wundverbandes das entstehende Exsudat von der Wundaufgabe aufgenommen werden, um einen Sekretstau zu vermeiden (Runge-Werner et al. 2015).

Während der Reparaturprozesse bilden sich neue Hautzellen, welche nicht durch die Wundaufgabe zerstört werden sollen. Daher sollte das Material nicht am Wundrand haften bleiben. Auflagen mit einer hohen Verweildauer und wenigen Wechseln sind für den Patienten am besten geeignet. Weitere Ansprüche an moderne Wundaufgaben beinhalten Schmerzlinderung, geringes Potential allergischer Sensibilisierung, geringe Toxizität, angenehmer Tragekomfort und gute Verträglichkeit. Da die *Compliance* des Patienten einen hohen Stellenwert bei der Wundversorgung besitzt, sind Geruchsneutralität und eine ansprechende Optik der Wundaufgaben förderlich (Runge-Werner et al. 2015, Wicke et al. 2007).

Auch bei der Wundbehandlung unterliegt der behandelnde Arzt dem Wirtschaftlichkeitsgebot (Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung (Hrsg.) 2012). Die Kosten von Wundaufgaben sollten daher angemessen sein und die Lieferung in sterilen, wirtschaftlichen Packungsgrößen erfolgen (Dissemond et al. 2014).

Erfüllen die Wundaufgaben die Ansprüche im Bereich der Verträglichkeit und Effektivität, wird von einer guten Korrelation zwischen Biokompatibilität und Biofunktionalität gesprochen (Runge-Werner et al. 2015).

2.2 Der medizinische Nutzen von Silber

Das Halbmetall Silber, abgekürzt als *Ag*, befindet sich an 47. Stelle im Periodensystem der Elemente, hat eine Atommasse von 167,9u und glänzt weißlich (Hermann 2017). Pures Silber hat die höchste elektrische und thermische Leitfähigkeit aller Elemente (Konop et al. 2016). 5000v.Chr. wurde dieses Element in Assyrien entdeckt (Hermann 2017).

Silber wird schon seit mehreren tausend Jahren als antimikrobieller Stoff genutzt (Sivestry-Rodriguez et al. 2007). Es weist eine effektive Wirkung gegen Aerobier, Anaerobier, gramnegative und grampositive Bakterien, Hefen, fadenförmige Pilze, Viren und einige antibiotikaresistente Keime wie MRSA und VRE auf (Dunn et al. 2004, MacGregor 2012). Es wird vermutet, dass die Silber-Ionen durch die Bakterienmembran eindringen und in der Zelle mit enzymatischen und strukturellen Proteinen interagieren. Sie stören die Atmungskette in den Cytochromen und können mit der Bakterien-DNA oder Bakterien-RNA Komplexe bilden,

wodurch die Replikation und Transkription in den Bakterien behindert wird. Zudem fördern die Silber-Ionen die Bildung von *ROS* (Dunn et al. 2004, Konop et al. 2016).

In der Medizin finden Silbernanopartikel Verwendung in Desinfektionsmitteln, als Oberflächenbeschichtungen für neurochirurgische *Shunts*, zentralvenöse Katheter und Thoraxdrainagen (MacGregor 2012). Es ist Bestandteil von Knochenzement und verschiedener Implantate. Zudem dienen silberimprägnierte Wundauflagen der Infektionsverhinderung und damit der schnelleren Wundheilung. Dies findet u.a. Anwendung bei Brandwunden, traumatischen Verletzungen und diabetischen *Ulcera* (Chaloupka et al. 2010, Konop et al. 2016). Die aus Silbernitrat hergestellte Sulfadiazin-Creme ist der Goldstandard bei der Behandlung von Patienten mit topischen Verbrennungen (Konop et al. 2016).

Silbernitratlösung in Form von Augentropfen wird genutzt, um eine *perinatale* Übertragung der Gonokokkeninfektion des Auges von der Mutter auf das Kind zu vermeiden. Den antiinflammatorischen Effekt des Silbernitrates macht man sich bei der *Pleurodese* zu Nutze, zudem stoppt es das Wachstum von posttraumatischen *Granulomen* (Chaloupka et al. 2010).

Eine weitere Anwendung von Silber ist die Verarbeitung des Metalls in funktionalisierten Textilien. Kleidung hat am längsten Kontakt mit der menschlichen Haut und spielt damit eine kritische Rolle bei entzündlichen Hauterkrankungen (Fluhr et al. 2010). Daher werden die antibakteriellen und antimykotischen Eigenschaften des Silbers in medizinischen Textilien, wie in den *SeaCell®* Fasern, genutzt (Hipler et al. 2006). Die antimikrobielle Wirkung von silberhaltigen Wundauflagen dient in dieser Arbeit dem Vergleich.

Außerhalb der Medizin wird Silber zur antibakteriellen Oberflächenbeschichtung in Kühlschränken und Geschirrspülern eingesetzt. Es ist Bestandteil von *Deodorants*, sowie Toiletten- und Wasserfiltern (Silver et al. 2006). Weitere Verwendung findet das Element in der Lebensmittelindustrie und der Kosmetikbranche (Konop et al. 2016).

2.3 Bismuth als chemisches Element

Bismuth wurde im 15. Jahrhundert von Paracelsus und Agricola erwähnt. Die Darstellung und der Nachweis gelang Pott, Geoffroy, Bergman und Brezelius in der Mitte des 18. Jahrhunderts. Veraltet wird Bismuth auch als Wismut bezeichnet. Um 1500 nannte man Bergwerke Wismut. Sie befanden sich im Schneeberger Revier „Wiesen“ und wurden dort „gemutet“. Daraus wurde später der Begriff Wiesenmutung, Wiesmut und schließlich Wismut (Böttcher 2016).

Bismuth kommt selten, aber rein zu fast 100% als $^{209}\text{Bismuth}$ -Isotop vor, welches sich vor allem in der Erdkruste befindet. Es sind radioaktive Isotope bekannt. Zu den Bismutherzen wird der Bismuthglanz (Bi_2S_3) und der Bismuthocker (Bi_{12}O_3) gezählt (Binder 2016). Am häufigsten

findet sich Bismuth in China, Kasachstan, Sambia, Peru, Russland, Australien, Kanada, Spanien, Laos und Bolivien (Böttcher 2016).

Bismuth gehört zu den Halbmetallen und weist eine silberweiß-rötliche Farbe und einen mäßigen Glanz auf (Binder 2016). Es ist spröde, was durch Verunreinigungen hervorgerufen wird. In trockener und feuchter Luft bleibt das Element unverändert. Wenn Bismuth erstarrt, dehnt es sich aus. Bismuth leitet Strom und Wärme eher schlecht. Es ist nicht in Wasser löslich, jedoch in Salpeter- und in konzentrierter Schwefelsäure (Ternes 2013). Der Schmelzpunkt liegt bei 271°C, der Siedepunkt bei 1560°C (Binder 2016). Das Element weist den größten Hall-Effekt aller Metalle auf. Hierbei kommt es zum Auftreten einer Spannung in einem stromdurchflossenen Leiter, der sich in einem Magnetfeld befindet (Böttcher 2016).

Bismuth ist im Periodensystem der Elemente in der Stickstoffgruppe bzw. in der 5. Hauptgruppe zu finden. Es weist die Kernladungszahl 83 und eine Atommasse von 208,98u auf. Entsprechend der Kernladungszahl besitzt das Element 83 Elektronen, die sich auf sechs Schalen verteilen (Becker et al. 2004, Binder 2016).

Die erste industrielle Verwendung von Bismuth begann Ende des 15. Jahrhunderts mit der Wismutmalerei. 1681 entstand durch Lemery das *magistère de bismut*, welches als Kosmetikprodukt genutzt wurde (Böttcher 2016). Bismuthtrioxid (Bi_2O_3) findet Anwendung bei farbigen Glasuren (Ternes 2013). Bismuth wird zudem in Legierungen und in der Herstellung von Dauermagneten, Bremsscheiben, Kondensatoren, Spannungssicherungen, Katalysatoren und elektrothermischen Wandlern verwendet. Es findet zudem Verwendung in Lacken, Farbanstrichen, Kunststoffen und Feuerwerkskörpern (Böttcher 2016).

2.4 Die Verwendung von Bismuth in der Medizin

Bismuth wird seit über 200 Jahren in der Medizin verwendet. Im Gegensatz zu anderen Metallen wirkt es kaum toxisch und karzinogen. Anorganische Bismuthverbindungen sind nicht akut giftig, da sie nicht wasserlöslich sind. Organische Verbindungen können sich jedoch in Leber, Nieren und Gehirn anreichern und so zu *Stomatitis*, *Nephropathie* und *Enzephalopathie* führen. Bei medizinischen Anwendungen besteht die Gefahr von Schleimhautentzündungen und Hautveränderungen (Ternes 2013).

Während des 20. Jahrhunderts wurde Bismuth als Heilmittel gegen *Syphilis*, Bluthochdruck, Infektionen, Magen-, Darm- und Hauterkrankungen verwendet. Als Penicillin 1928 entdeckt wurde, erlebte die medizinische Verwendung vom Bismuth einen starken Rückgang. Seit den 1980er Jahren wird Bismuth weltweit wieder verstärkt im medizinischen Sektor genutzt.

Radioaktive Nuklide wie ^{212}Bi und ^{213}Bi sind in α -Strahlung zerfallende Radionuklide, welche potent Tumorzellen töten und das umliegende gesunde Gewebe schützen können. Dies ist in der Nuklearmedizin von Bedeutung (Mahony et al. 1999, Yang und Sun 2011).

Bismuthnitrate und andere Bismuthsalze waren die ersten Röntgenkontrastmittel (Sigel (Hrsg.) und Sigel 2004).

Bismuth wird heutzutage am meisten in Form von *CBS* und *BSS* bei der Behandlung von *Gastritis*, *duodenalen Ulcera* und chronischer *Diarrhöe* eingesetzt (Mahony et al. 1999, Yang und Sun 2011).

Bismuth kann mit Polyaminocarboxylaten komplexiert werden, was Anwendung in Form von präklinischen Modellen zur Behandlung von *Leukämie* und *Prostatakarzinomen* findet.

Es wird als Detektormaterial in der Tomografie und in Salben gegen *Hämorrhoiden* genutzt.

Das bismuthhaltige Bibrocathol wird als Antiseptikum im Augenbereich bei Staphylokokkeninfektionen eingesetzt (Bezdetko et al. 2012).

Bismutheicitrat-Komplexe in Kombination mit Metronidazol, Tetracyclin und Protonenpumpeninhibitoren stellen den Standard in der antibiotischen Therapie von *Helicobacter pylori* dar (Lu et al. 2019, Sigel (Hrsg.) und Sigel 2004). Der Komplex bildet einen Schutzfilm auf der *intestinalen* Schleimhaut und antagonisiert die Wirkung des Enzyms Pepsin. Dies ist förderlich bei der Heilung von *gastrointestinalen Ulcera* (Ternes 2013). *Helicobacter pylori* bildet eine Vielzahl von Enzymen, welche die Virulenz des Bakteriums bestimmen. Bismuthhaltige Medikamente können diese inhibieren (Sigel (Hrsg.) und Sigel 2004). Die genaue Wirkungsweise von Bismuth ist jedoch noch nicht bekannt. Ein jedoch eher zögerlich eingesetzter Verwendungszweck ist die antibakterielle Nutzung von Bismuth in Wundverbänden.

2.5 Die Wundauflagen Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais, Xeroform® Petrolatum Dressing und Xeronet

Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais

Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais der Firma smith&nephew plc ist eine silberbeschichtete antimikrobielle Wundauflage, die in 11 verschiedenen Größen erhältlich ist (siehe Abb. 1). Die Wundauflage ist mit nanokristallinem Silber beschichtet, welches eine antimikrobielle Barriere gegen mehr als 150 pathogene Mikroorganismen, inklusive MRSA und *Pseudomonas aeruginosa*, bildet (Driffield 2008a, Driffield 2008b, Driffield 2008c). Bereits nach 30min sind die bakteriziden Eigenschaften nachzuweisen, die bis zu 3 Tage wirksam sind (smith&nephew 2017a). Nanokristalline Wundauflagen fördern die Wundheilung

bei der Entstehung eines vaskularisierten Granulationsgewebes (Wright et al. 2002). Durch die poröse Silberstruktur der Auflage erfolgt die schnelle und kontinuierliche Freisetzung der Silber-Ionen (Driffield 2008d). Aufgrund der schwach haftenden Polyesterschicht der Auflage ist der Verbandswechsel atraumatisch und relativ schmerzfrei (Myers 2008, smith&nephew 2017a, Walton 2008). Acticoat Flex 3 ist anschmiegsam, dehn- und zuschneidbar, zeichnet sich durch guten Tragekomfort aus und reduziert den Wundgeruch sowie die Bildung von Biofilmen (smith&nephew 2017b).

Besonderen Nutzen findet diese Wundauflage bei Verbrennungen, nach chirurgischen Eingriffen, bei Hautimplantationen und bei venösen und diabetischen *Ulcer*a.

Acticoat Flex 3 kann zu Überempfindlichkeitsreaktionen der Haut führen (smith&nephew 2017a).

Da die lokale antimikrobielle Behandlung von Wunden mit silberversetzten Wundauflagen heute medizinischer Standard ist, wird diese Wundauflage zum Vergleich getestet.



Abb. 1: Foto der Wundauflage Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais

Xeroform® *Petrolatum Dressing*

Xeroform® *Petrolatum Dressing* der Firma Covaleo ist eine feinmaschige Gaze, die aus einem *Petrolatum* (Vaseline) Gemisch besteht, welche mit 3% Bismuth Tribromophenat versetzt ist (siehe Abb. 2). Bismuth Tribromophenat fördert die Epithalisation und hemmt die Geruchsentstehung bei Wunden. Xeroform® hat einen bakteriostatischen Effekt (Covaleo 2017). Diese Wirkung wird wahrscheinlich durch Bismuth-Ionen vermittelt, die sich in der Zelloberfläche, in Zellwänden und im Zytoplasma von Bakterien einlagern und Organelle zerreißen können (Dodge und Wackett 2005). Die Vaseline bildet eine verschließende, nicht klebende Barriere und sorgt für die feuchte Wundumgebung (Hansbrough et al. 1995). Xeroform® findet Einsatz bei Brandwunden des ersten und zweiten Grades, bei der postoperativen Wundbehandlung, bei Schürfwunden, bei der Behandlung von infizierten

Wunden, bei Spalthautentnahmen und bei Spalthautabdeckungen. Bei infizierten Wunden sollte die Gaze täglich gewechselt werden, bei nicht infizierten Verletzungen alle 3-4 Tage. Xeroform[®] ist im Vergleich zu anderen Wundauflagen der Verband erster Wahl bei großen Spalthautentnahmen, da er niedrige Kosten verursacht und bei einfacher Anwendung hohe Heilungsraten und niedrige Infektionsraten aufweist (Feldman et al. 1991). Die Anwendung von Xeroform[®] verursacht geringen oder gar keinen krankenpflegerischen Aufwand (Masella et al. 2014).



Abb. 2: Foto der Wundauflage Xeroform[®] *Petrolatum Dressing*

Xeronet

Die bismuthhaltige Wundauflage Xeronet der Firma Laboratorios Imperiales findet zum derzeitigen Stand in Deutschland noch keine medizinische Anwendung und es sind keine Informationen über diese Wundauflage bekannt. In dieser Arbeit wurde das Wundmaterial erstmals untersucht. Das Wundmaterial Xeronet ist in Abb. 3 dargestellt.

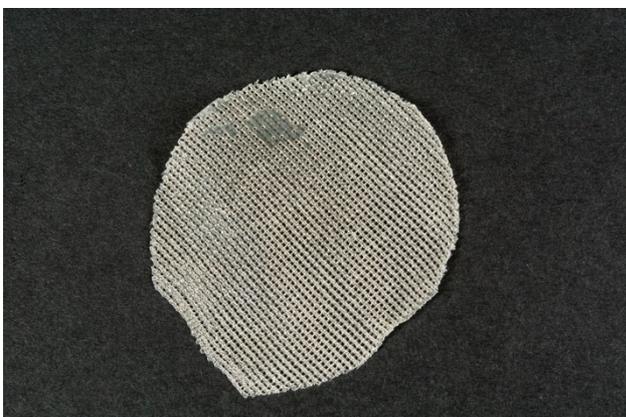


Abb. 3: Foto der Wundauflage Xeronet

2.6 Die zu untersuchenden Bakterien

Staphylococcus aureus

Staphylokokken sind grampositive, haufenförmige Bakterien mit einem Durchmesser von 1µM. Sie bilden keine Sporen und sind unbeweglich (Moll (Hrsg.) 2005). Sie werden in koagulase-positive und koagulase-negative Staphylokokken unterschieden. Die koagulase-negativen Bakterien sind Teil der Standardhautflora wie z.B. der *Staphylococcus epidermidis*. Zu den koagulase-positiven Staphylokokken zählt der *Staphylococcus aureus*. Er gehört zu den wichtigsten humanpathogenen Keimen (Sterry 2011). 15 bis 20% der Menschen sind permanente, 70% passagere Träger des Bakteriums (Schöfer et al. 2011). Die Bakterien sind deshalb so wichtig, weil sie eine große Anzahl von Virulenzfaktoren besitzen. Sie enthalten die Enzyme Koagulase und DNase, zellwandständige Virulenzfaktoren wie die Polysaccharidkapsel und das Protein A, Hämolyse, Enterotoxine und Exfoliatintoxine. Einige Stämme bilden das Enzym Penicillinase, wodurch β -Laktam-Antibiotika unwirksam werden (Moll (Hrsg.) 2005). Seit den 70er Jahren des 19. Jahrhunderts sind methicillinresistente Stämme des *Staphylococcus aureus* (MRSA) bekannt. Penicilline, Cephalosporine und Carbapeneme wirken hier nicht (Suerbaum et al. 2012). In den weiteren Jahren wurden Resistenzen gegen Ciprofloxacin, Vancomycin und Linezolid entdeckt (Schöfer et al. 2011). *Staphylococcus aureus* kann invasiv bedingte Erkrankungen wie *Abzesse*, *Furunkeln*, *Osteomyelitiden* und *Endokarditiden* auslösen. Er ist Erreger von toxinbedingten Erkrankungen wie dem *Toxic Shock Syndrome*, dem *Staphylococcal Scalded Skin Syndrome*, bis hin zur lebensbedrohlichen *Sepsis* (Hof und Dörries 2009). *Staphylococcus aureus* löst 80% aller Wundinfektionen aus (Suerbaum et al. 2012).

Klebsiella pneumoniae

Klebsiellen wurden nach dem Bakteriologen Edwin Klebs benannt und sind gramnegative Bakterien, die keine Sporen bilden und unbeweglich sind. Sie sind bekapselt. Es existieren über 70 verschiedene Kapseltypen. Klebsiellen leben im Wasser, auf Pflanzen, in der Erde und kommen bei einem Drittel der gesunden Bevölkerung in der Darmflora vor. Sie bilden die für sie typischen schleimigen Kolonien. Sie werden zu den drei häufigsten Nosokomialerregern gezählt (Hof und Dörries 2009, Suerbaum et al. 2012). Der wichtigste Vertreter der Klebsiellen ist *Klebsiella pneumoniae*. Diese Bakterien befallen häufig immungeschwächte Personen und können bei ihnen *Abzesse*, *Pleuritiden*, *Sinusitiden*, *Otitiden*, *urogenitale* Infektionen, *Endokarditiden* und *Sepsen* hervorrufen. Bei gesunden Menschen können sie die sogenannte *Friedländer-Pneumonie* auslösen. Klebsiellen besitzen eine natürliche Resistenz gegen

Penicillin G und Aminopenicilline (Hof und Dörries 2009). Zudem weisen viele Stämme eine erweiterte Resistenz gegen andere β -Laktam-Antibiotika auf, da sie das Enzym *ESBL* bilden können (Suerbaum et al. 2012).

3 Ziele der Arbeit

Die Anwendung von antibakteriellen Wundauflagen ist fester Bestandteil in der lokalen Therapie von chronischen Wunden. Da aufgrund steigender Lebenserwartung und des anhaltenden gesundheitsschädigenden Verhaltens die Prävalenz der chronischen Wunden zunehmen wird, ist es notwendig, über die Biofunktionalität der Wundauflagen Kenntnis zu besitzen (Karl et al. 2007). Da die Wundauflagen bei medizinischer Anwendung längeren Hautkontakt aufweisen und evtl. selbst Schäden an Hautzellen induzieren können, bildet neben der Biofunktionalität auch die Biokompatibilität der Wundauflagen ein ausschlaggebendes Kriterium für deren Anwendung.

In dieser Arbeit soll die Testung der Biokompatibilität entsprechend der DIN Norm ISO 10993-5:2007 erfolgen, welche zur Überprüfung auf *in vitro*-Zytotoxizität von medizinischen Produkten eingesetzt wird. Aus der silberhaltigen Wundauflage Acticoat Flex 3 und den zwei bismuthhaltigen Wundmaterialien Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet werden dafür entsprechende Testkonzentrationen erstellt, die mit *HaCaT*-Zellen inkubiert werden. Als Marker für einen Zelluntergang werden die ATP-, Protein- und LDH-Konzentrationen nach Zellinkubation gemessen und Aussagen über die Zytotoxizität unterschiedlicher Extraktkonzentrationen der Wundauflagen geschlussfolgert.

Die Biofunktionalität der Wundauflage soll auf die Bakterien *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* getestet werden. Dies erfolgt entsprechend den Normen *JIS L 1902:2002* und *AATCC 100-2004*. Es sollen Aussagen über die *antibakterielle Gesamtaktivität* und die *Keimreduktion* der jeweiligen Wundauflagen gewonnen werden.

Als Referenz dient jeweils die silberhaltige Wundauflage Acticoat Flex 3.

Silber findet bereits breite Anwendung bei der Herstellung von Wundauflagen. Da einige Bakterien bereits Resistenzen entwickelt haben, spielen die Erkenntnisse aus der Testung der bismuthhaltigen Auflagen Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet eine besondere Rolle (McHugh et al. 1975). Xeronet befindet sich zum derzeitigen Stand noch in keiner medizinischen Anwendung.

Ziel dieser Arbeit ist es, Aussagen über die Biokompatibilität und Biofunktionalität der bismuthhaltigen Wundauflagen nach *in vitro*-Testung zu erhalten und damit erste Empfehlungen für die Anwendung in der medizinischen Wundversorgung zu geben.

4 Materialien

4.1 Chemikalien und andere genutzte Materialien

Wundauflagen

- Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais, Lot. Nr. 1605, smith&nephew plc, London WC2N 6LA, Vereinigtes Königreich
- Bismuth Tribomophenate, Laboratorios Imperiales, 2578 Jiutepec, Morelos, Mexiko
- Xeroform® *Petrolatum Dressing*, Lot. Nr. K13739, COVALEO SA de CV, Polanco, Mexico D.F., C. P. 11560
- Xeronet XN1010US, Lot. Nr. 04638, Laboratorios Imperiales, 2578 Jiutepec, Morelos, Mexiko

Stammhaltung und Versuchskultivierung der *HaCaT*-Zellen

- *DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (High Glucose, 4,5g/L mit stabilem Glutamin)*, Cat. Nr. 1-26F50-I, BioConcept AG, 4123 Allschwil, Schweiz
- *Dulbecco's PBS (w/o Ca²⁺, Mg²⁺)*, Ref. Nr. 3-05F29-I, Amimed Direct Ltd, London NW9 6AQ, Vereinigtes Königreich
- Ethanol $\geq 99,5\%$, Ph.Eur., reinst, Art. Nr. 50554.1, Carl Roth GmbH + Co KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
- FBS, P140705, PAN-Biotech GmbH, 94501 Aidenbach, Deutschland
- Fetales Kälberserum FKS, Cat. Nr. P30-1502, PAN-Biotech GmbH, 94501 Aidenbach, Deutschland
- PSF-Pen/Strep/Fungizone Antibiotika, Lot. Nr. LA02419P, PeloBiotech, 82152 Planegg, Deutschland
- Trypanblau 0,4%, Cat. Nr. 15250-061, Gibco, Life Technologies Inc., Carlsbad, Kalifornien, USA
- 0,05% Trypsin-EDTA, mit Phenolrot, Ref. Nr. 25300-054, Gibco, Life Technologies Inc, Carlsbad, Kalifornien, USA

Herstellung der Materialextrakte

- *DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (High Glucose, 4,5g/L mit stabilem Glutamin)*, Cat. Nr. 1-26F50-I, BioConcept AG, 4123 Allschwil, Schweiz
- PSF-Pen/Strep/Fungizone Antibiotika (Pen 10000IU/mL, Streptomycin 10000µg/mL, Fungizon 25µg/mL), Cat. Nr. 4-02F00-H, BioConcept AG, 4123 Allschwil, Schweiz
- TRIS, Pufferan $\geq 99,3\%$, Art. Nr. AE 15.1, Carl Roth GmbH + Co KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland

- Triton X-100, Alkylphenylpolyaethylenglycol, Art. Nr. 505 002, Ferak Berlin GmbH, 12055 Berlin-Neukölln, Deutschland

Bismuth

- *DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (High Glucose, 4,5g/L mit stabilem Glutamin)*, Cat. Nr. 1-26F50-I, BioConcept AG, 4123 Allschwil, Schweiz
- TRIS, Pufferan $\geq 99,3\%$, Art. Nr. AE 15.1, Carl Roth GmbH + Co KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
- Essigsäure 100%, DAB, E 260, Art. Nr. 6755.1, Carl Roth GmbH + Co KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland
- Triton X-100, Alkylphenylpolyaethylenglycol, Art. Nr. 505 002, Ferak Berlin GmbH, 12055 Berlin-Neukölln, Deutschland
- Salzsäure HCl 1mol/L, Art. Nr. K025.1, Carl Roth GmbH + Co KG, 76185 Karlsruhe, Deutschland

ATPLite-M, Cat. Nr. 6016947 5000 Assay Kit, PerkinElmer, Waltham, Massachusetts, USA

- Flaschen mit lyophilisierten ATP-Standard
- Flaschen mit lyophilisierten Substrat (Luciferase/ Luciferin)
- Mammalian Zelllysepuffer
- Substratpuffer
- *Aqua dest.*, Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61356 Bad Homburg, Deutschland

BC Assay Protein Quantitation Kit (Uptima), UP 40 840 A, Interchim, 03100 Montluçon, Frankreich

- *BC Assay Reagent A*, Bicinchoninic Säure, UP 954 24 A
- *BC Assay Reagent B*, Kupfer (II) Sulfat, UP 954 25 A
- *BSA Standard*, BSA mit 0,05% Natriumazid, UP 368 59 A
- Isotonische Kochsalzlösung NaCl 0,9%, Lot. Nr. 14HD24, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61356 Bad Homburg, Deutschland

Cytotoxicity Assay (LDH), Cat. #G1780, Promega Corporation, Fitchburg, Wisconsin 53711, USA

- *Assay Puffer*
- LDH Positiv-Kontrolle
- Lyophilisiertes Substrat
- Lyselösung

- Stopplösung (Essigsäure)
- *Aqua dest.*, Ampuwa, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, 61356 Bad Homburg, Deutschland
- *BSA*, Cat. Nr. K45-001, GE Healthcare Bio-Sciences Austria GmbH PAA Laboratories GmbH, 4061 Pasching, Austria
- *DMEM-Dulbecco's Modified Eagle's Medium (High Glucose, 4,5g/L mit stabilem Glutamin)*, Cat. Nr. 1-26F50-I, BioConcept AG, 4123 Allschwil, Schweiz
- 0,1%-iger Triton X-100, G. Nr. 505002, Ferak Berlin GmbH, 12055 Berlin, Deutschland

***Cytotoxicity Detection Kit (LDH)*, Cat. Nr. 1644793, Lot. Nr. 14115700, Hoffmann-La Roche AG, 4070 Basel, Schweiz**

- *Solution 1 (Catalyst)*
- *Solution 2 (INT-Farbstofflösung)*

AATCC 100-2004, JIS L 1902:2002

- *Klebsiella pneumoniae* ATCC 4352
- *Staphylococcus aureus* ATCC 6538
- *LabLemco Powder* (Fleischextrakt), B. Nr. LP 0029, 500g, Oxoid Limited, RG24 8PW, Basingstoke, Vereinigtes Königreich
- Physiologische Kochsalzlösung NaCl 0,9%, Lot. Nr. 14HD24, Fresenius Kabi AG, 61346 Bad Homburg, Deutschland
- Polyester, Standard der Hautklinik Jena
- *Special Peptone (Bacto-Peptone)*, B. Nr. LP 0072, 500g, Oxoid Limited, RG24 8PW, Basingstoke, Vereinigtes Königreich
- Tween 20, Art. Nr. 9127.1, Carl Roth GmbH + Co KG, Karlsruhe, Deutschland

4.2 Geräte und Software

Geräte

- 15mL *Cellstar® Tubes*, PP, conical bottom, blue screw cap, sterile, Cat. Nr. 188 271, Greiner Bio-One GmbH, 4550 Kremsmuenster, Österreich
- 50mL *Cellstar® Tubes*, PP, conical bottom, blue screw cap, sterile, Cat. Nr. 210 261, Greiner Bio-One GmbH, 4550 Kremsmuenster, Österreich
- Autoklav Laboklav, SHP Steriltechnik AG, 39345 Detzel Schloss, Deutschland
- Brutschrank BM 500, F. Nr. 902074, Memmert GmbH + Co KG, 8540 Schwabach, Deutschland

- Brutschrank MCO-20AIC, CO₂ Inkubator SANYO Electric Co Ltd., Moriguchi, Osaka 540-6226, Japan
- *Calibrator for automated systems* (C.f.a.s.) B. Nr. 759350, Hoffmann-La Roche AG, 4070 Basel, Schweiz
- CASY TT, Art. Nr. 5651697, OLS OMNI Life Science GmbH & Co KG, 28359 Bremen, Deutschland
- *CELLSTAR®Serological Pipettes*, 5 mL und 10mL, Cat. Nr. 606 180, Cat. Nr. 607 180, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
- *CELLSTAR®Tubes*, blaue Kappe, steril, 50mL, Cat. Nr. 277 261, Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Germany
- Columbia-Agar-Platten mit 5% Schafblut, Ref. Nr. 43049, bioMérieux, 69280 Marcy l'Etoile, Frankreich
- *Combitips advanced* 0,1mL, 0,5mL, 1mL, 10mL, 25mL unsteril, K. Nr. 0030089405, K. Nr. 0030089421, K. Nr. 0030089430, K. Nr. 00300894646, K. Nr. 0030089472, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
- *Combitips advanced* 0,1mL, 25mL, 50mL steril (Biopur), K. Nr. 0030089618, K. Nr. 0030089685, K. Nr. 0030089693, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
- Cryo-Einfrierröhrchen, 4mL, PP, runder Boden, Außengewinde, Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
- DURAN®Borosilikatglas mit Ausguss, verschiedene Größen, DWK Life Sciences GmbH, 97877 Wertheim/Main, Deutschland, Schott AG Jena, 07745 Jena, Deutschland
DURAN®-250mL Glasflasche mit autoklaviertem Deckel, DWK Life Sciences GmbH, 97877 Wertheim/Main, Deutschland, Schott AG Jena, 07745 Jena, Deutschland
- DURAN®Erlenmeyerkolben, verschiedene Größen, DWK Life Sciences GmbH, 97877 Wertheim/Main, Deutschland, Schott AG Jena, 07745 Jena, Deutschland
- DURAN®Laborbecher, verschiedene Größen, DWK Life Sciences GmbH, 97877 Wertheim/Main, Deutschland, Schott AG Jena, 07745 Jena, Deutschland
- Einmalimpföse, steril blau, Art. Nr. 731175, VWR International GmbH, Radnor, Wayne, Pennsylvania 19087, USA
- Eppendorf *Easypet®3*, verschiedene Größen, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
- Eppendorf *Reference®2*, Einkanal, verschiedene Größen, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland

- Eppendorf *Research*®plus, Einkanal, verschiedene Größen, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
- Eppendorf *Xplorer*®plus, 8 Kanal, verschiedene Größen, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
- epT.I.P.S.®, verschiedene Größen, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
- *FLUOstar Galaxy*, BMG LABTECH GmbH, 77799 Ortenberg, Deutschland
- Gaze, Mullkompressen, Ref. Nr. 31528, Fuhrmann GmbH, 53804 Much, Deutschland
- Gefrierschrank Liebherr comfort, G. Nr. 4115-20, Liebherr-International AG, 1630 Bulle, Schweiz
- Handschuhe Nitril®3000, *powderfree, latexfree, small, medium, large*, Ref. Nr. 1280S, 1280M, 1280L, Meditrade GmbH, 83088 Kiefersfelden, Deutschland
- Kleinbrutschrank B15, Thermo Electron Corporation, 63505 Langenselbold, Deutschland
- Koloniezähler *acolyte symbiosis*, M. Nr. 75 10/SYN, Symbiosis, Frederick, Maryland 21704, USA
- *LUMIstar Galaxy*, BMG LABTECH GmbH, 77799 Ortenberg, Deutschland
- M-Prove Waage AY612, Sartorius AG, 37075 Göttingen, Deutschland
- Magnetrührer MR Hei-End, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, 91126 Schwabach, Deutschland
- Messzylinder, BLAUBRAND® ETERNA, verschiedene Größen, VWR International GmbH, Radnor, Wayne, Pennsylvania 19087, USA
- Microbank™, PL. 170, Pro-Lab Diagnostics, Ontario L4B 1K3, Kanada
- *Microscope Cover Slips*, Menzel-Gläser 24 x 60mm, Thermo Fisher Scientific Co, Waltham, Massachusetts 02451, USA
- Mikro-Schraubröhrchen 2mL, PP, Ref. Nr. 72.609.001, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, 51588 Nümbrecht, Deutschland
- Mikrotiterplatte, 96 *Wells*, PS, *ELISA*, F-*Bottom*, klar, Ref. Nr. 655061, Greiner Bio-One GmbH, 4550 Kremsmuenster, Österreich
- Mikrotiterplatte, 96 *Wells*, PS, F-*Bottom*, glasklar, Ref. Nr. 655101, Greiner Bio-One GmbH, 4550 Kremsmuenster, Österreich
- Mikrotiterplatte, Zellkulturplatte, 96 *Wells*, PS, F-*Bottom*, weiß mit durchsichtigem Boden, Ref. Nr. 655098, Greiner Bio-One GmbH, 4550 Kremsmuenster, Österreich
- Mikrotiterplatten-Waschautomat Columbus (Tecan), S. Nr. 404353, SLT Labinstrumente Deutschland GmbH, 74564 Crailsheim, Deutschland

- Multipipette®M4, Einkanal, K. Nr. 4982000012, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland
- pH-Meter PT-15, Sartorius AG, 37075 Göttingen, Deutschland
- Plattformschüttler Titramax 1000, Heidolph Instruments GmbH & Co KG, 91126 Schwabach, Deutschland
- Präzisionswaage L 420 S, Sartorius AG, 37075 Göttingen, Deutschland
- *Primo Star* iLED Licht-Fluoreszenz Mikroskop, Carl Zeiss AG, 73447 Oberkochen, Deutschland
- Reagiergefäß 1,5mL, 2mL *SafeSeal*, Ref. Nr. 72.706.400, Ref. Nr. 72.695.500, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, 51588 Nümbrecht, Deutschland
- Rotilabo Aluminiumfolie, 16µm dick, 30cm breit, B. Nr. 1770.2, Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Deutschland
- Rotilabo Signal-Timer mit Zeituhr, Art. Nr. A802.1, Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Deutschland
- Sanyo MCO-18AIC CO₂Inkubator, Marshall Scientific, Hampton, NH 03842, USA
- Schraubverschluß in blau, gelb, grün, rot, Ref. Nr. 65.716.001, Ref. Nr. 65.716.002, Ref. Nr. 65.716.005, Ref. Nr. 65.716.003, Sarstedt Aktiengesellschaft & Co, 51588 Nümbrecht, Deutschland
- Schüttelwasserbad GFL 1083, Gesellschaft für Labortechnik mbH, 30938 Burgwedel, Deutschland
- Semimikrowaage MC 210 P, Sartorius AG, 37075 Göttingen, Deutschland
- Sicherheitsbunsenbrenner *Fireboy plus*, Integra Biosciences AG, 8304 Wallisellen, Schweiz
- Sterilwerkbank *HeraSafe* KS 12, UnityLab Services, Part of Thermo Fisher Scientific Co, Waltham, Massachusetts 02451, USA
- Trockenschrank TS 400, Volkseigenes Kombinat Medizin- und Labortechnik, Leipzig, Deutschland
- Ultraschallbad Elmasonic 1XE35, Nr. 002427012, 35kHz, Elma Schmidbaue GmbH, 78224 Singen, Deutschland
- *Viewseal* Abdeckfolie, transparent, Ref. Nr. 676070, Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
- Vortexer *Lab Dancer digital*, G. Nr. 01.648590, VWR International GmbH, Radnor, Wayne, Pennsylvania 19087, USA
- Vortexer VF 2, N. 524139, IKA Labortechnik, 7813 Staufen im Breisgau, Deutschland

- Wasserbad Typ 1022, S. Nr. 104149900, GFL Gesellschaft für Labortechnik GmbH, 30938 Burgwedel, Deutschland
- Wasserbad VWB 18, ECN 462-0243, VWR International GmbH, Radnor, Wayne, Pennsylvania 19087, USA
- Zählkammer Neubauer *improved*, B. Nr. T729.1, inklusive zwei Hemocytometer-Deckgläser, Carl Roth GmbH, 76185 Karlsruhe, Deutschland
- Zellkulturflasche 250mL, 75cm², PS, B. Nr. 658175, Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Deutschland
- Zellkulturschale PS, 35/10mm, Nocken, *Cellstar*® TC, steril, Ref. Nr. 627160, Greiner Bio-One GmbH, 72636 Frickenhausen, Germany
- Zentrifuge 5702RH, Eppendorf AG, 22339 Hamburg, Deutschland

Software

- *Excel*[™] 2010, Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
- *Numbers Version* 2008-2016, Apple Inc. Corporation, Cupertino, Kalifornien, USA
- *Origin* 1991-2002, OriginLab Corporation, Northampton, Massachusetts, USA
- *Stata*®14, StataCorp LLC, College Station, Texas 77845-4512, USA

5 Methoden

5.1 Evaluierung der Biokompatibilität der Wundauflagen Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais, Xeroform® *Petrolatum Dressing*, Xeronet und des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat (Norm ISO 10993)

Bei Testung der Wundauflagen spielt neben der Beurteilung der Wirksamkeit eines Wundmaterials (siehe 5.2) auch die Verträglichkeit auf menschlichen Zellen eine Rolle. Welchen Effekt die Wundauflagen auf die Haut haben, kann anhand einiger Parameter beurteilt werden, die in den folgenden Untersuchungen getestet werden. Es werden die drei Wundauflagen Acticoat Flex 3, Xeroform® *Petrolatum Dressing*, Xeronet und der Reinstoff Bismuth Tribromophenat beurteilt. Die Versuche erfolgen anhand der DIN Norm ISO 10993-5:2007, die zur Überprüfung auf *in vitro*-Zytotoxizität von Medizinprodukten genutzt wird. Alle Versuche werden nach dem *Standard Operating Procedure (SOP)* des Labors der Hautklinik des Universitätsklinikums Jena durchgeführt.

5.1.1 Die verwendete *HaCaT*-Zelllinie und deren Stammhaltung und Versuchskultivierung

Für die Versuche der Evaluierung der Biokompatibilität werden die epithelischen *HaCaT*-Zellen genutzt. Sie entstammen dem Randbereich eines *Melanoms* auf dem oberen Rücken eines 62-jährigen Mannes. Sie wurden bei einem niedrigen Calciumgehalt und bei einer hohen Temperatur von 38,5°C kultiviert. Das Akronym *HaCaT* resultiert somit aus der Beschreibung für die Zelllinie: *Human adult low Calcium High Temperature Cells*. Durch eine spontane Metamorphose wurde diese Zelllinie besonders widerstandsfähig und unsterblich (Lutmann et al. 2014). *In vitro* besitzen diese Zellen einen veränderten Phänotyp, sind aber nicht tumorinduzierend. Trotz des veränderten und unbegrenzten Wachstumspotenzials zeigen sie nach Implantation auf Nacktmäuse eine regelmäßige, strukturierte Schichtung und Differenzierung der *Epidermis* wie normale Keratinozyten (Boukamp et al. 1988, Kehrer 2016). Aufgrund dieser Ähnlichkeiten zu normalen Keratinozyten wird die Zelllinie der *HaCaT*-Zellen für diese Untersuchungen verwendet.

Die Rolle von Matrix- und Adhäsionsmolekülen und deren Interaktion bei der Ausbildung eines regelmäßigen Gewebes kann anhand der *HaCaT*-Zellen erklärt werden. Die Moleküle befinden sich zur Kommunikation zwischen Epithel und Bindegewebe im ständigen Umbau. Für das Verständnis von Tumoren, der Heilung chronischer Wunden und von Reparaturprozessen ist es daher wichtig zu wissen, in wie weit sich Matrixbestandteile verändern lassen (Breitkreutz et

al. 1998). Dies soll in Zukunft durch *in vivo*-Manipulation relevanter Genprodukte in den *HaCaT*-Zellen erreicht werden. Beispielsweise können die Integrinketten der Matrixzellen überexprimiert werden (Giancotti et al. 1990).

HaCaT-Zellen finden Anwendung bei *in vitro* durchgeführten Toleranz- und Toxizitätstests, da sie eine wichtige Rolle bei Entzündungs- und Wundheilungsprozessen, sowie bei der Immunabwehr, spielen. Sie bilden Zytokine, Komplement- und Wachstumsfaktoren (Wiegand und Hipler 2008). Sie können ein breites Spektrum an Keratinen bilden, wie die Keratine K5, K6, K14, K16 und K17, welche ebenfalls in normalen Keratinozyten vorkommen (Ryle et al. 1989).

Bevor mit der Kultivierung der *HaCaT*-Zellen begonnen wird, muss die Sterilbank desinfiziert werden. 5min vor Arbeitsbeginn wird der Abzug eingeschaltet. Beim Arbeiten werden stets Handschuhe getragen, um mögliche Kontaminationen zu verhindern. Alle benötigten Reagenzien werden auf RT gebracht.

Ausgangspunkt ist die sieben Tage alte Zellkultur in der Zellkulturflasche, welche unter dem Mikroskop mit einer hundertfachen Vergrößerung betrachtet wird. Zu erkennen sind Zellen im Zellverband. Das Medium in der Zellkulturflasche wird abgesaugt und verworfen. Es enthält die Antibiotikamischung PSF. Die am Flaschenboden befindlichen Zellen werden zwei Mal mit je 10mL *PBS* gewaschen. Die entstandene Suspension wird abgesaugt und anschließend mit 4mL Trypsin/EDTA versetzt. Es folgt die Inkubation bei 37°C im Brutschrank für 5min. Das Inkubieren darf 10min nicht überschreiten, da es sonst zu irreversiblen Schäden an den Zellen kommen kann. Das Gemisch Trypsin/EDTA hat die Aufgabe, die Zellverbindungen aufzulösen. Trypsin ist eine alkalische Pankreasprotease. Sie fungiert als Endopeptidase und spaltet Peptidbindungen am Carboxylende der Aminosäuren Arginin und Lysin. Dadurch baut es die Zell-Matrix-Verbindungen an. EDTA ist ein sechszähliger Chelator, der Calcium komplexiert und damit Zell-Zellverbindungen auflöst (Gstraunthaler und Lindl 2013). Nach 5min Einwirkzeit wird der Auflösevorgang von Trypsin beendet, indem die doppelte Menge des fertigen Mediums zur Zellsuspension hinzugeben wird. Das entstandene Gemisch wird mehrmals mit der Pipette aufgezogen und so vermischt. Durch nochmaliges Mikroskopieren sind die nun abgekugelten und vereinzelt Zellen zu erkennen. Die Zellsuspension wird für 5min bei RT und 1000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert, das entstandene Zellpellet aufgeschüttelt und mit 8mL *DMEM* versetzt. Die Zellzahl (ZZ) wird mittels dem Zellzahlzähler CASY TT bestimmt. Sie liegt in der Regel bei $1,11 \times 10^6$ Zellen/mL. Um die Vitalität der Zellen zu kontrollieren, wird die Trypanblaufärbung durchgeführt.

Trypanblaulösung ist ein saurer Farbstoff, der als Anion fungiert und Proteine leicht bindet (Lutmann et al. 2014). Tote Zellen färben sich durchgängig blau an. Schwach gefärbte Zellen werden ebenfalls als tote Zellen betrachtet. 122µL Zellsuspension werden mit 100µL 0,4%-igem Trypanblau für 2 bis 5min inkubiert. Anschließend erfolgt eine zweifache Zählung in zwei verschiedenen Zählkammern. Die Anzahl der toten und lebendigen Zellen in den zwei Auszählungen sollte sich maximal um 15% unterscheiden. Die *Anzahl der lebenden Zellen in %* wird nach Formel (1) berechnet:

$$\text{Anzahl der lebenden Zellen in \%} = \frac{\text{ungefärbte Zellen}}{\text{ungefärbte Zellen} + \text{gefärbte Zellen}} \times 100 \quad (1)$$

(SOP/Winter 2016).

Aus der bestimmten ZZ kann die Verdünnung und damit die Menge der verwendeten Zellsuspension und *DMEM* für die zu beschickenden 96 *Well*-Mikrotiterplatten berechnet werden. Pro Reinstoff Bismuth und pro Wundaufgabe werden jeweils sechs Platten, drei durchsichtige und drei weiße Platten, beschickt. Jede Platte wird nach Hinzugabe aller Substanzen für 1h, 24h und 48h inkubiert. Die durchsichtigen Platten dienen der Bestimmung des Protein-Gehaltes der Zellen mittels *BC Assay Protein Quantitation Kit* (siehe 5.1.6), die weißen Platten der Bestimmung der ATP-Menge der Zellen mittels *Lumineszenz ATP-Detections-Kit* (siehe 5.1.5). Für alle drei Wundaufgaben und den Reinstoff Bismuth werden insgesamt 24 Mikrotiterplatten genutzt.

ZZ	1,11x10 ⁶ Zellen/mL
Volumen pro <i>Well</i>	200µL
Verdünnung	1 : V
Anzahl Zellsuspension	Y
Anzahl <i>DMEM</i>	Z
Anzahl der Bestimmungen	8 (eine Mikrotiterplatte hat 8 Reihen, A bis H)
Anzahl der Platten pro Material	6 (jeweils 3 Platten zur Bestimmung des ATP- und Protein-Gehaltes der Zellen)
50000 Zellen/mL	festgelegte Anzahl der eingesäten Zellen

$$\frac{ZZ}{50000} = V \quad \text{mit } V = 22 \quad (2)$$

$$\text{Volumen pro Well} \times \text{Anzahl Bestimmung} \times \text{Anzahl Platten} = 200 \mu\text{L} \times 8 \times 6 = 86,4\text{mL} \quad (3)$$

(Die Gesamtmenge an *DMEM* und Zellsuspension für sechs Platten wird auf 95mL aufgerundet.)

$$\frac{95\text{ml}}{v} = Y \quad \text{mit } Y = 4,32\text{mL} \quad (4)$$

$$95\text{mL} - Y = Z \quad \text{mit } Z = 90,68\text{mL} \quad (5)$$

Damit insgesamt 6 Platten pro zu untersuchendem Material genutzt werden können, werden 90,68mL *DMEM* und 4,32mL der Zellsuspension benötigt.

Durch Zugabe des *DMEMs* wird die *ZZ* auf 50000Zellen/mL festgesetzt. Alle 96 *Well*-Mikrotiterplatten werden pro *Well* mit 200µL, also mit je 10.000 Zellen des entstandenen Mediums (Medium + Zellen), von Spalte 3 bis 11 beschickt (siehe Tab. 3). Die ersten beiden Spalten dienen zur Standardkurvenermittlung des ATP- und Protein-Gehaltes. In der Spalte 12 befinden sich die *Blanks (BLK)*. *Blanks* sind Blindproben, in denen sich keine Zellen befinden. Die eingesäten *HaCaT*-Zellen werden für 24h im CO₂-Inkubator bei 37°C und 5%CO₂ kultiviert.

Tab. 3: Layout einer Mikrotiterplatte

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Medium	<i>BLK</i>								
B			Medium	<i>BLK</i>								
C			Medium	<i>BLK</i>								
D			Medium	<i>BLK</i>								
E			Medium	<i>BLK</i>								
F			Medium	<i>BLK</i>								
G			Medium	<i>BLK</i>								
H			Medium	<i>BLK</i>								

Zur Stammhaltung der Zellen wird die errechnete *ZZ* von 1,11x10⁶ Zellen/mL in eine 75cm² Zellkulturflasche eingesät und mit 15mL *DMEM* vermischt. Die *HaCaT*-Zellen werden nun bei 37°C und 5%CO₂ Begasung kultiviert. Alle 48h erfolgt ein Mediumwechsel (*SOP/Winter* 2016).

5.1.2 Die Herstellung der Testkonzentrationen bzw. der Materialextrakte der eingesetzten Wundauflagen

Die Wundauflagen müssen zur Durchführung der Untersuchungen mit den *HaCaT*-Zellen versetzt werden. Die Auflagen können jedoch nicht direkt auf die *HaCaT*-Zellen übertragen werden, da diese sonst an Sauerstoffmangel versterben würden. Daher ist eine Extrakterstellung von Acticoat Flex 3, Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet notwendig. Durch die Extraktion werden Prüfmuster erstellt, anhand derer die biologische Reaktionsfähigkeit und das Gefährdungspotenzial jedes herauslösbaren Bestandteils für die Anwendung am Menschen bestimmt werden kann (DIN EN ISO 10993-12). Die Extraktion erfolgt bei allen drei Wundauflagen analog.

3g der jeweiligen Wundauflage werden entsprechend der DIN EN ISO 10993-12 in einem Erlenmeyerkolben eingewogen, zerkleinert und für 20min bei 121°C autoklaviert. 15mL einer *DMEM*+PSF-Lösung werden hinzugeben. Es resultiert ein Extraktionsverhältnis der Wundauflage von 0,2g/mL. Dies entspricht einer Testkonzentration von 100%.

Pro Wundauflage wird die Hälfte des entstandenen Extraktionsvolumens in einem Schüttelwasserbad bei 37°C für 24h, die andere Hälfte für 72h, extrahiert. Dies erfolgt, um eine Aussage über die Biokompatibilität hinsichtlich der Extraktionszeit zu erhalten. Da die Ergebnisse der 72h Extraktion innerhalb der Standardabweichung liegen, erfolgt die weitere Auswertung nur anhand der 24h Extrakte der Wundauflagen.

Die Extraktionsvolumina werden anschließend für 5min bei 1000rpm über Gaze zentrifugiert. Die entstandenen Überstände werden steril filtriert und bis zur Verwendung im Kühlschrank gelagert. Vor Versuchsbeginn werden die Wundauflagenextrakte mit FKS supplementiert. Hierzu werden 10mL Wundauflagenextrakt mit 1mL FKS vermischt.

5.1.3 Ansetzen der Mikrotiterplatte mit den hergestellten Wundauflagen Testkonzentrationen bzw. der Materialextrakte

Insgesamt werden für die hergestellten Wundauflagen Testkonzentrationen bzw. die Wundauflagenextrakte von Acticoat Flex 3, Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet 18 Mikrotiterplatten genutzt. Die Platten mit den Extrakten werden jeweils für 1h, 24h und 48h inkubiert. Für jede Inkubationszeit wird eine gesonderte Mikrotiterplatte genutzt. Die Platten wurden bereits mit den *HaCaT*-Zellen versehen und befinden sich im Brutschrank (siehe 5.1.1). Das Befüllen der Platten mit den Extrakten erfolgt für jede Wundauflage analog.

Acht Röhrchen werden bereitgestellt, welche mit den Buchstaben (A) bis (G) beschriftet werden. Der hergestellte Wundauflagenextrakt (Stammlösung) hat ein Extraktionsverhältnis von 0,2g/mL und damit eine Testkonzentration von 100% (siehe 5.1.2). Nach der untenstehenden Tabelle werden die verschiedenen Testkonzentrationen erstellt (siehe Tab. 4).

Tab. 4: Extraktverd nnung

Röhrchennummer	Stammlösung [mL]	Medium [mL]	Testkonzentration [%]	Extraktionsverhältnis [g/mL]
(A)	4	-	100	0,2
(B)	3	1	75	0,15
(C)	2	2	50	0,1
(D)	1	3	25	0,05
(E)	0,5	4,5	10	0,01
(F)	0,5 (E)	4,5	1	0,001
(G)	0,5 (F)	4,5	0,1	0,0001

Pro Wundaufgabe werden die sechs mit den *HaCaT*-Zellen inkubierten Mikrotiterplatten nach 24h aus dem Brutschrank genommen und ausgekippt, um die Zellen vom alten Medium zu befreien. Die ersten beiden Spalten der Platte sind frei von Wundaufgaben Konzentrationen, da dort die Standardkurven für die Bestimmung des ATP- und Protein-Gehaltes angesetzt werden (siehe 5.1.5 und 5.1.6). In den Spalten 3 und 11, Reihe A bis E wird in jedes *Well* 100 L Medium pipettiert (siehe Tab. 5). In die Spalten 4 bis 10 werden jeweils 100 L der entsprechenden Testkonzentrationen hinzugefügt. Dabei wird mit der niedrigsten Konzentration begonnen. Die Reihen A bis D enthalten jeweils den 24h Extrakt (siehe Tab. 5, rote Schrift), die unteren 4 Reihen den 72h Extrakt (siehe Tab. 5, blaue Schrift). In die Spalte 3, Reihe F bis H, werden jeweils 100 L von 0,1%-iger Triton X-100 Lösung hinzugeben. Diese *Wells* dienen als Positivkontrolle (PK), in denen alle Zellen sterben. Die (PK) in der Spalte 11 bleiben frei und werden erst 45min vor Beginn der Messung des LDH-Gehaltes mit 10 L der 10xLysel sung versetzt (siehe 5.1.7). In der letzten Spalte befinden sich die *Blanks* (BLK). Die beschickten Platten werden mit einer durchsichtigen Folie beklebt und für 1h, 24h und 48h im Brutschrank inkubiert. Anschließend erfolgen die Messungen der jeweiligen Parameter.

Tab. 5: Layout der zu beschickenden Mikrotiterplatte mit den Testkonzentrationen der Wundaufgaben

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Medium	0,1 %	1 %	10 %	25 %	50 %	75 %	100 %	Medium	BLK 50%
B			Medium	0,1 %	1 %	10 %	25 %	50 %	75 %	100 %	Medium	BLK 75%
C			Medium	0,1 %	1 %	10 %	25 %	50 %	75 %	100 %	Medium	BLK 100%
D			Medium	0,1 %	1 %	10 %	25 %	50 %	75 %	100 %	Medium	BLK 50%
E			Medium	0,1 %	1 %	10 %	25 %	50 %	75 %	100 %	Medium	BLK 75%
F			(PK)	0,1 %	1 %	10 %	25 %	50 %	75 %	100 %	(PK)	BLK 100%
G			(PK)	0,1 %	1 %	10 %	25 %	50 %	75 %	100 %	(PK)	
H			(PK)	0,1 %	1 %	10 %	25 %	50 %	75 %	100 %	(PK)	

5.1.4 Ansetzen der Mikrotiterplatte mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat

Da der Reinstoff Bismuth nur in Essig- oder Salpetersäure löslich ist, werden 10mg Bismuth mit 10mL 50%-iger Essigsäure (1mg/mL) versetzt und für 30min ins Ultraschallbad gestellt (Sigel (Hrsg.) und Sigel 2004). Es folgt die Herstellung einer *DMEM*/TRIS Lösung in einer 1:4 Verdünnung. *DMEM* fungiert als Nährlösung für die *HaCaT*-Zellen. Durch das Lösungsmittel Essigsäure ist ein saurer pH-Wert vorhanden. TRIS und 30mL *DMEM* werden vermischt. Die hergestellte Lösung wird als Medium bezeichnet und hat einen pH-Wert von 7,88.

Anschließend werden die zu untersuchenden Reagenzien in neun beschrifteten Röhren erstellt. Röhren (A) bis (E) enthalten verschiedenen Konzentrationen des Reinstoffes. Deren Herstellung ist in Tab. 6 veranschaulicht.

In Röhren (G) und (H) befinden sich jeweils 5mL Medium. Zu Röhren (G) werden 180µL 1 molare HCl hinzugeben, zu Röhren (H) 150µL 1 molare HCl. In Röhren (G) wird ein pH-Wert von 5,14 gemessen, in Röhren (H) ein pH-Wert von 6,12.

Röhren (I) enthält 50%-ige Essigsäure. Dazu werden 10µL Bismuth/Essigsäure mit 990µL Medium vermischt, wodurch ein pH-Wert von 5,14 resultiert. Röhren (J) enthält eine 0,25%-ige Essigsäurekonzentration. Diese wird aus 500µL des Röhrens (B) mit 500µL *DMEM*

erzeugt. Röhren (J) hat mit 6,12 den gleichen pH-Wert wie Röhren (H). Röhren (G), (H), (I) und (J) dienen als Kontrollröhren.

Tab. 6: Herstellung der Konzentrationen des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat

Röhrchennummer	Reinstoff Bismuth [μL]	Medium [mL]	7mL	Konzentration des Reinstoffes [$\mu\text{g/mL}$]
(A)	140	18,86	-	10
(B)	-	7	aus (A)	5
(C)	-	7	aus (B)	2,5
(D)	-	7	aus (C)	1,25
(E)	-	7	aus (D)	0,625

Unter Punkt 5.1.1 wurden für die Reinsubstanz Bismuth sechs Platten mit den *HaCaT*-Zellen versetzt. Die Platten werden nach 24h aus dem Brutschrank genommen und unter dem Mikroskop betrachtet. Es sind vereinzelte, sich noch in der Wachstumsphase befindende Zellen zu erkennen. Die Mikrotiterplatten werden abgeschüttet, um die Zellen von altem Medium zu befreien. Die Beschickung der Platten erfolgt analog der Beschickung in Tab. 5. Änderungen gibt es nur in den Spalten 4 bis 10. Diese werden laut Layout mit jeweils 100 μL von Röhren (J) bis (A) befüllt (siehe Tab. 7). Es wird mit der niedrigsten Konzentration begonnen. Die Platten werden mit einer Schutzfolie beklebt und entweder für 1h, 24h oder 48h inkubiert. Der Reinstoff Bismuth Tribromophenat wird zum Vergleich gegenüber den Wundaufgaben getestet.

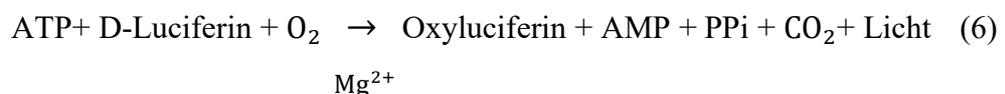
Tab. 7: Layout der zu beschickenden Mikrotiterplatte mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A			Medium	(G)	(I)	(E)	(D)	(C)	(B)	(A)	Medium	
B			Medium	(G)	(I)	(E)	(D)	(C)	(B)	(A)	Medium	(BLK E)
C			Medium	(G)	(I)	(E)	(D)	(C)	(B)	(A)	Medium	(BLK D)
D			Medium	(G)	(I)	(E)	(D)	(C)	(B)	(A)	Medium	(BLK C)
E			Medium	(H)	(J)	(E)	(D)	(C)	(B)	(A)	Medium	(BLK B)
F			(PK)	(H)	(J)	(E)	(D)	(C)	(B)	(A)	(PK)	(BLK A)
G			(PK)	(H)	(J)	(E)	(D)	(C)	(B)	(A)	(PK)	
H			(PK)	(H)	(J)	(E)	(D)	(C)	(B)	(A)	(PK)	

5.1.5 Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels Lumineszenz ATP-Detections-Kit

ATP ist ein Marker für die Zellaktivität und kommt bei allen metabolischen Prozessen vor. Gehen Zellen zu Grunde, sinkt die Konzentration des ATPs. Die Messung des ATP-Gehaltes in der genannten Untersuchung beruht auf der Reaktion des *Luciferase* Enzyms des Glühwürmchens:

Luciferase



(Branchini et al. 2017, SOP/Winter 2010).

Das emittierte Licht bei dieser Reaktion ist proportional zur ATP-Konzentration in nM und damit zur *Zellzahl in %* und kann im *LUMistar Galaxy* gemessen werden.

Nach Inkubation der Zellen mit dem Reinstoff Bismuth und den Extrakten der Wundauflagen Acticoat Flex 3, Xeroform ® *Petrolatum Dressing* und Xeronet werden die weißen Mikrotiterplatten nach 1h, 24h und 48h aus dem Brutschrank entnommen. Nach allen drei Inkubationszeiten und für alle vier zu untersuchenden Materialien erfolgt der gleiche

Testablauf. Bei der Versuchsdurchführung ist es wichtig, Handschuhe zu tragen und mit neuen Pipettenspitzen zu arbeiten, da es sonst zu Kontaminationen mit den ATPasen des eigenen Körpers kommt.

Zur Erstellung einer ATP-Standardkurve werden acht Röhren benötigt. Sie werden mit den Buchstaben (A) bis (H) beschriftet. Eine 10^{-2} M Stammlösung wird hergestellt. Hierzu wird eine Flasche mit lyophilisierten ATP-Standard mit der Konzentration von $11,2 \times 10^{-6}$ mol in $1120 \mu\text{L}$ *Aqua dest.* gelöst. Die entstandene Standard Stammlösung wird zu je $30 \mu\text{L}$ abgefüllt und bei -20°C eingefroren. Die Herstellung der Standardkurve erfolgt anhand des Schemas in Tab. 8.

Tab. 8: Herstellung der ATP-Standardkurve

Röhrchennummer	Standard Stammlösung [μL]	<i>Aqua dest</i> [μL]	Mischung aus Röhrchen [μL]	aus (H)	Standardkurven Konzentration [M]
(H)	20	1980	-		1×10^{-4}
(G)	-	250	750		$0,75 \times 10^{-4}$
(F)	-	500	500		$0,5 \times 10^{-4}$
(E)	-	750	250		$0,25 \times 10^{-4}$
(D)	-	875	125		$0,125 \times 10^{-4}$
(C)	-	900	100		1×10^{-5}
(B)	-	950	50		$0,5 \times 10^{-5}$
(A)	-	990	10		1×10^{-6}

Nach sorgfältigem Mischen der acht Röhren mit dem Vortexer werden jeweils $10 \mu\text{L}$ entnommen und in Doppelbestimmung in die ersten beiden freien Spalten der Mikrotiterplatte pipettiert (siehe Tab. 5 und Tab. 7). Nachfolgend werden je $100 \mu\text{L}$ Medium und $50 \mu\text{L}$ Mammalian Zellysepuffer in alle 96 *Wells* der Mikrotiterplatte verteilt. Die Platte wird für 5min bei 700rpm geschüttelt und anschließend mit $50 \mu\text{L}$ Luciferase/Luciferin-Substratlösung pro *Well* versetzt. Es folgt ein erneutes Schütteln bei 700rpm für 5min. Die Platten werden dunkel gestellt und für 10min bei RT inkubiert. Anschließend erfolgt die Messung im Luminometer *LUMIstar Galaxy* (SOP/Winter 2010).

Tabellarisch werden die ermittelten ATP-Konzentrationen in nM in Abhängigkeit der Testkonzentrationen des Mediums (Negativkontrolle), der Triton X-100 Lösung (Positivkontrolle), der Wundaufgaben Konzentrationen in % bzw. der Reinstoff

Konzentrationen in $\mu\text{g/mL}$ in einer *Excel*-Datei dargestellt. Die erhaltenen Diagramme sind im Anhang zu finden (siehe Abb. 26, Abb. 32, Abb. 38 und Abb. 44). Die *Zellzahl in %* kann aus den erhaltenen ATP-Konzentrationen errechnet werden:

$$\text{Zellzahl in \%} = \frac{\text{ATP Wert in nM}}{\text{Mittelwert ATP in nM} - \text{Wert des Mediums in nM}} \times 100 \quad (7)$$

Sie wird in Abhängigkeit von den Wundauflagen Testkonzentrationen in % bzw. der Reinstoffkonzentrationen in $\mu\text{g/mL}$ graphisch dargestellt. Hieran erfolgt die Auswertung der Ergebnisse (siehe Abb. 5, Abb. 8, Abb. 11 und Abb. 14).

Ebenfalls erfolgt über die Ermittlung von Regressionsgeraden (siehe Tab. 18, Tab. 20, Tab. 22 und Tab. 24) aus den gemessenen ATP-Konzentrationen die Berechnung der *Zellzahl/mL* und deren grafische Darstellung (siehe Abb. 27, Abb. 33, Abb. 39 und Abb. 45). Dies ist im Anhang zu finden.

5.1.6 Bestimmung der Protein-Konzentration mittels BC Assay Protein Quantitation Kit

Der Nachweis von Proteinen in Zellen beruht auf einer Farbreaktion, die als Bicinchoninsäure-Reaktion (*BCA*-Reaktion) bezeichnet wird (*SOP/Winter 2011*). Die Proteine reduzieren Cu^{2+} -Ionen zu einwertigen Kupfer-Ionen. Anschließend reagieren die Cu^{1+} -Ionen mit Bicinchoninsäure zu einem violetten Farbkomplex. Dieser Komplex wird mittels Photometrie im *FLUOstar Galaxy* nachgewiesen. Die Farbintensität des Komplexes ist proportional zum Protein-Gehalt in $\mu\text{g/mL}$. Die reagierenden Kupfer-Ionen sind im *BC Assay Reagent B* enthalten, die Bicinchoninsäure im *BC Assay Reagent A*. Während des Versuches werden beide miteinander vermischt.

Die drei farblosen Platten pro zu untersuchendem Material werden nach 1h, 24h und 48h Inkubationsdauer nach Versetzung mit den *HaCaT*-Zellen aus dem Brutschrank genommen (siehe 5.1.1). Es erfolgt nach allen Inkubationszeiten derselbe Testablauf.

Die Platte wird ruckartig ausgeschüttet, um das alte Medium abzuschütten. Um die Zelllysate herzustellen, wird die Platte zwei Mal mit $300\mu\text{L}$ *PBS* pro *Well* gewaschen, anschließend mit $75\mu\text{L}$ pro *Well* mit *HaCaT*-Lysepuffer (*PBS* + 0,1%-iger Triton X-100 Lösung) versehen und für 15min bei 700rpm geschüttelt. Zum Schutz der Proben wird die Platte mit einer durchsichtigen Schutzfolie beklebt und anschließend im Wasserbad bei 90°C für 15min

inkubiert. Nachdem die Mikrotiterplatte abgekühlt ist, erfolgt das Einfrieren dieser bei -20°C . Durch den Lysepuffer, das Erhitzen sowie das anschließende Einfrieren der Platte, kommt es zur Zerstörung der Zellen und damit zur Freisetzung der Proteine. Deren Anzahl wird später im Messgerät bestimmt.

Zunächst wird die Standardkurve zur Bestimmung des Protein-Gehaltes angesetzt. Hierzu werden acht Röhrrchen verwendet, welche mit Buchstaben (A) bis (H) beschriftet werden (siehe Tab. 9).

Tab. 9: Herstellung der Protein-Standardkurve

Röhrchennummer	BSA Stocklösung (2mg/mL) [μL]	Lysepuffer [μL]	500 μL	Standardkurven Konzentration [$\mu\text{g/mL}$]
(H)	150	850	-	300
(G)	-	500	aus (H)	150
(F)	-	500	aus (G)	75
(E)	-	500	aus (F)	37,5
(D)	-	500	aus (E)	18,75
(C)	-	500	aus (D)	$\sim 9,4$
(B)	-	500	aus (C)	$\sim 4,7$
(A)	-	500	-	0

Jeweils $25\mu\text{L}$ aus den Röhrrchen (A) bis (H) werden in Doppelbestimmung in die ersten beiden freien Spalten der Mikrotiterplatte pipettiert (siehe Tab. 5 und Tab. 7). Mit der niedrigsten Konzentration wird begonnen. Die Beschickung wird analog der Beschickung der weißen Platte mit dem ATP-Standard durchgeführt (siehe 5.1.5). Anschließend wird in jedes *Well* $200\mu\text{L}$ der *BCA*-Reagenz pipettiert. Diese wird zuvor angesetzt. Sie besteht aus 1 Teil *Reagent B* und 50 Teilen *Reagent A*. Pro Mikrotiterplatte werden $0,4\text{mL}$ *Reagent B* mit 20mL *Reagent A* benötigt. Die mit den Reagenzien versehene Platte wird für 30min bei 60°C inkubiert und anschließend abgekühlt. Es erfolgt die Absorptionsmessung im *FLUOstar Galaxy* (SOP/Winter 2011).

Die Messwerte werden automatisch in eine *Excel*-Datei überführt, in welcher die tabellarische Auflistung des Protein-Gehaltes in $\mu\text{g/mL}$ in Abhängigkeit der Testkonzentrationen des Mediums (Negativkontrolle), der Triton X-100 Lösung (Positivkontrolle), der Wundaufgaben Testkonzentrationen in % bzw. der Reinstoff Konzentrationen in $\mu\text{g/mL}$ erfolgt. Die

zugehörigen Diagramme sind im Anhang zu finden (siehe Abb. 28, Abb. 34, Abb. 40 und Abb. 46).

Die Zellzahl in % kann wie folgt bestimmt werden:

$$\text{Zellzahl in \%} = \frac{\text{Proteingehalt in } \mu\text{g/mL}}{\text{Mittelwert Proteingehalt in } \mu\text{g/mL} - \text{Proteingehalt des Mediums in } \mu\text{g/mL}} \times 100 \quad (8)$$

Ebenfalls erfolgt die Veranschaulichung der Zellzahl in % in Abhängigkeit der Wundauflagen Testkonzentrationen in % bzw. der Reinstoff Konzentrationen in $\mu\text{g/mL}$ zur Auswertung der Ergebnisse in Balkendiagrammen (Abb. 6, Abb. 9, Abb. 12 und Abb. 15).

Mithilfe von Regressionsgeraden (siehe Tab. 19, Tab. 21, Tab. 23 und Tab. 25) lässt sich aus den gemessenen Protein-Konzentrationen die *Zellzahl/mL* ermitteln und grafisch darstellen (siehe Abb. 29, Abb. 35, Abb. 41 und Abb. 47). Dies ist im Anhang zu finden.

5.1.7 Bestimmung der LDH-Konzentration mittels CytoTox96® *Non Radioactive Cytotoxicity Assay*

LDH ist ein zytosolisches Enzym, welches in allen Zellen des Menschen vorkommt. LDH spielt eine wichtige Rolle bei der *anaeroben Glykolyse* und wandelt Pyruvat zu Lactat unter Verbrauch von $\text{NADH} + \text{H}^+$ in NAD^+ um (Löffler und Petrides 2014). Diese Reaktion ist reversibel. Der nachzuweisende Test beruht auf der Gegenreaktion von Lactat zu Pyruvat unter Entstehung von $\text{NADH} + \text{H}^+$ (siehe Abb. 4). Es werden INT (2-[4-iodophenyl]-3-[4-nitrophenyl]-5-phenyltetrazolinsalzchlorid) und das Enzym Diaphorase hinzugegeben. Dieses Enzym katalysiert die Reaktion von INT zu Formazansalz. Formazansalz ist rot und kann photometrisch im *FLUOstar Galaxy* nachgewiesen werden. Die Farbintensität ist proportional zur Aktivität von LDH und damit zur Anzahl der abgestorbenen Zellen (Lutmann et al. 2014). Ist viel LDH nachzuweisen, spricht dies für einen signifikant hohen Zelluntergang.

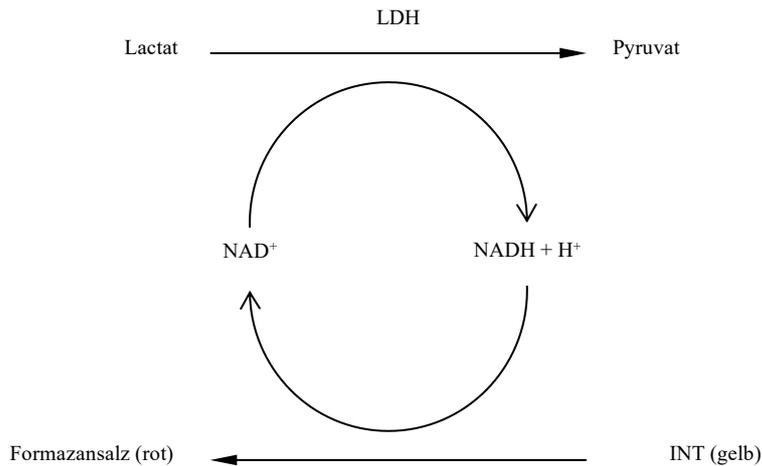


Abb. 4: Testprinzip des LDH-Nachweises (*SOP/Winter 2005* und *SOP/Winter 2013b*).

45min vor Entnahme aller Mikrotiterplatten aus dem Brutschrank werden je 10µL der 10xLyselösung in die Spalte 11, Reihe F bis H, der mit den Materialien versehenen Platten pipettiert (siehe Tab. 5 und Tab. 7). Die Platten werden für die restlichen 45min wieder zurück in den Brutschrank gestellt. Die Zugabe der 10xLyselösung dient zur *High*Kontrolle, um das Maximum der LDH-Abgabe zu bestimmen (siehe Tab. 5, Spalte 11, Reihe F bis H). Die spontane Abgabe von LDH von unbehandelten Zellen wird als *Low*Kontrolle bezeichnet. Diese wird in den *Wells* des Mediums gemessen (siehe Tab. 5 und Tab. 7, Spalte 3 und 11, Reihe A bis E). Die LDH-Aktivität im Medium wird als *Background* bezeichnet. Die mit 0,1%-iger Triton X-100 Lösung versehenen *Wells* bilden die Positivkontrolle (siehe Tab. 5 und Tab. 7, Spalte 3, Reihe F bis H). Nach allen drei Inkubationszeiten und für alle vier zu untersuchenden Stoffe erfolgt derselbe Testablauf.

Nach 45min Einwirkzeit der 10xLyselösung werden aus den Platten für die ATP- und Protein-Bestimmung pro *Well* 50µL mit einer 8-Kanalpipette entnommen und in eine frische durchsichtige 96 *Well*platte überführt. Es ist darauf zu achten, dass keine Luftblasen übertragen werden.

Zwei Lösungen werden hergestellt, die jeweils in einer Flasche mit einem roten und blauen Deckel gefüllt werden. In der Flasche mit rotem Deckel wird das Lyophilisat erstellt, indem 1mL des *Catalyst* in 1mL *Aqua dest.* gelöst und gut vermengt werden. In der Flasche mit dem blauen Deckel befindet sich die INT-Farbstofflösung, die bereits gebrauchsfertig ist. Für 100 Tests werden 250µL der Flasche mit dem roten Deckel und 11,25mL der Flasche mit dem blauen Deckel vermischt. So entsteht eine 1:46 Verdünnung des LDH-Reaktionsgemisches.

50µL des frischen LDH-Reaktionsgemisches werden in jedes *Well* der neuen Platte pipettiert. Die Platte wird geschüttelt, um die Reagenzien zu vermischen und anschließend für 30min bei RT im Dunkeln inkubiert. In jedes *Well* werden 50µL Essigsäure (Stopplösung) pipettiert. Eine rote Farbreaktion einiger *Wells* lässt auf Toxizität schließen. Maximal 60min nach Zugabe der Stopplösung wird die optische Dichte im *FLUOstar Galaxy* bei einer Wellenlänge von 490nm gemessen. Es erfolgt eine weitere Messung bei der Referenz Wellenlänge von 620nm. Die optische Dichte entspricht dem LDH-Gehalt in mOD (*SOP/Winter 2005* und *SOP/Winter 2013b*).

Die gemessenen LDH-Konzentrationen in mOD werden in eine *Excel*-Datei überführt und tabellarisch in Abhängigkeit der Testkonzentrationen des Mediums (Negativkontrolle), der Triton X-100 Lösung (Positivkontrolle) und der Testkonzentrationen der Wundaufgaben in % bzw. des Reinstoffes in µg/mL dargestellt. Aus den Messwerten wird mit Hilfe der Zytotoxizitätsformel (9) die *Zytotoxizität* in % berechnet und in einem Balkendiagramm veranschaulicht (siehe Abb. 7, Abb. 10, Abb. 13 und Abb. 17).

$$\text{Zytotoxizität [\%]} = \frac{\text{LDH Wert in mOD} - \text{Lowkontrolle in mOD}}{\text{Highkontrolle in mOD} - \text{Lowkontrolle in mOD}} \times 100 \quad (9)$$

Folgende Zytotoxizitätsgleichungen in Abhängigkeit der Wundaufgaben und des Reinstoffes werden berechnet (siehe Tab. 10, Tab. 11, Tab. 12 und Tab. 13).

Tab. 10: Übersicht der Zytotoxizitätsgleichungen für Acticoat Flex 3

Inkubationszeit	Zytotoxizitätsgleichung
1h	$\begin{aligned} &\text{Zytotoxizität [\%]} \\ &= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 607,4\text{mOD}}{1616\text{mOD} - 607,4\text{mOD}} \times 100 \end{aligned}$
24h	$\begin{aligned} &\text{Zytotoxizität [\%]} \\ &= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 453,4\text{mOD}}{2999,67\text{mOD} - 453,4\text{mOD}} \times 100 \end{aligned}$
48h	$\begin{aligned} &\text{Zytotoxizität [\%]} \\ &= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 532,8\text{mOD}}{3338,33\text{mOD} - 532,8\text{mOD}} \times 100 \end{aligned}$

Tab. 11: Übersicht der Zytotoxizitätsgleichungen für Xeroform® *Petrolatum Dressing*

Inkubationszeit	Zytotoxizitätsgleichung
1h	Zytotoxizität [%] $= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 591\text{mOD}}{1402\text{mOD} - 591\text{mOD}} \times 100$
24h	Zytotoxizität [%] $= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 467,2\text{mOD}}{2574,67\text{mOD} - 467,2\text{mOD}} \times 100$
48h	Zytotoxizität [%] $= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 550,6\text{mOD}}{3247,33\text{mOD} - 550,6\text{mOD}} \times 100$

Tab. 12: Übersicht der Zytotoxizitätsgleichungen für Xeronet

Inkubationszeit	Zytotoxizitätsgleichung
1h	Zytotoxizität [%] $= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 523,4\text{mOD}}{1670,67\text{mOD} - 523,4\text{mOD}} \times 100$
24h	Zytotoxizität [%] $= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 478\text{mOD}}{3046\text{mOD} - 478\text{mOD}} \times 100$
48h	Zytotoxizität [%] $= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 489\text{mOD}}{3354,33\text{mOD} - 489\text{mOD}} \times 100$

Tab. 13: Übersicht der Zytotoxizitätsgleichungen für den Reinstoff Bismuth Tribromophenat

Inkubationszeit	Zytotoxizitätsgleichung
1h	Zytotoxizität [%] $= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 589\text{mOD}}{1251,67\text{mOD} - 589\text{mOD}} \times 100$
24h	Zytotoxizität [%] $= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 390,38\text{mOD}}{1840\text{mOD} - 390,38\text{mOD}} \times 100$
48h	Zytotoxizität [%] $= \frac{\text{LDH Wert in mOD} - 422,63\text{mOD}}{2420,67\text{mOD} - 422,63\text{mOD}} \times 100$

5.1.8 EnzymimmunoAssay zur quantitativen Bestimmung von humanem Interleukin-8 (IL-8) und humanem Interleukin-6 (IL-6)

Reaktionen von zytotoxischen Substanzen sind oft mit der Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen, wie IL-8 und IL-6, gekoppelt. IL-8 gehört zu den CXC Chemokinen und stellt einen chemischen Lockstoff für Neutrophile dar. IL-6 produziert einen Großteil der zellulären und physiologischen Antworten bei Entzündungsprozessen, in der *Hämatopoese* und in der neuronalen Differenzierung. Beide Zytokine werden zu Beginn der Arbeit mittels *EnzymimmunoAssay (ELISA)* nachgewiesen. Die Ergebnisse des *ELISA*-Tests zeigen keine quantitative Korrelation zwischen Interleukin-Konzentration und Zelltod. IL-8 und IL-6 dienen als ein Marker für Entzündungsprozesse und Zellstress, anhand der Ergebnisse dieser Arbeit jedoch nicht als geeigneter Marker zur Einschätzung der Zytotoxizität von Bestandteilen der getesteten Wundauflagen (Wiegand und Hipler 2009). Aufgrund des Umfangs der Arbeit wurde die Testung mittels *ELISA* und deren Ergebnisse nachträglich herausgenommen. Diagramme der erhaltenen Ergebnisse finden sich im Anhang (siehe Abb. 30, Abb. 31, Abb. 36, Abb. 37, Abb. 42, Abb. 43, Abb. 48 und Abb. 49) (*SOP/Wiegand 2011* und *SOP/Wiegand 2016*).

5.2 Evaluierung der Biofunktionalität der Wundauflagen Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystais, Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet

Entsprechend der *SOP's* des Labors der Klinik für Hautkrankheiten des Universitätsklinikums Jena wurden die entsprechenden Versuche durchgeführt.

5.2.1 Prüfung der Wundauflagen auf antibakterielle Wirkung entsprechend des *Japanese Industrial Standard (JIS L 1902:2002)*

Damit die Hemmung des Wachstums von Mikroorganismen durch antimikrobielle Substanzen in Textilien, Flüssigkeiten, Zellulose-Pulvern, Cremes und Wundauflagen beurteilt werden kann, werden die folgenden Untersuchungen entsprechend des *Japanese Industrial Standard JIS L 1902:2002* „*testing method for antibacterial activity of textiles*“ durchgeführt. Die Tests werden an den drei Wundauflagen mit dem grampositiven Bakterium *Staphylococcus aureus* und dem gramnegativen Erreger *Klebsiella pneumoniae* realisiert. Die *antibakterielle Gesamtaktivität oder Reduktion des mikrobiellen Wachstums der Wundmaterialien* kann wie folgt berechnet werden:

*antibakterielle Gesamtaktivität oder Reduktion des mikrobiellen Wachstums
der Wundmaterialien = logKBE(IWK)_{t=18h} – logKBE(Probe)_{t=18h}* (11)

KBE	Koloniebildende Einheiten
IWK	Interne Wachstumskontrolle
Probe	jeweilige Wundaufgabe
t	Zeitpunkt

(SOP/Winter 2013a).

5.2.1.1 Vorbereitung der Untersuchungen entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002*

Zu Beginn wird die *Caso-Bouillon* (Medium) hergestellt. Hierzu werden 3g *LabLemco Powder* und 5g *Special Peptone* in 1L *Aqua dest.* gelöst und der pH-Wert auf 7,0 eingestellt. Die Auflösung der Substanzen wird durch ständiges Rühren und Erhitzen beschleunigt. Die hergestellte *Bouillon* wird für 15min bei 121°C autoklaviert und nach dem Abkühlen im Kühlschrank gelagert.

Die für die Untersuchung notwendigen Bakterien werden aus der Kryobank entnommen und aufgetaut. Mit Hilfe der 3-Strichmethode wird eine Columbia-Agar-Platte beimpft. Die Agar-Platte wird für 24h bis 48h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 2°C bis 5°C gelagert. Daraus wird eine 18h-Schüttelkultur hergestellt. Mindestens zwei Kolonien auf der Platte werden mit einer Öse von der Stammhaltungs-Platte in 20mL *Caso-Bouillon* überführt und für 18h bei 37°C im Schüttelwasserbad inkubiert. Daraus wird ein Testinokulum erstellt. Die 18h-Schüttelkultur wird 1:1000 in Medium verdünnt. Hiervon werden 10µL mit 990µL Medium vermischt. Wiederum 400µL der entstandenen Lösung werden zu 3600µL Medium hinzugeben. Das entstandene Testinokulum kann bis zu 4h auf Eis gestellt werden.

1mL Tween 20 und 500mL NaCl werden vermischt, um die Ausschüttelflüssigkeit herzustellen. Jeweils 10mL hiervon werden in 50mL Röhren abgefüllt und bei 2°C bis 8°C bis zur Nutzung gelagert. Die Ausschüttelflüssigkeit besteht aus NaCl-Lösung und nicht aus reinem Wasser, da die Bakterien sonst aufgrund von *Osmose* platzen würden. Tween 20 ist enthalten, um die Oberflächenspannung der Wundaufgaben herabzusetzen, damit die Bakterien in diese eindringen können.

Pro Wundaufgabe werden davon 3x400mg je Lauf und je Testkeim in kleine Eppendorf *Tubes* eingewogen (dreifache Bestimmung pro Probe). Getestet werden insgesamt sechs Muster. Dies sind Acticoat Flex 3, Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet, jeweils autoklaviert und

nicht autoklaviert. Die zu autoklavierenden Proben werden bei 121°C für 15min dampfsterilisiert und im Trockenschrank bei 80°C getrocknet.

Vom Polyester, welches als Referenz eingesetzt wird, werden 6x400mg je Lauf und Testkeim in Eppendorf *Tubes* eingewogen. Drei der sechs Referenzen dienen als 0h-Wert Kontrollen und drei als 18h-Wert Kontrollen. Die *Tubes* werden für 15min bei 134°C autoklaviert.

5.2.1.2 Versuchsdurchführung entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002*

Tag 1

Pro Testkeim werden die drei *Tubes* mit den Polyester 0h-Wert Kontrollen, die drei *Tubes* mit den Polyester 18h-Wert-Kontrollen und die drei *Tubes* pro Wundmaterial bereitgestellt. Jeder *Tube* wird mit 200µL des Testinokulums beimpft. Die Inhalte der drei *Tubes* mit den Polyester Referenzen für die 0h-Wert Kontrollen werden in je ein beschriftetes 50mL Röhrchen überführt, welches mit 10mL der Ausschüttelflüssigkeit gefüllt ist. Der Inhalt wird für 25s mit dem Vortexer behandelt und bis zur Nutzung auf Eis gestellt. Dies dient der Bestimmung des Keimwachstums zum Zeitpunkt 0h, welches als $KBE/Platte_{t=0h}$ bezeichnet wird.

Nach dem Schema in Tab. 14 erfolgt die Herstellung der Verdünnungen der Polyester 0h-Wert Kontrollen. 100µL jeder Verdünnungsstufe werden auf eine Columbia-Agar-Platte ausplattiert. Es wird mit der höchsten Verdünnung begonnen und es ist darauf zu achten, dass möglichst wenig am Rand der Platten verteilt wird. Insgesamt werden neun Platten genutzt, da jede Polyester 0h-Wert Kontrolle drei Verdünnungen besitzt. Jede Platte wird auf dem Plattenboden mit der Referenznummer und der Verdünnungsstufe beschriftet. Die Platten werden mit Deckel nach unten für 24h bei 37°C inkubiert. Die übrigen *Tubes* mit den weiteren Referenzproben und den Wundmaterialien werden für 18h bei 37°C inkubiert.

Tab. 14: Herstellung der Verdünnungsreihe der Polyester 0h-Wert Kontrollen

Tubenummer	NaCl [µL]	50µL	Verdünnungsstufe
1	450	der Ausschüttelflüssigkeit des 50mL Röhrchens	10^1
2	450	aus Tube 1	10^2
3	450	aus Tube 2	10^3

Tag 2

Es folgt die Auszählung der $KBE/Platte_{t=0h}$ auf den neun Platten der 0h-Wert Kontrollen. Hierzu wird der Koloniezähler *acolyte symbiosis* genutzt. Die erhaltenen KBE werden in eine *Excel*-Datei überführt, in der die weitere Bearbeitung und Berechnung stattfindet. Es erfolgt die Berechnung der $KBE(Kontrolle)_{t=0h}$:

$$KBE(Kontrolle)_{t=0h} = KBE/Platte_{t=0h} \times Verdünnung \times 10 \times 100 \quad (12)$$

KBE	Koloniebildende Einheit
Kontrolle	Referenzmaterial, Polyester
Probe	Wundauflage
t	Zeitpunkt
10	10mL Ausschüttelflüssigkeit
100	ausplattieren von 100 μ L

Anschließend erfolgt die Berechnung des dekadischen Logarithmus von $KBE(Kontrolle)_{t=0h}$, welches als $\log KBE(Kontrolle)_{t=0h}$ bezeichnet wird. Sowohl von der $KBE(Kontrolle)_{t=0h}$, als auch von $\log KBE(Kontrolle)_{t=0h}$ werden Mittelwert und Standardabweichung berechnet.

Nach 18h Inkubation bei 37°C werden die *Tubes* mit den übrigen Polyester 18h-Wert Kontrollen und die *Tubes* mit den Wundauflagen aus dem Inkubator entnommen. Für jede Polyester 18h-Wert Kontrolle und für jeden *Tube* mit Wundauflagen Probe wird je ein 50mL Röhrchen mit 10mL Ausschüttelflüssigkeit bereitgestellt und beschriftet. Referenzen und Proben werden in diese Röhrchen gegeben, für 25s mit dem Vortexer vermischt und bis zur Nutzung auf Eis gestellt.

Nach Tab. 15 wird die Verdünnungsreihe der Polyester 18h-Wert Kontrollen hergestellt. 100 μ L der Verdünnungen 10^3 , 10^4 , 10^5 werden auf insgesamt neun beschriftete Columbia-Agar-Platten pro Testkeim pipettiert.

Tab. 15: Herstellung der Verdünnungsreihe der Polyester 18h-Wert Kontrollen

Tubenummer	NaCl [μL]	50 μL	Verdünnungsstufe
1	450	der Ausschüttelflüssigkeit des 50mL Röhrchens	10^1
2	450	aus Tube 1	10^2
3	450	aus Tube 2	10^3
4	450	aus Tube 3	10^4
5	450	aus Tube 4	10^5

Anschließend erfolgt die Herstellung der Verdünnungsreihe ($10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$) der Proben analog der Tab. 15. Die Verdünnung 10^0 befindet sich im 50mL Ausschüttelröhrchen. 100 μL jeder erstellten Verdünnung werden auf eine Columbia-Agar-Platte pipettiert und verteilt. Es wird mit der höchsten Verdünnung begonnen. Die Platten werden sorgfältig mit der Probennummer und der Verdünnungsstufe beschriftet. Pro Wundaufgabe werden 18 Platten bereitgestellt, da pro Verdünnungsstufe eine dreifache Bestimmung erfolgt. Alle Platten werden für 24h bei 37°C bebrütet.

Tag 3

Die entstandenen Kolonien $KBE/Platte_{t=18h}$ auf den 18h-Wert Kontrollplatten und auf den 18h-Wert Wundaufgabenplatten werden ausgezählt. Es erfolgt die Berechnung von $KBE(Kontrolle)_{t=18h}$ und $KBE(Probe)_{t=18h}$ analog (12). Aus beiden Werten wird der dekadische Logarithmus gezogen, was als $\log KBE(Kontrolle)_{t=18h}$ und $\log KBE(Probe)_{t=18h}$ betitelt wird. Von allen ermittelten Größen erfolgt die Berechnung der Mittelwerte und der Standardabweichungen. Der Mittelwert aus $\log KBE(Kontrolle)_{t=18h}$ wird auch als Interne Wachstumskontrolle $\log KBE(IWK)_{t=18h}$ bezeichnet. Aus $\log KBE(Kontrolle)_{t=18h}$ und $\log KBE(Probe)_{t=18h}$ kann das prozentuale *mikrobielle Wachstum* % ermittelt werden. Dies wird in Abb. 18 und Abb. 20 dargestellt. Es folgt die Berechnung des *Wachstumswertes*, siehe Formel (13). Hat dieser einen Wert von über 0,8 wird dies mit ‚ok‘ in der Datei vermerkt, ansonsten erscheint der Hinweis ‚Prüfen‘.

$$\text{Wachstumswert} = \log KBE(IWK)_{t=18h} - \log KBE(Kontrolle)_{t=0h} \quad (13)$$

KBE Koloniebildende Einheit
 IWK Intere Wachstumskontrolle

Kontrolle	Referenzmaterial, Polyester
t	Zeitpunkt

In den Diagrammen Abb. 19 und Abb. 21 kann mithilfe von (11) die *antibakterielle Gesamtaktivität oder Reduktion des mikrobiellen Wachstums der Wundauflagen* berechnet und dargestellt werden (SOP/Winter 2013a). Signifikante Ergebnisse sind mit (*) gekennzeichnet.

5.2.2 Prüfung der Wundauflagen auf antibakterielle Wirkung entsprechend der *Standard Test Method of the American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC 100-2004)*

Damit die antibakterielle Wirkung von Textilien (Stoffe, Garn, Fasern, beflockter Stoff, Kordeln, Faservlies, Teppiche) und Wundauflagen getestet werden kann, wendet man die *AATCC Test Methode 100-2004 "Assessment of antibacterial finishes on textile materials"* an. Die Untersuchungen werden an drei Wundauflagen mit dem grampositiven Erreger *Staphylococcus aureus* und dem gramnegativen Bakterium *Klebsiella pneumoniae* durchgeführt. Die *Keimreduktion der Wundauflagen in %* kann wie folgt berechnet werde:

$$\text{Keimreduktion der Wundauflagen in \%} = \frac{\text{Kontrolle}_{t=0h} \text{KBE(Probe)} - \text{Probe}_{t=24h} \text{KBE(Probe)}}{\text{Kontrolle}_{t=0h} \text{KBE(Probe)}} \times 100 \quad (14)$$

KBE	Koloniebildende Einheit
Kontrolle	Referenzmaterial, Polyester
Probe	Wundauflage
t	Zeitpunkt

(SOP/ Wiegand 2012).

5.2.2.1 Vorbereitung der Untersuchungen entsprechend der Norm AATCC 100-2004

Als erster Schritt wird die *Caso-Bouillon* (Medium) hergestellt. Dazu werden 3g des *LabLemco Powders* mit 5g des *Special Peptones* in 1L *Aqua dest.* aufgelöst. Der pH-Wert wird auf 7,0 eingestellt. Unter Rühren und Erhitzen kommt es zum kompletten Auflösen des Pulvers. Die *Bouillon* wird für 15min bei 121°C autoklaviert und im Kühlschrank bis zur Nutzung gelagert. Die Bakterien werden aus der Kryobank entnommen, aufgetaut und mittels der 3-Strichmethode jeweils auf eine Columbia-Agar-Platte mit 5% Schafblut beimpft. Die Platten werden anschließend für 24h bis 48h bei 37°C inkubiert und bei 2°C bis 5°C gelagert. Mindestens zwei Kolonien auf der beimpften Platte werden mit einer Öse abgenommen und in 20mL der *Caso-Bouillon* gegeben. Die Flasche wird für 18h bei 37°C in einem Wasserschüttelbad inkubiert. So entsteht die 18h-Schüttelkultur.

Zur Herstellung des Testinokulums wird die Schüttelkultur 1:10000 mit Medium verdünnt, welches zuvor 1:20 in der Ausschüttelflüssigkeit verdünnt werden muss. 10µL der 18h-Schüttelkultur werden zu 990µL Medium hinzugeben. Damit entsteht eine Verdünnung von 10^2 . Anschließend werden hiervon 250µL zu 24750µL Medium hinzuzugeben, um die gewünschte 1:10000 Verdünnung herzustellen. Das so erhaltene Testinokulum kann maximal 4h auf Eis gelagert werden.

Die Ausschüttelflüssigkeit wird erzeugt, indem 1mL Tween 20 zu 500mL NaCl gegeben werden. Je 10mL der Ausschüttelflüssigkeit werden in 50mL Röhrchen verteilt und bei 4°C gelagert.

Es werden Versuche an Acticoat Flex 3 autoklaviert, Xeroform® *Petrolatum Dressing* autoklaviert und Xeronet autoklaviert durchgeführt. Um die Proben vorzubereiten, werden die Wundauflagen in kreisrunde Proben mit dem Durchmesser 4,8cm geschnitten. Eine Abweichung von 0,1cm wird zugelassen. Für jedes Material muss geprüft werden, wie viele Proben mit dieser Größe erforderlich sind, um 1mL Flüssigkeit komplett aufzunehmen. Pro Wundaufgabe werden drei Proben je Lauf und je Testkeim verwendet.

Die Polyester Referenzen werden ebenfalls in kreisrunde Proben mit dem Durchmesser von 4,8cm geschnitten. Auch hier wird eine Abweichung von 0,1cm zugelassen. Sechs Polyester Proben werden je Lauf und je Testkeim genutzt. Hierbei dienen drei Proben zur 0h-Wert Kontrolle und drei als Kontrolle für den 24h-Wert.

Alle Materialproben und Referenzen werden in 250mL Glasflaschen mit autoklaviertem Deckel überführt und bei 121°C für 15min autoklaviert. Es folgt die Trocknung der Proben im

Trockenschrank bei 80°C. Wenn keine Autoklavierung möglich ist, muss die Vorbereitung steril erfolgen.

5.2.2.2 Versuchsdurchführung entsprechend der Norm AATCC 100-2004

Tag 1

Die Wundmaterialien und die Kontrollen werden auf sterile Petrischalen überführt und mit je 1000µL Testinokulum beimpft. Die Proben werden unter aseptischen Bedingungen in sterile 250mL Glasflaschen überführt und verschlossen. Die drei 0h-Wert Kontrollen werden ebenfalls in 250mL Glasflaschen überführt und mit 100mL Ausschüttelflüssigkeit versetzt. Die Glasflaschen mit den Kontrollen werden für 25s mit Hilfe des Vortexers gemischt und auf Eis gestellt.

Es wird eine Verdünnungsreihe ($10^1, 10^2, 10^3$) der Ausschüttelflüssigkeit mit den 0h-Wert Kontrollen angefertigt. Dies erfolgt analog der Verdünnungsreihenherstellung der Tab. 14 unter 5.2.1.2 (Tag 1). Je 100µL jeder Verdünnungsstufe werden auf eine Columbia-Agar-Platte pipettiert. Es wird mit der höchsten Verdünnung begonnen. Insgesamt werden dafür neun Platten benötigt, die am Boden mit der Kontrollnummer und der Verdünnungsstufe beschriftet werden. Die fertigen Platten werden für 24h bei 37°C inkubiert. Diese Prozedur dient der Bestimmung des Keimwachstums zu der Zeit von 0h. Die übrigen Teststücke werden für 24h bei 37°C inkubiert.

Tag 2

Die entstandenen Kolonien $KBE/Platte_{t=0h}$ auf den neun Platten der 0h-Wert Kontrollen werden mit Hilfe des *acolyte symbiosis* gezählt. Die erhaltenen Koloniezahlen werden in eine *Excel*-Datei überführt, in welcher die weitere Bearbeitung stattfindet. Es erfolgt die Berechnung der $Kontrolle_{t=0h}KBE(Probe)$ nach folgender Formel:

$$Kontrolle_{t=0h}KBE(Probe) = KBE/Platte_{t=0h} \times Verdünnung \times 100 \times 100 \quad (15)$$

KBE	Koloniebildende Einheiten
Kontrolle	Referenzmaterial, Polyester
Probe	Jeweilige Wundaufgabe
t	Zeitpunkt
100	100mL Ausschüttelflüssigkeit
100	ausplattieren von 100 µL

Der dekadische Logarithmus $\log_{10} \text{Kontrolle}_{t=0h} \text{KBE}(\text{Probe})$ der $\text{Kontrolle}_{t=0h} \text{KBE}(\text{Probe})$ sowie Mittelwert und Standardabweichung werden berechnet.

Die übrigen Proben werden nach 24h aus dem Inkubator genommen und mit je 100µL Ausschüttelflüssigkeit versetzt. Nach ausreichendem Mischen werden die Proben auf Eis gestellt.

Aus den 24h-Wert Kontrollen wird eine Verdünnungsreihe ($10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$) hergestellt. Dies erfolgt analog der Tab. 15 unter 5.2.1.2 (Tag 2). Jeweils 100µL der hergestellten Verdünnungen $10^3, 10^4, 10^5$ werden auf eine Columbia-Agar-Platte pipettiert. Insgesamt werden neun Platten genutzt.

Ebenfalls wird eine Verdünnungsreihe ($10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$) der Wundauflagen Proben hergestellt. Auch dies wird analog der Tab. 15 unter 5.2.1.2 (Tag 2) durchgeführt. Die 10^0 Verdünnung wird aus dem Ausschüttelröhrchen entnommen. Von den Verdünnungen $10^1, 10^2, 10^3, 10^4, 10^5$ werden je 100µL auf eine Columbia-Agar-Platte ausplattiert und gut verteilt. Für die Versuchsdurchführung mit den drei Wundauflagen werden 18 Platten genutzt. Sowohl die Wundmaterialienplatten als auch die Kontrollplatten werden für 24h bei 37°C inkubiert.

Tag 3

Die Kolonien $\text{KBE}/\text{Platte}_{t=24h}$ der Kontroll- und Probenplatten für 24h werden ausgezählt. Es erfolgt die Berechnung von $\text{Kontrolle}_{t=24h} \text{KBE}(\text{Probe})$ und $\text{Probe}_{t=24h} \text{KBE}(\text{Probe})$ analog der Formel (15). Aus ihnen wird der dekadische Logarithmus gezogen. Die logarithmischen Werte werden als *Keimwachstum in KBE* bezeichnet und in einem Balkendiagramm dargestellt (siehe Abb. 19 und Abb. 21). Signifikante Ergebnisse sind mit (*) gekennzeichnet. Mithilfe von (14) wird die *Keimreduktion* % der Wundauflagen errechnet und ebenfalls grafisch veranschaulicht (siehe Abb. 23 und Abb. 25) (SOP/Wiegand 2012).

5.3 Statistische Auswertung der Messwerte

Bei der Bestimmung der Biokompatibilität der Wundauflagen mittels der Messung der metabolischen Aktivität durch das Lumineszenz *ATP-Detections-Kit*, mittels der Bestimmung des Protein-Gehaltes durch das *BC Assay Protein Quantitation Kit* und mittels der Bestimmung der LDH-Konzentration durch das *CytoTox96® Non Radioactive Cytotoxicity Assay* werden die erhaltenen Messwerte automatisch in das *Excel* 2010-Programm überführt, tabellarisch aufgelistet, bearbeitet und grafisch dargestellt. Es erfolgt die Berechnung der Mittelwerte,

Standardabweichungen und p-Werte, sowie deren Bewertung. Der Mittelwert, auch das arithmetische Mittel genannt, ist ein Maß für den Durchschnitt der Messwerte. Die Standardabweichung beschreibt die Streuung der erhaltenen Daten und ist ein Maß für die mittlere Abweichung der Einzelmesswerte vom Mittelwert (Bosch 1997). Zur Beurteilung der Testergebnisse wird eine Wahrscheinlichkeitsaussage abgeleitet. Ist der ermittelte p-Wert der Untersuchung, also die Überschreitungswahrscheinlichkeit, kleiner als das gewählte Signifikanzniveau, dann unterscheiden sich die Wundauflagen Testkonzentrationen hinsichtlich der Ausschüttung der Parameter signifikant. Bei einem p-Wert über, oder im Signifikanzniveau, unterscheiden sich die Extrakte nicht signifikant (Sachs und Hedderich 2018). Es ist üblich, ein Signifikanzniveau von 0,05 zu wählen. Statistisch signifikante Ergebnisse werden in den Messwertreihen und in den Diagrammen mit (*) gekennzeichnet. Aufgrund der geringen Anzahl von Testversuchen sollte der p-Wert nicht überinterpretiert werden. In dieser Arbeit wurde er zur statistischen Vollständigkeit berechnet und hinzugefügt.

Mittels T-Test wird getestet, ob sich die errechneten *Zellzahlen in %* aus den ATP- und Protein-Konzentrationen und die ermittelte *Zytotoxizität* der LDH-Ausschüttungen der Wundauflagen Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet nach den drei Zellinkubationszeiten von 1h, 24h und 48h hinsichtlich ihrer Mittelwerte zur Referenz Acticoat Flex 3 signifikant unterscheiden. Die silberhaltige Wundauflage Acticoat Flex 3 dient in der Auswertung der Biokompatibilität dem Vergleich zu den beiden bismuthhaltigen Wundmaterialien, da sie bereits große Anwendung in der Wundversorgung findet (siehe 6.1.1). Mithilfe der *Software Origin* wird bei der Bestimmung der metabolischen Aktivität mittels Lumineszenz *ATP-Detections-Kit* des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat die Letale Konzentration (LC_{50}) berechnet und der dazugehörige Graph angelegt (siehe Abb. 15). LC_{50} beschreibt die letale Konzentration des Reinstoffes, bei welcher 50% der eingesetzten *HaCaT*-Zellen versterben (Wiegand et al. 2013).

Bei den Versuchen zur Biofunktionalität entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002* und der *AATCC Test Methode 100-2004* werden die Messwerte in Form von KBE in eine *Excel*-Datei überführt. Nur KBE zwischen 30 und 300 werden für die Auswertung genutzt. Es erfolgt die Berechnung der Mittelwerte, der Standardabweichung und der p-Werte. Die Überprüfung der Signifikanz erfolgt mittels F-Test, einem Spezialfall der Varianzanalyse. Abschließend wird entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002* das *mikrobielle Wachstum in %* und die *antibakterielle Gesamtaktivität der Wundmaterialien*, entsprechend der *AATCC Test Methode 100-2004* das *Keimwachstum in KBE* und die

Keimreduktion der Wundauflagen in % errechnet. Die Ergebnisse werden grafisch dargestellt.

Da die weitere Bearbeitung an einem Laptop mit dem Betriebssystem *macOS* erfolgt, werden die *Excel*-Dateien im weiteren Verlauf mit dem *Numbers 4.0.5* Programm bearbeitet.

Die statistische Signifikanzüberprüfung der erhaltenen Ergebnisse in der Testung auf Biokompatibilität und Biofunktionalität erfolgt mit dem Programm *STATA®14*.

6 Ergebnisse

In den nachfolgenden Diagrammen werden jeweils die Mittelwerte der Messungen und die Standardabweichung dargestellt und zur weiteren Auswertung genutzt. Es befinden sich beispielhaft nur die wichtigsten grafischen Darstellungen im Text. Weitere Diagramme der durchgeführten Versuche sind im Anhang zu finden.

6.1 Ergebnisse der Testung der Wundauflagen auf Biokompatibilität

Die Diagramme stellen jeweils die ermittelte *Zellzahl in %* aus den gemessenen ATP- und Protein-Konzentrationen bzw. die errechnete *Zytotoxizität in %* der LDH-Gehalte in Bezug auf das Medium mit den *HaCaT*-Zellen (Negativkontrolle), der mit Triton X-100 behandelten Zellen (Positivkontrolle) und die unterschiedlichen Wundauflagen Testkonzentrationen dar. Die Testkonzentrationen von 0,1%, 1%, 10%, 25%, 50%, 75% und 100% entsprechen folgenden Extraktionsverhältnissen der Wundauflagen: 0,0001g/mL, 0,001g/mL, 0,01g/mL, 0,05g/mL, 0,1g/mL, 0,15g/mL und 0,2g/mL (siehe 5.1.3).

Bei den Untersuchungen des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat werden die *Zellzahl in %* und *Zytotoxizität in %* in Relation zur Negativkontrolle, zur Positivkontrolle, zu *DMEM* mit dem pH-Wert 6,2 und pH-Wert 5,14, zur 0,25%-igen und 0,5%-igen Essigsäure, sowie zu den Reinstoff Testkonzentrationen von 0,625µg/mL, 1,25µg/mL, 2,5µg/mL, 5µg/mL und 10µg/mL grafisch dargestellt. Zudem erfolgte anhand der Bestimmung der ATP-Konzentration die Ermittlung der Letalen Konzentration LC_{50} .

Negative Zellzahlen und Zytotoxizitäten werden nicht in den Diagrammen veranschaulicht. Ein negativer ATP- und Protein-Gehalt ergab sich, wenn die gemessene ATP- und Protein-Konzentration der jeweiligen Testkonzentration niedriger war, als die ATP- und Protein-Konzentration des Mediums mit den *HaCaT*-Zellen. Somit war auch die daraus ermittelte Zellzahl negativ. War der gemessene LDH-Gehalt der jeweiligen Testkonzentration niedriger als die LDH-Ausschüttung des Mediums der Zellen, ergab sich eine negative Zytotoxizität.

6.1.1 Vergleich der Referenz Acticoat Flex 3 mit Xeroform ® *Petrolatum Dressing* und Xeronet

Da Acticoat Flex 3 bereits eine große Anwendung im medizinischen Bereich findet und dessen Wirksamkeit durch Studien bereits bestätigt wurde, konnte diese Wundauflage als Referenz zu den anderen Wundauflagen betrachtet werden (Chaloupka et al. 2010, Dissemmond et al. 2017b, Lansdown 2004). Die Signifikanzüberprüfung erfolgte mittels des T-Tests mithilfe des

Programms *STATA*®14. Signifikante Unterschiede waren dort zu finden, wo der p-Wert kleiner als das gewählte Signifikanzniveau von 0,05 war. Die p-Werte sind in den Diagrammen mit (*) gekennzeichnet.

Um die *in vitro*-Biokompatibilität einer Wundauflage betrachten zu können, wurden die erhaltenen ATP-, Protein- und LDH-Konzentrationen der Wundauflagenextrakte in den unterschiedlichen Testkonzentrationen miteinander verglichen und interpretiert. Dazu wurden anhand der von den *HaCaT*-Zellen ausgeschütteten ATP- und Protein-Gehalte der verschiedenen Wundauflagen die *Zellzahlen in %* ermittelt (siehe Formel (7) und (8)). Wenn eine Reduktion dieser Zellzahlen um mindestens 30% vorlag, konnte laut DIN EN ISO 10993-5 von einem biologisch relevanten, zytotoxischen Effekt ausgegangen werden. Je nach verwendeter Messmethode und gemessenem Parameter wurde von einem zytotoxischen Effekt_{ATP} bzw. von einem zytotoxischen Effekt_{Protein} gesprochen (siehe Abb. 5, Abb. 8, Abb. 11 bzw. Abb. 6, Abb. 9 und Abb. 12) (DIN EN ISO 10993-5). Dies wurde in den Diagrammen mit einer schwarzen Linie bei Zellzahl 70% gekennzeichnet. Mittels Zytotoxizitätsgleichung (9) konnte anhand der gemessenen LDH-Konzentrationen die *Zytotoxizität in %* der Wundauflagenextrakte ermittelt werden. Bei einer Zytotoxizität von mindestens 30%, wurde dies als zytotoxischer Effekt_{LDH} bezeichnet und in den Diagrammen ebenfalls mit einer schwarzen Linie bei 30% veranschaulicht (siehe Abb. 7, Abb. 10 und Abb. 13).

Damit eine Aussage über die Biokompatibilität einer Wundauflage getroffen werden kann, sollte ermittelt werden, in welchen Testkonzentrationen der Wundauflagenextrakte mittels aller 3 Parameter keine zytotoxischen Effekte beobachtet werden konnten.

Nach Inkubation der *HaCaT*-Zellen inklusive des Acticoat Flex 3-Extraktes in den Konzentrationen von 50% bis 100% konnte eine Zellzahlreduktion um mindestens 30% bei der Bestimmung des ATP- und Protein-Gehaltes in allen drei Inkubationszeiten nachgewiesen werden (siehe Abb. 5 und Abb. 6). Nach 1h Inkubation der *HaCaT*-Zellen mit den Acticoat Flex 3-Extrakten in den Konzentrationen von 75% und 100% waren die errechneten Zellzahlen durch Bestimmung des ATP-Gehaltes negativ. Im Acticoat Flex 3-Extrakt in den drei stärksten Konzentrationen von 50% bis 100% lag ein zytotoxischer Effekt_{ATP} und ein zytotoxischer Effekt_{Protein} vor.

Mit Hilfe der ATP-Bestimmung konnte nach 1h Zellinkubation des Wundauflagenextraktes der 25%-igen Konzentration der Acticoat Flex 3 Auflage eine zytotoxische Zellzahlreduktion von über 40% nachgewiesen werden (siehe Abb. 5). Bei der Messung des Protein-Gehaltes nach

gleicher Inkubationzeit der Zellen lag eine annähernde 30%-ige Zellzahlreduktion vor (siehe Abb. 6). Die ermittelten Zellzahlreduktionen durch Untersuchung des ATP-Gehaltes nach 24h und 48h Inkubation der Zellen inklusive des Acticoat Flex 3-Extrakt lag nur einige Prozente unter der zytotoxischen Grenze von 30% Zellzahlreduktion. Nach 48h Inkubation der Zellen mit dem Extrakt mit der 25%-igen Konzentration war durch die Bestimmung des Protein-Gehaltes eine Abnahme der Zellzahlen um über 30% erkennbar (siehe Abb. 6). Damit wurde auch die Testkonzentration des Acticoat Flex 3-Extrakt von 25% als zytotoxisch_{ATP/Protein} gewertet.

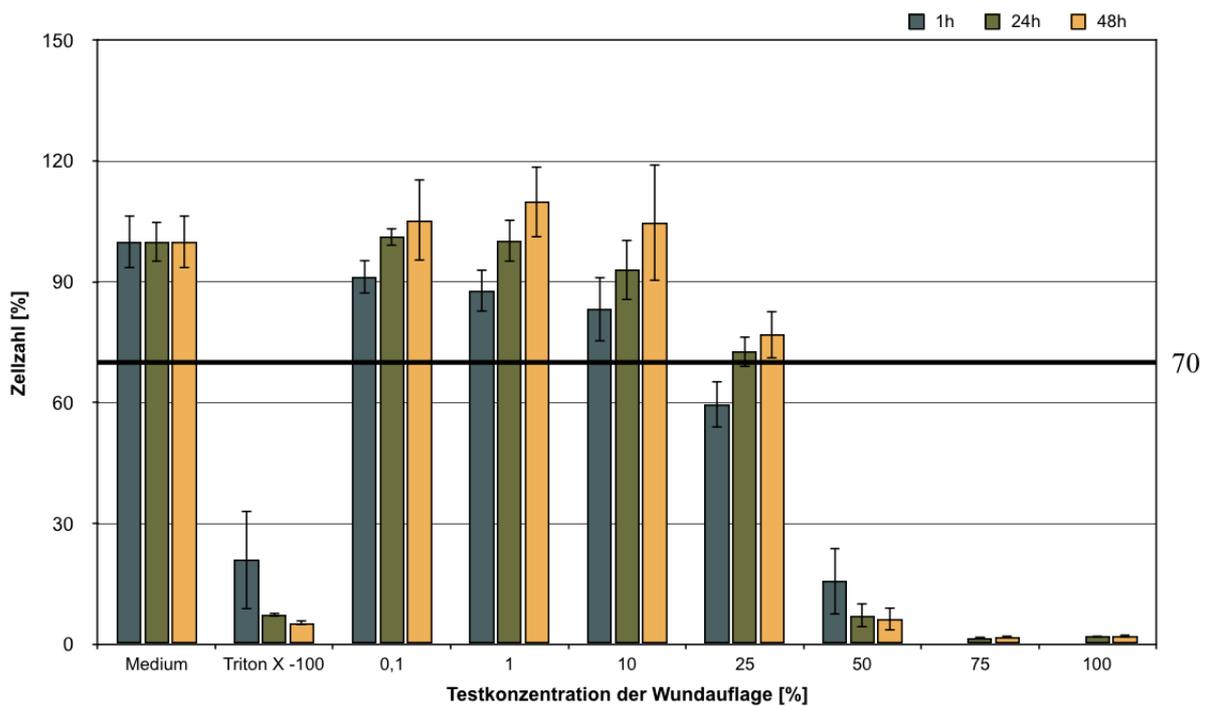


Abb. 5: Bestimmung der *Zellzahl in %* mittels Bestimmung der ATP-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3 bis zur Zellzahl von 70%

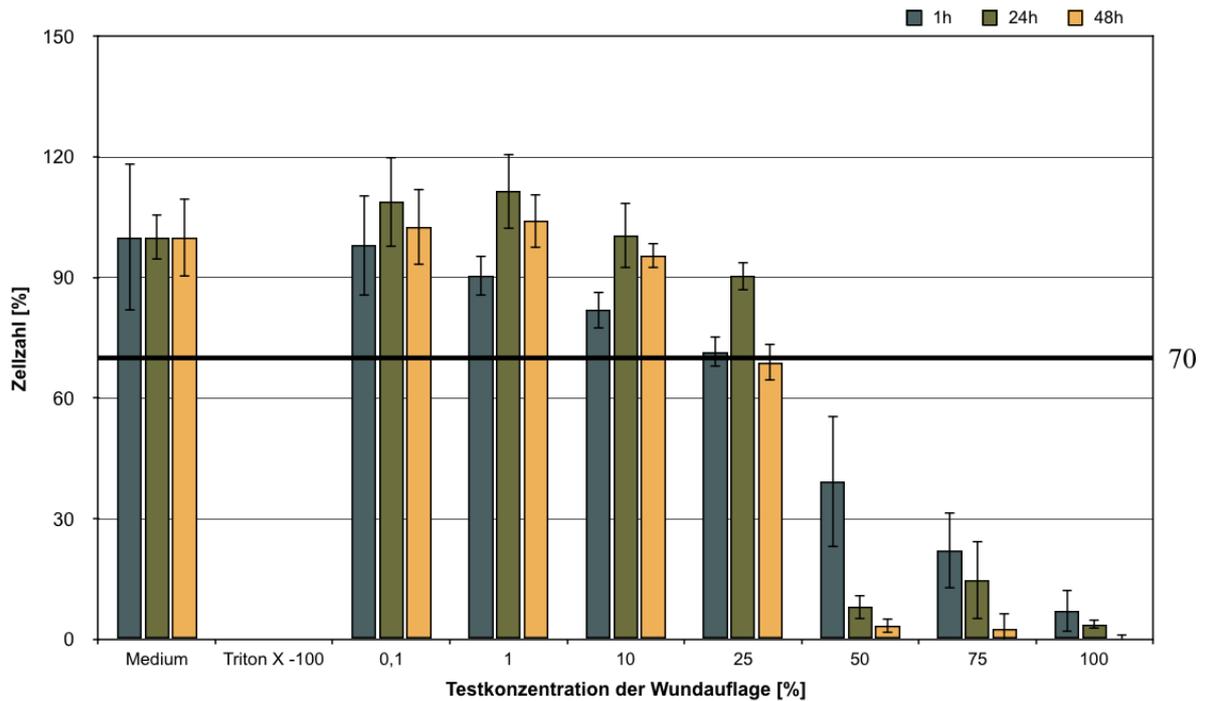


Abb. 6: Bestimmung der *Zellzahl in %* mittels Bestimmung der Protein-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Acticoat Flex 3 bis zur Zellzahl von 70%

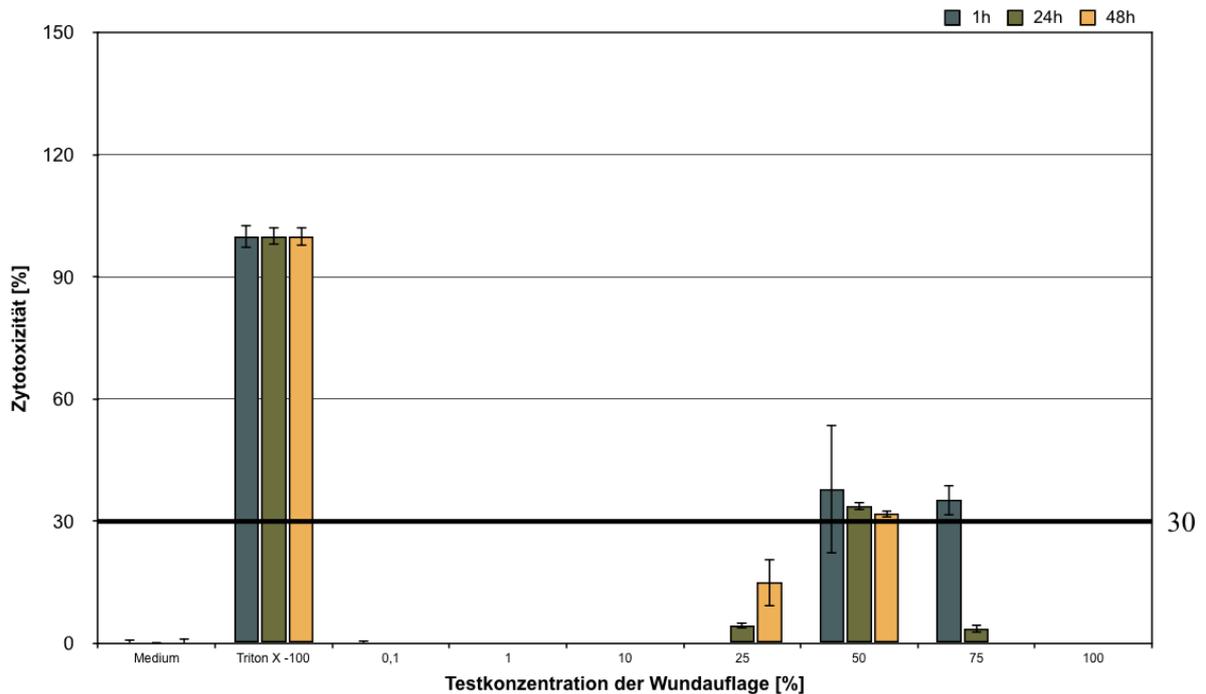


Abb. 7: Untersuchung der *Zytotoxizität in %*: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Acticoat Flex 3 ab der Zytotoxizität von 30%

Ein zytotoxischer Effekt_{LDH} von mehr als 30% wurde im Acticoat Flex 3-Extrakt mit den Testkonzentrationen von 50% und 75% nachgewiesen (siehe Abb. 7). In der stärksten

Konzentration des Wundauflagenextraktes ergab sich in der LDH Messung eine negative Zytotoxizität.

Bei der Testung der Extrakte des Xeroform® *Petrolatum Dressings* mit den Konzentrationen von 50% bis 100% konnten übereinstimmende Zellzahlreduktionen um mindestens 30% in der Bestimmung des ATP- und Protein-Gehaltes nach 48h Inkubation der Zellen gemessen werden (siehe Abb. 8 und Abb. 9). Darüberhinaus konnte eine zusätzliche zytotoxische Zellzahlreduktion nach 24h Inkubation der *HaCaT*-Zellen mit dem Wundauflagenextrakt in der 100%-igen Testkonzentration bei der Bestimmung des ATP- und Protein-Gehaltes nachgewiesen werden. Bei der Untersuchung der Protein-Konzentration wurden nach 24h Inkubation der Zellen mit dem Xeroform®-Extrakt in den Konzentrationen von 75% und 100% zytotoxische Effekte_{Protein} nachgewiesen (siehe Abb. 9). Nach 24h Inkubation der Zellen ergab sich mittels ATP-Nachweis im Wundauflagen-Extrakt mit der Konzentration von 75% und mittels Protein-Nachweis mit der Konzentration von 50% eine annähernde 30%-ige zytotoxische Zellzahlreduktion. Somit galten die Testkonzentrationen des Xeroform® *Petrolatum Dressing*-Extraktes in den Konzentrationen von 50% bis 100% als zytotoxisch_{ATP/Protein}.

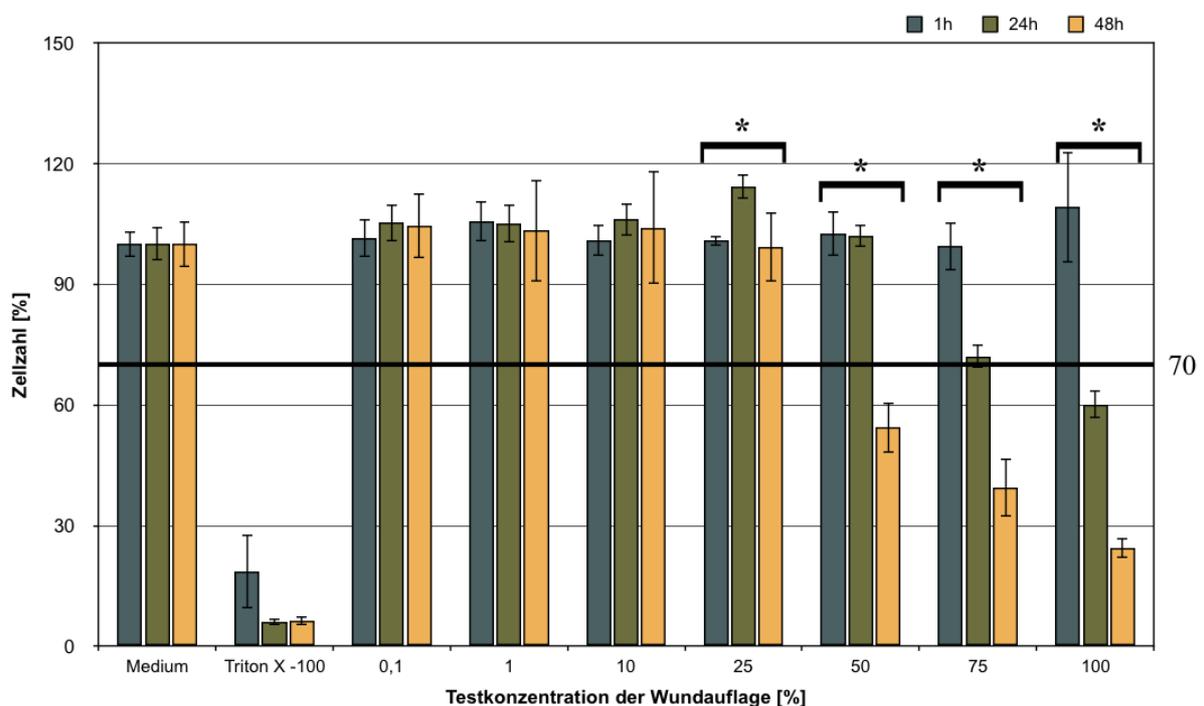


Abb. 8: Bestimmung der Zellzahl in % mittels Bestimmung der ATP-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeroform® *Petrolatum Dressing* bis zur Zellzahl von 70%

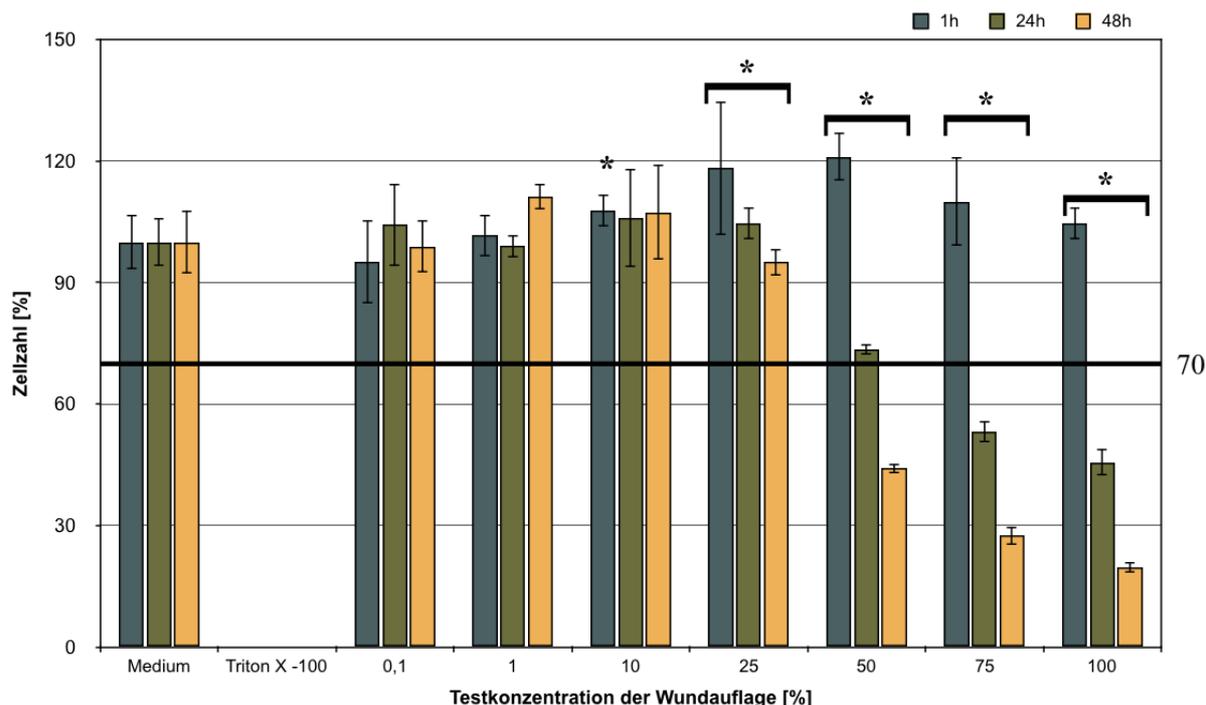


Abb. 9: Bestimmung der *Zellzahl in %* mittels Bestimmung der Protein-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeroform® *Petrolatum Dressing* bis zur Zellzahl von 70%

Nur nach 1h Inkubation der Zellen mit dem Xeroform®-Extrakt in der 0,1%-igen Konzentration konnte eine LDH-Ausschüttung nachgewiesen und damit eine Zytotoxizität von knapp 3% errechnet werden (siehe Abb. 10). In den anderen Extrakt-Konzentrationen waren keine bzw. negative Zytotoxizitäten zu finden. Wie bereits unter 5.1.7 beschrieben, ist bei der Bestimmung des LDH-Gehaltes darauf zu achten, dass vor der Messung im *FLUOstar Galaxy* keine Luftblasen in den *Wells* entstehen. Sie beeinflussen die Messung der optischen Dichte massiv. Dies könnte eine Erklärung für die LDH-Ausschüttung der 0,1%-igen Konzentration des Xeroform®-Extraktes darstellen.

Anhand der Bestimmung des LDH-Gehaltes bzw. der Zytotoxizität konnte kein zytotoxischer Effekt_{LDH} des Extraktes von Xeroform® *Petrolatum Dressing* nachgewiesen werden.

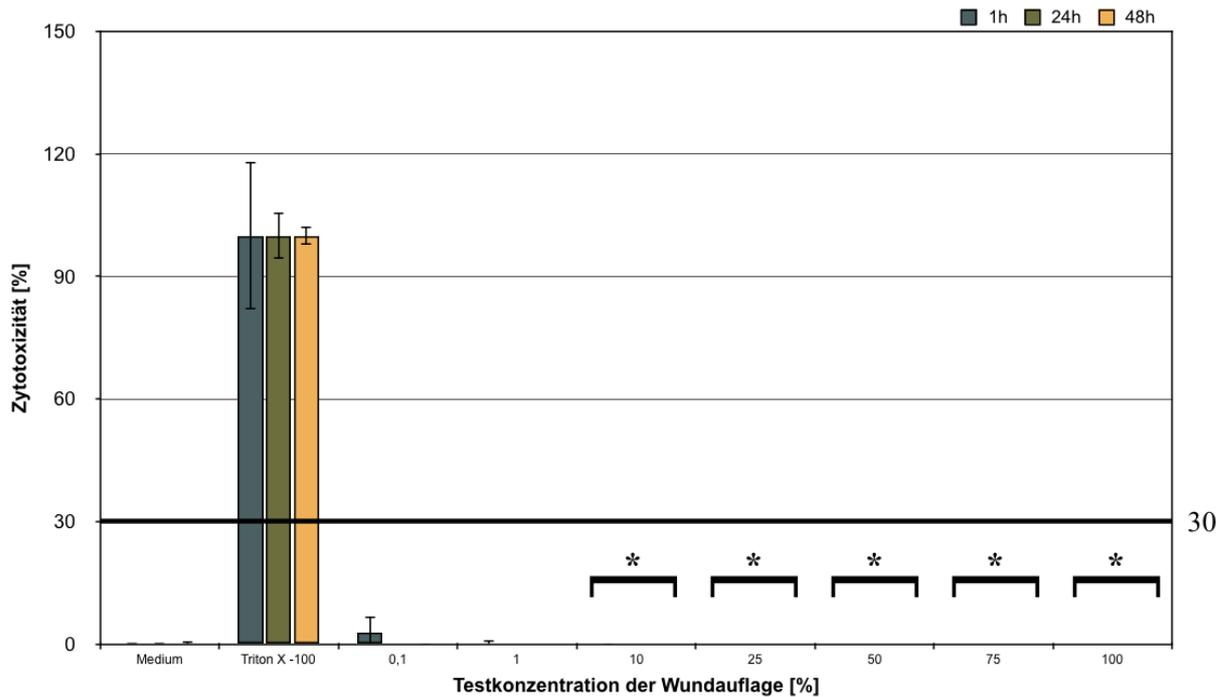


Abb. 10: Untersuchung der *Zytotoxizität in %*: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeroform® *Petrolatum Dressing* ab der Zytotoxizität von 30%

Bei der Untersuchung des Xeronet-Extraktes mit der Konzentration von 100% konnte nach 48h Inkubation der Zellen durch Bestimmung des ATP- und Protein-Gehaltes eine zytotoxische Zellzahlreduktion um mehr als 30% nachgewiesen werden (siehe Abb. 11 und Abb. 12). Nach 24h Zellinkubation inklusive des Xeronet-Extraktes wurde in gleicher Testkonzentration eine 30%-ige Zellzahlreduktion in der Protein-Messung ersichtlich (siehe Abb. 12). Bei Nachweis des ATPs lag diese bei knapp 25% (siehe Abb. 11). Somit wird die Konzentration von 100% des Xeronet-Extraktes als zytotoxisch_{ATP/Protein} bezeichnet.

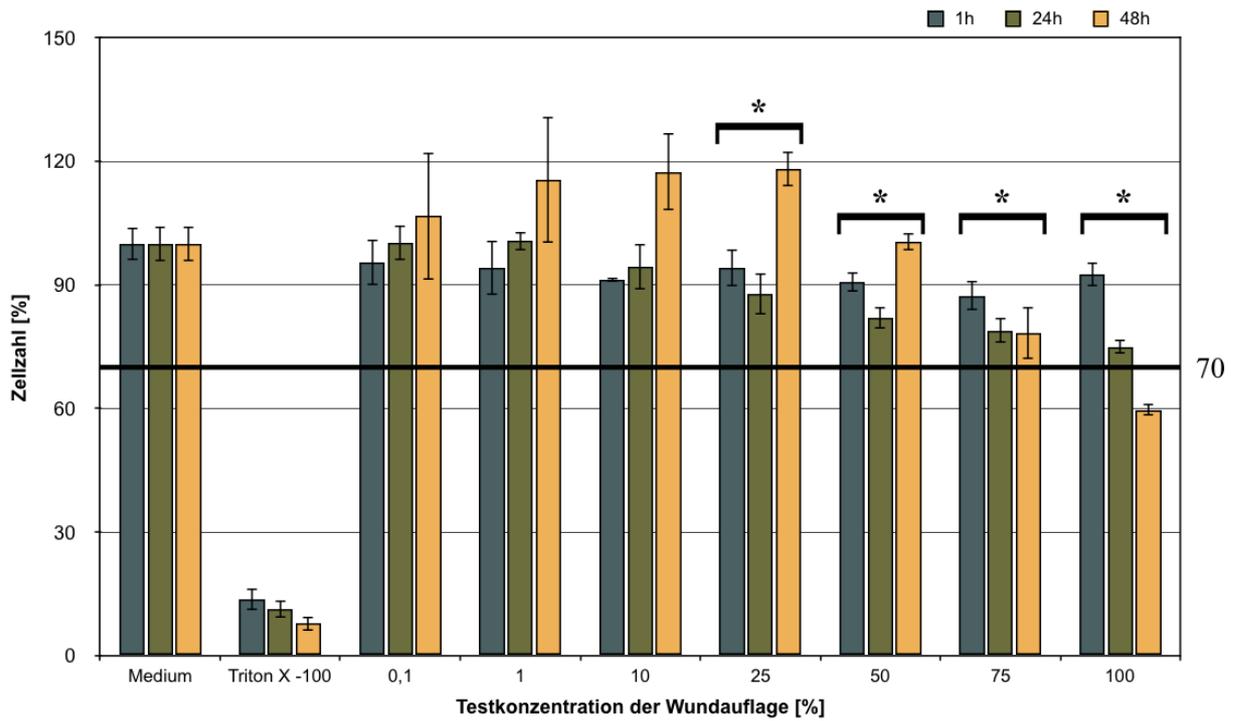


Abb. 11: Bestimmung der *Zellzahl in %* mittels Bestimmung der ATP-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeronet bis zur Zellzahl von 70%

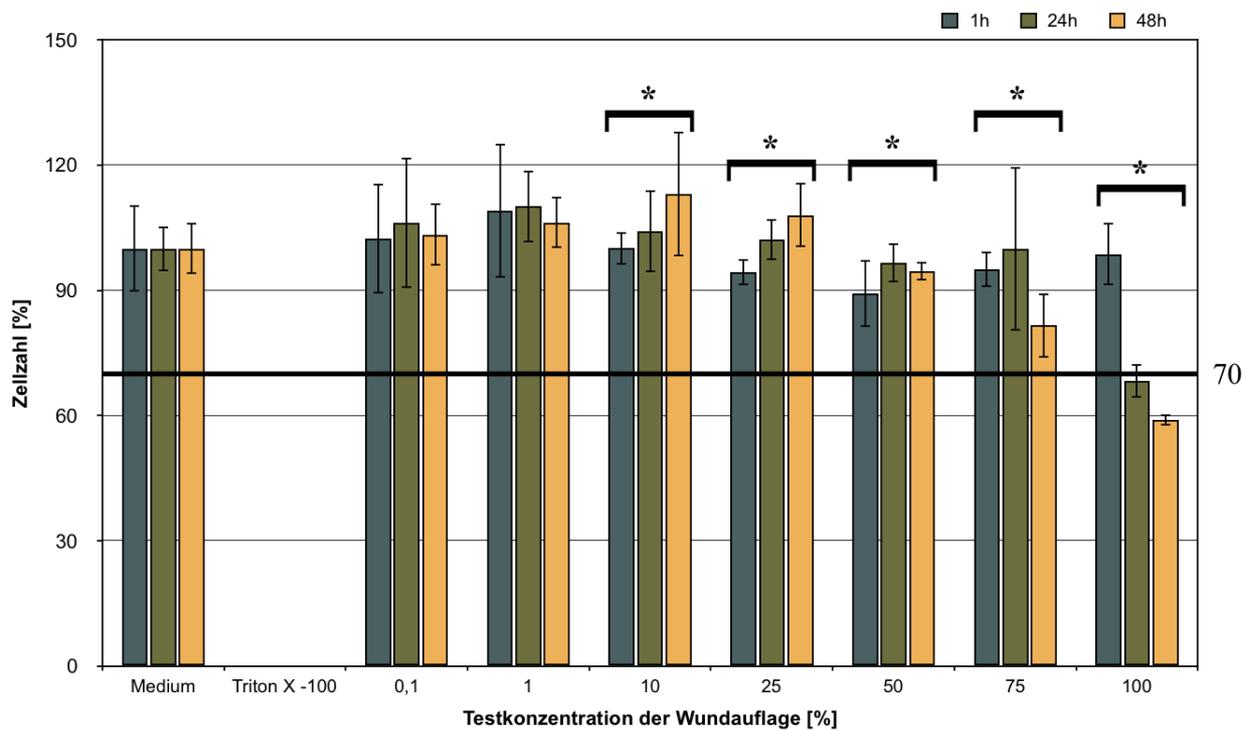


Abb. 12: Bestimmung der *Zellzahl in %* mittels Bestimmung der Protein-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeronet bis zur Zellzahl von 70%

Durch Anwendung der Zytotoxizitätsformel konnte nur in der 50%-igen Testkonzentration des Xeronet-Extraktes eine zytotoxische_{LDH} Wirkung festgestellt werden.

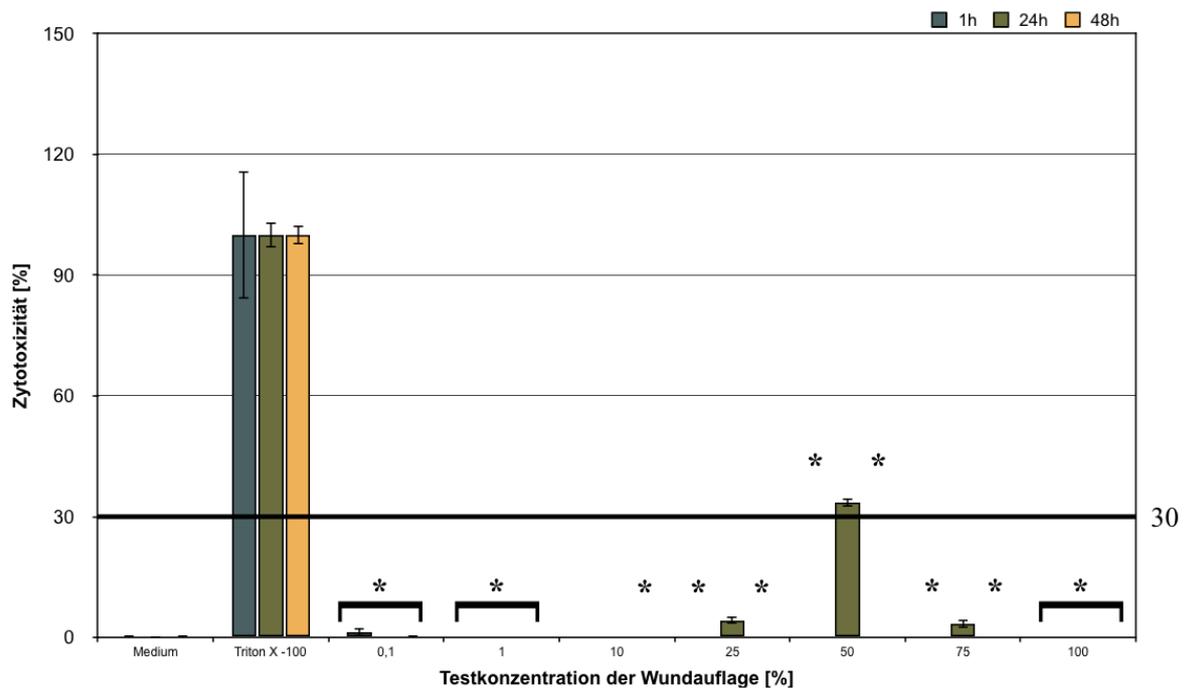


Abb. 13: Untersuchung der Zytotoxizität in %: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeronet ab der Zytotoxizität von 30%

Durch Vergleich der zytotoxischen Effekte der Messungen des ATP-, Protein- und LDH-Gehaltes des Acticoat Flex 3-Extraktes konnten die Testkonzentrationen von 25%, 50%, 75% und 100% als zytotoxisch bezeichnet werden. Keine zytotoxischen Effekte konnten in der 0,1% bis einschließlich 10%-igen Konzentration des Wundauflagen-Extraktes nachgewiesen werden. Somit wirkten die niedrigeren Testkonzentrationen 0,1%, 1% und 10% des Acticoat Flex 3-Extraktes biokompatibel.

Im Vergleich zur Referenz Acticoat Flex 3 konnten in der Untersuchung des Extraktes von Xeroform® *Petrolatum Dressing* zytotoxische Effekte_{ATP/Protein} der Testkonzentrationen von 50%, 75% und 100% nachgewiesen werden. Wie in den Diagrammen Abb. 5, Abb. 6, Abb. 8 und Abb. 9 ersichtlich wird, waren die Zellzahlreduktionen, welche durch Einsatz des Acticoat-Extraktes nach Inkubation verursacht wurden, deutlich größer als unter Testung des Xeroform® *Petrolatum Dressing*-Extraktes. Dies bestätigten die signifikanten Unterschiede (*) in den Abb. 8 und Abb. 9. Deutliche Zellzahlreduktionen durch Bestimmung des ATP- und Protein-Gehaltes traten erst nach einer 24h-iger bzw. 48h-iger Inkubationszeit der Zellen mit dem

Xeroform®-Extrakt in den Testkonzentrationen von 50% bis einschließlich 100% auf. Bei Testung des Acticoat-Extraktes fand dies bereits nach 1h Zellinkubation statt. Zudem konnte bei der Untersuchung der 25%-igen Konzentration des Xeroform®-Extraktes im Gegensatz zum Acticoat-Extrakt keine zytotoxische Zellzahlreduktion in der ATP- und Protein-Bestimmung nachgewiesen werden. Dies bestätigten die signifikanten p-Werte (siehe Abb. 8 und Abb. 9). LDH-Ausschüttungen von mindestens 30% als Marker für Zytotoxizität konnten nach Inkubation des Acticoat Flex 3-Extraktes in den Konzentrationen von 50% und 75% gemessen werden (siehe Abb. 7). Bei Testung des Xeroforms® ließ sich in keiner Extrakt-Konzentration ein zytotoxischer Effekt_{LDH} nachweisen (siehe Abb. 10). Somit unterschieden sich die Zytotoxizitäten des Xeroform®-Extraktes mit den Konzentrationen von 10% bis einschließlich 100% signifikant von den Zytotoxizitäten des Acticoat-Extraktes (siehe Abb. 10). Aus den Ergebnissen der ATP- und Protein-Bestimmung des Extraktes der Xeroform® Auflage konnte geschlußfolgert werden, dass die 0,1%-ige, 1%-ige, 10%-ige und die 25%-ige Testkonzentration biokompatibel wirkten.

Auch unter Einfluss der Xeronet Auflage konnten nach Inkubation des Extraktes mit den *HaCaT*-Zellen geringere Zellzahlreduktionen im ATP- und Protein-Nachweis als bei Testung des Acticoat-Extraktes nachgewiesen werden (siehe Abb. 11 und Abb. 12). Nur die Testkonzentration von 100% des Xeronet-Extraktes wies einen knappen zytotoxischen Effekt_{ATP/Protein} auf. Die erhaltenen Zellzahlreduktionen der ATP- und Protein-Messung waren um mehr als die Hälfte geringer als jene des Acticoats-Extraktes. Dies machen die gekennzeichneten signifikanten Unterschiede in den Konzentrationen von 25% bis 100% Xeronet deutlich (Abb. 11 und Abb. 12). Nach Inkubation des Xeronet-Extraktes mit den Zellen sind ebenfalls deutlich geringer zytotoxische Effekte_{LDH} entstanden als unter Einsatz des Acticoat Flex 3-Extraktes (siehe Abb. 13). Lediglich in der 50%-igen Testkonzentration des Xeronet-Extraktes konnte eine Zytotoxizität von knapp über 30% ermittelt werden. Unter Berücksichtigung der Ergebnisse der ATP- und Protein-Messung wirkten die Konzentrationen von 50% und 100% des Xeronet-Extraktes zytotoxisch. Eine Biokompatibilität der Xeronet Auflage konnte demnach wie unter Einsatz des Xeroform® *Petrolatum Dressings* in den Extrakt-Konzentrationen von 0,1%, 1%, 10% und 25% nachgewiesen werden. Zusätzlich wirkte die 75%-ige Konzentration des Xeronet-Extraktes biokompatibel.

6.1.2 Ergebnisse der Untersuchungen der *HaCaT*-Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat

Analog der Darstellung der Ergebnisse der Testung der drei Wundmaterialien unter 6.1.1 erfolgte in den Diagrammen zu den Untersuchungen des Reinstoffes die Markierung der zytotoxischen Effekte_{ATP/Protein} bei der Zellzahl 70% bzw. die Markierung des zytotoxischen Effekts_{LDH} bei 30% Zytotoxizität.

Zytotoxische Effekte_{ATP} konnten nach allen drei Zellinkubationszeiten in den beiden Essigsäurekonzentrationen und in den zwei stärksten Konzentrationen des Reinstoffes von 5µg/mL und 10µg/mL nachgewiesen werden (siehe Abb. 14). In der Konzentration von 2,5µg/mL Reinstoff und *DMEM* mit dem pH-Wert von 5,14 fanden sich ebenfalls zytotoxische Zellzahlreduktionen nach 24h und 48h Inkubation der Zellen dargestellt werden.

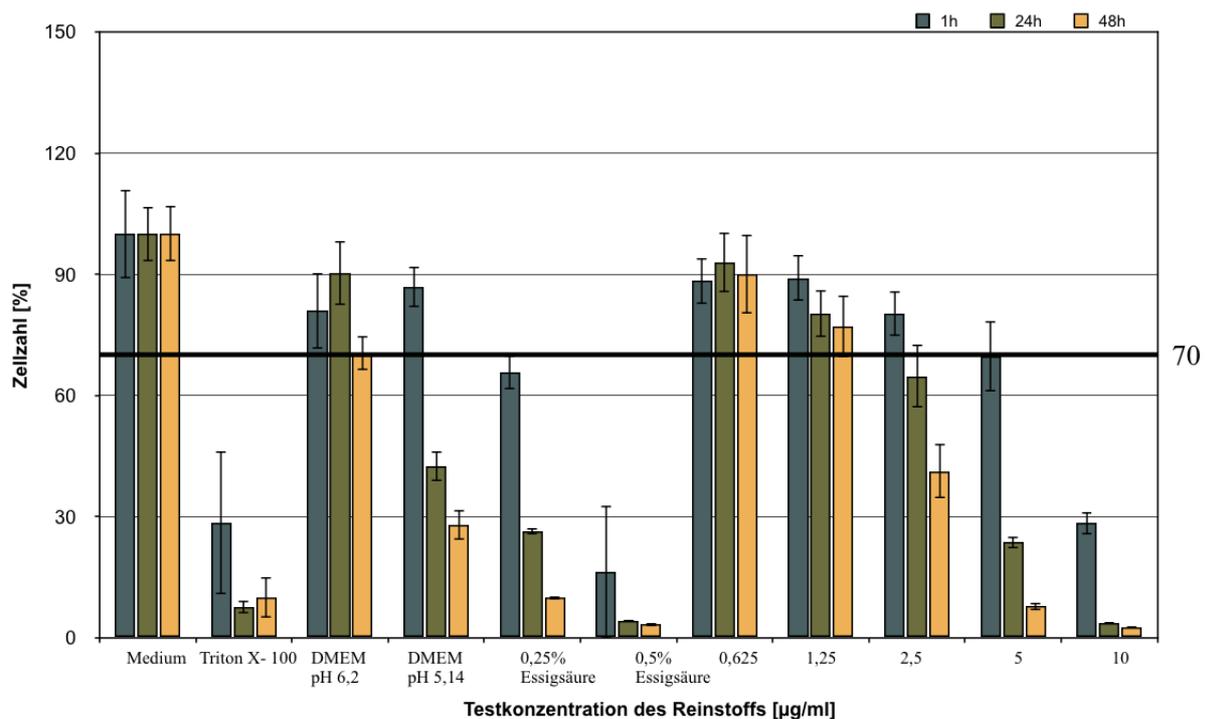


Abb. 14: Bestimmung der *Zellzahl in %* mittels Bestimmung der ATP-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat bis zur Zellzahl von 70%

Bei der Inkubation der *HaCaT*-Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat konnte nach Bestimmung der ATP-Konzentration die LC_{50} berechnet werden. Je kleiner der Wert der LC_{50} , desto toxischer wirkte der Stoff (siehe Abb. 15). Die LC_{50} des Reinstoffes entsprach 2,97µg/mL. In den Reinstoff Konzentrationen von über 2,97µg/mL konnte nach 24h und 48h Zellinkubation eine Zellzahlreduktion von über 50% bestätigt werden (siehe Abb. 14).

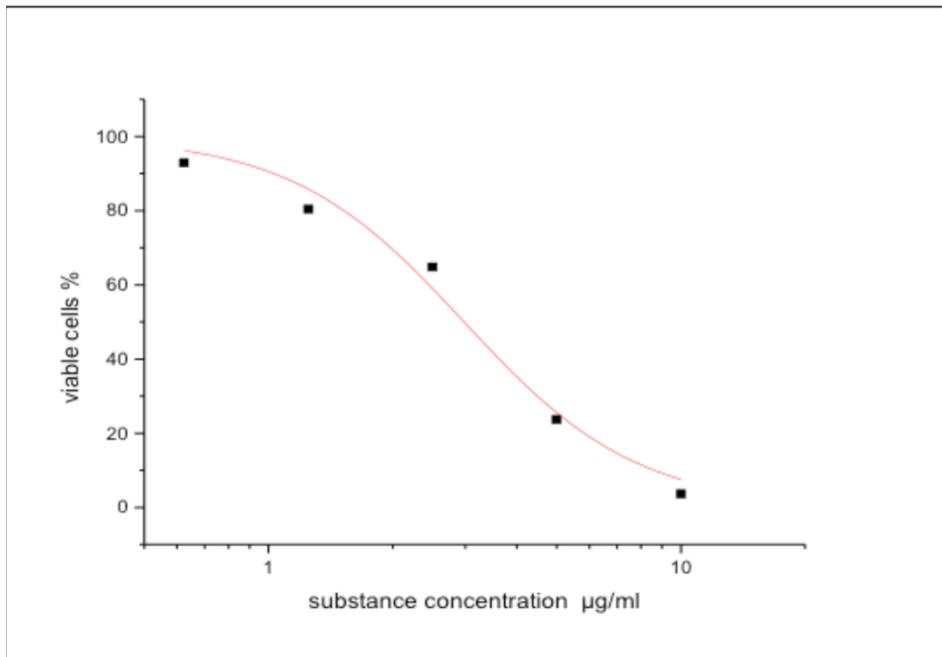


Abb. 15: Bestimmung der LC_{50} mit $2,97\mu\text{g/mL}$ Reinstoff

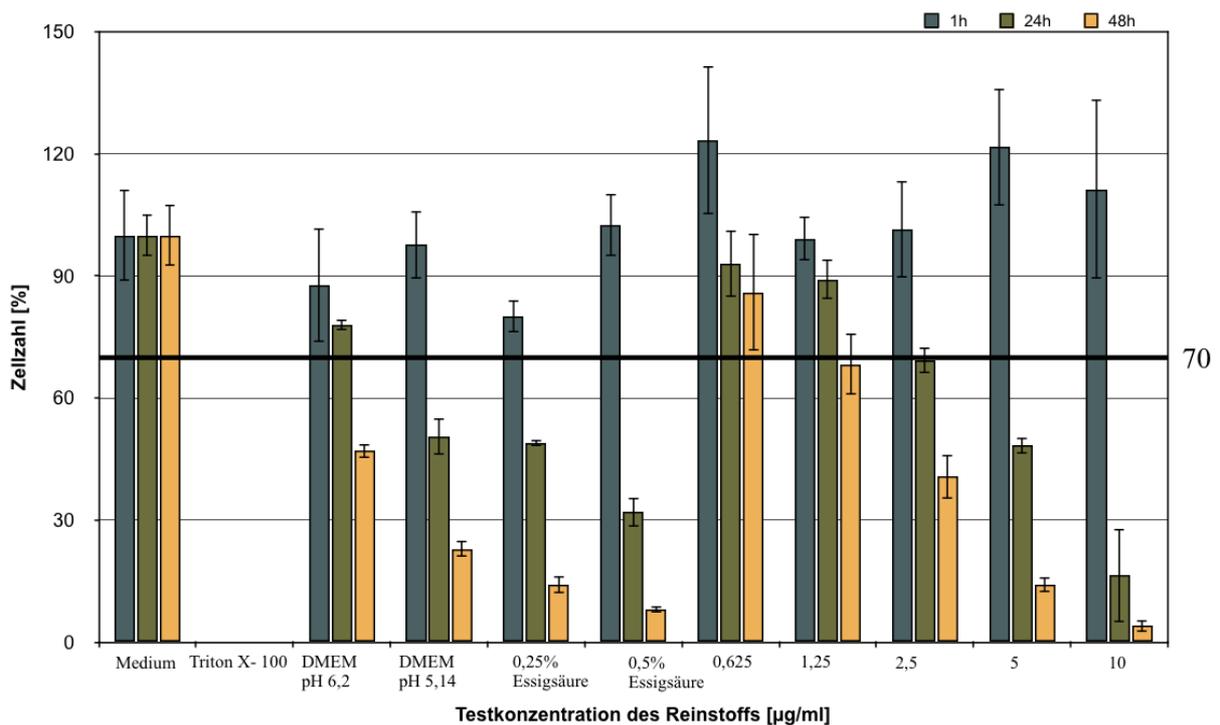


Abb. 16: Bestimmung der *Zellzahl in %* mittels Bestimmung der Protein-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat bis zur Zellzahl von 70%

Anhand der Bestimmung des Protein-Gehaltes konnte nach 24h und 48h Inkubation der Zellen eine zytotoxische Reduktion der Zellzahlen in den drei stärksten Reinstoff Testkonzentrationen, in beiden Essigsäurekonzentrationen und im *DMEM* mit dem pH-Wert von 5,14 nachgewiesen werden (siehe Abb. 16). Zwei weitere zytotoxische Effekte_{Protein} ergaben sich nach 48h

Inkubation der Zellen mit der Konzentration von 1,25µg/mL Reinstoff und des *DMEMs* mit dem pH-Wert von 6,2.

Wie in den Diagrammen Abb. 14 und 16 ersichtlich, konnte eine nahezu doppelt so starke Reduktion der *HaCaT*-Zellen nach 24h und 48h Inkubation der Zellen im *DMEM* mit dem pH-Wert 5,14 nachgewiesen werden, als jene im *DMEM* mit dem pH-Wert von 6,2. Demnach hemmte ein saurer pH-Wert das Zellwachstum. Ebenfalls waren die gemessenen Zellzahlen in der ATP- und Protein-Bestimmung nach 24h und 48h Zellinkubation der 0,5%-igen Essigsäure geringer, als jene der 0,25%-igen Essigsäure. Somit führte eine stärker konzentriertere Säure zu einer Hemmung des Zellwachstums.

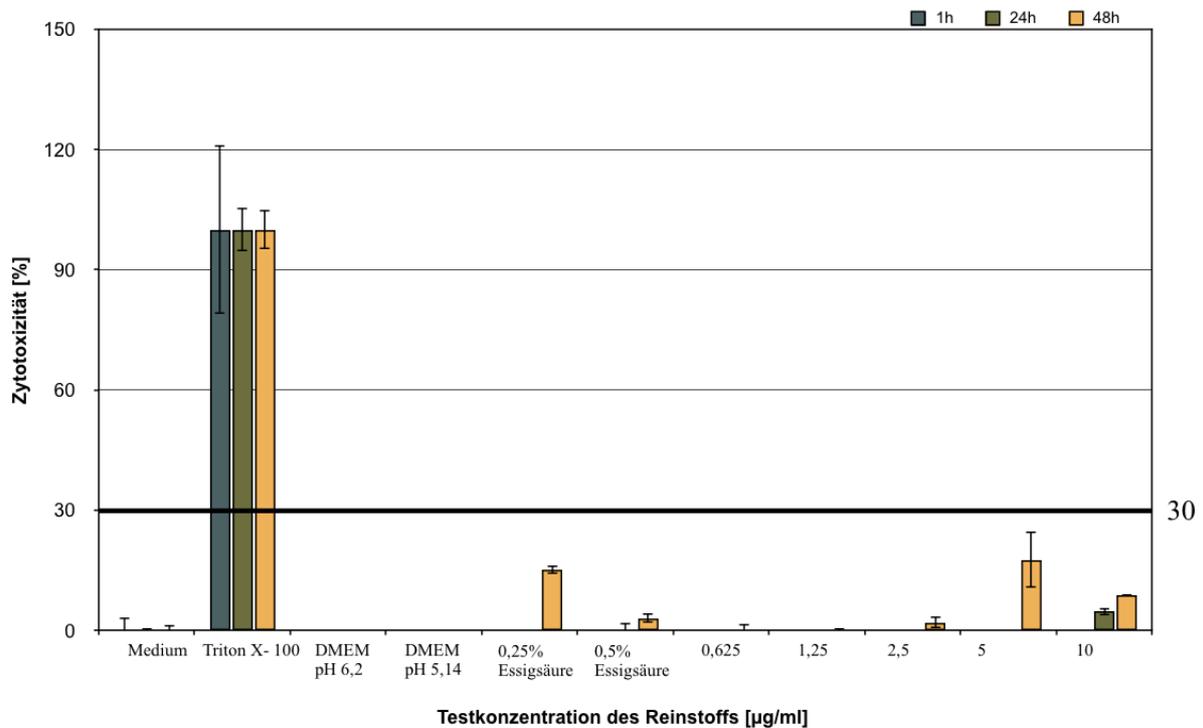


Abb. 17: Untersuchung der Zytotoxizität in %: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat ab der Zytotoxizität von 30%

Weder bei der Untersuchung des Reinstoffes in den unterschiedlichen Testkonzentrationen, noch bei den *DMEM*- oder Essigsäurekonzentration konnte eine Zytotoxizität von mindestens 30% nachgewiesen werden. Die stärkste LDH-Ausschüttung und damit höchste Zytotoxizität wurde nach 48h der Reinstoff-Konzentration von 5µg/mL mit knapp 18% ermittelt.

Unter Kombination der ATP- und Protein-Bestimmung und der daraus errechneten Zellzahlen in % konnte gezeigt werden, dass es in den höher konzentrierteren Reinstoff Konzentrationen von 2,5µg/mL, 5µg/mL und 10µg/mL zu übereinstimmenden zytotoxischen

Effekten_{ATP/Protein} kam (siehe Abb. 14 und Abb. 16). Je stärker die Konzentration des Reinstoffes und je länger die Inkubationszeit der Zellen war, desto höher war die gemessene Zellzahlreduktion. Bei der Bestimmung des Protein-Gehaltes kam es nach 48h Zellinkubation der Konzentration von 1,25µg/mL Reinstoff zu einer Abnahme der Zellzahl um knapp 32% (siehe Abb. 16). Unter Einsatz der ATP-Messung konnte in dieser Konzentration kein zytotoxischer Effekt_{ATP} ermittelt werden (siehe Abb. 14). Da die entstandene Reduktion in der Protein-Messung nur knapp die zytotoxische Grenze erreichte, wurde die Konzentration von 1,25µg/mL Reinstoff nicht als zytotoxisch eingestuft.

Anhand der Messungen konnte gezeigt werden, dass der Reinstoff Bismuth Tribromophenat in höheren Konzentrationen zytotoxisch wirkte. Demnach waren lediglich die geringeren Konzentrationen von 0,625µg/mL und 1.25µg/mL biokompatibel. Diese Erkenntnis bestätigte die Ergebnisse der Testung der bismuthhaltigen Wundauflagen Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet unter 6.1.1. Stärker konzentriertere Wundauflagen Testkonzentrationen mit einem höheren Anteil des Reinstoffes Bismuth wirkten zytotoxisch, niedrigere hingegen konnten als biokompatibel bezeichnet werden.

6.2 Ergebnisse der Testung der Wundauflagen auf Biofunktionalität

Der statistische Vergleich der Wundauflagen untereinander erfolgte mithilfe des F-Tests, einem Spezialfall der Varianzanalyse. Mit dem F-Test wurde überprüft, ob sich die Mittelwerte der Keimwachstumsraten unter Verwendung der drei verschiedenen Wundauflagen signifikant unterschieden. War der errechnete p-Wert kleiner als das gewählte Signifikanzniveau von 0,05, unterschieden sich die Wundmaterialien signifikant.

6.2.1 Ergebnisse der Untersuchung der Wundauflagen entsprechend des *Japanese Industrial Standard (JIS L 1902:2002)*

Die Diagramme stellen jeweils das errechnete *mikrobielle Wachstum in %* und die ermittelte *antibakterielle Gesamtaktivität* in Abhängigkeit der Polyester Kontrolle und der Wundauflagen dar. Die genutzten Formeln sind unter 5.2.1 aufgelistet. Jede Wundauflage wurde autoklaviert und nicht autoklaviert getestet. Die *antibakterielle Gesamtaktivität* wurde wie folgt bewertet (siehe Tab. 16).

Tab. 16: Beurteilungskriterien der *antibakteriellen Gesamtaktivität*

Antibakterielle Aktivität	Gesamtaktivität [<i>log KBE</i>]
keine	< 0,5
Leicht	0,5 bis 1
Signifikant	>1 bis ≤3
Stark	>3

(SOP/ Winter 2013a).

6.2.1.1 Antibakterielle Wirkung der Wundauflagen auf *Staphylococcus aureus* entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002*

Die Untersuchungen entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002* mit *Staphylococcus aureus* zeigten bei der Polyester Kontrolle ein *mikrobielles Wachstum* von 100%. In den Wundauflagen lag dieses bei 0% (siehe Abb. 18).

Sowohl bei Testung der autoklavierten als auch der nicht autoklavierten Wundverbände war keine statistische Berechnung möglich, da die Standardabweichung in allen Gruppen 0 betrug. Damit war die Voraussetzung zur Berechnung einer Varianzanalyse nicht gegeben.

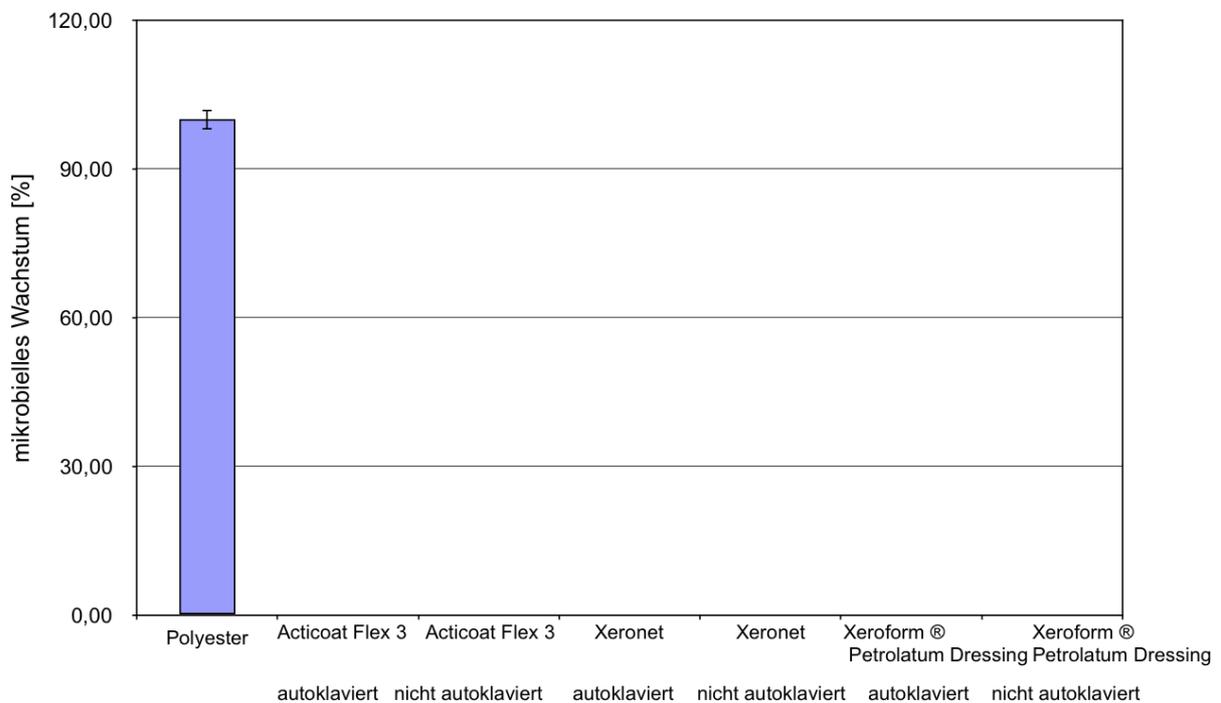


Abb. 18: Untersuchung des *mikrobiellen Wachstums* in %: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger *Staphylococcus aureus*

Die *antibakterielle Gesamtaktivität* wurde für alle Wundauflagen mit 7,08 berechnet (siehe Abb. 19). Dieser Wert ist größer als 3, wodurch laut den Beurteilungskriterien in Tab. 16 eine starke Inhibition des Wachstums von *Staphylococcus aureus* in allen drei Wundauflagen nachgewiesen werden konnte. Die mittlere *antibakterielle Gesamtaktivität* des Polyesters lag bei 0. Das Ansetzen eines statistischen Tests war hier nicht möglich, da die Standardabweichung in allen Gruppen mit 0 berechnet wurde.

Der errechnete *Wachstumswert* lag bei 1,67.

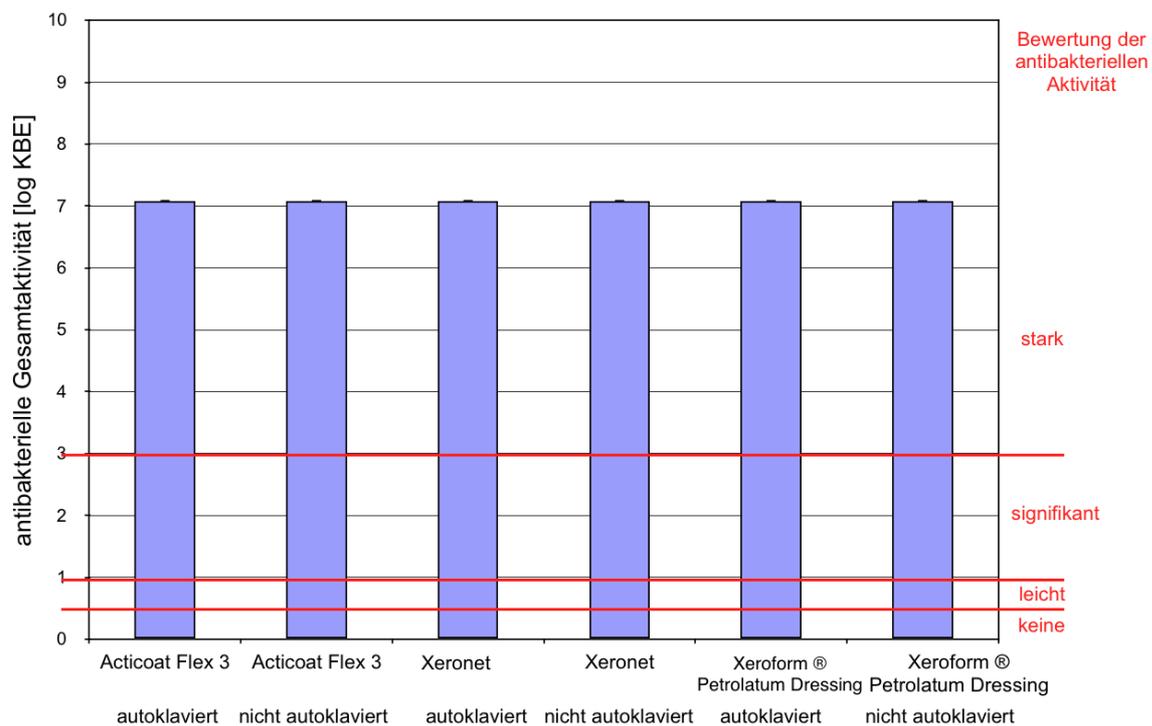


Abb. 19: Untersuchung der *antibakteriellen Gesamtaktivität*: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger *Staphylococcus aureus*

6.2.1.2 Antibakterielle Wirkung der Wundauflagen auf *Klebsiella pneumoniae* entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002*

Durch die Versuche entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002* wurde unter Einsatz der Polyester Kontrolle ein mittleres *mikrobielles Wachstum* des Bakteriums *Klebsiella pneumonia* von 100% nachgewiesen (siehe Abb. 20).

In der autoklavierten Probe von Xeronet trat ein mittleres *mikrobielles Wachstum* von 16,55% auf. In allen weiteren Proben war keine Bakterienproliferation zu erkennen. Innerhalb aller autoklavierten Proben wurde ein p-Wert von 0,079 errechnet. Dieser war größer als das

gewählte Signifikanzniveau. Die autoklavierten Proben unterschieden sich daher nicht signifikant. Da die Standardabweichung in der Gruppe der nicht autoklavierten Wundauflagen 0 betrug, konnte keine weiterführende statistische Auswertung angeschlossen werden.

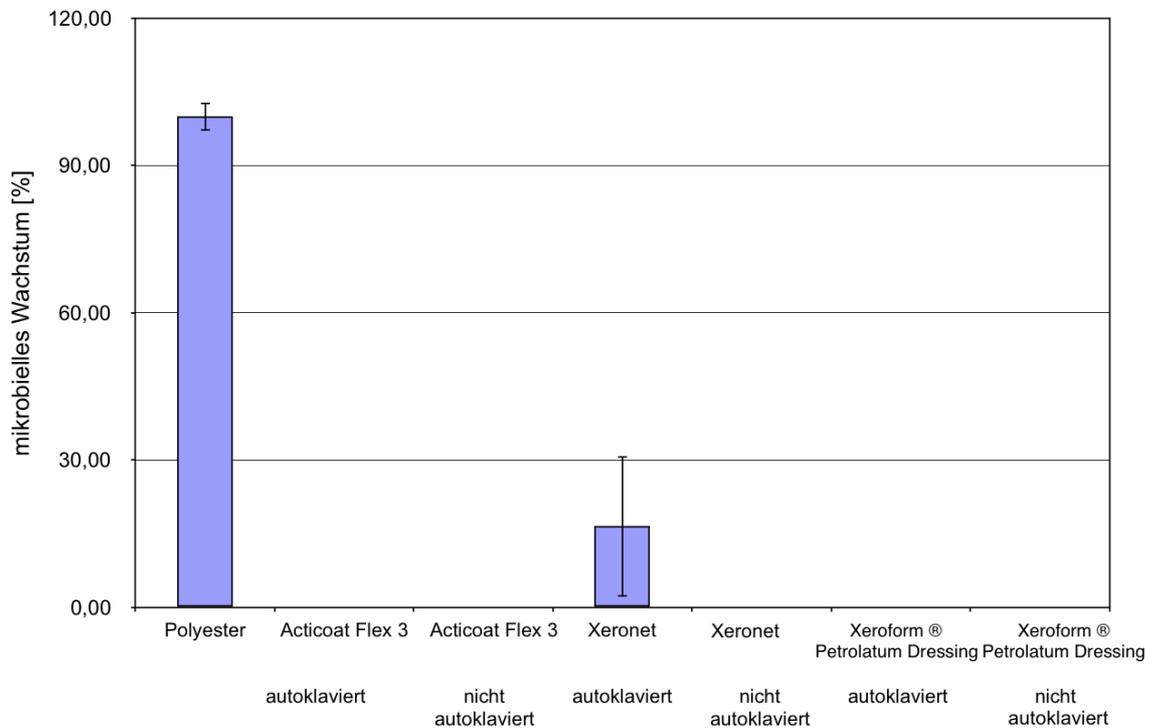


Abb. 20: Untersuchung des *mikrobiellen Wachstums* in %: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger *Klebsiella pneumoniae*

In den autoklavierten und nicht autoklavierten Proben von Acticoat Flex 3 und Xeroform[®], sowie in der nicht autoklavierten Wundauflage des Xeronets, war mit 8,06 eine starke *antibakterielle Gesamtaktivität* nachzuweisen (siehe Abb. 21). Für das autoklavierte Xeronet wurde eine mittlere *antibakterielle Gesamtaktivität* von 6,72 errechnet. Damit lag auch hier eine starke Inhibition des bakteriellen Wachstums vor. Da gerade das Autoklavieren einer Probe zur Keimfreiheit und zur Optimierung der Voraussetzungen eines Versuchs führen soll, lässt dieses Ergebnis auf eine Verunreinigung oder einen Fehler im Versuchsablauf schließen. Innerhalb aller autoklavierten Proben betrug der p-Wert 0,079. Die autoklavierten Wundauflagen unterschieden sich damit nicht signifikant. In der Gruppe der nicht autoklavierten Proben konnte aufgrund der Standardabweichung von 0 kein statistischer Test angewendet werden. Die *antibakterielle Gesamtaktivität* von Polyester betrug im Mittel 0.

Der *Wachstumswert* wurde mit 2,47 berechnet.

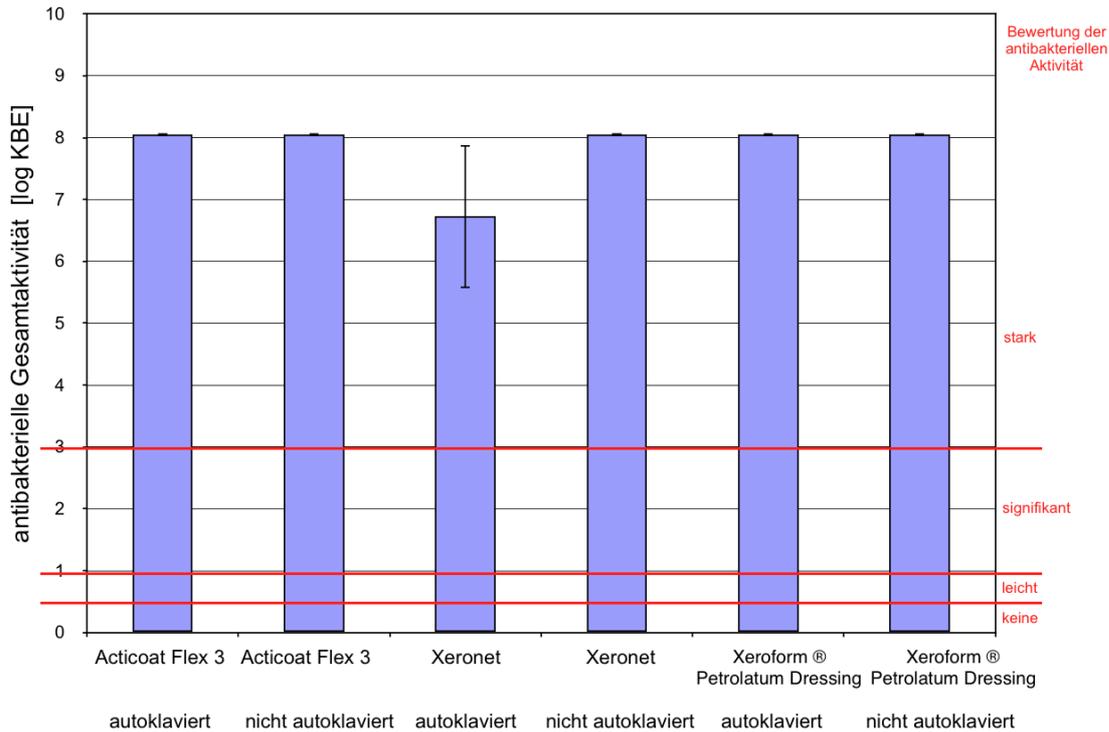


Abb. 21: Untersuchung der *antibakteriellen Gesamtaktivität*: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger *Klebsiella pneumoniae*

6.2.2 Ergebnisse der Untersuchung der Wundauflagen entsprechend der *Standard Test Method of the American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC 100-2004)*

Die aufgelisteten Diagramme stellen das *Keimwachstum in KBE* dar, welches analog der Formel (15) berechnet wurde. Die *Keimreduktion in %* wurde mithilfe der Formel (14) errechnet, anschließend grafisch dargestellt und wie folgt bewertet (siehe Tab. 17):

Tab. 17: Beurteilungskriterien der *Keimreduktion in %*

Antimikrobielle Aktivität	Keimreduktion in %
Keine Wirkung	Keimreduktion <50%
Signifikante Wirkung	Keimreduktion >50% aber <90%
Starke Wirkung	Keimreduktion >90%

(SOP/Wiegand 2012).

6.2.2.1 Antibakterielle Wirkung der Wundauflagen auf *Staphylococcus aureus* entsprechend der Norm AATCC 100-2004

Mithilfe der Untersuchungen entsprechend der Norm AATCC 100-2004 sind unter Einsatz der Polyester Kontrolle 14×10^6 KBE entstanden (siehe Abb. 22). Bei der Untersuchung der Wundauflagen konnte kein *Keimwachstum* nachgewiesen werden. Die Anwendung eines statistischen Tests war nicht möglich, da die Standardabweichungen der errechneten Mittelwerte der getesteten Wundauflagen bei 0 lagen.

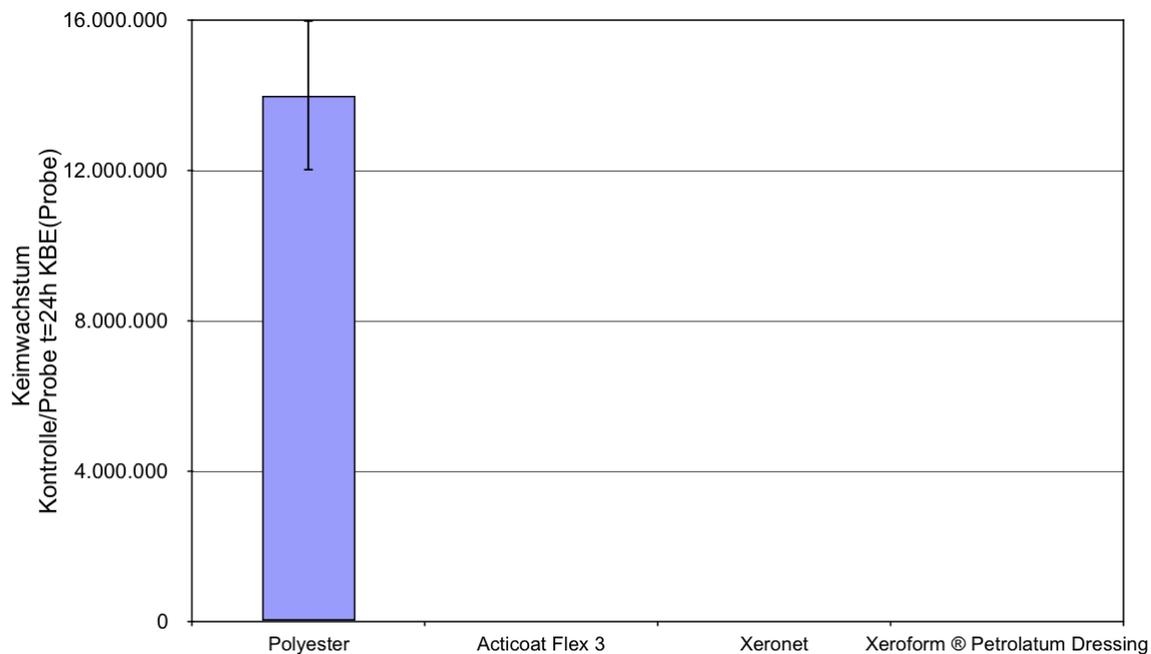


Abb. 22: Untersuchung des *Keimwachstums* in KBE: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger *Staphylococcus aureus*

In allen drei untersuchten Wundmaterialien konnte eine *Keimreduktion* von 100% errechnet werden (siehe Abb. 23). Damit lag eine starke antimikrobielle Aktivität gegenüber *Staphylococcus aureus* vor. Unter Einsatz der Polyester Referenz konnte keine *Keimreduktion* ermittelt werden. Die Standardabweichung der Mittelwerte der getesteten Proben lag bei 0. Damit war die Anwendung einer Varianzanalyse nicht möglich.

Der *Wachstumswert* betrug 1,89.

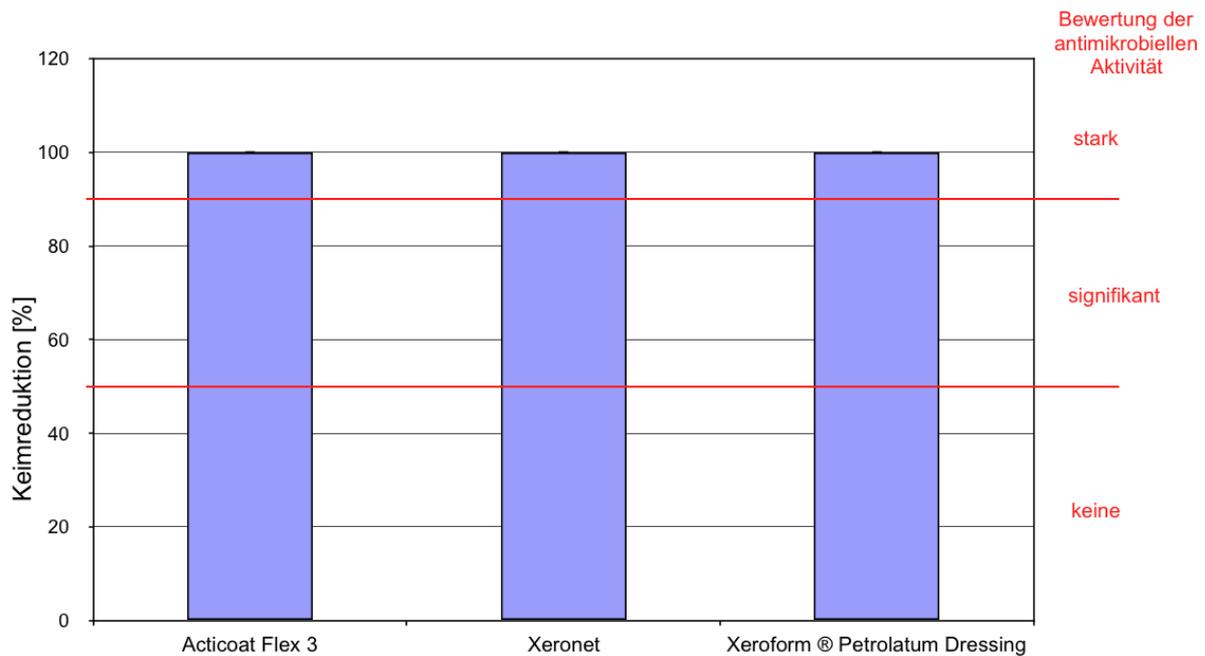


Abb. 23: Untersuchung der *Keimreduktion in %*: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger *Staphylococcus aureus*

6.2.2.2 Antibakterielle Wirkung der Wundauflagen auf *Klebsiella pneumoniae* entsprechend der Norm AATCC 100-2004

Anhand der Durchführung der Versuche entsprechend der Norm AATCC 100-2004 konnte das stärkste *Keimwachstum* mit einem Mittelwert von 357×10^6 KBE unter Testung der Polyester Kontrolle angegeben werden. Unter Einsatz der Wundauflage Xeroform® *Petrolatum Dressing* betrug das *Keimwachstum* weniger als 1% verglichen mit der Polyester Kontrolle. Dieser Wert war im Verhältnis so gering, dass er im Diagramm nicht zur Darstellung kam (siehe Abb. 24). Unter Acticoat Flex 3 und Xeronet konnte kein Bakterienwachstum nachgewiesen werden. Der durch den F-Test ermittelte p-Wert betrug 0,422. Damit unterschieden sich die Wundauflagen nicht signifikant voneinander.

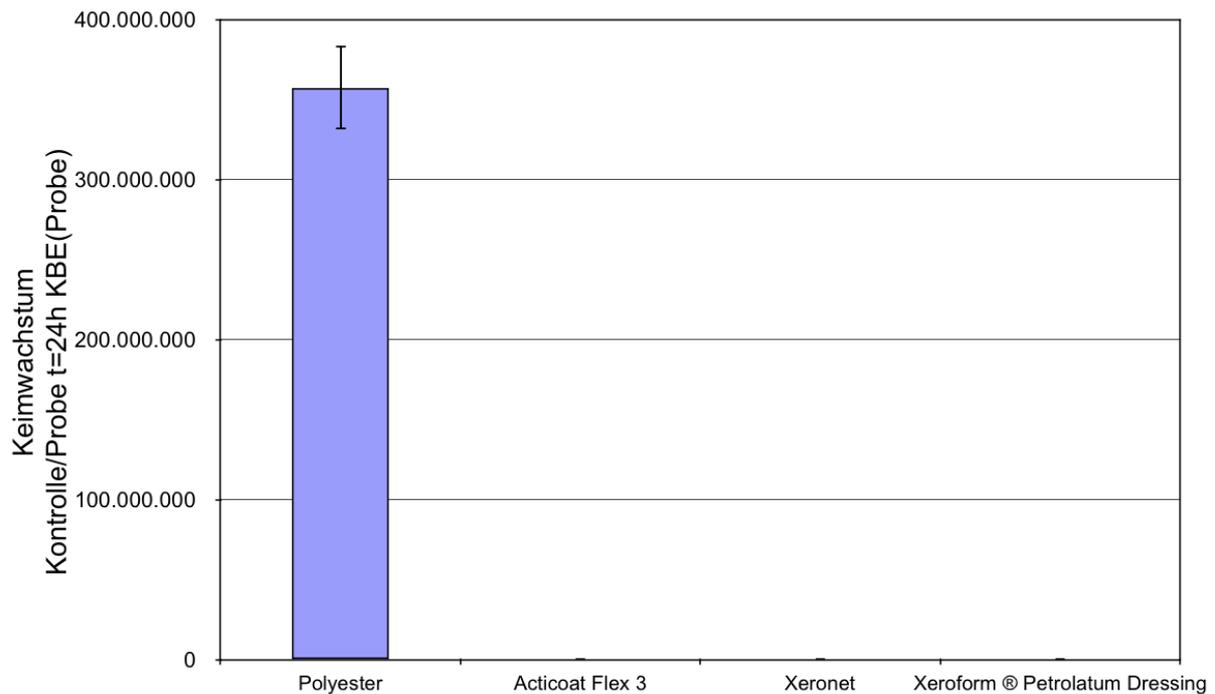


Abb. 24: Untersuchung des *Keimwachstums in KBE*: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger *Klebsiella pneumoniae*

Die Wundauflagen Acticoat Flex 3 und Xeronet zeigten eine *Keimreduktion* von 100% (siehe Abb. 25). Damit war anhand der Beurteilungskriterien in Tab. 17 eine starke antimikrobielle Aktivität dieser Wundauflagen zu erkennen. Bei der Inkubation mit Xeroform® *Petrolatum Dressing* konnte eine mittlere *Keimreduktion* von 90,43% nachgewiesen werden. Sie besaß damit eine signifikant bis starke antimikrobielle Aktivität (siehe Abb. 25). Unter der Polyester Probe erfolgte keine *Keimreduktion*.

Der errechnete *Wachstumswert* konnte mit 2,96 berechnet werden.

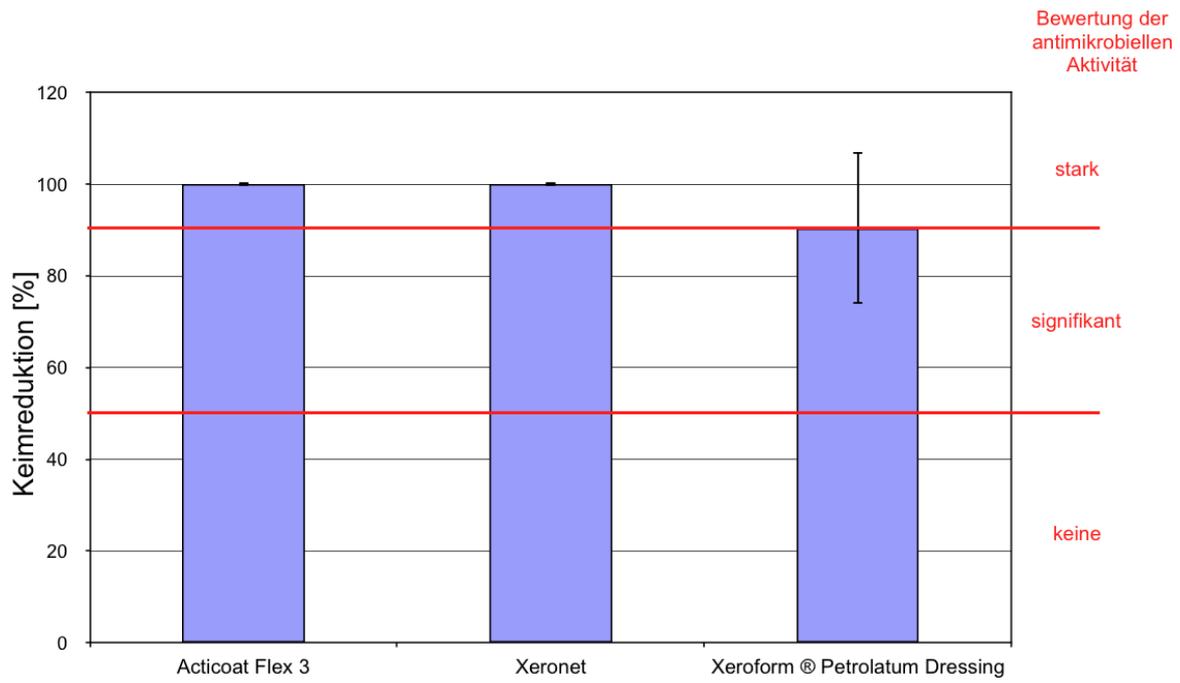


Abb. 25: Untersuchung der *Keimreduktion in %*: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger *Klebsiella pneumoniae*

7 Diskussion

Für eine erfolgreiche Anwendung der getesteten Wundauflagen sind zwei Eigenschaften entscheidend: Die Verträglichkeit des Wirkstoffes (Biokompatibilität) und die Fähigkeit des Wundmaterials, die erwünschte therapeutische Wirkung zu erzielen (Biofunktionalität) (Williams 2008). Die Bestimmung der Biokompatibilität erfordert Kenntnisse über die funktionelle Anwendung des Biomaterials. Diese besteht darin, die Regeneration der Haut vorübergehend aktiv zu fördern (Williams 2008). Den Grund der Nutzung des Materials beschreibt die Biofunktionalität. Im Falle der Wundauflagen bildet eine Gewebeverletzung mit Entstehung einer chronischen Wunde den Grund der Anwendung.

Um die Verträglichkeit der Wundauflage zu testen, werden verschiedene Methoden zur Untersuchung der Biokompatibilität entsprechend der DIN Norm ISO 10993-5 eingesetzt. Die Kenntnis der Verträglichkeit eines Materials ist wichtig, da die Reparatur- und Regenerationsprozesse im Rahmen der Wundheilung nicht durch Wirkstoffe oder sonstige Bestandteile der Wundauflage gehemmt werden dürfen. Seit Jahren existiert eine Vielzahl von Definitionen des Begriffes Biokompatibilität. Die häufigste zitierte Definition ist auf der Einigkeitskonferenz für Biomaterialien in Chester 1986 entstanden. Biokompatibilität wird als Fähigkeit eines Materials beschrieben, eine passende Antwort in einer spezifischen Situation zu leisten (Williams 1987). Diese Definition sagt jedoch nichts darüber aus, wie Biokompatibilität bewertet oder verbessert werden kann. Daher wurde sie vom gleichen Autor Jahre später nochmals verändert: „Biokompatibilität bezieht sich auf die Fähigkeit eines Biomaterials, seine gewünschte Funktion in Bezug auf eine medizinische Therapie durchzuführen, ohne irgendwelche unerwünschten lokalen oder systemischen Effekte im Empfänger oder Begünstigten dieser Therapie zu entlocken, aber die passendste und vorteilhafteste zelluläre Gewebeantwort in dieser spezifischen Situation zu erzeugen und die klinisch relevante Leistung dieser Therapie zu optimieren“ (Williams 2008). Gerade im 21. Jahrhundert hat sich das Verständnis von biologischen Reaktionen, der Entzündung und Wundheilung verbessert. Aufgrund dieser Kenntnisse ist von Ratner 2011 eine erweiterte Definition verfasst worden. Er beschreibt die Biokompatibilität als die Fähigkeit eines Materials, durch lokale nichtfibrotische Wundheilung eine Wundrekonstruktion und Gewebeintegration zu ermöglichen (Ratner 2011). Aufgrund des technologischen Fortschrittes und der wissenschaftlichen Forschung wird sich diese Definition in den kommenden Jahren erneut anpassen.

Die Testung auf Biokompatibilität bzw. Zytotoxizität von medizinischen Anwendungen, Materialien und Geräten ist zu einer zentralen Anforderung des medizinischen Sektors geworden (Wiegand et al. 2009). Die Überprüfung ist durch ISO Standards geregelt.

Bei jeder Applikation eines Biomaterials ist es unverzichtbar, über dessen Funktionsweise und den Grund der Anwendung Kenntnis zu besitzen. Dies betrifft die Wundauflagen mit der Eigenschaft, antimikrobiell zu wirken. Sie verhindern dadurch Komplikationen wie Wundinfektionen und Schmerzen des Patienten, fördern eine schnelle Heilung und reduzieren die Kosten des Gesundheitssystems. Somit beschreibt der Begriff der Biofunktionalität ein Konstrukt aus Funktionen eines Biomaterials.

Jede medizinische Anwendung und jedes medizinische System ist durch eine entsprechende Biofunktionalität gekennzeichnet. Beispielsweise stellt das Aufrechterhalten des kardiovaskulären Systems die Biofunktionalität von künstlich implantierten Herzklappen oder Blutgefäßen dar. Auch der Einsatz von Kochleaimplantaten zur Verbesserung des Hörvermögens sei als Beispiel der Biofunktionalität genannt (Wintermantel und Ha 2009).

Aufgrund von neuartigen Umständen, einem verbesserten Wissenstand und höheren Anforderungen wird es gerade im Bereich der Medizin und der Medizintechnik zu Entwicklungen neuer fortschrittlicher Biomaterialien mit verbesserten Eigenschaften kommen, deren Etablierung im medizinischen Sektor nur durch Kenntnis und gute Effektivität der Biofunktionalität durchgesetzt werden kann (Marti et al. 2018).

7.1 Diskussion der Methoden

Die Messung von ATP gehört zu den fundamentalen Bausteinen für den Nachweis von lebenden Prozessen, sollte jedoch nicht als einziger Parameter genutzt werden, um den Zelltod vorauszusagen (Crouch et al. 1993, Galluzzi et al. 2009). Den Goldstandard zum Nachweis des ATP-Gehaltes stellt die auch in dieser Arbeit angewandte Messung von ATP mittels (Bio)-*Luminescence* dar (Riss et al. 2011). Laut der Publikation von Andreotti et al. 1995 hat die ATP-*Luminescence*-Methode eine hohe Sensitivität, Linearität und Präzision für die Messung der Aktivität von verschiedenen Agenzien und Stoffkombinationen (Andreotti et al. 1995). In dieser Studie wird eine Erfolgsrate von 87% mittels der genannten Methode erreicht. Größte Vorteile dieser Messmethode stellen die Schnelligkeit, die technische Einfachheit und die hohe Flexibilität dar (Kangas et al. 1984). Zudem sind geringe Zellzahlen ausreichend (Kawamura et al. 1997). Ursprünglich wurde die ATP-Bestimmung mittels *Luminescence* entwickelt, um Tumorzellaktivität nach der Gabe von Chemotherapeutika zu bestimmen. Heutzutage wird sie

zudem genutzt, um ein primäres Screening der zytotoxischen Aktivität von bekannten oder nicht bekannten Stoffe zu erstellen (Kangas et al. 1984, Sevin et al. 1988).

Um die Protein-Konzentration und damit die Zellanzahl nachzuweisen, wird in dieser Arbeit das *BC Assay* genutzt (siehe 5.1.6). Die *BC Assay* Methode ist ähnlich der Lowry Methode. Beide stützen sich auf die Biuret-Reaktion, in welcher im alkalischen Milieu ein Farbstoffkomplex aus Peptid und Kupferatom gebildet wird (Brown et al. 1989). Bei der 1951 veröffentlichten Lowry Methode nutzt man zur Verstärkung des Farbkomplexes Fiolin Cioalteau Reagenz (Lowry et al. 1951). Die Lowry Methode ist mechanisch aufwendig und in alkalischer Umgebung nicht stabil (Smith et al. 1985). Im *BC Assay* wird anstatt der Fiolin Reagenz das Natriumsalz der Bicinchonininsäure zur Farbkomplexverstärkung hinzugefügt (Brown et al. 1989). Diese Methode auf Basis der Bicinchonininsäure bildet eine gute Alternative zur Lowry Methode, da das Reagenz stabiler ist und sich durch eine höhere Empfindlichkeit auszeichnet. Zudem ist die Protokolldurchführung flexibler als unter Einsatz der Lowry Methode (Smith et al. 1985). Der signifikante Vorteil des verwendeten *Assays* besteht in einer höheren Toleranz gegenüber Störquellen (Ji 1973, Lowry et al. 1951, Smith et al. 1985, Vallejo und Lagunas 1970.). Aufgrund des einfacheren Verfahrens und der mit Triton X-100 versetzten Versuche ist das *BC Assay* in dieser Arbeit die Methode der Wahl.

Die Analyse von Zellwachstum, Zellinhibition und Zelltod spielt eine große Rolle für die biologische Forschung, insbesondere für die Behandlung von Krebs (Smith et al. 2011). Es existieren verschiedene Methoden, um Zytotoxizität nachzuweisen.

Die traditionell genutzte Methode stellt das ^{51}Cr Radioisotopische Mikro-Zytotoxizitäts-*Assay* dar, welches 1968 von Brunner et al. entdeckt wurde (Brunner et al. 1968). Es wird zur Bestimmung der Quantifizierung der natürlichen T-Zell-vermittelten Zytotoxizität eingesetzt. Aufgrund des Einsatzes eines Radioisotopes muss ein aufwendiger Strahlenschutz vorhanden sein. Den hohen Kosten für die Methode und langen Versuchsperioden steht eine hohe Sensitivität gegenüber (Korzeniewski und Callewaert 1983). Heute wird diese Methode nicht mehr angewandt.

Ein weiteres Verfahren für die Bestimmung der Zytotoxizität stellt das Kalorimetrische *Assay* für T-Zellen dar, welches Parish und Müllbacher 1983 in ihrem Artikel beschrieben (Parish und Müllbacher 1983). Bei dieser Form des Zytotoxizitätsnachweises werden die lebensfähigen Zellen mit Neutralrot angefärbt und anschließend gezählt. Diese Methode ist sensitiver und 50 bis 100-fach schneller, als das radioaktive *Assay* (Parish und Müllbacher 1983).

Mithilfe der Bestimmung des Enzyms LDH mittels Photometrie kann ebenfalls die Zytotoxizität eines Materials nachgewiesen werden (Decker und Lohmann-Matthes 1988).

Diese Methode wird in der vorliegenden Arbeit verwendet. LDH kann als Marker für den Zelltod *in vivo* und *in vitro* genutzt werden (Allen et al. 1994). Ein Parameter für den Zelltod ist die Integrität der Zellmembran. Diese kann mithilfe von zytoplasmatischen Enzymen, wie dem LDH, gemessen werden. Es existiert ein Zusammenhang zwischen Zellkonzentration und LDH-Gehalt. Jedoch besitzt nicht jede Zelle die gleiche LDH-Aktivität. Diese hängt von der Zellgröße und der oxidativen Aktivität der Zelle ab. Der Gehalt des Enzyms von Zellen gleicher Abstammung ist ähnlich, aber nicht identisch. Unter dieser Annahme kann ein linearer Zusammenhang von Zellzahl und LDH-Gehalt angenommen werden (Allen et al. 1994). Die Methode der LDH-Messung kann nicht genutzt werden, um zwischen verschiedenen Zelltod-Arten zu unterscheiden (Galluzzi et al. 2009). Seit mehr als 15 Jahren ist diese Methode der Standard zum Nachweis der Zytotoxizität und Biokompatibilität geworden, da sie eine sensitive, akkurate und kosteneffektive Alternative zum radioisotopischen und färbemittelbasierten *Assay* bildet (Allen et al. 1994).

Damit Aussagen über die Biofunktionalität von antimikrobiell wirkenden Wundverbänden getroffen werden können, finden meist *in vitro*-Tests Anwendung. Die verfügbaren Methoden unterscheiden sich erheblich in ihrer Durchführung, den notwendigen Extraktionsmethoden, den Löslichkeitsgraden und den Diffusionseigenschaften der Testmaterialien und der Mikroorganismen. Daher werden die erhaltenen Ergebnisse und deren Bewertung von den ausgewählten Untersuchungsmethoden beeinflusst (Klančnik et al. 2010).

Zur Testung der Biofunktionalität von Wundmaterialien finden der Agar-Diffusionstest (ADT), die Mikroplattenlasernephelometrie (MLN), die Methode *luminescent quantification of bacterial ATP (LQbATP)* und die Challenge-Tests wie *Japanese Industrial Standard (JIS L 1902:2002)* und *Standard Test Method of the American Association of Textile Chemists and Colorists (AATCC 100-2004)* am häufigsten Anwendung. Alle Tests ermöglichen einen direkten Vergleich der Auswirkungen der Wundauflagen auf die eingesetzten Mikroorganismen (Wiegand und Hipler 2015).

Der ADT ist ein einfacher Test, der zur Registrierung von antimikrobiellen Materialien verwendet wird, die diffusionsfähiges Material enthalten. Jedoch lässt er keine quantitative Bewertung zu (DIN EN ISO 20645-2, DIN EN ISO 58940-3).

Um Aussagen über die Quantifizierung des mikrobiellen Wachstums bzw. lebensfähiger Mikroorganismen zu erhalten, können die MLN und die Methode *LQbATP* eingesetzt werden. Die MLN beruht auf der Messung von Trübungen in flüssigen Suspensionen. Je stärker die Trübung, desto höher ist die Partikelkonzentration. Mithilfe der MLN können also Aussagen

über das Lösungsverhalten der Wundauflagen getroffen werden. Es kann ermittelt werden, in welchem Ausmaß eine Wundauflage wirksame Metallbestandteile in Lösung gibt (Hipler et al. 2003). Die MLN wird weiterhin in der klinischen Chemie zur Bestimmung des Serum-Immunglobulins, der Komplementfaktoren und der reaktiven Proteine eingesetzt (Finger et al. 2013, Seyfarth et al. 2008, Wiegand et al. 2012). Im *LQbATP* kann durch die Messung des Gehaltes an zellulärem ATP auf die Menge an vorhandenen lebensfähigen mikrobiellen Zellen und damit auf die Wirkungsweise der Wundauflage geschlossen werden. Beide Testmethoden werden in Lösung durchgeführt und können bei einer großen Probenzahl eingesetzt werden (Wiegand et al. 2009, Wiegand und Hipler 2009).

Challenge-Tests, wie die in dieser Arbeit eingesetzten *JIS L 1902:2002* und *AATCC 100-2004*, finden Anwendung bei geringerem Umfang der Probenzahlen, da sie sehr arbeitsintensiv und zeitaufwändig sind. Beide Testmethoden sind im Unterschied zum ADT unabhängig von den Diffusionseigenschaften des antimikrobiellen Mittels. Die antimikrobielle Wirksamkeit der Wundauflagen wird nach direktem Kontakt mit den Mikroorganismen über einen entsprechenden Zeitraum analysiert. Sie erlauben eine quantitative Beurteilung der antimikrobiellen Aktivität, da die Ergebnisse als prozentuale Verringerung der Keimzahl oder als Hemmung des mikrobiellen Wachstums in logarithmischen Reduktionswerten angegeben werden können (AATCC 100-2004, JIS L 1902:2002).

Alle verwendeten *Assays* und Methoden wurden ursprünglich zu einem bestimmten Zweck entwickelt. Jedoch ist keine dieser Methoden allein ausreichend, eine befriedigende Aussage über die Biokompatibilität und Biofunktionalität zu treffen (Wiegand und Hipler 2009). Daher müssen wie in dieser Arbeit mehrere Parameter untersucht werden und verschiedene Methoden angewandt werden, um eine zufriedenstellende Aussage zu treffen.

7.2 Diskussion der Ergebnisse der Testung auf Biokompatibilität und Biofunktionalität

Da Acticoat Flex 3 bereits großen Einsatz in der Wundversorgung findet und dessen Wirkungsweise bestätigt ist, liegt das Augenmerk der Testung und deren Ergebnisse auf den Wundmaterialien Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet (Chaloupka et al. 2010, Lansdown 2004, Wiegand et al. 2015).

Durch Testung der Biokompatibilität konnten Ergebnisse erzielt werden, in denen der Acticoat Flex 3-Extrakt in den Konzentrationen von 0,1% bis 10% biokompatibel wirkte. Die Extrakte

von Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet wiesen in den Testkonzentrationen von 0,1% bis 25% biokompatible Effekte auf. Zusätzlich ließ sich im Xeronet-Extrakt in der Konzentration von 75% eine Biokompatibilität nachweisen. Kam es in höheren Konzentrationen bei Testung der bismuthhaltigen Wundauflagenextrakte zu zytotoxischen Effekten, sind diese wesentlich geringer, als unter Einsatz des Acticoat Flex 3-Extraktes. Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet besitzen damit eine bessere Biokompatibilität, als die silberhaltige Wundauflage.

Zu Beginn der Arbeit wurden die unterschiedlichen Wundauflagen zur Testung der Biokompatibilität für 24h und 72h extrahiert, geschüttelt und inkubiert. Hieraus sollten Erkenntnisse über die Zytotoxizität in Abhängigkeit der Extraktionsdauer erhalten werden. Da sich die Ergebnisse nach 24h bzw. 72h Extraktion jedoch kaum unterschieden, wurden in dieser Arbeit nur die Ergebnisse der 24h Extrakte der einzelnen Wundmaterialien dargestellt.

Die erhaltenen Ergebnisse der Biofunktionalität entsprechend des *Japanese Industrial Standard* zeigten, dass die silberhaltige Wundauflage Acticoat Flex 3 und die beiden bismuthversetzten Wundmaterialien Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet, sowohl autoklaviert, als auch nicht autoklaviert, eine starke *antibakterielle Gesamtaktivität* gegenüber *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* von deutlich größer 3 aufwiesen (siehe Tab. 16). Die autoklavierte Probe von Xeronet zeigte auf *Klebsiella pneumoniae* gegenüber den anderen Proben eine etwas geringere, aber dennoch starke *antibakterielle Gesamtaktivität*.

Entsprechend der *Standard Test Method of the American Association of Textile Chemists and Colorists* konnte für alle drei Wundauflagen eine vollständige Eradikation von *Staphylococcus aureus* nachgewiesen werden. Acticoat und Xeronet zeigten die gleiche Wirkung auf *Klebsiella pneumoniae*. Xeroform® erzielte auf *Klebsiella pneumoniae* eine *Keimreduktion* von 90,43% (siehe Tab. 17).

Bei Testung der Biofunktionalität kommt die Zellwand der Bakterien als erstes mit den extrahierten Wundauflagen in Kontakt und bildet damit die primäre Abwehrinstanz der Erreger. *Staphylococcus aureus* gehört zu den grampositiven Bakterien. Bei diesen Bakterien schließt sich eine 15 bis 55nm dicke Zellwand nach außen an die Zellmembran an. Hauptbestandteil dieser ist ein großes Polymer, welches aus zwei verknüpften Komponenten besteht. Eine Komponente bildet das Murein, welches eine vernetzte, faserige Struktur aufweist und für die Festigkeit und Form der Bakterienzelle verantwortlich ist. Zweiter Bestandteil ist das saure Polymer Teichonsäure. Hierdurch wird die Zellwand polar und negativ geladen. Weitere

Bestandteile wie Proteine und Enzyme variieren von Spezies zu Spezies. Ein charakteristisches Merkmal der Wand von *Staphylococcus aureus* bildet u.a. das Protein A, welches dem Bakterium seine antigene Wirkung verleiht (Franklin und Snow 1998). Die Wand der gramnegativen Bakterien wie *Klebsiella pneumoniae* besteht aus nur einer Schicht Murein, welche ebenfalls die Zellmembran umschließt. Nach außen schließt sich die äußere Lipiddoppelschicht an. Sie enthält Poren und regelt den Stoffdurchtritt. Zwischen der Mureinschicht und der äußeren Lipidmembran befindet sich der periplasmatische Raum. Äußere und innere Membran verhindern gemeinsam das Eindringen von Substanzen, wie Metallionen aus den Wundauflagen (Kauffmann und Schweiger 2004, Poeggel 2009). Durch den unterschiedlichen Wandaufbau von *Klebsiella pneumoniae* und *Staphylococcus aureus* besitzen diese Bakterien verschiedene Voraussetzungen für die Abwehr von antibakteriellen Stoffen. Dieser unterschiedliche Aufbau der Bakterien könnte eine Erklärung darstellen, dass sowohl bei den Versuchen entsprechend der Norm *JIS L 1902:2002* die bismuthhaltige Wundauflage Xeronet, als auch bei der Testung entsprechend *AATCC 100-2004* das bismuthhaltige Wundmaterial Xeroform® *Petrolatum Dressing*, eine etwas geringere Wirkungsweise auf den gramnegativen Keim *Klebsiella pneumoniae* zeigten.

Die in dieser Arbeit ermittelte deutlich geringe Zytotoxizität der niedrig konzentrierten Extrakte der Wundauflage Xeroform® *Petrolatum Dressing* im Vergleich zur silberhaltigen Wundauflage konnten Wild et al. 2016 in ihrem Paper ebenfalls bestätigen. Auch die in dieser Arbeit festgestellte gute Biofunktionalität der bismuthhaltigen Wundauflage konnte bereits 2001 in einem Agardiffusions- und Verdünnungsempfindlichkeitstest von Domenico et al. nachgewiesen werden (Domenico et al. 2001). Im Vergleich zur silberhaltigen Wundauflage sind die Stückkosten des bismuthhaltigen Wundmaterials Xeroform® *Petrolatum Dressing* niedriger, jedoch immer noch kostenintensiv (Wild et al. 2016). Daher versuchten Chattopadhyay et al. 2016 eine kostengünstigere Alternative herzustellen. Die handgemachte Wundauflage zeigte gegenüber Xeroform® eine vergleichbare Biokompatibilität und -funktionalität bei 34%-iger Ersparnis der Herstellungskosten (Chattopadhyay et al. 2016). Künftige Studien könnten sich demnach mit der Entwicklung einer günstigeren bismuthhaltigen Wundauflage für die klinische Anwendung befassen.

Neben diesem Nutzen besitzt Xeroform® noch weitere Vorteile. Hansbrough et al. konnten 1995 ein gutes kosmetisches Ergebnis und eine geringe Anzahl an Verbandswechseln nachweisen (Hansbrough et al. 1995). Patienten, deren Wunde mit Xeroform® *Petrolatum Dressing* behandelt wurde, benötigten weniger parenterale Analgesie und hatten weniger Infektionen als unter Einsatz der silberhaltigen Wundauflage (Haith et al. 2015). Die wohl

stärkste Überlegenheit zur silberhaltigen Wundauflage Acticoat Flex 3 stellt die fehlende Resistenzentwicklung der Bakterien gegenüber Bismuth-Ionen dar (Wild et al. 2016).

Die Vorbeugung und Behandlung von Wundinfektionen mittels Xeroform® *Petrolatum Dressing* ist seit Langem bekannt, hat sich jedoch noch nicht etabliert (Wild et al. 2016). Dies liegt u.a. daran, dass die genaue Wirkungsweise des Bismuths in Wundmaterialien nicht geklärt ist. Es wird vermutet, dass die antimikrobielle Wirkungsweise der Bismuth-Ionen auf Störung der Eisenaufnahme durch die Bakterien oder auf einer Verdrängung von Zink aus Enzym-Komplexen beruht, wodurch die Bakterien zu Grunde gehen (Domenico et al. 1996, Sigel (Hrsg.) und Sigel 2004). Studien zur Funktionsweise der Bismuth-Ionen in Wunden sind somit unabdingbar, um Xeroform® *Petrolatum Dressing* und das noch nicht in Anwendung befindliche Xeronet als modernes Wundprodukt zu etablieren.

In Kombination der Ergebnisse der Biokompatibilität und Biofunktionalität zeigte sich, dass in den Versuchen die Wundauflage Xeronet die besten Ergebnisse unter den drei Wundauflagen erzielte. Die Konzentrationen von 0,1% bis 25% und 75% des Xeronet-Extraktes wirkten biokompatibel. In den Extrakt-Konzentrationen von 50% und 100% kam es zu zytotoxischen Effekten. Diese waren weitaus geringer als unter Einsatz des Extraktes der Wundauflage Acticoat Flex 3, zudem traten sie erst nach Zellinkubationszeiten von 24h bzw. 48h auf. Die Untersuchung der Biokompatibilität wurde an Extrakten bzw. Testkonzentrationen der Wundauflagen durchgeführt. Das bedeutet, dass nur der herausgelöste Wirkstoff der Auflage in unterschiedlichen Konzentrationen in den Versuchen getestet wurde. In der tatsächlichen medizinischen Anwendung gelangt der Wirkstoff nicht im reinem Zustand auf die Wunde. Im Übrigen kann die Anwendungsdauer der bismuthhaltigen Wundauflage variiert und individuell angepasst werden, um das Risiko für einen zytotoxischen Effekt durch hohe Wirkstoff Konzentrationen zu senken.

Auf die Keime *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* wirkte Xeronet stark antibakteriell. Die Testung der Biofunktionalität erfolgte an den originalen, unveränderten Materialstücken der jeweiligen Wundauflage anhand der Normvorschrift. Dies ist realitätsnäher als die Testung der Biokompatibilität, jedoch können so keine verschiedenen Wundauflagen Konzentrationen untersucht werden und damit keine abstuften Aussagen über die Wirkungsweise in unterschiedlichen Konzentrationen getroffen werden.

Für die medizinische Anwendung der Wundauflage Xeronet resultiert anhand der Ergebnisse dieser Arbeit eine große Empfehlung. Um eine Aussage über die optimale Konzentration des Xeronets ohne zytotoxische Effekte bei guter antimikrobieller Wirkung treffen zu können, bedarf es weiterer Studien.

Die Versorgung von chronischen Wunden stellt ein aktuelles medizinisches Problem dar und wird auch in Zukunft von großer Relevanz sein. Die Versorgung chronischer Wunden ist kosten-, zeit- und personalintensiv, stellt eine große Belastung des Gesundheitssystems dar und schränkt die Lebensqualität der Patienten deutlich ein (Purwins et al. 2010). Durch unnötigen und falschen Einsatz von Antibiotika und die freizügige Anwendung dieser Medikamente in der Massentierhaltung entstehen zunehmend Resistenzen gegen die Wirksamkeit dieser Medikamente. Durch den Wandel der Resistenzlage der Keime hat sich das Risiko einer Wundinfektion mit der möglichen Komplikation der Chronifizierung von Wunden erhöht. Da die Ursachen chronischer Wunden vielfältig sind, rücken die herkömmlichen Präventions- und Therapiemaßnahmen bei infizierten Wunden in den Hintergrund und erfordern eine multimodale Wundtherapie (Dissemond et al. 2005). Den allgemeinen und speziellen Hygienemaßnahmen sowie dem chirurgischen Wunddebridement wird eine stärkere Wichtigkeit beigemessen (Riesner et al. 2017). Gleichzeitig nehmen bakterizide Therapiemöglichkeiten mittels silberhaltigen Wundauflagen (z.B. Acticoat Flex 3) und bismuthversetzten Wundmaterialien wie Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet einen zunehmenden Stellenwert ein.

Aufgrund zunehmender Resistenzen von Bakterien gegenüber Antibiotika und silberhaltigen Externa treten Alternativen in der Wundversorgung in den Fokus. Eine davon bildet das chemische Element Bismuth. Wie in der Einleitung beschrieben (siehe 2.4), findet es bereits Anwendung in einigen medizinischen Bereichen. Der antibakterielle Effekt von Bismuth resultiert aus einer Funktionshemmung von Proteinen und Enzymen durch dessen Metallionen, deren biochemische Wirkung jedoch unvollständig geklärt ist (Mahony et al. 1999, Sigel (Hrsg.) und Sigel 2004).

In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die bismuthversetzten Wundauflagen Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet eine gute Balance zwischen den geringen zytotoxischen Nebenwirkungen und der Biofunktionalität besitzen. Diese Charakterisierung gilt besonders für die Wundauflage Xeronet, welche zum Stand der Arbeit noch keine Anwendung im medizinischen Sektor besitzt. Ein Einsatz dieser bismuthhaltigen Wundauflage könnte dazu beitragen, die Behandlung chronischer Wunden zu beschleunigen, um dadurch die Beschwerden der Patienten zu lindern. Trotz dieser positiven Entwicklung in der Versorgung von Wundheilungsstörungen werden chronische Wunden weiterhin sozioökonomische Probleme darstellen, welche durch das steigende Lebensalter und die Multimorbidität der Patienten aggravieren (Karl et al. 2007).

Für eine effektive Wundversorgung sind sowohl etablierte, als auch innovative Ansätze bedeutsam, soweit diese die pathophysiologischen Vorgänge und das Mikromilieu der Wunde berücksichtigen. Sind die Mediatoren einer chronischen Wundheilungsstörung bekannt, können diese gezielt inhibiert werden. Eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung eines Wundmilieus spielt die gesteigerte Aktivität eiweißspaltender Proteasen. Proteasehemmende Medikamente sind somit eine weitere therapeutische Option (Eming et al. 2007).

Ein weiteres vielversprechendes Therapiekonzept stellt der Einsatz von Kaltplasma dar. Hierbei können Argonplasma oder atmosphärisches Plasma auf Wunden aufgetragen werden, welche dadurch antibakteriell und durchblutungsfördernd behandelt werden (Heinlin et al. 2010). Auch die Entwicklung intelligenter Wundverbände stellt einen neuen Therapieansatz dar. Diese Verbände enthalten zur adäquaten Reaktion Sensoren, welche beispielsweise die Messung der Temperatur in einer Wunde ermöglichen. 2018 entwickelten Zhou et al. einen UV-photovernetzbaren methacrylierten Gelatine Verband, der mit Farbwechsel auf das mikrobiologische Milieu der Wunde reagierte und dadurch antimikrobielle Wirkstoffe freisetzte, wenn dies erforderlich war (Zhou et al. 2018).

Der Nachweis der guten Biokompatibilität und Biofunktionalität der bismuthaltigen Wundauflagen Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet repräsentiert also nur den Anfang einer vielversprechenden, innovativen lokalen Versorgung chronischer Wunden.

Es ist nicht möglich, die erhaltenen Ergebnisse der *in vitro*-Testung der *HaCaT*-Zellen gleichwertig auf die menschliche Haut zu übertragen. Die Zellen weisen in einer zweidimensionalen *in vitro*-Umgebung ein anderes Verhalten auf, als unter dreidimensionalen *in vivo*-Bedingungen. Daher müssen die erhaltenen Ergebnisse anhand von dreidimensionalen Hautmodellen bestätigt werden (Wiegand et al. 2016). Derzeit sind Monolayer-Kulturen von *HaCaT*-Zellen und Fibroblasten die aktuelle Wahl der Technik für die Einschätzung der Biokompatibilität und Zytotoxizität eines bestimmten Biomaterials (Wiegand und Hipler 2009).

8 Schlussfolgerung

Bis zu 2% der deutschen Bevölkerung leiden an chronischen Wunden, deren Diagnostik und Therapie den medizinischen Sektor jährlich mit schätzungsweise 5 Milliarden Euro Kosten belastet (Karl et al. 2004, Voggenreiter und Dold 2004). Es erkranken pro Jahr etwa 600 000 Menschen an einer neuropathischen Wunde als Komplikation eines *Diabetes mellitus*. Zu den Ursachen zählen u.a. Bewegungsmangel, Nikotinabusus und Übergewicht (Karl et al. 2007). Durch den Anstieg der Lebenserwartung und zunehmender Komorbidität im Alter ist auch eine zunehmende Prävalenz chronischer Wunden zu erwarten (Klein 2007). Somit gewinnt eine multifaktorielle Wundversorgung mit neuartigen antimikrobiellen Materialien an Bedeutung.

Die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigen die antimikrobielle Wirkungsweise von Silber. Trotz standardmäßigem Einsatz des Silbers in der Medizin werden zunehmend Resistenzen der Bakterien gegen Silber entdeckt. McHugh et al. beschrieben bereits 1975, dass die entwickelte Silberresistenz der Bakterien plasmidkodiert basiert ist (McHugh et al. 1975). Das Plasmid pMG101 kodiert die Resistenz für Silber, aber auch für Quecksilber, Tellurit, Ampicillin, Chloramphenicol, Tetracyclin, Streptomycin und Sulfonamid. Die klinische Inzidenz der Silberresistenz bleibt jedoch gering (Chopra 2007).

Da es keine genauen Vorhersagen über die weitere Resistenzentwicklung von Silber gibt, muss nach weiteren antibakteriellen Stoffen für die medizinische Behandlung gesucht werden. Einen solchen Stoff stellt Bismuth dar. Auch bismuthhaltige Materialien besitzen bereits Anwendung im medizinischen Sektor. In den letzten Jahren wurde die Entwicklung weiterer Bismuthverbindungen für den medizinischen Gebrauch angekurbelt (Sigel (Hrsg.) und Sigel 2004). Trotz Wirksamkeit der bismuthhaltigen Wundauflagen, wie auch in dieser Arbeit bestätigt, wird Bismuth in der Wundversorgung eher zögernd eingesetzt. Dies liegt u.a. daran, dass die genaue Wirkungsweise von Bismuth noch nicht ausreichend erforscht ist. Weitere Studien zum Wirkort und Wirkmechanismus des Bismuths in Bakterien, möglicher langfristiger schädlicher Einfluss auf Hautzellen und Resistenztestungen sind erforderlich, um bismuthhaltige Wundtherapeutika zu etablieren.

In dieser Arbeit erfolgte die Testung der silberhaltigen Wundauflage Acticoat Flex 3 im Vergleich zu den zwei bismuthversetzten Wundauflagen Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet auf Biokompatibilität und Biofunktionalität. Es konnte gezeigt werden, dass die Wundauflagenextrakte von Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet in geringen Konzentrationen biokompatibel wirkten. Sollten in höheren Konzentrationen zytotoxische Effekte entstehen, sind diese wesentlich geringer, als unter Einsatz des Acticoat Flex 3-

Extraktes. Den bismuthhaltigen Wundmaterialien konnte ebenfalls ein starker keimreduzierender Effekt auf *Staphylococcus aureus* und *Klebsiella pneumoniae* nachgewiesen werden. Erkenntnis dieser Arbeit ist, dass die bismuthhaltigen Wundauflagen Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet eine Alternative zu Silber bilden, um bakteriell infizierte Wunden zu versorgen.

Die Testung der Biokompatibilität erfolgte an *in vitro*-*HaCaT*-Zellen, da sie der menschlichen Haut am ähnlichsten sind. Jedoch ist die Übertragung der *in vitro*-Ergebnisse auf die menschliche Haut nicht uneingeschränkt möglich. Weitere Testreihen an dreidimensionalen Hautmodellen sind daher zu empfehlen. Für präzisere Ergebnisse sind langfristige Messungen der Parameter erforderlich. Schließlich müssen Effektivität und Sicherheit bismuthhaltiger Wundauflagen *in vivo* bewiesen werden.

Die guten Ergebnisse der Testungen der Wundmaterialien Xeroform® *Petrolatum Dressing* und Xeronet auf Biokompatibilität und Biofunktionalität stellen eine deutliche Empfehlung des Einsatzes in der lokalen Wundbehandlung dar. Insbesondere der Einsatz von Xeronet, welches zum Stand der Arbeit noch keine medizinische Anwendung besitzt, scheint vielversprechend.

9 Literaturverzeichnis

- Allen M, Millett P, Dawes E, Rushton N.** 1994. Lactate Dehydrogenase Activity as a Rapid and Sensitive Test for the Quantification of Cell Numbers in vitro. *Clin Mater*, 16(4): 189-194.
- Andreotti PE, Cree IA, Kurbacher CM, Hartmann DM, Linder D, Harel G, Gleiberman I, Caruso PA, Ricks SH, Untch M.** 1995. Chemosensitivity testing of human tumors using a microplate adenosine triphosphate luminescence assay: clinical correlation for cisplatin resistance of ovarian carcinoma. *Cancer Res*, 55(22): 5276-5282.
- Becker FM, Boortz G, Dietrich V, Engelmann L, Ernst C, Fanghänel G, Höhne H, Lenertat R, Liesenberg G, Meyer L, Pews-Hocke C, Schmidt GD, Stamm R, Weber K.** 2004. Formeln und Tabellen für die Sekundarstufen I und II. 11. Auflage. Berlin: PAETEC Gesellschaft für Bildung und Technik mbH, 1.
- Bezdetko PA, Sergienko N, Dyomin Y, Korol A, Nikitin N, Merzbacher M, Groß D, Kohnen R.** 2012. Successful treatment of blepharitis with bibrocathol (Posiformin® 2%). *Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol*, 250(12): 1869-1875.
- Binder HH.** 2016. Kleines Lexikon der chemischen Elemente. 2., aktualisierte Auflage. Berlin: Lehmanns Media, 36-37.
- Bosch K.** 1997. Elementare Einführung in die angewandte Statistik. 6., überarbeitete Auflage. Braunschweig, Wiesbaden: Vieweg, 12-13, 25-26.
- Böttcher D.** 2016. Die Ökonomie der Elemente. Was im Periodensystem an Wirtschaft steckt: Bismut (Bi). *brand eins*, (1): 14.
- Boukamp P, Petrussevska RT, Breitkreutz D, Hornung J, Markham A, Fusenig NE.** 1988. Normal keratinization in a spontaneously immortalized aneuploid human keratinocyte cell line. *J Cell Biol*, 106(3): 761-771.
- Branchini BR, Southworth TL, Fontaine DM, Murtiashaw MH, McGurk A, Talukder MH, Qureshi R, Yetil D, Sundlov JA, Gulick AM.** 2017. Cloning of the Orange Light-Producing Luciferase from *Photinus scintillans* - A New Proposal on how Bioluminescence Color is Determined. *Photochem Photobiol*, 93(2): 479-485.
- Breitkreutz D, Schoop VM, Mirancea N, Baur M, Stark HJ, Fusenig NE.** 1998. Epidermal differentiation and basement membrane formation by HaCaT cells in surface transplants. *Eur J Cell Biol*, 75(3): 273-286.
- Brown RE, Jarvis KL, Hyland KJ.** 1989. Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem*, 180(1): 136-139.

- Brunner KT, Mauerl J, Cerottini JC, Chapus B.** 1968. Quantitative Assay of the Lytic Action of Immune Lymphoid Cells on ⁵¹Cr-Labelled Allogenic Target Cells In vitro; Inhibition by Isoantibody and by Drugs. *Immunology*, 14(2): 181-196.
- Chaloupka K, Malam Y, Seifalian AM.** 2010. Nanosilver as a new generation of nanoparticle in biomedical applications. *Trends Biotechnol*, 28(11): 580-588.
- Chattopadhyay A, Chang K, Nguyen K, Galvez MG, Legrand A, Davis C, McGoldrick R, Long C, Pham H, Chang J.** 2016. An Inexpensive Bismuth-Petrolatum Dressing for Treatment of Burns. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 4(6): 1-8.
- Chopra I.** 2007. The increasing use of silver-based products as antimicrobial agents: a useful development or a cause for concern?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 59: 587-590.
- Covaleo.** 2017. Packungsbeilage Xeroform ® Petrolatum Dressing.
- Crouch SP, Kozlowski R, Slater KJ, Fletcher J.** 1993. The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 160(1): 81-88.
- Decker T, Lohmann-Metthes ML.** 1988. A quick and simple method for the quantitation of lactate dehydrogenase release in measurements of cellular cytotoxicity and tumor necrosis factor (TNF) activity. *J Immunol Methods*, 115(1): 61-69.
- Deutsche Chemische Gesellschaft (Hrsg.).** 1927. *Gmelins Handbuch der anorganischen Chemie - Wismut und radioaktive Isotope mit 11 Figuren*. 8., völlig neu bearbeitete Auflage. Berlin: Verlag Chemie, 1-4.
- Deutsche Gesellschaft für Wundheilung und Wundbehandlung e.V. (DGfW) (Hrsg.).** 16.02. 2012. Kurzfassung S3-Leitlinie „Lokaltherapie chronischer Wunden bei Patienten mit den Risiken peripherer arterielle Verschlusskrankheit, Diabetes mellitus, chronische venöse Insuffizienz“. In: AWMF online - Das Portal der wissenschaftlichen Medizin. AWMF – Register Nr. 091/001.
- DIN EN ISO 10993-5.** 2007. Biologische Beurteilung von Medizinprodukten - Teil 5: Prüfungen auf in-vitro-Zytotoxizität.
- DIN EN ISO 20645-2.** 2005. Textile fabrics-determination of antibacterial activity-agar-diffusion plate test.
- DIN EN ISO 58940-3.** 2007. Medical microbiology-susceptibility testing of microbial pathogens to antimicrobial agents - part 3: agar diffusion test.
- Dissemond J, Assenheimer B, Engels P, Gerber C, Kröger K, Kurz P, Läubli S, Probst S, Protz K, Traber J, Uffenweiler S, Strohal R.** 2017a. M.O.I.S.T. - ein Konzept für die Lokaltherapie chronischer Wunden. *J Dtsch Dermatol Ges*, 15(4): 443-445.

- Dissemond J, Augustin M, Eming S, Görge T, Horn T, Karrer S, Schumann H, Stücker M für die Arbeitsgemeinschaft Wundheilung (AGW) der DDG.** 2014. Moderne Wundtherapie - praktische Aspekte der lokalen, nicht-interventionellen Behandlung chronischer Wunden. *J Dtsch Dermatol Ges*, 12: 541-554.
- Dissemond J, Böttrich JG, Braunwarth H, Hilt J, Wilken P, Münter KC.** 2017b. Evidenz von Silber in der Wundbehandlung – Metaanalyse der klinischen Studien von 2000-2015. *J Dtsch Dermatol Ges*, 15(5): 524-536.
- Dissemond J, Körber A, Jansen T, Grabbe S.** 2005. Aktuelle Diagnostik des Ulcus cruris. *Dtsch Med Wochenschr*, 130: 1262-1266.
- Dissemond J.** 2014. Chronische Wunden und Bakterien. *Hautarzt*. Berlin: Springer Medizin, 65: 10-14.
- Dissemond J.** 2015. *DermaUpdate 2015. Handbuch Dermatologie. Hot Topic: Wundheilung/Narben.* Wiesbaden: Med update, 1-51.
- Dissemond J.** 2017. Chronische Wunden. *Kompodium Dermatologie.* Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 13: 45-46.
- Dodge AG, Wackett LP.** 2005. Metabolism of bismuth subsalicylate and intracellular accumulation of bismuth by *Fusarium* sp. Strain BI. *Appl Environ Microbiol*, 71(2): 876-882.
- Domenico P, Baldassarri L, Schoch PE, Kaehler K, Sasatsu M, Cunha BA.** 2001. Activities of bismuth thiols against staphylococci and staphylococcal biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(5): 1417-1421.
- Domenico P, Reich J, Madonia W, Cunha BA.** 1996. Resistance to bismuth among Gram-negative bacteria is dependent on Iron and its uptake. *J Antimicrobial Chemother*, 38: 1031-1040.
- Dorland WAN.** 1974. *Dorland's illustrated medical dictionary.* 25.ed. Philadelphia: Saunders, 218.
- Driffield K.** 2008a. ACTICOAT FLEX prevents the formation of biofilms. In: *Wundmanagement Produktkatalog smith&nephew 2017.* Data on File reference 012024-1.
- Driffield K.** 2008b. Antimicrobial Activity of ACTICOAT FLEX 3 against a Broad Spectrum of Wound Pathogens. In: *Wundmanagement Produktkatalog smith&nephew 2017,* Data on File reference 0810016-2.
- Driffield K.** 2008c. Antimicrobial Activity of ACTICOAT FLEX 3 dressings in a 3 day Repeat Challenge Test. In: *Wundmanagement Produktkatalog smith&nephew 2017,* Data on File reference 0810017-3.

Driffield K. 2008d. ACTICOAT FLEX 3 has antimicrobial activity in 30 minutes. In: Wundmanagement Produktkatalog smith&nephew 2017, Data File refernce 0810014.

Dunn K, Edwards-Jones V. 2004. The role of Acticoat with nanocrystalline silver in the management of burns. *Burns*, 30(1): 1-9.

Eming SA, Kaufmann J, Löhner R, Krieg T. 2007. Chronische Wunde, Neue Wege in Forschung und Therapie. *Hautarzt*. Berlin: Springer Medizin, 58(11): 939-944.

Feldman DL, Rogers A, Karpinski RH. 1991. A prospective trial comparing Biobrane, Duoderm and xeroform for skin graft donor sites. *Surg Gynecol Obstet.*, 173(1): 1-5.

Finger S, Wiegand C, Buschmann HJ, Hipler UC. 2013. Antibacterial properties of cyclodextrin-antiseptics-complexes determined by microplate laser nephelometry and ATP bioluminescence assay. *International Journal of Pharmaceutics*, 452(1-2): 188-193.

Fluhr JW, Breternitz M, Kowatzki D, Bauer A, Bossert J, Elsner P, Hipler UC. 2010. Silver-loaded seaweed-based cellulosic fiber improves epidermal skin physiology in atopic dermatitis: safety assessment, mode of action and controlled, randomized single-blinded exploratory in vivo study. *Exp Dermatol*, 19(8): 9-15.

Franklin TJ, Snow GA. 1998. *Biochemistry and Molecular Biology of Antimicrobial Drug Action*. 5. Auflage. New York: Springer Science + Business Media, 25-35.

Galluzzi L, Aaronson SA, Abrams J, Alnemri ES, Andrews DW, Baehrecke EH, Bazan NG, Blagosklonny MV, Blomgren K, Borner C, Bredesen DE, Brenner C, Castedo M, Cidlowski JA, Ciechanover A, Cohen GM, De Laurenzi V, De Maria R, Deshmukh M, Dynlacht BD, El-Deiry WS, Flavell RA, Fulda S, Garrido C, Golstein P, Gougeon ML, Green DR, Gronemeyer H, Hajnóczky G, Hardwick JM, Hengartner MO, Ichijo H, Jäättelä M, Kepp O, Kimchi A, Klionsky DJ, Knight RA, Kornbluth S, Kumar S, Levine B, Lipton SA, Lugli E, Madeo F, Malomi W, Marine JC, Martin SJ, Medema JP, Mehlen P, Melino G, Moll UM, Morselli E, Nagata S, Nicholson DW, Nicotera P, Nuñez G, Oren M, Penninger J, Pervaiz S, Peter ME, Piacentini M, Prehn JH, Puthalakath H, Rabinovich GA, Rizzuto R, Rodrigues CM, Rubinsztein DC, Rudel T, Scorrano L, Simon HU, Steller H, Tschopp J, Tsujimoto Y, Vandenabeele P, Vitale I, Vousden KH, Youle RJ, Yuan J, Zhivotovsky B, Kroemer G. 2009. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring cell death in higher eukaryotes. *Cell Death Differ*, 18(8): 1093-1107.

Giancotti FG, Ruoslahti E. 1990. Elevated levels of the alpha 5 beta 1 fibronectin receptor suppress the transformed phenotype of Chinese hamster ovary cells. *Cell*, 60(5): 849-859.

- Gstraunthaler G, Lindl T.** 2013. Zell- und Gewebekultur, Allgemeine Grundlagen und spezielle Anwendungen. 7. Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 115-119.
- Gurthar GC, Werner S, Barrandon Y, Longaker MT.** 2008. Wound repair and regeneration. *Nature*, 453(7193): 314-321.
- Haith LR, Stair-Buchanan ME, Ackerman BH, Herder D, Reigart CL, Stoering M, Guilday RE, Patton ML, Ross KM.** 2015. Evaluation of Aquacel Ag for Autogenous Skin Donor Sites. *J Burn Care Res*, 36(6): 602-606.
- Hansbrough W, Doré C, Hansbrough JF.** 1995. Management of skin-grafted burn wounds with Xeroform and layers of dry coarse-mesh gauze dressing results in excellent graft take and minimal nursing time, *J Burn Care Rehabil*, 16(5): 531-534.
- Heinlin J, Morfill G, Landthaler M, Stolz W, Isbary G, Zimmermann JL, Shimizu T, Karrer S.** 2010. Plasma medicine: possible applications in dermatology. *J Dtsch Dermatol Ges*, 8(12): 968-976.
- Hermann S.** 2017. Kupfergruppe: Elemente der ersten Nebengruppe: Eine Reise durch das Periodensystem. Wiesbaden: Springer Spektrum, 62-91.
- Hipler B, Brand S, Angersbach S, Rückert C.** 2003. Monitoring des Wachstums von Mikroorganismen mit Hilfe der Nephelometrie. *BIOspektrum*, 9: 648-649.
- Hipler UC, Elsner P, Fluhr JW.** 2006. Antifungal and Antibacterial Properties of a Silver-Loaded Cellulosic Fiber. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 77(1): 156-163.
- Hof H, Dörries R.** 2009. Medizinische Mikrobiologie. 4. vollständig überarbeitete Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 310-318.
- Japanese Industrial Standard JIS L 1902:2002:** testing method for antibacterial activity of textiles.
- Ji TH.** 1973. Interference by detergents, chelating agents, and buffers with the Lowry protein determination. *Anal Biochem*, 52(2): 517-521.
- Jockenhöfer F, Gollnick H, Herberger K, Isbary G, Renner R, Stücker M, Valesky E, Wollina U, Weichenthal M, Karrer S, Stoffels-Weindorf M, Dissemond J.** 2014. W.A.R. Scores in Patients With Chronic Leg Ulcers: Results of a Multicentre Study. *J Wound Care*, 23(1): 5-12.
- Kangas L, Gronroos M, Nieminen AL.** 1984. Bioluminescence of cellular ATP: a new method for evaluating cytotoxic agents in vitro. *Med Biol*, 62(6): 338-343.
- Karl T, Gusmann A, Storck M.** 2007. Chronische Wunden - Perspektiven der integrierten Versorgung. *Zentralblatt für Chirurgie*, 132(3): 232-235.

- Karl T, Modic PK, Voss EU.** 2004. Indikationen und Behandlungsergebnisse der V.A.C.®-Therapie in der Gefäßchirurgie - State of the art in der Behandlung chronischer Wunden. Zentralblatt für Chirurgie, 129: 74-79.
- Kauffmann MH, Schweiger M.** 2004. Biologie für Mediziner und Naturwissenschaftler. 5., überarbeitete Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 286-289.
- Kawamura H, Ikeda K, Takiyama I, Terashima M.** 1997. The usefulness of the ATP assay with serum-free culture for chemosensitivity testing of gastrointestinal cancer. Eur J Cancer, 33(6): 960-966.
- Kehrer S.** 2016. In-vitro-Untersuchungen zum Einfluss von Extrakten aus ZnO-haltigen Textilien auf humane Keratinozyten (HaCaT-Zellen) [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität. 14-16.
- Klancnik A, Piskernik S, Jersek B, Mozina SS.** 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. J Microbiol Methods, 81(2): 121-126.
- Klein A.** 2007. Gesundheitsverhalten, Ein Vergleich von öffentlicher und fachlicher Meinung [Dissertation]. Greifswald: Universität Greifswald. 6.
- Klein S, Schreml S, Dolderer J, Gehmert S, Niederbichler A, Landthaler M, Prantl L.** 2013. Evidence-based topical management of chronic wounds according to the T.I.M.E. principle. Journal of the German Society of Dermatology, 11(9): 819-829.
- Konop M, Damps T, Misicka A, Rudnicka L.** 2016. Certain Aspects of Silver and Silver Nanoparticles in Wound Care: A Minireview. Hindawi Publishing Corporation^[1]Journal of Nanomaterials, 2016(4): 1-10.
- Korzeniewski C, Callewaert DM.** 1983. An Enzyme-Release Assay for Natural Cytotoxicity. J Immunol Methods, 64(3): 313-320.
- Lange B, Wessel LM.** September 2014. S1-Leitlinie: Wunden und Wundbehandlung aktueller Stand. In: AWMF online - Das Portal der wissenschaftlichen Medizin. AWMF – Register Nr. 006/129.
- Lansdown AB.** 2004: A review of the use of silver in wound care: facts and fallacies. Br J Nurs, 13(6): 6-19.
- Löffler G, Petrides PE.** 2014. Löffler/Petrides - Biochemie und Pathobiochemie. 9., vollständig überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer, 195-196.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ.** 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. J Biol Chem, 193(1): 265-275.

- Lu B, Wang J, Li J, Liu J, Chen Y.** 2019. Half-dose clarithromycin-containing bismuth quadruple therapy is effective and economical in treating *Helicobacter pylori* infection: A single-center, open-label, randomized trial. *Heliobacter*, 12566.
- Lutmann W, Bratke K, Küpper M, Myrtek D.** 2014. *Der Experimentator: Immunologie*. 4. Auflage. Heidelberg: Springer Spektrum, 16-19, 40.
- MacGregor L.** 2012. Internationaler Konsens. Adäquate Anwendung von Silberverbänden bei Wunden. In: *Konsens einer Expertengruppe*. London: Wounds International, 1-9.
- Mahony DE, Lim-Morrison S, Bryden L, Faulkner G, Hoffman PS, Agocs L, Briand GG, Burford N, Maguire H.** 1999. Antimicrobial Activities of Synthetic Bismuth Compounds against *Clostridium difficile*. *Antimicrob Agents Chemother*, 43(3): 582-588.
- Marti M, Frigols B, Serrano-Aroca A.** Antimicrobial Characterization of Advanced Materials of Bioengineering Applications. *J Vis Exp*, (138): 1-10.
- Masella PC, Balent EM, Carlson TL, Lee KW, Pierce LM.** 2014. Evaluation of Six Split-thickness Skin Graft Donor-site Dressing Materials in a Swine Model. *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 1(9): 1-11.
- McHugh GL, Moellering RC, Hopkins CC, Swartz MN.** 1975 *Salmonella typhimurium* resistant to silver nitrate, chloramphenicol, and ampicillin. *Lancet*, 1(7901): 235-240.
- Moll I (Hrsg.).** 2005. *Dermatologie*. 6., komplett überarbeitete und erweiterte Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 16-27.
- Myers D.** 2008. Acticoat Dressing: Wound Bed Preparation and Wound Trauma. In: *Wundmanagement Produktkatalog smith&nephew 2017*.
- Parish CR, Müllbacher A.** 1983. Automated Colorimetric Assay for T Cell Cytotoxicity. *J Immunol Methods*, 58(1-2): 225-237.
- Poeggel G.** 2009. *Kurzlehrbuch Biologie*. 2. Auflage. Stuttgart, New York: Georg Thieme Verlag, 138-141.
- Purwins S, Herberger K, Debus ES, Rustenbach SJ, Pelzer P, Rabe E, Schäfer E, Stadler R, Augustin M.** 2010. Cost-of-illness of chronic leg ulcers in Germany. *Int Wound J*, 7(2): 97-102.
- Ratner BD.** 2011. The Biocompatibility Manifesto: Biocompatibility for the Twenty-first Century. *J of Cardiovasc Trans. Res*, 4: 523-527.
- Riesner HJ, Friemert B, Lang P, Palm HG, Suda AJ.** 2017. Verändertes Keimspektrum von Komplexwunden in Deutschland durch die Behandlung von Verletzten aus Konfliktländern. *Z Orthop Unfall*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 155(03): 297-303.

- Riss TL, Moravec RA, Niles AL.** 2011. Cytotoxicity testing: measuring viable cells, dead cells, and detecting mechanism of cell death. *Methods Mol Biol*, 740: 103-114.
- Runge-Werner P, Hoffmann J, Dissemond J.** 2015. Wundfibel. Empfehlungen für die Wundtherapie am Universitätsklinikum Essen. Herne: Phadimed GmbH & Co KG, 5-25, 32-45, 59-66.
- Ryle CM, Breitzkreutz D, Stark HJ, Leigh IM, Steinert PM, Roop D, Fusenig NE.** 1989. Density-dependent modulation of synthesis of keratins 1 and 10 in the human keratinocyte line HACAT and in ras-transfected tumorigenic clones. *Differentiation*, 40(1): 42-54.
- Sachs L, Hedderich J.** 2018. *Angewandte Statistik: Methodensammlung mit R*. 16., überarbeitete und ergänzte Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 452.
- Schöfer H, Bruns R, Effendy I, Hartmann M, Jappe U, Plettenberg A, Reimann H, Seifert H, Shah P, Sunderkötter C, Weberschock T, Wichelhaus TA, Nast A.** April 2011. S2k+IDA Leitlinie: Diagnostik und Therapie *Staphylococcus aureus* bedingter Infektionen der Haut und Schleimhäute. In: AWMF online - Das Portal der wissenschaftlichen Medizin. AWMF – Register Nr. 013/038.
- Sevin BU, Peng ZL, Perras JP, Ganjei P, Penalver M, Averette HE.** 1988. Application of an ATP-bioluminescence assay in human tumor chemosensitivity testing. *Gynecol Oncol*, 31(1): 191-204.
- Seyfarth F, Schliemann S, Elsner P, Hipler UC.** 2008. Antifungal effect of high- and low-molecular-weight chitosan hydrochloride, carboxymethyl chitosan, chitosan oligosaccharide and N-acetyl-D-glucosamine against *Candida albicans*, *Candida krusei* and *Candida glabrata*. *Int J Pharm*, 353(1-2): 139-148.
- Sigel A (Hrsg.), Sigel H.** 2004. *Metal Ions in Biological Systems: Volume 41: Metal Ions and Their Complexes in Medication*. New York, Basel: Marcel Dekker Inc, 3-30.
- Silver S, Phung le T, Silver G.** 2006. Silver as biocides in burn and wound dressings and bacterial resistance to silver compounds. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 33 (7): 627-634.
- Sivestry-Rodriguez N, Sicairos-Ruelas EE, Gerba CP, Bright KR.** 2007. Silver as a Disinfectant. *Rev Environ Contam Toxicol*, 191: 23-45.
- 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.
- Smith SM, Wunder MB, Norris DA, Shellman YG.** 2011. A simple protocol for using a LDH-based cytotoxicity assay to assess the effects of death and growth inhibition at the same time. *PLoS One*, 6(11): e26908.

smith&nephew. 2017a. Packungsbeilage ACTICOAT FLEX 3 mit Silcryst Nanocrystals.

smith&nephew. 2017b. ACTICOAT FLEX 3, Nachgewiesener Schutz: Sicherer Schutz vor Infektionen mit ACTICOAT FLEX 3. Flyer.

Standard Operating Procedure/Wiegand C. 20.07.2012. Arbeitsanweisung: AATCC Test Methode 100-2004, „Assessment of Antibacterial Finishes on Textile Materials“. Universitätsklinikum Jena-Klinik für Hautkrankheiten Jena.

Standard Operating Procedure/Wiegand C. 08.08.2011. Arbeitsanweisung: Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem Interleukin-6, Mabtech Art.-Nr.: 3460- 1H- 6/3460- 1H- 20. Universitätsklinikum Jena-Klinik für Hautkrankheiten Jena.

Standard Operating Procedure/Wiegand C. 11.10.2016. Arbeitsanweisung: Enzymimmunoassay zur quantitativen Bestimmung von humanem Interleukin-8, R&DSystems Art.-Nr.: DY208 (für 15 Platten). Universitätsklinikum Jena-Klinik für Hautkrankheiten Jena.

Standard Operating Procedure/Winter D. 14.12.2010. Arbeitsanweisung: ATPLite-M, Cat. No. 6016943 300 Assay Kit, Cat. No. 6016941 1000 Assay Kit, Cat. No. 6016947 5000 Assay Kit, Perkin Elmer (Version 2002). Universitätsklinikum Jena-Klinik für Hautkrankheiten Jena.

Standard Operating Procedure/Winter D. 22.01.2016. Arbeitsanweisung: Kultivierung von HaCaT-Zellen. Universitätsklinikum Jena-Klinik für Hautkrankheiten Jena.

Standard Operating Procedure/Winter D. 17.11.2005. Arbeitsanweisung: Cytotoxicity Detection Kit (LDH), Cat. No. 1644793, Roche. Universitätsklinikum Jena-Klinik für Hautkrankheiten Jena.

Standard Operating Procedure/Winter D. 01.03.2013a. Arbeitsanweisung: Japanische Norm JIS L 1902:2002. Universitätsklinikum Jena-Klinik für Hautkrankheiten Jena.

Standard Operating Procedure/Winter D. 09.12.2011. Arbeitsanweisung: Protein-Bestimmung mittels BC Assay Protein Quantitation Kit (Uptima), Interchim, UP 40 840 A. Universitätsklinikum Jena-Klinik für Hautkrankheiten Jena.

Standard Operating Procedure/Winter D. 18.10.2013b. Arbeitsanweisung: CytoTox96®Non-Radio. Cytotoxicity Assay (LDH), Cat. #G1780, Promega. Universitätsklinikum Jena-Klinik für Hautkrankheiten Jena.

Standard Test Method of the American Association of Textile Chemists and Colorists AATCC 100-2004: Assessment of antibacterial finishes on textile materials.

Sterry W. 2011. Kurzlehrbuch Dermatologie: 94 Tabellen. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 54-56.

- Suerbaum S, Hahn H, Burchard GD, Kaufmann S HE, Schulz TF.** 2012. Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 7., überarbeitete Auflage. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 187-195, 229, 240.
- Ternes W.** 2013. Biochemie der Elemente Anorganische Chemie der biologischen Prozesse. Berlin, Heidelberg: Springer Spektrum, 330-333.
- Vallejo CG, Lagunas R.** 1970. Interferences by sulfhydryl, disulfide reagents and potassium ions on protein determination by Lowry's method. *Anal Biochem*, 36(1): 207-212.
- Voggenreiter G, Dold C.** 2004. Wundtherapie: Wunden professionell beurteilen und erfolgreich behandeln. Stuttgart, Berlin: George Thieme Verlag, 1-4.
- Walton G.** 2008. Wound Healing Study Summary Report. In: Wundmanagement Produktkatalog smith&nephew 2017.
- Wicke C, Schilling D, Feyerabend S, Königsrainer A, Stenzl A.** 2007. Pathophysiologie der Wundheilung und modernes Wundmanagement im urologischen Kontext. *Der Urologe*, Berlin: Springer Medizin, 46(12): 1721-1734.
- Wiegand C, Abel M, Ruth P, Elsner P, Hipler UC.** 2015. In vitro assessment of the antimicrobial activity of wound dressings: influence of the test method selected and impact of the pH. *J Mater Sci Mater Med*, 26(1): 5343.
- Wiegand C, Abel M, Ruth P, Hipler UC.** 2012. Analysis of the adaptation capacity of *Staphylococcus aureus* to commonly used antiseptics by microplate laser nephelometry. *Skin Pharmacol Physiol*, 25: 288-297.
- Wiegand C, Bauer M, Hipler UC, Fischer D.** 2013. Poly(ethyleneimines) in dermal applications: Biocompatibility and antimicrobial effects. *International Journal of Pharmaceutics*, 456(1): 165-174.
- Wiegand C, Fink S, Beier O, Horn K, Pfuch A, Schimanski, Grünler B, Hipler UC, Elsner P.** 2016. Dose- and Time-Dependent Cellular Effects of Cold Atmospheric Pressure Plasma Evaluated in 3D Skin Models. *Skin Pharmacol Physiol*, 29(5): 257-265.
- Wiegand C, Heinze T, Hipler UC.** 2009. Comparative in vitro study on cytotoxicity, antimicrobial activity, and binding capacity for pathophysiological factors in chronic wounds of alginate and silver-containing alginate. *Wound Rep Reg*, 17: 511-521.
- Wiegand C, Hipler UC.** 2008. Methods for the measurement of cell and tissue compatibility including tissue regeneration processes. *GMS Krankenhyg Interdiszip*, 3(1): 1-9.
- Wiegand C, Hipler UC.** 2009. Evaluation of biocompatibility and cytotoxicity using keratinocyte and fibroblast cultures. *Skin Pharmacol Physiol*, 22(2): 74-82.

- Wild T, Auböck J (Hrsg.).** 2007. Manual der Wundheilung: Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung. Wien, New York: Springer-Verlag, 1-10, 42-44, 53-62, 69-88, 99-108.
- Wild T, Wiegand C, Kamolz L.** 2016. Use of bismuth in wound care: review and case report. *Wounds International*, 7(3): 34-39.
- Williams, DF.** 1987. Definitions in biomaterials: proceedings of a consensus conference of the European Society for Biomaterials. *Progress in biomedical engineering* 4. Amsterdam, New York: Elsevier, 72-74.
- Williams, DF.** 2008. On the mechanisms of biocompatibility. *Biomaterials*. New York: Elsevier, 29(20): 2941-2953.
- Wintermantel E, Ha SW.** 2009. *Medizintechnik Life Science Engineering*. 5. Auflage. Berlin: Springer Medizin, 105, 110.
- Wright JB, Lam K, Buret AG, Olson ME, Burrell RE.** 2002. Early healing events in a porcine model of contaminated wounds: effects of nanocrystalline silver on matrix metalloproteinases, cell apoptosis, and healing. *Wound Repair Regen*, 10(3): 141-151.
- Yang N, Sun H.** 2011. Bismuth: environmental pollution and health effects. Nriagu JO (Ed.). *Encyclopedia of Environmental Health*. Burlington: Elsevier, 414-420.
- Zhou J, Yao D, Qian Z, Hou S, Li L, Jenkins ATA, Fan Y.** 2018. Bacteria-responsive intelligent wound dressing: Simultaneous In situ detection and inhibition of bacterial infection for accelerated wound healing. *Biomaterials*. New York: Elsevier, 161: 11-23.

10 Anhang

10.1 Weitere Ergebnisse der Untersuchung der Biokompatibilität

10.1.1 Ergebnisse der Wundauflage Acticoat Flex 3

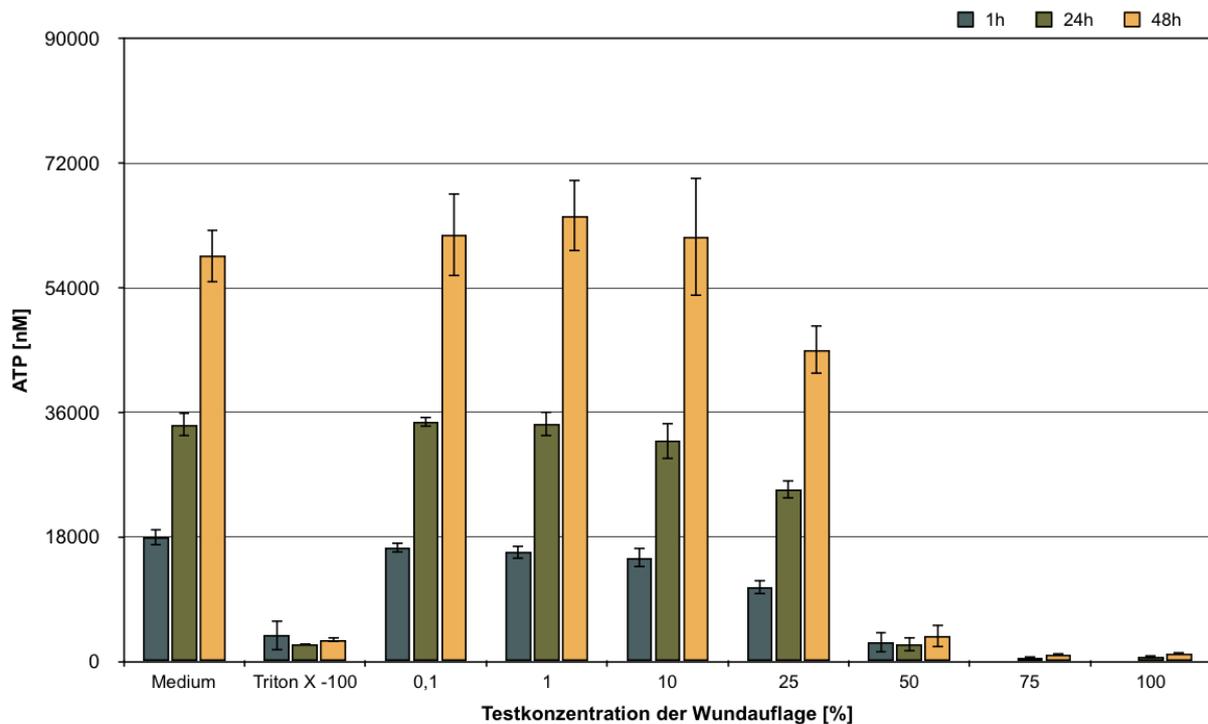


Abb. 26: Bestimmung der ATP-Konzentrationen in nM: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3

Tab. 18: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der *Zellzahl/mL* von Acticoat Flex 3 mittels der gemessenen ATP-Konzentrationen

Inkubationszeit	Regressionsgleichung $y = mx + b$
1h	$y = 0,401 \times x + 230,816$
24h	$y = 0,441 \times x - 183,605$
48h	$y = 0,441 \times x - 308,24$

y entspricht den gemessenen Units. x entspricht der ATP-Konzentration in nM.

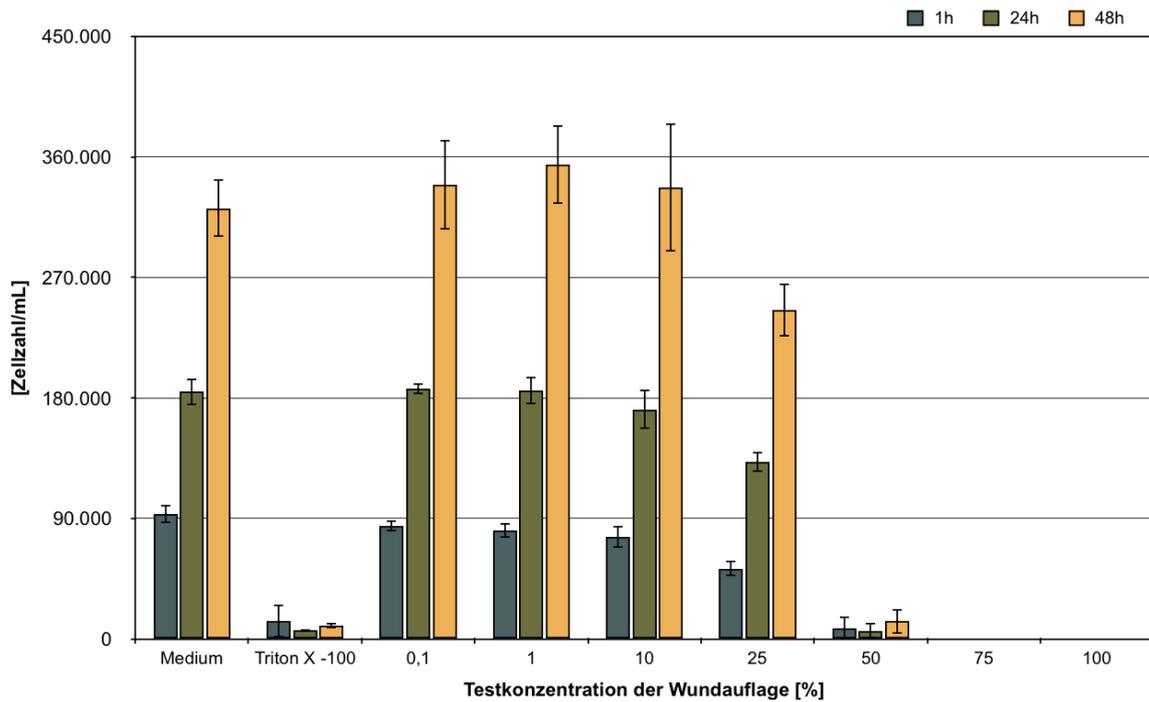


Abb. 27: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der ATP-Konzentrationen: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3

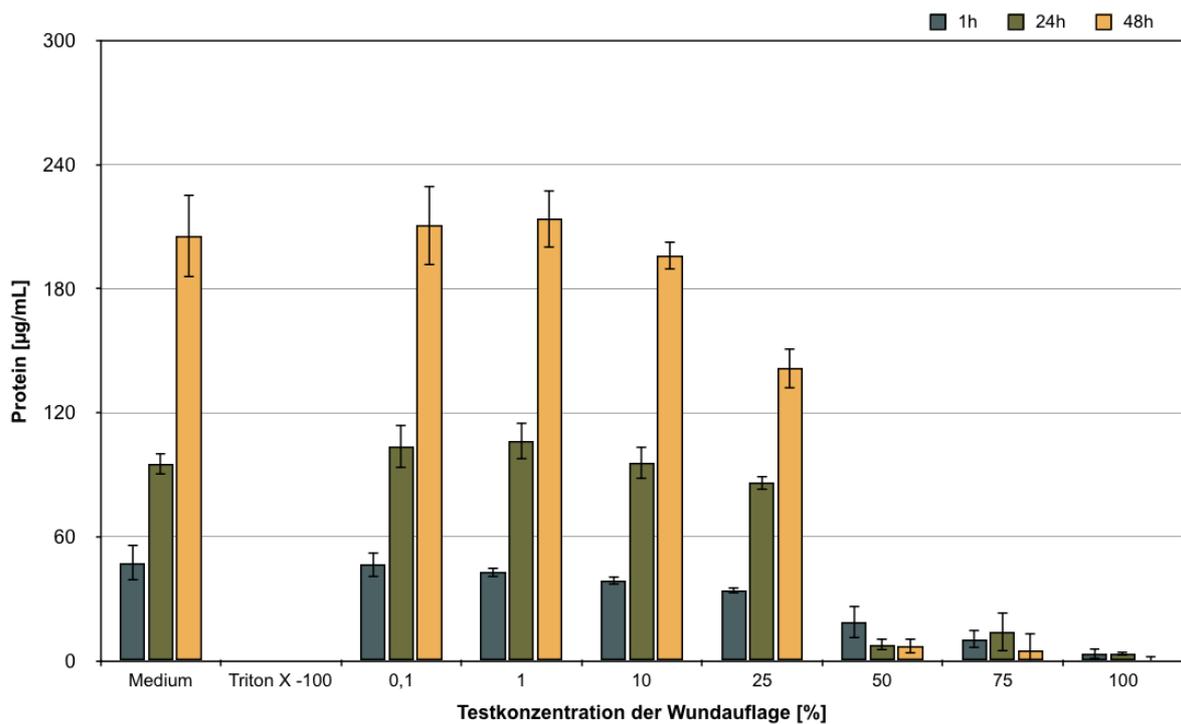


Abb. 28: Bestimmung der Protein-Konzentrationen in µg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3

Tab. 19: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der *Zellzahl/mL* von Acticoat Flex 3 mittels der gemessenen Protein-Konzentrationen

Inkubationszeit	Regressionsgleichung $y = mx + b$
1h	$y = 3,264 \times x + 16,305$
24h	$y = 3,202 \times x + 29,961$
48h	$y = 3,144 \times x + 23,737$

y entspricht den gemessenen Units. x entspricht der Protein-Konzentration in $\mu\text{g/mL}$.

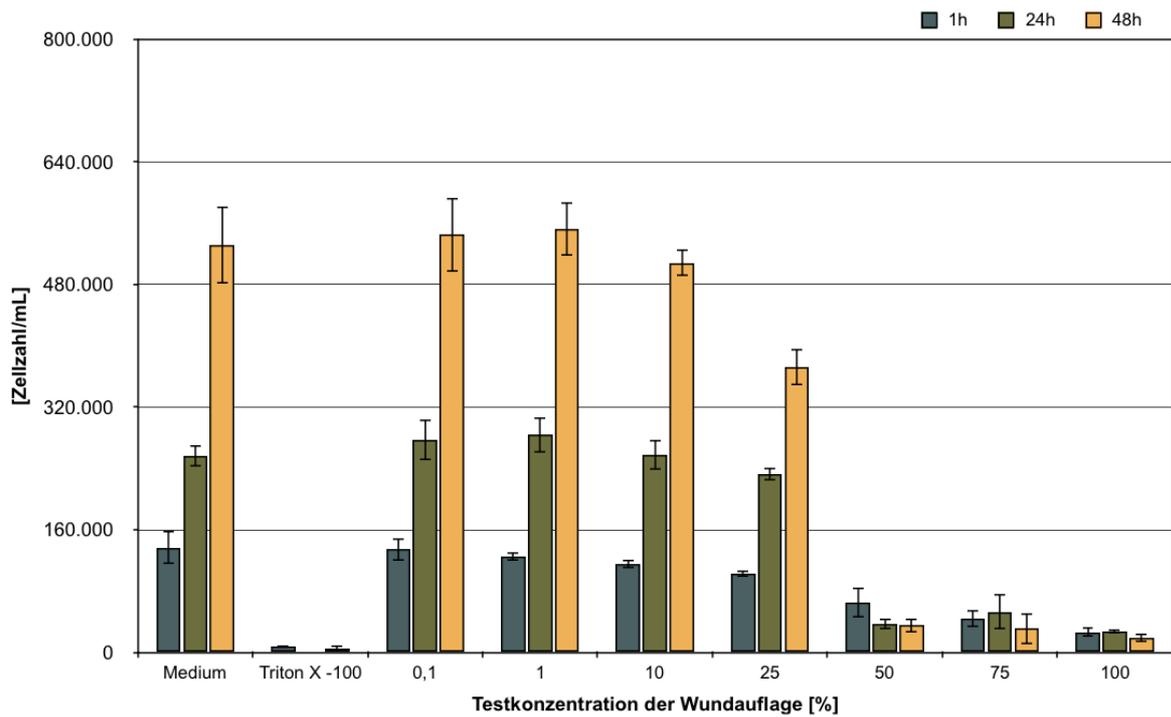


Abb. 29: Bestimmung der *Zellzahl/mL* mittels der Protein-Konzentrationen: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3

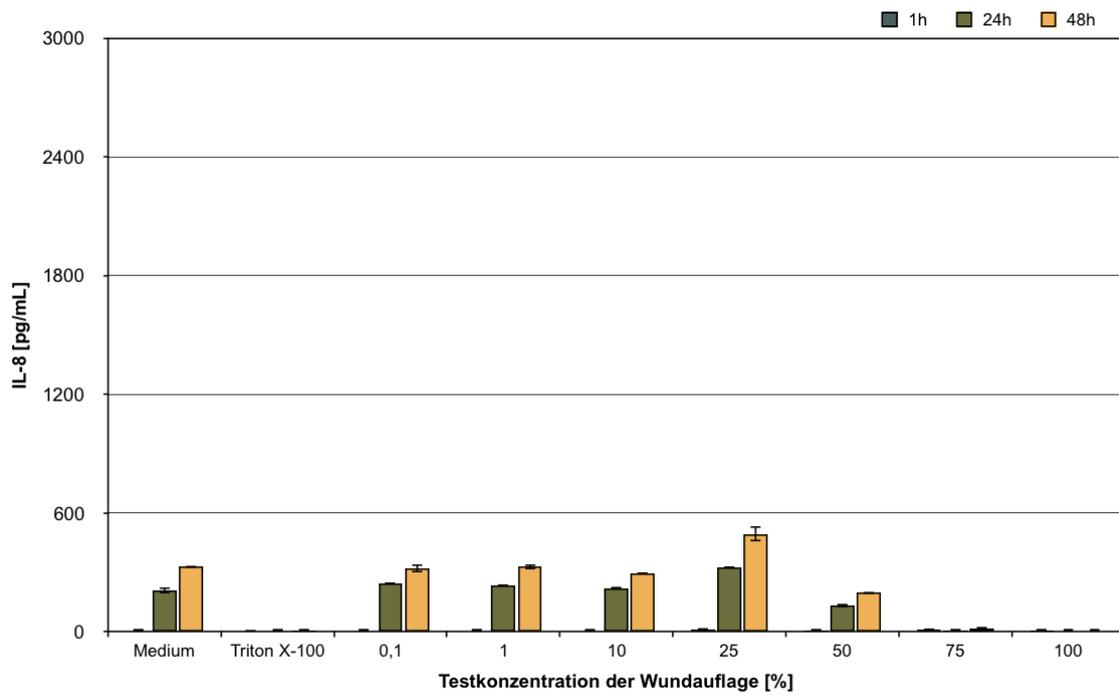


Abb. 30: Bestimmung des IL-8-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3

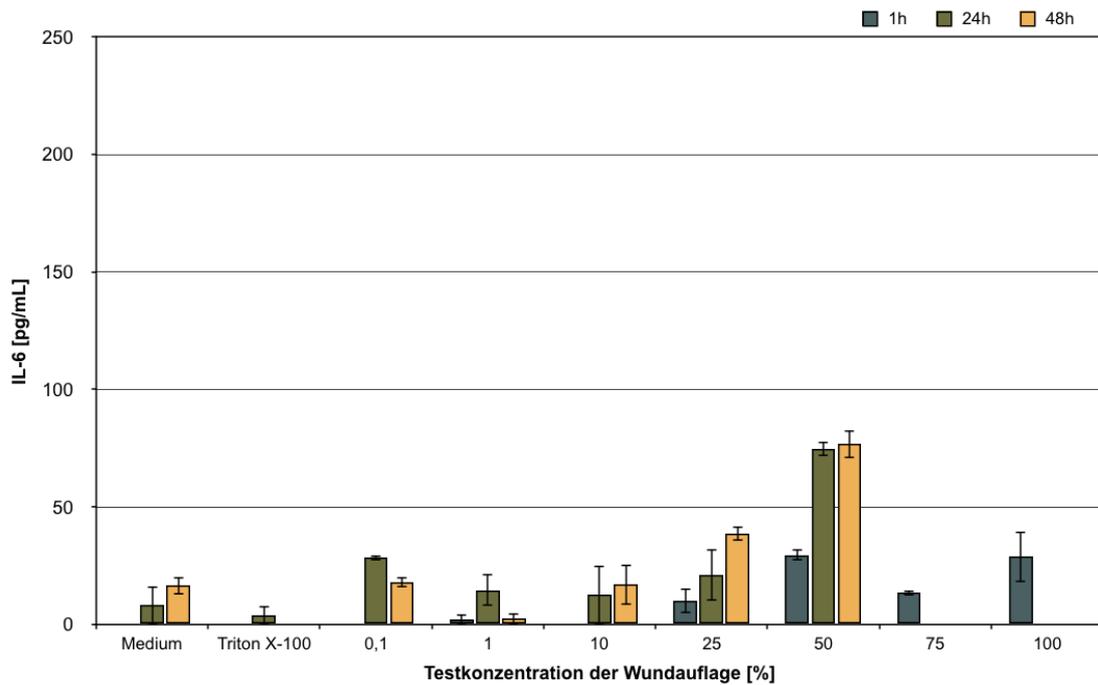


Abb. 31: Bestimmung des IL-6-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3

10.1.2 Ergebnisse der Wundauflage Xeroform® Petrolatum Dressing

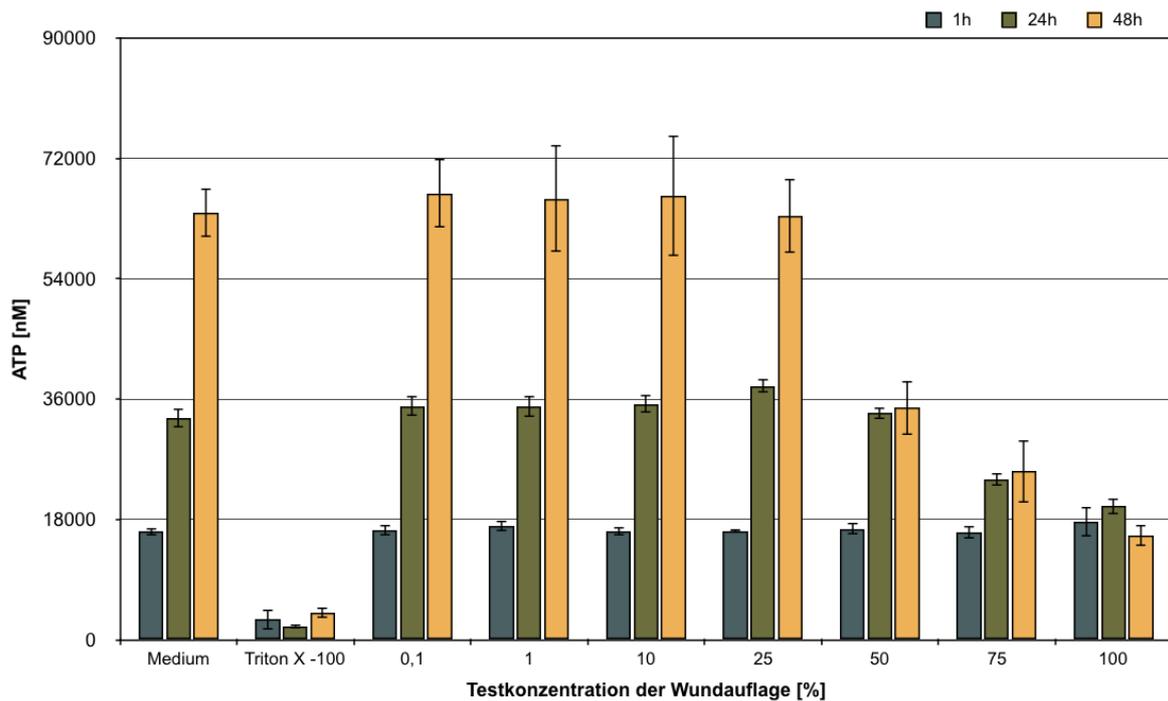


Abb. 32: Bestimmung ATP-Konzentrationen in nM: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform® Petrolatum Dressing

Tab. 20: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der *Zellzahl/mL* von Xeroform® Petrolatum Dressing mittels der gemessenen ATP-Konzentrationen

Inkubationszeit	Regressionsgleichung $y = mx + b$
1h	$y = 0,438 \times x - 254,033$
24h	$y = 0,449 \times x - 240,21$
48h	$y = 0,413 \times x - 490,606$

y entspricht den gemessenen Units. x entspricht der ATP-Konzentration in nM.

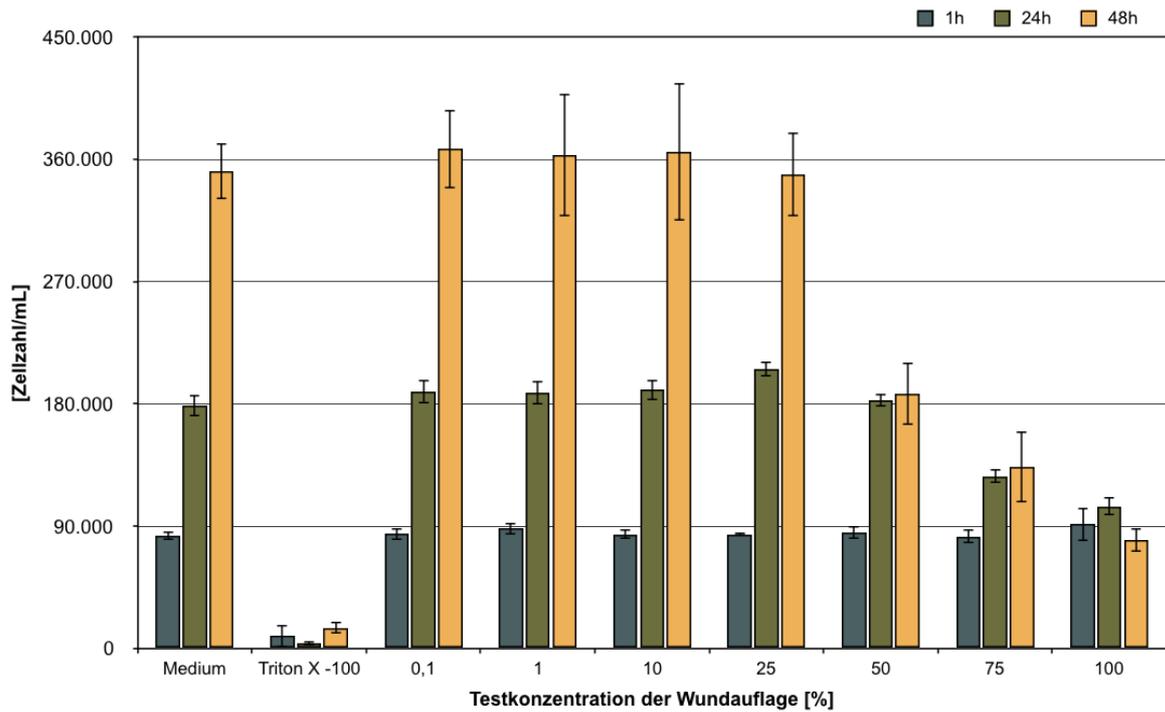


Abb. 33: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der ATP-Konzentrationen: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform® *Petrolatum Dressing*

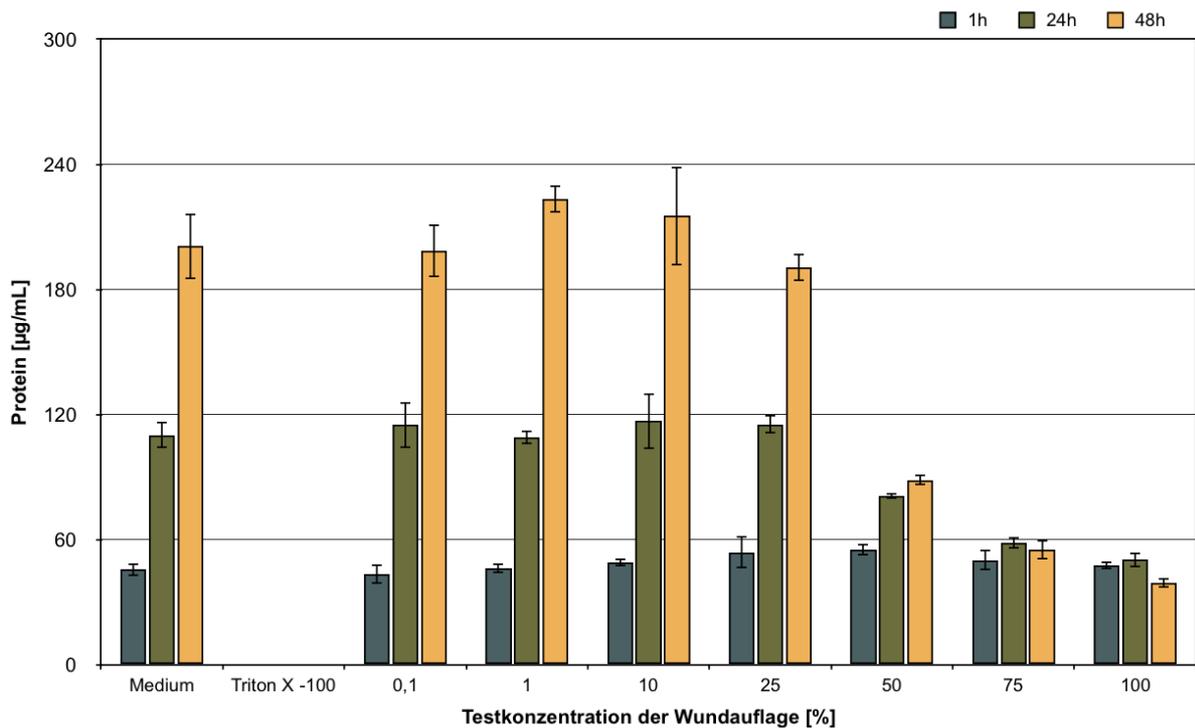


Abb. 34: Bestimmung Protein-Konzentrationen in µg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform® *Petrolatum Dressing*

Tab. 21: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der *Zellzahl/mL* von Xeroform® *Petrolatum Dressing* mittels der gemessenen Protein-Konzentrationen

Inkubationszeit	Regressionsgleichung $y = mx + b$
1h	$y = 3,255 \times x + 18,222$
24h	$y = 3,3902 \times x + 6,83$
48h	$y = 3,326 \times x + 20,04$

y entspricht den gemessenen Units. x entspricht der Protein-Konzentration in $\mu\text{g/mL}$.

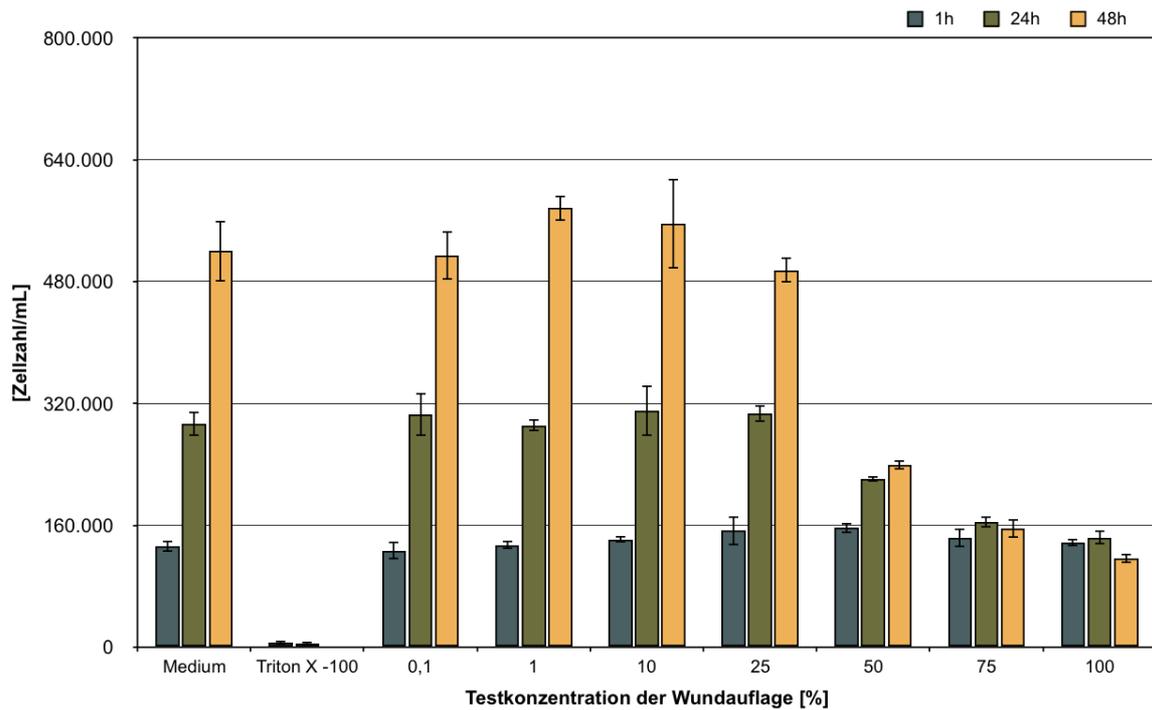


Abb. 35: Bestimmung der *Zellzahl/mL* mittels der Protein-Konzentrationen: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform® *Petrolatum Dressing*

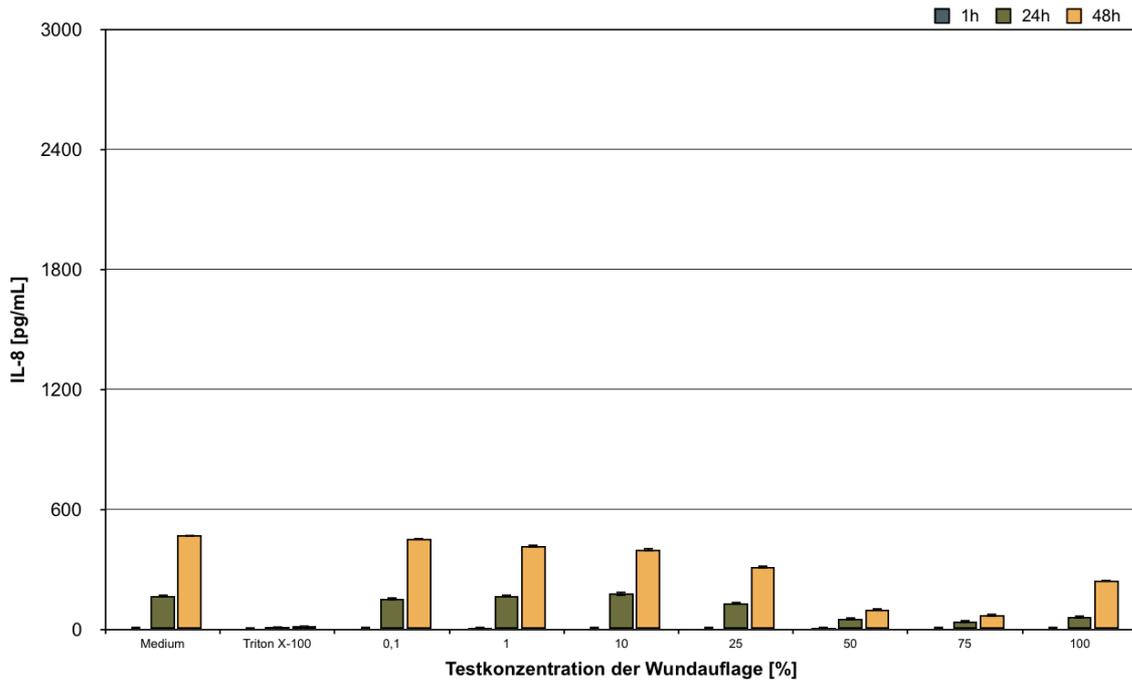


Abb. 36: Bestimmung des IL-8-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform® *Petrolatum Dressing*

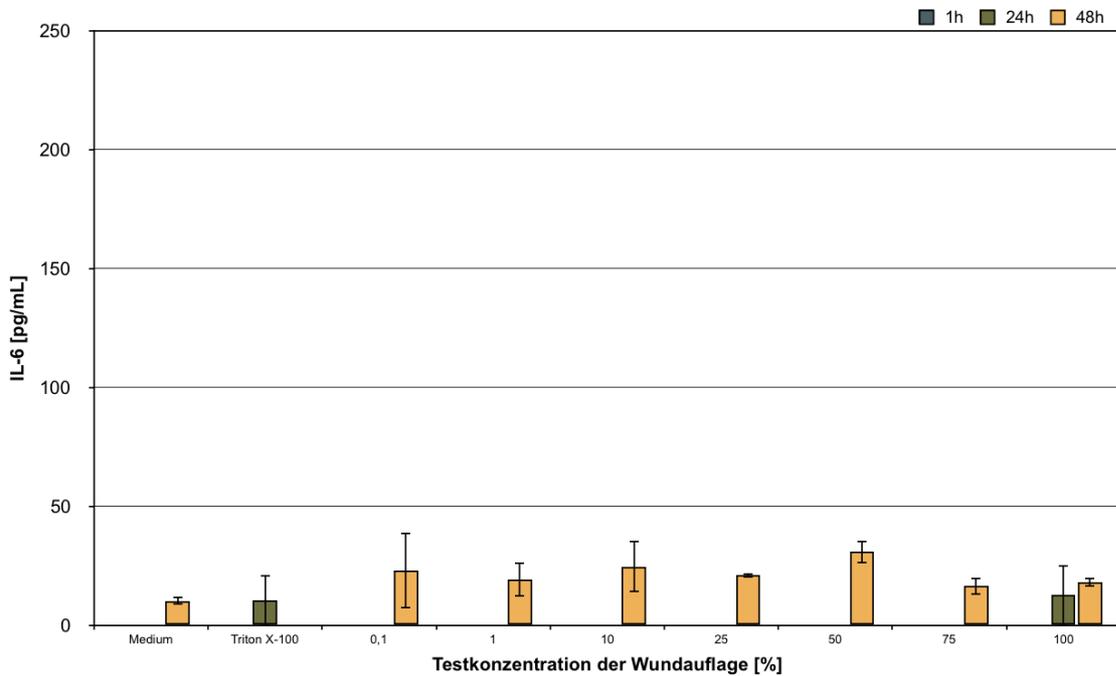


Abb. 37: Bestimmung des IL-6-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform® *Petrolatum Dressing*

10.1.3 Ergebnisse der Wundauflage Xeronet

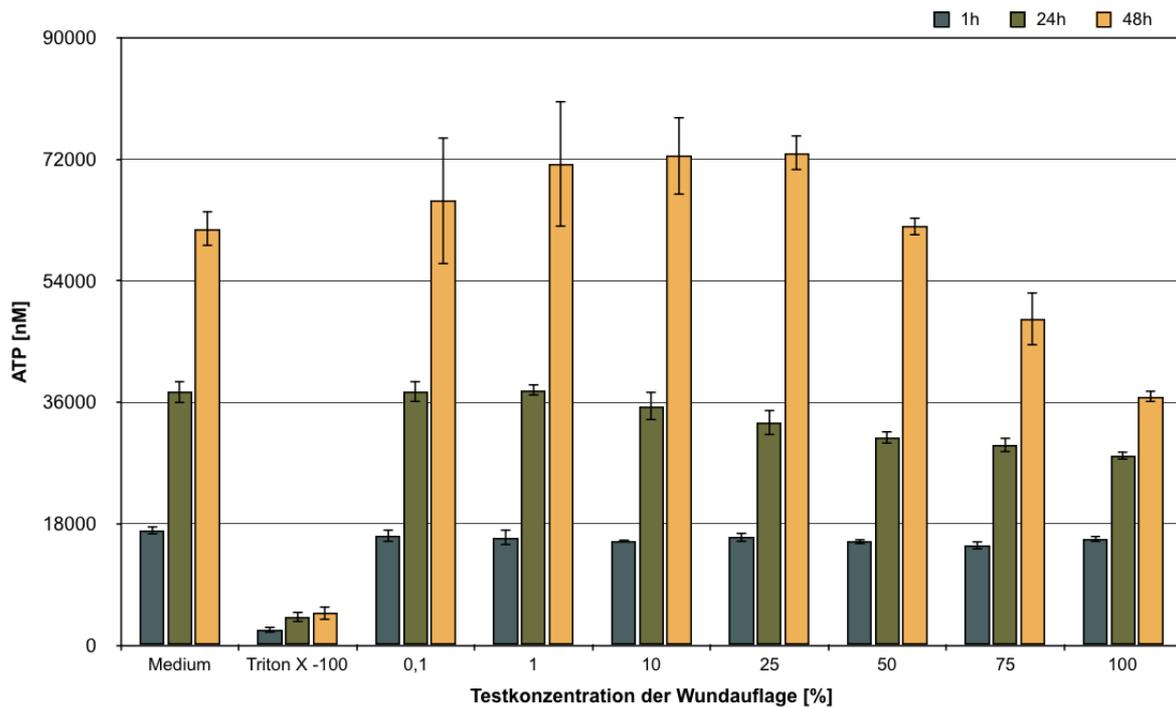


Abb. 38: Bestimmung ATP-Konzentrationen in nM: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet

Tab. 22: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der *Zellzahl/mL* von Xeronet mittels der gemessenen ATP-Konzentrationen

Inkubationszeit	Regressionsgleichung $y = mx + b$
1h	$y = 0,4 \times x - 125,129$
24h	$y = 0,467 \times x - 818,699$
48h	$y = 0,371 \times x - 689,458$

y entspricht den gemessenen Units. x entspricht der ATP-Konzentration in nM.

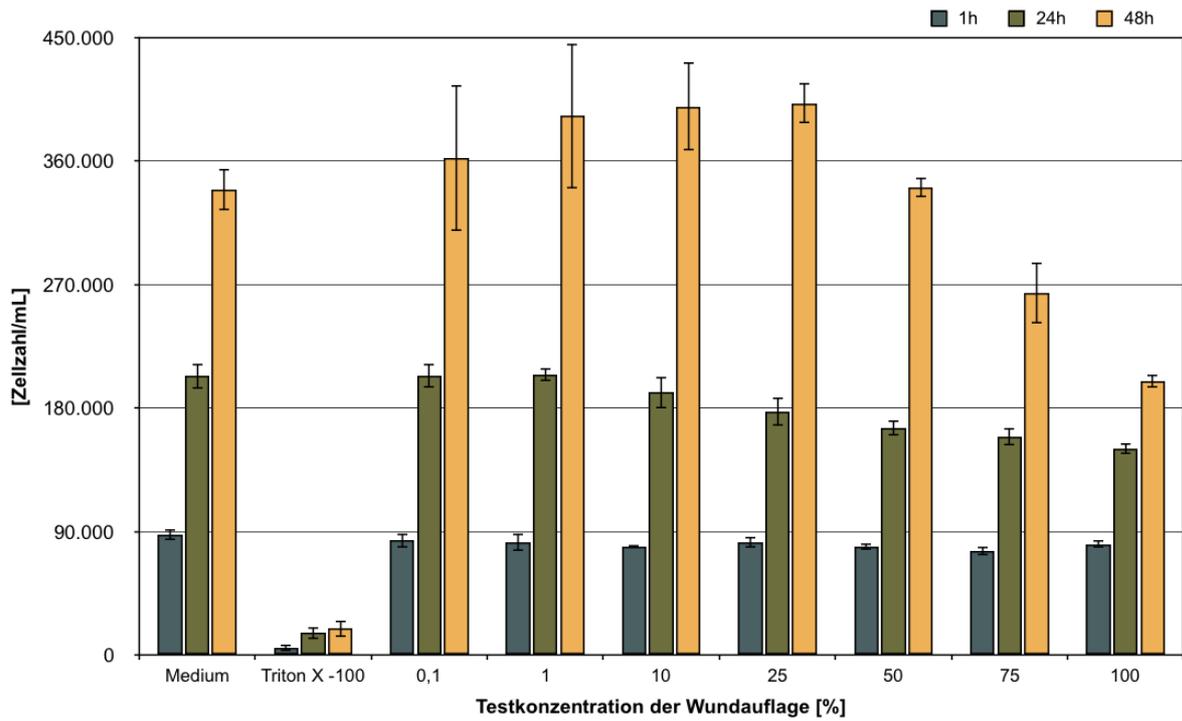


Abb. 39: Bestimmung der *Zellzahl/mL* mittels der ATP-Konzentrationen: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet

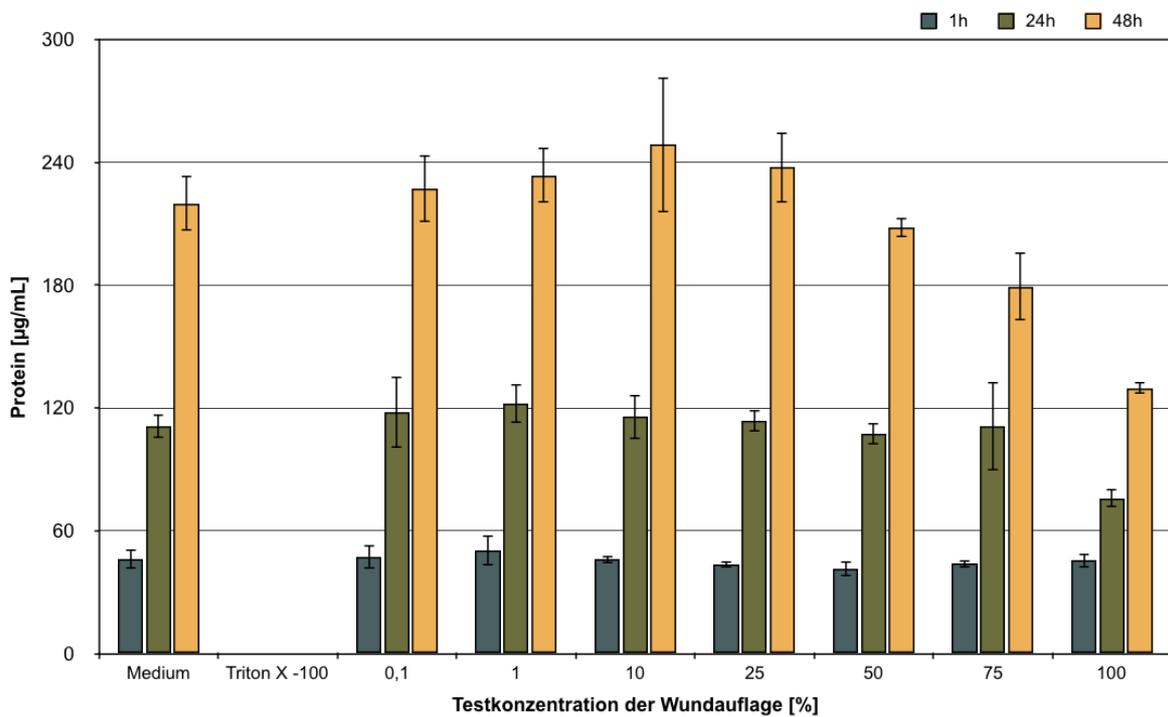


Abb. 40: Bestimmung Protein-Konzentrationen in µg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet

Tab. 23: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der *Zellzahl/mL* von Xeronet mittels der gemessenen Protein-Konzentrationen

Inkubationszeit	Regressionsgleichung $y = mx + b$
1h	$y = 3,475 \times x + 19,921$
24h	$y = 3,318 \times x + 12,158$
48h	$y = 3,299 \times x + 10,106$

y entspricht den gemessenen Units. x entspricht der Protein-Konzentration in $\mu\text{g/mL}$.

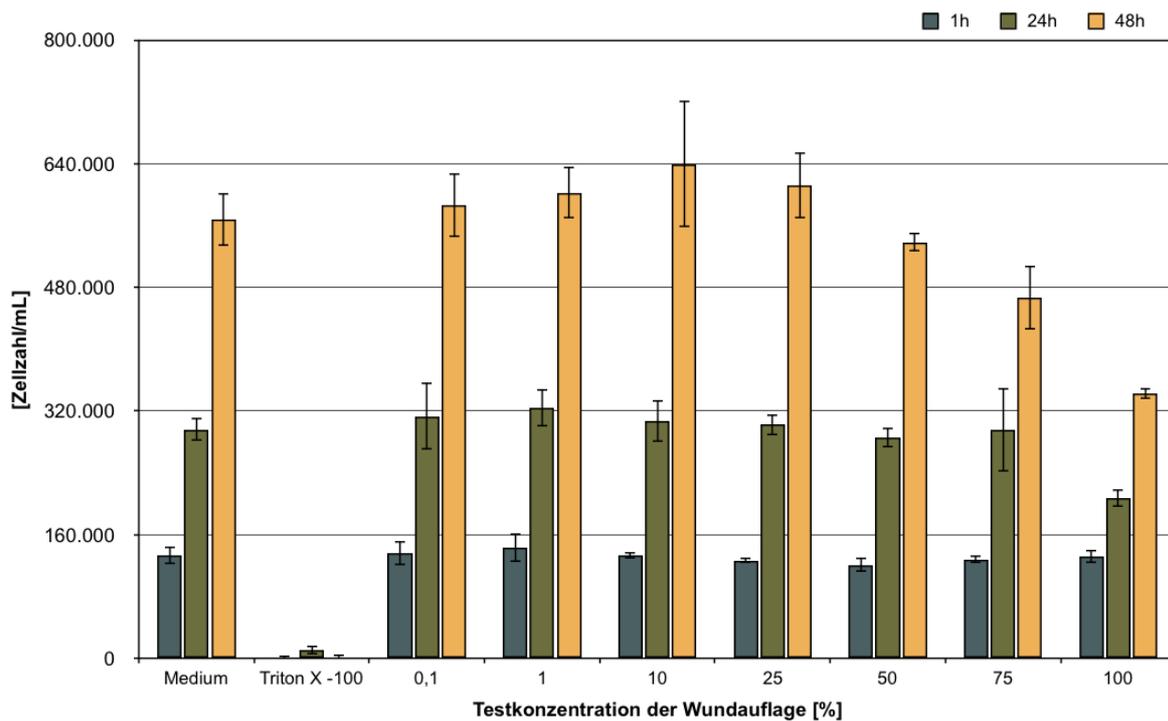


Abb. 41: Bestimmung der *Zellzahl/mL* mittels der Protein-Konzentrationen: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet

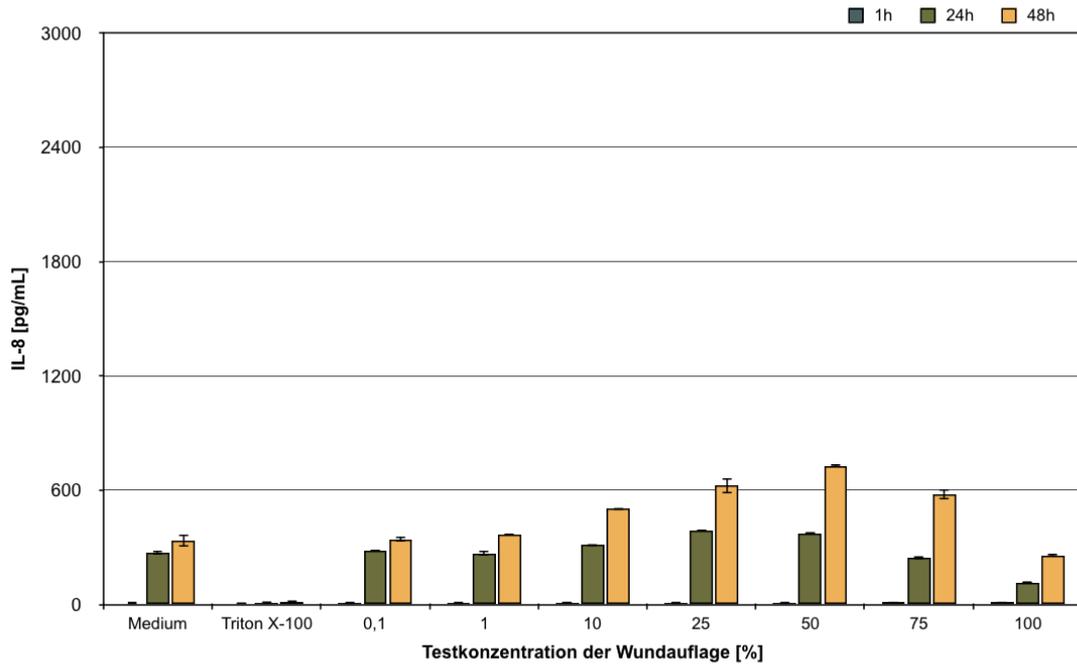


Abb. 42: Bestimmung des IL-8-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet

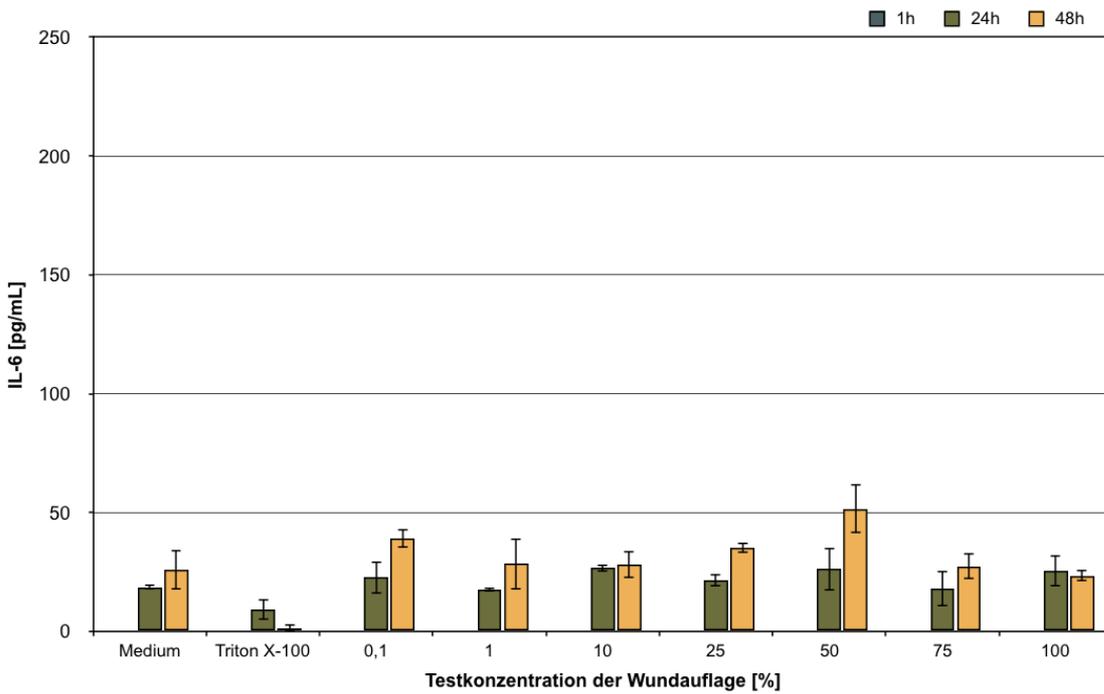


Abb. 43: Bestimmung des IL-6-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet

10.1.4 Ergebnisse des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat

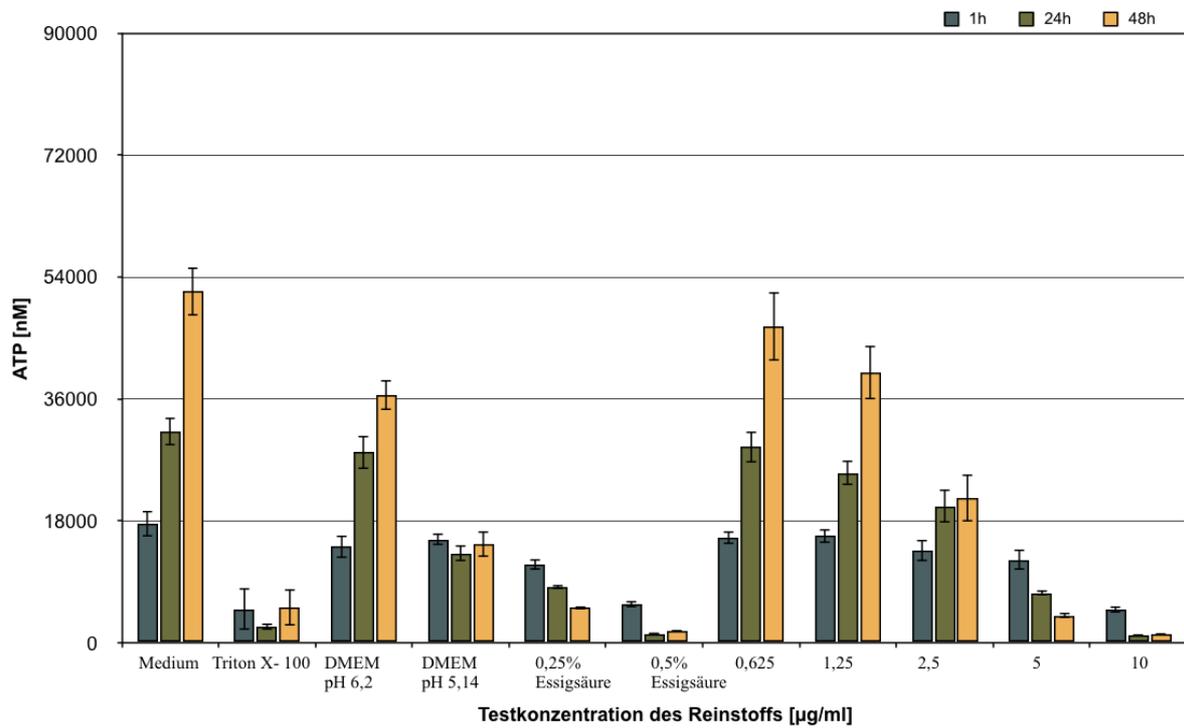


Abb. 44: Bestimmung der ATP-Konzentrationen in nM: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat

Tab. 24: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der *Zellzahl/mL* des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat mittels der gemessenen ATP-Konzentrationen

Inkubationszeit	Regressionsgleichung $y = mx + b$
1h	$y = 0,451 \times x - 123,427$
24h	$y = 0,56 \times x - 547,306$
48h	$y = 0,6 \times x - 907,626$

y entspricht den gemessenen Units. x entspricht der ATP-Konzentration in nM des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat

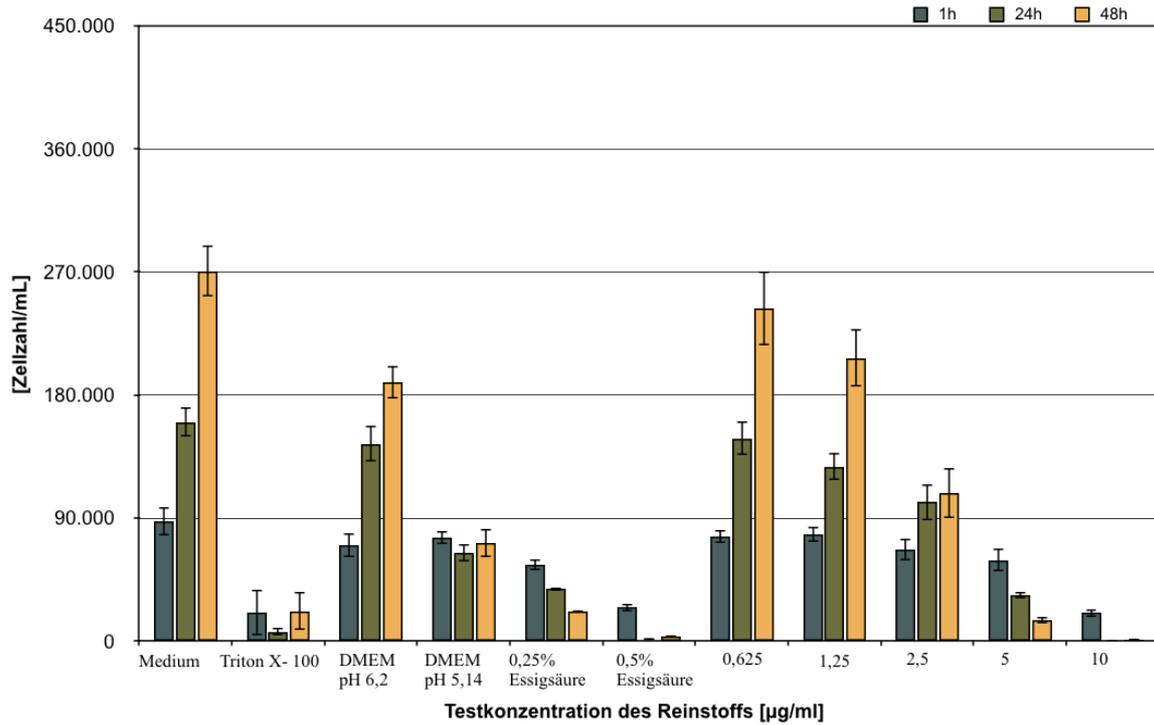


Abb. 45: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der ATP-Konzentrationen: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat

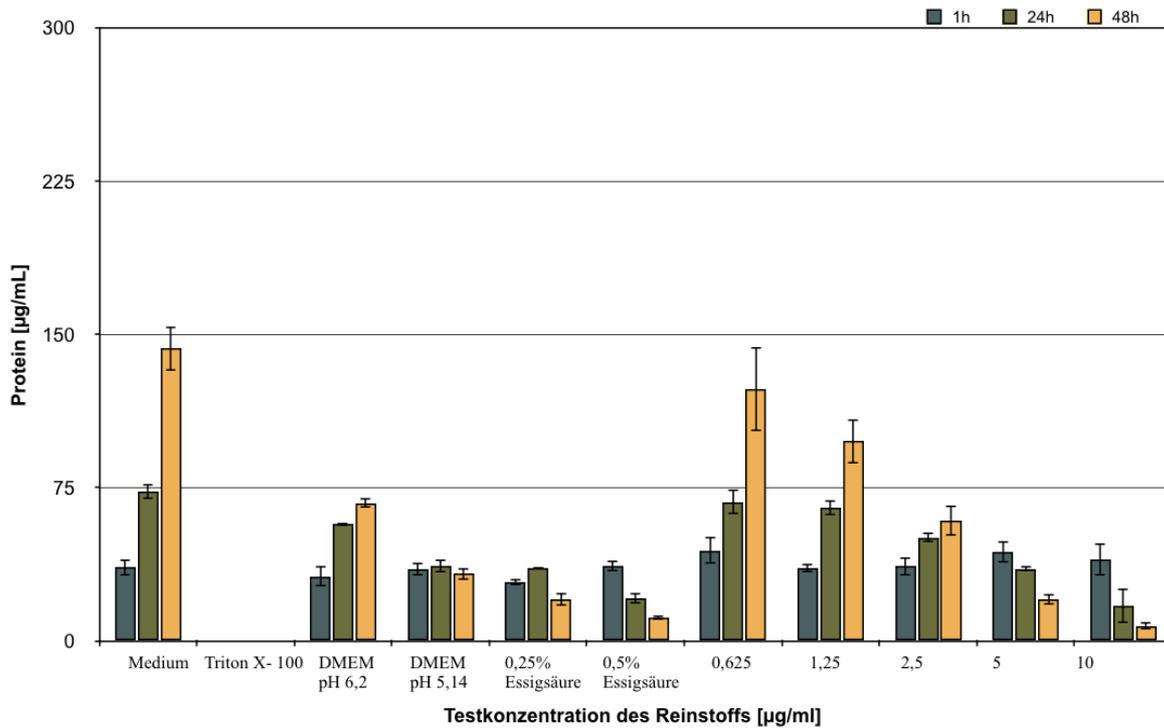


Abb. 46: Bestimmung der Protein-Konzentrationen in µg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat

Tab. 25: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der *Zellzahl/mL* des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat mittels der gemessenen Protein-Konzentrationen

Inkubationszeit	Regressionsgleichung $y = mx + b$
1h	$y = 3,505 \times x + 26,806$
24h	$y = 3,548 \times x + 17,449$
48h	$y = 3,492 \times x + 30,189$

y entspricht den gemessenen Units. x entspricht der Protein-Konzentration in $\mu\text{g/mL}$ Reinstoffes Bismuth Tribromophenat

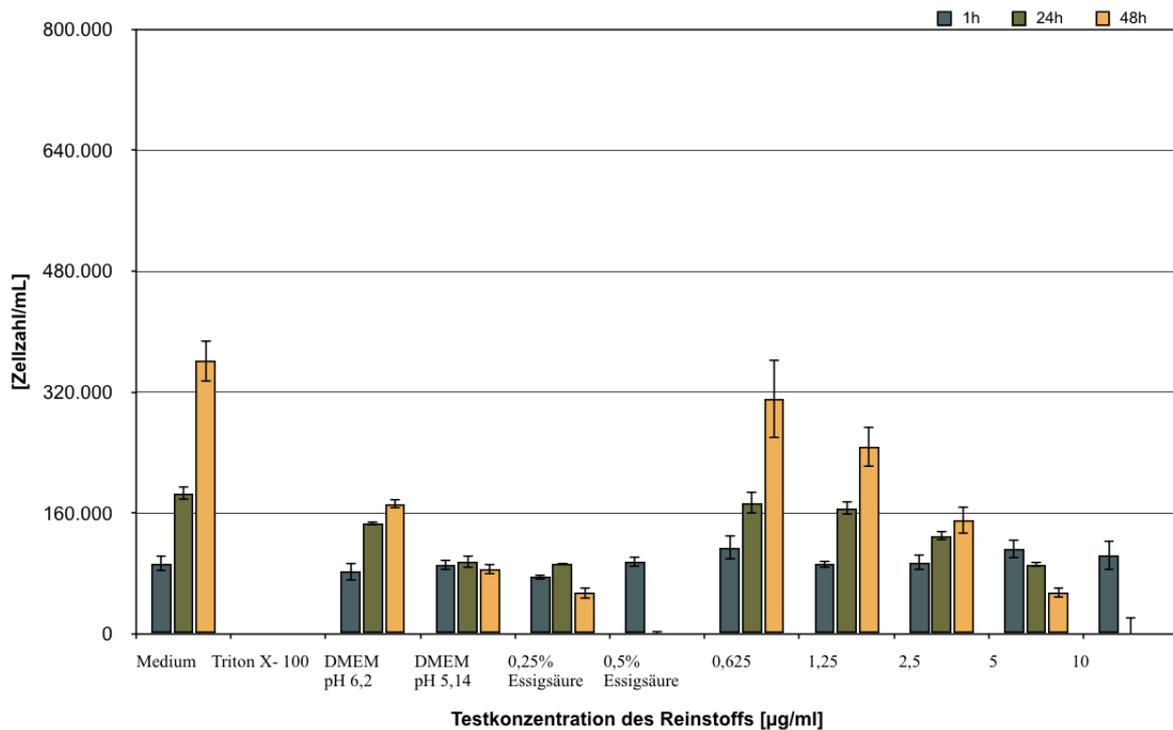


Abb. 47: Bestimmung der *Zellzahl/mL* mittels der Protein-Konzentrationen: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat

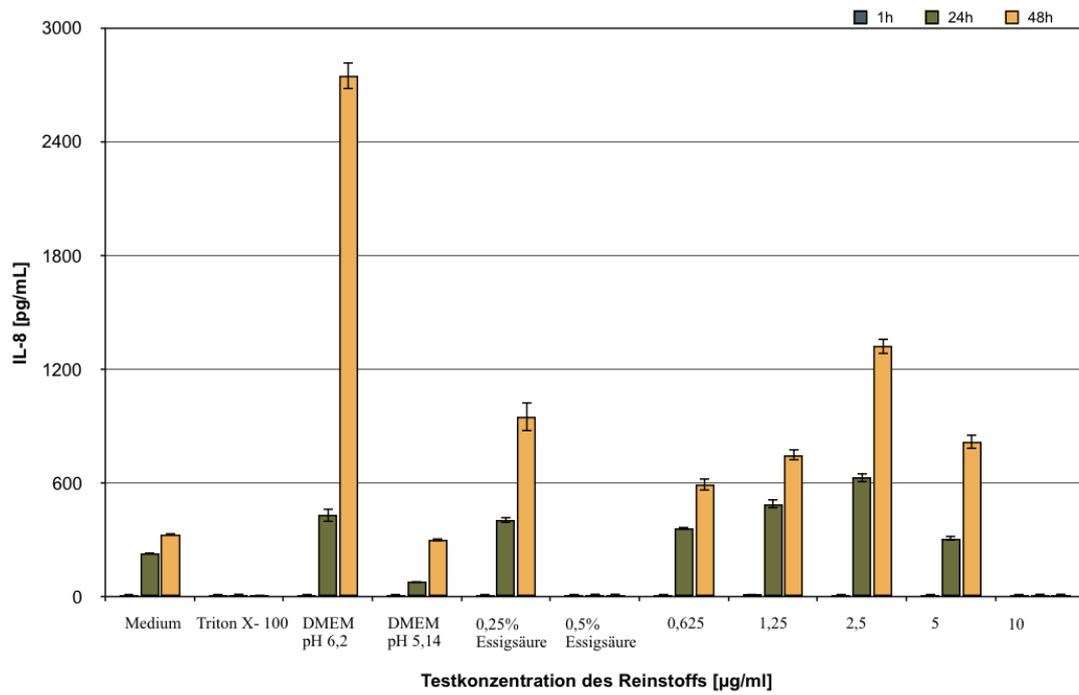


Abb. 48: Bestimmung des IL-8-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat

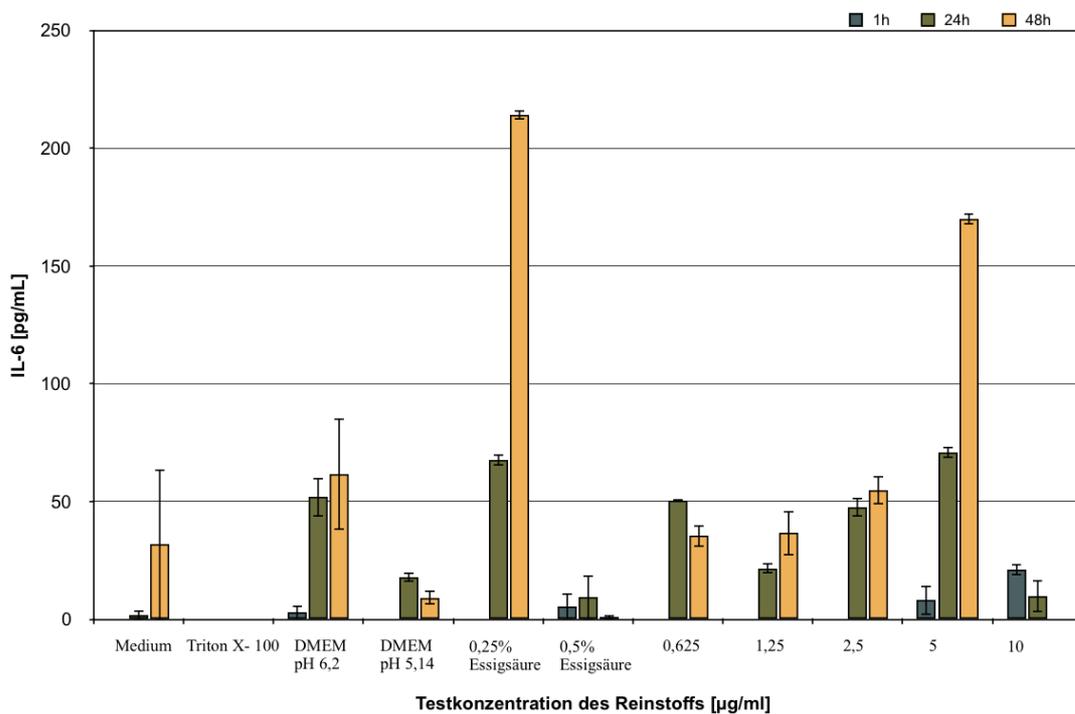


Abb. 49: Bestimmung des IL-6-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der *HaCaT*-Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat

10.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Foto der Wundauflage Acticoat Flex 3 mit SILCRYST Nanocrystals.....	22
Abb. 2: Foto der Wundauflage Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i>	23
Abb. 3: Foto der Wundauflage Xeronet	23
Abb. 4: Testprinzip des LDH-Nachweises (SOP/Winter 2005 und SOP/Winter 2013b).	47
Abb. 5: Bestimmung der Zellzahl in % mittels Bestimmung der ATP-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Acticoat Flex 3 bis zur Zellzahl von 70% ..	63
Abb. 6: Bestimmung der Zellzahl in % mittels Bestimmung der Protein-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Acticoat Flex 3 bis zur Zellzahl von 70% ..	64
Abb. 7: Untersuchung der Zytotoxizität in %: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Acticoat Flex 3 ab der Zytotoxizität von 30%	64
Abb. 8: Bestimmung der Zellzahl in % mittels Bestimmung der ATP-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i> bis zur Zellzahl von 70%.....	65
Abb. 9: Bestimmung der Zellzahl in % mittels Bestimmung der Protein-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i> bis zur Zellzahl von 70%.....	66
Abb. 10: Untersuchung der Zytotoxizität in %: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i> ab der Zytotoxizität von 30%.....	67
Abb. 11: Bestimmung der Zellzahl in % mittels Bestimmung der ATP-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeronet bis zur Zellzahl von 70%.....	68
Abb. 12: Bestimmung der Zellzahl in % mittels Bestimmung der Protein-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeronet bis zur Zellzahl von 70%.....	68
Abb. 13: Untersuchung der Zytotoxizität in %: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes von Xeronet ab der Zytotoxizität von 30%.....	69
Abb. 14: Bestimmung der Zellzahl in % mittels Bestimmung der ATP-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat bis zur Zellzahl von 70%	71
Abb. 15: Bestimmung der LC ₅₀ mit 2,97µg/mL Reinstoff.....	72
Abb. 16: Bestimmung der Zellzahl in % mittels Bestimmung der Protein-Konzentrationen: zytotoxischer Effekt des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat bis zur Zellzahl von 70%	72
Abb. 17: Untersuchung der Zytotoxizität in %: zytotoxischer Effekt des 24h-Extraktes des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat ab der Zytotoxizität von 30%.....	73

Abb. 18: Untersuchung des mikrobiellen Wachstums in %: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger <i>Staphylococcus aureus</i>	75
Abb. 19: Untersuchung der antibakteriellen Gesamtaktivität: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger <i>Staphylococcus aureus</i>	76
Abb. 20: Untersuchung des mikrobiellen Wachstums in %: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger <i>Klebsiella pneumoniae</i>	77
Abb. 21: Untersuchung der antibakteriellen Gesamtaktivität: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger <i>Klebsiella pneumoniae</i>	78
Abb. 22: Untersuchung des Keimwachstums in KBE: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger <i>Staphylococcus aureus</i>	79
Abb. 23: Untersuchung der Keimreduktion in %: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger <i>Staphylococcus aureus</i>	80
Abb. 24: Untersuchung des Keimwachstums in KBE: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger <i>Klebsiella pneumoniae</i>	81
Abb. 25: Untersuchung der Keimreduktion in %: Wechselwirkung der drei Wundauflagen mit dem Erreger <i>Klebsiella pneumoniae</i>	82
Abb. 26: Bestimmung der ATP-Konzentrationen in nM: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3.....	106
Abb. 27: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der ATP-Konzentrationen: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3	107
Abb. 28: Bestimmung der Protein-Konzentrationen in µg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3.....	107
Abb. 29: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der Protein-Konzentrationen: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3	108
Abb. 30: Bestimmung des IL-8-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3.....	109
Abb. 31: Bestimmung des IL-6-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Acticoat Flex 3.....	109
Abb. 32: Bestimmung ATP-Konzentrationen in nM: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform® <i>Petrolatum Dressing</i>	110
Abb. 33: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der ATP-Konzentrationen: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform® <i>Petrolatum Dressing</i>	111
Abb. 34: Bestimmung Protein-Konzentrationen in µg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform® <i>Petrolatum Dressing</i>	111

Abb. 35: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der Protein-Konzentrationen: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i>	112
Abb. 36: Bestimmung des IL-8-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i>	113
Abb. 37: Bestimmung des IL-6-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i>	113
Abb. 38: Bestimmung ATP-Konzentrationen in nM: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet	114
Abb. 39: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der ATP-Konzentrationen: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet	115
Abb. 40: Bestimmung Protein-Konzentrationen in µg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet	115
Abb. 41: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der Protein-Konzentrationen: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet	116
Abb. 42: Bestimmung des IL-8-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet	117
Abb. 43: Bestimmung des IL-6-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem 24h-Extrakt von Xeronet	117
Abb. 44: Bestimmung der ATP-Konzentrationen in nM: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat	118
Abb. 45: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der ATP-Konzentrationen: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat	119
Abb. 46: Bestimmung der Protein-Konzentrationen in µg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat	119
Abb. 47: Bestimmung der Zellzahl/mL mittels der Protein-Konzentrationen: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat	120
Abb. 48: Bestimmung des IL-8-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat	121
Abb. 49: Bestimmung des IL-6-Gehaltes in pg/mL: Wechselwirkung der <i>HaCaT</i> -Zellen mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat	121

10.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Ausgewählte Faktoren für eine gestörte Wundheilung	14
Tab. 2: Behandlungsoptionen des <i>M.O.I.S.T.</i> Konzeptes	17
Tab. 3: Layout einer Mikrotiterplatte	37
Tab. 4: Extraktverdünnung	39
Tab. 5: Layout der zu beschickenden Mikrotiterplatte mit den Testkonzentrationen der Wundauflagen.....	40
Tab. 6: Herstellung der Konzentrationen des Reinstoffes Bismuth Tribromophenat	41
Tab. 7: Layout der zu beschickenden Mikrotiterplatte mit dem Reinstoff Bismuth Tribromophenat	42
Tab. 8: Herstellung der ATP-Standardkurve	43
Tab. 9: Herstellung der Protein-Standardkurve	45
Tab. 10: Übersicht der Zytotoxizitätsgleichungen für Acticoat Flex 3	48
Tab. 11: Übersicht der Zytotoxizitätsgleichungen für Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i>	49
Tab. 12: Übersicht der Zytotoxizitätsgleichungen für Xeronet	49
Tab. 13: Übersicht der Zytotoxizitätsgleichungen für den Reinstoff Bismuth Tribromophenat	49
Tab. 14: Herstellung der Verdünnungsreihe der Polyester 0h-Wert Kontrollen	52
Tab. 15: Herstellung der Verdünnungsreihe der Polyester 18h-Wert Kontrollen	54
Tab. 16: Beurteilungskriterien der antibakteriellen Gesamtaktivität	74
Tab. 17: Beurteilungskriterien der Keimreduktion in %	78
Tab. 18: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der Zellzahl/mL von Acticoat Flex 3 mittels der gemessenen ATP-Konzentrationen	106
Tab. 19: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der Zellzahl/mL von Acticoat Flex 3 mittels der gemessenen Protein-Konzentrationen.....	108
Tab. 20: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der Zellzahl/mL von Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i> mittels der gemessenen ATP-Konzentrationen	110
Tab. 21: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der Zellzahl/mL von Xeroform ® <i>Petrolatum Dressing</i> mittels der gemessenen Protein-Konzentrationen ...	112
Tab. 22: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der Zellzahl/mL von Xeronet mittels der gemessenen ATP-Konzentrationen	114
Tab. 23: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der Zellzahl/mL von Xeronet mittels der gemessenen Protein-Konzentrationen	116

Tab. 24: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der Zellzahl/mL des
Reinstoffes Bismuth Tribromophenat mittels der gemessenen ATP-Konzentrationen..118

Tab. 25: Übersicht der Regressionsgleichungen zur Berechnung der Zellzahl/mL des
Reinstoffes Bismuth Tribromophenat mittels der gemessenen Protein-Konzentrationen
.....120

10.4 Lebenslauf

Aufgrund der vorgeschriebenen Datenschutzrichtlinien wurde der Lebenslauf entfernt.

10.5 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei all den Menschen bedanken, die mich beim Gelingen meiner Arbeit begleitet, geprägt und unterstützt haben.

Mein Dank gilt meiner Doktormutter PD Dr. rer. nat. et med. habil. Uta-Christina Hipler für die Bereitstellung des Themenkomplexes, die wissenschaftliche Betreuung und die kontinuierlichen sowie geduldigen Rücksprachen. Nach jedem gemeinsamen Gespräch strotzte ich vor Motivation und Ehrgeiz, diese Arbeit erfolgreich abzuschließen.

Ich bedanke mich beim Team des Labors der Hautklinik in Jena für die nette Arbeitsatmosphäre und Unterstützung bei der Durchführung meiner Tests. Besonderer Dank gilt hierbei Frau Doreen Winter und Martina Grebner, die bei allen Labortätigkeiten an meiner Seite waren, mich in den Umgang mit den Labormaterialien einwiesen und mich bei allen Arbeitsschritten tatkräftig unterstützten.

Auch meinen Eltern Dres. Kerstin und Jürgen Veltman danke ich für die großzügige Unterstützung und die liebevolle Motivation, die mein Studium und diese Arbeit ermöglicht haben. Auch für das mühevollen Korrekturlesen der Dissertation in ihrer freien Zeit möchte ich mich bedanken. Ohne sie wäre ich niemals so weit gekommen.

10.6 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben:.....,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift