

Aus der berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen

Klinik für Unfallchirurgie

Ärztlicher Direktor : Professor Dr. K. Weise

**Einfluss von thrombocytären Wachstumsfaktoren,
einer Keimsuspension mit S. Aureus und Antiproteasen
auf das Wachstumsverhalten von Fibroblasten in der
Zellkultur**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Patrick Michael Enno Holl

aus

Heilbronn

2006

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	
2. Material und Methoden	
2.1 Studiendurchführung.....	
2.2 Zellen und Keime.....	
2.3 Laborausstattung und Material.....	
2.4 Kulturmedien, Wundexsudat, Antiproteasen, Bakterienbouillon.....	
2.4.1 Dulbecco´s modified Eagle Medium (DMEM).....	
2.4.2 PBS ⁻ Puffer (Phosphate Buffered Saline).....	
2.4.3 Wundexsudat.....	
2.4.4 Aprotinin (Trasylol®).....	
2.4.5 Pepstatin A (Isovaleryl-Val-Val-Ala-Sta).....	
2.4.6 α_1 – Antitrypsin.....	
2.4.7 Erythromycin	
2.4.8 Bakterienbouillon.....	
2.5 Gewinnung der autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung	
2.5.1 Gewinnung der Thrombozyten.....	
2.5.2 Thrombozytendegranulation.....	
2.6 Grundlagen der Fibroblastenkultur in vitro.....	
2.6.1 Einfrieren von Fibroblasten.....	
2.6.2 Auftauen von Fibroblasten.....	
2.6.3 DAPI Routinefärbung.....	
2.6.4 Zellen trypsinieren, Zellzahlbestimmung.....	
2.6.5 Zellen aussähen.....	
2.7 Datenauswertung und Statistik.....	

3. Ergebnisse	
3.1 aseptische Versuche	
3.1.1 Einfluss der Wachstumsfaktorenlösung auf in vitro kultivierte Fibroblasten	
3.1.2 Einfluss von Wundexsudat auf in vitro kultivierte Fibroblasten..	
3.1.3 Wirkung von Wachstumsfaktoren in Kombination mit Wundexsudat auf in vitro kultivierte Fibroblasten.....	
3.2. septische Versuche	
3.2.1 Einfluss von Keimsuspensionen, Erythromycin auf in vitro kultivierte Fibroblasten.....	
3.2.2 Einfluss von Aprotinin, Wachstumsfaktoren und Keimlösungen auf in vitro kultivierte Fibroblasten.....	
3.2.3 Einfluss von Aprotinin in Kombination mit Wachstumsfaktoren sowie Keimlösungen auf in vitro kultivierte Fibroblasten.....	
3.2.4 Einfluss von Antitrypsin in Kombination mit Wachstumsfaktoren sowie Keimlösungen auf in vitro kultivierte Fibroblasten.....	
3.2.5 Einfluss von Pepstatin A in Kombination mit Wachstumsfaktoren sowie Keimlösungen auf in vitro kultivierte Fibroblasten.....	
3.3 Komplikationen.....	
4. Diskussion.....	
5. Zusammenfassung.....	
6. Literaturverzeichnis.....	
7. Anhang.....	

KAPITEL 1

Einleitung

Seit langem beschäftigt sich die Medizin und speziell die Chirurgie mit dem Problem chronischer Wunden.

Schon seit Alters her gab es die verschiedensten Ansätze, Wunden und zum schneller und besser zum abheilen zu lassen.

Noch bis vor wenigen Jahrhunderten galt die Hauptaufmerksamkeit den akuten Wunden, den die durchschnittliche Lebenserwartung eines Menschen war kaum ausreichend, auch nur an chronische Wunden der verschiedensten Ursachen zu denken.

Dieser Fakt hat sich nun in den letzten 100 Jahren ganz grundlegend gewandelt. Mit Ansteigen der Lebenserwartung auf Durchschnittswerte bis 80 Jahre, tauchte das Problem chronischer Wunden, vor allem der unteren Extremitäten auf.

Ursächlich fanden sich schnell chronisch venöse Insuffizienz, Diabetes mellitus und arterielle Verschlusskrankheit, um nur die häufigsten zu nennen.

An einer aus medizinischer Sicht zufriedenstellenden Lösung des Problems „chronische Wunde“ wird seit Jahren mit Ehrgeiz und Anstrengung in den verschiedensten Disziplinen geforscht.

Doch nicht nur hier, sondern in allen industriell fortgeschrittenen Staaten und Staatengemeinschaften wie den USA, anderen europäischen Staaten, Japan, aber auch in den Ländern der 3.ten Welt nimmt die Zahl der Patienten mit chronischen Wunden ständig zu.

Als chronisch wird eine sekundär heilende Wunde bezeichnet, wenn innerhalb von drei Monaten kein Wundverschluss zu erzielen ist (Wollina, U. 2000) , oder innerhalb von 2 Wochen keinerlei Heilungstendenz zu erkennen ist.. Eine andere Definition beschreibt eine Wunde als therapieresistent, wenn sich nach 3 Monaten optimaler Behandlung keine Abheilungstendenz zeigt oder wenn nach 12 Monaten keine spontane Abheilung erfolgt ist. (Dissemond, J.2001)

Grundsätzlich ist eine Behandlung des zugrundeliegenden Leidens bei Patienten mit chronischen Wunden wünschenswert.

So ist eine optimale Einstellung des Blutzuckers und Erreichen eines HbA_{1c} Wertes unter 6,5 % bei einem Diabetiker anzustreben, sowie eine eventuelle Entlastung bei neuropathischen Ulcera.

Ein an pAVK leidender Patient sollte zum angemessenen körperlichen Training und dem Einstellen des Konsums auslösender Noxen wie Nikotin angehalten werden.

Hier ist auch eine Kontrolle und medikamentöse Einstellung der Blutfettwerte angezeigt.

Unter Umständen kann ein Gefäßbypass bei kurzstreckigen Gefäßverengungen die periphere Durchblutung und somit Versorgung des Wundgebiets verbessern.

Patienten mit chronisch venöser Insuffizienz können konservativ durch Anwendung einer Kompressionstherapie oder bei gegebener Indikation operativ behandelt werden.

Eine chirurgische Wundtoilette mit scharfem Débridement und anschließender feuchter Wundbehandlung mit Kochsalzgetränkten Kompressen, Infektionsprophylaxe und Druckentlastung hat sich in den letzten Jahren unter dem Begriff „good wound care“ (Wiemann et al., 1998) als Lokalthherapie etabliert.

Trotz dieser Behandlungsmöglichkeiten zeigen eine große Zahl Wunden keine Besserung und können nicht zur Abheilung gebracht werden.

Ein vielversprechender Ansatz zur lokalen Behandlung chronischer Wunden wurde mit dem Beginn der Wachstumsfaktorentherapie eingeleitet.

Aus autologem Thrombocytenkonzentrat gewonnen, werden diese extern auf die Wunde appliziert. In Thrombocyten sind PDGF, TGF- β , EGF und IGF enthalten (H. Lippert et al. 2001).

Wachstumsfaktoren spielen bei der kutanen Wundheilung akuter und chronischer Wunden eine entscheidende Rolle. (Köveker, G.B. 2000)

Viele bisher durchgeführte Studien wendeten verschiedenste wachstumsfaktorenhaltige Substanzen auf chronischen Wunden an Patienten an. Steed et al. (1995) zeigten den positiven Einfluss von topisch angewendetem PDGF auf chronische Wunden diabetischen Ursprungs.

Den Einfluss von TGF- β , EGF und PDGF auf Fibroblastenkulturen in Kollagenmatrix untersuchten Genever, P.G., Wood, E.J., Cunliffe, W.J. (1993) und stellten einen positiven Effekt auf die Zellvermehrung fest.

Jaumann et al (1991) und Andersson et al. (1992) zeigten mittels Mutationsanalysen die Struktur von PDGF auf, Oefner et al. (1992) untersuchte PDGF durch Röntgenkristallographie. Sie zeigten, dass sich PDGF aus 2 Ketten : A und B zusammensetzt, die durch Disulfidbrücken verbunden sind.

Die Stimulation humaner dermaler Fibroblasten durch PDGF-AB zeigten Jungtäubl et al. (1994). Das Ausmaß der Stimulation der Fibroblasten durch PDGF-BB und PDGF-AB fanden sie gleichwertig.

Lepisto et al. (1995) zeigten, dass PDGF-BB, mehr als PDGF-AB oder PDGF-AA einen zellproliferierenden Einfluss auf Fibroblasten hat.

Piazuelo E., et al. (2000) zeigten einen positiven Einfluss von PDGF-BB und EGF auf die Proliferation von Fibroblastenkulturen in vitro, wobei die Wirkung des EGF deutlich unter der des PDGF-BB lag. Interessant ist auch, dass eine autokrine Sekretion von Wachstumsfaktoren der Fibroblasten vermutet wurde.

Gosslau, A., Dittrich, W., Willig, A., Jaros, P.P. (2001) zeigten auf, dass sich biochemisch aktive Membranen in Fibroblastenmitochondrien durch Anwendung auch geringer PDGF Dosen vergrößern und dadurch ihre Leistungsfähigkeit steigern, wie es zum Beispiel bei der Wundheilung erforderlich ist.

Keine wundheilungsfördernde Wirkung auf chronische Wunden venösen Ursprungs durch autologes Thrombocytenkonzentrat fanden Stacey, M.C., Mata, S.D., Trengrove, N.J., Mather, C.A. (2000) in ihrer Studie, schränkten jedoch das Ergebnis bezüglich der von ihnen angewendeten Methode der Herstellung und Weiterverarbeitung des autologen Thrombocytenkonzentrats ein.

Seit einigen Jahren ist Beclapernin Gel (Regranex ®) auf dem Markt. Durch Gentransfer des für die B-Kette des PDGF kodierenden Gens in *Saccharomyces cerevisiae* lässt es sich in industriellem Masstab produzierbaren. Die Wirkung lässt sich mit der von endogenem PDGF-BB vergleichen. In Kombination mit chirurgischer Wundbehandlung lassen sich bei topischer Anwendung gute Ergebnisse bei chronischen diabetischen Wunden nachweisen. Embil, J.M. , Nagai, M.K. (2002)

Es gibt bereits Bestrebungen, den Gentransfer des PDGF-BB Gens direkt in die an der Wundheilung beteiligten Zellen durchzuführen. Hierdurch ließe sich die Wundbehandlung deutlich vereinfachen. Das wiederholte aufbringen grosser Mengen von teuer gewonnenen Wachstumsfaktoren könnte vermieden werden. Cupp, C.L., Bloom, D.C. (2002) .

Wenig untersucht wurden bisher die Gründe für die unterschiedliche Wirksamkeit in vivo auf chronische Wunden aufgebracht Wachstumsfaktorenlösungen.

Bedenkt man, dass es sich bei den in das komplexe Wundmilieu aufgebrachten Wachstumsfaktoren um Proteine handelt, so fragt man sich ob hier nicht der Einfluss bakterieller Proteasen eine Rolle spielen kann.

Bekanntlich sind chronische Wunden im klinischen Alltag ausnahmslos keimbesiedelt.

Häufige Keime sind Streptokokken und Staphylokokken, sowie Pseudomonaden.

Deren Fähigkeit Proteasen zu bilden und damit ein vermehrt proteasehaltiges Wundmilieu der chronischen Wunde zu erzeugen sind unstrittig.

Ob sich jedoch hieraus eine Beeinflussung topisch aufgebracht Wachstumsfaktoren ableiten lässt, sollte in unserer Studie untersucht werden.

Kapitel 2

Material und Methoden

2.1 Studiendurchführung

In dieser prospektiven Studie wurde der Einfluß unterschiedlicher Versuchsmedien und thrombozytärer Wachstumsfaktoren auf in vitro kultivierte Fibroblasten untersucht.

1. Einfluss autologer humaner thrombozytärer Wachstumsfaktoren in Kulturmedien im Vergleich zu Standardkulturmedien. Hier war die Hypothese, das Wachstum von Fibroblasten im Milieu einer chronischen und einer chronisch superinfizierten Wunde zu simulieren und den Einfluss der autologen humanen thrombozytären Wachstumsfaktoren zu untersuchen.

2. Aseptische Versuchsreihe zur Bestimmung der Auswirkung von durch Bestrahlung sterilisiertem wundexsudathaltigem Medium auf die Fibroblastenkultur mit und ohne Zusatz von autologen humanen thrombozytären Wachstumsfaktoren.

Hier war das Ziel eine Fibroblastenkultur unter den Bedingungen einer chronisch superinfizierten Wunde einzusetzen, und den Einfluß der Wachstumsfaktoren darauf zu untersuchen.

Nachdem hier kein signifikanter Einfluss des gewonnenen Wundexsudats festgestellt wurde, folgten weitere septischen Versuche mit Zusatz einer definierten keimhaltigen Lösung.

3. Einfluss von Erythromycin auf Fibroblasten, mit und ohne Zusatz von Keimen. Hier wurde der Einfluß einer topischen Antibiotikabehandlung auf die Fibroblastenkultur untersucht.

4. Es wurde die Wirkung von Antitrypsin, Pepstatin A und Aprotinin auf die Zellkulturen mit und ohne Einfluss von Keimsuspensionen und den darin enthaltenen Proteasen, sowie autologen Wachstumsfaktoren bestimmt, um festzustellen, ob der Degradation von Wachstumsfaktoren durch bakterielle Proteasen mit Hilfe von Antiproteasen verschiedener Klassen entgegengewirkt werden kann, bzw. deren Wirkung durch Antiproteasen beeinflusst werden kann.

Die Zellen der Versuchsreihen wurden in Versuchskulturflaschen ausgesät, zunächst zum Anwachsen in Standardmedium (siehe 2.6.5). Nach 6 – 16 Stunden erfolgte der Medienwechsel und die Zugabe der Versuchslösungen.

Je Versuchsansatz wurden 5 Kulturflaschen verwendet, sodass bei 3 verschiedenen Lösungen insgesamt 15 Kulturflaschen Verwendung fanden. Nach 7 Tagen wurde die Zellzahl in den Kulturflaschen bestimmt (siehe 2.6.4)

2.2 Zellen, Keime

In dieser Studie wurden Zellkulturen humaner Hautfibroblasten der Reihe HSF5¹ verwendet, die vom radiologischen Institut der Universitätsklinik Tübingen zur Verfügung gestellt wurden. Die Zellen der Versuchskulturen befanden sich in den Passagen 7 bis 12 und wiesen eine PD von 1,41 bis 2,94 auf.

In den septischen Versuchsreihen kam eine Bakterienbouillon des Stammes *Staphylococcus aureus* ATCC 25322 zur Verwendung, die von einem mikrobiologischen Labor in Leinfelden Echterdingen bereitgestellt wurde. (Laborgemeinschaft Frey / Hüsken Leinfelden-Echterdingen)
Chronisch infizierte Wunden weisen diesen proteasenbildenden Keim am häufigsten auf. Bowler,P (1998)

2.3 Laborausstattung und Material

Die aseptischen Versuchsreihen wurden sämtlich unter einer sterilen Workbench mit laminarem Airflow durchgeführt (Kendro Lab. Products, UVF6.18S., Newtown, USA)

Der verwendete Brutschrank (Heraeus Instruments Mod. BBD 6620 CH02, Hanau, Germany) bietet eine gleichbleibende Temperatur von 37° C und eine CO₂ Konzentration von 5 %, 95 % rel. Luftfeuchtigkeit.

Im mikrobiologischen Labor in Leinfelden Echterdingen wurden die septischen Versuchsreihen durchgeführt. Dabei wurde ein Brutschrank (Firma Binder Mod. BD720, Tuttlingen, Germany) verwendet, ebenso eine sterile Workbench mit laminarem Airflow (Kendro Lab. Products UVF6.18S.,Newtown, USA)

In beiden Labors kamen zum Einsatz:

- sterile Bechergläser, Petrischalen und Glasflaschen (mit Verschuß)
- sterile 50 ml Plastikröhrchen
- BD Falcon™ Cell Culture Flasks 353109
25 cm² , 70 ml Inhalt. Diese Behälter wurden ausschließlich zur Durchführung der Versuchsreihen benutzt.
- BD Falcon™ Cell Culture Flasks 353136
75 cm² , 250 ml Inhalt. Diese Behälter wurden nur für Erhaltungskulturen verwendet.
- Eppendorfpipetten (1000 µl, 100 µl) mit sterilen Pipettenspitzen
- sterile Einmalpipetten (10 ml, 25 ml)

2.4 Kulturmedien, Wundexsudat, Antiproteasen, Bakterienbouillon

2.4.1 Dulbecco´s modified Eagle Medium (DMEM)

Als Zellkulturmedium für die Fibroblastenkulturen wurde Dulbecco´s modified Eagle Medium (DMEM) eingesetzt.

Das Medium wurde folgendermassen hergestellt :

12,04g DMEM und 3,3g Bicarbonat wurden abgewogen und in einem 1,5 l Glasbehälter mit Magnetrührer in 900 ml Aqua bidest. gelöst. Anschliessend wurde durch Titration unter pH-Messung ein pH-Wert von 7,2 bis 7,4 eingestellt und 10 ml Antibiotikum (5000 U/ml Penicillin G (NaCl – Salz); 5000µg/ml Streptomycinsulfat , Life Technologies Gaithersburg, MD, USA) zugegeben. Anschliessend wurde die Lösung unter der Workbench mit Hilfe einer Pumpe und eines Easy Flow Sterilfilters steril in 2 500ml fassende Glasbehälter abgefüllt, in die zuvor je 50 ml steriles fetales Kälberserum (GIBCO BRL, Paisley, Schottland) pipettiert wurden.

Dieses Kulturmedium wurde zur Aufbewahrung bei 4° C gelagert und nach spätestens 8 Wochen verworfen.

Xu, J., Clark, R.A.F. (1996), Soma, Y., Grotendorst , G.R. (1989)

2.4.2 PBS⁻ Puffer (Phosphate Buffered Saline)

Diese phosphatgepufferte Salzlösung wurde zum Reinwaschen der Zellkulturen von Medium vor dem Trypsinieren und zu Verdünnungszwecken bei den Versuchsreihen eingesetzt.

8,0g NaCl, 0,2g KCl, 1,44g NaHPO₄ , 0,2g KH₂PO₄ wurden in einem Glasbehälter mit Aqua bidest. gelöst , auf 1000 ml verdünnt.

Dann wurde der pH-Wert durch Titration auf 7,2 eingestellt und die Flasche verschlossen und autoklaviert.

2.4.3 Wundexsudat

Das in einigen Versuchen verwendete Wundexsudat stammt aus einer humanen chronischen Infektwunde (> 12 Wochen), das nach Explantation einer infizierten Endoprothese in der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen gewonnen wurde. In diesem Fall wurde die Wundhöhle mit Vacuseal® (Fa. KCI, Ort, Land) ausgelegt, um einerseits die Wundhöhle zu verkleinern und andererseits die Wunde kontinuierlich zu drainieren.. Das Exsudat wurde über die Redonflasche aufgefangen und für 10 min bei 6000 r zentrifugiert.

Anschliessend wurde die in dem Wundexsudat enthaltenen Keime durch Gammabestahlung unter Dosimetrieontrolle abgetötet (Fa. Willy Rösch, Kernen-Rommelshausen, Deutschland).

Als Bestrahlungsanlage wurde der Typ JS – 8500 des Herstellers Nordion International Inc., Canada eingesetzt.

Dann wurde das Exsudat bis zur Verwendung bei –20°C eingefroren.

2.4.4 Aprotinin (Trasylol®)

Bei Aprotinin handelt es sich um eine natürlich vorkommende Antiprotease, die in den 30er Jahren von Kraut et al aus Rinderlungen isoliert werden konnte und fast zeitgleich von Kunitz und Northrop als im Pankreas vorkommender Trypsininhibitor beschrieben wurde.

Aprotinin hat ein Molekulargewicht von 6512 Dalton und besteht aus einer Aminosäurenkette.

Bekannt ist bisher vor allem seine Wirkung auf Serinproteasen wie Trypsin, Plasmin, Plasma Kallikrein, Gewebekallikrein, Elastase, Urokinase und Thrombin. Vermutet werden Wirkungen auch auf Kallikrein-Kininogen-Kinin, Komplement, Fibrinolyse und Leukozyten Elastase.

Der klinische Einsatz erfolgte, um Blutungen zu reduzieren ,vor allem prophylaktisch bei jungen Patienten der Herzchirurgie (Dietrich W.,Mossinger H., Spannagl M.,et al., 1993), sowie Patienten der Transplantationschirurgie (Neuhaus P., Bechstein W.O., Lefebre B., et al 1990), Kolorektalchirurgie (Sheridan W.G., Shandall A.A., Alexander-Williams J., et al., 1989) und im Bereich der Endoprothetik (Janssens M.,Joris J.,David J.L.,et al., 1994). Das Aprotinin wurde von der Fa. Bayer, Wuppertal bezogen und bei den Versuchen in einer Konzentration von 0,01g/ml angewendet.

2.4.5 Pepstatin A (Isovaleryl-Val-Val-Ala-Sta)

Pepstatin ist ein niedermolekularer, stark spezifischer Inhibitor für saure Proteasen (im speziellen Aspartat - Proteasen). Es hat sich gezeigt, daß nahezu alle sauren Proteasen inhibiert werden, einschließlich Pepsin, Renin, Cathepsin D, Chymosin, Protease B aus *Aspergillus niger* und Proteasen mikrobischen Ursprungs. (Barrett, A.J. & Dingle, J.T. (1972), Poole, A.R., Dingle, J.T. & Barrett, A.J. (1972)).

Die strenge Spezifität von Pepstatin für saure Proteasen konnte durch eine Nicht-Inhibierung von neutralen und alkoholischen Proteasen nachgewiesen werden.

Proteasen retroviralen Ursprungs wurden ebenfalls gehemmt (Baum, E.Z. et al. (1990), Katoh, I. et al. (1987)).

Bislang ist der Hemmungmechanismus durch Pepstatin nicht bekannt. Es wird angenommen, dass der Statin-Rest von Pepstatin hauptsächlich für die Wirkung verantwortlich ist. Er stellt offensichtlich ein Analogon des Übergangszustandes der Proteinkatalyse dar (Maciniszyn, J., Hartsuck, J.A., Tang, J., 1976)

Pepstatin A wurde von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Germany bezogen und in der Konzentration von 1,25mg / ml eingesetzt.

2.4.6 α_1 – Antitrypsin

Bei α_1 – Antitrypsin handelt es sich um ein ca 50 kDa großes, hauptsächlich in der Leber synthetisiertes Akutphaseprotein. Es wirkt als effektiver Inhibitor von Serinproteasen und wird von einigen Nicht-Serin Proteasen sowie durch Oxidation des aktiven Methioninteils inaktiviert. Es hemmt Trypsin, Chymotrypsin sowie Granulozyten - Elastase und Pankreas – Elastase, ausserdem Acrosin. (Beynon, R.J. and Bond, J.S., 1989)

Beim Menschen führt ein Gendefekt auf Chromosom 14 zur Erkrankung des α_1 – Antitrypsin (AAT) Mangels, der sich bei Kindern vor allem durch eine Leberzirrhose, beim Erwachsenen häufiger durch ein Lungenemphysem und COPD äußert, abhängig der Ausprägung der Allele.

Das verwendete FLUKA-10814 α_1 -Antitrypsin stammt von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH , Steinheim, Germany und wurde in der Konzentration 3,125mg/ml verwendet.

2.4.7 Erythromycin

Erythromycin ist ein aus *Streptomyces erytheus* gewonnenes Antibiotikum der Makrolidgruppe. Beim Menschen ist durch die hohe erzielbare Konzentration im Serum und im Gewebe eine Anwendung bei Infekten mit :

Streptococcus pneumoniae, *Streptococcus pyogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Corynebakterium diptheriae*, *Branhamella catharrhalis*, *Neisseria gonorrhoe*, *Haemophilus influenzae*, *Bordetella pertussis*, *Legionella pneumophila*, *Mycoplasma pneumoniae*, sowie diverse *Bacteroides* und *Campylobacter* spezies. Es weist eine Wirkungslücke bei *Pseudomonas aeruginosa* auf.

Das benutzte Erythromycin Erythrocin – i.v. stammte von Abbott GmbH, (Wiesbaden,Germany) es wurde in der Konzentration 1mg/ml verwendet.

2.4.8 Bakterienbouillon

Um das Milieu einer chronisch infizierten Wunde in vitro zu simulieren wurde den Versuchskulturen eine Bakterienbouillon in definierter Konzentration zugegeben.

Hierzu wurden im mikrobiologischen Labor in Leinfelden Echterdingen Keime auf einer Agarplatte ausgestrichen und vermehrt und vor Applikation in steriler NaCl Lösung verdünnt.

Es handelte sich dabei um den Stamm *Staphylococcus aureus* ATC 25923, die Anzahl KBE/ml betrug bei jedem Versuch 10^6 .

Quantitative Bestimmung koagulasepositiver Staphylokokken mittels Oberflächentechnik mit Selektivmedium

Das benutzte Verfahren ermöglicht die quantitative Bestimmung koagulasepositiver Staphylokokken und dient im Rahmen der Lebensmittelüberwachung als Referenz zur Überprüfung festgelegter Höchstwerte.

Koagulasepositive Staphylokokken wie *Staphylococcus aureus*, bilden unter den in diesem Verfahren definierten Bedingungen typische Kolonien. Von bekannten Mengen Untersuchungsgut wurde ein Oberflächenausstrich auf einem selektiven Nährboden angelegt. Nach Inkubation wurden typische Kolonien ausgezählt und die Anzahl koagulasepositive Staphylokokken pro ml Untersuchungsgut berechnet.

Material und Reagenzien :

1.Grundmedium :

Rabbit Plasma Fibrinogen Agar (RPFA)

Grundmedium (Baird-Parker-Agar)

Caseinpepton, pankreatisch 8.9 g

Fleischextrakt 4.5 g

Hefeextrakt 0.9 g
Natriumpyruvat 8.9 g
L-Glycin 10.7 g
LiCl (42.39 g/mol) 4.5 g
Agar 15 g
Wasser 740 ml
Titrieren auf pH-Wert: 6.9 ± 0.2

wurden gemäss den Angaben der Herstellerfirma gelöst und 15 min bei 121°C sterilisiert.

2. Zusätze :

Bovines Fibrinogen, Fraktion I 3.7 g
Wasser 73 ml
Phosphatpuffer (5.2) 147 ml

Das Fibrinogen wurde in einem Porzellanmörser verrieben und zum Quellen gebracht, unter ständigem Rühren langsam und in kleinen Mengen wurde Wasser zugegeben. Sobald sich das Fibrinogen zu lösen begann, wurden 147 ml Phosphatpuffer dazugegeben und fertiggelöst.

Die Mischung wurde über Papierfilter abgenutscht (Filtration über drei Filter mit zunehmender Dichte bzw. zunehmendem Rückhaltevermögen).

Anschliessend folgte sofort druckloses sterilfiltriert, mit folgendem Filteraufbau:

- 1) Membranfilter (Cellulose Mischester), 0.8 μm
- 2) Nylon-Trenngaze
- 3) Glasfaser-Vorfilter

dann folgt die Zugabe von
Trypsininhibitor Typ I-S aus Sojabohnen 0.1 g
Phosphatpuffer (5.2) 100 ml
Lyophilisiertes Kaninchenplasma EDTA,
gemäss Angaben des Herstellers gelöst in
K₂TeO₃ (253.80 g/mol) 1.0 g
Wasser 100 ml

Das Grundmedium (1.) wurde auf 45-50°C abgekühlt. Die Zusätze (2.) wurden mittels Filtration sterilisiert und in folgenden Mengen unter vorsichtigem

Schwenken beifügt:

Fibrinogenlösung* 220.0 ml

Trypsininhibitorlösung 8.4 ml

Kaninchenplasma 24.7 ml

Kaliumtelluritlösung 2.5 ml

Dabei wurde auf 45-50°C erwärmt.

Anschliessend wurden die Platten beimpft, je 0.1 ml der Stammlösung wurden auf gut vorgetrockneten RPFA-Nährboden gegeben und auf der ganzen Oberfläche ausgespatelt.

Die Bebrütung erfolgte mittels Inkubation während 18 - 48 h bei 37±1°C unter aeroben Bedingungen.

Nach erfolgter Bebrütung wurden die Kolonien ausgezählt:

Als koagulasepositive Staphylokokkenkolonien galten grauschwarze bis schwarze, glänzende, konvexe Kolonien von 1 - 3 mm Durchmesser mit einem trüben Hof, die am besten vor einer dunklen Fläche und schräg einfallendem Gegenlicht, sichtbar waren.

Es wurde die aufgrund der quantitativen Auswertung ermittelte Anzahl koloniebildender Einheiten koagulasepositiver Staphylokokkenkolonien pro ml Untersuchungsgut angegeben.

Anonym (1999)

2.5 Gewinnung der autologen thrombozytären Wachstumsfaktorenlösung

2.5.1 Gewinnung der Thrombozyten

Die autologe thrombozytäre Wachstumsfaktorenlösung wurde in Tübingen nach der SAA - Methode aus meinem eigenen Blut hergestellt.

Die Vollblutspende von 500 ml wurde in einem Vollblutbeutel eines 4-fach Beutelsystems mit 70 ml einer CPD Antikoagulanzlösung zur weiteren Verarbeitung steril aufbewahrt.

Die SAA – Methode entspricht der Standardarbeitenweisung für die Verarbeitung von Vollblutspenden und für die Herstellung von Einzelthrombozytenkonzentraten der Abteilung für Transfusionsmedizin mit Blutbank der Universität Tübingen.

Das 4-fach Beutelsystem wurde in einer Grosszentrifuge (Heraeus Cyrofuge, Fa. Hereaus, Hanau, Germany) bei 3800 U/min 10 Minuten lang bei 20°C zentrifugiert.

Dann wurde aus dem Vollblutbeutel mit dem Geräteprogramm 1- 4 einer Opti-Press II (Fa. Baxter, München-Unterschleißheim, Germany) der Buffy-Coat abgepresst und in TKE- Beutel überführt.

Nach mindestens 2 Stunden Lagerung wurde aus dem Buffy-Coat ein Thrombozytenkonzentrat hergestellt, nach der Standardarbeitenweisung für die Herstellung von Einzelthrombozytenkonzentraten der Abteilung für Transfusionsmedizin mit Blutbank der Universität Tübingen.

Nach einer weiteren 6 minütigen Zentrifugation bei 1040 U/min des TKE Beutels wurde er in der Opti Press II weiterverarbeitet, nach dem Geräteprogramm 2 – 4. Dieser Abpressvorgang endete automatisch, sobald die Erythrozythengrenzschicht einen Detektor erreicht.

Anschließend folgte die 24 stündige Resuspension der Thrombozyten auf einer Blutbeutelchaukel.

2.5.2 Thrombozytendegranulation

Alle im folgenden beschriebenen Arbeitsschritte wurden unter einer Workbench mit laminarem airflow durchgeführt.

Das Ende eines Infusionsbestecks (Infasid-P Plus, Fa. Asid Bonz, Böblingen, Germany) wurde an den das Thrombozytenkonzentrat enthaltenden Beutel angeschweißt.

Der an diesem Ende befindliche Lueranschluss wurde an einen Discifix Dreiwegehahn (Fa. B. Braun, Melsungen) angeschlossen. Hierüber werden 10 ml einer Thrombin-Calciumlösung zugeführt (Thrombin-JMI, 1,000 U.S. Units, Fa. Gentrac, Inc. Middleton, Wisconsin, USA / 10 ml Calcium 8,4 %, Fa. B. Braun, Melsungen, Germany).

Die Thrombin-Calciumlösung bewirkt eine Degranulation der α -Granula der Thrombozyten und damit eine Freisetzung der darin enthaltenen Wachstumsfaktoren.

Nach 10 Minuten wurde die Lösung über den Dreiwegehahn in 2 ml Einmalspritzen (Fa. B. Braun, Melsungen, Germany) mit Lueranschluss abgefüllt.

Diese Spritzen wurden steril mit Combistoppfern (Fa. B. Braun, Melsungen, Germany) verschlossen und als Versuchslösung zu Forschungszwecken gekennzeichnet, sowie in Folien verpackt.

Bis zur Verwendung wurden die Spritzen durchgehend bei -20°C gelagert.

2.6 Grundlagen der Fibroblastenkultur in vitro

2.6.1 Einfrieren von Fibroblasten

Humane Fibroblasten werden zur Lagerung eingefroren.

Hierzu werden die Zellen trypsiniert (siehe 2.6.4)und in Zellkulturmedium aufgenommen.

Dann wird die Zellzahl bestimmt und die Lösung 2 Minuten bei 1400 U/Min. zentrifugiert, das entstandene Pellet wird dann in einer entsprechenden Menge Einfriermedium aufgenommen , sodass die Zellkonzentration 1 Million Zellen pro ml beträgt. Das Einfriermedium enthält eine höhere fetale Kälberserumkonzentration als das normale Kulturmedium und das lichtempfindliche DMSO, um eine Kristallbildung beim Auftauen der Zellen zu verhindern. Die verwendeten Fibroblasten wurden auf diese Weise eingefroren.

2.6.2 Auftauen von Fibroblasten

Die Versuchszellen wurden in einem Wasserbad aufgetaut und in 20 % fetales Kälberserum enthaltendes DMEM aufgenommen.

Nach 4 Stunden wurde die Anwachsrate bestimmt, das ist der Anteil an Zellen, der den Einfrier- und Auftauprozess überstanden hat, und sich am Boden der Kulturflasche angeheftet hat.

2.6.3 DAPI Routinefärbung

Fibroblastenkulturen sind durch Infektion mit Mykoplasmen gefährdet. Diese intrazellulären Erreger haben negativen Einfluss auf die Versuchszellpopulationen und können Ergebnisse verfälschen. Es wurde daher bei jeder Versuchsreihe eine DAPI Routinefärbung durchgeführt. Hierbei wurden je 30000 Zellen auf entfetteten sterilen Deckgläsern ausgesät und nach den Anwachsen zweimal mit PBS⁻ Puffer und zweimal mit Methanol gewaschen .

Es folgt die Applikation von mit Methanol auf 5µg / ml verdünnter DAPI-Lösung und anschließend 20 Minuten Inkubation bei 37°C.

Nun erfolgte eine erneute Reinigung, zweimal mit Methanol und 1 mal mit PBS⁻ Puffer, danach einbetten in Mowiol.

Das DAPI komplexiert mit ds-DNA.

Eine Fluoreszenzanalyse bei UV – Anregung zeigt nun ob ein Befall der Kultur mit Mykoplasmen vorliegt.

In diesem Fall hätten außer den Zellkernen der Fibroblasten auch vorhandene Mykoplasmen blau fluoresziert, als kleine blaue Punkte auf der Zelloberfläche. Dies war bei keiner Untersuchung der Fall.

2.6.4 Zellen trypsinieren, Zellzahlbestimmung

Um Zellen zu zählen und sie in Versuchen in bekannter Quantität aussähen zu können, mussten sie von der Oberfläche der Kulturflaschen abgelöst werden.

Das Medium des Kulturbehälters wurde unter der sterilen Workbench abgesaugt. Die am Boden angehefteten Fibroblasten wurden anschließend 2 mal mit PBS⁻ Puffer gewaschen, um Reste des Kulturmediums zu entfernen, die sonst die Trypsinwirkung beeinträchtigt hätten.

Es erfolgte die Applikation von 1 ml Trypsin in die Versuchskulturflasche zum Ablösen der Zellen. Unter dem Mikroskop wurde der Ablösungsprozess beobachtet und dieser unter Verwendung von 4 ml DMEM Standardmedium beendet, sobald alle Fibroblasten losgelöst waren.

Es erfolgt das Vereinzeln durch Einsatz einer Glaspipette. Hier wird die Zellsuspension mehrfach vorsichtig in einer Glaspipette aspiriert und ausgestossen, hierdurch wurde vermieden dass sich Zellcluster bilden und Zellverbände aufgelöst, die Zellen gleichmässig in der Suspension verteilt. Nun wurde die Zellzahl durch Benutzung der Fuchs Rosenthal- Zählkammer bestimmt. Hierbei werden die Zellen auf einen gitternetzförmig markierten Objektträger aufgebracht und unter dem Mikroskop ausgezählt.

Die PD wurde mit der Formel

$$\frac{\ln \text{ geerntete Zellzahl} - \ln \text{ ausgesäte Zellzahl}}{\ln 2} = \text{PD}$$

berechnet.

2.6.5 Zellen aussähen

Die Zellsuspension wurde entsprechend der enthaltenen Zahl an Fibroblasten unter der sterilen Workbench auf 300000 Zellen in 5 ml DMEM Standardmedium pro Versuchskulturflasche verdünnt.

In den Erhaltungskulturflaschen waren es 700000 Zellen in 15 ml DMEM Standardmedium.

Die Fibroblasten setzen sich am Boden der Flasche ab und heften sich am Kunststoffbehälter an.

Nach frühestens 6 Stunden und spätestens 16 Stunden wurde ein Medienwechsel durchgeführt, sodass die Zellen einerseits ausreichend Zeit hatten sich unter gleichen Bedingungen anzuheften, andererseits aber auch

eine festgelegte Inkubationszeit mit dem zu untersuchenden Kulturmedium, dass beim Medienwechsel nun hinzugefügt wurde, gewährleistet war. In den Versuchskulturflaschen wurde die jeweilige Versuchslösung verwendet, in den Erhaltungskulturflaschen DMEM - Standardmedium. Für die Versuchsreihen in Leinfelden Echterdingen wurde das Aussähen unter sterilen Bedingungen in Tübingen durchgeführt, nach 6 –16 Stunden erfolgte der Transport in einer Kühlbox bei Raumtemperatur nach Leinfelden Echterdingen. Hier folgte nun der Medienwechsel mit teilweise keimhaltigen Versuchslösungen.

2.7 Datenauswertung und Statistik

Bei den Versuchsreihen wurde die Zellzählung 7 Tage nach Aussaat der Fibroblasten wie unter 2.6.4 beschrieben, vorgenommen .

Es ergaben sich pro untersuchtem Versuchsmedium je 5 Zellzahlwerte, entsprechend der 5 simultan mit demselben Kulturmedium untersuchten Versuchsansätze. Diese Fünffachbestimmung diente der Minimierung etwaiger Pipettierfehler.

Alle Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Mittelwert mit (MW) und die Standardabweichung mit (SD) bezeichnet.

Die statistische Auswertung wurde mit SPSS 13.0 durchgeführt. Für die statistischen Vergleiche der Wirkung der Substanzen auf die Proliferation der unterschiedlichen Zellkulturen wurde eine Varianzanalyse durchgeführt (ANOVA). Wenn die Varianzanalyse statistisch signifikant war, wurde eine post hoc Testung (LSD-Methode; LSD = least significant difference) auf signifikante Gruppenunterschiede durchgeführt. Da die Wirkung von Trasylo1 nur bei zwei Zellkulturen verglichen wurde, wurde in diesem Fall ein unabhängiger Student´s t-test durchgeführt. Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von $< 0,05$ gewählt.

Kapitel 3

Ergebnisse

3.1 aseptische Versuche

3.1.1 Einfluss der Wachstumsfaktorenlösung auf in vitro kultivierte Fibroblasten

Bei diesem Versuchsansatz wurde der Einfluss der aus autologen Thrombozyten gewonnenen Wachstumsfaktorenlösung auf in vitro kultivierte Fibroblasten untersucht.

Es zeigte sich ein eindeutiger positiver Effekt auf die Zahl der nach einer Woche in der wachstumsfaktorenhaltigen Medium gewachsenen Zellen.

In der Reihe 1 der Abbildung 1 ist der Mittelwert der ersten 5 Kulturflaschen abgebildet, sowie die Standardabweichung. Es handelt sich um die Kontrollreihe bei der, wie bei jedem Versuch, 300000 Zellen in 5 ml Standardmedium ausgesät wurden. Also in einer Konzentration von 60'000 Zellen / ml.

Reihe 2 zeigt den Mittelwert und die Standardabweichung eines Versuchs bei dem dem Standardmedium 0,25 ml autologe Wachstumsfaktorenlösung zugesetzt wurden. Man erkennt den signifikanten Anstieg der Zellzahl nach einer Woche. Abbildung 1, Tabelle 1.1

	Reihe 1	Reihe 2
Mittelwert	216500	544000
Standardabweichung	9151,50261	14374,4565
n	5	5
p	P < 0,05	

Tabelle 1.1 Standardmedium im Vergleich mit Standardmedium + 0,25ml GF

Bei Reihe 3 wurden der Versuchslösung 0,5ml autologe Wachstumsfaktorenlösung zugesetzt. Hier zeigt sich eine mehr als Verdreifachung der Vermehrungsrate der Zellen im Vergleich zur Kontrolle und eine 1,5 fache Erhöhung der Vermehrungsrate im Vergleich zur Versuchsreihe mi 0,25 ml Wachstumsfaktorenlösung.

Abbildung 1 Tabelle 1.2, 1.3

	Reihe 1	Reihe 3
Mittelwert	216500	711700
Standardabweichung	9151,50261	15801,8986
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 1.2 Standardmedium im Vergleich mit Standardmedium + 0,5ml GF

	Reihe 2	Reihe 3
Mittelwert	544000	711700
Standardabweichung	14374,4565	15801,8986
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 1.3 Standardmedium + 0,25ml GF im Vergleich mit Standardmedium + 0,5ml GF

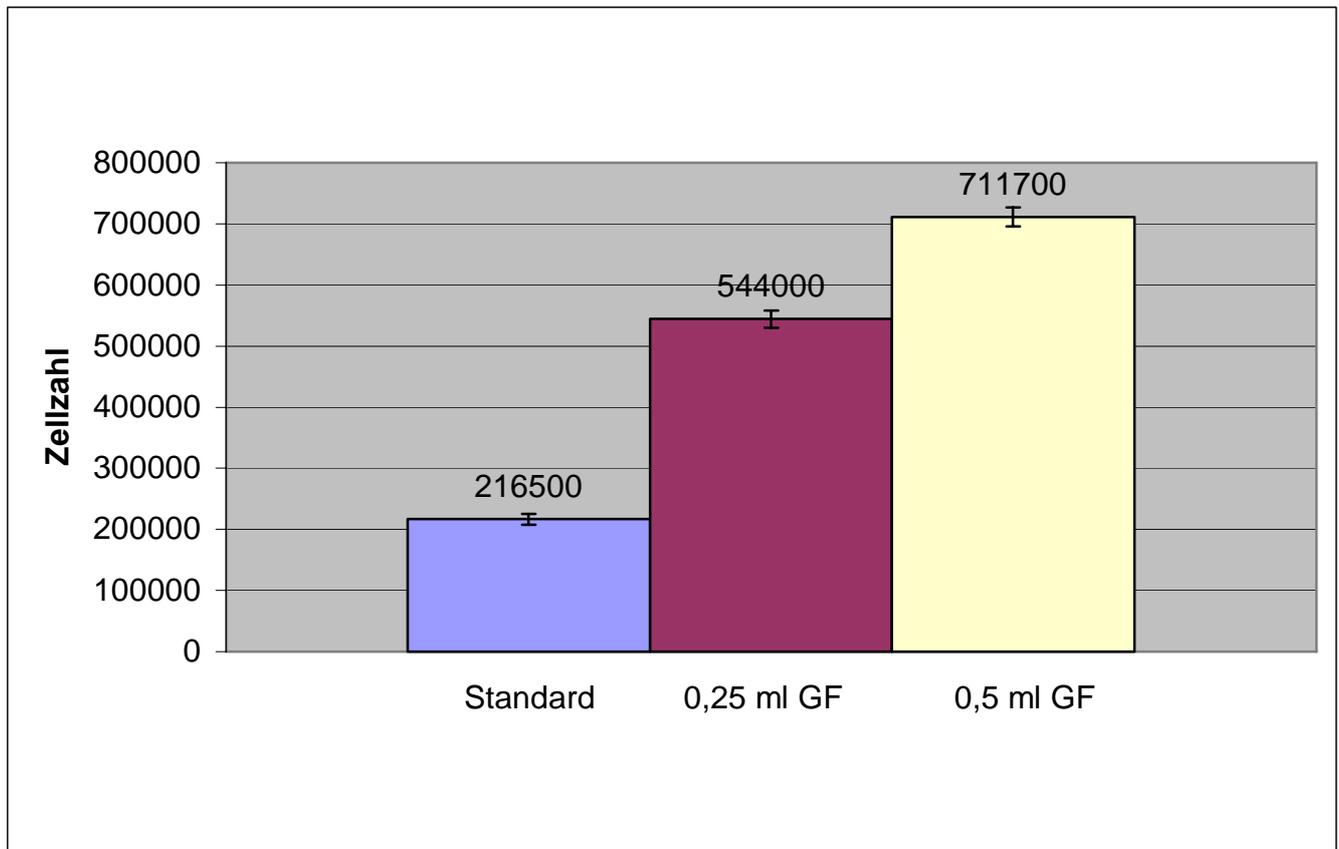


Abbildung 1

3.1.2 Einfluss von Wundexsudat auf in vitro kultivierte Fibroblasten

Bei diesem Versuch wurde der Einfluss von sterilisiertem Wundexsudat auf die Zellkulturen beobachtet.

In Reihe 1 ist die Kontrollgruppe dargestellt, die mit Standardmedium inkubiert wurde.

In Reihe 2 wurde dem Standardmedium 0,25ml Wundexsudatlösung zugefügt, es kam zu einer nicht signifikanten ($P = 0,106$) Verringerung der Vermehrungsrate. Tabelle 2.1

	Reihe 1	Reihe 2
Mittelwert	195400	181700
Standardabweichung	10322,3059	13474,9768
n	5	5
p	P = 0,106	

Tabelle 2.1 Kontrolle im Vergleich zu Standardmedium + 0,25 ml Wundexsudat

In der dritten Reihe wurde dem Standardmedium 0,5ml Wundexsudatlösung zugefügt, hier zeigt sich ein nicht signifikanter (P = 0,278) Anstieg der Zellvermehrungsrate. Tabelle 2.2

	Standardmedium	Standardmedium + 0,5 ml Wundexsudat
Mittelwert	195400	204300
Standardabweichung	10322,3059	13108,2035
n	5	5
p	P = 0,278	

Tabelle 2.2 Kontrolle im Vergleich zu Standardmedium + 0,5 ml Wundexsudat

Vergleicht man Reihe 2 und 3 , also gering und höher dosiertes Wundexsudat miteinander, so fällt eine Signifikanz auf.

	Standardmedium + 0,25 ml Wundexsudat	Standardmedium + 0,5 ml Wundexsudat
Mittelwert	181700	204300
Standardabweichung	13474,9768	13108,2035
N	5	5
P	P =< 0,05	

Tabelle 2.3 Standardmedium + 0,25 ml Wundexsudat im Vergleich zu Standardmedium + 0,5 ml Wundexsudat

Die Ergebnisse sind in Abbildung 2 graphisch dargestellt.

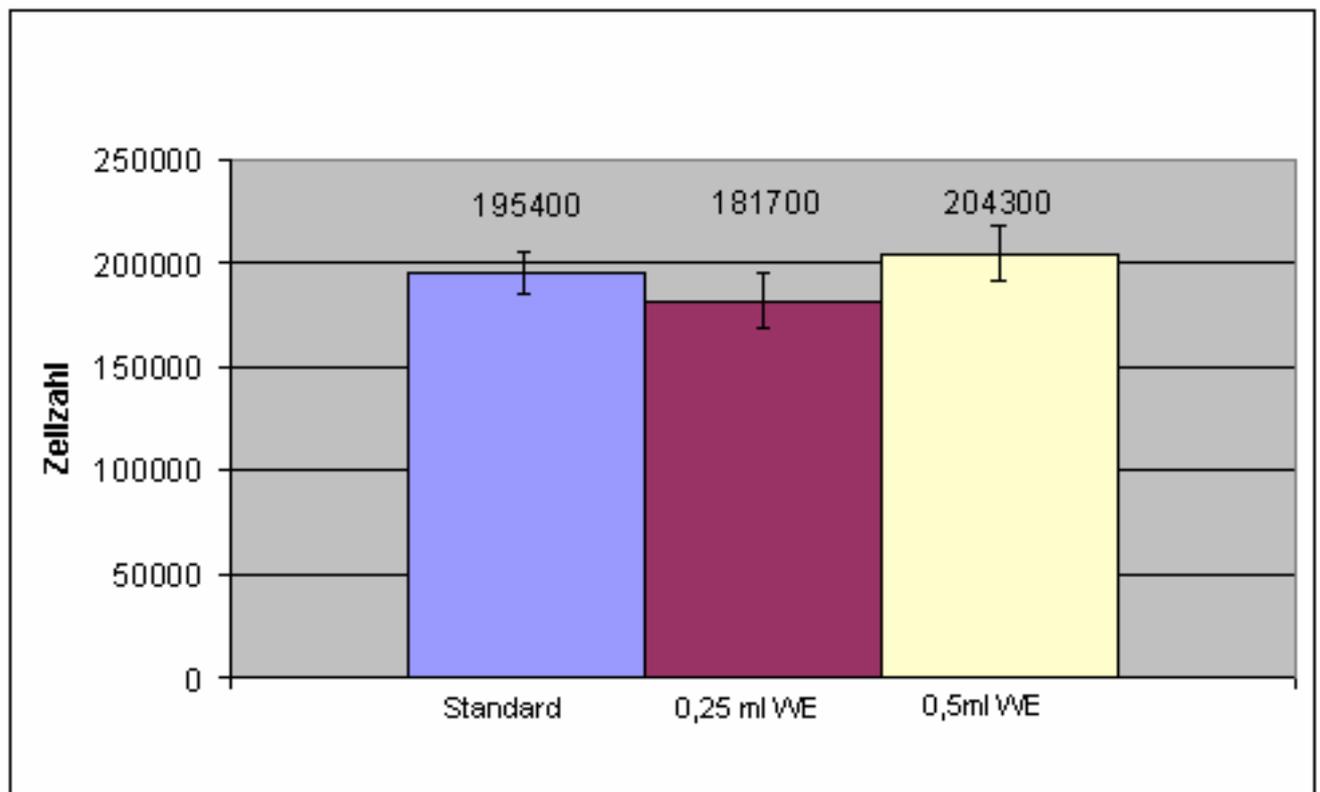


Abbildung 2

3.1.3 Wirkung von Wachstumsfaktoren in Kombination mit Wundexsudat auf in vitro kultivierte Fibroblasten

Bei dieser Versuchsreihe wurden den Zellkulturen in Reihe 1 nur Standardmedium zugesetzt.

In Reihe 2 wurden dem Standardmedium 0,25ml Wundexsudat (GF)und 0,25ml Wachstumsfaktorenlösung zugesetzt, es kam zu einer signifikanten Erhöhung der Vermehrungsrate ($P = <0,05$). Tabelle 3.1

	Reihe 1	Reihe 2
Mittelwert	189300	515400
Standardabweichung	9444,57516	12147,0161
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 3.1 Kontrolle im Vergleich zu Standardmedium + 0,25 ml GF +0,25 ml Wundexsudat.

In der dritten Reihe wurden 0,5 ml Wundexsudat und 0,5 ml Wachstumsfaktorenlösung (GF) zugesetzt. Hier kam es zu einer noch deutlicheren Zunahme der Vermehrungsrate ($P = <0,05$)im Vergleich zur Kontrollgruppe. Tabelle 3.2

	Reihe 1	Reihe 3
Mittelwert	189300	660100
Standardabweichung	9444,57516	12259,69
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 3.2 Kontrolle im Vergleich zu Standardmedium + 0,5 ml GF + 0,25 ml Wundexsudat.

Ein deutlicher negativer oder positiver Einfluss des gewonnenen, sterilisierten Wundexsudats lässt sich hier nicht nachvollziehen, der positive Einfluss der Wachstumsfaktorenlösung überwiegt bei weitem.

In Abbildung 3 sind die Ergebnisse graphisch dargestellt.

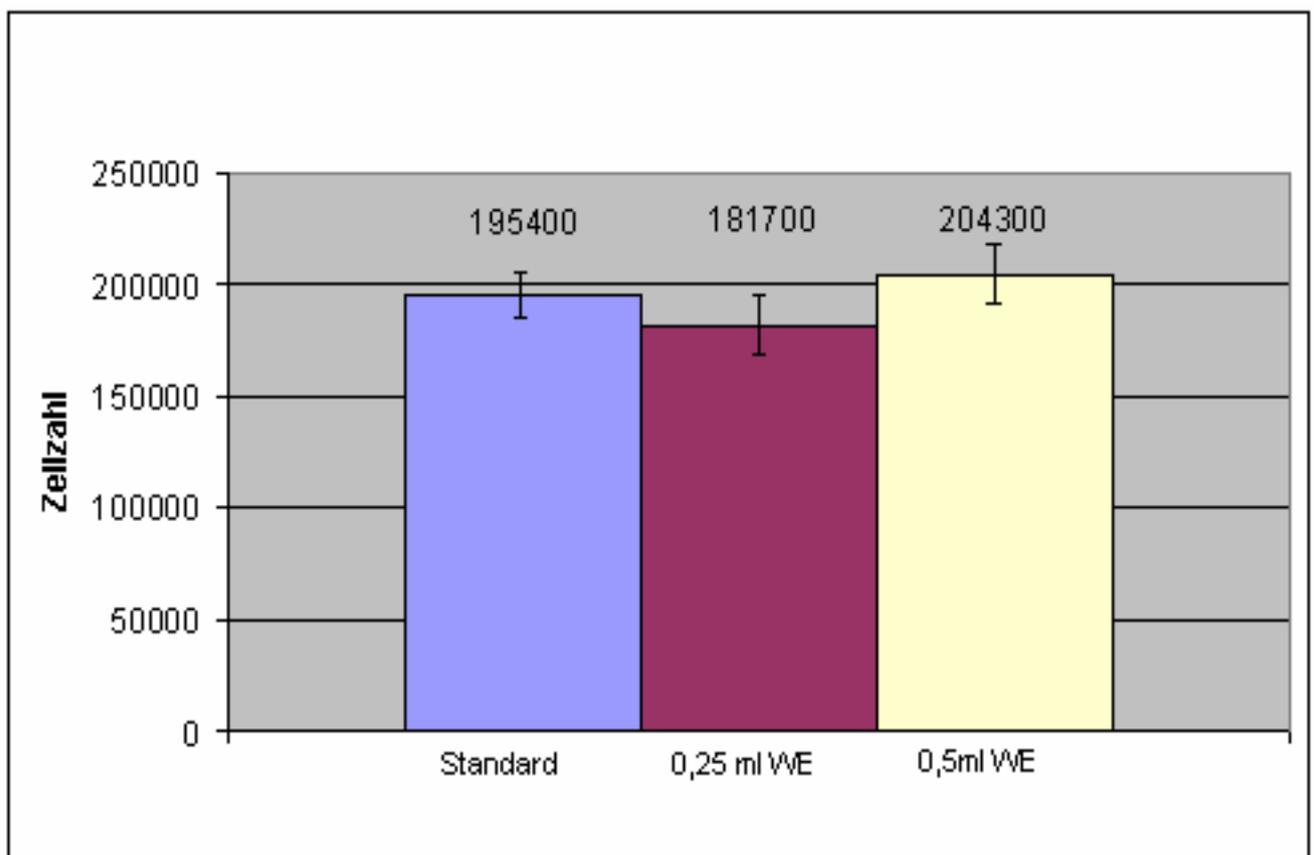


Abbildung 3

3.2. septische Versuche

3.2.1 Einfluss von Keimsuspensionen, Erythromycin auf in vitro kultivierte Fibroblasten

Bei diesem Versuch wurden die Kulturen mit Bakterienbouillon, Wachstumsfaktorenlösung und Erythrocin i.v. (Erythromycin)der Konzentration 1mg/ml angesetzt.

In Reihe 1 wurde zum Standardmedium 0,5 ml Erythrocin i.v. zugegeben.

In Reihe 2 wurden 0,25 ml Wachstumsfaktorenlösung , 0,5ml Bakterienbouillon und 0,5 ml Erythromycin, in Reihe 3 0,5 ml Wachstumsfaktorenlösung , 0,5 ml Bakterienbouillon und 0,5 ml Erythromycin.

In Reihe 4 wurde nur Standardmedium zugegeben, ohne Zugabe von Erythromycin.

In der fünften Reihe wurden 0,25ml Wachstumsfaktorenlösung und 0,5ml Erythromycin zugegeben, in der sechsten 0,5 ml Wachstumsfaktorenlösung und 0,5ml Erythromycin.

Es kam zum ablösen und Tod der Zellkulturen, denen das Erythromycin zugesetzt wurde, unabhängig vom Zusatz von Keimlösung oder Wachstumsfaktorenlösung. Die Kontrollkultur wuchs indessen unbeeinträchtigt.

3.2.2 Einfluss von Aprotinin, Wachstumsfaktoren und Keimlösungen auf in vitro kultivierte Fibroblasten

Hier wurden den Kulturen der Versuchsreihen unterschiedliche Mengen Keimsuspension, Wachstumsfaktorenlösung (GF)und Aprotinin zugesetzt, um deren Auswirkung zu beobachten. Als Antibiotikum wurde nur das im Standardmedium enthaltene Penicillin / Streptomycin verwendet.

In Reihe 1 wurde die Kontrollkultur mit Standardmedium kultiviert.

In Reihe 2 wurden Standardmedium und 0,25 ml der Keimsuspension zugegeben. Es kommt zu einer signifikant . ($P = < 0,05$) verminderten Zellvermehrung. Tabelle 5.1

	Reihe 1	Reihe 2
Mittelwert	159600	80100
Standardabweichung	7805,44682	5140,52526
N	5	5
P	$P = < 0,05$	

Tabelle 5.1 Kontrolle im Vergleich zu Standardmedium + 0,25 ml Keimsuspension

In Reihe 3 wurden Standardmedium, 0,5 ml Keimsuspension und 0,5 ml Wachstumsfaktorenlösung (GF)zugegeben. Hier zeigt sich ein signifikant positiver Einfluss der Wachstumsfaktoren, der schon in früheren Reihen gesehen wurde, Tabelle 5.2

	Reihe 1	Reihe 3
Mittelwert	159600	279100
Standardabweichung	7805,44682	10945,3186
N	5	5
P	P =< 0,05	

Tabelle 5.2 Kontrolle im Vergleich zu Standardmedium + 0, 5 ml Keimsuspension + 0,5 ml GF.

Vergleicht man Reihe 3 und 4 zeigt sich ein signifikanter negativer Einfluss der Keimsuspension in Reihe 3, im Vergleich zu Reihe 4, bei der nur 0,5 ml GF zugesetzt wurden. Tabelle 5.3

	Reihe 3	Reihe 4
Mittelwert	279100	350200
Standardabweichung	10945,3186	8976,35784
N	5	5
P	P < 0,05	

Tabelle 5.3 Vergleich Standardmedium + 0, 5 ml Keimsuspension + 0,5 ml GF zu Standardmedium + 0,5 ml GF

In der fünften Reihe wurden die Kulturen in Standardmedium und 0,5 ml Aprotininlösung der Konzentration 0,001g/l gezüchtet, hier sieht man einen signifikant negativen Einfluss der Aprotininlösung im Vergleich zur Kontrolle.

	Reihe 1	Reihe 5
Mittelwert	159600	111500
Standardabweichung	7805,44682	8268,9177
n	5	5
p	P < 0,05	

Tabelle 5.4 Kontrolle im Vergleich zu Standardmedium + 0,5 ml Aprotininlösung (0,001g/l)

Der signifikant negative Einfluss der Keimsuspension, als eingeschränktes in vitro Modell der chronisch infizierten Wunde, zeigt sich sowohl auf die Kontrollkultur als auch auf das Modell der mit Wachstumsfaktoren behandelten infizierten Wunde. Graphische Darstellung in Abbildung 4.

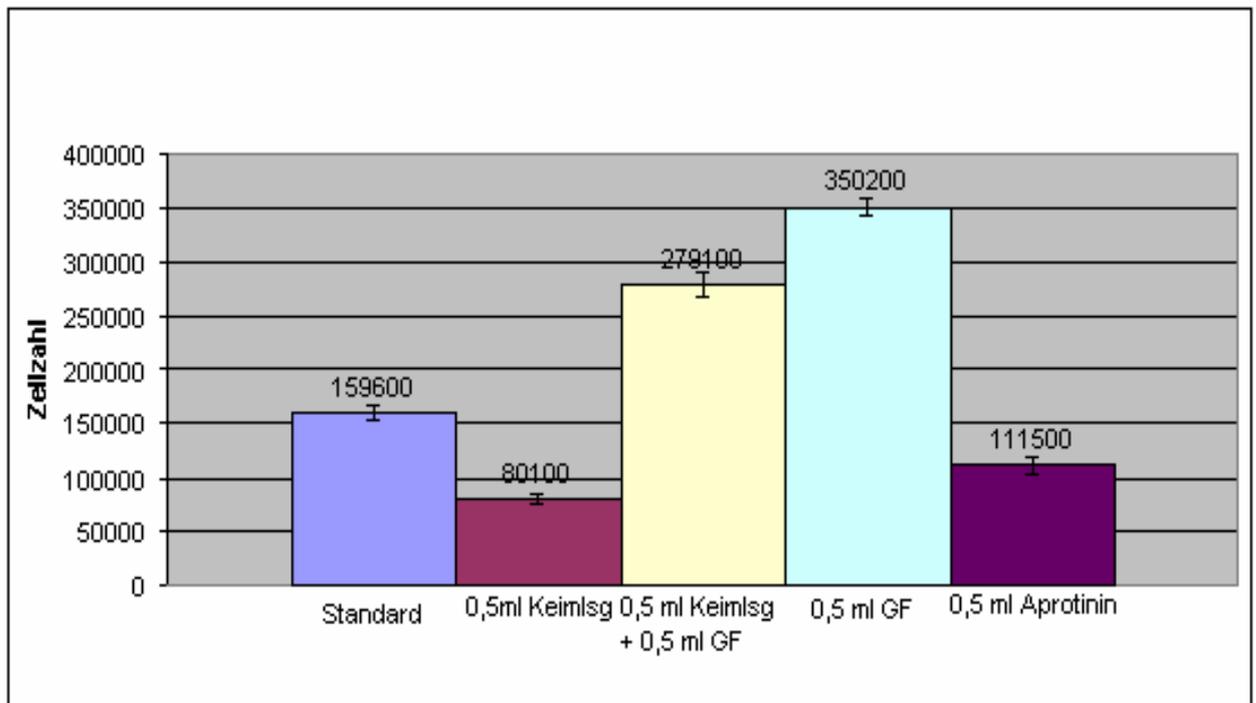


Abbildung 4

3.2.3 Einfluss von Apoptin in Kombination mit Wachstumsfaktoren sowie Keimlösungen auf in vitro kultivierte Fibroblasten

Reihe 1 ist die Kontrolle mit Standardmedium, Reihe 2 wurde 0,5 ml Bakterienbouillon zugegeben, hier zeigt sich wie in den vorhergehenden Reihen ein signifikanter negativer Einfluss des keimhaltigen Milieus. Tabelle 6.1

	Reihe 1	Reihe 2
Mittelwert	195000	125700
Standardabweichung	8979,1425	5943,48383
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 6.1 Vergleich Standardmedium zu Standardmedium + 0,5 ml Keimsuspension

In Reihe 3 wurden 0,5 ml Wachstumsfaktorenlösung und 0,5 ml Bakterienbouillon zugesetzt der positive Einfluss der Wachstumsfaktoren wird durch den Zusatz von Keimlösung verringert, signifikant im Vergleich zu Reihe 6, in der nur 0,5 ml Wachstumsfaktorenlösung zugegeben wurden. Tabelle 6.2

	Reihe 3	Reihe 6
Mittelwert	689100	785700
Standardabweichung	13418,2711	11116,4293
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 6.2 Vergleich Standardmedium +0,5 ml GF + 0,5 ml Keimsuspension zu Standardmedium +0,5 ml GF

In Reihe 4 wurden zur Standardlösung 0,5 ml Keimsuspension, 0,5 ml Wachstumsfaktorenlösung und 0,5 ml 10mg/ml Aprotinin zugegeben. Hier zeigte sich ein signifikant negativer Einfluss des Aprotinins in Kombination mit Keimen und Wachstumsfaktoren im Vergleich zum Ansatz nur mit Keimen und Wachstumsfaktoren. Tabelle 6.3

	Reihe 3	Reihe 4
Mittelwert	689100	281800
Standardabweichung	13418,2711	9660,48653
n	5	5
p	P < 0,05	

Tabelle 6.3 Vergleich 0,5 ml GF + 0,5 ml Keimsuspension zu 0,5 ml GF + 0,5 ml Keimsuspension und 0,5 ml Antitrypsin 10mg / ml.

In Reihe 5 wurde die Auswirkung der Zugabe von 0,5 ml Aprotinin 10mg / ml untersucht. Hier zeigt sich im Vergleich zur Kontrolle ein signifikant negativer Einfluss. Tabelle 6.4

	Reihe 1	Reihe 5
Mittelwert	195000	50900
Standardabweichung	8979,1425	4052,77683
n	5	5
p	P < 0,05	

Tabelle 6.4 Vergleich Standardmedium zu Standardmedium + 0,5 ml Antitrypsin 10mg/ml.

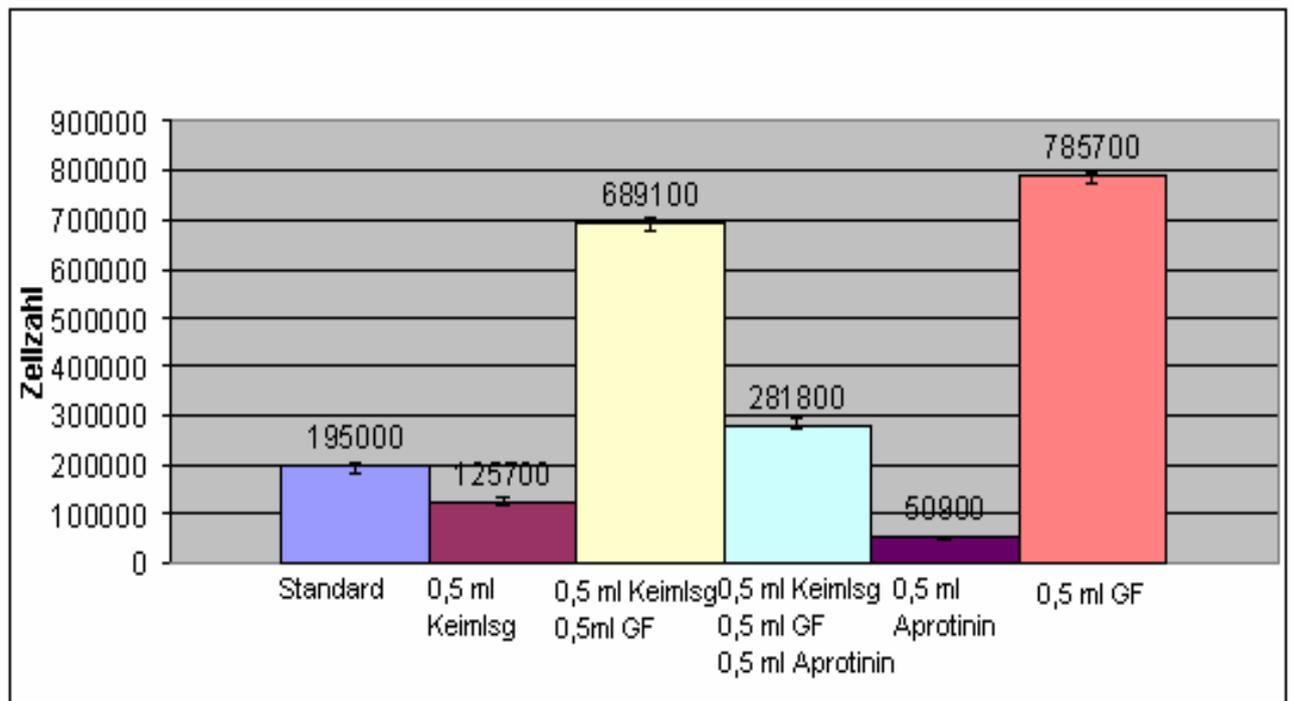


Abbildung 5

3.2.4 Einfluss von Antitrypsin in Kombination mit Wachstumsfaktoren sowie Keimlösungen auf in vitro kultivierte Fibroblasten

Reihe 1 stellt die Kontrolle dar.

Reihe 2 enthielt zusätzlich 0,5 ml Bakterienbouillon, hier war der negative Einfluss der Keime auf die Kultur von Interesse. Es zeigte sich ein signifikant negativer Einfluss der Keimsuspension im Vergleich zur Kontrolle ($P = <0,05$).

	Reihe 1	Reihe 2
Mittelwert	167600	139800
Standardabweichung	8770,68982	5495,45267
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 7.1 Standard im Vergleich zu Standard + 0,5 ml Bakterienbouillon

In Reihe 3 wurden die Zellkulturen unter Zugabe von 0,5 ml GF und 0,5 ml Bakterienbouillon inkubiert.

Im Vergleich zu Reihe 6, in der die Zellen mit 0,5 ml GF aber ohne Keimsuspension angezüchtet wurden zeigt sich ein signifikant negativer Einfluss ($P = < 0,05$).

	Reihe 3	Reihe 6
Mittelwert	553500	610100
Standardabweichung	11570,4365	12977,8658
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 7.2 Standard + 0,5 ml GF + 0,5 ml Bakterienbouillon im Vergleich zu Standard + 0,5 ml GF

In Reihe 4 wurden 0,5 ml Wachstumsfaktorenlösung, 0,5 ml Bakterienbouillon und 0,5 ml Antitrypsinlösung der Konzentration 3,125 mg / ml zugegeben. Ein signifikant positiver Einfluss der Antitrypsinzugabe wird im Vergleich zu Reihe 3 sichtbar.

	Reihe 4	Reihe 3
Mittelwert	608600	553500
Standardabweichung	9876,74035	11570,4365
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 7.3 Standard + 0,5 ml GF + 0,5 ml Bakterienbouillon + 0,5 ml Antitrypsin im Vergleich zu Standard + 0,5 ml GF + 0,5 ml Bakterienbouillon

In Reihe 5 wurden 0,5 ml Antitrypsin 3,125 mg /ml zugegeben. Es zeigt sich ein geringer aber signifikanter positiver Einfluss durch die alleinige Zugabe von Antitrypsin im Vergleich zur Kontrolle (P < 0,05).

	Reihe 5	Reihe 1
Mittelwert	181100	167600
Standardabweichung	6949,82014	8770,68982
n	5	5
p	P < 0,05	

Tabelle 7.4 Standard +0,5 ml Antitrypsin im Vergleich zu Standard

In Reihe 6 wurde 0,5 ml Wachstumsfaktorenlösung zugegeben, hier zeigt sich, wie in den anderen Versuchen, ein signifikant positiver Einfluss, im Vergleich zu Reihe 4, dem Ansatz mit 0,5 ml Antitrypsin und 0,5 ml Bakterienbouillon jedoch kein signifikanter Unterschied ($P = 0,807$) Tabelle 7.5

	Reihe 6	Reihe 4
Mittelwert	610100	608600
Standardabweichung	12977,8658	9876,74035
n	5	5
p	P = 0,807	

Tabelle 7.5 Standard + 0,5 ml Bakterienbouillon im Vergleich zu Standard + 0,5 ml GF + 0,5 ml Bakterienbouillon + 0,5 ml Antitrypsin
Abbildung 7 zeigt die graphische Auswertung.

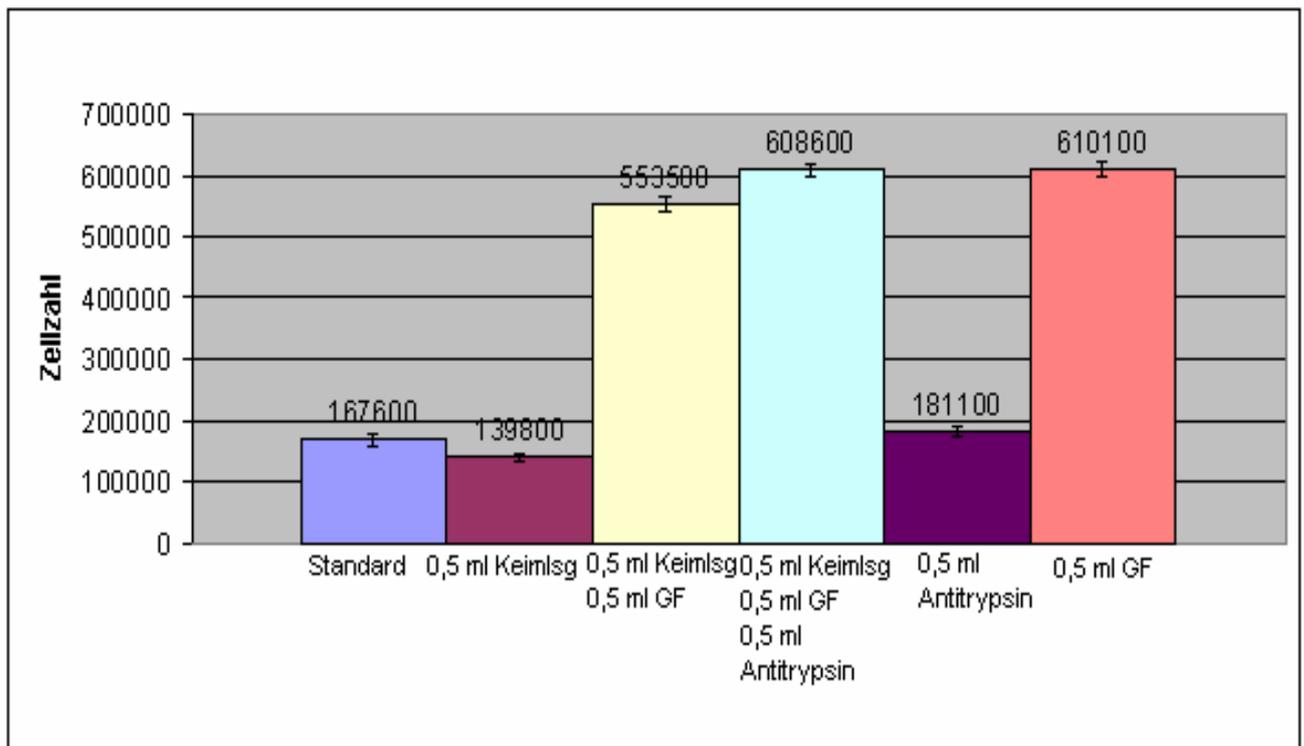


Abbildung 6

3.2.5 Einfluss von Pepstatin A in Kombination mit Wachstumsfaktoren sowie Keimlösungen auf in vitro kultivierte Fibroblasten

Bei diesem Versuch wurde Pepstatin A daraufhin untersucht, ob es einen Einfluss auf die Zellvermehrung in vitro kultivierter Fibroblasten hat und ob es den negativen Einfluss der Antiproteasen der Keimsuspension auf die Zellvermehrung der Kultur aufheben kann.

In Reihe 1 wurde die Kontrolle gezüchtet.

In Reihe 2 wurden die Zellen zusätzlich mit 0,5 ml Keimsuspension inkubiert.

Es zeigt sich der aus den vorgehenden Versuchen bekannte und auch hier reproduzierte negative Einfluss der Keimsuspension. Tabelle 8.1

	Reihe 1	Reihe 2
Mittelwert	182600	139200
Standardabweichung	8756,42621	5652,4331
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 8.1 Standard im Vergleich zu Standard + 0,5 ml Bakterienbouillon

In Reihe 3 wurden die Zellen mit 0,5 ml GF und 0,5 ml Keimsuspension (ATC 25923) inkubiert. Es zeigt sich ein signifikanter negativer Einfluss der Keimsuspension im Vergleich zu Reihe 5 , bei der nur 0,5 ml GF zugegeben wurden (P < 0,05).

	Reihe 3	Reihe 5
Mittelwert	604000	635500
Standardabweichung	12604,5627	10891,5105
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 8.2 Standard + 0,5 ml GF + 0,5 ml Keimsuspension im Vergleich zu Standard + 0,5 ml GF

In Reihe 4 wurden die Zellen mit 0,5 ml Keimsuspension, 0,5 ml GF und 0,5 ml Pepstatin A der Konzentration 1,25 mg / ml versetzt.

Im Vergleich zur Reihe 3 zeigt sich ein signifikant negativer Einfluss des Pepstatin A auf die Zellkultur ($P < 0,001$), ein aufheben des negativen Effekts der Keimsuspension ist nicht zu beobachten.

	Reihe 4	Reihe 3
Mittelwert	518300	604000
Standardabweichung	9865,34338	12604,5627
n	5	5
p	P < 0,05	

Tabelle 8.3 Standard + 0,5 ml Keimsuspension + 0,5 ml GF + 0,5 ml Pepstatin A im Vergleich zu Standard + 0,5 ml GF + 0,5 ml Keimsuspension

In Reihe 6 wurde dem Medium lediglich 0,5 ml Pepstatin A der Konzentration 1,25 mg /ml zugegeben. Im Vergleich mit der Kontrolle die nur Standardmedium enthielt zeigte sich ein signifikant negativer Einfluss des Pepstatin A auf eine Fibroblastenzellkultur.

	Reihe 6	Reihe 1
Mittelwert	140500	182600
Standardabweichung	4555,21679	8756,42621
n	5	5
p	P =< 0,05	

Tabelle 8.4 Standard + Pepstatin A im Vergleich zu Standard

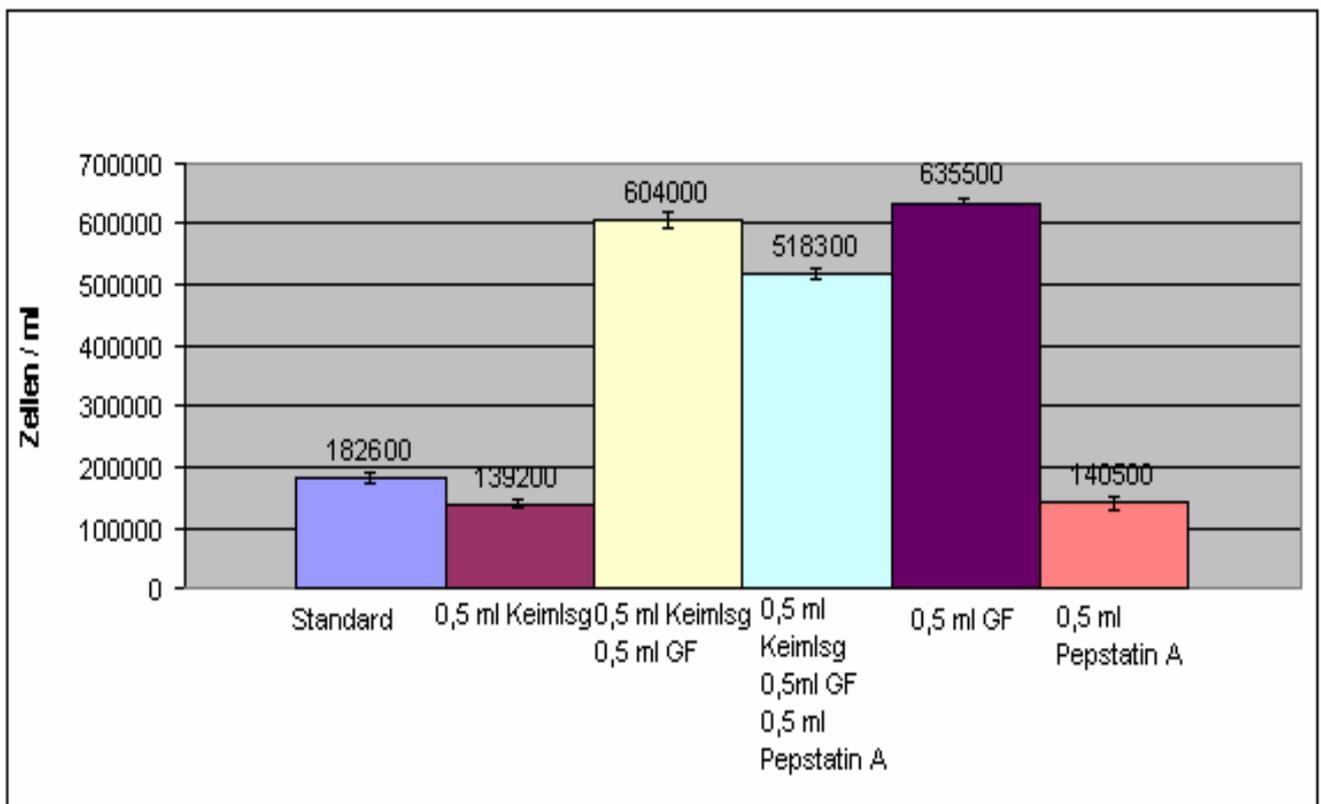


Abbildung 7

3.3 Komplikationen

Bei dem Versuchsansatz mit Erythromycin i.v. wurde zusätzlich zum im Standardmedium bereits enthaltenen Penicillin / Streptomycin Erythrocyin i.v. (Erythomycin) in der Konzentration von 0,1 mg/ml zugegeben.

Dieses führte zum Absterben der Fibroblasten. Die nur mit Standardmedium ohne Erythromycin inkubierte Kontrollkultur zeigt ein normales Wachstum. Alle Versuchsreihen mit Keimen wurden in Leinfelden Echterdingen in einem mikrobiologischen Labor durchgeführt. Hierbei wurden die Zellen unter sterilen Bedingungen in Tübingen ausgesäht und der Medienwechsel nach 6- 16 h erfolgte dann in Leinfelden Echterdingen. Es kam verkehrsbedingt zu unterschiedlichen Transportzeiten von 30 Minuten bis 60 Minuten , bei denen die Kulturschalen mit den Fibroblasten bei Raumtemperatur in einer Thermobox gelagert waren. Ein negativer Einfluss dieser Zeitperiode auf die Kulturen spiegelt sich in den Ergebnissen wider und schränkt die Möglichkeiten des direkten Vergleichs zweier Versuche ein.

Daher wurden zur besseren Vergleichbarkeit der unterschiedlichen Versuchsreihen bei jedem Versuch der Einfluss von Keimen und Wachstumsfaktoren allein und in Kombination untersucht, hierdurch lassen sich trotz der Unterschiede der verschiedenen Versuchsansätze Vergleiche ziehen.

KAPITEL 4**Diskussion**

Zellkulturuntersuchungen analog zum Wundmilieu chronischer Wunden und der Einfluss von autologen Wachstumsfaktoren, Keimsuspensionen und Antiproteasen waren der Gegenstand dieser Arbeit.

Es wurden bereits viele Studien zum Thema chronische Wunde und Wachstumsfaktoren publiziert.

Viele zeigten statistisch einen positiven Einfluss der Wachstumsfaktorenapplikation auf die Wundheilung, so z.B. die Wirkung von PDGF-BB in einer klinischen Studie mit chronischen Wunden. Pierce et al. (1994). Mustoe et al. (1989) zeigten den Einfluss von PDGF-BB auf strahlengeschädigte Fibroblasten der Ratte. Topische Anwendung von humanem EGF zeigte bei venösen Ulzera gute Ergebnisse. Falanga et al. (1992).

Smiell et al. (1999) führten eine kombinierte Analyse von 4 randomisierten Studien durch, bei denen Beclapernin Gel (rekombinantes PDGF-BB) untersucht wurde und fanden positive Ergebnisse auf die Wundheilung.

Einige zeigten keinen signifikanten Einfluss von autolog gewonnenen thrombocytären Wachstumsfaktoren in klinischen Studien an venösen Ulcera (Reuter et al. 1999) und an chronischen Wunden (Krupski et al. 1991). Die Schwierigkeit der Erhebung aussagekräftiger, statistisch relevanter Daten bei der hohen Zahl an Variablen solcher praxisnaher Versuche zeigt sich daran. Daher war der Gedanke dieser Arbeit, viele dieser Variablen auszuschliessen. Alter des Patienten, Nebenerkrankungen, Compliance und die Wundaetiologie, die bei klinischen Studien eine Rolle spielen konnten ausgeschaltet werden. Dafür handelt es sich um ein vereinfachtes Modell des chronischen Wundmilieus in vitro, an dem verschiedene Substanzenkonzentrationen und Substanzkombinationen im Hinblick auf die Zellvermehrung humaner Fibroblasten untersucht werden konnten.

Grundsätzlich wurde die Fragestellung untersucht, warum bei einigen chronischen Wunden keine oder eine nur geringe Wirkung der lokal applizierten Wachstumsfaktoren zu beobachten ist, wohingegen bei vielen anderen Wunden ein sehr deutlicher positiver Effekt statistisch nachgewiesen werden konnte.

Einige Autoren beschreiben sehr hohe Proteasenkonzentrationen in chronischen Wunden (Bennet et al. 1993)

Geht man von der Vorstellung aus, dass Proteinase u.a. bakteriellen Ursprungs in einigen chronischen Wunden in hoher Konzentration vorliegen, liegt die Vorstellung nahe, dass diese einen direkten Einfluss auf die im lokal applizierten Wachstumsfaktoren haben können. Es war also erforderlich ein Modell des chronischen Wundmilieus in vitro zu etablieren, bei dem ein positiver Effekt der Wachstumsfaktorenzugabe auf die Zellvermehrung der Fibroblastenkultur nachzuweisen ist. In einem zweiten Schritt war nachzuweisen, dass eine zugegebene Versuchslösung mit Proteasen bakteriellen Ursprungs als Modell der chronischen Wundflüssigkeit den positiven Effekt der Wachstumsfaktoren auf die Zellvermehrung der Fibroblastenkultur aufheben oder verringern kann.

Dann wurde schliesslich untersucht, ob durch Einsatz von Antiproteasen verschiedener Klassen ein Aufheben des negativen Effekts der Proteasen, die in den Versuchslösungen enthalten sind, auf die Wirksamkeit der Wachstumsfaktoren auf die Fibroblastenkultur nachgewiesen werden kann. Die Angiogeneese und das Immunsystem, die bei der Heilung chronischer Wunden auch eine entscheidende Rolle spielt, konnte mit diesem Versuchsansatz nicht erfasst werden.

Zunächst wurde der Einfluss der gewonnenen autologen thrombocytären Wachstumsfaktoren auf die Fibroblastenkultur untersucht. Es zeigte sich ein signifikant positiver Effekt auf die Zellvermehrung nach 7 Tagen Inkubationsdauer.

Bei einer Konzentration von 1 /20 Wachstumsfaktorenlösung zum Standardmedium, konnte eine um das 2,5 fach höhere Vermehrungsrate erreicht werden als bei der Kontrollkultur die nur mit dem Standardmedium angezüchtet wurde. Durch die noch steigende Wachstumsfaktorenkonzentration von 1 /10 stieg die Rate auf das 3,28 fache der Kontrollkultur.

Damit lässt sich ein positiver Einfluss der von uns gewonnenen und benutzten autologen Wachstumsfaktorenlösung postulieren, der als Grundlage der weiteren Versuche diene.

Als weitere Grundlage musste nun ein der chronisch infizierten Wunde entsprechendes Milieu gefunden werden, hier lag die Annahme nahe, dass Flüssigkeit aus einer chronischen Wunde gewonnen und mittels Bestrahlung sterilisiert geeignet sein müsste (siehe 2.3.8). In einer weiteren Versuchsreihe wurde nun der Einfluss dieses gewonnenen Wundexsudats im Hinblick auf die Vermehrung der Fibroblastenkultur untersucht.

In Versuchsreihe 3.1.2 zeigte sich jedoch kein signifikanter Einfluss auf die Verminderung der Fibroblasten vor und nach Inkubation.

In geringer Konzentration (1/20) zugefügt, zeigt sich ein statistisch nicht signifikanter, tendenziell jedoch negativer Effekt (Reihe 2 Versuch 3.1.2). Dies war durchaus durch die geringe Konzentration an Wundexsudat erklärbar. Es zeigte sich jedoch, dass bei Erhöhung der Konzentration des Wundexsudats auf 1/10 des Versuchsmediums (Reihe 3 Versuch 3.1.2) eine tendenziell, wenn auch nicht statistisch signifikante Vermehrung der Zellteilungsrate.

Im Wundexsudat enthaltene Wachstumsfaktoren weisen einen positiven Effekt auf die Zellvermehrung auf, sie können also alleine für diesen Effekt nicht verantwortlich gemacht werden.

Vielmehr ist ein Einfluss der Metalloproteinasen 2,3,9 (Wall, S.J., Bevan, D., Thomas, D.W, Harding, K.G., Edwards D.R., Murphy, G. 2002) zu vermuten, die in chronischen Wunden vorhanden sind .

Desweiteren finden sich in chronischen Wunden sehr hohe Spiegel an TNF- α und IL-1 β (B.A. Mast, G.S. Schultz 1997) die bei Zugabe von 1/10 und 1/20 verdünntem Wundexsudat nicht mehr in derselben hohen Konzentration vorliegen, wie im Milieu der chronischen Wunde selbst.

Trengrove, N.J, Bielefeldt-Ohmann, H ., Stacey, M.C. (2000) zeigten, dass in früheren Studien die in Wundexsudat aus chronischen Wunden gemessenen Spiegel an Zytokinen und Wachstumsfaktoren nicht repräsentativ waren. Dies lag ihrer Meinung nach an der Verarbeitung des Wundexsudats bis zur Auswertung der Spiegel. So zeigten z.B. Fivenson et al. (1997) in einer Untersuchung über einen Zeitraum von 8 Wochen keine signifikante Änderung der Zytokinpiegel in Biopsien und Wundexsudat chronischer Wunden. Sie führten vor jeder Biopsieentnahme und Wundexsudatentnahme allerdings ein chirurgisches Wunddebridement durch, welches das Milieu einer chronischen Wunde verändert. Zum anderen wurde Wundexsudat über einen Zeitraum von 7 Tagen in einem saugfähigen Schwamm gesammelt, sodass proteolytische Vorgänge in diesem Zeitraum anzunehmen sind und das untersuchte Wundexsudat nicht mehr dem in vivo vorliegenden entspricht.

Wir sammelten das Wundexsudat über einen Zeitraum von 3 Tagen, auch hier kann die von

Trengrove N.J, Bielefeldt-Ohmann, H ., Stacey, M.C. (2000) postulierte, dass die Abnahme an Zytokinen und Wachstumsfaktoren bis zur Auswertung eine Rolle spielen und die nicht signifikante Wirkung unseres Wundexsudats erklären.

Die Wirkung des Wundexsudats wurde nun in Verbindung mit Wachstumsfaktoren untersucht. (3.1.3)

Bei diesem Versuchsansatz wurde eruiert, ob sich bei unserem Modell ein Einfluss des Wundexsudats auf die Wirkung der autologen humanen Wachstumsfaktoren zeigt. Hierzu wurde ein Ansatz mit Standardmedium + 0,25 ml Wundexsudat + 0,25 ml Wachstumsfaktoren gewählt und ein Ansatz mit 0,5 ml Wundexsudat + 0,5 ml Wachstumsfaktoren.

Es zeigte sich, dass durch das verwendete Wundexsudat der positive Effekt der Wachstumsfaktoren auf die Zellvermehrung der Fibroblasten nicht beeinflusst werden kann. (Abbildung 4)

Ursache hierfür mag im Mangel an Proteasen speziell bei dem von uns benutzten Wundexsudat liegen, bezogen auf die im Überschuss vorhandenen Wachstumsfaktoren ,wie bei der Diksussion von Versuch 3.1.2 besprochen.

Um ein Modell des chronischen Wundmilieus mit Proteasen bakteriellen Ursprungs zu erzeugen wurde eine Bakterienbouillon mit *Staphylococcus aureus* ATCC 25322 entwickelt (2.4.8). Chronisch infizierte Wunden weisen diesen proteasenbildenden Keim am häufigsten auf. Bowler,P (1998)

Bei dem anschliessenden Versuchsansatz wurden die Kulturen mit Bakterienbouillon, Wachstumsfaktorenlösung und Erythrocin i.v. (Erythromycin) der Konzentration 1mg/ml angezüchtet.

Der Zusatz von Erythromycin sollte sicherstellen, dass sowohl die Proteasen der Bakterienbouillon erhalten blieben, aber ein Einfluss lebender Keime auf die Fibroblastenkultur mit relativer Sicherheit ausgeschlossen werden konnte.

Es kam zum Ablösen und Tod der Fibroblastenkulturen, denen das Erythromycin im Verhältnis 1/10 zugesetzt wurde, unabhängig vom Zusatz von Bakterienbouillon oder Wachstumsfaktorenlösung. Die Kontrollkultur wuchs indessen unbeeinträchtigt.

Schlussfolgerung war, dass Erythomycin in der von uns in Anlehnung an die physiologischen Spiegel bei der Antibiotikatherapie beim Menschen

verwendeten Konzentration zelltoxisch auf eine in Dulbeccos modified Eagle medium gezüchtete Fibroblastenkultur wirkt.

Ob sich auch in klinischen Studien die topische Anwendung von Erythromycin bei chronischen Wunden zur Verringerung der Keimlast als ungeeignet herausstellt kann hier nur vermutet werden, zumal die in vivo Verhältnisse ein deutlich komplexeres Milieu darstellen als unsere Versuchsreihen.

In allen anderen Versuchen wurde auf Zusatz von weiteren Antibiotika zu den im Standardmedium enthaltenen Penicillin/ Streptomycin (5000 U/ml Penicillin G , 5000 µg/ml Streptomycinsulfat) verzichtet.

Zur weiteren Untersuchung wurde der Kultur Bakterienbouillon, Wachstumsfaktorenlösung (GF) und Aprotinin zugesetzt, um deren Auswirkung zu beobachten. (Versuch 3.2.3, Abb. 6)

Es zeigte sich ein statistisch signifikanter negativer Einfluss der Bakterienbouillon als vereinfachtes Modell des chronisch infizierten Wundmilieus im Vergleich zur Kontrolle.

Es kam auch zu einer signifikant verringerten Zellvermehrungsrate der Fibroblasten, wenn man die Kultur der Wachstumsfaktoren und Keime zugesetzt wurden mit der Kultur vergleicht, der nur Wachstumsfaktoren zugesetzt wurden.

Ein Aufheben der negativen Keimwirkung auf die Vermehrung der Fibroblasten gelingt also mit Wachstumsfaktoren alleine nicht. Dies kann ein Hinweis auf Wirkung der bakteriellen Proteasen der Bakterienbouillon sein.

Alleinig zugesetztes Aprotinin, 1/10 verdünnt der Konzentration 10mg/ml zeigte einen negativen Einfluss im Vergleich zur Kontrolle. Es zeigt sich ein negativer Einfluss des Aprotinins auf die Vermehrung der Fibroblastenkulturen in vitro.

In einem weiteren Versuchsansatz (Versuch 3.2.3, Abb. 6) wurde untersucht ob Aprotinin den negativen Effekt der Bakterienbouillon auf die Kulturen mit und ohne Zusatz von Wachstumsfaktoren beeinflusst.

Es zeigte sich, dass Aprotinin in Kombination mit Wachstumsfaktoren und Bakterienbouillon einen negativen Einfluss hat, im Vergleich zu einer Kultur nur mit Wachstumsfaktoren und Keimen, somit Aprotinin in unserer Versuchsanordnung nicht nachweisbar als Hemmstoff der bakteriellen Proteasen der Bakterienbouillon wirkt, sondern selbst allein oder in Kombination zugegeben einen negativen Einfluss auf die Zellvermehrung hat.

Einerseits lässt dies den Schluss zu, daß Serinproteasen, die von Aprotinin gehemmt werden eine Rolle bei der Zellvermehrung unserer Fibroblastenkultur spielen, andererseits konnte keine Hemmung der negativen Bakterienbouillonwirkung aufgezeigt werden, sodass davon auszugehen ist, dass bakterielle Proteasen zumindest nicht in relevantem Ausmaß von Aprotinin gehemmt werden. Soeparwata et al. (1996) untersuchten die Aprotininwirkung im Hinblick auf Entzündungsmediatoren wie IL-6, IL-8, IL-1 β , TNF- α im Plasma bei Patienten mit kardiopulmonalen Eingriffen. Sie exponierten Immunozyten dem Plasma von frischoperierten Patienten und stellten fest, dass Aprotinin die Aktivierung von Immunozyten deutlich reduziert. Vor allem die IL-8 und IL-6 Plasmalevel sanken stark. Wenn man bedenkt, dass diese Faktoren eine noch nicht endgültig erforschte Rolle bei der Zellvermehrung und Wundheilung spielen, lässt sich durchaus eine Parallele ziehen.

Muir, I.F.K. (1998) untersuchte den Einfluss von Zytokinen auf Fibroblasten und zeigte einen direkten Einfluss der IL-1 Sekretion von Lymphozyten auf Fibroblasten.

Aprotinin zeigte in unserer Versuchsreihe durchweg einen negativen Einfluss auf die Zellvermehrung der Fibroblastenkultur in vitro, eine mögliche Erklärung läge in den verringerten Zytokinkonzentrationen die bei Zellteilung und Wundheilung entscheidende Rollen spielen.

Wir untersuchten Antitrypsin in einem vergleichbaren Versuchsansatz (Versuch 3.2.4, Abb. 7) und stellten fest, dass die Zugabe von Antitrypsin zur Kultur im Vergleich zur Kontrolle einen signifikanten leicht positiven Einfluss

hatte. Im Vergleich zur Kontrolle wuchsen pro ml Versuchslösung im Schnitt 181100 Zellen, in der Kontrolle 167600 / ml, also 1,08 mal mehr.

Die bisher in der Literatur beschriebene Wirkung als Serin-Antiproteinase und die beschriebenen Effekte auf Trypsin, Chymotrypsin, Granulozyten – Elastase, Pankreas – Elastase und Acrosin (Beynon, R.J., Bond, J.S., 1989) alleine erklärt dies nicht. Erklärung kann nur eine Interaktion mit im Standardmedium vorhandenen Wachstumsfaktoren (fetales Kälberserum) oder eine Interaktion mit bei der Zellvermehrung von der Zellkultur selbst gebildeten Proteasen sein. Vergleicht man den Ansatz in Reihe 4 (Abb. 7) GF, Antitrypsin und Bakterienbouillon mit dem Ansatz in Reihe 3 GF und Bakterienbouillon, erkennt man den Effekt der Antitrypsinzugabe. Es wachsen signifikant mehr Zellen unter Zusatz von Antitrypsin. Nach 7 Tagen waren beim Ansatz mit Antitrypsin im Mittel 608600 Zellen / ml gewachsen, im Vergleich zu nur 553500 Zellen / ml ohne, also 1,099 mal mehr. Betrachtet man dieses Ergebnis im Vergleich zu dem Ansatz in dem die Antitrypsinzugabe mit der Kontrolle verglichen wurde, kann man nicht sicher postulieren, dass die Antitrypsinwirkung auf Hemmung der Proteasen in der Bakterienbouillon zurückzuführen ist, wohl aber , dass sie nicht durch letztere selbst gehemmt wurde.

Der Vergleich des Ansatzes GF (Reihe 6 Versuch 3.24) und des Ansatzes Antitrypsin, Bakterienbouillon und GF zeigt keinen signifikanten Unterschied. Dies unterstreicht die positive Wirkung des Antitrypsins ohne jedoch den Beweis zu liefern, dass der zugrunde liegende Mechanismus eine Hemmung bakterieller Proteasen war.

Versuchsansätze mit quantitativer Auswertung der in den Versuchslösungen enthaltenen Proteasen / Antiproteasen könnten hier Aufschluss bringen.

Wir untersuchten die Wirkung von Pepstatin A auf die Kulturen.

(Versuch 3.2.5, Abb. 8) Pepstatin ist ein niedermolekularer, stark spezifischer Inhibitor für saure Proteasen (im speziellen Aspartat - Proteasen).

Es hat sich gezeigt, daß nahezu alle sauren Proteasen inhibiert werden, einschließlich Pepsin, Renin, Cathepsin D, Chymosin, Protease B aus *Aspergillus niger* und Proteasen mikrobischen Ursprungs.

(Barrett, A.J. & Dingle, J.T. (1972), Poole, A.R., Dingle, J.T. & Barrett, A.J. (1972)).

Bislang ist der Hemmungmechanismus durch Pepstatin nicht bekannt. Es wird angenommen, dass der Statin-Rest von Pepstatin hauptsächlich für die Wirkung verantwortlich ist.

Wir beobachteten bei Zugabe von Pepstatin A einen negativen Einfluss auf die Zellvermehrung unserer Fibroblastenkultur. (Tabelle 8.4).

Dies kann zeigen, dass saure Proteasen bei der normalen Zellvermehrung von Fibroblasten eine Rolle spielen, da diese von Pepstatin A selektiv inhibiert werden.

Vergleicht man die Zellvermehrung der Kultur unter Zugabe von Wachstumsfaktoren , Keimlösung und Pepstatin A mit der ohne Pepstatin A (Abb 8. Reihe 3, 4, Tabelle 8.3), zeigt sich ein deutlicher negativer Einfluss. Eine Hemmung der bakteriellen Proteasen neben der bekannten ansich negativen Wirkung auf die Zellkultur lässt sich nicht zeigen. Im Gegenteil, der negative Effekt der Zugabe von Keimlösung wird noch verstärkt, die Zellzahl/ml nach einer Woche lag deutlich unter die der Versuchsreihe in der Keimlösung und Wachstumsfaktoren getestet wurden. (Abb 8. Reihe 3, 5, Tabelle 8.2)

Wir konnten bei unseren Versuchen keinen Anhalt dafür finden, dass die Antiproteasenzugabe eine Reduktion des negativen Effekts der in der Keimlösung enthaltenen Proteasen auf die Zellvermehrung der Fibroblastenkultur in vitro zeigt. Trengrove N.J, Bielefeldt-Ohmann, H ., Stacey, M.C. (2000) untersuchten Wundflüssigkeit von chronisch nichtheilenden Wunden der unteren Extremität und fanden erhöhte Spiegel bei Il-6, Il-1 und TNF α . Dagegen waren die Spiegel an PDGF, EGF, bFGF, TGF β im Vergleich zu den normal heilenden Wunden nicht signifikant verändert.

KAPITEL 5

Zusammenfassung

Chronische Wunden sind seit langem Objekt klinischer Forschung und zahlreicher Studien. Autologe thrombozytäre Wachstumsfaktoren werden zur Behandlung chronischer Wunden eingesetzt, ihre Wirkung wurde in Studien belegt. Bei einem Teil der behandelten Patienten konnte jedoch keine Wirkung festgestellt werden.

Ziel dieser Studie war die Erforschung des Einflusses von autologen thrombozytären Wachstumsfaktoren, bakteriellen Proteasen in einer definierten Keimlösung, definierten Antiproteasen auf in vitro kultivierte humane Fibroblasten.

Es zeigte sich ein signifikanter positiver Effekt von thrombozytären Wachstumsfaktoren auf die Fibroblastenkultur. In einer Konzentration von 1/20 zum Standardmedium zugegeben stieg die Zellzahl der Kultur nach 1 Woche auf das 2,5 fache der Kontrollkultur. In einer Konzentration von 1 /10 zugegeben führten die Wachstumsfaktoren zu einem 3,5 fachen Anstieg. Untersuchtes Wundexsudat einer chronischen Wunde zeigte unter sterilen Bedingungen keine signifikante Wirkung auf die Vermehrung der Fibroblasten. Definierte Keimlösungen des Keims *Staphylococcus aureus* ATC25322 zeigten, 1 /10 zum Standardmedium zugegeben einen signifikant negativen Einfluss auf die Zellzahl der Kultur nach 1 Woche, sowohl bei der Kontrollkultur als auch bei mit Wachstumsfaktoren angezüchteten Kulturen.

Aprotinin hatte, in der Konzentration 0,001 g/l zugegeben, einen signifikant negativen Einfluss auf die Zellkulturen, sowohl in Kombination mit Wachstumsfaktoren als auch mit Keimlösung.

Antitrypsin zeigte einen signifikant positiven Effekt auf die Zellvermehrung in vitro, sowohl in Kombination mit Keimen als auch mit Keimen und Wachstumsfaktoren. Auch der alleinige Zusatz von Antitrypsin in der Konzentration 0,3125 mg/ml zum Standardmedium förderte die Zellvermehrung der Fibroblastenkultur.

Pepstatin A zeigte sowohl alleinig in der Konzentration 0,125mg/ml als auch in Kombination mit Wachstumsfaktoren und Keimen einen negativen Einfluss auf die Vermehrung der Zellkultur.

Erythromycin (Erythrocin i.v.®) zeigte in der Konzentration 0,1mg /ml zum Standardmedium zugegeben eine zelltoxische Wirkung auf in vitro kultivierte Fibroblasten.

Wir haben gezeigt, daß die Zugabe von autologen Wachstumsfaktoren zu einer Fibroblastenkultur zu einer signifikant gesteigerten Zellvermehrungsrate führt. Der signifikant negative Einfluss der von uns verwendeten Keimlösung konnte nachgewiesen werden. Die von uns untersuchten Antiproteasen konnten, bis auf Antitrypsin, keine signifikante Steigerung der Zellvermehrung einer mit Keimlösung versetzten Fibroblastenkultur herbeiführen.

KAPITEL 6 Literatur

Anderrson, M., Östman, A., Backström, G., Hellmann, U., George-Nascimento, C., Westermark, B., Heldin, C.H.

Assignment of interchain disulfide bonds in platelet-derived growth factor (PDGF) and evidence for agonist activity of monomeric PDGF

J. Biol. Chem. (1992)267: 11260-11266

Anonym

Microbiology of food and animal feeding stuffs - Horizontal method for the enumeration of coagulase-positive staphylococci (*Staphylococcus aureus* and other species), Part 2: Technique using rabbit plasma fibrinogen agar medium.

ISO Norm 6888-2; International Organization for Standardization.

Baum, E.Z., Bebernitz, G.A., Gluzman, Y.

Beta-galactosidase containing a human immunodeficiency virus protease cleavage site is cleaved and inactivated by human immunodeficiency virus protease.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1990; 87 : 10023-7.

Barrett, A.J. & Dingle, J.T.

The inhibition of tissue acid proteinases by pepstatin

Biochem. J. (1972) 127: 439

Bennet, N.T., Schultz, G.S.

Growth factors and wound healing : biochemical properties of growth factors and their receptors

Am.J.Surg. (1993) 165:728-737

Beynon, R.J., Bond, J.S.

Ed. Proteolytic enzymes: a practical approach. Oxford: IRL

(1989) 248-249

Bowler, P.

The anaerobic and aerobic microbiology of wounds.

Wounds 10 (1998) 170 :78

Cupp, C.L., Bloom, D.C.

Gene Therapy, electroportation, and the future of wound-healing therapies.

Facial. Plast. Surg. (2002) 18(1):53-7

Dietrich W., Mossinger H., Spannagl M., et al.

Hemostatic activation during cardiopulmonary bypass with different aprotinin dosages in pediatric patients having cardiac operations. J Thorac Cardiovasc

Surg. (1993) 105: 705-11

Dissemond, J.

Biochirurgie – Wundbehandlung mit Fliegenmaden.

Hartmann Wundforum 1/2001 : 27

Embil, J.M. , Nagai, M.K.

Beclapermin : recombinant platelet derived growth factor, a new treatment for healing diabetic foot ulcers.

Expert Opin. Biol. Ther. (2002) 2:211-8

Falanga, V., Eaglstein, W., Bucalo, B., Katz, M.H., Harris, B., Carson, P.

Topical use of human recombinant epidermal growth factor (h-EGF) in venous ulcers

J.Dermatol.Surg.Oncol. (1992) 18:604-606

Fivenson, D.P., Faria, D.T., Nickoloff, B.J., Poverini, P.J., Kunkel, S., Burdick, M., Strieter, R.M.

Chemokine and inflammatory cytokine changes during chronic wound healing.

Wound Rep.Reg. (1997) 5:310-22

Genever, P.G., Wood, E.J., Cunliffe, W.J.

The wounded dermal equivalent offers a simplified model for studying wound repair in vitro.

Exp. Dermatol. (1993) 2 (6):266-73

Gossiau, A., Dittrich, W., Willig, A., Jaros, P.P.

Cytological effects of platelet-derived growth factor on mitochondrial ultrastructure in fibroblasts.

Comp. Biochem. Physiol. A. Mol. Integr. Physiol. (2001) 128 (2):241-9

Janssens M.,Joris J.,David J.L.,et al.,

High-dose aprotinin reduces blood loss in patients undergoing total hip replacement surgery.

Anesthesiology (1994) 80: 23-9

Jaumann, M., Hoppe, V., Tatje, D., Eichner, W., Hoppe, J.

On the structure of platelet-derived growth factor AA: C-terminal processing, epitopes, and characterization of cystein residues.

Biochemistry (1991) 30: 3303-3309

Jungtäubl, H., Peus, D., Wlaschek, M., Kirchberg, K., Meyer-Ingold, W., Plewig, G., Scharfetter-Kochanek, K.

The integrated response of human dermal fibroblast to different cytokine combinations.

Arch. Dermatol. Res. (1994) 286: 162-163

Katoh, I. et al. (1987)

(1987) Nature 329,654-6

Köveker, G.

Growth factors in clinical practice

Int. J. Clin.Pract. (2000) 54 (9) : 590-3

Krupski, W.C., Reilly, L.M., Perez, S., Moss, K.M., Crombleholme, P.A., Rapp, J.H.

A prospective randomized trial of autologous platelet-derived wound healing factors treatment of chronic nonhealing wounds: a preliminary report

J.Vasc.Surg. (1991) 14:526-532

Lepisto, J., Peltonen, J., Vaha-Kreula, M., Niinikoski, J., Laato, M.

Platelet-derived growth factor isoforms PDGF-AA, - AB and –BB exert specific effects on collagen gene expression and mitotic activity of cultured human wound fibroblast.

Biochem. Biophys. Res. Commun. (1995) 209 (2):393-9

Lippert , H.

Wundatlas – Wunde, Wundbehandlung und Wundheilung Barth Verlag in MVH Medizinverlage, Heidelberg (2001)

Maciniszyn, J., Hartsuck, J.A., Tang, J.

J. Biol. Chem. (1976) 251 22:7088

Mast, B.A., Schultz , G.S.

Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds, Wound Repair and Regeneration (1996) 4: 411-420

Muir, I.F.K.

Control of fibroblast activity in scars: a review

Eur. J. Surg. (1998) 21 :1-7

Mustoe, T.A ., Prudy, J., Gramates, P., Deuel, T.F., Thomason, A., Pierce, G.F.

Reversal of Impaired Wound Healing in Irradiated Rats by Platelet-Derived Growth Factor-BB

The American Journal of Surgery (1989) 158 :345-350

Neuhaus P., Bechstein W.O., Lefebvre B., et al.

Effect of aprotinin on intraoperative bleeding and fibrinolysis in liver transplantation [letter]. Lancet (1990) 2: 924-5

Oefner, C., D´Arcy, A., Winkler, F.K., Eggiman, B., Hosang, M.

Crystal structure of human platelet-derived growth factor-BB
EMBO J. (1991) 11: 3921-3926

Piazuelo, J., Jimenez, P., Lanas, A., Garcia, A., Esteva, F., Sainz, R.

Platelet derived growth factor and epidermal growth factor play a major role in human colonic fibroblast repair activities.
Eur. Surg. Res. (2000) 32 (3):191-6

Poole,A.R., Dingle,J.T. & Barrett,A.J.

The immunocytochemical demonstration of cathepsin D
J. Histochem. Cytochem. (1972) 20:261-265

Reutter, H.,Bort, S., Jung, M., Klysc, T., Schippert, W., Zuder, D., Junger, M.

Fragliche Wirksamkeit autologer thrombocytärer Wachstumsfaktoren (PDWHF) in der Behandlung chronisch venöser Beinulzera
Hautarzt (1999) 50:859-865

Sheridan W.G., Shandall A.A., Alexander-Williams J., et al.

A multicenter trial of the use of the proteolytic enzyme inhibitor aprotinin in colorectal surgery.
DIS Colon Rectum (1989) 32:505-8

Smiell, J.M., Wieman, T.J., Steed, D.L., Perry, B.A., Sampson, A.R., Schwab, B.H.

Efficacy and safety of beclapernin (recombinant human platelet-derived growth factor-BB) in patients with nonhealing, lower extremity diabetic ulcers : a combined analysis of four randomised studies
Wound. Repair Regen. (1999) 7 :335-346

Soeparwata, R., hartman, A.R., Frerichman, U., Stefano, G.B., Scheld, H.H., Bilfinger, T.V.

Aprotinin diminishes inflammatory processes
Int. J. of Card. 53 Suppl. (1996) 55-63

Soma, Y., Grotendorst , G.R.

TGF- β Stimulates Primary Human Skin Fibroblast DNA Synthesis via Autocrine Production of PDGF-Related Peptides
Journal of Cellular Physiology (1989) 140: 246-253

Stacey, M.C., Mata, S.D., Trengrove, N.J., Mather, C.A.

Randomised double-blind placebo controlled trial of topical autologous platelet derived lysate in venous ulcer healing.
Eur J Vasc Endovasc Surg 2000;20 (3):296-301

Steed, D.L.

Clinical evaluation of recombinant human platelet-derived growth factor for the treatment of lower extremity diabetic ulcers. Diabetic Ulcer study Group
J. Vasc. Surg. (1995) 21 :71-81

Trasylool package insert

Trasylool package insert (Bayer-US), Rev 12/1994 Rec 12/1994

Trengrove N.J, Bielefeldt-Ohmann, H ., Stacey, M.C.

Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing chronic leg ulcers

Wound Rep. Reg. (2000) ;8:13-25

Wall, S.J., Bevan, D., Thomas, D.W, Harding, K.G., Edwards D.R., Murphy, G.

Differential expression of matrix metalloproteinases during impaired wound healing of the diabetes mouse.

Journal of Investigative Dermatology (2002) 119 (1):91-8.

Wiemann T.J.. Smiell, J.M., Su,Y.

Efficacy and safety of a topical gel formulation of recombinant human platelet – derived

Growth factor-BB (becaplermin) in patients with chronic neuropathic diabetic ulcers. A Phase III randomized placebo-controlled double-blind study Diabetes Care (1998) 21:822-827

Wollina, U. (2000)

Therapie chronischer Wunden – Stiefkind der modernen Medizin ?

Akt. Dermatol. (2000) 26 Sonderheft 1: 20-28

Xu, J., Clark, R.A.F.

Extracellular Matrix Alters PDGF Regulation of Fibroblast Integrins
The Journal of Cell Biology (1996), Vol. 132,N° 1&2, 239-24

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bFGF	basic fibroblast growth factor
CVI	chronisch venöse Insuffizienz
DMEM	Dulbeccos' s modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
Fa.	Firma
FCS	fetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
GF	Wachstumsfaktoren
IL-1 β	Interleukin-1 β
IL-2	Interleukin-2
IL-6	Interleukin-6
IL-8	Interleukin-8
KBE	Koloniebildende Einheiten
kD	Kilodalton
Keimlsg	Bakterienbouillon
LiCl	Lithiumchlorid
LSD	least significance difference
MW	Mittelwert
NaCl	Kochsalz
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung
PD	Population doubling
PDGF	platelet-derived growth factor
PDGF-BB	homodimer B des platelet-derived growth factor
PNP	Polyneuropathie
RPFA	Rabbit Plasma Fibrinogen Agar
SD	Standardabweichung
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TGF- α	transforming growth factor α
TGF- β	transforming growth factor β
TK	Thrombozytenkonzentrat
TNF- α	Tumornekrosefaktor α
U/min.	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
WE	Wundexsudat

Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name : Patrick Michael Enno Holl
geboren am : 27 Dez. 1974
in: Heilbronn
Konfession: ev.
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1981 – 1985 Grundschole Sölling Kehl
1985 – 1994 Einstein-Gymnasium Kehl

Hochschulbildung:

1995 - 2000 Studium der Humanmedizin an der Universität
Tübingen
08.2000 - 08.2001 Praktisches Jahr am städt. Krankenhaus
Sindelfingen
9.11.2001 Staatsexamen.

Beruflicher Werdegang:

1997 1. Famulatur am Kreiskrankenhaus Offenburg
Klinik für Kardiologie und Pneumologie.
1999 2. Famulatur am Kreiskrankenhaus Kehl,
Chirurgische Klinik.
2000 3. + 4. Famulatur in der Allgemeinarztpraxis
Dr. Binder 79848 Bonndorf im Schwarzwald
2000 – 2001 Praktisches Jahr am städtischen

	Krankenhaus Sindelfingen, Lehrkrankenhaus der Universität Tübingen Wahlfach Orthopädie.
12.2001 – 5.2003	Arzt im Praktikum am Kreiskrankenhaus Kehl, Fachabteilung Chirurgie mit Schwerpunkt Viszeral- und Unfallchirurgie.
5.2003 – 5.2004	Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Kehl, Fachabteilung Chirurgie mit Schwerpunkt Viszeral- und Unfallchirurgie.
Seit 1.6.2004	Assistenzarzt der Orthopädischen Klinik der Klinik am Eichert in Göppingen