

Diplomarbeit

Chronische Wunden - Innovative enzymbasierte Diagnosemöglichkeit infizierter Wundflüssigkeiten

eingereicht von

Eliabeth Biebl

geboren am 24.08.1986

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor(in) der gesamten Heilkunde

(Dr. med. univ.)

an der

Medizinischen Universität Graz

ausgeführt an der

Klinischen Abteilung für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie

unter der Anleitung von

Univ. Prof. Dr. Michael Schintler

und

OA. Dr. Eva Prandl

Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.

Graz, am 27.04.2012

Unterschrift

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt meinen beiden Betreuern Prof. Dr. Michael Schintler und Dr. Eva Prandl, die stets bei Problemen und Fragen jeglicher Art verfügbar waren und mich von Beginn an hervorragend unterstützt haben.

Weiters gebührt mein Dank den Mitarbeiterinnen der TU Graz, Dr. Eva Wehrschütz-Sigl und Doris Schiffer, die mich geduldig in die Laborarbeit eingeführt haben und mir maßgeblich beim Erlangen und bei der Auswertung der Daten geholfen haben.

Zusammenfassung

Problemstellung

Die Diagnose einer Wundinfektion erfolgt gewöhnlich klinisch durch Erfassung der klassischen Entzündungszeichen Rubor (Rötung), Calor (Überwärmung) Tumor (Schwellung) und Dolor (Schmerz) durch erfahrene Ärzte einerseits, andererseits durch aufwendige und zeitraubende diagnostische Prozeduren. Zur Zeit gibt es am riesigen Markt der Wundbehandlung kein rasches diagnostisches Tool zur Evaluation einer Wundinfektion, welches insbesondere im Heimversorgungsbereich von Patienten mit chronischen Wunden von großem Wert wäre.

Material und Methodik

In dieser Studie wurde ein neues Konzept für einen Schnelltest zur Feststellung einer Wundinfektion basierend auf einer Lysozym und Elastase getriggerten Freisetzung aus Farbstoffen aus einer Peptidoglykanmatrix untersucht. Die Matrix bestand aus Alginate/Agarose und Peptidoglycane in einer kovalenten Bindung mit Remazol Brilliant Blau. Die Lysozymaktivität in postoperativen und Dekubituswundflüssigkeiten war signifikant erhöht bei infizierten Wunden (4,830 + 1,848 U mL⁻¹) im Vergleich zu nicht infizierten Wunden (376 + 240 U mL⁻¹).

Ergebnisse

Folglich führte die Inkubation von 8 % (w/v) gebundener Agarose/Peptidoglycan-Mischung mit infizierter Wundflüssigkeit über 2 Stunden bei 37°C zu einer 4-fach höheren Farbstofffreisetzung im Vergleich zu nichtinfizierter Wundflüssigkeit. Bei Alginate/Peptidoglycan Ketten wurde ein 7-fach höheres Ausmaß von Farbstoffen freigesetzt bei infizierter Wundflüssigkeit im Vergleich zu nicht infizierter. Abgesehen von Lysozym wurden auch Proteasen (z.B. Gelatinase MMP-2 und MMP-9 und

Elastase) in Wundflüssigkeiten festgestellt. Ein leicht synergistischer Effekt wurde festgestellt für Peptidoglycan Hydrolyse (d.h. Farbstofffreisetzung zwischen Lysozym und diesen Proteasen).

Schlussfolgerung

Die Inkubation eines doppel beschichteten Systems aus gefärbten und ungefärbten Peptidoglycanen mit infizierter Wundflüssigkeit resultierte in einem Farbumschlag von gelb zu blau und somit zu einer simplen visuellen Diagnose einer Wundinfektion.

Abstract

Purpose of the study

Diagnosis of wound infection is based on the well known “traditional signs of inflammation” like rubor (redness), calor (heat), tumor (swelling) and dolor (pain) by experienced doctors and/or resource consuming and expensive procedures. At present there is no rapid diagnostic device on the market for the detection of wound infection which would especially be helpful in home care of chronic ulcer patients [1]

Material and methods

In this study, a new concept for a fast diagnostic tool for wound infection based on lysozyme and elastase triggered release of dye from a peptidoglycane matrix was investigated. The matrix consisted of alginate/agarose and peptidoglycane covalently labelled with Remazol Brilliant Blue (RBB). Lysozyme activity in post operative wounds and decubitus wound fluids was significantly elevated upon infection ($4,830 \pm 1,848 \text{ U mL}^{-1}$) compared to non infected wounds ($376 \pm 240 \text{ U mL}^{-1}$) [1].

Results :

Consequently, incubation of 8% (w/v) labelled agarose/peptidoglycane blend layers with infected wound fluid samples for 2 hours at 37°C resulted in a 4 fold higher amount of dye released than measured for non-infected wounds. For alginate/peptidoglycane beads a 7 fold higher amount of dye was released in case of infected wound fluid samples compared to not-infected ones. Apart from lysozyme, proteases (i.e. gelatinase MMP-2 and MMP-9 and elastase) were detected in wound fluids (e.g. using Western plotting). When dosed in ratios typical for wounds, a slight synergistic effect was measured for peptidoglycane hydrolysis (i.e. dye release) between lysozyme and these proteases [1].

Conclusion:

Incubation of a double layer system consisting of stained and non-stained peptidoglycane with infected wound fluids resulted in a colour change from yellow to blue thus allowing simple visual detection of wound infection [1].

Inhaltsverzeichnis

Eidesstattliche Erklärung.....	I
Danksagungen.....	II
Zusammenfassung.....	III
Abstract.....	V
Inhaltsverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis.....	XI
Abbildungsverzeichnis.....	XIII
1 Einleitung und Studienziel	1
2 Das Immunsystem.....	4
2.1 Definition	4
2.2 Die angeborene bzw. unspezifische Abwehr	4
2.3 Adaptive bzw. spezifische Abwehr	4
2.4 Bestandteile des Immunsystems	5
2.4.1 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems.....	5
2.4.2 Humorale Bestandteile des Immunsystems.....	7
2.5 Ablauf einer Immunreaktion	9
2.6 Immundefekte	9
3 Entzündung	11
3.1 Definition	11
3.2 Ursachen einer Entzündung	11
3.3 Formen einer Entzündung	12
3.3.1 Die akute Entzündung.....	13
3.3.2 Die primär chronische Entzündung.....	14
4 Infektionen.....	15
4.1 Definition von Infektionen	15

4.2	Erreger von Infektionskrankheiten	21
4.2.1	Subzelluläre, infektiöse Objekte.....	21
4.2.2	Prokaryontische und eukaryontische Mikroorganismen.....	21
4.3	Pathogenese bakterieller Infektionen	22
4.4	Humanpathogene Bakterien.....	25
4.4.1	Staphylokokken.....	25
4.4.2	Streptokokken.....	26
4.4.3	Clostridium perfringens.....	26
4.5	Labordiagnostik.....	26
4.5.1	Material.....	26
4.5.2	Mikroskopie, Kultur, Identifizierung.....	27
4.5.3	Molekulare Methoden.....	28
4.5.4	Nachweis von Antikörpern, Antigenen Toxinen.....	28
4.6	Grundlagen der Antibiotikatherapie	28
4.6.1	Definition.....	29
4.6.2	Einteilung nach Wirkmechanismus bzw. Angriffspunkt.....	29
4.6.3	Resistenz.....	30
4.6.4	Bekämpfung der Resistenz.....	31
5	Medizinische Relevanz – chronische Entzündungen	32
5.1	Dekubitalulzera.....	32
5.1.1	Defintion des Dekubitalulkus.....	32
5.1.2	Dekubitusstadien.....	35
5.1.3	Pathophyologie des Dekubitalulkus.....	37
5.1.4	Prophylaxe.....	39
5.2	Ulcus cruris.....	39
5.2.1	Einteilung des Ulcus cruris.....	40
5.2.2	Pathophysiologie des Ulcus cruris.....	40

5.2.3	Prophylaxe und Therapie des Ulcus cruris venosum	41
5.3	Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)	42
5.3.1	Therapie des arteriellen Ulkus	42
5.4	Das Diabetische Fußsyndrom (DFS).....	43
5.4.1	Definition	43
5.4.2	Epidemiologie	43
5.4.3	Pathogenese.....	43
6	Allgemeines zur Wundheilung	46
6.1	Wundheilungsphasen	46
6.2	Begriffserklärung Wunde–Ulkus	47
6.3	Biologie der Wundheilung	48
7	Beurteilung einer Wunde	53
7.1	Wie beurteilt man eine Wunde	53
8	Innovative Enzymbasierte Diagnose von Wundinfektionen	57
8.1	Allgemein	57
8.2	Einleitung	57
8.2.1	Die Bedeutung des Enzyms Lysozym.....	57
8.2.2	Die Bedeutung des Enzyms Elastase	59
8.3	Materialien und Methoden	59
8.3.1	Probengewinnung	59
8.3.2	Wundabstrich	60
8.3.3	Durchführende Personen	60
8.3.4	Patientenzahl	60
8.3.5	Biochemische Analyse	61
8.3.6	Datenerhebung, Datenverwaltung und Datenschutz.....	61
9	Biochemisches Verfahren für die Erfassung von Wundinfektionen	62
9.1	Messung der Enzymaktivität direkt – praktische Durchführung	62

9.1.1	Lysozymaktivität.....	62
9.1.2	Integration und Anwendung im klinischen Alltag.....	64
9.1.3	Elastase	65
9.1.4	Integration und Anwendung im klinischen Alltag.....	66
9.2	Ergebnisse	68
9.3	Diskussion	68
9.4	Zusammenfassung und Ausblick	69

Abkürzungsverzeichnis

AgNO ₃	Silbernitrat
AIDS	Acquired Immune Deficiency Syndrome
APC	antigenpräsentierende Zellen
BSG	Blutkörperchen-Senkungsgeschwindigkeit
CD4	Cluster of Differentiation
CRP	C-reaktives Protein
CVI	chronisch venösen Insuffizienz
CVID	common variable immune deficiency
DFS	Diabetische Fußsyndrom
DNQ	Deutschen Netzwerk für Qualitätsentwicklung in der Pflege
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECM	Extrazelluläre Matrix
EGF	Epidermal Growth Factor
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FGF	Fibroblast Growth Factor
GALT	Gut Associated Lymphoid Tissue
HCL	Chlorwasserstoff
IGF- 1	Insulinlike Growth factor-1
KGF	Keratinocyte Growth Factor
KH ₂ PO ₄ -Puffer	Kaliumdihydrogenphosphat-Puffer
IL-1, IL-6	Interleukin-1 und 6
MAK	Membran-Angriffs-Komplex
MeOSUc-AAPV-pNA	N-methoxysuccinyl-ala-pro-val-p-nitroanilid
MHC	Major Histocompatibility Complex
MPS	Monozytäres phagozytisches System

NFG	Nerve Growth Factor
PA	Polyamid
PAMP	pathogen-associated molecular pattern
pAVK	peripheren arteriellen Verschlusskrankheit
PCR	Polymerase Chain Reaction
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PES	Polyester
RNA	Ribonukleinsäure
TCR	T-Zell-Rezeptor
TGF- β 1	Transforming Growth Factor- β 1
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
TNO	Niederländische Organisation für Angewandte Naturwissenschaftliche Forschung
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
ZNS	Zentrales Nervensystem

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Kontamination:verunreinigte Fraktur mit Luxation d. oberen Sprunggelenkes	16
Abbildung 2: Kontamination: offene stark mit Teer verunreinigte Unterschenkelfraktur	16
Abbildung 3: Kolonisation: Ulcus cruris venosum mit Fibrinbelag	17
Abbildung 4: Kolonisation: Hautentnahmestelle mit grünlich verfärbten Sekundärverband	17
Abbildung 5: Kritische Kolonisation	18
Abbildung 6: Infektion, Unguis incarnatus	19
Abbildung 7: Neuropathisches Plantarulkus	19
Abbildung 8: Infektion: Die klassischen Entzündungszeichen	20
Abbildung 9: Schema : Therapieoptionen bei infizierten Wunden	20
Abbildung 10: Systemische Infektion- Sepsis	21
Abbildung 11: Fersendekubitus bei PAVK	34
Abbildung 12: Stumpfdekubitus bei Kontraktur bzw. Prothesendruck	34
Abbildung 13: Stumpfröntgen zeigt Knochenzuspitzung	35
Abbildung 14: Dekubitus Grad I am Knie bei Epilepsiepatienten	35
Abbildung 15: Dekubitus Grad II bei Patient mit Multipler Sklerose	36
Abbildung 16: Dekubitus Grad III sacral	36
Abbildung 17: Dekubitus Grad IV sacral und über Tuber ischiadicum	37
Abbildung 18: Verschieden Klassifikationen des Dekubitus (Schema modifiziert nach Lüscher)	37
Abbildung 19: Kalibrationsgeraden zur Berechnung der Enzymaktivitäten von Lysozym	63
Abbildung 20: Lysozymaktivitäten von jeweils 9 infizierten und 9 nicht infizierten Wunden	64
Abbildung 21: Kalibrationsgeraden zur Berechnung der Enzymaktivitäten von Elastase	65
Abbildung 22: Elastaseaktivitäten von jeweils 9 infizierten und 9 nicht infizierten Wunden	66
Abbildung 23: InFact Device, Sechs-Kammer-System	67

Die klinischen Bilder stammen aus dem Fotolabor der Abteilung für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie. Die restlichen Abbildungen werden in modifizierter Form gezeigt. Diagramme und Bilder zur biochemischen Analyse habe ich selbst hergestellt.

1 EINLEITUNG UND STUDIENZIEL

Das EU-Projekt „LIDWINE“ mit dem Titel „Multifunctional Medical Textiles for wound prevention and improved wound healing“ (IP-SME) unter der Koordination von Dr. Hermann Lenting, TNO, Niederlande, beschäftigt sich mit der Entwicklung neuer Textilien für Wundauflagen, die zu einer verbesserten Wundheilung führen sollen. Dabei legt man besonderes Augenmerk auf chronische Wunden, speziell auf die durch Dekubitus hervorgerufenen. In den westlichen Industrienationen leiden etwa 1–2% der Bevölkerung unter chronischen Wunden. Die Inzidenz steigt mit zunehmendem Lebensalter an und erreicht jenseits des 80. Lebensjahres 4–5 %. Vor allem arterielle, venöse und diabetische Ulzera, ebenso Dekubitalulzera, treten häufiger bei alten als bei jungen Menschen auf. Hauptursachen dafür sind sicher die zahlreichen Komorbiditäten alter Menschen, konsumierende Krankheiten, langdauernde Verabreichung heilungswidriger Medikamente wie Steroide, Antiphlogistika, oder Zytostatika, eingeschränkte Mobilität, Mangelernährung und nicht zuletzt zelluläre und biochemische Veränderungen der alternden Haut. Eine chronische Wunde ist vor allem dadurch gekennzeichnet, dass trotz intensiver Therapie innerhalb eines angemessenen Zeitraumes keine Abheilung erfolgt [2].

Dekubitus kommt häufig vor, verursacht Unannehmlichkeiten und Schmerz bei dem Patienten und führt zu erheblichen Kosten für das Gesundheitswesen. In den Niederlanden wurde berechnet, dass jährlich 1% des Budgets des Gesundheitswesens auf die Prävention und Behandlung des Dekubitus verwendet wird [3]. Schätzungen für Deutschland haben ergeben, dass durch eine Reduzierung der Dekubitusprävalenz jährlich bis zu 220 Millionen € gespart werden könnten [4]. Obwohl klar ist, dass Dekubitus häufig vorkommt, ist es schwierig anzugeben, wie groß das Problem wirklich ist. Zahlen, wie sie in der Literatur gefunden werden, lassen sich nur sehr schwer vergleichen und unterscheiden sich erheblich voneinander. Die Prozentsätze können von 5% [5] bis 40% [6] variieren, was durch eine Vielzahl von Faktoren verursacht wird, z. B. was gemessen wurde, wie gemessen wurde und bei welcher Population.

Zusätzlich zu den Schmerzen, welche ein Dekubitus den Patienten bereitet, hat er einen hohen Arbeitsaufwand für das medizinische Personal und verursacht deshalb hohe Kosten [7,8]. Neue Wundauflagen zur Prävention und einer verbesserten Wundheilung hätten einen enormen positiven Effekt auf die Lebensqualität durch Schmerzreduktion, kürzere Krankenstände, durch gesteigerte Mobilität und Unabhängigkeit.

Das Projekt LIDWINE beschäftigt sich sowohl mit der Prävention, als auch mit der Behandlung bereits bestehender Dekubitalulcera. Decubitalulcera entstehen oft durch ein Querschnittssyndrom nach Unfällen und häufig durch neurologische Krankheiten. „Intelligente“, multifunktionale Textilien sollen das Entstehen solcher Wunden verhindern, oder die Wundheilung beschleunigen und verbessern, um den Menschen eine schnelle Rückkehr in ihr aktives Leben ermöglichen zu können.

Wichtige therapeutische Möglichkeiten in der Prävention und Verbesserung der Wundheilung sind eine

1. Stimulation der Blutzirkulation im geschädigten Hautareal
2. Herabsetzung der Reibung zwischen dem Textil und der Haut
3. Trockenhalten der Haut
4. Prävention einer bakteriellen Infektion.

Aus diesen Gründen beschäftigt sich LIDWINE mit der Entwicklung von Textilien, welche die Durchblutung verbessern, die Feuchtigkeit regulieren und zusätzlich noch eine antimikrobielle Wirkung haben. Die Suche nach Enzymen, die für die Gewebsschädigung verantwortlich sind und im Falle einer Infektion freigesetzt werden, hat zur Entwicklung einer neuen Generation von Wundauflagen geführt.

Aufgrund der Tatsache, dass das Thema der Dekubitalulcera hochaktuell und von zunehmender Bedeutung ist, wurden von der EU 9.100.000 € zur Verfügung gestellt, wobei 19 Partner aus 10 Ländern an diesem Projekt beteiligt sind. Neben mittleren und kleinen High-tech Betrieben handelt es sich um verschiedene universitäre Einrichtungen und eine Klinik, wobei die Fachgebiete von Nanobiotechnologie, über Molekularbiologie, Biopolymertechnologie bis zur Elektrochemie reichen.

Institut für Umweltbiotechnologie

Unter der Leitung von Prof. Dr. Georg Gübitz erfolgt auf dem Insitut für Umweltbiotechnologie die **Identifikation von Enzymen in Wundflüssigkeiten**, die nur unter bestimmten Bedingungen, wie beispielsweise einer Infektion, oder einer Entzündung, in einem erhöhten Maß gebildet werden. Diese **Enzyme sollen als „diagnostic tools“ zur frühzeitigen Erkennung einer Infektion beitragen und so eine gezielte Behandlung ermöglichen.**

Die Produkte aus dem LIDWINE-Projekt würden sich nicht nur auf Dekubiti beschränken, sondern könnten auch zur Behandlung anderer chronischer Wunden herangezogen werden. Unter einer chronischen Wunde versteht man einen Gewebsdefekt, der trotz fachgerechter Behandlung innerhalb von 3 Monaten keine Heilungstendenz zeigt bzw. innerhalb von 12 Monaten nicht abgeheilt ist. Die wichtigste Voraussetzung für eine erfolgreiche Behandlung ist die Diagnostik und Therapie der zugrunde liegenden Erkrankung. Darüber hinaus unterstützt eine phasengerechte Lokalthherapie die Abheilung [9]. Bei Menschen, die alt, krank, oder mangelernährt sind, reicht oft schon eine kleine Verletzung aus, um eine schwer heilende Wunde hervorzurufen. Wenn eine Gewebsläsion so groß ist, dass sie mit Gewebe aufgefüllt werden muss, oder an einer Stelle liegt, die ständiger Reibung oder Nässe ausgesetzt ist, kann die Heilung zusätzlich verzögert werden. Aber auch Medikamente wie z.B. Zytostatika und Immunsuppressiva können zu Wundheilungsstörungen beitragen. In Deutschland und Österreich gehören das Ulcus cruris (Unterschenkelgeschwür, offenes Bein), der Dekubitus (Druckgeschwür) und das diabetische Fußsyndrom zu den häufigsten Ursachen chronischer Wunden und daraus resultierender Infektionen.

Bei 57 bis 80 Prozent aller chronischen Ulcera an den Beinen handelt es sich um ein Ulcus cruris venosum. Ältere Patienten sind am häufigsten betroffen. Durchschnittlich etwa 0,6 Prozent aller Menschen zwischen dem 18. und dem 79. Lebensjahr waren zumindest einmalig davon betroffen, ab dem 8. bis 9. Lebensjahrzehnt beträgt die Vorkommenshäufigkeit etwa 1 bis 3 Prozent [10,11].

Besonders schwierig in seiner Behandlung ist das Ulcus cruris venosum durch seine oftmals vorhandene Therapieresistenz und seiner Rezidivneigung.

2 DAS IMMUNSYSTEM

2.1 Definition

Das Immunsystem hat die Aufgabe uns vor Mikroorganismen, Fremd- und Schadstoffen, Toxinen und malignen Zellen zu beschützen. Durch ständige Entwicklung dieses Systems ist es möglich, lebende Organismen gegen die dauernden Angriffe des äußeren und internen Umfeldes zu erhalten. Das Immunsystem hat dabei gelernt, destruktive Antworten gegen körpereigene Substanzen auszuschalten. Eine der bedeutendsten Aufgaben des Immunsystems ist die Unterscheidung zwischen „gefährlich“ und „ungefährlich“ [12].

2.2 Die angeborene bzw. unspezifische Abwehr

Zur angeborenen Immunabwehr zählen zunächst der Säuremantel der Haut sowie eine intakte Epidermis, das Komplementsystem, antimikrobielle Enzymsysteme sowie unspezifische Mediatoren wie Interferone und Interleukine. Auf dem zellulären Sektor sind die Granulozyten, das Monozyten-Makrophagensystem und die Natürlichen-Killer-Zellen (NK-Zellen) zu nennen. Ein anderer wichtiger unspezifischer Abwehrmechanismus ist die Entzündungsreaktion: zunächst werden Mediatoren freigesetzt, die die Blutgefäße erweitern, dann wandern Granulozyten in den Herd ein, die im weiteren Verlauf von Makrophagen abgelöst werden. Die Granulozyten bilden die erste Verteidigungslinie, bei der ein Großteil der Erreger vernichtet wird [12].

2.3 Adaptive bzw. spezifische Abwehr

Im Rahmen einer Entzündungsreaktion werden die Weichen für das spezifische Immunsystem gestellt. Durch ein spezifisches Zytokinmilieu kann eine mehr humoral oder zellulär orientierte Abwehr vorgegeben werden. Das Auswandern von

antigenpräsentierenden Zellen in die lymphatischen Organe ruft die systemische Antwort und die spätere Gedächtnisreaktion hervor. Hierbei spielen v.a. die T- und B-Lymphozyten eine wichtige Rolle. Nach einer Infektion bleiben spezifische Antikörper und Gedächtniszellen erhalten, die bei erneutem Kontakt mit dem Pathogen innerhalb kürzester Zeit eine angemessene Abwehrreaktion einleiten [12].

2.4 Bestandteile des Immunsystems[13]

Die Zellen des Immunsystems zirkulieren ständig in den Blutgefäßen und den Lymphbahnen und kommen auch in den Geweben des Körpers vor. Am Wirkort sind sie dazu fähig durch Phagozytose (Aufnahme und Verdauung) den Erreger zu vernichten, oder durch die Produktion von Immunmodulatoren und Zytokinen die Immunreaktion des Körpers zu steuern und andere Abwehrzellen zum Ort der Entzündung zu locken.

2.4.1 Zelluläre Bestandteile des Immunsystems

Granulozyten

Das Wort leitet sich vom Lateinischen „granulum“, „Körnchen“ ab und rührt daher, dass sie in ihrem Inneren Granula besitzen, die aggressive Enzyme enthalten mit denen Krankheitserreger unschädlich gemacht werden. Sie können die Blutgefäße verlassen, ins Gewebe einwandern und Phagozytose betreiben.

Neutrophile Granulozyten

Am Leukozytenpool des Blutes machen sie 40-60 % aus. Werden sie aktiviert, wandern sie im Bereich postkapillärer Venolen ins Gewebe aus. Ihre Granula enthalten Enzyme wie Lysozym, Myeloperoxidase, saure Hydrolase, Protease, Kollagenase, Histaminase, um nur einige zu nennen. Mit diesen Enzymen bahnen sie sich ihren Weg durch das Gewebe und können Erreger enzymatisch oder durch Phagozytose eliminieren.

Eosinophile Granulozyten

Diese sind vorherrschend bei Entzündungen vom allergischen Typ und bei antiparasitären Reaktionen. Sie werden chemotaktisch ins Entzündungsareal gelockt, in ihren Granula enthalten sie basisches Protein, das für Parasiten, aber auch für normale Zellen toxisch ist.

Basophile Granulozyten

Ihre Granula enthalten unter anderem Histamin, Heparin und Kallikrein und sie sind mit den ortsständigen Gewebsmastzellen verwandt.

Monozyten/Makrophagen

Diese Zellen gehören zum *monozytären phagozytischen System* (MPS). Nach der Auswanderung aus dem Blut differenzieren sich die Monozyten zu Gewebsmakrophagen, welche aktiv phagozytierende Zellen darstellen. Sie können aber auch die Funktion einer antigenpräsentierenden Zelle übernehmen, indem sie aufgenommene Teile des Erregers im Inneren in einzelne Peptide zerlegen und diese durch MHC-II-Moleküle auf ihrer Oberfläche präsentieren. Die Antigene können dann von T-Lymphozyten erkannt werden, die letztendlich zur Vernichtung des Erregers führen.

NK-Zellen

NK-Zellen sind Teil der angeborenen Immunität, werden aber zu den Lymphozyten gezählt, weil sie eine gemeinsame Vorläuferzelle haben. Sie verwenden einen speziellen Mechanismus, der in den 1980er Jahren vom schwedischen Immunologen Klas Kärre entdeckt wurde und als „Fehlendes Selbst“ (endl. „missing self“) bezeichnet wird: NK-Zellen erkennen den MHC-I-Komplex, der auf nahezu allen gesunden Körperzellen exprimiert wird. Infiziert sich eine Zelle mit einem Virus und bewirkt dies eine Änderung des MHC-I-Komplexes, fällt diese Zelle einer durch NK-Zellen ausgelösten Immunreaktion anheim. Das gleiche gilt für mutierte Zellen, also Tumorzellen.

T-Lymphozyten

T-Lymphozyten entstehen im Knochenmark, wandern dann in den Thymus aus, wo sie selektiert werden und ausreifen („T“, von Thymus-abhängig). Jede T-Zelle trägt auf ihrer Oberfläche T-Zell-Rezeptoren (TCR), mit denen sie spezifische Antigene erkennen kann, die mit MHC-Molekülen auf körpereigenen Zellen präsentiert werden. Die Gruppe der T-Zellen unterteilt sich weiter in *T-Helferzellen* und *zytotoxische T-Zellen*. Sie unterscheiden sich anhand von Proteinen auf ihrer Zellmembran, die mit CD (engl. „Cluster of differentiation“) abgekürzt werden. T-Helferzellen tragen das CD4-Protein und zytotoxische T-Zellen das CD8-Protein auf ihrer Oberfläche. T-Helferzellen erkennen Antigene, wenn sie von antigenpräsentierenden Zellen dargeboten werden und setzen daraufhin unterschiedliche Botenstoffe frei: mit dem Lymphokin TH1 verstärken sie die zelluläre Immunantwort, mit der Freisetzung von TH2 fördern sie die Produktion von Antikörpern. Zytotoxische Zellen erkennen Antigene, die ihnen mithilfe der MHC-I-Komplexe präsentiert werden. Sie erkennen also körpereigene Zellen, die durch Krankheitserreger (z.B. Viren) befallen sind.

B-Lymphozyten

Die Bezeichnung „B“-Lymphozyten stammt ursprünglich von ihrem Bildungsort in der Bursa Fabricii bei Vögeln. Bei Säugetieren entstehen die B-Zellen, wie alle anderen Abwehrzellen auch, im Knochenmark, daher nachträglich die Bedeutung von „bone marrow“ (deutsch „Knochenmark“). Wenn ein B-Lymphozyt ein Antigen bindet, das zu seinem Rezeptor passt und durch von T-Helferzellen ausgeschütteten Lymphokinen stimuliert wird, kommt es zur Differenzierung in eine Plasmazelle, welche die zum Antigen passenden Antikörper freisetzt. Ausserdem kommt es dabei zur Bildung von Gedächtniszellen, die bei einem zweiten Kontakt eine schnelle, zielgerichtete, immunologische Antwort gewährleisten.

2.4.2 Humorale Bestandteile des Immunsystems

Die humoralen Bestandteile (lat. „humor“, „Flüssigkeit“) umfassen verschiedene Plasmaproteine, die passiv im Blut, bzw. der Lymph- und Gewebsflüssigkeit zirkulieren. Sie sind deshalb nicht in der Lage, aktiv an den Ort der Infektion zu

wandern.

Antikörper

Je nach Krankheitserreger produzieren B-Lymphozyten und Plasmazellen maßgeschneiderte Antikörper, die bestimmte Proteine, oder auch Zuckerketten an der Oberfläche erkennen und sich an diese binden.

Antikörper haben prinzipiell drei Funktionen:

- Die so genannte Opsonierung. Das heißt, dass das Antigen durch den Fc-Teil (Teil der konstanten Kette des Antikörpers) für Phagozyten (Fresszellen) besser "sichtbar" gemacht wird.
- Durch den Antigen-Antikörperkomplex wird das so genannte Komplementsystem aktiviert, das zum einen wiederum als Opsonin (sind Stoffe, die opsonieren) wirkt, zum anderen Chemotaxine (Lockstoffe für Zellen des Immunsystems) freisetzt und einen sogenannten MAK (Membran-Angriffs-Komplex) bildet, der Löcher in Zellmembranen verursacht.
- Antikörper wirken direkt inaktivierend auf den Eindringling durch Verkleben und Bildung von großen Komplexen (je nach Antikörperklasse und Anzahl der Antigen determinanten).

Das Komplementsystem

Das Komplementsystem gehört zur angeborenen Immunabwehr und besteht aus etwa 20 verschiedenen Plasmaproteinen. Ein paar dieser Proteine können sich an Mikroorganismen heften und die Zellwand schädigen, wodurch diese zugrunde gehen. Andere Proteine, die Anaphylatoxine, haben einen gefäßerweiternden Effekt und fördern die Entzündungsreaktion. Zusätzlich können Komplementfaktoren Abwehrzellen zum Ort der Infektion locken und sind in der Lage Phagozyten zu aktivieren.

Interleukine

Interleukinen gehören zur Gruppe der Zytokine und sind körpereigene Botenstoffe, die von den Leukozyten gebildet werden. Heute kennt man eine große Zahl von Interleukinen (IL-1 bis IL-32; Stand Oktober 2005) und genauso vielfältig ist auch ihr

Wirkspektrum: die einen wirken auf Leukozyten stimulierend hinsichtlich Wachstum, Reifung und Teilung, andere führen zu deren Aktivierung.

2.5 Ablauf einer Immunreaktion

Wie eine Immunreaktion abläuft, hängt davon ab, ob der Organismus zum ersten Mal Kontakt mit dem Antigen hat, oder ob es bereits zu einer Immunisierung gekommen ist. Bei Erstinfektion können Zellen der angeborenen Immunabwehr typische Merkmale der Krankheitserreger erkennen, ohne jemals zuvor mit diesen Kontakt gehabt zu haben. Sie können die Erreger in sich aufnehmen, phagozytieren und anschließend Bruchstücke dieses Erregers an ihrer Oberfläche an spezialisierte Zellen (B- und T-Lymphozyten) präsentieren. Die Eindringlinge werden entweder durch Phagozytose, oder durch die Ausschüttung aggressiver Substanzen direkt abgetötet, oder sie werden von Antikörpern bewegungsunfähig und unschädlich gemacht. Nach einer ersten Infektion bleiben im Organismus Antikörper und so genannte Gedächtniszellen erhalten, um bei einer erneuten Infektion schneller und effizienter reagieren zu können.

Ob durch eine Infektion eine Krankheit entsteht oder nicht, hängt einerseits von der Funktion des Immunsystems, von der Menge an eingebrachten Erregern und der krankmachenden Eigenschaft (Virulenz) ab. Bei intaktem Immunsystem und niedriger Erregerdosis kann eine Erkrankung entweder überhaupt nicht ausbrechen, oder einen leichten Verlauf nehmen. Solange sich keine eindeutigen Symptome erkennen lassen, kann der Verlauf einer Infektion kaum, oder gar nicht vorhergesagt werden [12].

2.6 Immundefekte

Wenn einzelne Faktoren der Immunantwort fehlen, oder nicht funktionieren, kann das Immunsystem Krankheitserreger nicht mehr effektiv bekämpfen und selbst Erkrankungen, die normalerweise ungefährlich sind, können bedrohlich werden.

Immundefekte können angeboren oder erworben sein:

1. Bei der CVID (common variable immune deficiency) handelt es sich um eine heterogene Gruppe von Krankheiten, denen eine inadäquate Produktion von Immunglobulinen gemeinsam ist.
2. Bei der erworbenen Immunschwächekrankheit AIDS, verursacht durch das HI-Virus, werden T-Helferzellen zerstört, sodass meist nach einigen Jahren Inkubationszeit eine zunehmende Abwehrschwäche eintritt und die Anzahl von Infekten und Tumorerkrankungen zunimmt.
3. Eine Neutropenie, oder Agranulozytose kann im Rahmen von Autoimmunerkrankungen ausgelöst werden, aber auch bestimmte Medikamente können Auslöser sein. Dabei kommt es gehäuft zu Schleimhautentzündungen und opportunistischen Infekten.
4. M. Behçet, Di George-Syndrom, selektiver Immunglobulin-A-Mangel und das Wiskott-Aldrich-Syndrom sind weitere Beispiele für angeborene Immundefekte.
5. Überschießende Immunantwort: Allergien
6. Autoimmunerkrankungen: sie entstehen dadurch, dass das Immunsystem körpereigene Strukturen angreift; Beispiele sind: Typ-I-Diabetes, Rheumatoide Arthritis, Multiple Sklerose. Auch die Zellen des Immunsystems können bösartig entarten (Leukämien, Lymphome). Diese Krebserkrankung befallen meist den ganzen Körper, v.a. die Organe des Immunsystems (Lymphknoten, Milz, Knochenmark etc.), was zur Abnahme der Immunabwehr und der Verdrängung normaler Blutbildung im Knochenmark führt (Knochenmarksdepression). Durch die große Zahl verschiedener Immunzellen und gemeinsamen Vorläuferzellen anderer Zelltypen, kommt es zu einer Vielfalt unterschiedlicher Symptome und Krankheitsverläufe [12].

3 ENTZÜNDUNG [13]

3.1 Definition

Der Mensch ist in seiner Umwelt zahlreichen chemischen und physikalischen Noxen, sowie mikrobiellen Erregern ausgesetzt, die unter bestimmten Umständen unterschiedlich schwere Schädigungen hervorrufen können. Zum Schutz vor diesen Noxen hat der menschliche Organismus eine Reihe von Abwehrsystemen entwickelt, die pathogene Noxen erkennen und bekämpfen. Beim Menschen lassen sich diese Abwehrmechanismen in angeborene und erworbene unterscheiden. Jedes System enthält wiederum humorale und zelluläre Anteile. Über Blutgefäße ist es möglich, dass humorale und zelluläre Komponenten des Abwehrsystems schnell den Ort der Schädigung erreichen; die dabei auftretende Reaktion bezeichnet man als Entzündung (Inflammatio). Die Inflammatio ist ein Vorgang, der zur Beseitigung der schädigenden Noxe dienen soll und weiters nach Abklingen der Entzündung, zur Wiederherstellung des Gewebes und damit zur Heilung führt. Damit ist die physiologische Entzündungsreaktion ein wichtiger Prozess zum Schutz unseres Organismus.

Die Entzündung kann in einem umschriebenen Gebiet, oder als systemische Reaktion in Erscheinung treten.

3.2 Ursachen einer Entzündung

Die Ursachen sind vielfältig und beinhalten:

1. Physikalische Noxen: Reibung, Druck, Fremdkörper, Strahlung, Hitze, Kälte
2. Chemische Noxen wie Säuren und Laugen, endogene Substanzen
3. Mikroorganismen: Viren, Pilze, Bakterien, Parasiten
4. Körpereigene Noxen z.B. Harnvergiftung (Urämie),
5. Allergene: Fremdallergene, oder Autoallergene wie z.B. bei rheumatischen Erkrankungen

Nach dem klinischen Verlauf spricht man von einer akuten und einer chronischen Entzündung. Ziel jeder Entzündung ist die Wiederherstellung der normalen Gewebsintegrität (Restitutio ad integrum), was einer Heilung entspricht. Bei schwerer Gewebsschädigung kommt es allerdings zum Ersatz des Gewebes durch Narbengewebe, es kommt zur Defektheilung bzw. zur Reparatio.

3.3 Formen einer Entzündung

Man unterscheidet zwischen lokalen und systemischen Entzündungsreaktionen, die den gesamten Organismus betreffen können, als auch zwischen akuten und chronischen Entzündungen.

Während **akute Entzündungen** durch ein plötzliches Auftreten und einen raschen Verlauf über nur wenige Stunden oder Tage gekennzeichnet sind, dauern **chronische Entzündungen** Wochen, Monate oder gar Jahre. Häufig entsteht die chronische Entzündung schleichend, mit sich entwickelnder Symptomatik (primär chronische Entzündung). Andererseits kann sie sich aus einer akuten Entzündung entwickeln (sekundär chronische Entzündung).

Besondere Verlaufsformen:

1. Rezidivierende Entzündungen: sie verlaufen schubweise mit beschwerdefreien Intervallen (Remission) und einem Wiederauflodern der Entzündung (Exazerbation).
2. Perakute Entzündungen: meist sehr kurzer, tödlicher Verlauf, der auf eine hohe Virulenz des Erregers, oder auf eine schlechte Immunlage des Organismus schließen lässt.
3. Subakute oder subchronische Entzündung: diese Entzündungen zeigen Verläufe, die zwischen akut und chronisch liegen.

3.3.1 Die akute Entzündung

Obwohl der Ablauf einer akuten Entzündung stark von der Art und dem Ausmaß der Gewebsläsion abhängt, läuft sie jedesmal ähnlich ab. Darin involviert sind vaskuläre und zelluläre Reaktionen, die überlappend ablaufen:

- Erste Phase: Arteriolenkontraktion: durch einen Reiz kommt es zur Kontraktion der kleinsten Blutgefäße. Die Phase dauert nur wenige Minuten lang und wird durch das lokale Abblassen „initiale Ischämie“ genannt.
- Zweite Phase: es kommt durch die Aufhebung der Kontraktion zu einer vermehrten Durchblutung. Es entsteht eine aktive Hyperämie mit einer Durchblutung bis auf das Zehnfache. Dadurch zeigt sich die Haut tiefrot (Rubor) und überwärmt (Calor). Durch die vermehrte Durchblutung und den dadurch erhöhten Druck, tritt Flüssigkeit ins Interstitium (Ödem, bzw. „Tumor“). Anfangs handelt es sich um eiweißarmes Transudat, das durch die zunehmende Permeabilitätsstörung zu Exsudat wird.
- Dritte Phase: durch die Permeabilitätssteigerung in der Endstrombahn tritt Blutplasma in das Interstitium. Dies führt zu einer Strömungsverlangsamung, bis hin zum Stillstand des Blutflusses. Auf diesem Wege können Plättchenthromben entstehen.

Die klassischen Kardinalsymptome einer akuten Entzündung sind Schwellung (lat. *tumor*), Rötung (lat. *rubor*), Erwärmung (lat. *calor*), Schmerz (lat. *dolor*) und die eingeschränkte Funktion (lat. *functio laesa*).

Daneben kann man Entzündung ab einem gewissen Schweregrad auch an allgemeinen Reaktionen erkennen:

1. Fieber
2. Allgemeines Krankheitsgefühl
3. Leukozytenanstieg
4. CRP-Anstieg (immunologisch wirksames Akut-Phase-Protein)
5. Erhöhte Blutsenkungsgeschwindigkeit (BSG)
6. Procalcitonin-Anstieg (Hormonvorstufe)
7. Nachweis von Bakterien im Blut

3.3.2 Die primär chronische Entzündung

Ursache für primär chronische Entzündung können Mikroorganismen (z.B. Tuberkulosebakterien), nichtdegradierbare Fremdmaterialien (Asbest, Quarzkristalle) und Autoimmunerkrankungen (z.B. chronische Polyarthrit) sein.

Bei den dominierenden Zellen handelt es sich um Makrophagen, Lymphozyten und Plasmazellen. Morphologisch erkennbar sind oft eine Bindegewebsvermehrung (Fibrose) und eine Narbenbildung (Sklerose) bis hin zu granulomatösen Reaktionen.

Pathologisch-anatomische Subtypen einer chronischen Entzündung:

1. Chronisch granulierende Entzündung
2. Chronisch lymphozytäre Entzündung
3. Granulomatöse Entzündung

4 INFEKTIONEN

4.1 Definition von Infektionen [14]

Unter einer Infektion versteht man das aktive oder passive Eintreten, die Absiedelung und die Vermehrung mit nachfolgender Abwehrreaktion und/oder Schädigung. Eine intakte Haut und ein funktionierendes Immunsystem stellen gemeinsam eine natürliche Barriere gegen die Invasion von Krankheitserregern dar. Ist die Integrität der Haut oder der Schleimhaut jedoch gestört, oder liegt eine Immunschwäche vor, können Mikroorganismen der eigenen Flora eindringen und sich lokal oder systemisch ausbreiten (**endogene Infektion**). Als **exogene Infektionen** bezeichnet man Infektionen, die durch Erreger von Aussen verursacht werden. Dabei handelt es sich meistens um fakultativ oder obligat pathogene Erreger, die entweder an der Eintrittspforte eine Infektion auslösen, oder systemisch. Als Inkubationszeit bezeichnet man die Zeit von der Infektion bis zum Auftreten erster klinischer Symptome. Sie ist bei der exogenen Infektion leichter zu bestimmen als bei der endogenen.

Die endogene und exogene Infektion lassen sich von einer **Kolonisation** dadurch unterscheiden, dass im Falle einer Infektion meist die 5 Zeichen einer Entzündung vorliegen. Diese Zeichen finden sich aber nicht nur bei Infektionen, sondern auch bei Malignomen, weshalb diese eine wichtige Differentialdiagnose darstellen.

Ferner ist die **Kontamination** von der Infektion und der Kolonisation zu unterscheiden. Bei einer Kontamination befinden sich Bakterien im Wundbett, allerdings replizieren sich die Bakterien nicht.



Abbildung 1: Kontamination: offene stark verunreinigte Fraktur mit Luxation des oberen Sprunggelenkes



Abbildung 2: Kontamination: offene stark mit Teer verunreinigte Unterschenkelfraktur

Bei der **Kolonisation** vermehren sich die Bakterien zwar, jedoch gibt es noch keine Invasion in die Tiefe und keine Immunreaktion des Organismus. Eine für den Menschen nützliche Kolonisation ist die Standortflora.



Abbildung 3: Kolonisation: Ulcus cruris venosum mit Fibrinbelag



Abbildung 4: Kolonisation: Hautentnahmestelle mit grünlich verfärbten Sekundärverband, Fettgaze am Rande sichtbar. Sekundäre Infektion einer primär sterilen Wunde kann zu verzögerter Abheilung führen. Grünfärbung: Verdacht auf *Pseudomonas aeruginosa*

Kritische Kolonisation bedeutet, dass der bakterielle Belag einen negativen Einfluss auf den Heilungsprozess hat, aber keine klassischen Symptome einer Infektion hervorgerufen werden.



Abbildung 5: Kritische Kolonisation: Stagnation des Heilungsprozesses bei Ulcus cruris venosum: *Pseudomonas aeruginosa*

Bei der **Infektion** resultiert die bakterielle Invasion in einer Immunantwort mit den Zeichen eines Erythems, lokaler Erwärmung, Schwellung, Schmerz und einem evtl. unangenehmen Geruch. Gelangen Bakterien über die Blutbahn, oder durch Verletzungen in ein Gelenk, so kann das zu einer infektiösen Arthritis führen. Das Gelenk ist gerötet und überwärmt und es bildet sich reaktiv ein Gelenkserguss. Bei schweren Formen könne Zeichen einer Blutvergiftung und Schock auftreten.



Abbildung 6: Infektion: Unguis incarnatus: eingewachsener Großzehennagel mit massiven Entzündungszeichen



Abbildung 7: Infektion: Neuropathisches Plantarulcus beim Diabetiker mit Plantarphlegmone



Abbildung 8: Infektion: Die klassischen Entzündungszeichen: Rubor, Dolor, Tumor, Calor, Functio Laesa,

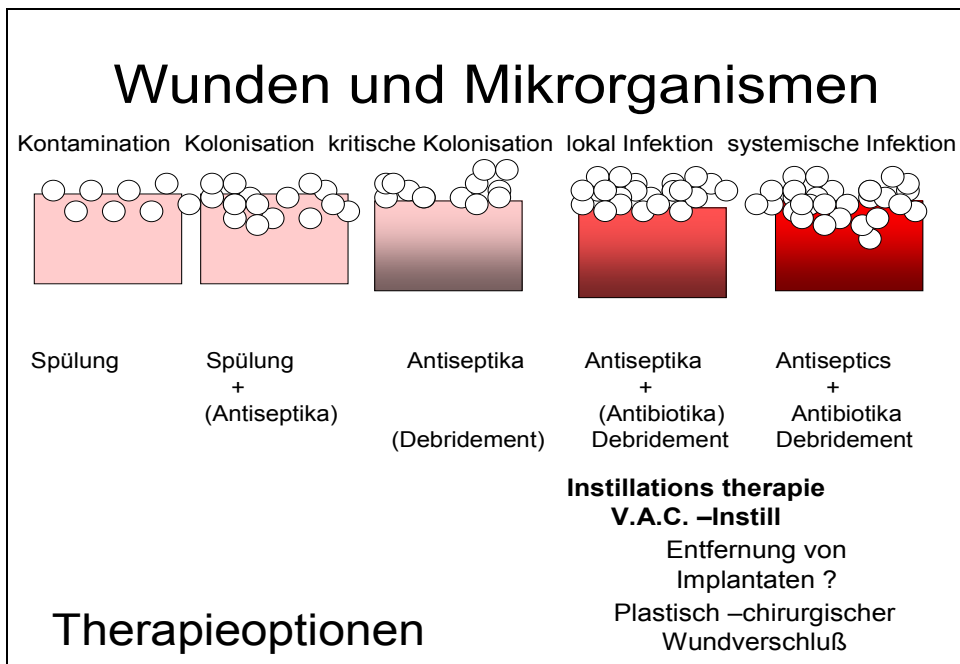


Abbildung 9: Schema : Therapieoptionen bei infizierten Wunden aus Hartmann Wundforum Das Magazin für Wundheilung und Wundbehandlung Heft 2/2008-15. Jahrgang J.Dissemond :Die Bedeutung von Bakterien in chronischen Wunden (modifiziert nach Schintler)



Abbildung 10: Systemische Infektion- Sepsis: Fieber, Leukozytose, CRP Erhöhung, extremitätenbedrohende- und lebensbedrohliche Wundinfektion

4.2 Erreger von Infektionskrankheiten [15]

4.2.1 Subzelluläre, infektiöse Objekte

Prionen

Dabei handelt es sich um Proteinmoleküle, die degenerative Erkrankungen des ZNS wie Kuru, Creutzfeldt-Jakob-Krankheit und Scrapie auslösen können.

Viren

Viren sind obligate Zellparasiten, die nur eine Art der Nukleinsäure enthalten (entweder DNA oder RNA), keine eigenständige Energiegewinnung aufweisen und einen Wirt zur Synthese neuer Viruszellen benötigen.

4.2.2 Prokaryontische und eukaryontische Mikroorganismen

Bakterien

Bakterien vermehren sich ungeschlechtlich und gehören zur Gruppe der

Prokaryonten (ohne Zellkern). Sie besitzen eine meist starre Zellwand mit Ausnahme der Mykoplasmen.

Pilze und Protozoen

Pilze: sind Eukaryonten, haben eine starre Zellwand und einen klassischen Zellkern. Von über 50000 Pilzarten sind nur ca. 300 als Infektionsauslöser des Menschen bekannt.

Protozoen: leben frei oder parasitär, sie besitzen ebenfalls einen Zellkern. Die Vermehrung findet geschlechtlich oder ungeschlechtlich statt. Ihre Übertragung geschieht meist über Arthropoden.

Tiere

Helminthen: dabei handelt es sich um parasitäre Würmer. Sie sind komplex strukturiert und vielzellig. Klinische Bedeutung haben vor allem die Trematoda (Saugwürmer), Nematoda (Fadenwürmer) und die Cestoda (Bandwürmer).

Arthropoden: Gliederfüßler mit eine Chitinskelett, Mundwerkezeugen und Körpergliederung. Zu ihnen zählen z.B. die Milben. Häufiger dienen sie als Überträger für Viren, Bakterien, Protozoen oder Helminthen.

Im Folgenden wird v.a. auf bakterielle Infektionen eingegangen.

4.3 Pathogenese bakterieller Infektionen

Um eine Infektion hervorrufen zu können, müssen Bakterien die unspezifische und spezifische Infektionsabwehr des Patienten überwinden und ihre pathogene Fähigkeit entwickeln. Dabei spielen besonders Ausmaß und Art der Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren ein Rolle.

Unter **fakultativ pathogen** versteht man Bakterien, die bei eingeschränkter Infektionsabwehr eine Erkrankung bewirken können. *Staphylokokkus epidermidis*, ein Bakterium der normalen Hautflora, kann beim immunsupprimierten Patienten unterschiedliche Krankheiten bewirken, bis hin zur Sepsis führen [13].

Pathogenitäts- bzw. Virulenzfaktoren sind:

- a) Adhärenz an Wirtszellen
- b) Invasion der anatomischen Barrieren und Ausbreitung im Wirt
- c) Strategien gegen die unspezifische Immunität
- d) Strategien um der spezifischen Immunität zu entgehen
- e) Zytopathologische Schädigung der Wirtszelle und des Gewebes
- f) Immunpathologische Schädigung der Wirtszelle und des Gewebes [15]

ad c)

Die Invasion, Vermehrung und Ausbreitung in einem Wirt setzen voraus, dass Bakterien die Fähigkeit besitzen der unspezifischen Infektabwehr zu entgehen. Die wichtigsten Mechanismen sind:

- Antiphagozytose
 - Kapsel, die die Phagozytose erschwert wie bei *Streptococcus pneumoniae*
 - Membran-schädigende Exotoxine: *Staphylococcus aureus*
 - Toxine, injiziert über Typ-III und Typ-IV-Sekretionssysteme, die Leukozyten ausser Gefecht setzen können
 - Überlebensfähigkeit in Phagozyten: Mycobakterien, Chlamydien, Salmonellen, etc.
- Komplementresistenz

Durch eine spezielle Beschaffenheit der äusseren Membran wird die Aktivierung des Komplementsystems verhindert
- Resistenz gegen antibakterielle Peptide und NO
- Eisenanreicherung

Staphylococcus aureus kann durch ein spezielles Transportsystem Eisen aus dem Hämoglobin der Erythrozyten gewinnen. Bakterien brauchen für ein gutes Wachstum 10^{-5} mol/l freie Eisenionen [15].

ad d)

Zu den Strategien gegen die spezifische Immunität gehören:

- Immuntoleranz: Pränatal erkennt das Immunsystem bakterielle Erreger nicht als fremd.
- Molekulare Mimikry (Täuschungstracht): Bakterien können an ihrer Oberfläche wirtsähnliche Moleküle exprimieren und werden so nicht erkannt
- Antigenvariation: Bakterien können eine Reihe unterschiedlicher Immun-Antigene präsentieren, was auf eine hohe Strukturgenvariabilität schließen lässt. Durch den ständigen Wechsel der Antigenstruktur sind die Antikörper nicht mehr passend.
- IgA-Proteasen: In den Sekreten von Schleimhäuten kommen sekretorische Antikörper der Klasse IgA_1 vor. Die Antikörper können z.B. durch die Proteasen von *Haemophilus influenza* zerstört werden [15].

ad e)

Die zytopathogenetischen Wirkung entfaltet sich durch die Produktion von Toxinen. Die sogenannten Exotoxine werden unter Berücksichtigung der Zelltypen auf die sie wirken eingeteilt: *Zytotoxine* wirken toxisch auf Wirtszellen; *Neurotoxine* auf Neurone und *Enterotoxine* wirken toxisch auf Enterozyten.

Zu den bekanntesten gehören das Diphtherietoxin, das Tetanustoxin, und das Toxisches-Schock-Syndrom-Toxin.

ad f)

Die Immunpathogenetische Wirkung entsteht durch bakterielle Oberflächenmoleküle; diese induzieren in Makrophagen eine vermehrte Produktion von $\text{TNF-}\alpha$, IL-1, IL-6, IL-8, was sekundär zur Entstehung einer starken Entzündung führt. Bei massiver Freisetzung die Zellwandbestandteile kommt es zum Bild einer schweren Sepsis und des septischen Schocks mit Blutdruckabfall und multiplen Organversagen.

Eitrige Gewebsnekrosen entstehen durch lysosomale Bestandteile von Granulozyten, welche chemotaktisch angelockt werden, sich am Ort der Infektion sammeln und danach zerfallen [15].

4.4 Humanpathogene Bakterien

Zu den humanpathogenen Bakterien gehören unzählige Arten, die sich in morphologischen, physiologischen und strukturellen Merkmalen unterscheiden [15]. Die wichtigsten Haut- und Weichteilinfektionen verursachenden Bakterien sind *Staphylokokken*, *Streptokokken* und *Clostridium pefringens* [16].

4.4.1 *Staphylokokken*

Die Pathogenität der Staphylokokken beruht vor allem auf den unterschiedlichen Toxinen (Toxischer-Schock-Syndrom-Toxin, Enterotoxine), die sie freisetzen.

Typische Haut- und Weichteilinfektionen durch Staphylokokken sind:

1. Pyodermie
2. Postoperative und posttraumatische Wundinfektionen
3. Impetigo contagiosa
4. Mastitis puerperalis
5. Pemphigus

Die Peptidoglycan-Oberfläche der Staphylokokken führt zur Freisetzung von Zytokinen aus Makrophagen, Aktivierung des Komplementsystems und Plättchenaggregation. Die meisten humanpathogenen Staphylokokken besitzen eine Kapsel aus Polysacchariden, von denen man inzwischen 11 unterschiedliche Serotypen nachgewiesen hat. 75% der Infektionserreger sind vom Typ 5 und 8. Zusätzlich unterteilt man in Koagulase-positive und Koagulase-negative Staphylokokken.

Staphylococcus aureus ist wegen seiner Wandlungsfähigkeit und Virulenz als gefährlicher Problemkeim anzusehen. Die durch ihn verursachten ambulanten und nosokomialen Infektionen zeigen eine steigende Tendenz. Wegen der Zunahme der antibiotischen Resistenz erweist sich die Therapie zunehmend schwieriger [16].

4.4.2 *Streptokokken*

Streptokokken sind die häufigsten Erreger von Infektionen der Haut (40-60%) und des Nasen-Rachenraums (ca. 30%). Die Ansteckung geschieht meist über Tröpfchen- und Schmierinfektion. Man unterscheidet α - und β -hämolyisierende Bakterien und unterteilt sie nach R. Lancefield zusätzlich in die Serogruppen A-T. Für Haut- und Weichteilinfektionen spielt v.a. *Streptococcus pyogenes* eine wichtige Rolle [16].

4.4.3 *Clostridium perfringens*

Clostridium perfringens ist oft an Mischinfektionen, wie beim infizierten diabetischen Fuß oder bei postoperativen Wundinfektionen, beteiligt. Es handelt sich dabei um ein obligat anaerobes gram-positives Stäbchen, das Endosporen bildet. Die Endosporen sind sehr resistent und ermöglichen ein Überleben ausserhalb anaerober Bedingungen. Die Übertragung erfolgt bei verschmutzten Wunden, endogen oder iatrogen bei Mischinfektionen.

Auch hier sind es die Toxine, die die Virulenz ausmachen. Ausschlaggebend sind das Alpha-, Beta-, Epsilon- und Jotatoxin. Das Alphatoxin wirkt stark zytotoxisch und zerstört mithilfe der Lecithinase Membranen von Muskelzellen [16].

4.5 Labordiagnostik

4.5.1 *Material*

Für den Nachweis eines Erregers ist es wichtig zu wissen, ob das gewonnene Material aus einer normalerweise sterilen Körperregion stammt, oder aus einer, die Kolonisationsflora enthält.

Die Materialgewinnung aus dem **Respirationstrakt** kann mittels Tupferabstrich, Spülflüssigkeit, Punktat, oder expektoriertem Sputum erfolgen.

Aus dem **Urogenitaltrakt** kann Urin zur Untersuchung herangezogen werden. Dabei ist es wichtig zu beachten, dass Mittelstrahlurin regelmäßig mit der Flora der vorderen Harnröhre kontaminiert ist. Bei einer Keimzahl von $> 10^5$ /ml Morgenurin ist eine Infektion sehr wahrscheinlich.

Blutkulturen sollten beim Erwachsenen aus 10-20 ml Venenblut in je einer anaeroben und einer aeroben Blutkulturflasche angelegt werden. Abnahme von 3 Blutkulturen in 24 Stunden.

Eiter und Wundsekrete könne mithilfe von Abstrichtupfern von oberflächlichen Wunden entnommen werden. Die Untersuchung wird nur auf aerobe Bakterien durchgeführt. Bei tiefen und geschlossenen Wunde kann Material, Eiter, mit einer Spritze entnommen werden.

Material aus dem **Verdauungstrakt** kann sein: Stuhl, Duodenalsaft, Galle.

Zur Untersuchung eignen sich auch Liquor, Punktate, Exsudate und Transudate [15].

4.5.2 *Mikroskopie, Kultur, Identifizierung*

Mikroskopie

Für die Darstellung von Bakterien ist eine 1000-fache Vergrößerung notwendig. Selbst dann kann man sie nur sehen, wenn 10⁴-10⁵ Keime pro Milliliter vorhanden sind.

- Nativpräparate: Betrachtung lebender Bakterien mit oder ohne Vitalfärbung
- Gefärbte Präparate: Bei der Fixierung und Färbung gehen die Bakterien zugrunde. Die bekanntesten Färbungen sind die Färbung mit Methyleneblau und die Gramfärbung
- Fluoreszenzmikroskopie
- Immunfluoreszenz [15]

Kultur

Nährmedien: Für Nachweis und Identifizierung ist auf eine Kultur notwendig. Fast alle humanpathogenen Keime lassen sich auf Nährboden kultivieren. Die Nährmedien können flüssig sein (=Nährbouillon), oder eine gelartige Konsistenz besitzen (=Nähragar) [15].

Identifizierung

Für die Identifizierung können drei Merkmale herangezogen werden: Morphologische Merkmale, physiologische und chemische Merkmale (Antigenstruktur, DNA-Struktur) [15].

4.5.3 Molekulare Methoden

Molekulare Methoden dienen einerseits dem Nachweis erregerspezifischer Nukleinsäuresequenzen und andererseits der Identifizierung von Bakterien, die sich mit den klassischen phänotypischen Methoden nur schwer identifizieren lassen.

Diese Methode beruht auf dem Kenntnis unterschiedlicher Nukleotidsequenzen und Genen [15].

4.5.4 Nachweis von Antikörpern, Antigenen Toxinen

- **Antikörper:** Diese Methode gibt oft nur retrospektive Hinweise auf eine Infektion. Problematisch sind hierbei die Durchseuchung der Bevölkerung, serologische Narben und die oft späte Bildung von Antikörpern. Bei der Syphilis, den Treponemosen, Leptospirosen, Borreliosen und Rickettsiosen kommt der Antikörpernachweis zum Einsatz.
- **Antigene:** Hier erfolgt der Nachweis mit polyklonalen Antikörpern im Untersuchungsmaterial. Anwendung bei akuter eitriger Meningitis, Gonokokken, Streptokokken-Rachenabstrich.
- **Toxine:** Anwendung bei EHEC, Clostridium difficile, Clostridium tetani [15].

4.6 Grundlagen der Antibiotikatherapie

Die Therapie bakterieller Infektionen umfasst zahlreiche Wirkstoffe, die gegen spezifische Erreger und deren Eigenschaften gerichtet sind. Einige Medikamente

wirken bakteriostatisch, d.h. die Erreger werden in ihrem Wachstum behindert, andere wirken bakterizid und töten die Erreger ab.

Die Antibiotikatherapie hat unterschiedliche Angriffspunkte: sie greifen die Zellwand, die Zytoplasmamembran, den Proteinsyntheseapparat, die bakterielle DNA- und RNA-Synthese, oder die Folsäuresynthese an [14].

Leider können Bakterien aufgrund ihrer genetischen Variabilität Resistenzen gegen Antiinfektiva erwerben (MRSA- *methicillinresistenten Staphylokokkus aureus*). Besonders Krankenhauskeime weisen oft eine Mehrfachresistenz auf. Deshalb muss das Labor für eine gezielte Therapie Resistenztestungen durchführen, bei der die minimale Hemmkonzentration bestimmt wird [15].

4.6.1 Definition

Unter spezifischer antibakterieller Therapie versteht man eine Behandlung mit Antiinfektiva, die gegen einen bestimmten Erreger gerichtet sind. Diese Pharmaka wirken schon in minimalen Dosen gegen das Bakterium (=“selektive Toxizität“) ohne den Organismus zu schädigen. Die wichtigsten Vertreter der Antiinfektiva sind die Antibiotika.

Antibiotika sind Substanzen, die von Pilzen oder Bakterien produziert werden [15].

4.6.2 Einteilung nach Wirkmechanismus bzw. Angriffspunkt [14]

1. Hemmung der Zellwandsynthese: Zu dieser Gruppe gehören Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme, Vancomycin, Teicoplanin, Oritavancin, und Fosfomycin. Die Hemmung der Zellwandsynthese beeinflusst nur wachsende und proliferierende Bakterien; die Wirkung ist bakterizid.
2. Schädigung der Zytoplasmamembran: Vertreter dieser Substanzgruppe sind Polymyxin und Daptomycin.
3. Hemmung der Proteinbiosynthese: Zu dieser Gruppe gehören die Aminoglykoside, Lincosamine, Tetracycline, Makrolide und Ketolide, Chloramphenicol, Fusidinsäure, Streptogramin und Linezolid.
4. Störung von DNA-Synthese- und Struktur: Chinolone, Nitroimidazole,

Rifampicin, Ethambutol, Griseofulvin.

6. Hemmung der Folsäuresynthese: Sulfonamide, Trimethoprim, Paraaminosalicylsäure.

4.6.3 Resistenz [15]

Die Resistenzentwicklung in der Medizin ist auf zwei Ursachen zurückzuführen.

1. Bemerkenswerte genetische Variabilität bei den Bakterien, die dazu führt, dass Bakterien letztendlich gegen jedes Antiinfektivum resistent werden.
2. Ausbreitung resistenter, oft sogar multiresistenter Bakterienstämme.

Erworbene Resistenzen kommen gehäuft bei den Enterobacteriaceae, den Pseudomonaden, den Staphylokokken und den Enterokokken vor. Das macht sie zu Problemkeimen. Sie sind oft ursächlich für nosokomiale, oft lebensbedrohliche, schwer zu therapierende Infektionen. Ausserhalb des Krankenhauses werden multiresistente Keime weniger oft gefunden.

Resistenzen entwickeln sich auf dem Boden von **Selektion**. Je mehr Antiinfektiva angewendet werden, umso häufiger lassen sich resistente Erreger finden. Das ist der Grund dafür, weshalb sie besonders in Krankenhäusern vorkommen. In Abhängigkeit der Verschreibungspraxis eines Krankenhauses, weist die Krankenhausflora einen ganz speziellen Resistenzphänotyp auf. Diesen Phänotyp muss der Arzt kennen um bei Bedarf eine „**kalkulierte Antibiotikatherapie**“ durchführen zu können. Darunter versteht man eine Chemotherapie unter Berücksichtigung der Häufigkeit, mit der ein Erreger eine bestimmte Krankheit verursacht, sowie die Resistenzlage bei diesem Bakterium.

Problematisch sind auch Infektionen, die auf dem Boden einer Durchblutungsstörung entstehen, z.B. beim diabetischen Fußsyndrom, oder dem Dekubitus, da bei diesen das Antibiotikum schlecht zum Zielort transportiert werden kann. Die antimikrobielle Substanz kann den Wirkort (target site) wegen einer Minderperfusion des Gewebes, wegen Ödemen und Gewebsnekrosen, aber auch aufgrund systemischer Probleme wie septischen Schock und peripherer Vaskokonstriktion bei Katecholamingaben nicht erreichen.

Aus diesem Grund ist die lokale Antibiotikabehandlung von Dekubitalucera und offenen Beinen in Österreich obsolet, da erstens die Wirksamkeit bezweifelt wird und zweitens eine Resistenzbildung bzw. eine Kontaktsensibilisierung befürchtet wird. Daher führt man eine Reinigung der Wunde und lokale Antiseptikabehandlung durch und legt vorbeugend Silberpräparate auf.

4.6.4 Bekämpfung der Resistenz [15]

Die Resistenzentwicklung, der Austausch von Resistenz-Determinanten zwischen den Bakterien und die Ausbreitung von multiresistenten Keimen können nicht verhindert werden. Man kann einzig und allein versuchen den Selektionsdruck zu reduzieren. Das geschieht durch:

- a. Strenge Indikation für den Einsatz von Antiinfektiva
- b. Richtige Auswahl, Dosierung und Therapiedauer von Antiinfektiva
- c. Vermeidung der Verwendung bei nichtmedizinischer Indikation
- d. Rezeptpflicht. Antiinfektiva dürfen keine OTC („over the counter“)-Medikamente sein
- e. Einsatz von Kombinationstherapien bei Erfordernis
- f. Schutzimpfungen
- g. Richtiges Infektionsmanagement, v.a. im Krankenhaus

5 MEDIZINISCHE RELEVANZ – CHRONISCHE ENTZÜNDUNGEN

5.1 Dekubitalulzera

Unter einem Dekubitus versteht man eine ischämische Nekrose durch chronischen Druck auf ein Hautareal. Es tritt besonders bei älteren Menschen auf und ist bei erhaltener Sensibilität sehr schmerzhaft [17]. Dekubitalgeschwüre können Pflegefehler sein und werden deshalb gerne als Gradmesser der Pflegequalität gewertet. In der internationalen Klassifikation der Krankheiten erhält der Dekubitus den Code L89 [18].

Der Begriff Dekubitus leitet sich vom lateinischen Wort „decumbo“ ab. Es bedeutet „sich lagern“, „sich krank ins Bett legen“ und „krank darnieder liegen“ [19]. Druckgeschwüre durch dauernden äußeren Druck können am ganzen Körper entstehen. Die Prävalenz des Dekubitus kann zwischen 5% und 40% variieren [5,6].

Die Behandlung und Vermeidung von Wundinfektionen bei Dekubitalulzera ist von großer Bedeutung, da es als Folge die Immobilisierung zur Pneumonie, durch Streuung von Eiterherden über die Blutbahn zur unter Umständen tödlichen Sepsis, kommen kann.

Bei der Therapie geht es vor allem darum, eine Druckentlastung zu erzielen. Dies einerseits durch eine häufig wechselnde Lagerung, oder durch Weichbettung mit entsprechenden Antidekubitusmatratzen oder -betten. Wenn es möglich ist, sollte der Patient mobilisiert werden. Als prophylaktische Maßnahmen bekommt neben der Druckvermeidung die richtigen Hautpflege eine entscheidende Bedeutung. Damit keine Wunden entstehen ist die richtige Hautpflege nötig: trocken, spröde Haut sollte mit Wasser-in-Öl Emulsionen gepflegt werden.

5.1.1 Definition des Dekubitalulkus

Der Ausdruck „Druckgeschwür“ weist schon auf die lokale Druckbelastung als

maßgebliche Ursache hin. Hier gilt: das Produkt Druck mal Zeit. Durch die mangelnde Blutzufuhr bzw. eine Blutleere entstehen ischämische Drucknekrosen der Haut und des darunterliegenden Gewebes. Chronischer Sauerstoff- und Nährstoffmangel führen dann zu einer Unterversorgung des Gewebes und wenn nicht früh genug gehandelt wird, zu einem Dekubitus. Auch Scherkräfte beim Umlagern und Hochziehen der Patienten sind als Ursache einer Ischämie nicht zu vernachlässigen [20].

1930 befasste sich E.M. Landis mit der Messung des Kapillardrucks. Die physiologischen Druckwerte gelten für das Niveau auf der Höhe des Herzens, oberhalb bzw. unterhalb des Herzens kommt durch den hydrostatischen Druck ein zusätzlicher Betrag hinzu [21].

1. Druck im artriellen Schenkel der Kapillaren: 32 (21-48) mmHg
2. Druck im venösen Schenkel der Kapillaren: 12 (6-18) mmHg

Bei hohen Spitzendrücken (Zehenspitzen einer Ballettänzerin) entstehen keine Schäden, wenn immer wieder eine Entlastungsphase und damit eine Durchblutungsphase eintritt.

Relative niedrige Druckwerte, welche aber über mehrere Stunden einwirken, genügen um einen Dekubitus zu verursachen. (z.B. große fingerdicke Bettfalte, oder harter Rand auf dem OP-Tisch) [20].

Der Anstieg der sauren Stoffwechselprodukte löst beim Gesunden einen Reflex aus, der zu einer Umlagerung und damit Entlastung der gefährdeten Hautstellen führt, bevor es zu einer Schädigung der entsprechenden Areale kommt. In der normalen Schlafphase rechnet man mit ca. 250 Spontanbewegungen, als kritischer Minimalwert werden < 50 spontane Lagewechsel angesehen (hier entwickeln ca. 10 % ein Ulcus), bei <20 spontanen Lagewechseln 90 % [22]. Bei Älteren und Kranken Personen sind diese Reflexe oft nur noch eingeschränkt, bei Querschnittgelähmten oder Patienten mit neurologischen Erkrankungen fehlend, sodass es zu keiner Entlastung kommt.

Auf die Übersäuerung reagiert der Körper mit einer Weitstellung der Gefäße, sodass diese Hautareale stärker durchblutet sind (eine wegdrückbare Rötung), Dekubitus Grad I, ist die Konsequenz [22].

Besonders gefährdet sind Stellen mit geringer Weichteildeckung durch Muskeln oder Fettgewebe und knöchernen Widerlagern, da dadurch der Druck nicht genügend verteilt werden kann. Dies betrifft vor allem die Kreuzbeinregion, die Fersen, die Trochanteren und die Knöchel [20].



Abbildung 11: Fersendekubitus bei PAVK



Abbildung 12: Stumpfdekubitus bei Kontraktur bzw. Prothesendruck



Abbildung 13: Stumpfröntgen zeigt Knochenzuspitzung

5.1.2 Dekubitusstadien

Die seit 1989 geltende Klassifizierung (National Pressure Ulcer Advisory Panel) teilt Dekubitusgeschwüre in vier Grade:

1. **Grad 1:** nicht wegdrückbare, umschriebene Hautrötung bei intakter Haut (Gewissheit verschafft der sogenannte Fingertest. Bleibt das Areal unter leichtem Druck rötlich, ist also nicht wegdrückbar (= Weißfärbung), handelt es sich um einen Dekubitus ersten Grades). Weitere klinische Zeichen können Ödembildung, Verhärtung und eine lokale Überwärmung sein [23].



Abbildung 14: Dekubitus Grad I am Knie bei Epilepsiepatienten und länger dauernder Bewusstlosigkeit

- Grad 2:** Teilverlust der Haut; Epidermis bis hin zu Anteilen des Koriums ist geschädigt. Die Haut ist oberflächlich geschädigt: Blase, Hautabschürfung oder flaches Geschwür [23].



Abbildung15: Dekubitus Grad II bei Patient mit Multipler Sklerose

- Grad 3:** Tiefenschädigung von Haut- und Gewebe. Verlust aller Hautschichten und Schädigung oder Nekrose des subkutanen Gewebes, die bis auf die darunter liegende Faszie reichen kann. Der Dekubitus zeigt sich klinisch als tiefes, offenes Geschwür [23].



Abbildung 16: Dekubitus Grad III sacral

4. **Grad 4:** Verlust aller Hautschichten mit ausgedehnter Zerstörung, Gewebsnekrose oder Schädigung von Muskeln, Knochen oder stützenden Strukturen wie Sehnen oder Gelenkskapseln, mit oder ohne Verlust aller Hautschichten [23].



Abbildung 17: Dekubitus Grad IV sacral und über Tuber ischiadicum

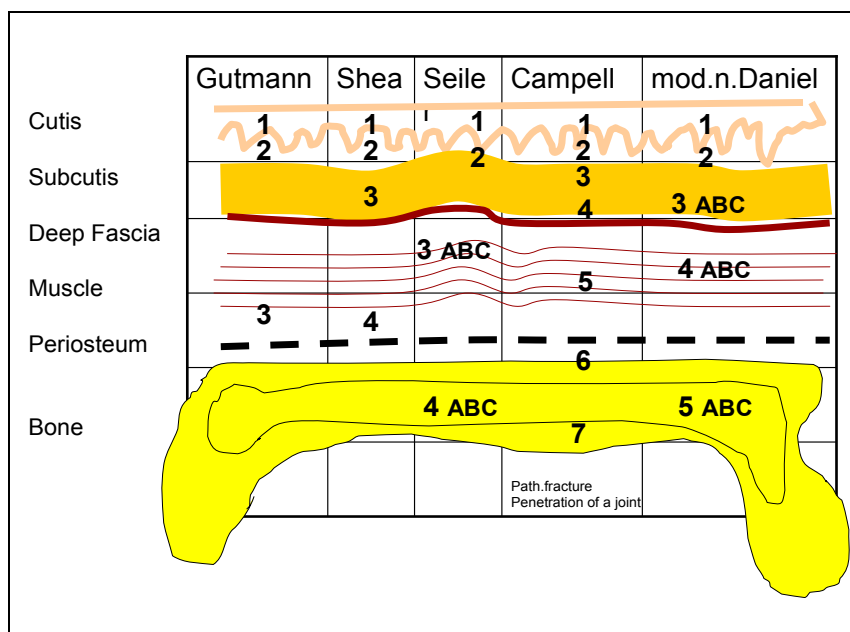


Abbildung 18: Verschieden Klassifikationen des Dekubitus (Schema modifiziert nach Lüscher)

5.1.3 Pathophysiologie des Dekubitalulkus

Sobald die Haut für längere Zeit einer Druckeinwirkung ausgesetzt ist, verändert

der menschliche Körper selbstständig die Position. Patienten, die beispielsweise im Koma, unter längerer Narkose liegen oder eine Neuropathie haben, sind besonders gefährdet, einen Dekubitus zu entwickeln, weil dieser natürliche Reflex bei ihnen nicht mehr funktioniert. Die Komprimierung der Gefäße führt zu einer Mangel durchblutung des Gewebes bis hin zur Ischämie. Eine ausreichende Sauerstoffversorgung ist nicht mehr gewährleistet. Zusätzlich lagern sich saure Stoffwechselprodukte und Metabolite in den mangel durchbluteten Gefäßen an. Die Ansammlung von solchen Giftstoffen führt zu einer Azidose und einer dadurch ausgelösten Gefäßerweiterung, erkennbar durch eine verstärkte Rötung der Haut. Durch die aus dem Intravasalraum austretende Flüssigkeit kommt es zur Ausbildung von Blasen und Ödemen. Die andauernde Hypoxie in Verbindung mit der bestehenden Ischämie führt zum Absterben des Gewebes und somit zur Ausbildung eines Dekubitus [23].

Dekubitusfördernde Faktoren und Krankheitsbilder:

- Erkrankungen wie z.B. pAVK, Stoffwechselerkrankungen insbesondere Diabetes mellitus, Genuss- und Drogensucht, konsumierende Grunderkrankungen, Demenz, Frakturen, Polyneuropathie, neurologische Erkrankungen, psychische Erkrankungen
- Bewegungseinschränkung bis zur Immobilität
- Medikamente z.B. Sedativa (fördern durch Ruhigstellung -> Bewegungseinschränkungen), Antibiotika (Förderung von Resistenzen, Abwehrschwäche), Diuretika (-> Elektrolytausschwemmung), Chemotherapeutika, Antikoagulantien
- Blasenverweilkatheter
- Ernährungs- und Flüssigkeitszustand
- Hautzustand und Hautveränderungen wie Allergien/Psoriasis/Neurodermitis
- Hautfeuchtigkeit/Mazeration: Fieber, Kontinenzsituation, Schwitzen
- mangelndes Schmerzempfinden
- langandauernde Narkosezeiten
- Kontrakturen, Skelettdeformierungen, Paresen

Zusammenfassend gelten als dekubitusauslösende Faktoren: Druck,

Druckzeit, Druckstelle, Motivation, Körperform, Hautzustand und die Stoffwechselsituation [23].

5.1.4 Prophylaxe

Ein routinemäßiger Bestandteil der täglichen Pflege sind Prophylaxemaßnahmen zur Dekubitusvorsorge. Der Pflegekraft obliegt die Einschätzung des individuellen Dekubitusrisikos, um die notwendigen Maßnahmen einleiten zu können. Zur Vereinheitlichung der Dekubitusprophylaxe wurde vom Deutschen Netzwerk für Qualitätsentwicklung in der Pflege (DNQP) ein Expertenstandard Dekubitusprophylaxe herausgegeben. Dieser formuliert hierzu: „Die Pflegefachkraft beurteilt das Dekubitusrisiko aller Patienten/Betroffenen, bei denen die Gefährdung nicht ausgeschlossen werden kann, unmittelbar zu Beginn des pflegerischen Auftrages und danach in individuell festzulegenden Abständen sowie unverzüglich bei Veränderungen der Mobilität, der Aktivität und des Druckes u.a. mit Hilfe einer standardisierten Einschätzungsskala, z.B. nach Braden, Waterlow oder Norton“. Eine Lagerung erfolgt immer in einem individuellen Zeitabstand. Die Wirksamkeit des bekannten „Zwei-Stunden-Intervalls“ ist durch keine wissenschaftliche Untersuchung belegt. Für einen kachektischen Patienten mit Halbseitenlähmung nach Apoplex kann diese Zeitspanne möglicherweise bereits zu lang zu sein. Es gibt eine Vielzahl von Lagerungsmöglichkeiten. Für alle gilt jedoch, nicht Haut auf Haut zu lagern, die Gelenke in Funktions- oder Mittelstellung zu belassen und für eine leichte Erhöhung der Extremitäten zur Beschleunigung des venösen Rückflusses zu sorgen. Die Lagerung verbessert die pulmonale Situation und erhöht die Fähigkeit zur Eigenbewegung bei gleichzeitiger Druckentlastung der aufliegenden Regionen [23].

5.2 Ulcus cruris

Der Begriff „Ulcus cruris“ (lat. *ulcus* „Geschwür“ und *crus* „Schenkel“, „Unterschenkel“) beschreibt eine Geschwür am Unterschenkel. „Ulcus cruris“ ist ein rein klinischer Begriff, der eine genaue differentialdiagnostische Abklärung erfordert

[17] . Am häufigsten findet er sich im Bereich des distalen Unterschenkels in der Umgebung des oberen Sprunggelenkes (Ulcus cruris venosum). Dieser Substanzdefekt zeigt sich klinisch als infizierte, häufig schmerzhaft Wunde mit der charakteristischen, sehr geringen Heilungstendenz [23,25].

5.2.1 Einteilung des Ulcus cruris

Generell unterteilt man die Ulcera nach ihrer Ätiologie:

1. Ulcus cruris arteriosum
2. Ulcus cruris neoplasticum
3. Ulcus cruris mixtum
4. Ulcus cruris venosum: es ist mit ca. 56-80% aller chronischen Ulzerationen, die häufigste Ursache für nicht spontan abheilende Wunden [10].

5.2.2 Pathophysiologie des Ulcus cruris

Zu den Hauptursachen gehört eine mangelnde Durchblutung des Gewebes (Makro- oder Mikrozirkulation). Die schlechte Durchblutung führt einerseits zur Entwicklung einer Wunde am Unterschenkel, meist ausgelöst durch ein Bagateltrauma, andererseits verhindert sie eine rasche physiologische Abheilung [24].

Die häufigste Form ist das Ulcus cruris venosum [10]. Es ist die schwerste Form der chronisch venösen Insuffizienz (CVI). Dabei kommt es durch einen mangelnden Abfluss des venösen Blutes zu einer venösen Stauung. Durch Übergreifen auf den Endstrombereich kommt es zu einer Schädigung der Mikrozirkulation und Entstehung einer venösen Mikroangiopathie. Folge sind Permeabilitätsstörungen mit Ödem und Hämosiderose, Entzündung mit Gewebsschädigung und Fibrose/Sklerose, letztlich Kapillaruntergang und –rarefizierung. Die aus Fibrose und Kapillarrarefizierung resultierende Ischämie führt zu trophischen Gewebsschäden einschließlich einer Ulkusbildung [17].

Ein Bein mit einer venösen Stauung kann man an einigen Merkmalen erkennen:

1. das Bein ist geschwollen, um bereits bestehende Geschwüre finden sich oft bräunliche Hyperpigmentierungen
2. das Bein ist trocken und juckt (Stasisekzem)
3. das Geschwür ist nässend und feucht, meist schmerzlos
4. Lokalisation besonders im Bereich der Knöchel, Innenseite des Beines
5. Dermatosklerose und die Atrophie blanche [26]

Zu den Risikofaktoren gehören vor allem venösen Störungen, diese machen circa 85% aller Geschwüre aus. Sie sind die Folge einer chronischen Venenschwäche, auch chronisch venöse Insuffizienz (CVI) genannt. Häufig ist die Anlage zu einer Venenschwäche erblich bedingt. Viele Patienten haben auch Probleme mit den Venenklappen, die den venösen Rückfluss zum Herzen unterstützen. Auch die hormonelle Umstellung in der Schwangerschaft führt zu einer Erweiterung der Venen. Thrombosen, also Blutgerinnsel in den tiefen Bein- und Beckenvenen sind eine weitere Ursache der chronisch venösen Insuffizienz. Man spricht in diesem Falle auch von einem postthrombotischen Syndrom [27].

5.2.3 Prophylaxe und Therapie des Ulcus cruris venosum

Grundsätzlich sollte eine Frühtherapie der CVI angestrebt werden, um irreversible Folgeschäden zu vermeiden bzw. zu verzögern. Weiterhin erfordert die Therapie der CVI zuvor eine genaue Diagnostik mit Abklärung der gestörten venösen evtl. auch arteriellen Hämodynamik.

Zur Ulkusbehandlung gehört vor allem die Feuchtbehandlung und eine stadienbezogene Behandlung entsprechend dem Zustand des jeweiligen Ulkus. Dazu gehören das Débridement, die antiinfektiöse Behandlung (antiseptische Umschläge, z.B. AgNO₃), Feuchtbehandlung mit Hydrogelen, -kolloiden und -polymeren, sowie Alginaten und die Ulkusdeckung durch Hauttransplantat bei gut konditioniertem Wundgrund [28].

5.3 Periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK)

Die pAVK entsteht durch eine meist chronisch obliterierende Arteriosklerose (>95%). Zu den Hauptrisikofaktoren zählen der chronische Nikotinabusus und der Diabetes mellitus, ferner arterielle Hypertonie und Fettstoffwechselstörungen [28]. Die durch die pAVK entstehenden arteriellen Beingeschwüre machen etwa 4- 30% der Unterschenkelgeschwüre aus [30].

Ein arterielles Ulkus entsteht durch eine arterielle Minderversorgung, ursächlich hervorgerufen durch eine Arteriosklerose, arterielle Thrombose, oder arterielle Embolie. Die Auftretenswahrscheinlichkeit liegt bei 12 – 16/1000 Einwohner jährlich [31].

Im Unterschied zu den venös bedingten Ulcera sind die arteriellen

- meistens an der Unterschenkelaußenseite und an den Akren (Zehen und Fersen) lokalisiert
- meist schmerzhaft
- Füße und Beine sind kalt, pulslos, blass und evtl. bläulich
- Ulzera sind tief und nekrotisch belegt, sie können trocken, schwarz, oder aber auch entzündlich, feucht, schwarz-gelb, nekrotisch sein [31].

Leitsymptom der pAVK ist der belastungsabhängige ischämische Schmerz, der sich distal der Stenose projiziert und den Patienten zwingt, nach einer bestimmten Gehstrecke stehenzubleiben („Schaufensterkrankheit“ = Claudicatio intermittens) [29]. Vorallem der nächtliche Ruheschmerz plagt die Patienten, die oft vor Schmerzen erwachen. Sich aufsetzen und die Beine aus dem Bett hängen lassen, führt oft zu einer Linderung, da die Schwerkraft die arterielle Durchblutung unterstützt und mehr arterielles Blut ins Bein gelangt.

5.3.1 Therapie des arteriellen Ulkus

Das primäre Therapieziel ist, die Durchblutung wiederherzustellen, sei es durch eine endovaskuläre Revaskularisation/percutane transluminale Angioplastie, eine Stentimplantation, durch ein offenes gefäßchirurgisches Verfahren (Venen- oder

Kunststoffbypass), oder zumindest medikamentös (Thrombozytenaggregationshemmer wie Acetylsalicylsäure/Thrombo-Ass, oder Plavix oder eine Antikoagulantientherapie mit Cumarinderivaten/Marcoumar, Sintrom). Meist kommen mehrere Methoden kombiniert zum Einsatz [29].

5.4 Das Diabetische Fußsyndrom (DFS)

5.4.1 Definition

Unter dem diabetischen Fußsyndrom wird das Auftreten von Folgeschäden am Fuß im Zusammenhang mit der diabetischen Grunderkrankung verstanden [16].

5.4.2 Epidemiologie

Bei etwa 7% aller Diabetiker ist mit einem behandlungsdürftigen diabetischen Fußsyndrom zu rechnen. In Deutschland wird die Anzahl der Patienten auf 280.000 geschätzt. In Schweden sind 25% aller Krankenhausaufenthalte von Diabetikern durch das diabetische Fußsyndrom bedingt. In Großbritannien liegen die stationären Kosten für die Behandlung des diabetischen Fußsyndroms bei 223 Millionen Pfund und sind damit höher als alle diabetischen Folgeschäden zusammengenommen [16].

5.4.3 Pathogenese [16]

Als Hauptursache der Entstehung des DFS gilt die periphere Neuropathie, die im Rahmen des Diabetes auftreten kann. Die Neuropathie betrifft sensible, motorische und autonome Fasern gleichermaßen. Die Reduktion der sensiblen Funktionen bedingt einen Verlust der protektiven Eigenschaften des Schmerzes. Dies begründet die unerklärliche Missachtung auch fortgeschrittener krankhafter Prozesse durch den Patienten. Ferner führt die diabetische Polyneuropathie zur Atrophie der Binnenmuskulatur des Fußes. Daraus resultiert einer Veränderung der Statik sowie

eine Fehlregulation der gesamten Fußmotorik. Klinisch zeigt sich eine atrophische Haut mit verminderter Schweißsekretion, Hyperkeratosen, eine Atrophie der Knochen, die begleitet ist von einer muskulären Atrophie. Alle Krankheitsprozesse beim diabetischen Fuß werden durch die begleitende Angiopathie der Mediasklerose begünstigt.

Wichtige Pathogenitätsfaktoren für den weiteren Krankheitsverlauf sind

- Mechanischer Stress und
- die bakterielle Infektion.

Fußdeformität und Fehlbelastung durch unzureichendes Schuhwerk führen zur Entwicklung von Druckgeschwüren. Über Mikro- und Makroläsionen gelangen Bakterien in den subkutanen Bereich und bedingen eine Gewebsentzündung, die ohne Behandlung in eine Gewebszerstörung übergeht. Oft manifestiert sich eine Infektion als so genanntes *Malum perforans pedis* und als *diabetische Gangrän*. Beim *Malum perforans* zeigt sich ein scharf begrenztes Ulkus an typischen Druckstellen im Bereich der Vorfüße u./o. der Großzehen. Die Ulzera sind meist sehr tief und haben Knochenkontakt. Die tiefen, schmerzlosen Ulzera sind dadurch auch häufig mit einer Osteomyelitis kombiniert.

Bei der diabetischen Gangrän können Zehen, Vorfuß und schließlich der gesamte Unterschenkel betroffen sein. Am Beginn stehen eine Schwellung und eine livide Verfärbung, die sich allmählich zu einer feuchten, oder trockenen Gangrän ausbildet. Bei manchen Patienten fehlen systemische Entzündungszeichen trotz eines bestehenden Weichteilinfektes und durch die Sensibilitätsstörung, verursacht durch die Neuropathie, werden Gewebsdefekte oft erst sehr spät bemerkt. Häufig kommt es durch die fehlenden Schmerzen zu einer Bagatellisierung der anfänglich kleinen Hautläsionen. Durch die Fehleinschätzung von Infektion und Gewebsuntergang durch ungeschulte Hausärzte, erfolgt oft viel zu lange eine konservative Behandlung mit ungenügender Druckentlastung der plantar belasteten Zonen, wodurch es zu einer raschen Progredienz und schließlich zum Extremitätenverlust kommen kann. Man rechnet, dass alle 20 Sekunden weltweit irgendwo ein Bein aufgrund eines Diabetes amputiert wird (International Consensus on The Diabetic Foot 2011). Durch

die Folgen des nicht rechtzeitig entdeckten und diagnostizierten „diabetischen Fußes“, entstehen durch den Verlust der unteren Extremität bis hin zum Oberschenkel, großes menschliches Leid und hohe medizinische Behandlungskosten.

6 ALLGEMEINES ZUR WUNDHEILUNG

Die Haut spielt eine wichtige Rolle als Barriere gegenüber äußeren, schädlichen Einflüssen der Umwelt. Bei Verletzungen strebt der Organismus deswegen so schnell wie möglich eine Reparatur an, um die Schutzfunktion der Haut wieder herzustellen.

Die Wundheilung ist ein natürlicher Prozess und beginnt bereits wenige Minuten nach der Wundsetzung. Betrachtet man die Wundheilung genauer, lassen sich unterschiedliche Phase mit spezifischen Merkmalen differenzieren [13].

6.1 Wundheilungsphasen

Die Wundheilung im Bereich der Haut durchläuft verschiedene Stadien; initial kommt es zu einer Exsudation mit Bildung eines fibrinreichen Blutgerinnsels (Schorf). Danach die resorptive Entzündung, die Reparation und die Parenchymregeneration (Reepithelisierung) [13].

1) Exsudative Phase

In dieser Phase kommt es zu einem Auffüllen des Defekts mit koaguliertem Blut und Fibrin, was eine Stabilisierung der Wunde bewirkt. An der Oberfläche wird die Wunde mit koaguliertem Blut (Blutschorf) bedeckt [13].

2) Resorptive Phase

In dieser Phase kommt es neben der Einwanderung segmentkerniger und neutrophiler Granulozyten, insbesondere auch von Monozyten/Makrophagen, die die Zelltrümmer und den Blutpfropf abräumen [13].

3) Reparative Phase

In der reparativen Phase kommt es zur Bildung von Granulationsgewebe. Es entsteht durch die Proliferation von Kapillaren und Fibroblasten. Die Umwandlung des

Granulationsgewebes in reifes Narbengewebe ist ein langwieriger Prozess, der Wochen bis Monate dauern kann. Dieser Prozess geht mit der Resorption des Exsudats und einer starken Kollagensynthese einher. Das gebildete Kollagen sorgt für die mechanische Stabilität der Narbe. Da aber keine elastischen Fasern gebildet werden, verfügt das Narbengewebe über keine Elastizität und ist unvermeidbar minderwertig, weswegen in der Therapieplanung eine minimale Narbe angestrebt wird [13].

4) Reepithelisierung

Die Reepithelisierung erfolgt durch die Einwanderung basaler Epithelzellen zwischen die Schicht des oberflächlichen Blutschorfs und dem Granulationsgewebe schon am Beginn. Dabei bildet sich eine epitheliale Zone aus. Gleichzeitig proliferieren die Epithelzellen und bilden ein mehrschichtiges Epithel, das sich zu einem normalen Epithel ausdifferenziert. Die neugebildete Epidermis besitzt im Gegensatz zur normalen Haut keine Reteleisten und keine Melanozyten, auch Hautanhangsgebilde fehlen. Nach Abschluss dieser Phase wird der oberflächliche Blutschorf abgestoßen. Die unkomplizierte Wundheilung mit nur geringer Narbenbildung wird als Heilung *per primam intentionem* (PP-Heilung) bezeichnet, anders als die Heilung *per secundam intentionem* (PS-Heilung) [13].

6.2 Begriffserklärung Wunde–Ulkus

Als Wunden werden akute Substanzdefekte bezeichnet, die traumatisch (z. B. Verletzungen, chirurgische Eingriffe) in primär gesunder, nicht vorgeschädigter Haut entstehen. Sie weisen eine gute Heilungstendenz auf. OP-Wunden heilen innerhalb von 2–3 Wochen ab. Ulzera hingegen sind tiefe Defekte bis in die Dermis oder Subkutis (»full-thickness-depth«) in vorgeschädigter Haut. Sie zeichnen sich durch schlechte Heilungstendenz aus [32]. Die erfolgreiche Abheilung von Ulzera erfordert unbedingt die Beseitigung der Ursachen und allfälliger Störfaktoren [32].

Zu den häufigsten Ursachen zählen wie zuvor beschrieben vor allem venöse und arterielle Durchblutungsstörungen, diabetische Neuropathie und Druck.

6.3 Biologie der Wundheilung

Eine Störung der Wundheilung tritt auf, wenn systemische und lokale Faktoren den Heilungsverlauf und das Ergebnis der Narbenbildung negativ beeinflussen [12]. Das oberste Ziel bei der Behandlung von Wunden ist ein rascher, funktionell und ästhetisch zufriedenstellender Wundverschluss. Voraussetzung hierfür ist das Verständnis für die grundlegenden Wundheilungsprozesse. Die Wundheilung ist ein äußerst komplexer und dynamischer Reparaturvorgang: Blut-, Bindegewebs und Epidermiszellen, die extrazelluläre Matrix (ECM) sowie unzählige Zytokine und Wachstumsfaktoren spielen dabei eine wesentliche Rolle und treten in komplexe Wechselwirkung miteinander [34, 35, 36].

Während den verschiedenen Phasen der Wundheilung laufen viele fein aufeinander abgestimmte Prozesse ab: Chemotaxis und Phagozytose, Bindegewebsneubildung mit Synthese, Degradation und Umbau von Kollagen, Angiogenese, Produktion neuer Glykosaminoglykane und Proteoglykane und nicht zuletzt die Epithelisierung. Das Resultat der Wundheilung ist, sobald das Stratum reticulare, oder tiefere Hautschichten geschädigt sind, beim postfötalen Individuum stets eine Narbe [37]

Zu den wichtigsten Regulationsfaktoren zählen TGF- β 1, der Plättchenabkömmling PDGF, IGF-1 und EGF. Diese Zytokine leiten die Wundheilungskaskade ein, indem sie Makrophagen, Fibroblasten und Gefäßzellen ins Wundgebiet dirigieren und dort aktivieren [38, 39].

In der **Entzündungsphase** der Wundheilung spielt die Einwanderung von Leukozyten eine große Rolle. Bereits einige Stunden nach der Verletzung findet man neutrophile Granulozyten in der Wunde. Der Höhepunkt ihrer Einwanderung ist nach 2 Tagen überschritten und nimmt über die folgenden Tagen ab, vorausgesetzt dass keine Infektion stattfindet. Mit einigen Tagen Verzögerung erreicht die Einwanderung von Monozyten (und deren Umwandlung in Gewebsmakrophagen) ihren Höhepunkt (Tag 4–5). Zuletzt folgen die Lymphozyten (Tag 6) [40,41,42,43].

Die zeitlich begrenzte Hauptfunktion der Neutrophilen besteht vermutlich in der *Verhütung von Wundinfekten*: sie phagozytieren und eliminieren Bakterien und bauen fremdes Material und devitales Gewebe ab. Neutrophile synthetisieren und setzen Entzündungsmediatoren wie Tumor Nekrose Faktor- α (TNF- α) und Interleukin-1 (IL-1) frei, diese wiederum aktivieren Fibroblasten und Epithelzellen. Weiters produzieren und speichern sie große Mengen aggressiver Proteasen und freier Sauerstoffradikale, mit denen sie phagozytirtes Material verdauen. Nach ihrem Zelltod gelangen diese Noxen in das Wundgebiet, schädigen das Gewebe und verlängern unter Umständen die Entzündung. Letztlich werden sie mit dem Exsudat und Debris an die Wundoberfläche abgeschieden oder von Makrophagen phagozytiert [44].

Makrophagen nehmen ferner eine Schlüsselfunktion bei der *Reparation der Wunde* ein und vermitteln den Übergang von der Entzündungsphase zur Proliferationsphase [39]. Sie produzieren zahlreiche Zytokine und Wachstumsfaktoren: z. B. TNF- α , PDGF, Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF), TGF- α , - β , IL-1, IL-6, IGF-1 und Fibroblast Growth Factor (FGF). Diese Faktoren führen zur geordneten Rekrutierung und Proliferation von Fibroblasten und Endothelzellen und zur regelrechten Ausbildung von Granulationsgewebe. Makrophagen spielen somit eine essentielle Rolle bei der Wundheilung [34].

Eine Depletion von Monozyten und Gewebsmakrophagen verursacht Wundheilungsstörungen und hat mangelhaftes Wunddebridement und verzögerte Bindegewebsproliferation zur Folge [35]. Wegen des Gefäßschadens herrscht unmittelbar nach der Verletzung im Wundareal Sauerstoffarmut. Diese zweifellos bedrohliche Situation hat auch günstige Auswirkungen: die Hypoxie stimuliert die Migration von Keratinozyten, die Angiogenese und die Proliferation von Fibroblasten. Auch die Synthese kritischer Wachstumsfaktoren und Zytokine einschließlich PDGF, VEGF und TGF- β 1 wird angeregt.

4–5 Tage nach der Verletzung beginnt die reparative Wiederauffüllung des Gewebsdefektes mit frischem Bindegewebe aus einsprossenden Gefäßen, proliferierenden Fibroblasten und neu geformter ECM. Im Lauf der folgenden Tage

bis Wochen wird der initiale provisorische Wundpfropf aus geronnenem Blut völlig von diesem Granulationsgewebe durchdrungen und ersetzt. Zuletzt stellt ein neues Epithelrasen die endgültige Integrität der Haut wieder her [39,40].

Die Granulation in der **Proliferationsphase** beginnt etwa 3 Tage nach der Gewebeerletzung und dauert ungefähr 2 Wochen an. Sie ist charakterisiert durch den Ersatz der provisorischen Fibrin/Fibronectin-Matrix durch neu gebildetes Granulationsgewebe. Makrophagen, Fibroblasten und Blutgefäße wandern gemeinsam aus dem umliegenden Gewebe in die Wunde ein. Die Makrophagen setzen kontinuierlich Wachstumsfaktoren frei, und regulieren und stimulieren auf diese Weise den komplexen Prozess der Fibroplasie und Angiogenese [38]. Die Migration der Fibroblasten wird wesentlich von PDGF, TGF- β und basic Fibroblast Growth Factor (b-FGF) gesteuert, auch Nerve Growth Factor (NGF) aus peripheren Nerven des Wundgebietes scheint eine wichtige Rolle zu spielen [45,46]. Die Wanderungsrichtung wird bestimmt durch die Konzentrationsgradienten der chemotaktischen Faktoren und die Ausrichtung der fibrillären Strukturen von provisorischer Matrix und neu gebildeter ECM [43].

Die Neubildung der Blutgefäße wird ebenfalls von Wachstumsfaktoren (z. B. b-FGF, TGF- β , VEGF) induziert. Auch das lokale Wundmilieu einschließlich Hypoxie, saurer pH und hohe Laktatspiegel stimulieren die Angiogenese. Endothelzellen wandern ein, proliferieren, formen neue Blutgefäße und durchwachsen mit einem reich verzweigten Geflecht die Fibrinmatrix. Die jungen Blutgefäße sichern dadurch die Bereitstellung von Sauerstoff und Nährstoffen, die für die reparativen Prozesse benötigt werden [41,47]

In der anschließenden Wundkontraktion findet keine Auffüllung des Defektes durch neues Gewebe statt, sondern eine aktive Annäherung der gesunden Wundränder zueinander. Die Wundkontraktion setzt – gleichzeitig mit der Remodellierungsphase – bereits einige Tage nach der Verletzung ein. Ermöglicht wird die Wundkontraktion durch Myofibroblasten, das sind modifizierte Fibroblasten mit kontraktile Eigenschaften. Myofibroblasten besitzen aktinhaltige kontraktile Filamente, die ihnen Eigenschaften glatter Muskelzellen verleihen. Die Kontraktion der Myofibroblasten,

die wie ein Maschenwerk das Granulationsgewebe durchziehen, führt schließlich zur Schrumpfung und Verkleinerung des Wundvolumens. [48] Stimuliert wird die Wundkontraktion unter anderem durch TGF- β und PDGF. Das Ausmaß der Wundkontraktion wird kritisch beeinflusst von sämtlichen wichtigen Heilungsfaktoren wie Allgemeinzustand, Ernährung, Infektion und Ätiologie der Wunde. Auch die geometrische Form der Wunde beeinflusst die Wundkontraktion sehr stark. Während sie bei schmaler, strichförmiger Wundform rasch vonstatten geht, dauert sie in breiten und rundlich konfigurierten Wunden naturgemäß länger. Sobald die Wunde verschlossen ist, werden die Wachstumsfaktorrezeptoren der Fibroblasten abreguliert, ein Teil der Fibroblasten fällt der Apoptose anheim (insbesondere die Myofibroblasten), der Rest kehrt in den Ruhestand zurück [35].

Die Umwandlung von Granulationsgewebe zur Narbe erfolgt in der **Remodellierungsphase**. Sie dauert bis zu 2 Jahre an und schließt die Wundheilung ab. In dieser Phase erfolgt ein langsamer Umbau des Bindegewebes, in der die Narbe ihre endgültige Beschaffenheit wie Funktion, Stärke und Aussehen erlangt. Ein Nebeneinander von Kollagenabbau und Kollagensynthese prägen die Remodellierungsphase: Typ-3 Kollagen, das in den ersten Wochen der Wundheilung synthetisiert wurde, wird nunmehr kontinuierlich durch das stabile Typ-1 Kollagen ersetzt [34,43]. Die fortlaufende Synthese von stabilem Kollagen, seine Verfestigung unter Ausbildung von Cross-links, die Verflechtung zu dickeren Bündeln und deren regelrechte Ausrichtung verleihen der heilenden Wunde wachsende Stärke. Die Ausrichtung der Kollagenbündel wird dabei den lokalen und funktionellen Erfordernissen angepasst. Dennoch wird Narbengewebe nie mehr so kräftig wie gesundes Gewebe. 2 Wochen nach einer Verletzung hat die heilende Wunde im Durchschnitt erst 5% ihrer ursprünglichen Belastbarkeit erlangt, 3 Wochen danach etwa 20 % und 1 Monat danach zirka 40%. Selbst nach optimalem Heilungsverlauf bleibt die Reißfestigkeit des Narbengewebes stets unter 80 % des Ausgangszustandes [34].

Die **Reepithelisierung** der Wunde setzt innerhalb weniger Stunden nach der Verletzung ein. Ausgehend von den Hautanhangsgebilden (z. B. Haarfollikel) und den Wundrändern bedecken die epidermalen Keratinozyten die Wundoberfläche

allmählich mit einem Epithelrasen und verschließen somit die Wundoberfläche [40,49]. Die Migration und Proliferation der Keratinozyten vom Wundrand aus wird einerseits durch den fehlenden Kontakt zu den (zerstörten) Nachbarzellen eingeleitet («free edge effect») und durch lokale Freisetzung von Wachstumsfaktoren (z. B. EGF, TGF- α und - β , Keratinocyte Growth Factor (KGF)) und Expression von Wachstumsfaktor-Rezeptoren angeregt. Sobald Epithelzellfronten aufeinander treffen, kommt es durch Kontaktinhibition zum Stillstand der Keratinozytenmigration. Parallel zur fortschreitenden Reepithelisierung wird auch die Basalmembran – fundamentale Verbindung und Trennschicht zwischen Epidermis und Dermis – wieder hergestellt. Die Epithelisierung geht bei sauberem Wundgrund, bei intakter Basallamina und bei feuchten Wundbedingungen am schnellsten vor sich. Nekrotisches Gewebe, Debris oder Krusten verlangsamen die Epithelisierung. Die vorwachsene Epithelfront unterminiert die Wundbeläge und zwingt sich zwischen Nekrosezone und Granulationsgewebe durch [37, 35, 39].

7 BEURTEILUNG EINER WUNDE [50]

Die allermeisten Wunden heilen problemlos aus. Bei manchen Wunden kommen jedoch Faktoren ins Spiel, die die Wundheilung nicht verhindern, aber zumindest verzögern. In seltenen Fällen werden Wunden chronisch und unheilbar. In solchen Fällen besteht das Ziel darin die Symptome zu beherrschen und Komplikationen zu vermeiden.

Vorraussetzung für eine korrekte Behandlung ist die richtige Arbeitshypothese und die Erhebung einer gründlichen Anamnese: Seit wann besteht das Geschwür schon? Gab es vereits früher Geschwüre? Haben Traumata stattgefunden? Wie entwickelte sich das Geschwür (Lokalisation, geruch, Schmerzhaftigkeit, Ausflüsse und Sekretion)? Liegt eine relevante Grunderkrankung vor wie Diabetes Mellitus, pAVK, Koronare Herzkrankheit, Neuropathien, zerebrovaskuläre Insuffizienz, chronisch venöse Insuffizienz, tiefe Venenthrombose? Sind bereits Operationen an Arterien oder Venen vorausgegangen? Ist der Patient Raucher, welche Medikamente nimmt er/sie ein?

7.1 Wie beurteilt man eine Wunde

Größe der Wunde

Schon bei der allerersten Inspektion und später bei den Kontrollen, sollte die Größe der Wunde genau vermerkt werden. Zur Vermessung der Wunde kann man eine durchsichtige, gerasterte Folie auf die Wunde legen und den Umriss mit einem Stift abzeichnen. Die Wundfläche erhält man, indem man den längsten Querdurchmesser mit dem Längsdurchmesser multipliziert. Bei nicht annähernd kreisförmigen Wunden erweist sich dieses Verfahren als etwas schwierig. Dennoch ermöglicht es Fortschritte im Verlauf der Wundheilung zu dokumentieren.

Der Wundrand

Die Beschaffenheit des Wundrandes kann Erkenntnisse zur Entstehungsursache-

und Verlauf liefern. So sind schräg abgeflachte Wundränder typisch für venöse Geschwüre, wohingegen arterielle Geschwüre meistens scharf begrenzt sind, mit Wundrändern, die wie ausgestanzt wirken.

Vorgewölbte bzw. eingerollte Wundränder weisen oft auf eine maligne Entstehungsursache hin. Bei Verdacht auf eine Malignom sollte biopsiert werden.

Lokalisation der Wunde

Bei der Diagnose einer Wunde spielt die Lokalisation eine große Rolle. So befinden sich diabetische Fußgeschwüre häufig in Bereichen abnormer Druckbelastung bei krankhaft veränderter Fußarchitektur. Viele venöse Geschwüre finden sich im Bereich der sogenannten Gamaschenregion, also um die Knöchel. Bei nicht heilenden Geschwüren an ungewöhnlichen Lokalisationen, sollte stets an ein Malignom gedacht werden.

Der Wundgrund

Gesundes Granulationsgewebe sieht rosig aus und weist darauf hin, dass eine gute Heilungstendenz in der Wunde vorliegt. Pathologisches Granulationsgewebe ist dunkelrot, blutet bei Berührung und kann eine Wundinfektion anzeigen. Bei solchen Wunden sollte man unbedingt einen Abstrich machen, um gezielt antibiotisch behandeln zu können. Überschießende Granulation bei einer nicht heilenden Wunde kann Hinweis auf eine Infektion sein. Die Entstehung von überschießendem Granulationsgewebe kann durch die Applikation von Silbernitrat oder Kortison-Präparaten reduziert werden; die Ursache wird damit jedoch nicht behandelt.

Mit schmierig, gelblichen Fibrinbelägen sind oft chronische Wunden belegt. Diese Beläge sind nicht durchblutet, behindern die Heilung und müssen daher entfernt werden (Débridement, Wundreinigung).

Die Beschaffenheit des Wundgrundes kann eine Aussage über Heilungsverlauf, Heilungsdauer und Komplikationen treffen.

Nekrotisches Gewebe, Schorf und Detritus

Der Wundgrund kann mit nekrotischen, abgestorbenem Gewebe bedeckt sein, das nicht durchblutet ist. Er kann auch mit gelblich, schmierigen Belägen bedeckt sein,

die aus abgestorbenen Zellen (Detritus) bestehen. Der Wundgrund kann auch verschorft sein, d.h. auf ihm befindet sich eine Kruste aus getrocknetem, schwarzem, abgestorbenem Gewebe. Alle diese Auflagerungen behindern die Wundheilung, da nekrotisches Gewebe Krankheitskeime beherbergen kann. Werden sie regelmäßig entfernt, können Infektionen verhindert werden. Nekrosen und Wundbeläge kann man mithilfe einer Pinzette und/oder einem Skalpell abtragen.

Wundtiefe

Bei der Beurteilung der Wundtiefe sollte zumindest die größte Tiefe geschätzt werden. Unterminierte Wundränder müssen mit dem Finger ausgetastet, oder mit der Sonde untersucht werden. Die Tiefe, mögliche Fistelgänge und Sekretionsverhalten müssen untersucht werden. Sind Sekrethöhlen und unterminierte Wundränder vorhanden, sollten diese austamponiert werden, um die Wundheilung zu fördern.

Die umgebende Haut

Eine die Wunde umgebende Phlegmone sollte systemisch mit Antibiotika behandelt werden, ekzematöse Hautveränderung können mit topischen Steroiden behandelt werden. Bei Mazerationen sollten häufiger ein Verbandswechsel durchgeführt werden oder auf andere Verbandsmaterialien umgestiegen werden. Hyperkeratosen, die sich um neuropathische Fußgeschwüren bilden, müssen regelmäßig abgetragen werden, damit die Wunde besser inspiziert werden kann und um die Umgebung der Wunde von erhöhter Druckbelastung zu befreien.

Infektionen

Alle offenen Wunden sind bakteriell kontaminiert bzw. besiedelt. Mikrobiologische Untersuchungen sind erst angezeigt, wenn klinische Zeichen einer Infektion bestehen, oder aus Gründen der Infektüberwachung. Neben den 5 Kardinalzeichen der Entzündung geben auch eine verstärkte Sekretion, verzögerte Wundheilung, Blutung bei Berührung, übler Geruch und pathologisches Granulationsgewebe einen Hinweis auf eine bestehende Infektion. Der Antibiotikaeinsatz sollte sich an mikrobiologischen Untersuchungen und Resistenztestungen orientieren.

Schmerzen

Schmerzen sind charakteristisch für viele heilende und viele nicht heilende Wunden. Schmerz kann durch nozizeptische Stimuli und auch durch neuropatische Stimuli entstehen. Intermittierend kann er beim Verbandswechsel auftreten, was eine vorherige Analgetikagabe notwendig machen kann. Permanenter Schmerz tritt oft bei Wunden auf, die einer bestimmten Grunderkrankung zugrunde liegen wie z.B. der pAVK, Neuropathie, Gewebsödem, chronischen Gewebsschaden, Infektionen, oder pathologischen Vernarbungen (Atrophie blanche). Bei therapieresistenten Schmerzen sollte die Patienten an eine Schmerzambulanz überwiesen werden.

Nicht heilende Wunden

Nicht heilende Wunden werden dadurch definiert, dass sie nicht den normalen Heilungsverlauf zeigen und ungewöhnlich lange offen bleiben. Bei Wunden, die hartnäckig allen Behandlungen trotzen, sollte u.U nicht die Wundheilung, sondern ein alternativen Behandlungsziel angestrebt werden. Dabei sind Behandlungen zu Verbesserung der Lebensqualität maßgeblich.

Studien haben gezeigt, dass chronische Wunden die Lebensqualität der Patienten erheblich reduzieren. Häufige Verbandswechsel, dauernde Müdigkeit aufgrund von Schlafmangel, Schmerzen, üble Gerüche, Einschränkung der Bewegungsfähigkeit und Wundinfektionen führen zu physischen und psychischen Verschlechterung der Befindlichkeit. Vorallem der schleichende Verlust der Autonomie führt bei vielen Menschen zu Störungen der Essgewohnheiten, Depressionen, sozialer Isolation und zu einer allmählichen Abnahme des Aktivitätsniveaus.

Deswegen steht in Fällen, in denen von vornhinein klar ist, dass die Wunde nicht abheilen wird, die Verbesserung der Lebenqualität im Mittelpunkt. Das kann durch eine Verminderung der Geruchbelästigung, der Schmerzen, des Wundsekrets und durch möglichst seltene Verbandswechsel geschehen. In manchen Fällen kann eine so drastisch erscheinende Maßnahme wie eine Amputation bei einem Patienten mit chronische Beingeschwüren die Lebensqualität verbessern, wenn diese zuvor durch das Nicht-Heilen der Geschwüre aufs schwerste beeinträchtigt war.

8 INNOVATIVE ENZYMBASIERTE DIAGNOSE VON WUNDINFEKTIONEN

8.1 Allgemein

Bei der Erfassung einer Wundinfektion steht die klinische Diagnose im Vordergrund. Die fünf Kardinalzeichen *Rubor*, *Calor*, *Tumor*, *Dolor* und *Functio laesa* sind bei einer klassischen Entzündung anzutreffen, wobei zu bedenken ist, dass vor allem beim Diabetiker wegen der Neuropathie Schmerzen oft fehlen. Neben der klinischen Untersuchung können erhöhte Laborparameter hilfreich sein.

Zurzeit gibt es noch keine schnellen diagnostischen Hilfsmittel, die speziell bei der Heimpflege von Patienten mit chronisch-ulzerierenden Wunden hilfreich wären. Man schätzt, dass in Europa die Prävalenz von aktiven Beinulzera bei 0.1 – 0.3 % angesiedelt ist [51].

Bei dieser Studie geht es um die Entwicklung eines diagnostischen Tools, welches eine Infektion mittels Farbumschlag sichtbar macht und dadurch eine frühe Behandlung ermöglicht. Im Speziellen geht es in meiner Diplomarbeit um die beiden Enzyme **Lysozym** und **Elastase**, die durch ihre Wirkung einen Farbstoff aus einer Peptidoglycanmatrix freisetzen, bzw. zu einer Aufhellung führen. Es hat sich gezeigt, dass die Lysozymaktivität in infizierten postoperativen Wunden und Dekubituswunden signifikant erhöht ist (16541,6153 U/ml), verglichen mit nicht infizierten Wunden (25,02 U/ml).

8.2 Einleitung

8.2.1 Die Bedeutung des Enzyms Lysozym

Die Infektion ist definiert als Eintritt, Absiedelung und anschließender Vermehrung und einer reaktiven, körpereigenen Antwort [52]. Bekannt ist, dass eine Vermehrung von Bakterien nicht nur zu einer Infektion führt, sondern auch jede Phase der Wundheilung verzögert, oder sogar behindert [52,53]. Aus diesem Grund ist es bei

der Wundversorgung essentiell, Wundinfektionen frühzeitig zu erkennen. Besonders bei der Heim/Hauspflege von chronischen Wunden spielt die Früherkennung eine große Rolle. Es gibt zwar Diagnosemethoden zur Erfassung von Infektionen wie den Wundabstrich und die Blutparameter Leukozyten und CRP, jedoch eignen sich diese nicht für eine schnelle Diagnose.

Im Gegensatz dazu können sich Enzyme als nützliche Detektoren erweisen. Dabei handelt es sich um Enzyme, die von Bakterien im Falle einer Infektion abgegeben werden und ihre Ausbreitung im Gewebe erleichtern. Dazu zählen verschiedene Phospholipasen, Hyaluronidasen, Elastasen, Lysozyme und verschiedene Lysine [54]. Auf der anderen Seite werden von den Zellen des menschlichen Immunsystems Enzyme zur Bakterienabwehr produziert und abgegeben (Lysozym, Cathepsin G, Elastase, Myeloperoxidase), welche für uns ebenfalls von großem Interesse sind, um eine Infektion zu detektieren.

Eines der beiden Enzyme, die sich als gute Marker einer Infektion herauskristallisierten, ist das **Lysozym**. Eine der biologischen Funktionen des Lysozyms ist der Schutz gegen bakterielle Infektionen [55]. Es wurde erstmals von Sir Alexander Fleming entdeckt und benannt [56]. Er war es auch, der als erster seine bakteriolytische Wirkung erkannte. Lysozym ist eine Muramidase, oder N-acetylmuramidglycanhydrolase und ist dadurch imstande die glykosidischen Verbindungen zwischen N-acetylmuramidsäure und N-acetylglucosaminen der bakteriellen Zellwand zu spalten [57]. Die hydrolytischen Eigenschaften des Lysozyms wurden in vielen Tests mit dem *Micrococcus lysodeikticus*, einem Bakterium, belegt [58]. Aus dieser Erkenntnis entwickelte man ein Verfahren mit dem man die Lysozymkonzentration bestimmen konnte und das effizient genug war, um damit Proben zu untersuchen. Es ist bekannt, dass Abweichungen der Lysozymkonzentration von ihrem Normalwert in Serum oder Urin mit einer Erkrankung verbunden sein können. So beobachtete man z.B. einen erhöhten Lysozymwert im Urin von Patienten mit monozytärer Leukämie [59]. Die Serumwerte können ebenso bei Erkrankungen wie Tuberkulose und Sarkoidose erhöht sein [60]. Diese Beobachtungen zeigten, dass die Lysozymmessung in Serum, oder Urin ein nützliches diagnostisches Mittel für Erkrankungen sein kann. Außerdem zeigten

diese Studien, dass ein erhöhter Enzymwert im Serum ein Marker für aktive chronische Entzündungen ist [61,62,63]. Neu an dieser Studie ist, dass erstmals die Lysozymaktivität in Wundflüssigkeit bestimmt wird.

8.2.2 Die Bedeutung des Enzyms Elastase

Die **Elastase**, eine Protease, ist ein Enzym das ebenfalls von Makrophagen und Monozyten im Falle einer Infektion freigesetzt wird. Elastase wird zusammen mit anderen Enzymen in den sogenannten Granulae gespeichert und bei Bedarf freigesetzt und ist dann dazu imstande Proteine wie Kollagen und Fibronectin und ebenso Tumor Nekrose Faktor $TNF\alpha$ zu spalten [64-66]. Eine exzessive Ausschüttung von Elastase und anderen proteolytischen Enzymen führt zu einer starken Gewebszerstörung, wie es z.B. bei chronischen Wunden der Fall ist. Es ist außerdem bekannt, dass Elastase bei einer Vielzahl anderer Erkrankungen wie der Cystischen Fibrose [67], der Chorioamnionitis [68], Intrauterinen Infektionen [69] und Urethralinfektionen [70] eine Rolle spielt. Ebenso wie Lysozym kann auch mit Elastase eine Aussage über den Status und den Schweregrad einer Wunde getroffen werden. Um dieses Potential auszunützen versuchten wir, wie bei Lysozym, die Enzymaktivität direkt in der Wundflüssigkeit mithilfe von Hydrolyse eines gefärbten Substrates nachzuweisen.

8.3 Materialien und Methoden

8.3.1 Probengewinnung

Im Zuge des routinemäßigen Verbandswechsels (sowohl in der Ambulanz als auch auf der Station) wurden bei PatientInnen mit chronischen Wunden (Decubitalulcus, Ulcus cruris etc.) kleine Mengen Wundsekretes mit Nadeln oder Löffeln steril entnommen. Da es sich um ein nicht-invasives Vorgehen handelt, ging die Prozedur für die PatientInnen weder mit Schmerzen, noch mit einem erhöhten Risiko, oder zusätzlichem Aufwand einher. Die Erlaubnis zur Probengewinnung wurde von der

Ethikkommission der Medizinischen Universität Graz erteilt.

8.3.2 Wundabstrich

Bei jeder Wundsekretabnahme wurde zusätzlich noch ein Wundabstrich durchgeführt.

8.3.3 Durchführende Personen

Die Probenentnahme und die Evaluierung des Infektionsgrades wurden von Univ. Prof. Dr. M. Schintler und anderen Ärzten der Abteilung für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie durchgeführt. Die Analyse und Auswertung erfolgte an dem Institut für Umweltbiotechnologie, TU Graz, Petersgasse 12. Nach einer zweiwöchigen Einführung in die Laborarbeit konnte ich die Wundsekrete unter Aufsicht der Mitarbeiter des Instituts selbst analysieren und die Enzymaktivitäten berechnen.

8.3.4 Patientenzahl

Da in unserem Projekt Fragestellungen behandelt werden, die in dieser Form in der Literatur nicht beschrieben sind, möchten wir mit Hilfe dieser Pilotstudie Hinweise auf interessante Enzyme erhalten. Die Enzymanalyse wurde mit 9 als eindeutig infiziert identifizierten Proben und 9 nicht infizierten Proben durchgeführt. Bei den 9 nicht infizierten Proben handelt es sich um gewonnene Flüssigkeit aus Blasen. Der Blaseninhalt soll die sterile Wunde repräsentieren, wie sie im Falle eines Verbrennungstraumas zuerst auftritt. Diese Zahl erscheint uns ausreichend, um erste Hinweise auf das Vorhandensein von bestimmten Enzymen zu unterschiedlichen Zeitpunkten und Unterschiede in akuten und chronischen bzw. infizierten und nicht infizierten Wunden zu erhalten. Interessante Ergebnisse sollten dann in einer weiteren Studie mit entsprechend hoher Fallzahl verifiziert werden.

8.3.5 *Biochemische Analyse*

Die Proben wurden 5 Minuten lang bei 2500 rpm zentrifugiert, um Zellen und Gewebematerial zu entfernen. Der daraus gewonnene Überstand wurde anschließend mit einem OxyFil-Filter (0,2µm) steril filtriert, um eventuell vorhandene Bakterien auszuschließen. Es wurde mit Hilfe von Farbreaktionen und Trübungsassays versucht, die in den Wundflüssigkeiten vorhandenen Enzyme zu quantifizieren. Anhand entsprechender Enzym-Assays in Microtiterplatten und anschließender Vermessung mit einem Platerreader der Firma Tecan analysierten wir die beiden Enzyme Lysozym und Elastase. Die Patienten wurden in Gruppen eingeteilt und entweder mit der Abkürzung i = infected wound, oder n.i. = non infected wound (Blase) und einer zusätzlichen Nummer, gekennzeichnet.

8.3.6 *Datenerhebung, Datenverwaltung und Datenschutz*

Für die Auswertung der Ergebnisse war eine gute Dokumentation durch die Beteiligten notwendig. Diese erfolgte mit Hilfe eines nach Standardrichtlinien erstellten, anonymisierten Fragebogens. Neben Alter und Geschlecht erhob man auch Alter der Wunde, Lokalisation, Zustand der Wunde, bereits vorgenommene Behandlungen etc. Da es sich um anonymisierte Fragebögen handelte, war der Datenschutz mit Sicherheit gewährleistet.

Die im folgenden Kapitel dargestellten Abbildungen, Diagramme und Resultate sind allesamt das Ergebnis meiner eigenständigen Labortätigkeit auf der TU Graz.

9 BIOCHEMISCHES VERFAHREN FÜR DIE ERFASSUNG VON WUNDINFEKTIONEN

9.1 Messung der Enzymaktivität direkt – praktische Durchführung

9.1.1 Lysozymaktivität

Um die Lysozymaktivität im Wundsekret zu bestimmen, benützt man ein von Shugar [58] beschriebenes Verfahren. Diese Untersuchung beruht auf der enzymatischen Spaltung der *Microkokkus lysodeikticus*-Zellwand, die bei einem Trübungsassay bei 450 nm beobachtet wird.

Die *Microkokkus lysodeikticus*-Zellwände werden in einem 0.1 M KH_2PO_4 -Puffer (pH 7.0) suspendiert, um annähernd eine Konzentration von 0.05% zu erreichen. Um die Werte, die man bei den Proben erhält, ausrechnen zu können, legt man eine Kalibrationsreihe an: dafür verdünnt man ein kommerzielles Standardenzym auf 10.000 U/ml und verdünnt es dann 1:2 weiter, bis man bei 156 U/ml angekommen ist. Von der Verdünnungsreihe gibt man jeweils 2 mal 10 μL auf die Microtiterplatte (Doppelbestimmung). Dasselbe geschieht mit den abfiltrierten Proben. Von jeder gibt man 10 μL auf die Platte.

Hat man die Verdünnungsreihe und die Proben auf der Microtiterplatte aufgetragen, kann mit dem Aufbringen des Standardenzyms begonnen werden. Jedes Feld wird nun mit 290 μL Substrat (*Micrococcus* + KH_2PO_4 -Puffer) befüllt und dann sofort in den Platereader geschoben, in dem alle 30 sec., 35 Zyklen lang, die Absorption bei 450 nm und 25°C gemessen wird.

Nach 17 Minuten (35 Zyklen zu je 30 Sekunden) kann die Microtiterplatte aus dem Platereader genommen werden. Danach erfolgt die Auswertung folgendermaßen:

1. Eichgerade mit Standards
2. Geradengleichung

3. Delta im linearen Bereich bestimmen

4. Berechnung U/mL

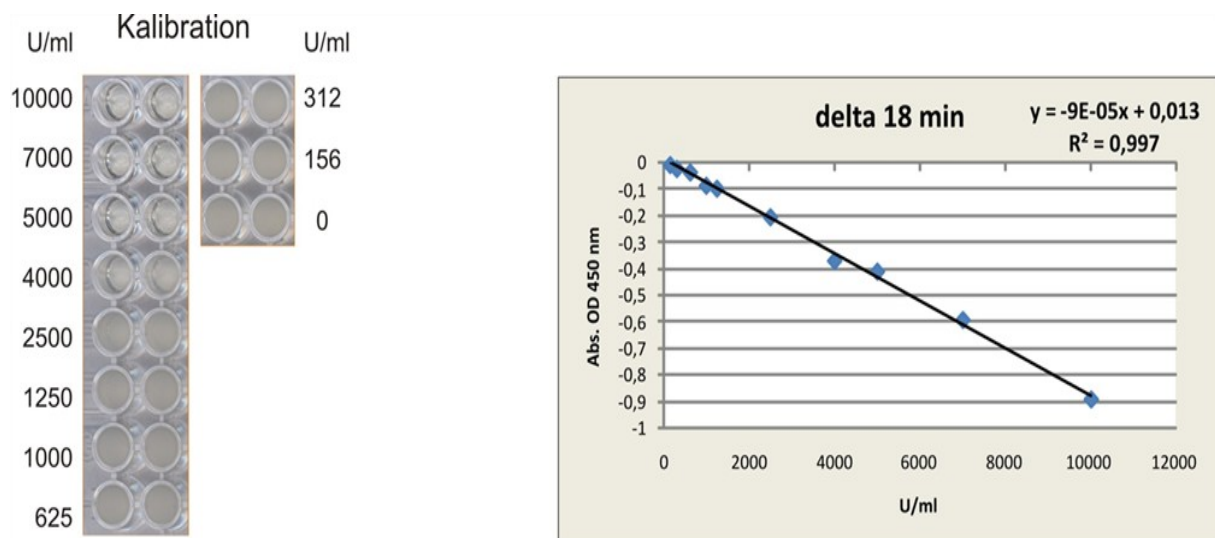


Abbildung 19: Kalibrationsgeraden zur Berechnung der Enzymaktivitäten von Lysozym in Wundflüssigkeiten. Links, Abbildung einer 96-Well-Platte mit verschiedenen Enzymkonzentrationen, rechts die errechnete Kalibrationsgerade. Man beachte die zunehmende Trübung bei abnehmender Enzymkonzentration.

Die Eichgerade ergibt sich aus den Ergebnissen der Kalibrationsreihe. Mathematisch ausgedrückt versteht man darunter eine Gerade mit der Formel $y = kx + d$. Mit Delta meint man die in der gemessenen Zeit registrierte Veränderung der Absorption. In unserem Fall haben wir uns auf die Änderung innerhalb der ersten 10 Minuten bezogen. Den Wert, den man dabei von jeder Probe erhält, ist das „y“.

„k“ ist die Steigung der Geraden. Hier fällt die Gerade steil abwärts; das ergibt sich daraus, dass durch die Beimischung des Lysozyms die Trübung mit jeder Minute abnimmt, das heißt das „k“ ist negativ.

„d“ ist der Achsenabstand.

Um den gesuchten Wert „x“, also die U/ml einer jeden Probe zu errechnen, setzt man alle Bekannten in die Geradengleichung ein.

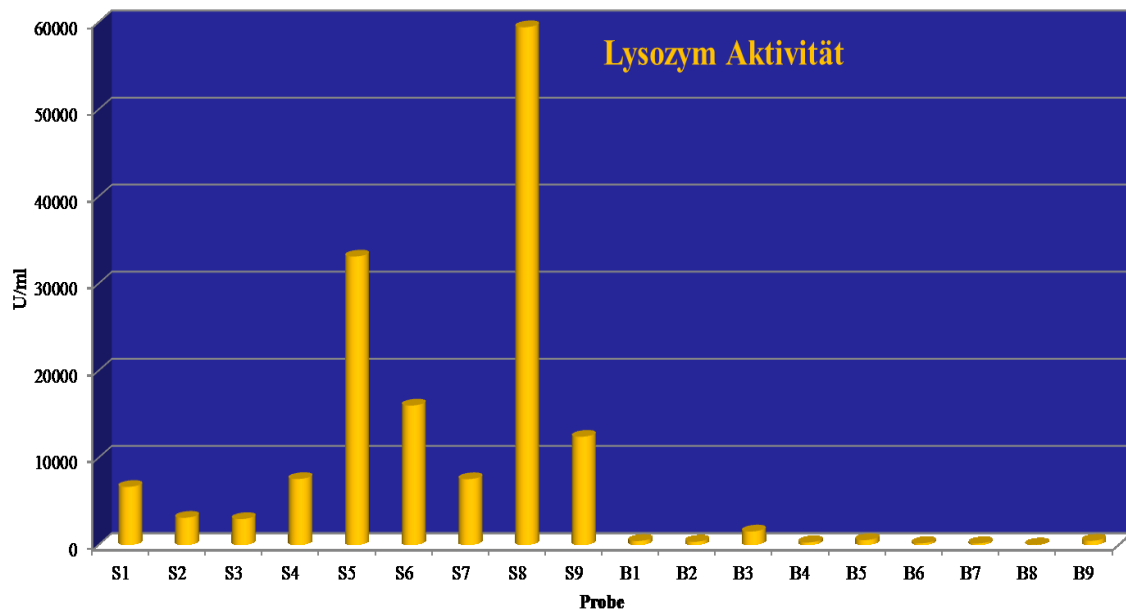


Abbildung 10: Lysozymaktivitäten von jeweils 9 infizierten und 9 nicht infizierten Wundflüssigkeiten in U/ml. S: Probe Univ. Prof. Michael Schintler, B: Blase Priv. Doz. Oa. Dr. Barbare Binder

9.1.2 Integration und Anwendung im klinischen Alltag

Anhand unserer Messungen konnte gezeigt werden, dass 1. Lysozym in infizierten Wunden signifikant erhöht ist und 2. der Nachweis von Enzymaktivität mithilfe eines Substrates sehr sensitiv ist.

Eine Möglichkeit die Erkenntnisse diese Pilotstudie in die klinische Realität umzusetzen, wäre die Entwicklung eines Device in dem sich bereits eine bestimmte Menge des Substrates befindet. Es bedarf dann nur noch einer kleinen Menge Wundflüssigkeit, entweder mit einer Spritze, oder einem Löffel entnommen, die zum vorgefertigten Substrat zugegeben wird. Nach wenigen Minuten könnte die Diagnose „Infektion“ durch eine sichtbare Veränderung der Färbung/Trübung erfolgen. Das Substrat könnte in flüssiger, gefrorener und in pulvriger Form vorliegen und somit auch für den Transport geeignet sein.

9.1.3 Elastase

Die Elastaseaktivität bestimmte man durch die Messung der Spaltung von N-methoxysuccinyl-ala-pro-val-p-nitroanilid nach einer Methode von Trengove et al [71]. Eine Lösung von 1 mM N-methoxysuccinyl-ala-pro-val-p-nitroanilid in 0.1. M KH₂PO₄-Puffer (pH 7.4) wurde verwendet. Dann wurden zu 5 µL Probe oder vorgefertigte Elastase 100 µL dieser Lösung hinzugefügt. Der Substratabbau wurde kontinuierlich alle 60 Sekunden durch die steigende Absorption überwacht, bei 405 nm und 30°C.

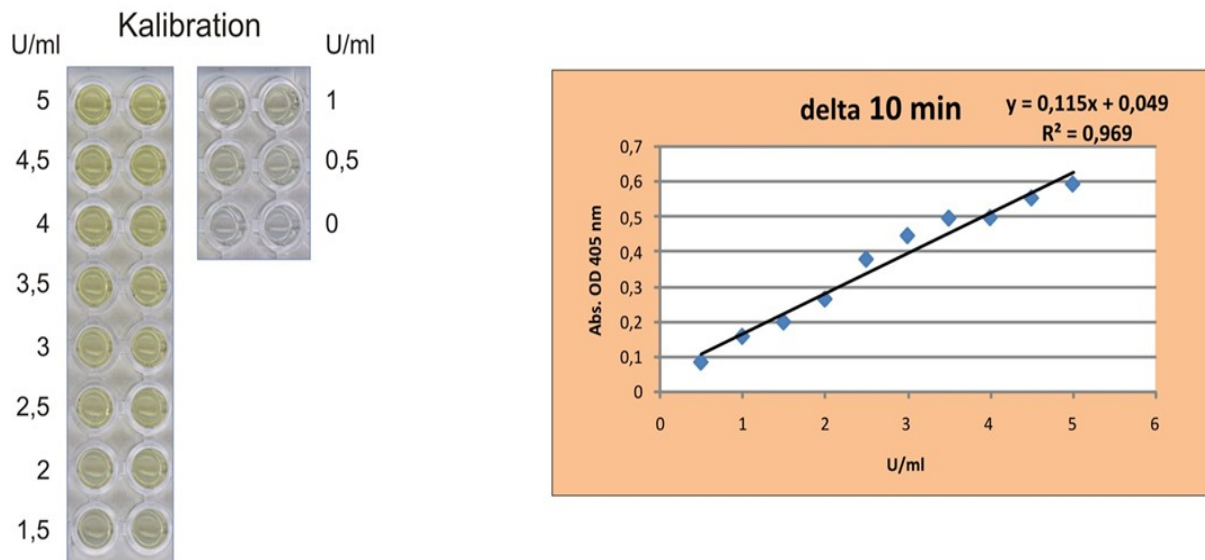


Abbildung 11: Kalibrationsgeraden zur Berechnung der Enzymaktivitäten von Elastase in Wundflüssigkeiten. Links, Abbildung einer 96-Well Platte mit verschiedenen Enzymkonzentrationen, rechts die errechnete Kalibrationsgerade

Die Auswertung der Elastasereaktion erfolgte auf dem gleichem Wege wie bei Lysozym. Im Gegensatz zu Lysozym steigt die Absorptionsgerade mit der Zeit und mit Abnahme der Elastasekonzentration.

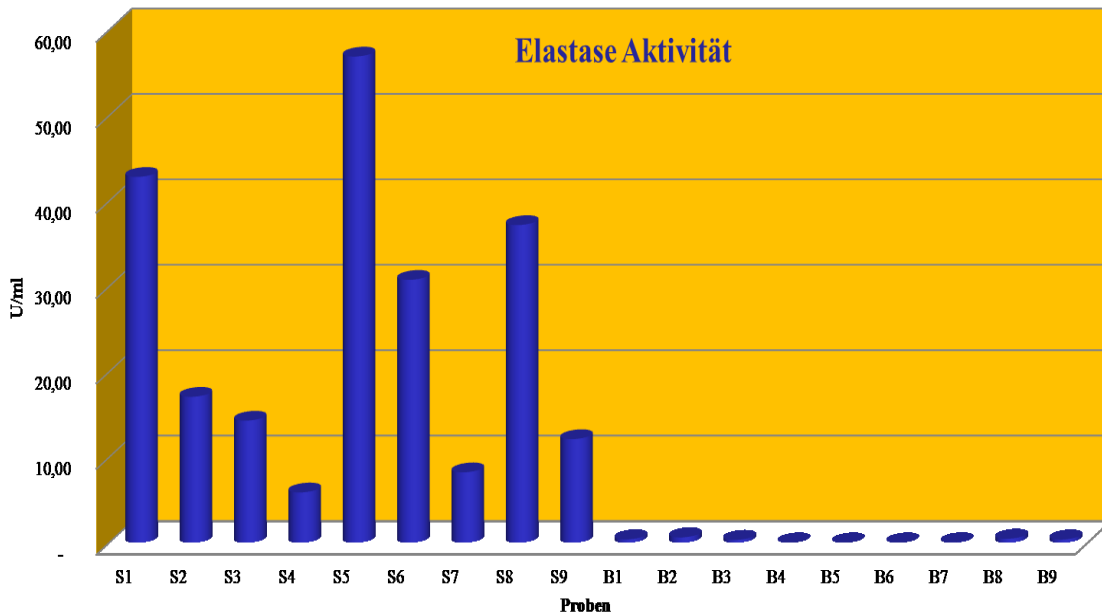


Abbildung 12: Elastaseaktivitäten von jeweils 9 infizierten und 9 nicht infizierten Wundflüssigkeiten in U/ml. S: Probe Univ. Prof. Michael Schintler, B: Blase Priv. Doz. Oa. Dr. Barbare Binder

9.1.4 Integration und Anwendung im klinischen Alltag

Auch bei den Messung der Elastase ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen den infizierten und nicht infizierten Wunden und auch die Testung mit dem chromogenen Substrat (MeOSUc-AAPV-pNA) erwies sich als sehr effektiv. Was die Vision eines erkennbaren Farbumschlages betrifft, ist das Institut für Umweltbiotechnologie einen großen Schritt vorangekommen: in den vergangenen Monaten gelang es das Substrat auf unterschiedliche Arten zu fixieren, was für die Anwendung in und auf Wundaufgaben eine wichtige Voraussetzung ist.

Eine Methode ist die Immobilisation, sprich die Fixierung, des Substrates mithilfe Siliciumgels, welches anschließend getrocknet und dann in Pulverform überführt wird. Erst die Immobilisation erlaubt die Integration des Substrates in Bandagen und Wundaufgaben für das Online-Monitoring des Wundstatus. Für die Testung an Oberflächen entschied man sich für die Materien Kollagen, Polyamid (PA) und Polyester (PES).

Kollagen ist schon seit längerem ein wichtiges Material in der Wundversorgung. Kollagen hält die Wunde feucht [72,73] und absorbiert gleichzeitig große Mengen Flüssigkeit [74]. Ausserdem bindet Kollagen Elastase; da ein erhöhter Elastase-Level zur Spaltung von Wachstumsfaktoren und Proteaseinhibitoren führt, hat die Bindung von Elastase durch Kollagen einen positiven Nebeneffekt auf die Proliferationsphase der Wundheilung. Die positiven Auswirkungen des Kollagens auf Zellmigration- und teilung sind gut dokumentiert [74,75-77]. Der aus Kollagen und Substrat bestehende Film könnte auf Wundauflagen aufgetragen werden. Kommt es zu Infektion, würden die von den Bakterien und Entzündungszellen ausgeschütteten Enzyme das Substrat spalten und eine Farbänderung würde sichtbar werden. Nicht nur mit Filmen, sondern auch mit Fasern, aus denen die Wundauflage bestehen kann, wurden Versuche durchgeführt. Dabei hat man versucht Polyamid- und Polyesterfasern mit dem Elastase-Substrat zu koppeln.

Ein System zur Schnelldiagnostik nennt sich InFact. Es besteht aus 6 Kammern, in denen sich in getrockneter Form die unterschiedlichen Substrate befinden. Bei regelmäßiger Anwendung minimiert InFact das Risiko für das Auftreten von schweren, unter Umständen lebensbedrohenden, Infektionen. Neben einer maßgeblichen Verbesserung der Lebensqualität werden die Dauer und vor allem auch die Kosten für die Behandlung signifikant reduziert. Die Integration in Verbänden für ein sog. "online monitoring" stellt die Vision des Systems dar.

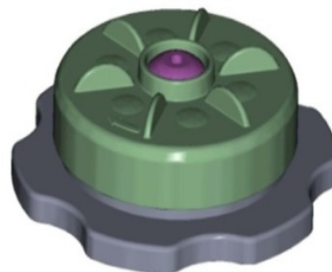


Abbildung 23: InFact Device

9.2 Ergebnisse

Für die Bestimmung der Lysozymaktivität wurde ein von Shugar [58] entwickeltes Verfahren angewandt und ein kommerziell erhältliches Standardenzym. Die Messwerte für Lysozym betragen bei den 9 infizierten Wunden im Mittel 16541,61 U/ml, bei den 9 nicht infizierten Blasen im Mittel 445 U/ml. Es zeigt sich eine signifikant höhere Enzymaktivität in den infizierten Proben ($p \leq 0,05$). Im Fall von Elastase lagen die Werte der infizierten Proben im Mittel bei 25,02 U/ml, bei den nicht infizierten Blasen ergaben sich Werte von 0,23 U/ml ($p \leq 0,001$). *Die Sensitivität der beiden Tests erwies sich als außerordentlich hoch, in unserem Fall liegt sie sogar bei 100 Prozent. Alle infizierten Wunden wurden von den Tests auch als solche erkannt. Aufgrund der signifikanten Unterschiede könnten diese Enzyme als mögliche diagnostische Tools für die Infektionsdetektion herangezogen werden, da die Enzyme von Bakterien und Monozyten/Makrophagen freigesetzt werden, bevor es zu ersten klinischen Zeichen einer Infektion kommt.*

9.3 Diskussion

Lysozym gehört zur Enzymklasse der Murinamidasen, welche die glykosidische Bindung zwischen N-acetylmuramidsäure und N-acetylglucosaminen der bakteriellen Zellwand spalten [57]. Im Rahmen der angeborenen Immunabwehr wird Lysozym von Monozyten und Makrophagen freigesetzt, um den Organismus gegen bakterielle Infektion zu schützen [59]. Es bestätigte sich in der Vergangenheit ein Zusammenhang zwischen einem erhöhtem Lysozymlevel im Serum und dem Bestehen einer chronischen Erkrankung wie der Tuberkulose und der Sarkoidose [58,59]. Ausserdem erwiesen sich erhöhte Serumwerte als Marker für chronische Entzündungen [61,62,63].

Ebenso von großer Relevanz im Entzündungsprozess ist die Protease Elastase. Sie spielt bei einer Vielzahl von Erkrankungen eine Rolle und führt bei einer Erhöhung zur Zerstörung von Wachstumsfaktoren [78,79] und Proteaseinhibitoren [80] und ist auch Ursache für Wundheilungsstörungen. Da sich die Elastase auch zu Beginn

einer Infektion in Wunden nachweisen lässt, eignet sie sich als frühdiagnostischen Marker.

Das Auftreten einer Wundinfektion ist der häufigste Grund für eine gestörte Wundheilung, die im schlimmsten Fall zum Tode führen kann. Es ist allseits bekannt das Wundflüssigkeit die Information des Zustandes und des Stadiums einer Wunde in sich birgt und dadurch als prognostischer Indikator verwendet werden kann [81,82].

Im Zuge dieser Pilotstudie fanden wir heraus, dass es signifikante Unterschiede der Lysozym- und Elastaseaktivität zwischen infizierten und nicht infizierten Wunden gibt, was möglicherweise Rückschluss auf die Menge der vorhandenen Monozyten/Makrophagen und neutrophilen Granulozyten im Gewebe gibt. Da Lysozym und Elastase Marker mit hoher Sensitivität zu sein scheinen, wird in Zukunft an der Verwirklichung von diagnostischen Tools gearbeitet, die auf einer enzymatisch kontrollierten Freisetzung von Farbstoffen beruhen.

9.4 Zusammenfassung und Ausblick

Die Haut schützt, neben vielen anderen Funktionen den Körper gegen infektiöse Mikroorganismen. Im Falle von Wunden ist dieser Schutz gestört, sodass Infektionen entstehen, die den Heilungsverlauf verzögern und oft zusätzliche (chirurgische) Maßnahmen notwendig machen. Diese Infektionen führen zu längeren Spitalsaufenthalten, erhöhten Kosten und oftmals zu schweren Sekundärerkrankungen wie Bakteriämie, Sepsis, Multiorganversagen mit allen Komplikationen. Die Wundbehandlung umfasst die Reinigung, Schutz gegen äußere Einflüsse, Stimulation des Gewebewachstums bis zur Epithelisierung. Die Strategie der Behandlung infektiöser Wunden hängt von der Ätiologie, der Größe und Art der Wunde, der Art der Mikroorganismen und die Schwere der Infektion ab. Systemische Antibiotika zeigen wegen mangelnder Perfusion und Bildung von Biofilmen oft reduzierte Wirksamkeit, weshalb andere Wege der Wundbehandlung beschritten werden müssen.

Für die Wundheilung ist eine frühzeitige Diagnose einer Wundinfektion essentiell, vielmehr kann ein rasches therapeutisches Einschreiten ein Fortschreiten der Infektion mit massiven Gewebsuntergang verhindern. Eine verzögerte Wundheilung die durch Bakterien in der Wunde verursacht wird, führt zu extremen Kosten für das Sozialsystem. Unzählige Patienten, die von Hausärzten und Hauskrankenpflege behandelt werden, verursachen neben den hohen Kosten auch einen enormen pflegerischen Aufwand. Nichtheilende chronische Wunden führen zu Schmerzen, Leid für Betroffenen und Angehörige, zu sozialer Stigmatisierung, Rückzug und Depression.

Ein einfaches diagnostisches Werkzeug zur Frühdiagnose einer Wundinfektion, möglicherweise auch einer kritischen Kolonisation wird in Zukunft eine große Rolle spielen, um eine rasche und gezielte ärztliche Intervention zu ermöglichen. Die Kontrolle des Heilungsverlaufes durch ein Schnelltestsystem, wie verfärbbare Watteträger, Teststreifen oder imprägnierte Therapie- und Diagnoseverbände werden in hohen Maßen erfolgreich sein und den modernen Wundverband prägen. Da bis jetzt kein vergleichbares Testsystem zur Verfügung steht, stellt die Beurteilung von Wunden selbst für Fachpersonal stets eine Gratwanderung dar. Einerseits müssen im Fall von Wundinfektionen meist Antibiotika systemisch verabreicht werden, andererseits können prophylaktisch angewandte Maßnahmen wie Silberverbände die Wundheilung stören bzw. behindern.

Die Entwicklung von diagnostischen Tools könnte zur frühzeitigen Feststellung einer Wundinfektion führen, bevor sich erste klinische Zeichen manifestieren. Der große Vorteil der Enzymdetektion liegt darin, dass im Vorfeld bereits die durch Einwanderung der Immunzellen stattfindende Erhöhung der verschiedenen Enzyme dargestellt wird. Dadurch wird eine entsprechend frühe Intervention, wie der Einsatz von lokalen Antiseptika, ermöglicht. Die Notwendigkeit von klinischen Maßnahmen und v.a. die Verschreibung von Antibiotika könnten dadurch reduziert werden.

Außerdem wäre die Diagnose nicht nur dem Fachpersonal vorenthalten – durch gut erkennbare Farbumschläge wäre es den Betroffenen selbst möglich Veränderungen schnell zu erkennen und eine Intervention einzuleiten.

Aus den Erkenntnissen unserer Studie wurde von der Technischen Universität Graz mit Beteiligung der Medizinischen Universität Graz ein Patent in den USA (Method for detecting a wound infection Application Number 13/299,067) angemeldet. Außerdem erfolgte eine Publikation im renommierten Journal Diagnostic Microbiology and Infectious Disease.

Bibliographie

[1] Hasmann A, Wehrsuetz-Sigl E, Kanzler G, Gewessler U, Hulla E, Schneider KP, Binder B, Schintler M, Guebitz GM. Novel peptidoglycan-based diagnostic devices for detection of wound infection. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2011 Sep;71(1):12-23.

[2] Dissemond J, *Modern wound dressings for the therapy of chronic wounds*, *Hautarzt*. 2006 Oct;57(10):881-7. Review. German.

[3] Severens JL, Habraken JM, Duivenvoorden S, Frederiks CM A. The cost of illness of pressure ulcers in the Netherlands (2002). *Adv Skin Wound Care* 15(2): 72–77

[4] RJG Halfens, T Dassen, A Tannen. Prävalenz von Dekubitus. In: Thomas Wild, Josef Auböck Hrsg., *Manual der Wundheilung* . Springer WienNewYork 2007, 179-185

[5] Lyder CH, Preston J, Grady JN, Scinto J, Allman R, Bergstrom N, Rodeheaver G. Quality of care for hospitalized Medicare patients at risk for pressure ulcers (2001); *Arch Int Med*; 61(12): 1549–54

[6] Thomson JSA, Brooks RG. The economics of preventing and treating pressure ulcers: a pilot study (1999). *J Wound Care*; 8(6): 312–16

[7] Bours GJJW, Halfens RJG, Huijjer Abu-Saad H, Grol RTPM (2002). Prevalence, prevention and treatment of pressure ulcers: descriptive study in 89 institutions in the Netherlands. *Res Nurs Health* 25(2): 99–110

[8] Schols JMGA, Kleijer CN, Lourens C (2003) Pressure ulcer care: nutritional therapy need not add to costs. *J Wound Care* 12(2): 57–61

[9] ÖGDC-Österreichische Gesellschaft für Dermatochirurgie [Website]; [updated

2010]. Abgerufen am 19.04.2012 von
http://www.oegdc.at/pat_chronische_wunden.html

[10] Deutsche Gesellschaft für Phlebologie [Website], [updated 10. 03.2010].
Angerufen am 19.04.2012 von <http://www.phlebology.de/diagnostik-und-therapie-des-ulcus-cruris-venosum.html>

[11] Altmeyer P, e.a. *Basiswissen Dermatologie*: Eine vorlesungsbegleitende Darstellung. Verlag W3I GmbH 2005, S.377

[12] Antonio P, Timo U, Gerd-Rüdiger B. *Taschenatlas der Immunologie*. 2. vollst. überarbeitete Aufl. Thieme

[13] Böcker W, Denk H, Heitz U. *Pathologie*. 3. Auflage. Urban & Fischer Verlag; 2004

[14] Groß U. *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie*. 2. Auflage Thieme; 2009

[15] Kayser FH, Böttge EC et al. *Taschenlehrbuch Medizinische Mikrobiologie*. 11. Auflage. Thieme; 2005

[16] Kujath P. *Haut- und Weichteilinfektionen*. Uni-Med Verlag AG. Bremen – London – Boston 2000. S. 76-80

[17] Rassner G. *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*. München: Urban und Fischer, 9. Auflage; 2009

[18] Wikipedia. *Dekubitus*. [updated 12.04.2012]. Abgerufen am 20.04.2012 von <http://de.wikipedia.org/wiki/Dekubitus>

[19] Stowasser JM, Petschenig M, Skutsch F (1997). *Stowasser Lateinisch-*

deutsches Schulwörterbuch. HPT-Medien-AG. Wien: öbv-hpt 1997

[20] Kammerlander G. *Lokaltherapeutische Standards für chronische Hautwunden*. 3. Auflage. Springer WienNewYork Verlag; 2001

[21] Biemstein C, Schröder G, M. Braun, K.-D. Neander. *Dekubitus–die Herausforderung für Pflegende*. Stuttgart: Thieme; 1997

[22] N.J. Lüscher. *Decubitus Ulcers of the Pelvic Region, Diagnosis and Surgical Therapy.*, Seattle: Hogrefe & Huber; 1992

[23] Protz Kerstin. *Dekubitus – Entstehung, Prophylaxe und Versorgung*. Geriatrie Journal 4/06

[24] Mader FH, e.a. *Allgemeinmedizin und Praxis: Anleitung in Diagnostik und Therapie*. Mit Fragen zur Facharztprüfung. 6. Aufl. Springer; 2007, S.214,

[25] Braun J, e.a. *Klinikleitfaden Innere Medizin*. Urban&FischerVerlag; 2009. S.180ff

[26] Altmeyer P, e.a *Basiswissen Dermatologie: Eine vorlesungsbegleitende Darstellung*. Verlag W3I GmbH, 2005, S.377

[27] Medhost [Website]. *Ulcus cruris*; 1999 - 2007 Copyright Promeus AG. Abgerufen am 18.04.2012 von <http://www.medhost.de/gesundheit-lexikon/ulcus-cruris.html>

[28] Rassner G. *Dermatologie Lehrbuch und Atlas*. 9. Auflage. München: Urban und Fischer; 2005, S. 284-386

[29] Herold G und Mitarbeiter. *Innere Medizin – Herold*. Köln; 2009

[30] Danzer S. *Chronische Wunden: Beurteilung und Behandlung*. W. Kohlhammer Verlag; 2009

[31] PDF-Download. Venöse und arterielle Ulzera. Abgerufen am 18.04.2012 von <http://werner-sellmer.de/Downloads/Bueltemann/Der20%Allgemeinarzt%2005.07%20venoeses20und%20arterielles%20Ulcus.pdf>

[32] Braun FO, Plewig G, Wolff HH, Burgdorf WHC, Landthaler M. *Dermatologie und Venerologie*, 5. Aufl. Heidelberg: Springer Medizin Verlag; (2007)

[33] Smola H, Eming S, Hess S, Werner S, Krieg T. *Wundheilung und Wundheilungsstörungen. Moderne Konzepte zur Pathophysiologie und Therapie*. Deutsches Ärzteblatt 2001;98: 2802–09

[34] Mauro T. Natural course of wound repair versus impaired healing in chronic cutaneous ulcers. In: *Wound healing and ulcers of the skin. Diagnosis and therapy – the practical approach* (Shai A, Maibach HI, eds). Springer, Berlin Heidelberg New York; 2005. 7–17

[35] Mehendale F, Martin P. The cellular and molecular events of wound healing. In: *Cutaneous wound healing* (Falanga V, ed). Martin Dunitz, London; 2001;15–37

[36] Schaffer CJ, Nanney LB. Cell biology of wound healing. *Int Rev Cytol* 1996; 169: 151–81

[37] Fritsch P. *Dermatologie und Venerologie. Grundlagen, Klinik, Atlas*, 2. Aufl. Springer, Berlin Heidelberg; 2004; 41–42

[38] Falanga V, Shen J. Growth factors, signal transduction and cellular responses. In: *Cutaneous wound healing* (Falanga V, ed). Martin Dunitz, London;2001; 81–93

- [39] Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous wound healing. *NEJM* 1999; 341: 738–46
- [40] Baum CL, Arpey C. Normal cutaneous wound healing: clinical correlation with cellular and molecular events. *Dermatol Surg* 2005; 31: 674–86
- [41] Clark RAF. Cutaneous tissue repair. Basic biologic considerations. *J Am Acad Dermatol* 1985; 13: 701–725
- [42] Martin GM, Sprague CA, Epstein CJ. Replicative life span of cultivated human cells. Effects of donor's age, tissue and genotype. *Lab Invest* 1970; 2: 86–92
- [43] Schultz GS, Ladwig G, Wysocki A (2005) Extracellular matrix: review of its roles in acute and chronic wounds. *World Wide Wounds*.
<http://www.worldwidewounds.com/2005/august/Schultz/extrace-matric-acute-chronic-wounds.html>
- [44] Enoch S, Price P (2004) Cellular, molecular and biochemical differences in the pathophysiology of healing between acute wounds, chronic wounds and wounds in the aged. *World Wide Wounds*.
<http://www.worldwidewounds.com/2004/august/enoch/pathophysiology-of-healing.html>
- [45] Micera A, Vigneti E, Pickholtz D et al. Nerve growth factor displays stimulatory effects on human skin and lung fibroblasts, demonstrating a direct role for this factor in tissue repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2001; 98: 6162–67
- [46] Smith PG, Liu M. Impaired cutaneous wound healing after sensory denervation in developing rats: effects on cell proliferation and apoptosis. *Cell Tissue Res* 2002; 307: 281–91
- [47] Li WW, Talcott KE, Zhai AW, Kruger EA, Li VW. The role of therapeutic angiogenesis in tissue repair and regeneration. *Adv Skin Wound Care* 2005;18: 491–

[48] Desmoulière A, Chaponnier C, Gabbiani G. Tissue repair, contraction, and the myofibroblast. *Wound Rep Reg* 2005 ; 13: 7–12

[49] Santoro MM, Gaudino G. Cellular and molecular facets of keratinocyte reepithelization during wound healing. *Exp Cell Res* 2005; 304: 274–86

[50] Grey JE, Harding K. *Ärztliche Wundversorgung. Das ABC der Wundheilung.* Urban&Fischer, Elsevier GmbH 2006

[51] Callam MJ, Ruckley CV, Harper DR, Dale JJ. Chronic ulceration of the leg—extent of the problem and provision of care. *Br Med J* 1985; 290:1855–1856

[52] Robson MC. Wound infection: a failure of wound healing caused by an imbalance of bacteria. *Surg Clin North Am* 1997; 77:637–650.

[53] Stadelmann WK, Digenis AG, Tobin GR. Impediments to wound healing. *Am J Surg* 1998; 176:39S–47S.

[54] Yager DR, Nwomeh BC. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1999; 7:433–441.

[55] Osserman EF, Klockars M, Halper J, Fischel RE. Effects of lysozyme on normal and transformed mammalian-cells. *Nature* 1973; 243:331–335.

[56] Walzer Laevitt J, Numbers RL. *Sickness and Health in America, Readings in the History of Medicine and Public Health.* Third Edition. The University of Wisconsin Press 1997

[57] Salton MR. Anatomy of bacterial surface. *Bacteriol Rev* 1961; 27:77–99

- [58] Shugar D. The measurement of lysozyme activity and the ultra-violet inactivation of lysozyme. *Biochim Biophys Acta* 1952; 8:302–309.
- [59] Osserman EF, Lawlor DP. Serum and urinary lysozyme (muramidase) in monocytic and monomyelocytic leukemia. *J Exp Med* 1966; 124:921–952.
- [60] Pascual RS, Gee JBL, Finch SC. Usefulness of serum lysozyme measurement in diagnosis and evaluation of sarcoidosis. *N Engl J Med* 1973; 289:1074–1076
- [61] Selroos O, Klockars M. Serum lysozyme in sarcoidosis—evaluation of its usefulness in determination of disease activity. *Scand J Respir Dis* 1977; 58:110–116.
- [62] Torsteinsdottir I, Hakansson L, Hallgren R, Gudbjornsson E, Arvidson NG, Venge P. Serum lysozyme: a potential marker of monocyte/ macrophage activity in rheumatoid arthritis. *Rheumatology* 1999; 38: 1249–1254.
- [63] Turton CWG, Grundy E, Firth G, Mitchell D, Rigden BG, Turner-Warwick M. Value of measuring serum angiotensin I converting enzyme and serum lysozyme in the management of sarcoidosis. *Thorax* 1979; 34:57–62.
- [64] McDonald J A, Kelley D G. J. Degradation of fibronectin by human leukocyte elastase. Release of biologically active fragments. *Biol Chem* 1980; 255: 8848–8858.
- [65] Scuderi P, Nez P A, Duerr M L et al. Cathepsin-G and leukocyte elastase inactivate human tumor necrosis factor and lymphotoxin. *Cell Immunol* 1991; 135: 299–313.
- [66] Kafienah W, Buttle D J, Burnett D et al. *Biochem J* 1998; 330: 897–902.

- [67] Boat T F, Welsh M J, Beaudet A L. In: Scriver C R, Beaudet A L, Sly W S, Valle D, eds. *The metabolic Basis of Inherited Diseases*. McGraw-Hill: New York , 1989; 2649–2680
- [68] Chimura T, Hirayama T, Takase M. Lysozyme in cervical mucus of patients with chorioamnionitis. *Jpn J Antibiot* 1993 ; 46: 318–322
- [69] Nugent R P, Krohn M A, Hillier S L. *J Clin Microbiol* 1991; 29: 297–301.
- [70] Fraser P A, Teasdale J, Gan K S et al. enzymes in urine for the detection of urethral infection in men. *Genitourin Med* 1995; 71: 176–179.
- [71] Trengove N J, Stacey M C, Macauley S et al. Analysis of the acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 442–452.
- [72] Doillon C J, Wayne C F, Brandwein S et al. Sensor materials for the detection of human neutrophil elastase and cathepsin G activity in wound fluid. *J Biomed Mater Res* 1986; 20: 1219–1228.
- [73] Doillon C J, Silver F H. Collagen-Based Wound Dressing: Effects of Hyaluronic Acid and Fibronectin on Wound Healing. *Biomaterials* 1986; 7: 3–8.
- [74] Friess W. Collagen - biomaterial for drug delivery. *Eur J Pharm Biopharm* 1998; 45: 113–136.
- [75] Mini M E, Cheung D, Strates B et al. *J Biomed Mater Res* 1987; 21: 741–771.
- [76] Pachence J M. Biodegradable Polymers as Drug Delivery Systems. *J Biomed Mater* 1996; 33: 35–40.
- [77] Lee C H, Singla A, Lee Y. Biomedical applications of collagen. *Int J Pharm* 2001; 221: 1–22.

[78] Yager D R, Ward S I, Olutye O et al. Sensor materials for the detection of human neutrophil elastase and cathepsin G activity in wound fluid. *Wound Repair Regen* 1997; 5: 23–32.

[79] Grinnell F, Zhu M F. Fibronectin Degradation in Chronic Wounds Depends on the Relative Levels of Elastase, 1-Proteinase Inhibitor, and 2-Macroglobulin. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 155–164.

[80] Yager D R, Nwomeh B C. The proteolytic environment of chronic wounds. *Wound Repair Regen* 1999; 7: 433–441.

[81] Trengove NJ, Langton SR, Stacey MC. Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen* 2002; 4:234–239.

[82] Yager DR, Kulina RA, Gilman LA. Wound fluids: a window into the wound environment? *Int J Low Extrem Wounds* 2007; 6:262–272.