

Aus dem Department für Nutztiere und öffentliches Gesundheitswesen in der Veterinärmedizin
(Universitätsklinik)

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

Universitätsklinik für Schweine

(Leiter: Univ. Prof. Dr. med. vet. Andrea Ladinig, Dipl. ECPHM)

**Etablierung eines geeigneten Wundmodells beim Schwein, um therapeutische
Effekte von verschiedenen Wundauflagen im Bereich von Spalthautwunden zu
testen**

Diplomarbeit

zur Erlangung der Würde eines

MAGISTER MEDICINAE VETERINARIAE

der Veterinärmedizinischen Universität Wien

vorgelegt von

Danijel Markovic

Wien, September 2019

BETREUER

Ao.Univ.Prof. Dr.med.vet. Wolfgang Sipos, Dipl.ECPHM

EXTERNER BETREUER

Dr.med.univ. Alexandru-Cristian Tuca

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung und Fragestellung	1
2 Literaturübersicht	3
2.1 Der Tierversuch	3
2.2 Anatomie der Haut.....	4
2.3 Das Schwein als Wundmodell.....	7
2.4 Die Wunde und Wundarten	10
2.4.1 Die Spalthaut.....	11
2.4.2 Spalthautwunden.....	13
2.5 Physiologie der Wundheilung.....	15
2.5.1 Formen der Wundheilung	20
2.5.2 Die Rolle der Keratinozyten in der Wundheilung	21
3 Material und Methode	23
3.1 Zu untersuchende Wundauflagen	23
3.2 Tiermanagement	27
3.3 Einsatz von Anästhesia, Analgesie und anderen schmerzlindernden Methoden.....	28
3.4 Operationstechnik	28
3.5 Anordnung der Wundauflagen	32
3.6 Statistische Auswertung.....	34
4 Ergebnisse	35
4.1 Ablauf des Tierversuchs	35
4.2 Tiermodell.....	35
4.3 Wundheilung.....	35
4.4 Die Ergebnisse der verwendeten Wundauflage pro Einzeltier	37
5 Diskussion	44
5.1 Das Tiermodell.....	44
5.2 Wundheilung und untersuchte Wundauflagen	46

6 Zusammenfassung	49
7 Summary	51
8 Literaturverzeichnis.....	52
9 Abbildungs-/ Tabellenverzeichnis.....	57

Abkürzungsverzeichnis:

Tierversuchsgesetz	TVG
Tierversuchs-Verordnung	TVV
Tierversuchs-Kriterienkatalog – Verordnung	TVKKV
Tierversuchsstatistik-Verordnung	TFSt - VO
Tierschutzgesetz	TSchG
Gentechnikgesetz	GTG
Abbildung	Abb
Tabelle	Tab
transforming growth factor-beta	TGF- β
platelet-derived growth factor	PDGF
epidermal growth factor	EGF
fibroblast growth factor	FGF
vascular endothelial grow factor	VEGF
Schwann'sche Zellen	SC Zellen
Matrixmetalloproteinasen	MMPs
Land- und forstwirtschaftliches Betriebsinformationssystem	LFBIS

1. Einleitung und Fragstellung

Heutzutage leiden 1,5 bis 2 Millionen Menschen in Europa an akuten und chronischen Wunden, die einen erheblichen Einfluss auf die Lebensqualität und das Gesundheitssystem haben (Lindholm und Searle 2016). Bei einer Verzögerung und Störung der Stadien im Wundheilungsprozess kommt es zur Entwicklung einer chronischen Wunde (Velnar et al. 2009). Daher stellt die gestörte Wundheilung eine große Herausforderung und ein klinisches Problem dar, bei dem ein korrektes, effizientes Wundmanagement essentiell ist. Von ungefähr 500 Millionen Menschen, die in Europa leben, gibt es geschätzt 262 000 Menschen mit chronischen Wunden. Die Gesamtkosten für die Behandlung solcher Wunden belaufen sich auf einige Millionen Euro. Der Fokus liegt dementsprechend auf dem Verständnis der Physiologie der Heilung und Versorgung mit einem Schwerpunkt auf neue therapeutische Ansätze. Von großer Bedeutung ist auch die Weiterentwicklung von Technologien für ein entsprechendes Wundmanagement von akuten und chronischen Wunden (Lindholm und Searle 2016).

Zur Optimierung der Wundheilung gibt es mehrere grundlegende Ansätze, denen man folgen kann. Die für die Wundheilung wichtigen Faktoren stellte Winter (1962) in seiner Studie der Epithelisierung bei jungen Hausschweinen fest. Um die Epithelisierung der Wunde zu beschleunigen sind eine Wundhydratation und Minimierung von Infektionen wichtig. Die Entwicklung und der Einsatz von verschiedenen Wundaufgaben, die diese Faktoren unterstützen sollen, ist ein wichtiger Bestandteil des Wundmanagements.

Der Fokus dieser Arbeit liegt darin, bessere Erkenntnisse über den Wundheilungsprozess mit Hilfe eines Tiermodells zu bekommen. Das Erkennen und Verstehen von pathophysiologischen Aspekten der Wundheilung spielt eine große Rolle, um eine weitere Entwicklung von neuen therapeutischen Strategien und innovativen Produkten zu ermöglichen, die die Prozesse der Wundheilung fördern können.

Dadurch, dass die Schweinehaut, ähnlich wie die Menschenhaut, relativ dick und gut durchblutet ist, hat sich das Schwein als zuverlässiges Wundheilungsmodell der Haut etabliert (Swindle 2016). Durch diese Tatsache kann bei Produkten die Förderung der Wundheilung bereits in der präklinischen Phase getestet werden. Eine kostenintensive klinische Prüfphase kann somit verkürzt werden.

Die vorliegende Arbeit ist eine Pilotstudie, die als Ziel die Etablierung eines Tiermodells zur Analyse der Wundheilung hatte, um einen Vergleich der Wirksamkeit von neuen zellbasierten Wundauflagen mit Wundauflagen, die schon als Standard zum Einsatz kommen, zu ermöglichen. Die Wundheilungsforschung wurde dadurch profitieren in der Verkürzung der Wundheilungsdauer und in weiterer Folge könnte auch die Entwicklung von passenden Wundauflagen für schwerheilende Wunden ermöglicht werden.

Das Prüfziel der vorliegenden Studie ist die Beantwortung folgender Fragen:

1. ob das Schwein mit einem definiertem Protokoll der Wundsetzung auch für die Wundheilungsstudien im Bereich Spalthautwunden als ein zuverlässiges Tiermodell etabliert werden kann.
2. ob es einen Unterschied bezüglich der Wundheilung (Reepithelisierung) zwischen den verschiedenen getesteten Wundauflagen gibt. Die Wirksamkeit der neuen Wundauflagen mit in vitro kultivierten Keratinozyten im Vergleich mit feuchten Wundauflagen, die heutzutage als Standard zum Einsatz kommen, soll in diesem Schritt überprüft werden.

2. Literaturübersicht

2.1 Der Tierversuch

Der Tierversuch spielte eine wichtige Rolle in vielen wissenschaftlichen und medizinischen Entwicklungen des vergangenen Jahrhunderts. Dieser Fortschritt im wissenschaftlichen und medizinischen Bereich trägt zum besseren Verständnis von verschiedenen Krankheiten, sowie zur Entwicklung neuer Medikamente und Behandlungen bei und ermöglicht eine bessere Lebensqualität der Menschen (Festing und Wilkinson, 2007). In der biomedizinischen Forschung wurden schon immer Tiere verwendet. Die griechischen Wissenschaftler Aristoteles (384 – 322 v. Chr.) und Erasistratus (304 – 258 v. Chr.) haben Experimente an lebenden Tieren durchgeführt (Hajar 2011). Zum besseren Verständnis von Anatomie, Physiologie, Pathologie und Pharmakologie hat ebenso der griechische Arzt Galen (129 – 199/217 n. Chr.) Tierversuche durchgeführt. Tierversuche sind nach § 2 Abs. 1 des Tierversuchsgesetzes (TVG 2012) definiert als „jede Verwendung von Tieren zu Versuchs-, Ausbildungs- oder anderen wissenschaftlichen Zwecken[...], die bei den Tieren Schmerzen, Leiden, Ängste oder dauerhafte Schäden [...] verursachen kann“. Ebenso ist der Tierversuch im Sinne des Tierversuchsgesetzes (TVG 2012) jede Belastung von Tieren, die durch Kanüleneinstich verursacht werden kann. Die Arbeit mit Tieren für wissenschaftliche Zwecke ist auf EU-Ebene durch die Richtlinie zum Schutz der für wissenschaftliche Zwecke verwendeten Tiere 2010/63/EU des Europäischen Parlaments und des Rates vom 22. September 2010 geregelt und in nationales Recht umgesetzt. In Österreich ist die Verwendung von Versuchstieren durch Gesetze und Verordnungen (Tierversuchsgesetz TVG 2012, Tierversuchs-Verordnung TVV 2012, Tierversuchs-Kriterienkatalog-Verordnung TVKKV, Tierversuchsstatistik-Verordnung TFSt-VO 2013, Tierschutzgesetz TSchG 2004, Tiertransportgesetz 2007, Gentechnikgesetz GTG 1994 und Systemverordnung 2012) streng rechtlich geregelt.

Das Tierversuchsgesetz regelt vor allem, wer einen Tierversuch durchführen darf, welche Tierversuche zulässig sind, die Projektziele, den zu erwartenden Schaden an den Tieren und den wissenschaftlichen Nutzen, welche Methoden zulässig sind, und ob das Projekt die Anforderungen der 3R-Leitprinzipien des Versuchstierschutzes erfüllt. Den Einsatz der 3R

Prinzipien etablierten 1959 William Russel und Rex Burch in ihrem Buch *“The Principles of Humane Experimental Technique“*.

Die folgenden 3 Grundprinzipien dienen zum Schutz der Versuchstiere:

- Replacement/Vermeidung – Anwendung von Ersatzmethoden
- Reduction/Verminderung – Reduzierung der Anzahl der verwendeten Tiere
- Refinement/Verbesserung – Haltungsbedingungen der verwendeten Tiere

Ein Tierversuch darf nur starten, wenn er durch die zuständige Behörde (Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung) genehmigt wird. Der Ablauf des Genehmigungsverfahrens besteht darin, dass die ForscherInnen durch den Tierversuchsantrag die Bedeutung, Erklärung und Begründung des Projekts, die Projektziele und die Umsetzung der 3R Leitprinzipien detailliert wissenschaftlich und rechtlich argumentieren, welche im § 26 Abschnitt 4 des Tierversuchsgesetzes (TVG 2012) rechtlich vorgeschrieben sind. Wenn alle rechtlichen Vorschriften dieses Bundesgesetzes erfüllt sind, genehmigt das Bundesministerium für Bildung, Wissenschaft und Forschung mit dem Bescheid den Tierversuchsantrag. Neben der rechtlichen Seite wird auch die Ethik als Bewertungsinstrument für die Durchführung des Tierversuchs in Betracht gezogen (Eggel und Grimm, 2018).

Im Jahr 2018 wurden laut der österreichischen Tierversuchsstatistik 237.727 Tiere für Versuche verwendet, meistens für die Grundlagenvorschung. Die häufigsten Tierarten, die verwendet wurden (fast 200.000), waren Mäuse. Die Zahl der verwendeten Schweine in den Tierversuchen war 1.584, bei mehr als der Hälfte der Tierversuche an den Schweinen (722) wurde ein mittlerer Schweregrad angegeben. Nach § 3 Abs. des österreichischen Tierversuchsgesetzes (TVG 2012) sind Tierversuche mit mittlerem Schweregrad Tierversuche mit kurzzeitig mittelstarken Schmerzen, mittel schweren Leiden oder Ängsten.

2.2 Anatomie der Haut

Die Haut ist das größte Organ des Körpers und erfüllt eine Vielzahl von Funktionen. Ihre wichtigsten Funktionen sind:

- Schutz des Körpers vor der äußeren Umgebung
- Speicherung des Wassers und der Elektrolyte
- Thermoregulation

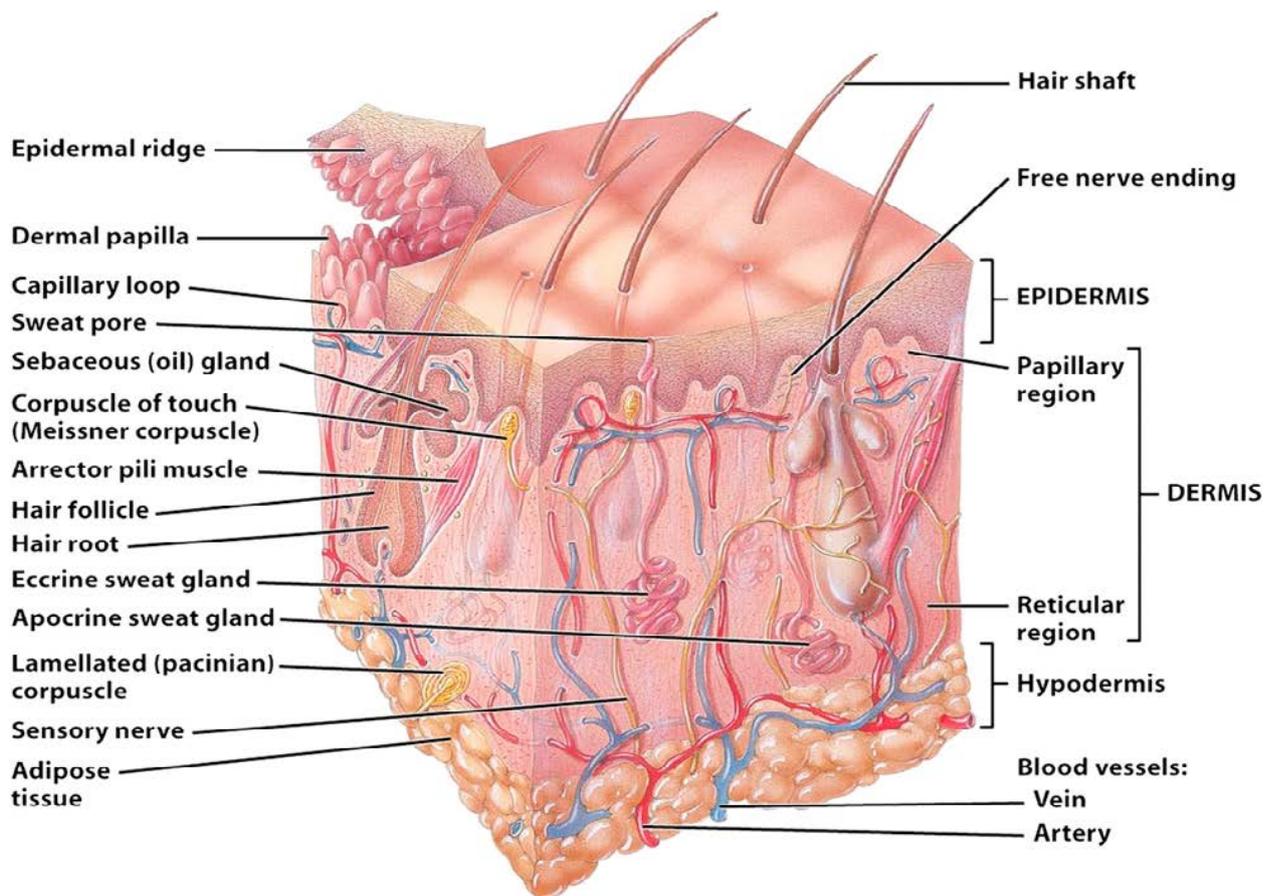
Die Haut besteht aus (siehe Abb. 2):

1. Epidermis

2. Dermis

3. Hypodermis

1. Die Epidermis dient als äußere Schutzbarriere, die eine große Rolle in der Thermoregulation spielt. Die Epidermis besteht hauptsächlich aus Keratinozyten (ungefähr 90%), die kontinuierlich durch die Proliferation von Stammzellen produziert werden und die für den Wundverschluss wichtig sind (Dehkordi et al. 2019, Rousselle et al. 2018, Gantwerker und Hom, 2011). In den verschiedenen Körperbereichen variiert die Dicke der Epidermis von 0,05 mm bis 1,5 mm. Die Epidermis besteht aus verschiedenen Teilschichten: Stratum basale, Stratum spinosum, Stratum granulosum, Stratum lucidum und Stratum corneum. Das Stratum basale ist die erste Teilschicht, die produziert wird und wo der Differenzierungsprozess von Keratinozyten beginnt. Das Stratum corneum ist die oberste Schicht der Epidermis, die eigentlich eine Schicht toter Zellen und Grundbestandteil der Hautbarriere ist (Sarkiri et al. 2019).



Sectional view of skin and subcutaneous layer

Abb. 1 Schema der Hautschichten

Abbildung leicht verändert entnommen aus Gantwerker et al. 2011

2. Die Dermis ist die innere Schicht der Haut und macht etwa 90 % des Gewichts der Haut aus. Die Dermis ist ein Bindegewebe, das regional unterschiedliche Bereiche hat: die oberflächliche papilläre Dermis (Stratum papillare) und die tiefere retikuläre Dermis (Stratum reticulare) (Dehkordi et al. 2019, Wong et al. 2016). Die Dermis besteht aus der extracellulären Matrix (ECM), vaskulären Endothelzellen und Fibroblasten, Fettdrüsen, Schweißdrüsen, Haarfollikel, Blutgefäßen und Nervenenden. Die Hauptzellpopulation besteht aus den Fibroblasten, die Kollagen und Elastin entlassen und die der Haut die mechanische Festigkeit und Elastizität geben (Dehkordi et al. 2019). Die größte Dicke der Dermis ist auf dem Rücken und beträgt ca. 3 mm. Die Hauptfunktionen der Dermis sind die Nährstoffversorgung der Epidermis, die mechanische Festigkeit und die Elastizität der Haut (Sarkiri et al. 2019, Dehkordi et al. 2019).

3. Die Hypodermis ist die tiefste Hautschicht bzw. Trennschicht zwischen Haut und Muskulatur. Sie besteht aus Gewebe und Zellen, die das Fett (die Hälfte der Körperfette) speichern (Dehkordi et al. 2019). Die vorkommenden Zelltypen in der Hypodermis sind: Fibroblasten, Adipozyten und Makrophagen, die eine wichtige Rolle in der Fettgewebshomöostase, möglicherweise in der reparativen Phase der Wundheilung und in der Wärmeregulation des Körpers haben (Wong et al. 2016).

2.3 Das Schwein als Wundmodell

Die Auswahl eines Tiermodells für die Analyse der Wundheilung beim Menschen hängt von mehreren Faktoren ab, wie z.B. der anatomischen und physiologischen Ähnlichkeit mit der Menschenhaut, der Verfügbarkeit und den damit verbundenen Kosten (Seaton et al. 2015). Kleintiere, wie z.B. Mäuse, Ratten und Kaninchen, sind einfach in der Haltung und im Umgang und preiswert, jedoch unterscheidet sich ihre anatomische und physiologische Hautstruktur signifikant von der Haut des Menschen (Tapking et al. 1993). Diese Tatsache schließt sie zwar für die Verwendung als Tiermodell nicht aus, sollte sich aber darin spiegeln, wie die Ergebnisse im Gegensatz zur Heilung einer menschlichen Wunde stehen. Ein weiterer Grund ist die Größe der Tiere. Das Schwein ermöglicht es aufgrund seiner Größe, mehrere Wunden am Rücken des Tieres zu setzen, so dass ein einzelnes Tier als Quelle für eine größere Anzahl von Replikationen dienen kann. So kann eine begrenzte Anzahl von Tieren zur Erzeugung von statistisch signifikanten Ergebnissen verwendet werden (Lindblad, 2008).

Die Epidermis des Schweines ist sehr ähnlich der menschlichen Epidermis. Die Keratinozyten sind die am häufigsten vorkommenden Zellen (ca. 90%) der Epidermis und sind in Schichten organisiert (Debeer et al. 2013). Die Dicke der Epidermis beträgt bei Schweinen 30 μm bis 140 μm und bei Menschen 50 μm bis 120 μm , beiden zeigen ähnliches dermales Kollagen, Papillarkörperchen und vorhandenes subdermales Fettgewebe (Tapking et al. 1993). Die Schweine-Dermis besteht aus 2 Zonen: die papilläre Dermis, die mit der Epidermis in Kontakt steht und die retikuläre Dermis, die in Kontakt mit der Hypodermis ist. Sie setzt sich aus zahlreichen Zelltypen zusammen, am meisten aus Fibroblasten, sowie aus der extrazellulären Matrix. Die Fibroblasten als meist vorkommende Zelltypen sind verantwortlich für die Sekretion der dermalen Proteine (Kollagen, Elastin) (Debeer et al. 2013).

Das dermal-epidermale Schichtdickenverhältnis der Schweinehaut variiert von 10:1 bis 13:1, welches auch vergleichbar mit der menschlichen Haut ist (Avon und Wood 2005).

In der Hypodermis sind Adipozyten die Hauptzellen, welche eine schwache perizelluläre Expression von Vimentin S 100 Protein – so wie auch in der menschlichen Haut - zeigen. Die Schweinehaut hat ein reiches Gefäßnetz, Hautinnervation und die Struktur der Haarfollikel sind ähnlich wie in der menschlichen Haut (Debeer et al.2013, Jacobi et al. 2006).

In Bezug auf den Haarmantel zeigen die Haut des Menschen und des Schweines eine große Ähnlichkeit, sie sind beide nur spärlich behaart. Im Vergleich dazu haben beispielsweise die Mäuse einen dichten Haarmantel mit einem definierten Wachstumszyklus. Der sogenannte Maushaar-Zyklus dauert 3 Wochen, während menschliche Haarzyklen mehrere Jahre dauern können (Abdullahi et al. 2014).

Obwohl die kleinen Säugetiere leichter zu handhaben sind, heilen die Wunden bei diesen Tieren hauptsächlich durch Wundkontraktion, anstatt wie beim Menschen durch Migration von Epidermiszellen. Im Gegensatz dazu heilt die Schweinehaut genau wie die menschlichen Hautwunden durch Reepithelisierung (Tapping et al. 1993).

Sullivan und Kollegen verglichen die Ergebnisse von Wundheilungsstudien an Menschen, Schweinen, kleinen Säugetieren und in In-vitro-Studien. Die Ergebnisse zeigten, dass beim Menschen gegenüber dem Schwein die Übereinstimmung 78% betrug, gegenüber kleinen Säugetieren 53% und im Vergleich zu In-vitro-Studien 57% (Middelkoop et al. 2004).

Die Unterschiede der Schweinehaut im Vergleich zur menschlichen Haut sind eine geringere Dicke körniger Zellschicht, reduzierte Mengen an Melanin und Melanozyten in der Basalzellschicht, eine größere Verbreitung der apokrinen (im Vergleich zu ekkrinen) Schweißdrüsen und kleinere Talgdrüsen (siehe Abb. 1) (Middelkoop et al. 2004). Die Ähnlichkeit zwischen menschlicher Haut und Schweinehaut machen das Schwein zu einem zuverlässigen und akkuraten Tiermodell zur Analyse der kutanen Wundheilung beim Menschen (Seaton et al. 2015).

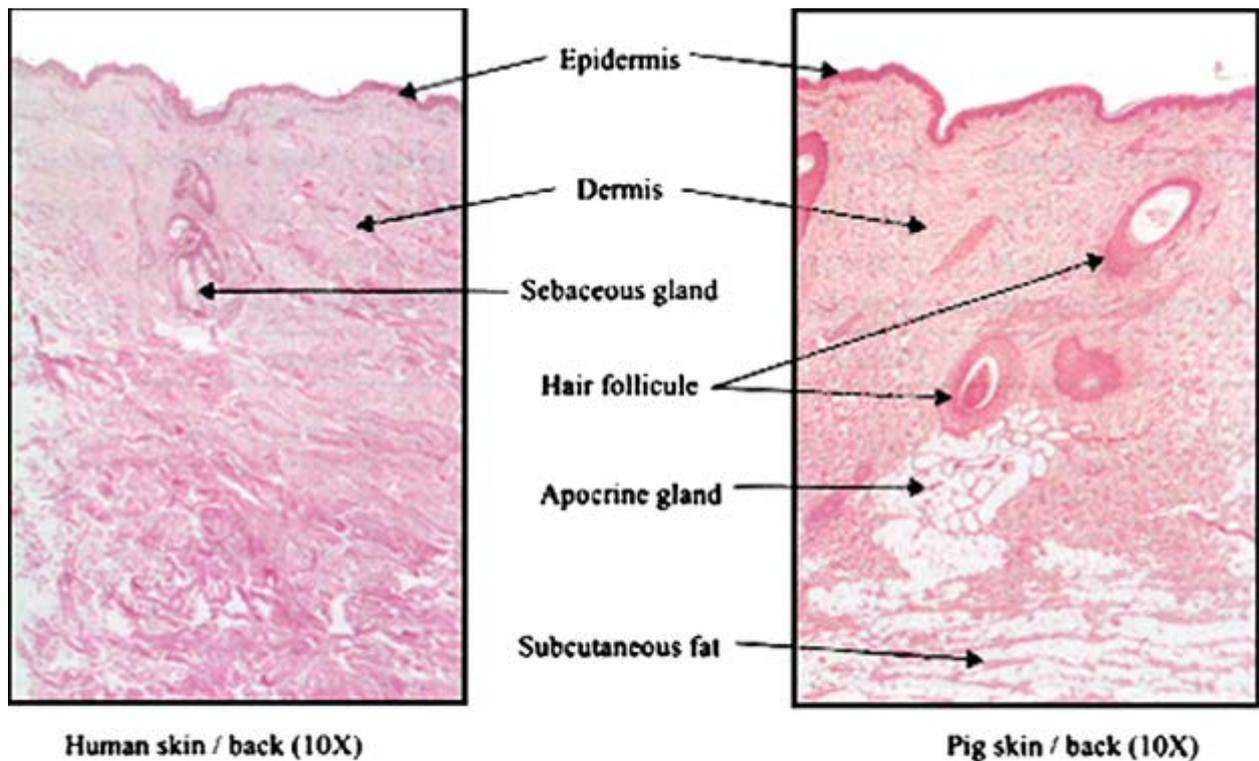


Abb. 2 Histologischer Vergleich zwischen menschlicher Haut und Schweinehaut mit ähnlichen Strukturen
Abbildung unverändert entnommen aus Lindbald 2014

Bevor man mit der Analyse der Wundheilung beim Menschen beginnt, ist es wichtig, einen kurzen Überblick über die Faktoren darzustellen, die in einem allgemeinem Sinn und für die vorliegende Studie das Schwein zu dem am besten geeigneten Tiermodell zur Untersuchung der Wundheilung beim Menschen ausmacht. Einer der wichtigsten Faktoren ist die anatomische, physiologische und biochemische Ähnlichkeit zwischen menschlicher Haut und Schweinehaut. Die Schweinehaut heilt vorwiegend durch Reepithelisierung und das macht das Schwein zu einem wertvollen In-vivo-Wundheilungsmodell (Seaton et al. 2015). Außer dieser Ähnlichkeit spielen auch die Verfügbarkeit und die Kosten eine große Rolle in der Auswahl des geeigneten Tiermodells. Mäuse, Ratten und Kaninchen sind zwar preiswert und einfacher zu halten, jedoch unterscheidet sich ihre Haut in ihrer anatomischen und physiologischen Struktur signifikant von der Haut des Menschen (Tapking et al. 1993).

2.4 Die Wunde und Wundarten

Eine Wunde kann man als Schaden oder Störung der normalen anatomischen Struktur und Funktion der Haut definieren. Diese Störung kann entweder nur die epitheliale Integrität der Haut oder auch tieferliegendes, subkutanes Gewebe betreffen und mit Schäden anderer Strukturen wie Muskeln, Gefäße, Nerven, parenchymaler Organe oder sogar Knochen einhergehen. Angesichts der Tatsache, dass die Zeit ein wichtiger Faktor in der Wundheilung ist, können die Wunden klinisch in akut und chronisch unterteilt werden. Die akuten Wunden können sich durch rechtzeitige und geordnete Wundheilungsphasenselbst reparieren, mit dem Zeitverlauf von 5 bis 10 Tagen, oder innerhalb von 30 Tagen. Sie entstehen meistens durch einen traumatischen Gewebeverlust oder ein chirurgisches Verfahren. Im Gegensatz dazu können chronische Wunden eine anatomische und funktionelle Wiederherstellung der Haut in keinem geordneten und zeitnahen Wundheilungszyklus erreichen. Der Wundheilungszyklus kann aufgrund verschiedener Faktoren wie Infektion, Gewebshypoxie, Nekrose oder Überschuss von Entzündungsmediatoren verlängert werden. Verbrennungen, Vaskulitis, sowie arterielle und venöse Insuffizienzen resultieren meistens in einer chronischen Wunde (Velnar et al. 2009).

Nach Binnebösel und Schumpelick (2010) unterscheidet man je nach Ursache folgende Wundarten:

- mechanische Wunden (Schnitt -, Stich -, Schürf -, Riss -, Biss -, Platz-,Schusswunde oder Ablederungswunde)
- thermische Wunden(Verbrennung/Erfröierung)
- chemische Wunden (Säure oder Laugenverätzungen)
- strahlungsbedingte Wunden (Gewebeschädigung durch ionisierende Strahlung)

Für die vorliegende Studie ist jedoch die Unterteilung der Wundarten nach Tiefe des geschädigten Gewebes von Interesse (Rose und Rozée 2013):

- Spalthautwunde (begrenzt auf die Epidermis mit dem Stratum papillare der Dermis als Grenzzone)
- Vollhautwunde (umfasst die gesamte Kutis mit Epidermis und Dermis)

2.4.1 Die Spalthaut

Die Spalthaut ist ein Hauttransplantat, das häufig in rekonstruktiven Verfahren verwendet wird, besonders nach Verbrennungen und bei großen, offenen Wunden, die sich nicht primär schließen können. Nach Definition ist ein Transplantat etwas das aus dem Körper entfernt, vollständig devaskularisiert und an einem anderen Ort eingesetzt wird (Thorne 2007). Die Spalthaut besteht aus der Epidermis und einem Teil der Dermis (siehe Abb. 4) (Ratner 2003). Die Dicke der Spalthaut liegt zwischen 0,1-0,6 mm und je nach Dicke wird die Spalthaut nach Rose und Rozée (2013) wie folgt unterteilt:

- Ultradünne Spalthaut: 0,1-0,2 mm
- Dünne Spalthaut: 0,2-0,3 mm
- Mittlere Spalthaut: 0,3-0,4 mm
- Dicke Spalthaut: 0,4-0,6 mm

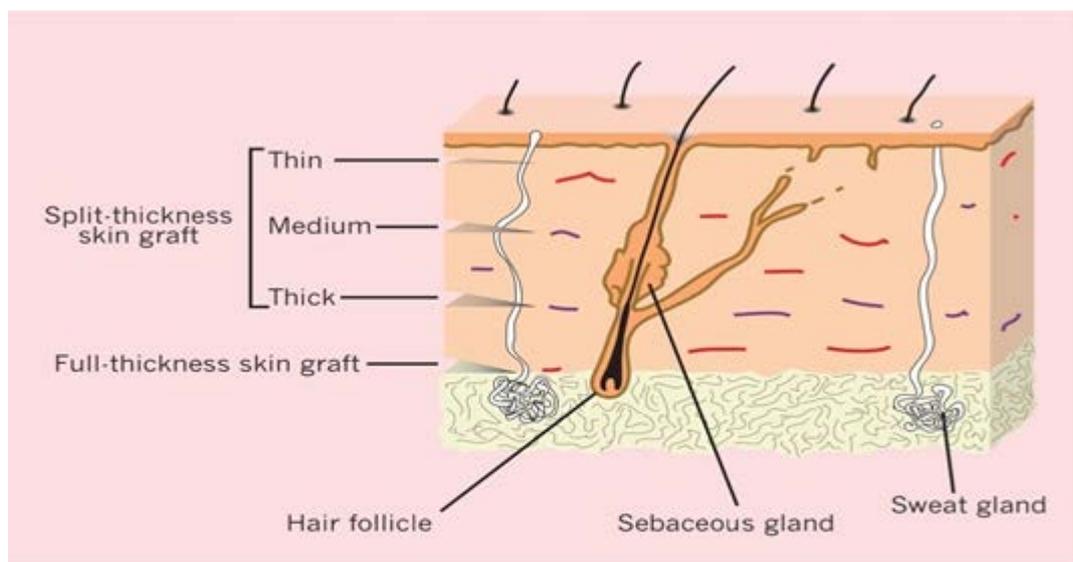


Abb. 3 Spalthaut und Vollhaut

Abbildung unverändert entnommen aus Beldon 2003

Das entnommene Hauttransplantat lässt sich durch sog. “mesh-graft-Technik“ im Verhältnis 1:1,5 - 1:6 vergrößern (Rose und Rozée 2013). Das ermöglicht, dass das Hauttransplantat eine größere Fläche pro Quadratzentimeter bedecken kann und ermöglicht eine bessere Drainage und auch Ernährung des Transplantats durch die zahlreichen Löcher.

Die Spalthaut kann von überall aus dem Körper entnommen werden, obwohl die Farbe, Textur, die Dicke der Dermis, Vaskularität und die Morbidität der Körperstellen erheblich variieren (Thorne 2007). Die häufigsten Bereiche für Spalthautspenden sind Oberschenkel, Rücken, Oberarm und Bauchdecke (Beldon 2003).

Die Entnahme der Spalthaut erfolgt heutzutage mit dem elektrischen Dermatome, mit einer maximalen Breite von 8 cm (Müller 2000). Das Verfahren läuft ab wie folgt (Ratner 2003):

- Spender- und Empfängerstelle werden anästhesiert und die Haut desinfiziert. Im Spenderbereich wird das Spalthauttransplantat in einem Winkel von 30-45° zur Hautoberfläche mit einem Dermatome entnommen und in eine sterile Kochsalzlösung gelegt.
- Mit einem speziellen Gerät wird das Transplantat „gemesht“, das heißt, es entsteht ein netzartiges Hauttransplantat. Das ermöglicht die Drainage von angesammeltem Blut und serös-blutigem Material, die den Kontakt mit dem Transplantatbett hemmen können. Weiters wird dadurch die Fläche des Transplantats entsprechend vergrößert.
- Im Anschluss erfolgt die Einpassung, Deckung und Fixierung des Transplantats am Gewebedefekt.

Der Erfolg einer Hauttransplantation hängt von der Fähigkeit der schnellen Vaskularisation und Aufnahme von Nährstoffen des Transplantats ab.

Die Spalthauttransplantate ermöglichen den Transfer von gesunder Haut (Young und Fowler 1988) um:

- Hautverluste, wie bei Verbrennungen, traumatischen Verletzungen, Epidermolysis bullosa, Dermatitis ulcerosa, toxischer Nekrolyse der Epidermis, etc. zu ersetzen
- die Heilungsrate bei langsamheilenden Wunden zu beschleunigen
- Defekte, wie z.B. bei Narbengewebe oder nach der Entfernung von Hauttumoren, zu rekonstruieren
- die Wunde dort zu verschließen, wo der primäre Wundverschluss das Risiko von Infektionen erhöht.

2.4.2 Die Spalthautwunden

Durch die Spalthautentnahme entsteht eine zweite Wunde, die für die Patienten postoperativ mehr Beschwerden verursachen kann als das Transplantat selbst (Ratner 2003). Da bei den Spalthautwunden die lokalen Nervenenden geschädigt und externen Reizen ausgesetzt sind, ist Schmerz ein häufiges Problem. Die Nervenenden schicken ein erhöhtes Schmerzsignal auf das zentrale Nervensystem und daraus resultiert, dass die Spalthautwunden schmerzhafter sind, als die ursprüngliche Wunde, und mehr Beschwerden für den Patienten verursachen (Varon et al. 2018, Beldon 2003).

Spalthautwunden sind oberflächliche Wunden, ähnlich wie Schürfwunden, die per secundam intentionem heilen. Bei der Spalthautentnahme sind die Epidermis und ein Teil der retikulären Dermis bzw. Haarfollikel und Schweißdrüsen unvollständig ausgeschnitten, was eine spontane Reepithelisierung der entstandenen oberflächlichen Wunden ermöglicht (Beldon 2003).

Im Gegensatz zu der Epidermis der Spenderseite, die sich aus den migrierenden epidermalen Zellen regeneriert, welche ursprünglich in den Haarfollikeln und Hautanhangsgebilden entstanden sind, hat die Dermis keine Fähigkeit sich zu regenerieren (Thorne 2007).

Der Heilungsprozess der Spalthautwunden besteht aus der Aktivierung, Migration und Proliferation von Keratinozyten über die Wundoberfläche (Miyanaga et al. 2017). Nach Beldon (2003) hängt die Reepithelisierung der Spalthautwunden von folgenden Faktoren ab:

- Tiefe der Spalthautwunde
- Ausmaß der verbleibenden retikulären Dermis am Entnahmeort
- Wundoberfläche
- Ernährungszustand
- Infektionen

Dieser Prozess dauert bei jungen Patienten 7-10 Tage, bei einem älteren Patienten kann es bis zu 3 Wochen dauern (Beldon 2003). Daher ist eine Heilungszeit, die mehr als 1 Monat dauert, als abnormal anzusehen (Miyanaga et al. 2017). Wenn die Spalthautwunde infiziert ist, besteht die Gefahr, dass die Wunde tiefer wird und die Eigenschaften von Vollhautwunden bekommt,

wodurch die Wundheilung prolongiert wird. Die Anzeichen einer Infektion sind wie bei den meisten anderen Wunden (Beldon 2003):

- Anstieg der inneren Körpertemperatur (bei systemischen Infektionen) sowie der Hauttemperatur
- Erhöhte Leukozytenzahl
- Entzündung
- Schmerzen/Beschwerden
- Erhöhtes Exudat
- Veränderter Geruch
- blutendes Wundbett
- Taschen am Wundgrund

Die Spalthautwunden können auf verschiedene Arten gepflegt werden. Jedenfalls müssen sie vor mechanischen Verletzungen und vor Austrocknung geschützt sein (Thorne 2007). Eine ideale Möglichkeit der Wundversorgung bei solchen Wunden sind Wundauflagen, die folgende Kriterien erfüllen sollten (Masella et al. 2014):

- Beschleunigung der Reepithelisierung
- Verhinderung der Austrocknung
- Beseitigung von Wundsekret
- Möglichkeit des Gasaustausches
- Resistenz gegenüber Infektionen
- Leichte Anwendbarkeit und hoher Patientenkomfort
- Kosteneffizienz

Keine einzige derzeit existierende Wundauflage ist ideal, um eine Spalthautwunde zu behandeln. Um das normale tägliche Leben des Patienten zu ermöglichen, ist eine Wundauflage, die bequem und selten zu wechseln ist, wünschenswert (Beldon 2003). In der letzten Zeit gibt es zahlreiche Wundauflagen für oberflächliche Wunden auf dem Markt. Diese Studie stellt in den Fokus die Wirksamkeit der neuen zellbasierten Wundauflagen im Vergleich mit Wundauflagen, die derzeit auf dem Markt erhältlich sind.

2.5 Physiologie der Wundheilung

Die Haut, die als das größte Organ des Körpers mehrere Funktionen hat, dient u.a. als äußere Schutzbarriere des Körpers gegen verschiedene Noxen und Mikroorganismen. Laut Wild und Auböck (2007) bezeichnet man jede Zerstörung großer Hautpartien durch Traumata (z.B. Verbrennungen) oder Hautkrankheiten (z.B. toxische epidermale Nekrose) als eine Wunde (Wild und Auböck, 2007). Diese Läsionen, die eine Gewebedurchtrennung der äußeren Haut, der Schleimhäute oder der Oberfläche von angrenzenden Geweben und Organen verursachen, führen zu lang dauernder schwerwiegender Beeinträchtigung oder sogar zum Tod. Deswegen ist es für den Körper höchste Priorität, die Verletzung der Haut wieder zu verschließen, d.h. das zerstörte Gewebe wird morphologisch und funktionell wiederhergestellt. Um die grundlegenden Wundheilungsabläufe zu verstehen, ist es erforderlich, diese komplexen, dynamischen Prozesse zu kennen.

Mutschler (2012) bezeichnet die Wunden, die nur auf die Oberfläche der Haut begrenzt sind, als einfache Wunden, im Vergleich zu komplizierten Wunden, die in tiefere Gewebeschichten reichen. Die einfache Wunde heilt primär unter Ausbildung einer minimalen Narbe innerhalb weniger Tage zu, wenn die Wundränder gut adaptiert und ohne Störfaktoren sind. Dagegen heilen Defektwunden sekundär ab über breitere Narbenbildung und Granulationsgewebe und benötigen dazu - je nach Defektgröße - einige Wochen (Mutschler 2012). Die Narbe entsteht durch Ausschüttung von Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Mediatoren, die verschiedene Mechanismen einsetzen. Dieser Wundverschluss reduziert die Möglichkeit von Keimbesiedlungen und den damit verbundenen Störungen der Heilungsprozesse (Trainotti und Schelthauer 2017).

Die Wundheilung ist ein Prozess, der aus einer katabolen Phase (in der Material abgebaut wird) und einer anabolen Phase (in der Material aufgebaut wird) besteht. Die beiden Phasen sind zeitlich und räumlich voneinander getrennt (siehe Abb. 3), wobei zu Beginn der Wundheilung katabole und beim Abschluss anabole Phasen überwiegen.

Die Wundheilung hat 3 zeitlich aufeinanderfolgende Phasen (Seebauer et al. 2019):

1. Entzündungs- oder Exsudative Phase, sie entspricht der katabolen Phase

2. Granulations- oder Proliferative Phase, die ein Übergang der katabolen in die anabole Phase ist

3. Remodellierung oder Reparative Phase, sie entspricht der anabolen Phase

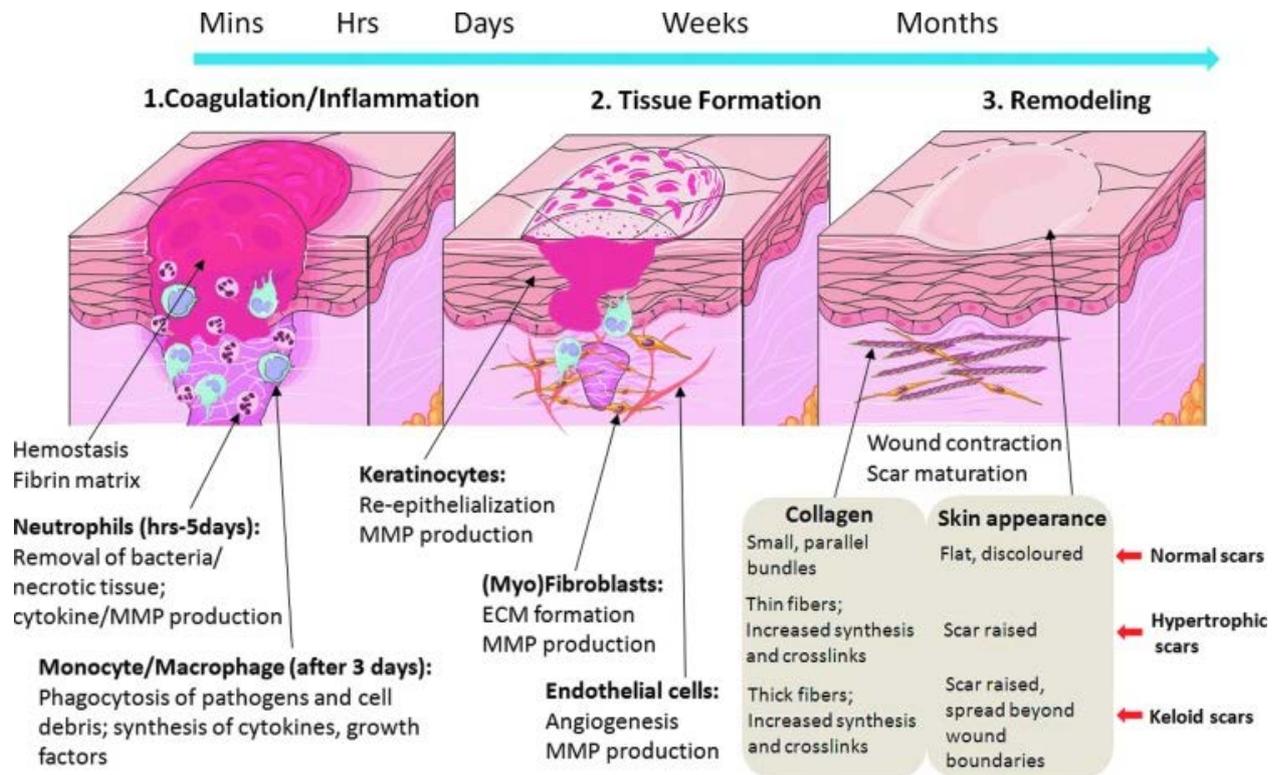


Abb. 4 klassischen Stadien der Wundheilung
Abbildung leicht verändert entnommen aus Xue und Jackson 2013

Entzündungsphase

Das erste Ziel des Prozesses der Wundheilung nach einer Verletzung ist die Blutung zu stoppen und das verletzte Gewebe zu verschließen. Die Entzündungsphase besteht aus der vaskulären Reaktion (Hämostase) und der zellulären Reaktion (Entzündung) (Dehkordi et al. 2019). Durch die vaskuläre Reaktion kommt es zu einer 5 bis 10minütigen Vasokonstriktion der Gefäße und die Gerinnungskaskade wird aktiviert, die Thrombozyten heften sich an der beschädigten Gefäßwand an und bilden einen Thrombus (Reinke und Sorg 2012, Mutschler 2012). Das Ziel der Aktivierung der Gerinnungskaskade ist Fibrin aus Fibrinogen zu bilden. Die Gruppierung der

Thrombozyten untereinander bewirkt die Bildung eines weißen Plättchenthrombus, der die beschädigte Gefäßwand provisorisch verschließt. Dieser Prozess wird als primäre Hämostase bezeichnet. In der sekundären Hämostase kommt es über die Aktivierung der plasmatischen Gerinnungskaskade zur Bildung von Fibrin (Seebauer et al. 2019).

Das Enzym Thrombin katalysiert am Ende der Gerinnungskaskade die Synthese von langkettigen Fibrinpolymeren aus wasserlöslichen Fibrinogenpeptiden. Die Thrombozyten setzen sich dabei in ein festes, dreidimensionales Fibrinnetzwerk, zusammen mit Erythrozyten und Leukozyten (Wild und Auböck 2017). Das gebildete Fibrin und der Blut-Thrombus sind stark in die Wunde eingebaut und dienen als mechanischer Schutz und auch als provisorische Matrix für die einwandernden Zellen (neutrophile Granulozyten, Monozyten, Fibroblasten und Endothelzellen) (Seebauer et al. 2019).

Die Entzündungsreaktion startet mit der Freisetzung von Zytokinen sowie verschiedenen Wachstumsfaktoren (TGF- β -, „transforming growth factor-beta“; PDGF-, „platelet-derived growth factor“; EGF-, „epidermal growth factor“; FGF-, „fibroblast growth factor“ und Interleukin-8) aus dem Fibrinnetzwerk (Dehkordi et al. 2019). In den ersten 24-48 h der Wundheilung sind die neutrophilen Granulozyten die dominanten Zellen in der Wunde (Mutschler 2012). Die Funktion von Neutrophilen ist die Verhütung und Beseitigung von Wundinfektionen durch Produktion und Speicherung großer Mengen von Proteasen und freier Sauerstoffradikale, mit denen sie fremdes Material und devitales Gewebe eliminieren und abbauen (Seebauer et al. 2019). Wenn die Aufgabe der neutrophilen Granulozyten erfüllt ist, werden sie apoptotisch oder von Makrophagen phagozytiert (Mutschler 2012).

Charakteristisch für diese Phase ist die Schwellung, welche durch die Steigerung des Kapillardrucks und die vasoaktiven Mediatoren (Histamin, Serotonin) ausgelöst wird. Das Ergebnis ist eine Blutstase, erhöhter Kohlendioxidpartialdruck und Sauerstoffmangel, die zu einer Gewebseazidose und am Ende zu einem Wundödem führen (Trainotti und Schelthauer 2017).

Die Zahl der Neutrophilen nimmt ungefähr 3 Tage nach der Verletzung ab und sie werden durch Makrophagen ersetzt (Dehkordi et al. 2019). Die Makrophagen aktivieren auch Endothelzellen, die TGF- β , PDGF und VEGF („vascular endothelial grow factor“) produzieren, die als die

wichtigsten Zytokine eine Hauptrolle in der Stimulierung der Bildung von Granulationsgewebe spielen (Gonzalez et al. 2016).

Granulationsphase

Die proliferative Phase startet 2-10 Tage nach der Gewebsläsion mit der Interaktion zwischen verschiedenen Zelltypen, die in der Bildung von Granulationsgewebe des Wundrandes resultiert (Dehkordi et al. 2019).

Dieser Phase folgt die Verringerung der Azidose und der Hypoxie, das Gewebsödem wird zurückgebildet und das katabole Wundmilieu wird anabol (Mutschler 2012). Die dominierenden Entzündungszellen sind Makrophagen, die die proliferative Phase der Wundheilung steuern (Canedo-Dorantes und Canedo-Ayala 2019). Während der Entzündungsphase kommt es zur Vermehrung der Makrophagen, die ihre maximale Konzentration während der proliferativen Phase erreichen. Danach sinkt ihre Konzentration während der reparativen Phase (Ellis et al. 2018).

Die proliferative Phase besteht aus komplexen Prozessen der Angiogenese, Fibrioplasie und Reepithelisierung. Die Angiogenese ist ein koordinierter Prozess mit Einwanderung, Endothelproliferation und Bildung vieler neuer Blutgefäße, die den Transport von Flüssigkeiten, Sauerstoff und Nährstoffen in der Wunde übernehmen (Gonzalez et al. 2016, Seebauer et al. 2019). Die Angiogenese, die wichtig für die Wundheilung ist, wird durch Wachstumsfaktoren ausgelöst und gefördert (Janis und Harrison 2014).

Die Sanierung der neurologischen Funktionen umfasst 2 Prozesse:

1. Reinnervation

2. Nervenregeneration

Die beteiligten Zellen in den beiden Prozessen sind: Monozyten-Makrophagen, Zytokine, Fibroblasten, Schwann'sche Zellen ("SC Zellen") und Transkriptionsfaktoren.

Die Fibroplasie ist charakterisiert durch eine Proliferation und Differenzierung von Myofibroblasten, neuer extrazellulärer Matrix und Wundkontraktion. Die Zytokine und Wachstumsfaktoren aktivieren die Fibroblasten zur Proliferation, um Kollagen zu produzieren

(Canedo-Dorantes und Canedo-Ayala 2019). Aus der bereits gebildeten temporären Matrix, die aus Fibrin und Fibronectin besteht, wird durch extrazelluläre Matrix-Biosynthese die richtige Struktur und Funktion des Gewebes wiederhergestellt (Olczyk et al. 2014).

Die zweite reife Population von Fibroblasten wandert in das Granulationsgewebe, ersetzt dort die vorläufige Fibrinmatrix durch Kollagensynthese und die Fibroblasten werden zu Myofibroblasten umgewandelt. Das Ergebnis ist die Ablagerung von Kollagen und Auslösung der Wundkontraktion (Canedo-Dorantes und Canedo-Ayala 2019).

Die Epithelisierung wird durch die Keratinozyten im Wundrand gesteuert und beginnt mit der Zellablösung und mitotischen Teilung. Diese Prozesse werden durch EGF, TGF- β , FGF und Zytokine stimuliert, das Resultat ist die Bildung einer Narbe. Die Narbe erscheint hell, ohne Haare, Talg und Schweißdrüsen, da die Melanozyten nicht regenerationsfähig sind (Dehkordi et al. 2019, Seebauer et al. 2019). Die Epithelisierung ist ein klinisches Symptom der Heilung, aber kein Zeichen für das Ende dieses Prozesses (Olczyk et al. 2014).

Reparative Phase

Die letzte Phase der Wundheilung ist die Remodellierung, die 2 bis 3 Wochen nach der Verletzung beginnt und 2 Jahre oder länger dauern kann. Während dieses Stadiums kommt es zur Änderung der Zusammensetzung der Matrix: Kollagen Typ III wird durch Kollagen Typ I ersetzt, die Umwandlung erfolgt durch Matrix-Metalloproteinasen, welche von Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen produziert werden, um die Narbe zu stärken (Dehkordi et al. 2019). Die reparative Phase hat als Hauptziel das Erreichen der maximalen Reißfestigkeit durch Reorganisation, Abbau und Resynthese der extrazellulären Matrix. Die Wiederherstellung der Funktionalität des verletzten Gewebes ist das Ergebnis der geringen Produktion von Chemokinen durch Wirkung von entzündungshemmenden Zytokinen wie IL-10 oder TGF- β . Eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, wie z.B. TGF- β und FGF, kontrollieren die Kollagen-Synthese und haben einen starken Einfluss auf die Genexpression dieses Proteins (Gonzalez et al. 2016).

Während in der proliferativen Phase die Makrophagen die Hauptzellen sind, sind es in der reparativen Phase die Fibroblasten, die für den Ersatz von Kollagen Typ III durch Kollagen Typ I verantwortlich sind (Childs und Murthy 2016). Da die Produktion von Kollagen erhöht ist, ermöglicht das die notwendige Festigkeit für das neue Gewebe, welches eine maximale

Reißfestigkeit von über 30 % nach 3 Wochen und von 80 % nach 3 Monaten erreicht (Mutschler 2012). Die Balance zwischen Typ I und Typ III tritt nach ungefähr 30 Tagen ein und die maximale Festigkeit nach ungefähr 42-60 Tagen. Deswegen empfiehlt sich eine Aktivitätseinschränkung für 6 Wochen. Die Voraussetzung für eine erfolgreiche Wundheilung ist die Sauerstoffversorgung des Gewebes an den Wundrändern (Childs und Murthy 2016).

Während der reparativen Phase verschwinden die Fibroblasten, Entzündungszellen und Blutgefäße im Wundbereich aufgrund von Auswanderungsprozessen, Apoptose oder anderen unbekanntem Mechanismen des Zelltods, die am Ende zur Bildung einer Narbe mit einer verringerten Anzahl von Zellen führt. Das gebildete Narbengewebe enthält weniger Zellen und Blutgefäße und zeigt eine Erhöhung der Konzentration von Kollagenfasern (Gonzalez et al. 2016). Im Vergleich zu unverletzter Haut hat die Epidermis der Narbe keine Retezapfen, die in der Bindegewebsmatrix verankert und verantwortlich für die Verbindung der Epidermis mit der Dermis sind (Reindke und Sorg 2012).

2.5.1 Formen der Wundheilung

Wie oben angeführt, ist für eine erfolgreiche Wundheilung eine rechtzeitige und optimale Funktionsweise vieler verschiedener Prozesse, Zelltypen, molekularer Mediatoren und Strukturelemente erforderlich (Velnar et al. 2009). Je nach Literaturgrundlage können wir grundsätzlich 3 Formen der Wundheilung unterscheiden (Scheithauer und Riechelmann 2003):

- primäre Wundheilung (Sanatio per primam intentionem)
- sekundäre Wundheilung (Sanatio per secundam intentionem)
- regenerative Wundheilung oberflächlicher Wunden

Ein gutes Beispiel für eine primäre Wundheilung sind chirurgische Schnitte, die eine sofortige Wiederernährung der Hautränder ermöglichen und eine Epithelisierung zur Wiederherstellung der Hautbarriere innerhalb von 48-72 Stunden ermöglichen (Childs und Murthy 2017). Die primäre Wundheilung ist meistens eine unkomplizierte und komplikationslose Wundheilung von nicht infizierten Wunden mit glatten und gut adaptierten Wundrändern. Sie durchläuft alle oben beschriebenen Phasen der Wundheilung ohne Unterbrechung und ist innerhalb von wenigen Tagen abgeschlossen (Gantwerker und Hom 2011, Kujath und Michelsen 2008).

Bei einer Wundheilung sind Infektionen und sekundäre Blutungen die häufigsten Komplikationen. Die klassischen Merkmale einer Infektion bzw. Entzündung sind: Calor (Wärme), Dolor (Schmerz), Rubor (Rötung), Tumor (Schwellung) und Functiolaesa (gestörte Funktion). Wenn keine Störfaktoren vorhanden sind, schließt sich die primär heilende und saubere Wunde bald durch die Vernetzung von Fibrin, was in einer strichförmigen, wenig sichtbaren Narbe resultiert (Kujath und Michelsen 2008, Binnebösel und Schumpelick 2010).

Eine sekundäre Wundheilung entwickelt sich, wenn der primäre Wundheilungsprozess durch lokale Faktoren gestört wird. Die Störungsfaktoren sind z.B. Infektionen, unzureichende Blutperfusion oder Wunddehiszenz (Kujath und Michelsen 2008). Offene Wunden mit großem Gewebsdefekt heilen nicht primär, sondern durch sekundäre Wundheilung, die mit Kontraktionen, Granulation und Epithelisierung erfolgt (Ramasastry 2005).

Beim sekundären Wundheilungsprozess erfolgt der Wundverschluss durch Bildung von Granulationsgewebe und Wundkontraktion. Wenn der Gewebsdefekt mit Granulationsgewebe ausgefüllt ist, erfolgt die Epithelisierung. Aus diesem Grund dauert der sekundäre Wundheilungsprozess länger als die primäre Wundheilung, und er resultiert in einer breiten, funktionell störenden Narbe (Binnebösel und Schumpelick 2010).

Oberflächliche Hautwunden, die nur mit der Verletzung der Epidermis verbunden sind, heilen durch Regeneration der Keratinozyten (Scheithauer und Riechelmann 2003). Wenn die Epithelisierung abgeschlossen ist, löst sich der Wundschorf, der die Wunde gegen Infektion schützt, spontan ab. Die regenerative Phase dieser Wundheilung endet ohne Narbenbildung (Binnebösel und Schumpelick 2010).

2.5.2 Die Rolle der Keratinozyten in der Wundheilung

Die Reepithelisierung umfasst die Bildung eines neuen Epithels durch die Aktivierung der Proliferation, Migration und Differenzierung von Keratinozyten. Die Keratinozyten sind die Hauptzellen der Epidermis. Sie stammen aus epithelialen Stammzellen, die hauptsächlich in der Ausbuchtung des Haarfollikels und der Basisschicht der interfollikulären Epidermis liegen (Chen et al. 2016).

Die Keratinozytenwanderung über das Wundbett beginnt ein paar Stunden bis zu einem Tag nach der Verletzung (Rousselle et al. 2018). Die Fähigkeit dieser Zellen zur Migration in die Mitte der Wunde wird als "shuffling" bezeichnet (Reinke und Sorg 2012). Zur Vorbereitung auf die Wanderung müssen innerhalb der Keratinozyten bestimmte Prozesse ablaufen, wie die Abflachung und Dehnung von Keratinozyten, der Verlust von Zell-Zell und Zell-Matrix Kontakt, Entwicklung von pseudopodenartigen Projektionen von Lamellipodie, das Zurückziehen von intrazellulären Tonofilamenten und die Bildung von Aktinfilamenten am Rand ihres Zytoplasmas. Mehrere Elemente sind in die Keratinozytenwanderung involviert, wie die extrazelluläre Matrix, Integrin-Rezeptoren, Matrixmetalloproteinasen (MMPs) und Wachstumsfaktoren. Eine frühgebildete provisorische Matrix zusammen mit Fibronectin und Kollagen Typ V ermöglichen die Wanderung der Keratinozyten und die Abdeckung der Wunde. Die Keratinozyten fügen sich an das zugrunde liegende Substrat an, um die Basalmembran-Zone (BZN) zu rekonstruieren, die die Epidermis und die Dermis verbindet, wenn die Wanderung, möglicherweise aufgrund der Kontakthemmung, abgeschlossen ist. Dann startet der Prozess der Differenzierung, um die Epidermis zu bilden.

Die Proliferation von Keratinozyten findet in der Nähe von epidermalen Zellen statt und ermöglicht eine ausreichende Versorgung der Zellen, um die Wunde zu bedecken (Li et al. 2007). Nach Rousselle et al. (2018) verlieren die Keratinozyten in der suprabasalen Schicht die Fähigkeit zur Vermehrung, während nur die basalen Keratinozyten diese Fähigkeit behalten. Der Proliferationsindex ist im Wundzentrum signifikant erhöht, während die Differenzierung der neu gebildeten Epidermis hauptsächlich am Wundrand stattfindet (Li et al. 2007).

Die epidermalen Stammzellen aus der interfollikulären Epidermis beginnen am Wundrand zu proliferieren. Dies geschieht ungefähr 2 bis 3 Tage nach der Verletzung, um mehr Zellen zu produzieren, die die Wunde bedecken (Rousselle et al. 2018). Eine Hauptrolle bei der Regulation der Keratinozytenproliferation während der Reepithelisierung spielt das Zusammenwirken von Wachstumsfaktoren, extrazellulärer Matrix und den Integrinen (Li et al. 2007).

3. Material und Methode

Die vorliegende Studie wurde durch das Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft genehmigt (BMFWF-66.010/039-WF/V/3b/2017/0136-WF/V/3b/2017/0035-V/3b/2018). Die geplanten Versuche wurden unter der Projektleitung von Univ.Prof.Dr.MSc Lars-Peter Kamolz von der Klinischen Abteilung für Plastische, Ästhetische und Rekonstruktive Chirurgie, Graz durchgeführt. Für die Durchführung dieser Studie konnten in vitro Hautmodelle nicht benutzt werden, da diesen Modellen ein Blutgefäßsystem und die Immunzellen fehlen, die eine wichtige Rolle im Wundheilungsprozess haben.

Dieser Versuch wurde mit mittelschwerem Grad eingestuft. Bei der Spalthautentnahme entspricht die zweite Wunde einem Schmerzausmaß, das ähnlich dem des Menschen ist. Aus diesem Grund entspricht die postoperative Analgesie bis zu einer Schmerzfreiheit der des Menschen. Die Versuchsdauer betrug 5 Tage und am fünften Tag wurden die Tiere fachgerecht euthanasiert.

3.1 Wundauflagen

Als primäre Wundverbände wurden die neuen aktiven Wundauflagen mit Keratinozyten „xxixxt I & II“ und EpiciteHydro® benutzt. Als sekundäre Wundverbände wurden die feuchten Wundauflagen AQUACEL®EXTRA™, Jelonet®, Adaptic®, Polyurethan-Folie Opsite®Flexifix, Fixierpflaster Omnifix®elastic und inaktive Wundauflage Cotton Gaze GazeVliwasoft® benutzt.

Wundauflagen mit Keratinozyten „xxixxt I & II“

Der Herstellungsprozess und Produktzusammensetzung von der „xxixxt I & II“ Wundauflage entspricht dem Verfahren, wie es in den 70-iger Jahren von Rheinwald und Green entwickelt wurde. Durch Verwendung der humaner Keratinozyten fördert und beschleunigt sie den Wundheilungsprozess. Nach in vitro Kultivierung bilden die Keratinozyten einen Zellrasen, der mit einer Vaseline-getränkten Gaze auf die Wunde aufgebracht wird und eine einfache Anwendung ermöglicht. Der Wirkungsmechanismus von zellbasierten Wundauflagen „xxixxt I“ und „xxixxt II“ ist die Stimulation und Migration verbleibender Zellen an der Wundstelle,

Freisetzung von Wachstumsfaktoren und Förderung der frühen Bildung von Granulationsgewebe.

Die zellbasierten Wundauflagen „xxixxt I“ und „xxixxt II“:

- fördern eine rasche Reepithelisierung der Wundfläche
- sind leicht anzuwenden
- verkleben sich nicht mit der Wunde
- basieren auf Biomaterialien
- wirken schmerzlindernd und können mehrere Tage auf der Wunde bleiben
- können in großer Stückzahl hergestellt, kryokonserviert und bei -80°C über mehrere Monate gelagert werden.

Die zellbasierten Wundauflagen haben eine breite Anwendung, insbesondere bei oberflächlichen und tieferen Verbrennungen des zweiten Grades, sowie bei den Wunden, die nach der Spalthautentnahme entstanden sind, wobei die Zeit bis zur Wundheilung an erster Stelle steht. Der Unterschied zwischen der zellbasierten Wundauflage „xxixxt I“ und „xxixxt II“ besteht in der Aufbereitung der Zellen. Das Prüfprodukt „xxixxt I“ ist nicht CE-Zertifiziert und somit nicht in EU zugelassen, während die Qualitätskontrolle von Wundauflagen „xxixxt II“ den EU Standards entspricht.

EpiciteHydro®

EpiciteHydro® von der Firma „QRSKIN“ ist eine hydroaktive Wundauflage aus Biomaterialien, Zellulose und isotonischer Kochsalzlösung. Bestehend aus einem hohen Wassergehalt (mehr als 95 %) und einem pH-Wert von 7, ermöglicht sie ein feuchtes Milieu und bietet Schutz vor massivem Feuchtigkeitsverlust. Das Produkt ist einzeln steril verpackt und eignet sich für die Behandlung von Verbrennungswunden und Spalthautentnahmewunden.

Diese Wundauflage bietet folgende Eigenschaften:

- besteht aus reiner Zellulose
- biotechnologischer Produktionsprozess
- bildet eine feuchte Umgebung
- durchlässig für Wasserdampf, Luft und Flüssigkeit
- Absorption von Wundexsudat
- einfach anwendbar
- verklebt sich nicht mit der Wunde
- garantiert eine schmerzlose Entfernung.

Die oben genannten Eigenschaften schützen vor Infektionen und fördern eine schnelle Wundheilung mit reduzierter Narbenbildung. EpiciteHydro® hat eine CE-Kennzeichnung und ist als Medizinprodukt in Europa zugelassen.

AQUACEL®EXTRA™

Es handelt sich um eine weiche, sterile, nicht gewebte Kompresse oder Tamponade aus Natriumcarboxymethylzellulose und regenerierter Zellulosefaser als Verstärkung. Im Kontakt mit Flüssigkeit bildet sich ein Gel. Diese Eigenschaften formen eine optimale Umgebung für die Wundheilung und vermindern das Infektionsrisiko. AQUACEL®EXTRA™ ist für oberflächige Wunden sowie für die tiefen Wunden in allen Wundheilungsphasen als primäre Wundauflage geeignet und sie kann mit allen sekundären Wundauflagen kombiniert werden. Entwickelt von der Firma „ConvaTecInc“ bietet die Wundauflage ein optimales Wundmilieu und verlässlichen Wundschutz, ist faltbar, mehrlagig anwendbar und reißfest. Sie hat auch eine höhere Aufnahmekapazität und reduziert Bakterienwachstum. Durch die Gelbildung wirkt sie schmerzlindernd und kann bis zu 7 Tage auf der Wunde bleiben.

Jelonet®

Jelonet® von der Firma „smith&nephew“ ist eine sterile Paraffinwundaufgabe aus offen gewebter Gaze, die als Verklebungsschutz zwischen Wunde und sekundären Wundaufgaben dient. Diese Eigenschaften ermöglichen, dass das Wundexsudat problemlos in eine sekundäre Wundaufgabe abfließen kann. Aus diesem Grund ist das Verbandwechseln nicht so schmerzhaft. Jelonet® ist anwendbar bei Verbrennungen, bei Entnahme und Transplantationsstellen, Wunden mit Hautverlust, Risswunden und Abschürfungen.

Adaptic®

Adaptic® von der Firma „Jonson & Jonson Medical“ ist ein nichthaftender, steriler und feuchter Primärverband, der aus einem Zellulose-Acetat-Netz besteht, das mit einer Vaseline-Emulsion imprägniert ist. Laut Hersteller schafft Adaptic® die Voraussetzung für eine rasche und ungestörte Wundheilung. Die Porengröße von Adaptic® ermöglicht ein ungestörtes Abfließen von Wundexsudat in den Sekundärverband, somit vermindert sich das Risiko von Exsudatansammlung und Mazeration in der Wunde. Die oberflächenglatte Viskose-Faser von Adaptic® ermöglicht die Reduktion von Verklebung mit der Wunde. Sie kann mehrere Tage auf der Wunde bleiben und atraumatisch und schmerzlos entfernt werden. Diese Wundaufgabe lässt sich einfach auf das notwendige Maß schneiden, ohne auszufransen oder zu zerfasern. Adaptic® kann für alle Wundarten verwendet werden, besonders für Verbrennungen 1. und 2. Grades, für Spender- und Empfängerstellen bei Hauttransplantationen bzw. bei sezendierenden Wunden bei denen ein Verkleben von Wundoberfläche und Verbandmaterial verhindert werden soll.

Opsite®Flexifix

Opsite®Flexifix von der Firma „smith&nephew“ ist ein transparenter Wundverband aus Polyurethan-Folie, die zur Fixierung von primären Wundaufgaben dient. Die Folie ist wasserdicht, bildet eine Barriere gegen Bakterien und minimiert das Infektionsrisiko von außen. Opsite®Flexifix ist auch atmungsaktiv aufgrund ihrer hohen Wasserdampfdurchlässigkeit. Weitere Eigenschaften dieses Wundverbandes sind eine einfache und sichere Handhabung. Die Wundkontrolle wird durch Transparenz des Folienverbandes ermöglicht und eine problemlose und schmerzarme Entfernung wird von dem Hersteller garantiert.

Omnifix®elastic

Omnifix®elastic ist von der Firma „PAUL HARTMANN“ entwickelt worden und garantiert eine sichere Verbandabdeckung und Verbandfixierung an allen runden und konischen Körperteilen. Es handelt sich um eine klebende, vollflächige Verbandfixierung aus 100 % Zellwollgewebe mit Zinkoxid-Kautschuk-Kleber. Aufgrund ihrer hautfreundlichen Eigenschaften bietet Omnifix®elastic sowohl dem Patienten als auch dem Anwender eine einfache, komfortable und problemlose Anwendung. Synthetischer Kautschuk-Kleber ermöglicht eine sichere Haftung, und eine schmerzlose Entfernung ohne Rückstände. Sie ist extrem luft- und wasserdampfdurchlässig, absorbiert keine Röntgenstrahlen und kann auch strahlensterilisiert werden. Omnifix®elastic kommt in unterschiedlichen Größen auf den Markt und eine aufgedruckte Messskala auf dem Abdeckpapier ermöglicht ein exaktes Abschneiden.

3.2 Tiermanagement: Anzahl, Art, Herkunft, Lebensabschnitte, Gewicht und Haltung der Versuchstiere

Für die Durchführung der Studie wurden 10 Hausschweine (Hybridschweine: Kreuzung aus den Rassen Landrassen/Edelschwein) als Versuchstiere verwendet. Die Versuchstiere wurden aus kontrollierter Zucht (LFBIS Nummer: 3201953, Zehenthofer, Wohldorf25, 8521 Wettmannsstätten, Österreich) bestellt. Alle Tiere waren 3 bis 4 Monate alt, weiblich, nicht kastriert, hatten ein Gewicht zwischen 35 und 45 kg (± 3 kg) und waren mit Ohrmarkierung gekennzeichnet.

Die Versuchstiere wurden in den Stallungen der Biomedizinischen Forschung der Medizinischen Universität Graz, Roseggerweg 48, 8036 Graz unter Standardbedingungen (benachbarte Einzelboxen von 2x 3m) mit 12 stündigen hell-dunkel-Phasen und einer Raumtemperatur von $22^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ und einer Luftfeuchtigkeit von 55 – 65 % untergebracht. Sie wurden einmal täglich mit Schweinemastfutter G-22 gefüttert (Gsellmann Mischfuttererzeugung GmbH, Gnas, Österreich) und alle Tiere hatten ad libitum Zugang zu frischem Trinkwasser (Tränkenippel).

Durch entsprechendes Handling des Tierpflegepersonals wurde während der Eingewöhnungsphase (7 bis 10 Tage) versucht, den Stress der Tiere so weit wie möglich zu reduzieren und die Schweine an den Umgang mit den Menschen zu gewöhnen, um sicherzustellen, dass der möglich empfundene Stress durch oftmalige Berührungen und adäquates Handling während der Experimente reduziert ist.

3.3 Einsatz von Anästhesie und Analgesie

Am Versuchsstart bzw. Tag 0 wurde bei den Tieren mit einer mobilen Einzell-Tierwaage das präzise Tiergewicht ermittelt um die exakte Medikamentdosierung festzustellen. Die Operation wurde mit folgender Sedierung eingeleitet: eine Kombination aus Midazolam (1mg/kg KG i.m., Dormicum®, Roche Austria GmbH, Wien Österreich), Azaperon (2mg/kg KG i.m., Stresnil®, Elanco, Sanochemia Pharmazeutika AG, Neufeld, Österreich) und Ketamin (15mg/kg KG i.m., Ketasol®, aniMedica GmbH, Senden-Bösesell, Deutschland).

Bei ausreichender Sedierung wurde nach entsprechender Hautdesinfektion ein venöser Zugang (IV-Katheter Vasofix® Safety 1,10 x 33 mm G 20 rosa, B/Braun Austria GmbH, Österreich) am OP-Tisch in eine Ohrvene gelegt und das Tier wurde mit 100% Sauerstoff für 5 min präoxygeniert. Die Einleitung der Narkose erfolgte mit Propofol (2-5 mg/kg KG i.v., Propofol®, Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Österreich).

Die Intubation erfolgte mit Spiraltubus (Oral/Nasaler Trachealtubus mit Manschette 8,0 – 9,0mm COVIDIEN® IIc, Mansfield, USA) und die Tiere wurden mit Sevofluran (1,5 Volumenprozent, SEVOrane®, AbbVie GmbH, Wien, Österreich) maschinell beatmet. Während der OP lag das Schwein in Brust-Bauch-Lage, die die Ventilation erleichterte. Als Dauertropfinfusion bekamen die Tiere während der ganzen Operation Fentanyl (30µg/kg/h, Fentanyl-hameln®, Hamelnpharma plus GmbH, Hameln Deutschland), sowie eine Elektrolytlösung (10ml/kg/h i.v., ELO-MEL Isoton, Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Österreich) infundiert. Die Austrocknung der Konjunktiven während der Narkose wurde verhindert, indem die Tiere eine Augenschutzcreme (Oleovit® mit Vitamin A, Fresenius Kabi Austria GmbH, Graz, Österreich) erhielten. Das perioperative Monitoring besteht aus einer Pulsoxymetrie am Schwanz zur Überwachung der Sauerstoffsättigung und der Pulsfrequenz, Kapnographie und Überwachung der inneren Körpertemperatur durch intranasale Sonde (Ausrüstung: SanitasAespire® mit S-5 Monitor, Sanitas Ges.m.b.H. Wels, Österreich).

3.4 Operationstechnik

Nach entsprechender Anästhesie wurde der gesamte obere Rücken mit einer Schermaschine (Aesculap Favorita II von B/Braun, Austria GmbH, Österreich) rasiert. Danach wurden paravertebral 10 (Versuchstier I und II) bzw. 12 (Versuchstier III bis X) quadratische Felder mit

einem Abstand von 4 cm, davon 6 Felder auf dem rechten und 6 Felder auf dem linken Schweinerücken a 3 cm Seitenlänge (9 cm² pro Feld) mit einer Schablone und Hautmarker (edding®8020, Vertrieb GmbH Wunstorf, Deutschland) angezeichnet (siehe Abb. 5). Die genaue Lage der Wundeinsetzung ist am Schweinerücken dorsal, 3 cm paramedian von den Processus spinosi, und kranial von Höhe des Schulterblattes in kaudale Richtung bis zu den Darmbeinhöckern.

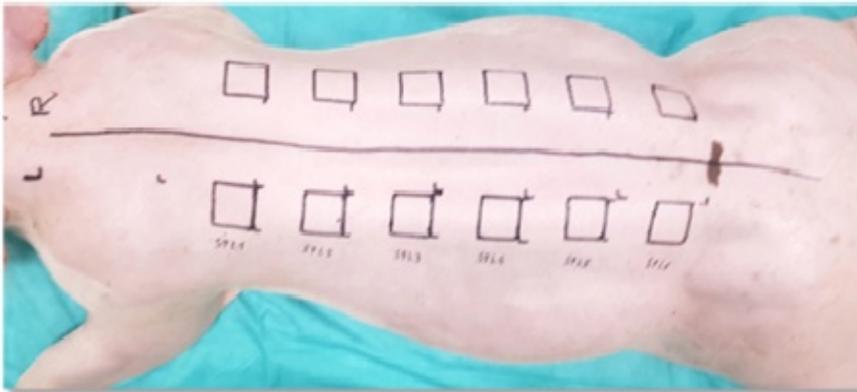


Abb. 5 Die Lage der Wundeinsetzung

Das bereits gereinigte und rasierte Operationsfeld wurde mittels sterilen Kompressen und Desinfektionsmittel (Octenisept®, Schuelke + Mayr GmbH, Wien, Österreich) desinfiziert.

Die Spalthautentnahme erfolgte auf beiden Seiten an angezeichneten Feldern mittels Dermatome (Humecca D42, „Humecca“, Borne, Niederlande), welches ein präzises Schneiden der Haut auf die gleiche Hautdicke ermöglicht (siehe Abb. 6).



Abb. 6 Die Spalthautentnahme

Dadurch entstehen gleichmäßige, glatte Wunden. Die Schädigung umfasst die Epidermis und Teile der Dermis bis zum Stratum papillare der Dermis (siehe Abb. 7).

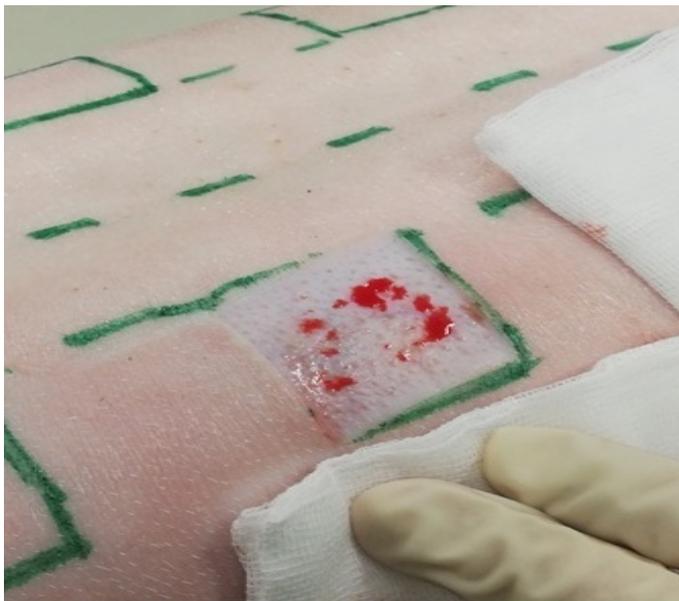


Abb. 7 Spalthautwunde

Die Hämostase der Wunde wurde mittels sterilen, feuchten Kompressen erreicht.

Versuchstier I und II dienten zur Etablierung der Wundtiefe, die eine entsprechende Beurteilung des Wundheilungsprozesses ermöglichen. Aufgrund dessen wurden die 3 Wundtiefen von 0,3

mm (300µm) bzw. 0,5 mm (500 µm) und 1,2 mm (1200 µm) exploriert und makroskopisch beurteilt.

Die Spalthautwunden wurden mit den verschiedenen Wundauflagen (primäre und sekundäre Wundauflagen), behandelt. Die Wundauflagen wurden auf die passende Größe 3,5x3,5 cm zugeschnitten und auf die Wunde angepasst. Nach Abschluss wurde die sterile Mullkomresse 10x10 cm (Lohmann&Rauscher GmbH., Wien, Österreich) auf die Wunde bzw. Wundauflage aufgebracht und mit dem Hautklammergerät (Weck Visitat® 35W, Teleflex®, Westmeath, Ireland) fixiert. Zusätzlich wurde die gesamte Operationsfläche mittels Standardüberknüpfverband (Dog & Cat- Body Basic, Große L von VetMedCare, Koblach, Austria) vor Verschmutzung und mechanischen Störungen geschützt. Die genaue Verbandanordnung wird im Kapitel 3.4 beschrieben.

Nach der Operation wurden die Tiere in warme, gepolsterte und trockene, ca. 3x3 m große Einzelboxen gelegt, um zu verhindern, dass das aufwachende Tier von den anderen Schweinen im Bestand gestört oder attackiert wird. Die Versuchstiere wurden täglich visitiert.

Die Tiere wurden postoperativ mittels transdermalem Opiat-Pflaster (Fentanyl 50 µg/h, Gebro Pharma im Nackenbereich, hinter dem Ohr, Wechsel nach 48 Stunden) und Benzylpenicillinum procainum-Dihydrostreptomycinum (1ml/10 kg KG für 6 Tage i.m., Pen-Strep 20/20 ad us.vet., MSD AnimalHealthGmbH, Luzern, Schweiz) analgetisch und antibiotisch abgedeckt. An den postoperativen Tagen 2, 3 und 4 erfolgte die Kontrolle der äußeren Verbände.

Am Versuchsende (Tag 5) wurde die Euthanasie in tiefer Narkose durch eine Überdosis Kaliumchlorid-Lösung (1 M-Kaliumchlorid-Lsg., Fresenius Kabi Austria GmbH., Graz, Österreich) durchgeführt. Danach erfolgte die Abnahme der Überknüpfverbände und Wundauflagen und die Entnahme der Hautpräparate für die histologische Untersuchung. Die Wunden wurden mittels epifaszialer Exzision mit einem Abstand von 1 cm von dem Wundrand entnommen. Die kraniale Seite des entnommenen Wundfeldes wurde mittels Biopsiestanze 4 mm(pf medical ag, Köln, Germany) markiert. Die entnommenen Hautpräparate wurden in den Einbettkassetten (Super-mega-Einbettkassetten, Maße 7,4x5,2x1,8 cm, Resolab® GmbH, Bad Oeynhausen, Deutschland) eingelegt und in der 4% Formaldehyd-Lösung (Formaldehyd-Lösung

4 % gepuffert, Donauchem GmbH, Wien, Österreich) konserviert. Danach wurden die konservierten Hautpräparate einer externen Firma zur histologischen Untersuchung geschickt.

Die Kontrolle der Wirksamkeit der Wundauflagen wurde im Bezug der Epithelisierung histologisch durch einen externen Histopathologen verblindet beurteilt. Dazu wurden standardisiert mehrere Schnitte der fixierten Präparate durchgeführt. Anschließend wurden diese durch den Histopathologen analysiert und ausgewertet. Hierbei wurde der Mittelwert aller untersuchten Areale einer Wunde für die Beurteilung der Wundheilung in % Reepithelisierung herangezogen.

3.5 Anordnung der Wundauflagen

Die 12 Wundfelder (Versuchstier III bis X) wurden in jeweils 4 Behandlungsgruppen unterteilt. Ausnahmen waren Tiere VI und X, bei denen 12 Wundfelder in 3 Behandlungsgruppen unterteilt wurden. Die Kombinationen aus primären und sekundären Wundauflagen wurden (siehe Tab.1 primäre und sekundäre Wundauflagen) randomisiert auf die Wundfelder aufgelegt. Die Randomisierung erfolgt im Microsoft® Excel 2016 (Microsoft Deutschland GmbH, München, Deutschland) mittels Zufallsgenerator.

Tab.1: Die verwendeten Wundauflagen

primäre Wundauflagen	sekundäre Wundauflagen
Zellbasierte Wundauflage „xxixxt I“	Jelonet® (smith&nephew GmbH, Hamburg, Deutschland)
Zellbasierte Wundauflage „xxixxt I“ ohne Keratinozyten	AQUACEL®EXTRA™(ConvaTec Austria GmbH, Wien, Österreich)
EpiciteHydro® (QRSKIN GmbH, Würzburg, Deutschland)	Adaptic® (Jonson & Jonson Medical, Gargrave, England)
Zellbasierte Wundauflage „xxixxt II“	Opsite®Flexifix (smith&nephew GmbH., Hamburg, Deutschland)
Placebo (Zellbasierte Wundauflage „xxixxt I“ ohne Zellen in trockener Form)	Omnifix®elastic (Paul Hartmann Ges.m.b.H., Wiener Neudorf, Österreich)

Vliwasoft® Cotton Gauze (Lohmann&Rauscher GmbH., Wien, Österreich)
--

Für die Behandlung von Versuchstieren wurden die in Tabelle 2 gezeigten Kombinationen von primären und sekundären Wundauflagen benutzt.

Tab. 2: Anordnung der Wundauflage

Tier	n	primären Wundauflagen	sekundären Wundauflagen
Tier III	3	EpiciteHydro®	Vliwasoft® Cotton Gaze
	3	EpiciteHydro®	AQUACEL®EXTRA™
	3	EpiciteHydro®	Jelonet®
	3	EpiciteHydro®	Opsite®Flexifix
Tier IV	3	„xxixxt I“	Jelonet®
	3	„xxixxt I“ ohne Keratinozyten	Jelonet®
	3	EpiciteHydro®	Jelonet®
	3	„xxixxt I“	EpiciteHydro®
Tier V	3	EpiciteHydro®	Jelonet®
	3	„xxixxt I“	EpiciteHydro®
	3	„xxixxt I“	Jelonet®
	3	„xxixxt I“ ohne Keratinozyten	Jelonet®
Tier VI	4	„xxixxt I“	Vliwasoft® Cotton Gaze
	4	„xxixxt II“	„xxixxt I“ ohne Keratinozyten
	4	Placebo	„xxixxt I“ ohne Keratinozyten
Tier VII	3	EpiciteHydro®	Adaptic®
	3	EpiciteHydro®	Omnifix®elastic
	3	„xxixxt I“	Vliwasoft® Cotton Gaze
	3	„xxixxt I“ ohne Keratinozyten	Vliwasoft® Cotton Gaze
Tier VIII	2	EpiciteHydro®	Adaptic®
	2	EpiciteHydro®	Omnifix®elastic
	4	„xxixxt I“	Vliwasoft® Cotton Gaze
	4	„xxixxt I“ ohne Keratinozyten	Vliwasoft® Cotton Gaze
Tier IX	3	EpiciteHydro®	Adaptic®
	3	„xxixxt I“	Vliwasoft® Cotton Gaze
	3	„xxixxt I“ ohne Keratinozyten	Vliwasoft® Cotton Gaze

	3	EpiciteHydro®	Omnifix®elastic
Tier X	2	EpiciteHydro®	Adaptic®
	8	EpiciteHydro®	Vliwasoft® Cotton Gaze
	2	EpiciteHydro®	Omnifix®elastic

Legende: n= Anzahl der behandelten Wundfelder

3.6 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mittels deskriptiver Statistik beschrieben, mit Microsoft® Excel 2016 (Microsoft Deutschland GmbH, München, Deutschland) gesammelt und grafisch mittels Kastengrafikdiagramme in Excel dargestellt. Die statistische Auswertung wurde mittels der Programmiersprache Python durchgeführt und als statistische Einheit wurde die Prozentzahl der Reepithelisierung der Wunde genommen. Es lag keine Normalverteilung der Daten vor. Der Gruppenvergleich wurde mittels Kruskal-Wallis-Test und einer Bonferroni Korrektur für den p-Wert ausgewertet. Als statistisch signifikant wurde für die Analyse ein Signifikantniveau von 1% ($p < 0,01$) festgelegt. Die numerischen Daten wurden durch die Mittelwerte, Standardabweichung, Minimum, Maximum und Standardfehler des Mittelwerts für die Behandlungsgruppen und pro Tier berechnet und tabellarisch dargestellt.

4 Ergebnisse

4.1 Ablauf des Tierversuchs

Auf dem Rücken von 10 Schweinen wurden insgesamt 116 Spalthautwunden, Größe 9 cm² operativ, wie im Kapitel 3.4 (Material und Methode) beschrieben, mittels Dermatom gesetzt. Die Tiere zeigten während der Behandlung keine Komplikationen oder Anzeichen von Krankheiten und die Wunden zeigten keine Eiterbildung oder Anzeichen von Infektionen. Anästhesie, Operation und postoperative Phase sind komplikationslos verlaufen.

4.2 Tiermodell

Die ersten 2 Schweine dienten der Etablierung der Wundtiefe zur Simulation oberflächiger Wundläsionen und tiefer Verbrennungswunden des Grades II. Die Erfahrung aus früheren Experimenten zeigte, dass die Haut des Schweins wesentlich dicker ist als die Haut des Menschen. Deshalb wurden drei verschiedene Wundtiefen, nämlich 0,3 mm (300µm), 0,5 mm (500 µm) und 1,2 mm (1200 µm) exploriert und makroskopisch beurteilt. Die Wundtiefe von 0,3 mm (300µm) bzw. 0,5 mm (500 µm) zeigte sich als sehr gering, bei diesen Wundtiefen läuft die Wundheilung sehr schnell ab und das erschwert eine entsprechende Beurteilung der Wundheilung. Die Wundtiefe von 1,2 mm (1200 µm) zeigte verlässlich tiefdermale Läsionen, die eine entsprechende Beurteilung der Wundheilungsprozesse ermöglichen.

4.3 Wundheilung

An 8 Schweinen wurden insgesamt 96 Spalthautwunden, Größe 9 cm² mit einer Wundtiefe von 1,2 mm (1200µm) mit verschiedener Kombinationen von primären und sekundären Wundaufgaben behandelt (insgesamt 13 verschiedene Kombinationen).

In der Ergebnisbewertung wurde die Reepithelisierung (in %) evaluiert. Dies wurde durch einen externen Histopathologen anhand mehrerer histologischen Schnitte standardisiert und verblindet durchgeführt. Die resultierende Prozentzahl spiegelt den Mittelwert aller evaluierten Bereiche einer Wunde wider. In Abbildung 8 ist die Wirksamkeit aller Kombinationen von primären und sekundären Wundaufgaben in Bezug auf die Prozente der Reepithelisierung der Wundfelder in Form der Kastengrafik dargestellt.

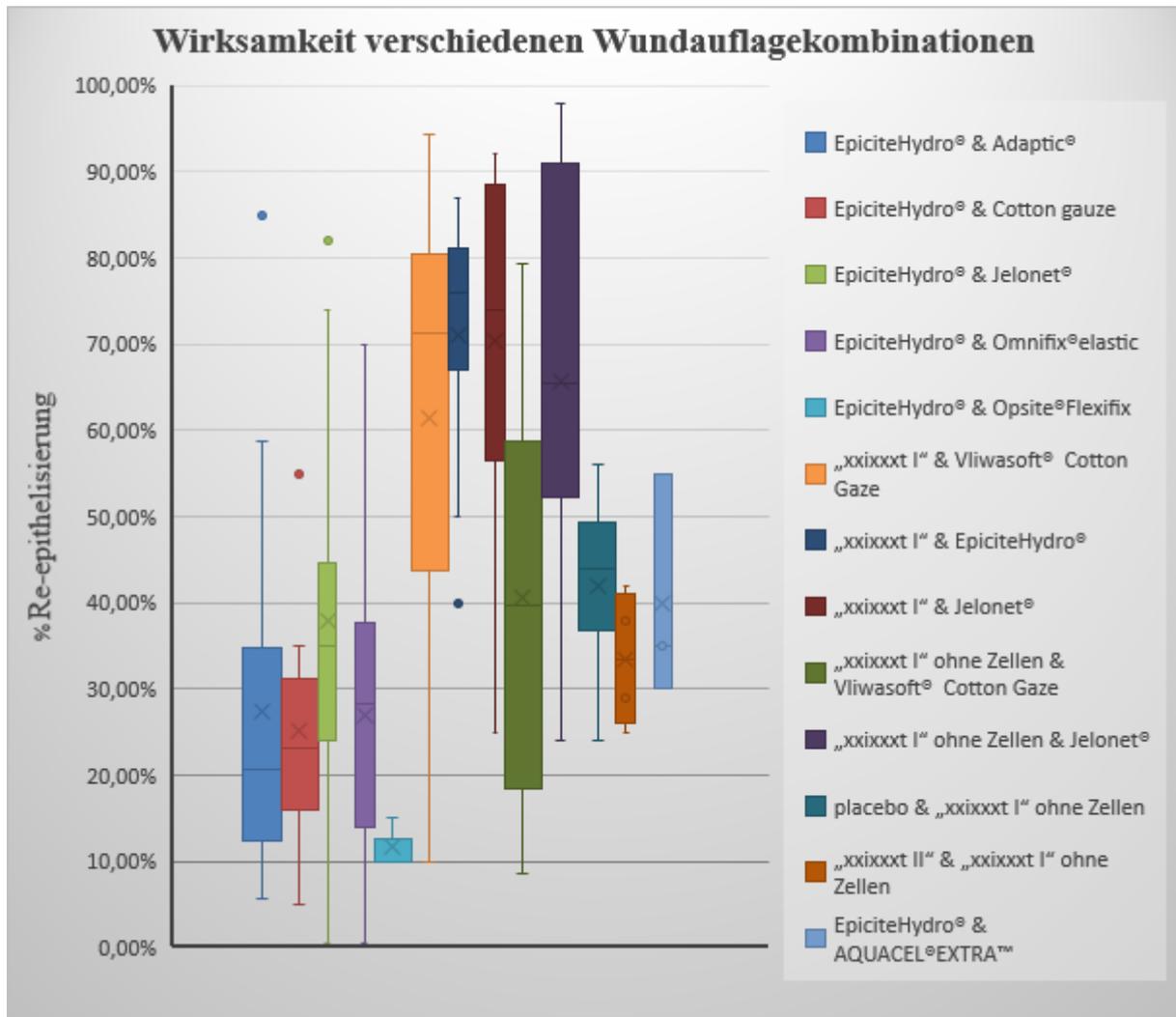


Abb. 8 Prozentsätze der Reepithelisierung von verschiedenen Wundauflagekombinationen

Es ließ sich in dem oben angeführten Boxplot die Tendenz erkennen, dass bei den Wunden, die mit Kombinationen mit zellbasierten Wundauflagen „xxixxxt I“ behandelt wurden, eine potentiell raschere Reepithelisierung stattfand, mit Ausnahme der Kombinationen mit zellbasierten Wundauflagen „xxixxxt II“. Des Weiteren fällt auf, dass die Wundauflagekombinationen „xxixxxt I“ ohne Zellen mit Standard-Wundauflagen auch einen erhöhten Reepithelisierungsgrad („xxixxxt I“ ohne Zellen & Jelonet n= 10, mit einem Mittelwert von 65,7 % ± 27,32 %) zeigten. Für die Wunden, die mittels zellbasierter Wundauflage „xxixxxt I“ & Cotton Gauze behandelt wurden (n= 12 mit einem Mittelwert von 61,30 % ± 26,69 %) konnte im Vergleich mit epicite & Omnifix, die eine Standard Kombination für die Behandlung

von Verbrennungswunden ist ($n= 12$, Mittelwert von $61,30 \% \pm 26,69 \%$), ein signifikanter Unterschied ($p= 0,01$) ermittelt werden. Dies traf auch für die Wunden zu, die mit der Wundauflegekombination epicite & Adaptic ($n= 12$, Mittelwert von $26,84 \% \pm 16,95 \%$), die auch eine Standard Kombination für die Behandlung von Wunden mit verzögerter Wundheilung ist, behandelt wurden. Im Vergleich mit der zellbasierten Wundauflegenkombination „xxixxt I“ & Cotton Gauze zeigte sich hier einen signifikanten Unterschied ($p=0,009$). Der Vergleich der restlichen Wundauflegenkombinationen ergab keine signifikanten Unterschiede. Die Werte aller Wundauflegekombinationen wurden auch tabellarisch dargestellt (Tabelle 3).

Tab. 3: Darstellung der Ergebnisse pro Wundauflegekombination

Wundauflegekombination	n	Mittelwert	SD	min	25%	50%	75%	max
epicite & Opsite	3	11,66666667	2,88675135	10	10	10	12,5	15
epicite & Cotton gauze	11	25,18272727	13,401262	5	15,87	23,13	31,07	55
epicite & Adaptic	20	25,537	19,7441832	5,67	12	18,04	33,938	85
epicite & Omnifix	20	26,849	16,9563275	0,5	14	28,28	37,658	70
„xxixxt II“ & „xxixxt I“ ohne Zellen	4	33,5	7,85281266	25	28	33,5	39	42
epicite & Jelonet	15	37,96666667	23,1689961	0,5	24	35	44,5	82
epicite & Auqacel	3	40	13,2287566	30	32,5	35	45	55
„xxixxt I“ ohne Zellen & Cotton gauze	10	40,605	25,4178901	8,57	18,39	39,645	58,753	79,33
placebo & „xxixxt I“ ohne Zellen	4	42	13,4907376	24	36,75	44	49,25	56
„xxixxt I“ & Cotton gauze	24	61,305	26,6932955	10	43,783	71,185	80,5	94,23
„xxixxt I“ ohne Zellen & Jelonet	10	65,7	27,3254054	24	52,25	65,5	91	98
„xxixxt I“ & Jelonet	11	70,45454545	21,5655449	25	56,5	74	88,5	92
„xxixxt I“ & epicite	11	71,09090909	14,6523346	40	67	76	81	87

4.4 Ergebnisse der verwendeten Wundauflagen pro Einzeltier

Die Ergebnisse der verwendeten Kombinationen von Wundauflagen ($n =$ Häufigkeit der verwendeten Kombinationen) pro Einzeltier wurden deskriptiv ausgewertet und durch Angabe des Mittelwertes \pm Standardabweichung ($\text{mean} \pm \text{SD}$) dargestellt. Bei Versuchstier III wurden 4

Wundauflagenkombinationen benutzt: epicite&Auqacel (n = 3) mit einem Mittelwert von $40 \pm 13,22$ %; epicite& Cotton Gauze (n = 3) mit einem Mittelwert von $40 \pm 13,22$ %; epicite&Jelonet (n = 3) mit einem Mittelwert von $23,33 \pm 12,58$ % und epicite&Opsite (n = 3) mit einem Mittelwert von $11,66 \pm 2,88$ % (siehe Abb 9.).

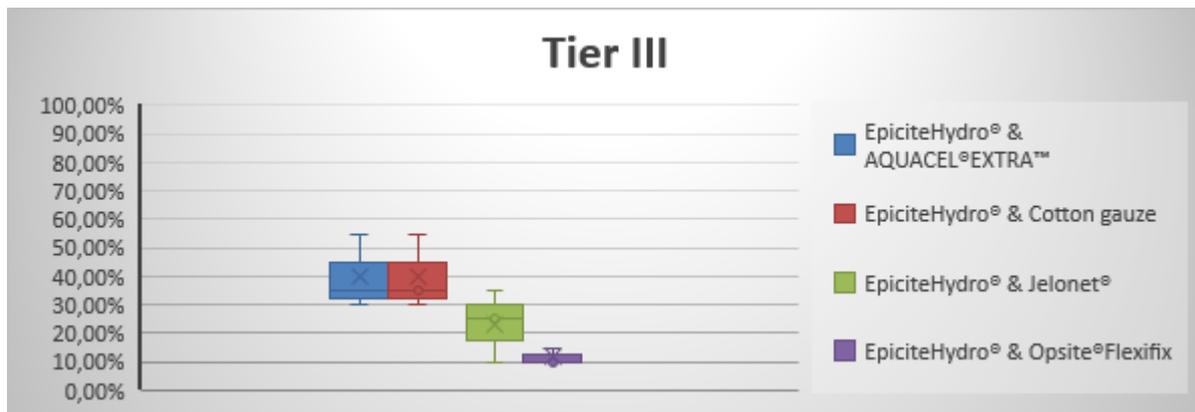


Abb. 9 Prozent der Reepithelisierung in Versuchstier III

Bei Versuchstier IV wurden 4 Wundauflagenkombinationen benutzt: epicite&Jelonet (n = 3) mit einem Mittelwert von $46 \pm 25,05$ %; „xxixxt I“&epicite (n = 3) mit einem Mittelwert von $75,66 \pm 10,40$ %; „xxixxt I“ &Jelonet n = 3 mit einem Mittelwert von $53 \pm 20,44$ % und „xxixxt I“ ohne Zellen &Jelonet n = 3 mit einem Mittelwert von $61,33 \pm 7,63$ % (siehe Abb. 10).

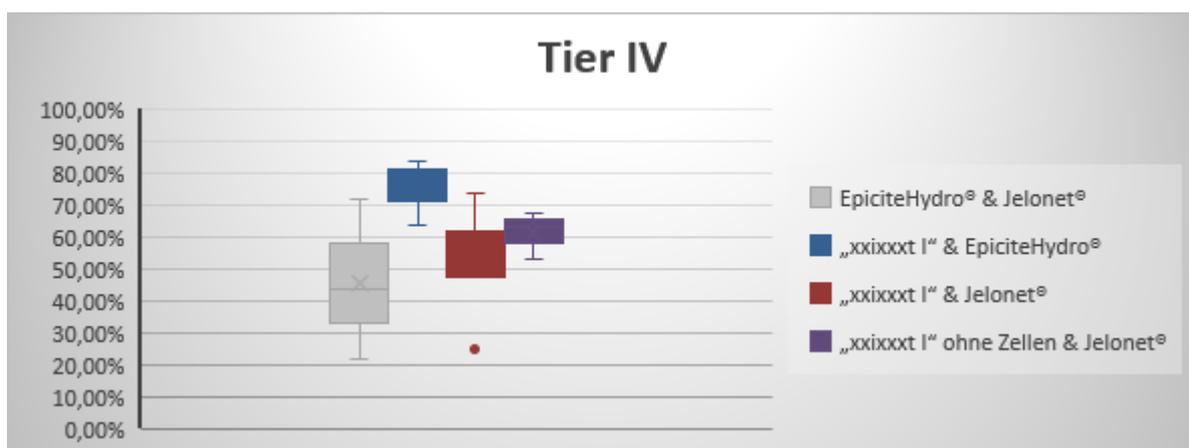


Abb. 10 Prozent der Reepithelisierung in Versuchstier IV

Bei Versuchstier V wurden die gleichen Wundauflagekombinationen wie beim Versuchstier IV benutzt: epicite&Jelonet (n = 3) mit einem Mittelwert von 40,16 % ± 25,15 %; „xxixxxt I“&epicite (n = 3) mit einem Mittelwert von 69,37 % ± 16,22 %; „xxixxxt I“ &Jelonet (n = 3) mit einem Mittelwert von 80,42 % ± 15,71 % und „xxixxxt I“ ohne Zellen &Jelonet (n = 3) mit einem Mittelwert von 67,57 % ± 32,96 % (siehe Abb. 11).

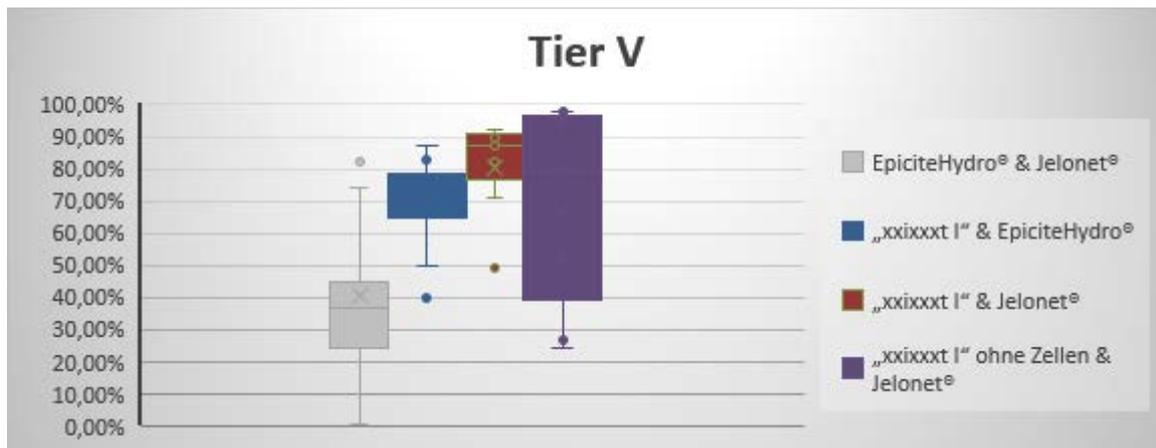


Abb. 11 Prozent der Reepithelisierung in Versuchstier V

Bei Versuchstier VI wurden 3 Wundauflagekombinationen mit folgenden Ergebnissen benutzt: „xxixxxt I“& Cotton Gauze (n = 4) mit einem Mittelwert von 63,75 % ± 21,10 %; „xxixxxt II“ & „xxixxxt I“ ohne Zellen (n = 4) mit einem Mittelwert von 33,5 % ± 7,85 % und placebo & „xxixxxt I“ ohne Zellen (n = 4) mit einem Mittelwert von 42 % ± 13,49 % (siehe Abb. 12).

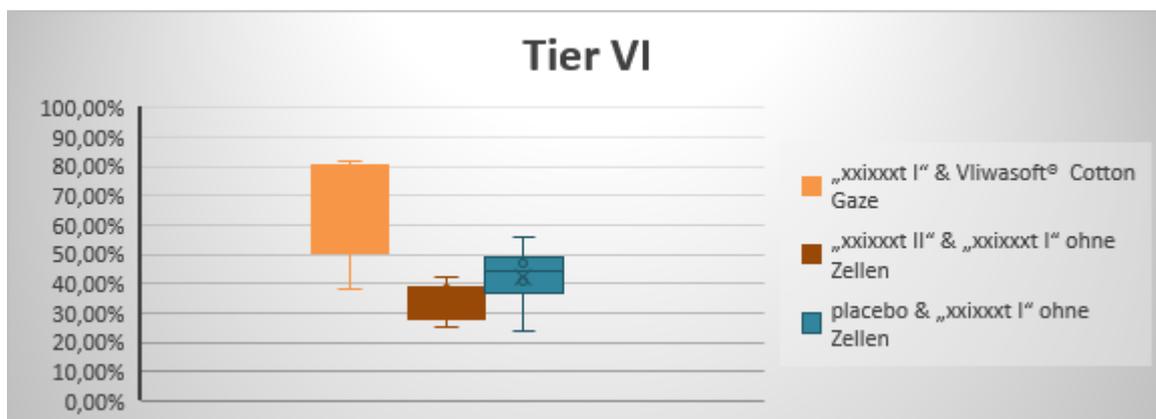


Abb. 12 Prozent der Reepithelisierung in Versuchstier VI

Bei Versuchstier VII wurden 4 Wundauflagekombinationen mit folgenden Ergebnissen benutzt: epicite&Adaptic (n = 3) mit einem Mittelwert von 25,11 % ± 21,77 %; epicite&Omnifix (n = 3) mit einem Mittelwert von 27,60 % ± 14,95 %; „xxixxt I“ & Cotton Gauze (n = 3) mit einem Mittelwert von 77,45 % ± 11,54 % und „xxixxt I“ ohne Zellen & Cotton Gauze (n = 3) mit einem Mittelwert von 72,25 % ± 8,47 % (siehe Abb. 13).

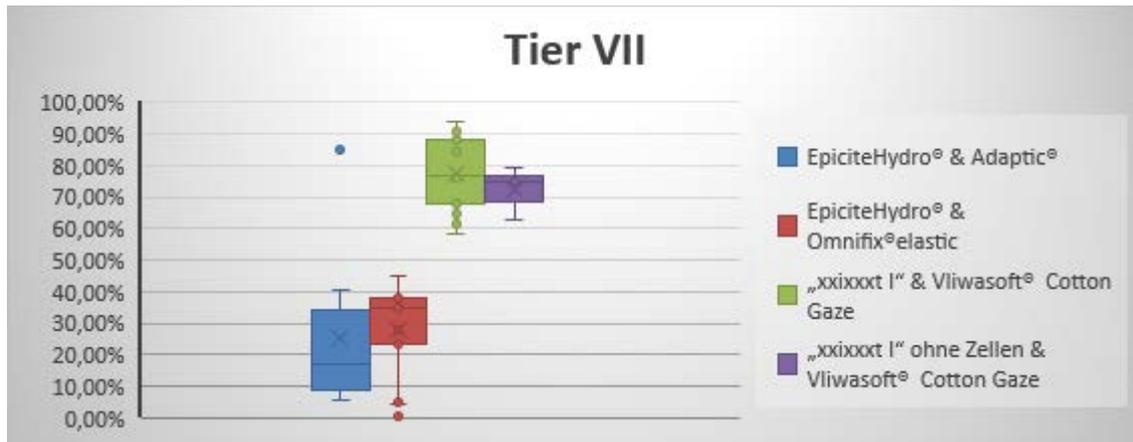


Abb.13 Prozent der Reepithelisierung in Versuchstier VIII

Bei Versuchstier VIII wurden 4 Wundauflagekombinationen wie bei Versuchstier VII mit folgenden Ergebnissen verwendet: epicite&Adaptic (n = 2) mit einem Mittelwert von 13,93 % ± 3,53 %; epicite&Omnifix (n = 2) mit einem Mittelwert von 20,36 % ± 8,58 %; „xxixxt I“ & Cotton Gauze (n = 4) mit einem Mittelwert von 15,17 % ± 4,33 % und „xxixxt I“ ohne Zellen & Cotton Gauze (n = 4) mit einem Mittelwert von 15,89 ± 5,60 (siehe Abb. 14).

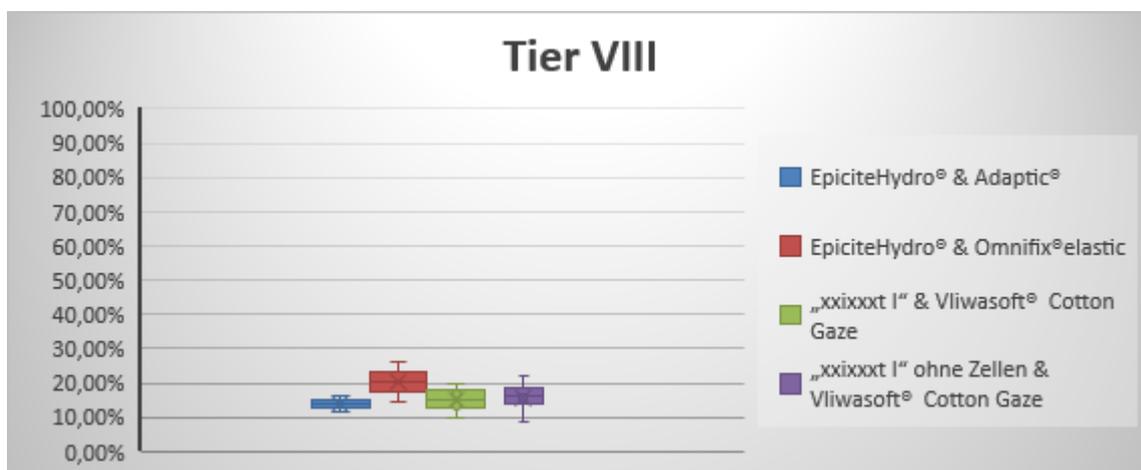


Abb. 14 Prozent der Reepithelisierung in VersuchstierVIII

Bei Versuchstier IX wurden die gleichen 4 Wundauflagekombinationen wie bei Versuchstier VII und VIII mit folgenden Ergebnissen verwendet: epicite&Adaptic (n = 3) mit einem Mittelwert von 34,58 % \pm 23,19 %; „xxixxt I“ & Cotton Gauze (n = 3) mit einem Mittelwert von 49,58 % \pm 23,01 %; „xxixxt I“ ohne Zellen & Cotton Gauze (n = 3) mit einem Mittelwert von 41,90 % \pm 7,83 % und epicite&Omnifix (n = 3) mit einem Mittelwert von 38,18 % \pm 29,03 % (siehe Abb. 15).

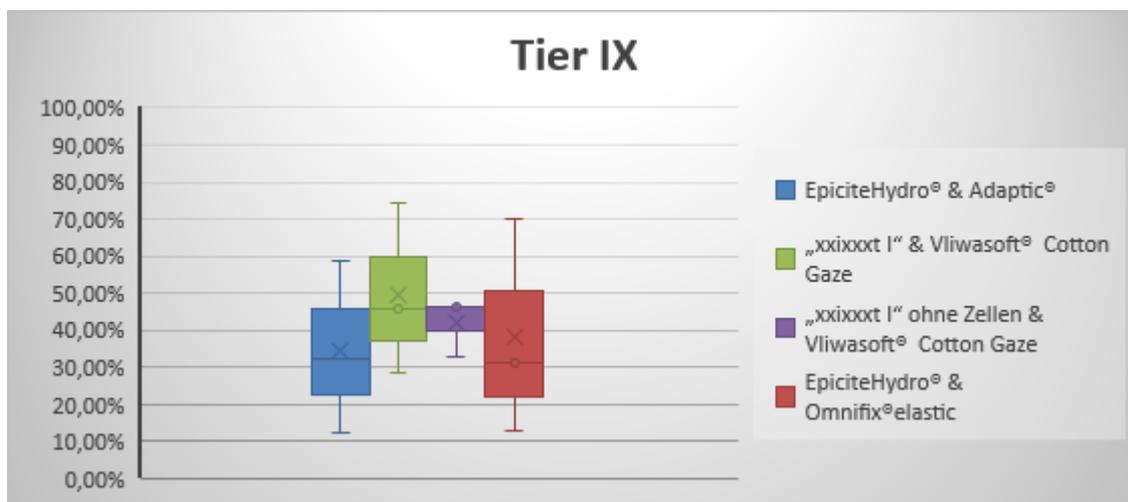


Abb. 15 Prozent der Reepithelisierung in Versuchstier IX

Bei Versuchstier X wurden 3 Wundauflagekombinationen mit folgenden Ergebnissen verwendet: epicite&Adaptic (n = 2) mit einem Mittelwert von 26,32 % \pm 10,50 %; epicite& Cotton Gauze (n = 8) mit einem Mittelwert von 19,62 % \pm 8,78 % und epicite&Omnifix (n = 2) mit einem Mittelwert von 11,42 % \pm 8,08 % (siehe Abb. 16).

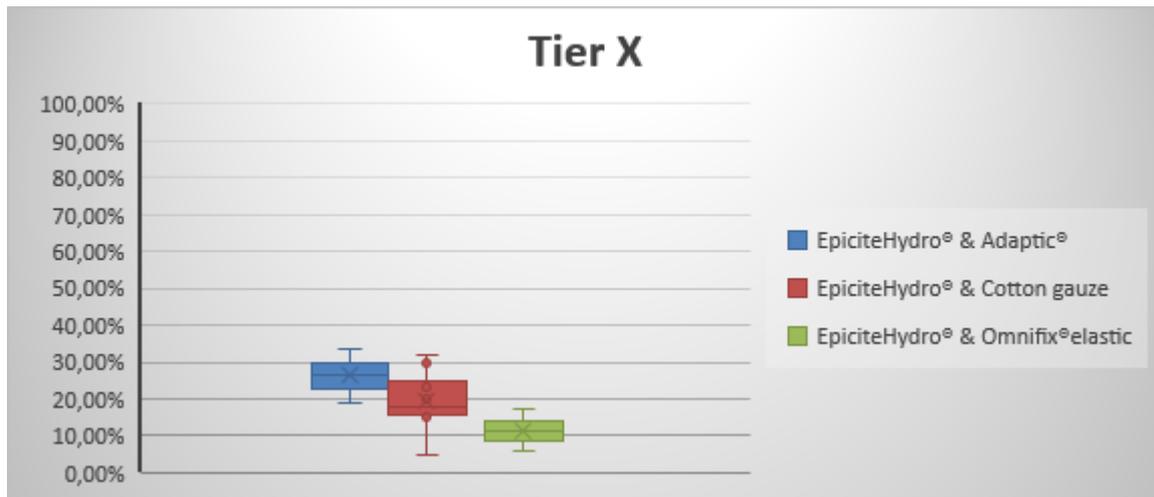


Abb. 16 Prozent der Reepithelisierung in Versuchstier X

Tab. 4: Darstellung der Ergebnisse pro Tier

Wundauflagekombinationen	Tier	n	Mittelwert	SD	min	25%	50%	75%	max
epicite & Auqacel	3	3	40	13,22875656	30	32,5	35	45	55
epicite & Cotton gauze	3	3	40	13,22875656	30	32,5	35	45	55
epicite & Jelonet	3	3	23,33333333	12,58305739	10	17,5	25	30	35
epicite & Opsite	3	3	11,66666667	2,886751346	10	10	10	12,5	15
epicite & Jelonet	4	3	46	25,05992817	22	33	44	58	72
„xxixxt I“ & Jelonet	4	3	53	20,4450483	25	47,5	56,5	62	74
„xxixxt I“ & epicite	4	3	75,66666667	10,40833	64	71,5	79	81,5	84
„xxixxt I“ ohne Zellen & Jelonet	4	3	61,33333333	7,637626158	53	58	63	65,5	68
epicite & Jelonet	5	3	40,16666667	25,15700698	0,5	24	37	45	82
„xxixxt I“ & Jelonet	5	3	80,4285714	15,71471861	49	76,5	87	91	92
„xxixxt I“ & epicite	5	3	69,375	16,22993266	40	65	74	78,5	87
„xxixxt I“ ohne Zellen & Jelonet	5	3	67,5714286	32,96896087	24	39,5	79	96,5	98
„xxixxt II“ & „xxixxt I“ ohne Zellen	6	4	33,5	7,85281266	25	28	33,5	39	42
„xxixxt I“ & Cotton gauze	6	4	63,75	21,10884491	38	50,75	67,5	80,5	82
placebo & „xxixxt I“ ohne Zellen	6	4	42	13,49073756	24	36,75	44	49,25	56
epicite & Adapatic	7	3	25,1146154	21,77416727	5,67	9,09	17,19	34,5	85
epicite & Omnifix	7	3	27,6038462	14,95879092	0,5	23,7	35	38,13	45
„xxixxt I“ & Cotton gauze	7	3	77,4507692	11,54531829	58,57	68,08	77	88	94,23
„xxixxt I“ ohne Zellen & Cotton gauze	7	3	72,2566667	8,477242083	62,86	68,72	74,58	76,955	79,33
epicite & Adapatic	8	2	13,93	3,535533906	11,43	12,68	13,93	15,18	16,43

epicite & Omnifix	8	2	20,36	8,584276324	14,29	17,325	20,36	23,395	26,43
„xxixxt I“ & Cotton gauze	8	4	15,1775	4,339680288	10	12,678	15,355	17,855	20
„xxixxt I“ ohne Zellen & Cotton gauze	8	4	15,89	5,604753935	8,57	13,925	16,425	18,39	22,14
epicite & Adapatic	9	3	34,58333333	23,1952761	12,5	22,5	32,5	45,625	58,75
epicite & Omnifix	9	3	38,1866667	29,03082213	13,13	22,28	31,43	50,715	70
„xxixxt I“ & Cotton gauze	9	3	49,58333333	23,01575402	28,75	37,23	45,71	60	74,29
„xxixxt I“ ohne Zellen & Cotton gauze	9	3	41,9066667	7,834643153	32,86	39,645	46,43	46,43	46,43
epicite & Adapatic	10	2	26,32	10,50760677	18,89	22,605	26,32	30,035	33,75
epicite & Cotton gauze	10	8	19,62625	8,785442403	5	15,473	18,055	24,848	32,14
epicite & Omnifix	10	2	11,425	8,082230509	5,71	8,5675	11,425	14,283	17,14

5 Diskussion

5.1 Das Tiermodell

Ein wichtiger Aspekt bei der Auswahl eines Tiermodells für eine Wundheilungsstudie ist, ob das Modell zur Analyse der akuten und chronischen Wundheilung die humane Haut widerspiegeln kann (Middelkoop et al. 2004). Zur Analyse der Wundheilung bei Spalt- und Vollhautwunden hat sich das Schwein als zuverlässiges Tiermodell sehr gut etabliert (Swindle und Smith 2016). Aufgrund der anatomischen, physiologischen und biochemischen Ähnlichkeit der Schweinehaut mit der menschlichen Haut und auch dadurch, dass sie vorwiegend durch Reepithelisierung heilt, wurde das Schwein als Versuchstier für diese Studie verwendet. Einige *in vitro* Modelle wurden zwar beschrieben, jedoch wurde die vorliegende Studie *in vivo* durchgeführt. Grund dafür sind fehlende Blutgefäße und Immunzellen im *In vitro*-Modell, welche jedoch im Wundheilungsprozess eine wichtige Rolle spielen.

Das Ziel dieser Studie war die Etablierung eines Tiermodells zur Analyse der Wundheilung bei oberflächlichen Läsionen, die unter rascher Reepithelisierung heilen. Diese Läsionen sind ähnlich den Verbrennungswunden des Grades II. Es gibt in der Literatur keine standardisierten Protokolle, um solche simulierten Wunden zu erzeugen. Die Unterschiede zur spontanen Wundheilung sind (in diesem Fall) sehr gering. Um zu vermeiden, dass die Anwendung von den zu untersuchenden Wundauflagen zu falsch positiven Ergebnissen führt, war es notwendig, tiefere Läsionen zu generieren, die zu verzögerter Wundheilung führen. Die Unterschiede zwischen den Wundauflagen im Bezug auf die Beschleunigung der Wundheilung konnten somit klarer aufgezeigt werden. Die Lokalisation der Wunden am Schweinerücken 3 cm von der Medianen entfernt, ermöglicht eine einfache Behandlung und Abdeckung mit den zu untersuchenden Wundauflagen. Die Schweine mit einem Gewicht zwischen 35 und 45 kg, die in dieser Studie verwendet wurden, ermöglichten eine leichtere Verteilung der Wunden und Handhabung der Tiere. Die Wunden wurden als 10 bzw. 12 quadratische Felder mit einem Abstand von 4 cm und einer Größe von 9 cm² gesetzt. Diese Wundgröße ermöglicht eine entsprechende Probengewinnung und Beurteilung der Wundheilung. Der Abstand der Wunden von 4 cm minimiert eine eventuelle Übertragung von Infektionen und ermöglicht eine bessere

Abdeckung der Wunden mit einem sicheren Abstand der Wundauflagen voneinander. Dadurch können mit einer minimalen Anzahl von Tieren viele Daten gewonnen werden.

Für die Setzung der Wunden wurde ein humanes Dermatom verwendet, welches immer vom selben Operateur mit immer dem gleich ausgeübten Druck angewandt wurde. Diese Tatsache ist von Bedeutung, da durch unterschiedlichen Druck auf das Dermatom unterschiedliche Wundtiefen gewonnen werden. Die Variationen der Wundtiefe wurden somit vermindert. Die Wundtiefe von 1,2 mm (1200 µm) zeigte sich als sicher, um tiefdermale Läsionen zu erzeugen, die zu einer verzögerten Wundheilung führten. Somit wurde eine entsprechende Beurteilung der Wundheilung ermöglicht.

Obwohl sich das Schwein als Tiermodell in der Wundheilung gut etabliert hat, verbleiben Unterschiede zwischen Mensch und Tier. Daher sollte immer eine sorgfältige Prüfung der Ergebnisse erfolgen, bevor man mit der Interpretation in Richtung Anwendung beim Menschen beginnen kann (Middelkoop et al. 2004).

Die Verwendung vom Schwein als Tiermodell war nur auf junge und gesunde Tiere, die von Natur aus keine altersbedingten Wundheilungsstörungen zeigen, begrenzt. Die Alterungseffekte spielen eine wichtige Rolle beim Menschen, da ältere Menschen häufig an systematischen Erkrankungen leiden, die einen großen Einfluss auf Wundheilungsstörungen und Wundinfektionen haben. Ein weiterer Unterschied zwischen dem Schweinmodell und dem Menschen ist der Ort der gesetzten Wunden. Der einzige Ort, wo es möglich ist, die Wunde zusetzen, ist bei Schweinen dorsal und dorsolateral am Rücken. Im Gegensatz dazu entstehen solche Wunden bei Menschen meistens an den unteren Extremitäten (Klein et al. 2018). Aufgrund dieser Tatsachen wäre eine eventuelle, weitere Optimierung des Schweinetiermodells in Richtung des Lebensalters der Tiere und der Lokalisation der Wunden notwendig.

Das Schwein als Tiermodell in der vorliegenden Studie ist mit kleiner Optimierung zuverlässig, weniger aufwändig und kann für ein besseres Verständnis der Wundheilung im Bereich tangentialer Wunden nützlich sein.

5.2 Wundheilung und untersuchte Wundauflagen

Die vorliegende Studie ist eine Pilotstudie, in welcher verschiedene Kombinationen von primären und sekundären Wundauflagen auf die Wunden eines etablierten Tiermodells randomisiert aufgebracht wurden. Das führte zu der Erkenntnis, welche Wundauflage bzw. Kombination von Wundauflagen eine Tendenz zur raschen Reepithelisierung der oberflächigen Hautläsionen zeigen. Die Ergebnisse aus dieser Pilotstudie dienen als Grundlage für weitere Tierversuche und zur Überprüfung der Wirksamkeit und Vergleichbarkeit neuer zellbasierter Wundauflagen mit Wundauflagen, welche schon Standard für die Behandlung solcher Wunden beim Menschen sind.

Im Mittelpunkt der Wundheilungsforschung steht der Einfluss von humanen allogenen Keratinozyten auf die Heilung der Spalthautwunden. Die Spalthauttransplantation ist der Goldstandard für Behandlung von großen verbrannten Hautflächen mit gut durchblutetem Wundgrund. Die beschleunigte Wundheilung von Spalthautwunden ist von großer Bedeutung in der Therapie der PatientInnen mit Schwerbrandverletzungen, wo eine mehrmalige Hautentnahme erforderlich ist. Die Therapie von Schwerbrandverletzten ist durch mehrere Schwierigkeiten eingeschränkt, wie z.B. ein hohes Infektionsrisiko oder eine prolongierte Epithelisierung von Verbrennungswunden. Eine weitere Schwierigkeit bei der Therapie von Verbrennungen ist die begrenzte Menge an Spenderhaut, da die Spalthautwunden bis zur Heilung und wiederholter Hautentnahme 2 bis 2,5 Wochen brauchen (Rivas-Tores et al. 1995).

Die Kultivierungstechnik von epidermalen Keratinozyten entspricht dem Verfahren, wie es in den 70-iger Jahren von Rheinwald und Green beschrieben wurde (Rivas-Tores et al. 1995). Die Zellen wurden 10-14 Tagen kultiviert, mit Vaseline-Gaze übertragen und sind sofort verfügbar oder bei -80°C bis zu 6 Monaten kryokonserviert (Auxenfans et al. 2013). Die humanen allogenen Keratinozyten, die auf die PatientInnen aufgebracht werden, fördern die Wundheilung, aber nach dem Wundverschluss (4 bis 6 Tagen) werden sie durch eigene epidermale Zellen der PatientInnen ersetzt (Tamariz et al. 1999). Der Wirkungsmechanismus von humanen allogenen Keratinozyten besteht in der Förderung der Generation von extrazeullärer Matrix und der Produktion von Wachstumsfaktoren. Zusätzlich fördern die Keratinozyten die Synthese von

Matrixmetalloproteinasen, Fibronectin, Laminin und Kollagen Typ V, die für die initiale Bildung des Granulationsgewebes verantwortlich sind (Rivas-Tores et al. 1995).

Die allogenen Zellen fördern eine rasche Reepithelisierung um ca. 76 % der Wundflächen mit einer normalen Pigmentierung und geringeren Häufigkeit von Erythemen in der neugebildeten Epidermis. Die Beschleunigung der Wundheilung und die Reepithelisierung wurden durch Zytokinsekretion stimuliert, die von kultivierten Keratinozyten an der Wundstelle gefördert wurde (Tamariz et al. 1999).

In dieser Studie wurden 13 Kombinationen von primären und sekundären Wundauflagen benutzt. Es wurden sowohl Kombinationen aus primären Wundauflagen (feuchte Wundauflagen: AQUACEL®EXTRA™, EpiciteHydro®, Adaptic®, Jelonet®), die bereits eine weitverbreitete Anwendung haben, verwendet, wie auch neue zellbasierte Wundauflagen, die aus einer Schicht in vitro kultivierter menschlicher Keratinozyten bestehen (Material und Methode Kapitel 3.5). Die Ergebnisse in dieser Studie zeigten ein tendenziell erhöhten Prozent der Reepithelisierung der Wunden (maximaler Wert von 94,23 %, mit Ausnahme des Tieres Nr. III: maximaler Wert 20 %), die mit der zellbasierten Wundauflage „xxixxt I“ in der Kombination mit Cotton Gaze behandelt waren. Die Wunden haben nach 5 Tagen einfeuchtes Milieu behalten und die Cotton Gaze als sekundärer Verband hat sich nicht mit der Wunde verklebt. Im Vergleich der zellbasierten Wundauflage „xxixxt I“ mit der Kombination von EpiciteHydro® und Omnifix®elastic, (maximaler Wert 70 % Reepithelisierung) und der Kombination von EpiciteHydro® und Adaptic® (maximaler Wert 85 % Reepithelisierung) ergaben sich signifikante Unterschiede. Die Studie von Rivas Tores et al. aus dem Jahr 1996 hat gezeigt, dass die Verwendung von Wundauflagen mit allogenen Zellen bei Spalthautwunden der Spenderseite im Vergleich zu einem konventionellen trockenem Verbande eine schnellere Epithelisierungsrate gezeigt hat. Solche rasche Reepithelisierung der Spalthautwunden innerhalb von 7 Tagen ermöglicht eine mehrmalige Hautentnahme von der gleichen Stelle und vermag somit eine größere Oberfläche von Verbrennungen abzudecken (Auxenfans et al. 2014). Gleichermassen haben die Wunden, die mit zellbasierten Wundauflagen „xxixxt I“ in verschiedenen Kombinationen behandelt wurden, eine Tendenz zur raschen Reepithelisierung gezeigt. Die Wundauflage „xxixxt II“ hat keine allgemeine Verbesserung der Reepithelisierung gezeigt, jedoch wurde die für die statistische Auswertung notwendige Anzahl von Wundfeldern nicht

behandelt. Die Kombinationen von „xxixxt I“ ohne Zellen haben eine potenziell bessere Zusammensetzung mit Vaseline-imprägnierter Gaze gezeigt. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie lassen noch keine eindeutigen Rückschlüsse im Bezug auf den Vergleich der Wirksamkeit von verschiedenen Wundauflegegruppen ziehen. Im weiteren Verlauf der Studie wird ein festes Behandlungsprotokoll mit gleich großen Gruppen gebildet werden, damit die Unterschiede zwischen den ausgewählten Wundauflegen aus dieser Studie im Bezug auf die Beschleunigung der Wundheilung klarer aufgezeigt werden können.

Eine weitere Optimierung wäre im Sinne der Lagerungsfähigkeit bei -80°C von großer Bedeutung. Aus diesem Grund sollte die zellbasierte Wundauflege weiterentwickelt werden, um eine Lagerfähigkeit bei $+4^{\circ}\text{C}$ zu ermöglichen.

Die Beurteilung und die Bewertung der Schmerzen, die wichtig für humane Studien sind, waren in dieser Studie nicht möglich, jedoch haben die Tiere während der gesamten postoperativen Zeit keine Anzeichen von Schmerzen gezeigt. Daher bleibt die klinische Relevanz der Schmerzunterschiede zwischen den Wundauflegen fraglich.

Die geringe Anzahl der behandelten Wunden pro Wundauflegegruppe war zum Nachweisen statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den verschiedenen Wundauflegekombinationen nicht ausreichend.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die zellbasierten Wundauflegen mit in vitro kultivierten menschlichen Keratinozyten ein Potential zur Verkürzung der Wundheilungsdauer haben und somit eine rasche Reepithelisierung von nicht infizierten, oberflächigen Spalthautwunden fördern können. Somit haben sie möglicherweise das therapeutische Potential zur Behandlung der Wunden, die nach der Spalthautentnahme entstanden sind, wobei die Zeit bis zur Wundheilung an erster Stelle steht.

6 Zusammenfassung

Die Spalthauttransplantation ist eine der häufigsten Methoden in der plastischen und rekonstruktiven Chirurgie zur Deckung von Hautdefekten, die nach Verbrennungen entstanden sind. Nach der Spalthautentnahme entsteht die zweite Wunde, bei der immer ein Risiko einer verzögerten Wundheilung besteht. Solche Wunden sind immer eine große Herausforderung für das Wundmanagement, das als Ziel eine schnelle Reepithelisierung und den Wundverschluss hat.

Die vorliegende Arbeit hatte als Ziel, einen Vergleich der Wirksamkeit von unterschiedlichen Wundauflagen auf den Wundheilungsprozess an einem geeignetem Tiermodell zu schaffen. In dieser Pilotstudie wurden bei 10 Schweinen jeweils 10 bzw. 12 Spalthautwunden mit einer für diese Studie etablierten Wundtiefe von 1,2 mm (1200 µm) am Rücken operativ gesetzt. Die ersten 2 Schweine mit insgesamt 20 Wundfeldern dienten zur Etablierung des Tiermodells. Insgesamt 96 Wunden von den restlichen 8 Schweinen wurden mit verschiedenen Kombinationen, bestehend aus neuen Wundauflagen mit in vitro kultivierten Keratinozyten und feuchten Wundauflagen, die heutzutage als Standard zum Einsatz kommen, randomisiert abgedeckt. Am Versuchsende (Tag 5) wurden die Schweine euthanasiert und die Wundfelder wurden im Bezug auf die Reepithelisierung histologisch beurteilt.

Die Wundtiefe von 1,2 mm (1200 µm) zeigte eine genügende Wundtiefe, um eine entsprechende Beurteilung der Wundheilung zu ermöglichen. Die histologische Untersuchung wurde durch einen externen Histopathologen verblindet durchgeführt. Der Mittelwert aller untersuchten Areale einer Wunde wurde für die Beurteilung der Wundheilung in % Reepithelisierung herangezogen. Die zellbasierten Wundauflagen führten zu einer tendenziell beschleunigten Reepithelisierung der Spalthautwunden, im Vergleich zu den standardisierten feuchten Wundauflagen. Diese Tendenz zu einer schnelleren Wundheilung wird im weiteren Verlauf der Studie genau überprüft und mit der Wirksamkeit standardisierter Wundauflagen, die schon auf dem Markt sind, verglichen werden.

Das vorgestellte Tiermodell kann im weiteren Verlauf der Studie zur Simulation der Spalthautwunden dienen und könnte wichtige Erkenntnisse für eine weitere Entwicklung der Wundauflagen ermöglichen. Dies muss an einer größeren Anzahl an behandelten Wunden pro Wundauflagengruppe überprüft werden. Weitere Entwicklung und Ansatz der neuen

Wundaufgaben könnten die Wundheilungszeit verkürzen und einen Fortschritt im Wundmanagement bedeuten.

7 Summary

Split-thickness skin grafting is one of the most common methods in plastic and reconstructive surgery to cover skin defects that have arisen after burns. After the split skin removal, the second wound is created, which is always at risk of a delayed wound healing. Such wounds are always a major challenge for wound management, with the goal of rapid re-epithelialization and wound closure.

The aim of the present study was to compare the efficacy of different wound dressings on the wound healing process on a suitable animal model. In this pilot study, 10 or 12 split-skin wounds with a 1.2 mm (1200 μ m) wound depth established for this study were surgically inserted in the back of the animal. The first 2 pigs with a total of 20 wound fields served for the establishment of the animal model. A total of 96 wounds from the remaining 8 pigs were randomly covered with various combinations consisting of new wound dressings with in vitro cultured keratinocytes and moist wound-dressings which are nowadays standardly used in wound healing.

At the end of the experiment (day 5), the pigs were euthanized and the wound fields were histologically assessed for re-epithelialization. The wound depth of 1.2 mm (1200 μ m) showed sufficient wound depth to enable a corresponding assessment of wound healing. Histological examination was performed blinded by an external histopathologist. The mean value of all investigated areas of a wound was used for the evaluation of wound healing in % reepithelialization.. The cell-based dressings showed a tendency to rapidly re-epithelialize the split-skin wounds compared to the standard wet dressings. This tendency for rapid wound healing will be inspected in the further course of the study and compared with the efficacy of standardized wound dressings already on the market.

The presented animal model can be used in the further course of the study to simulate split-skin wounds and could provide important insights for further development of wound dressings. Further development and approach of the new wound dressings could shorten wound healing time and lead to progress in wound management.

8 Literaturverzeichnis

- Abdullahi A, Amini-Nik S, Jeschke M.G. 2014. Animal models in burn research, *Cellular and Molecular Life Sciences*, 71(17):3241-55
- Auböck J. 2007. Biologie der Wundheilung. In: Wild T, Auböck J., Hrsg. 2007. *Manual der Wundheilung, chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung*. Wien: Springer-Verlag, 1-11.
- Auxenfans C, Shipkov H, Bach C, Catherine Z, Lacroix P, Bertin-Maghit M, Damour O, Braye F. 2014. Cultured allogenic keratinocytes for extensive burns: a retrospective study over 15 years. *Burns*, 40(1):82-88
- Avon S.L., Wood R.E., 2005. Porcine skin as an in-vivo model for ageing of human bite marks, *The Journal of Forensic Odonto-Stomatology*, 23(2):30-9
- Beldon P. 2003. Skin grafts: management of donor site wounds in the community, 8(9):S6, S8, S10
- Binnebösel M, Schumpelick V. 2010. Wunden, Wundheilung und –behandlung. In: Schumpelick V, Bleese N, Mommsen U. Hrsg. 2010. *Kurzlehrbuch Chirurgie*. 8. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag KG, 22-38
- Canedo-Dorantes L, Canedo-Ayala M. 2019. Skin Acute Wound Healing: A Comprehensive Review. *International Journal of Inflammation*, 2019:3706315.
- Childs D.R, Murthy A.S. 2017. Overview of Wound Healing and Management, *Surg. Clin. North Am.* 97(1):189-207
- Debeer S, Le Luduec J.B, Kaiserlian D, Laurent P, Nicolas J.F, Dubois B, Kanitakis J. 2013. Comparative Histology and immunohistochemistry of porcine versus human skin, *Eur J Dermatol*, 23(4):456-66
- Dehkordi A.N, Babaheydari F.M, Chehelgerdi M, Dehkordi S.R. 2019. Skin tissue engineering: wound healing based on stem-cell-based therapeutic strategies. *Stem Cell Research and Therapy*, 10(1):111.
- Eggel M, Grimm H. 2018. Necessary, but Not Sufficient. The Benefit Concept in the Project Evaluation of Animal Research in the Context of Directive 2010/63/EU. *Animals*. 8(3)
- Ellis S, Lin E.J, Tartar D. 2018. Immunology of Wound Healing. *Current Dermatology Reports*, 7(4):350-358.
- Festing S, Wilkinson R. 2007. The ethics of animal research. *EMBO reports* 8(6):526-30
- Gantwerker E.A, Hom D.B. 2011, Skin: Histology and Physiology of Wound Healing, *Facial Plast Surg Clin North Am.*, 19(3):441-53

- Gonzalez A.C, Costa T.F, Andrade Z.A, Medrado A.R. 2016. Wound healing – A literature review. *An Bras Dermatol*, 91(5):614-620.
- Jacobi U, Kaiser M, Toll R, Mangelsdorf S, Audring H, Otberg N, Sterry W, Lademann J. 2006. Porcine ear skin: an in vitro model for human skin, *Skin Research and Technology*, 13(1):19-24
- Janis J.E, Harrison B. 2014. Wound Healing: part I. Basic Science. *Plastic and Reconstructive Surgery*, 133(2):199e-207e.
- Klein P, Sojka M, Kucera J, Matonohova J, Pavlik V, Nemeč J, Kubickova G, Slakovský R, Szuszkiewicz K, Danek P, Rozkot M, Velebný V. 2018. A model of skin wound infected with a polybacterial biofilm. *Biofouling*, 34(2):226-236
- Kujath P, Michelsen A. 2008. Wounds-From Physiology to Wound Dressing, *Deutsches Ärzteblatt International*, 105(13):239-248
- Li J, Chen J, Kirsner R. 2007. Pathophysiology of acute wound healing, *Clinics in Dermatology*, 25(1):9-18
- Lindblad W.J. 2008. Considerations for selecting the correct animal model, *Journal of Biomaterials Science, Polymer Edition*, 19(8):1087-96
- Lindholm C, Searle R. 2016. Wound management for the 21st century: combining effectiveness and efficiency. *International Wound Journal*, 2:5-15.
- Masella P.C, Balent E.M, Carlson T.L, Lee K.W, Pierce L.M. 2014. Evaluation of Six Split-thickness Skin Graft Donor-site Dressing Materials in a Swine Model, *Plast Reconstr Surg Glob Open*, 1(9):e84
- Midelkoop E, Van den Bogaerd A.J, Lamme E.N, Hoekstra M.J, Brandsma K, Ulrich M.M.W. Porcine wound models for skin substitution and burn treatment, *Biomaterials*, 25(9):1559-67
- Miyanaga T, Haseda Y, Sakagami A. 2017. Minced skin grafting for promoting epithelialization of the donor site after split-thickness skin grafting, *Burns*, 43(4):819-823
- Müller W. 2000. Spalthaut- und Vollhautplastiken, *Mund Kiefer Gesichtschir.*, 4(1):314-321
- Mutschler W. 2012. Physiologie und Pathophysiologie der Heilung von Defektwunden. *Der Unfallchirurg*, 115(9):767-773.
- Olczyk P, Mencner L, Komonsinska-Vassev K. 2014. The role of the extracellular matrix components in cutaneous wound healing. *BioMed Research International*, 2014:747584.
- Pavel K, Sojka M, Kucera J, Motonohova J, Pavlik V, Nemeč J, Kubickova G, Slavkovský R, Szuszkiewicz K, Danek P, Rozkot M, Velebný V. 2018. A porcine model of skin wound infected with a polybacterial biofilm, *Biofouling*, 34(2):226-236
- Ramasastri S.S, 2005. Acute Wounds, *Clinic Plast Surg.*, 32(2):195-208

- Ratner D. 2003. Skin grafting, *Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery*, 22(4):295-305
- Reinke J.M, Sorg H. 2012. Wound Repair and Regeneration. *European Surgical Research*, 49(1):35-43.
- Rivas-Torres MT, Amato D, Arámbula-Alvarez H, Kuri-Harcuch W. 1996. Controlled clinical study of skin donor sites and deep partial-thickness burns treated with cultured epidermal allografts. *Plast Reconstr Surg*, 98(2):279-287
- Rose Ch, Rozée B. 2013. Hauttransplantation. In: Jauch K.W, Mutschler W, Hoffmann N.J, Kanz K.G., Hrsg. 2013. *Chirurgie Basisweiterbildung, In 100 Schritten durch den Common Trunk*. 2 Auflage. Springer-Verlag Heidelberg, 209-216.
- Sarkiri M, Fox S.C, Fratila-Apachitei L.E, Zadpoor A.A. 2019. Bioengineered Skin Intended for Skin Disease Modeling, *International Journal of Molecular Sciences*, 20(6):1470
- Scheithauer M, Riechelmann H. 2003, Review part II: disorders in cutaneous woundhealing, *Laryngo-Rhino-Otol*, 82(1):36-9
- Seaton M, Hocking A, Gibran N.S. 2015. Porcine Models of Cutaneous Wound Healing, *ILAR Journal*, 56 (1):127:38
- Seebauer C, Lucas C, Kindler S, Metelmann H.R. 2019. Wundmanagement-Biologie und Störung der Wundheilung. *Ophthalmologie*, 116(6):585-596.
- Swindle M.M. 2016. Wound Closure and Integument. In: Swindle M.M, Smith A.C, 2016. *Swine in the Laboratory*. Third Edition. New York: Taylor & Francis Group, 89-105.
- Tamariz E, Marsch-Moreno M, Castro-Muñozledo F, Tsutsumi V, Kuri-Harcuch W. 1999. Frozen cultured sheets of human epidermal keratinocytes enhance healing of full-thickness wounds in mice. *Cell Tissue Res.*, 296(3):575-585
- Tapking C, Popp D, Branski L.K. 1993. Pig Model to Test Tissue-Engineered Skin, *Methods in Molecular Biology*, 1993:239-249
- Thorne Ch.H. 2007. Principles, Techniques and Basic Science: Techniques and Principles in Plastic Surgery. In: Thorne Ch.H, Beasley R.W, Aston Sh.J, Bartlett S.P, Gurtner G.C, Spear S.L. Hrsg. *Grab and Smith's Plastic Surgery*. Sechste Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 3-15.
- Trainotti S, Schelthauer M. 2017. Phasen, Störungen und Förderung der Wundheilung. *HNO*, 65(9):777-788.
- Varon D.E, Smith J.D, Bharadia D.R, Shafique N, Sakthivel D, Halvorson E.G, Nuutila K, Sinha I. 2018. Use of a novel chitosan-based dressing on split-thickness skin graft donor sites: pilot study, *Journal of Wound Care*, 27(Sup 7):S12-S18
- Velnar T, Bailey T, Smrkolj V. 2009. The Wound Healing Process: an Overview of the Cellular and Molecular Mechanisms, *The Journal of International Medical Research*, 37(5):1528-42

Winter G. 1962. Formation of the scab and the rate of epithelialization of superficial wounds in the skin of young domestic pig. *Nature*, 193:293-4

Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau J.C, Wong J.K. 2016. The dynamic anatomy and patterning of skin, *Experimental Dermatology*, 25(2):92-8

Xue M, Jackson C.J. 2013. Extracellular Matrix Reorganization During Wound Healing and Its Impact on Abnormal Scarring, *Adv Wound Care*, 4(3):119-136

Young T, Fowler A. 1998. Nursing management of skin grafts and donor sites, *British Journal of Nursing*, 7(6):324-6, 328, 330

Internetquellen

Chen D, Hao H, Fu X, Han W. 2016. Insight Reepithelialization: How Do Mesenchymal Stem Cells Perform? *Stem Cells International*, 2016:6120173 <http://dx.doi.org/10.1155/2016/6120173> (Zugriff am 20.08.2019)

Hajar R, 2011. Animal testing and medicine. *Heart Views*. 12(1):42
<https://doi.org/10.1080/08927014.2018.1425684> (Zugriff am 10.07.2019)

Rousselle P, Braye F, Dayan G. 2018. Re-epithelialization of adult skin wounds: Cellular mechanisms and therapeutic strategies, *Advanced Drug Delivery Reviews*, <https://doi.org/10.1016/j.addr.2018.06.019> (Zugriff am 17.08.2019)

Abbildungs- und Tabellerverzeichnis

Tabellen

Tabelle 1: Die verwendeten Wundauflagen

Tabelle 2: Anordnung der Wundauflagen

Tabelle 3: Darstellung der Ergebnisse pro Wundauflagekombination

Tabelle 4: Darstellung der Ergebnisse pro Tier

Abbildungen

Abbildung 1: Schema der Hautschichten

Abbildung 2: Histologischer Vergleich zwischen menschlicher Haut und Schweinehaut mit ähnlichen Strukturen

Abbildung 3: Spalthaut und Vollhaut

Abbildung 4: Die klassischen Stadien der Wundheilung

Abbildung 5: Die Lage der Wundeinsetzung

Abbildung 6: Die Spalthautentnahme

Abbildung 7: Spalthautwunde

Abbildung 8: Prozent der Reepithelisierung verschiedener Wundauflagekombinationen

Abbildung 9: Prozent der Reepithelisierung bei Versuchstier III

Abbildung 10: Prozent der Reepithelisierung bei Versuchstier IV

Abbildung 11: Prozent der Reepithelisierung bei Versuchstier V

Abbildung 12: Prozent der Reepithelisierung bei Versuchstier VI

Abbildung 13: Prozent der Reepithelisierung bei Versuchstier VII

Abbildung 14: Prozent der Reepithelisierung bei Versuchstier VIII

Abbildung 15: Prozent der Reepithelisierung bei Versuchstier IX

Abbildung 16: Prozent der Reepithelisierung bei Versuchstier X

Danksagung

Vielen Dank an meinen Betreuer Univ.Prof. Dr. Wolfgang Sipos für die Betreuung und das Ermöglichen der Diplomarbeit in Zusammenarbeit mit der Medizinischen Universität Graz. Weiters danke ich Herrn Univ.Prof. Dr. Lars-Peter Kamolz für die Überlassung des Themas meiner Diplomarbeit.

Ein besonderes Dank auch an Dr.Alexandru Tuca und Dr. Iris Wiederstein-Grasser für das Engagement und Unterstützung während meiner Diplomarbeit.

Ein großes Dankeschön gilt meiner Familie, meiner Frau und meinen Kindern für die Unterstützung und das Verständnis während der gesamten Zeit, die nicht immer einfach für uns war. Abschließend ein großer Dank auch an meine Mama für die Liebe, Kraft und Hilfsbereitschaft.