

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. med. Christian Taeger
Plastische und Ästhetische Chirurgie

Untersuchung der Unterdrucktherapie mit Instillation durch Analyse der
Wundflüssigkeit

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
TERESA SOPHIE MARTINI

2024

Aus der Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg
Prof. Dr. med. Christian Taeger
Plastische und Ästhetische Chirurgie

Untersuchung der Unterdrucktherapie mit Instillation durch Analyse der
Wundflüssigkeit

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
TERESA SOPHIE MARTINI

2024

Dekan: Prof. Dr. Dirk Hellwig

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Christian Taeger

2. Berichterstatter: PD Dr. Daniel Popp

Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2024

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	6
1. Einleitung	7
<i>1.1 Physiologie der Wundheilung</i>	<i>7</i>
1.1.1 Inflammationsphase	8
1.1.2 Proliferative Phase.....	9
1.1.3 Remodellierungsphase	10
<i>1.2 Wundheilungsstörungen.....</i>	<i>11</i>
1.2.1 Prädisponierende Erkrankungen und systemische Störfaktoren	12
1.2.2 Lokale Störfaktoren.....	13
<i>1.3 Behandlung chronischer Wunden</i>	<i>15</i>
1.3.1 Unterdrucktherapie mit Instillation	17
1.3.2 Wirkweise der Unterdrucktherapie mit Instillation auf die Wundheilung.....	19
1.3.3 Anwendungsbereiche und Kontraindikationen	20
<i>1.4 Wundexsudat und Biomarker für Wundheilung</i>	<i>21</i>
1.4.1 Biomarker für Wundheilung	22
<i>1.5 Zielsetzung und Fragestellung</i>	<i>23</i>
2. Material und Methoden.....	25
2.1 Studiendesign	25
2.2 Das V.A.C. VERAFL TM Therapy-System.....	25
2.2.1 VACULTA TM Therapieeinheit.....	25
2.2.2 Spülvorrichtung und Spülflüssigkeit.....	26
2.2.3 Schwamm, Folie und T.R.A.C-Pad®	26
2.2.4 Verbandsanlage	27
2.2.5 V.A.C VERAFL TM Therapy Einstellungen und Generieren der Probe.....	28
2.3 Labormedizinische Analyse der Wundflüssigkeit.....	29
2.3.1 Zellbild	29
2.3.2 Interleukin 6, Interleukin 8 und Tumornekrosefaktor α	30

2.3.3 Vascular endothelial growth factor und basic fibroblast growth factor	31
2.3.4 pH, Kalium, Phosphat und Laktatdehydrogenase	32
2.3.5 Gesamtprotein	32
2.4 Statistische Auswertung.....	33
3. Ergebnisse	35
3.1 Patientenkollektiv und Probenzahl.....	35
3.2 Verteilung der Störfaktoren der Wundheilung	37
3.3 Messergebnisse der zellulären Parameter	38
3.4 Messergebnisse der Zytokine und Wachstumshormone	43
3.5 Messergebnisse von pH, Gesamtprotein, Kalium, Phosphat und Laktatdehydrogenase	49
3.6 Einfluss verschiedener Störfaktoren der Wundheilung auf die Messparameter	52
3.6.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit.....	52
3.6.2 Diabetes mellitus Typ II.....	54
3.6.3 Mikrobiologie.....	57
4. Diskussion	62
4.1 Diskussion der Methoden.....	63
4.2 Diskussion der Messwerte.....	66
4.2.1 Zellen.....	66
4.2.3 Zytokine und Wachstumshormone.....	68
4.2.4 Elektrolyte, Laktatdehydrogenase, Gesamtprotein, pH-Wert	71
4.3 Einfluss von DM Typ II und pAVK auf die Zusammensetzung der Wundflüssigkeit.....	75
4.4 Einfluss der mikrobiologischen Besiedelung auf die Zusammensetzung der Wundflüssigkeit	78
4.5 Fazit und Ausblick.....	81
5. Zusammenfassung.....	82
6. Tabellenverzeichnis	84
7. Abbildungsverzeichnis	85

8. Literaturverzeichnis.....	89
9. Anhang	103
<i>9.1 Gesamtverläufe weiterer Messparameter</i>	<i>103</i>
<i>9.2 Tag 0-3, weitere graphische Darstellungen.....</i>	<i>105</i>
<i>9.3 Ergebnisse des Man-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Gruppen AVK/keine AVK bzw. Diabetes/ kein Diabetes.....</i>	<i>106</i>
10. Publikationsverzeichnis	108
Danksagung.....	
Lebenslauf.....	

Abkürzungsverzeichnis

bFGF	Basic fibroblast growth factor
C. albicans	Candida albicans
CRP	C-reaktives Protein
DM Typ II	Diabetes mellitus Typ II
ECM	Extrazellulärmatrix
EGF	Epidermal growth factor
IL-1	Interleukin 1
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
KI	Konfidenzintervall
LDH	Lactatdehydrogenase
LPS	Lipopolysaccharid
MMP	Matrix-Metalloprotease
MNC	Mononukleäre Zelle
NET	Neutrophil extracellular trap
NPWT	Negativ pressure wound therapy
NPWTi	Negativ pressure wound therapy with instillation
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PDGF	platelet derived growth factor
PMN	polymorphnukleärer neutrophiler Granulozyt
RBC	Erythrozyten
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S. aureus	Staphylococcus aureus
ss-pH	skinsurface pH, Hautoberflächen pH
TGF- β	Transforming growth factor beta
TIMP	Tissue inhibitor of metalloproteinases
TNF- α	Tumornekrosefaktor alpha
V.A.C. [®]	Vacuum assisted closure
V.A.C. [®] -Instill	vacuum assisted closure with instillation
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organisation

1. Einleitung

Komplexe Wunden sind eine Herausforderung der modernen Medizin und werden auch in Zukunft, im Hinblick auf eine alternde Gesellschaft, eine immer größere Rolle spielen. Stand 2022 leiden schätzungsweise ein bis zwei Prozent der Bevölkerung der Industriestaaten an den Folgen einer chronischen Wundheilungsstörung (1). Neben den hohen Fallzahlen sind auch eine lange und pflegerisch intensive Behandlung verantwortlich dafür, dass in Deutschland jährlich zwischen fünf bis acht Milliarden Euro für die Behandlung solcher Wunden aufgewendet werden (2,3).

Um Krankheiten zu beurteilen, einzustufen und ihren Verlauf zu kontrollieren, werden seit Jahrzehnten Körperflüssigkeiten wie Blut und Urin labormedizinisch analysiert. Die Einblicke, die man über spezielle Parameter in die verschiedenen Organsysteme erhält, sind für viele Krankheiten und Pathologien die Grundlage der medizinischen Diagnostik. Dies wurde auch schon für Wunden über die Analyse der Wundflüssigkeit versucht. In dieser Arbeit wurde zum ersten Mal Wundflüssigkeit aus Wunden mit einem Unterdruckverband mit Instillation entnommen und labormedizinisch untersucht. Teile der Daten wurden bereits vorab im Rahmen von zwei Publikationen veröffentlicht, welche unter 10. Publikationsverzeichnis ausgewiesen sind. Für die Interpretation der Ergebnisse ist das Verständnis der Vorgänge bei der Wundheilung, möglicher Störfaktoren, die Wirkungsweise der Unterdrucktherapie mit Instillation, sowie die Bedeutung einzelner Faktoren des Wundexsudats für die Wundheilung notwendig. Diese Themen werden deshalb in den folgenden Abschnitten näher erläutert.

1.1 Physiologie der Wundheilung

Eine der wichtigsten Funktionen des menschlichen Körpers ist die Fähigkeit zur Regeneration. So ist das Abheilen einer akuten oder chronischen Wunde ein komplexer Vorgang mit vielen Einflussfaktoren. Generell unterscheidet man zwischen der primären und der sekundären Wundheilung. Bei der primären Wundheilung werden die Wundränder direkt adaptiert und die Wunde so verschlossen. Es entsteht in der Regel nur eine minimale Narbe. Bei der sekundären Wundheilung, oft bei größeren Defekten, ist dies nicht möglich, da die Wundränder zu weit voneinander entfernt sind. Das Gewebe muss vom Wundgrund und den Rändern nach oben proliferieren, um die Wunde zu verschließen (4). Oft kommt in diesem Fall eine aufwändige Wundtherapie, gefolgt von chirurgischen Verfahren zur Rekonstruktion der Defekte zum Einsatz.

Für Vorgänge der Wundheilung auf molekularer und zellulärer Ebene sind aber für beide Arten der Wundheilung dieselben Vorgänge beschrieben. Sie lassen sich in drei Phasen einteilen, wobei die Länge der Phasen stark von individuellen Faktoren abhängt. Auch ein Überlappen der verschiedenen Phasen ist üblich (5, S. 52.,6), wie in **Abbildung 1** dargestellt wird. Die Gerinnungs- und Entzündungsphase, ab Verletzung bis zu drei Tagen danach, wird von manchen Autoren auch, entsprechend dieser beiden Ereignisse, in zwei unterschiedliche Phasen aufgeteilt, sodass dementsprechend vier Phasen der Wundheilung durchlaufen werden (7). Die proliferative Phase beginnt bereits kurz nach der Inflammationsphase und dauert, je nach Wundgröße einige Tage bis Wochen nach der Verletzung an, während die Narbenbildung, welche in der Remodellierungsphase stattfindet, bis über ein Jahr in Anspruch nehmen kann (8).

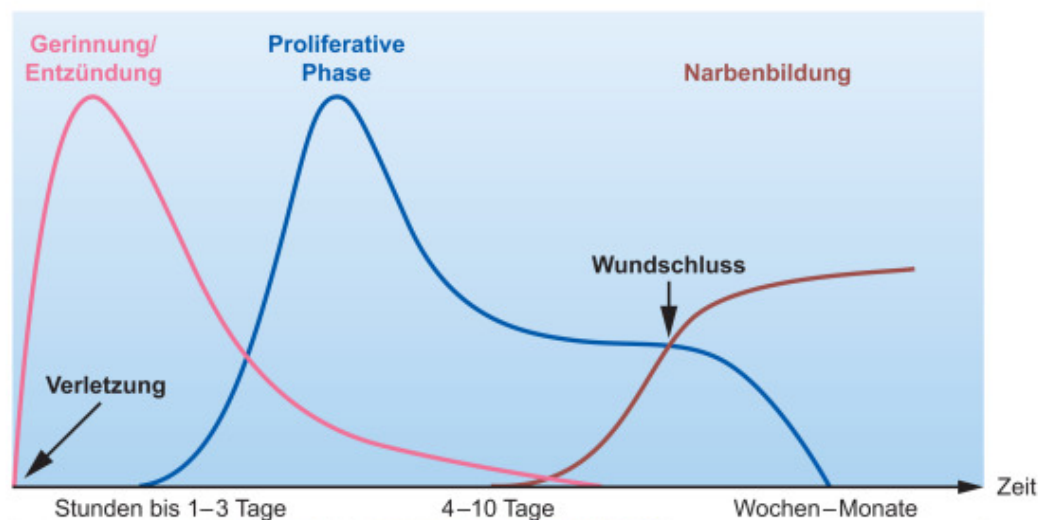


Abbildung 1: die Phasen der Wundheilung nach Dissemond et al., 2020 (5, S. 52), mit freundlicher Genehmigung des Elsevir Verlags

1.1.1 Inflammationsphase

Zunächst kommt es direkt nach der Verletzung des Gewebes zu einer Einblutung in das Wundbett. Durch eine mehrminütige lokale Vasokonstriktion sowie Aktivierung der Thrombozyten, durch die am verletzten Gewebe freiliegenden Kollagenfasern, kommt es zur Hämostase im Wundbereich und zum initialen Verschluss (6). An der Hautoberfläche entsteht durch Umbau des entstandenen Thrombus ein stabiler Wundschorf. Neben ihrer Fähigkeit zur Aggregation haben Thrombozyten auch eine chemotaktische Funktion. So sezernieren sie nach ihrer Aktivierung unter anderem platelet derived growth factor (PDGF), epidermal growth

factor (EGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) und transforming growth factor beta (TGF- β), welche Makrophagen und Fibroblasten vom Wundrand rekrutieren (7,8). Diese wandern dann in den Fibrinkoagel ein. Nach Abschluss der Hämostase beginnt die physiologische Inflammation. Anschließend an die vorausgegangene Vasokonstriktion kommt es nun zu einer Vasodilatation (5, S. 52 f). Dadurch kommt es zur gesteigerten Durchblutung der Wundumgebung, welche sich durch eine gerötete, überwärmte Haut um das Wundgebiet zeigt. Zusätzlich kommt es durch die Sezernierung von Entzündungsmediatoren wie Prostaglandinen, Histamin und Serotonin zu einer erhöhten Gefäßpermeabilität und damit zur vermehrten Einwanderung von Immunzellen in das Wundareal (9). Die ersten Abwehrzellen im Wundareal sind die Neutrophilen (10). Sie übernehmen die Wundreinigung durch Phagozytose von pathogenen Keimen und nekrotischem Gewebe bei gleichzeitiger Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und der Freisetzung von Proteasen, unter ihnen die Matrix-Metalloproteasen (MMP) 8 und 9 (11) und neutrophil extracellular traps (NETs) (11). Diese unterstützen die Bekämpfung und den Abbau von Bakterien und abgestorbenem Gewebe, können aber gleichzeitig auch schädlich für gesundes bzw. neugebildetes Gewebe werden. Sie sezernieren außerdem proinflammatorischen Tumornekrosefaktor alpha (TNF- α) und Interleukin 1 (IL-1) (6,12).

Monozyten, welche ca. 48 h nach der Hämostase in der Wunde eintreffen, differenzieren dort zu Makrophagen (11). Sie sind entscheidend für die regelhafte Wundheilung und übernehmen wichtige Aufgaben. Zum einen phagozytieren sie abgestorbene Neutrophile und eliminieren so deren toxische Abbauprodukte, zum anderen sezernieren sie selbst Proteasen und unterstützen so die Wundreinigung (9). Außerdem stimulieren sie Endothelzellen und Fibroblasten durch TNF- α , Interleukin 6 (IL6), basic fibroblast growth factor (bFGF) und weitere Zytokine zur Migration und Proliferation (12,13). Dadurch wird die Bildung von Granulationsgewebe angeregt, somit beginnt der Übergang in die proliferative Phase.

1.1.2 Proliferative Phase

Diese Phase der Wundheilung ist geprägt durch den Umbau des Thrombus in Granulationsgewebe (6). Dieses Gewebe, bestehend aus Fibroblasten, Kapillaren und einer vorläufigen Matrix, präsentiert sich makroskopisch himbeerrot und geleeartig und ist extrem empfindlich gegenüber Scherkräften, wie sie zum Beispiel beim Verbandswechsel vorkommen können (5, S. 52 f). Der Umbauprozess dauert in der Regel bis zu zwei Wochen nach der Inflammation und ist geprägt von Fibroblastenproliferation und Angiogenese. Diese beiden Vorgänge werden maßgeblich gesteuert über die von Makrophagen sezernierten Zytokine, wie

TNF- α und VEGF, die die Zellteilung und Neoangiogenese anregen (14–16). Entlang einer provisorischen Matrix aus Fibrin, Kollagen und Fibronectin wandern die Fibroblasten und Endothelzellen ins Wundgewebe ein (17). Neben TNF- α und VEGF sorgt auch die lokale Hypoxie mit einhergehendem niedrigem pH und erhöhtem Laktat in der Wunde für das vermehrte Einsprossen von Gefäßen. So wird die Versorgung des neu gebildeten Gewebes sichergestellt. Währenddessen bilden die Fibroblasten Kollagen Typ III, Glykosaminoglykane und Glykoproteine für den Umbau der provisorischen Extrazellulärmatrix (ECM) (18, S. 4). Im Verlauf der proliferativen Phase wandern auch Myofibroblasten ins Gewebe ein. Sie sind mitverantwortlich für die sogenannte Wundkontraktion. Hierbei werden die Wundränder durch Kontraktion des Gewebes einander angenähert, was den Wundverschluss begünstigt (11). Dies geschieht durch die Verbindung von Myofibroblasten untereinander und ihrer Vernetzung mit den vorhandenen Mikrofilamenten gefolgt von ihrer Kontraktion (19). Auch beginnt schon während dieser Phase die Epithelialisierung der Wunde. Durch vom Wundgrund und den Wundrändern sezernierte Faktoren wird die Einwanderung von Keratinozyten angeregt (5, S. 52 f).

1.1.3 Remodellierungsphase

In der Remodellierungsphase erfolgt ein erneuter Umbau des Gewebes, der schon parallel zu den anderen Phasen beginnt (siehe **Abbildung 1**) und über Monate andauern kann. Die Dauer ist unter anderem abhängig von Wundgröße, Lokalisation und patientenspezifischen Faktoren, wie zum Beispiel dem Alter oder Vorerkrankungen. Auch nach der vollständigen Epithelialisierung und der damit verbundenen Wiederherstellung der Barrierefunktion der Haut wird das Narbengewebe weiter verbessert. Das während der Proliferationsphase gebildete Kollagen Typ III wird hierfür in stabileres Kollagen Typ I umgebaut. Daran beteiligt sind hauptsächlich Matrix-Metalloproteinasen (MMP), sezerniert von den Zellen im Wundbett, welche das Kollagen Typ III abbauen, während die Fibroblasten Kollagen Typ I produzieren (20,21). Die Regulation der MMPs ist wichtig für die Wundheilung, da es sonst zur pathologisch erhöhten Proteolyse kommen kann. Sie erfolgt über sogenannte tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs), deren inhibitorische Aktivität auf die MMPs im Verlauf der regelhaften Wundheilung ansteigt (22). Umgekehrt kann es bei einer Überproduktion von Kollagen zur Bildung einer hypertrophen Narbe oder Keloiden kommen (12). Mit diesem Umbau ist die Wundheilung abgeschlossen und das gebildete Narbengewebe verbleibt mit einer ca. 80 %igen Stabilität im Vergleich zum Ausgangsgewebe (12). Durch den Rückgang der

gebildeten Gefäße erscheint die Narbe blass, das Gewebe ist zellarm, auch die Hautanhangsgebilde werden nicht erneut ausgebildet.

1.2 Wundheilungsstörungen

Die vorangegangenen Ausführungen machen deutlich, wie komplex der Wundheilungsprozess ist. Ein abgestimmtes Zusammenspiel von Zytokinen, Immunzellen, extrazellulärer Matrix und lokalen Zellen wie Keratinozyten, Fibroblasten, Endothel- und Nervenzellen ist für eine regelhafte Heilung unerlässlich (6). Funktioniert dieses Zusammenspiel, durchläuft die Wunde direkt nach ihrer Entstehung die oben beschriebenen Phasen und heilt ab (23). Man bezeichnet eine solche Wunde auch als „akute Wunde“. Auch wenn es keine einheitliche Definition für akute Wunden gibt, wird diese Bezeichnung in der Regel für Wunden verwendet, die für einen Zeitraum von 4 bis maximal 6 Wochen bestehen (24). Besteht die Wunde über längeren Zeitraum trotz adäquater Therapie hinaus, oder kehrt zurück, spricht man von einer chronischen Wunde (25). Eine einheitliche Definition für den Terminus „chronische Wunde“ zu finden, ist ebenso schwierig, da sich die Länge des Heilungsprozesses von Wunde zu Wunde enorm unterscheiden kann. Verschiedene Autoren geben Zeiträume zwischen vier und zwölf Wochen an, ab der eine Wunde als chronisch eingestuft wird (18, S. 6,24,26). Allerdings ist eine alleinige Einordnung anhand der Heilungszeit fraglich, da sowohl die Heilung als auch die Chronifizierung einer Wunde von vielen Faktoren, wie z. B. der Größe, abhängen.

Durch die Einwirkung verschiedener Faktoren kommt es auf molekularer Ebene zu Veränderungen im Wundmilieu und eine Verlängerung der Inflammationsphase wird begünstigt. Typisch für diese Phase sind erhöhte Konzentrationen von inflammatorischen Zellen in der Wunde, wie neutrophile Granulozyten und Makrophagen (11). Diese wiederum sezernieren ROS und Proteasen, die ein physiologisches Wunddebridement vollziehen. Hierbei entsteht ein gewisser Kollateralschaden am gesunden bzw. bereits neu gebildeten Gewebe (27). Bei der physiologischen Wundheilung endet die Inflammationsphase gewöhnlich nach wenigen Tagen und macht eine regelhafte Granulation von neuem Gewebe über dem gereinigten Wundbett möglich. In chronischen Wunden jedoch konnte eine Persistenz der Inflammation nachgewiesen werden. Dies zeigt sich durch eine erhöhte Migration von Makrophagen und Neutrophilen ins Wundgewebe, erhöhten Konzentrationen von entzündungsfördernden Zytokinen wie IL-6 und TNF- α , ROS, Proteasen und vermehrter Ödembildung (28,29). So kommt es in chronischen Wunden oftmals zu einer prolongierten Inflammationsphase, die sich

durch einen kontinuierlichen Abbau des neuen Gewebes und wachstumsfördernden Zytokinen zeigt. Der Wundverschluss verzögert sich oder bleibt ganz aus.

Eine weitere Möglichkeit für eine verzögerte Wundheilung ist die Entstehung eines Ungleichgewichts zwischen MMPs, TIMPs und Kollagen in der Remodellierungsphase (30). Wie oben beschrieben kann eine Fehlregulation der MMPs durch TIMPs zu einer erhöhten Aktivität der MMPs und damit zur Proteolyse des neugebildeten Gewebes führen. Zusätzlich zur Zunahme der katabolen Eigenschaften der MMPs gegenüber dem neugebildeten Kollagen kommt in diesem Fall ebenfalls noch ein vermehrter Abbau von wachstumsförderlichen Zytokinen bzw. deren Rezeptorproteinen (31,32).

Chronisch venöse Ulcera, diabetische Fußulcera und Dekubitus machen zusammen mehr als 90% der chronischen Wunden aus. Sie entstehen auf dem Boden einer Abflussstörung bei chronischer Veneninsuffizienz, einer Mikrozirkulationsstörung und Polyneuropathie, verursacht durch Diabetes mellitus, oder durch lokal erhöhte mechanische Belastung (33). Obwohl sie sich in ihrem Ursprung unterscheiden, kann man bei genauerer Betrachtung dieser und auch anderer chronischen Wunden noch weitere Faktoren identifizieren, die im Zusammenspiel die Persistenz einer Wunde bewirken. Einige Autoren unterscheiden diese Faktoren in lokale und systemische Faktoren (7,34, S. 121, 35). Eine eindeutige Einordnung in diese Gruppen fällt teilweise schwer, da beispielsweise eine lokale Hypoxie des Wundgewebes durch Diabetes mellitus und eine dadurch entstandene Mikro- und Makroangiopathie bedingt sein kann. Trotzdem soll zur übersichtlicheren Auflistung der verschiedenen Faktoren eine Unterteilung in diese Gruppen erfolgen.

1.2.1 Prädisponierende Erkrankungen und systemische Störfaktoren

Zu den bekanntesten Risikofaktoren für Wundheilungsstörungen zählen einige Vorerkrankungen und Komorbiditäten, aber auch Eigenschaften und Gewohnheiten wie beispielsweise hohes Alter, ein kachektischer oder adipöser Ernährungszustand, Stress oder der Konsum von Alkohol und Nikotin (7,34, S. 121, 36).

Die im Rahmen dieser Arbeit als besonders wichtig erachteten Vorerkrankungen in Bezug auf Wundheilungsstörungen sind Diabetes mellitus Typ II (DM Typ II) und die periphere arterielle Verschlusskrankheit (pAVK). Eine häufige Folgeerkrankung des Diabetes mellitus ist das diabetische Fußsyndrom. Zum einen kommt es beim diabetischen Fuß durch eine Makro- und Mikroangiopathie im Bereich des Fußes und des Unterschenkels zu einer verminderten Durchblutung und damit zur schlechten Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff (17,33). Zum anderen wird die Entstehung neuer Wunden durch eine Neuropathie

begünstigt. Oftmals sind die Betroffenen in ihrer sensorischen Wahrnehmung so eingeschränkt, dass sie Druckstellen oder Hitze nicht rechtzeitig wahrnehmen. Des Weiteren hat die Neuropathie negative Auswirkungen auf die Autoregulation der Gefäße, was die effiziente Gewebeversorgung weiter einschränkt und die Entstehung einer Mikroangiopathie begünstigt (17). Zudem kommt es zu einem Mangel an Neuropeptiden, welche im Normalfall die Produktion von Wachstumsfaktoren stimulieren würden (7,37). Vorhergehende Studien zeigen auch, dass sich eine hyperglykämische Stoffwechsellaage proinflammatorisch auf das Wundmikromilieu auswirkt (38–40).

Bei der peripheren arteriellen Verschlusskrankheit kommt es durch eine atherosklerotisch bedingte Intimahyperplasie zur Makroangiopathie der peripheren Gefäße, z.B. der Arteria femoralis, und somit zur Unterversorgung des Gewebes am Unterschenkel (34). Betroffene erleiden bei Bewegung oder im fortgeschrittenen Stadium bereits in Ruhe ischämische Schmerzen, die auf eine mangelnde Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff zurückzuführen ist. Die lokalen Auswirkungen einer Ischämie werden im nächsten Abschnitt beleuchtet.

Weitere wichtige Komorbiditäten, die das Risiko einer Wundheilungsstörung erhöhen, sind hämatologische Erkrankungen, sowie die Einnahme von Immunsuppressiva oder Kortikosteroiden (33,41).

1.2.2 Lokale Störfaktoren

Damit eine Wunde abheilen kann, benötigt sie eine ausreichende Versorgung mit Sauerstoff. Er ist essenziell für fast alle Vorgänge in der Wunde wie die Angiogenese, Keratinozytendifferenzierung, Migration und Fibroblastenproliferation. Bei einer Ischämie im Wundbett, wie sie bei chronischen Wunden nachgewiesen wurde, kommt es somit zur Unterversorgung und Verzögerung dieser Vorgänge (7). Oftmals steht dies im Zusammenhang mit einer Mikro- oder Makroangiopathie, wie sie bei DM Typ II oder pAVK vorkommen. Auch der Dekubitus entsteht durch eine Unterversorgung mit Sauerstoff und verminderte Perfusion durch lokal erhöhten Druck. Eine der häufigsten chronischen Wunden, das Ulcus cruris venosum, entsteht auf dem Boden einer chronischen venösen Abflussstörung. Dies verdeutlicht, dass auch der venöse Abfluss eine Einwirkung auf die Wundheilung hat. Durch eine venöse Stase in Kombination mit der Deaktivierung von Wachstumsfaktoren und der Aktivierung von Leukozyten kommt es zu einem erhöhten Gewebedruck und Ödem, was maßgeblich zur Ulcusbildung beiträgt (42,43). Nicht nur beim Ulcus cruris venosum, auch bei anderen chronischen Wunden ist die Ausbildung eines Wundödems ein lokaler Störfaktor, der die Heilung ungünstig beeinflusst. Pathophysiologisch kommt es zu Beginn der

Inflammationsphase zu einer Vasodilatation und auch zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäße, damit Entzündungszellen das Gewebe infiltrieren können (33). Normalerweise reguliert sich dieser Effekt selbst. Bei einer verstärkten Inflammation der Wunde allerdings persistiert die erhöhte Permeabilität der Gefäße und es kommt vermehrt zur Ödembildung im Wundgewebe. Durch die Druckerhöhung verschlechtert sich die Versorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Insgesamt ist also die regelhafte Perfusion und damit Versorgung des Wundgebiets nicht nur abhängig vom adäquaten Zusammenspiel des arteriellen und venösen Zu- und Abflusses und einer funktionierenden Mikrozirkulation, sondern auch von den lokalen Druckverhältnissen im Wundgebiet (44).

Auch Fremdkörper oder nekrotisches Gewebe in der Wunde wirken sich negativ auf die Wundheilung aus. Zum einen behindern sie die Wundkontraktion, zum anderen bieten sie Bakterien einen Nährboden um sich zu vermehren. Fremdkörper und auch nekrotisches Gewebe sollte deshalb beim chirurgischen Debridement sorgfältig entfernt werden um eine Verlängerung der Entzündungsphase zu vermeiden (33).

In fast jeder Wunde kommt es kurz nach Wundentstehung zur Kontamination durch Bakterien der Haut (45). Doch nicht jede Bakterienbesiedelung ist hinderlich für die Wundheilung. Erst ab einer Anzahl von 10^5 Bakterien pro mm^3 Gewebe oder dem Nachweis von β -hämolyisierenden Streptokokken ist die Wundheilung verlangsamt (46). Eine Infektion kann der Wundheilung extrem schaden und führt zur Verlängerung der inflammatorischen Phase (8,33,46), was zu den oben beschriebenen pathophysiologischen Mechanismen führt.

Des Weiteren sind Bakterien in der Lage Proteasen freizusetzen, welche durch Abbau des Gewebes Nährstoffe für den eigenen Stoffwechsel herstellen. Neben diesen Eigenschaften behindern Mikroorganismen in der Wunde zusätzlich die Wundkontraktion, sowie die regelrechte Kollageneinlagerung und Reepithelialisierung (44). In manchen Fällen bilden sie auch einen Biofilm aus, wodurch sie besonders schwer zu therapieren und schädlich für die Wundheilung sind (47). Zusammenfassend werden die beschriebenen lokalen und systemischen Störfaktoren nochmals in **Tabelle 1** dargestellt.

Tabelle 1: systemische und lokale Störfaktoren (7,33,44)

Systemische Störfaktoren	Lokale Störfaktoren
Alter	Mikrobielle Besiedelung/Wundinfektion
Vorerkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, pAVK)	Ischämie (Makro-/Mikroangiopathie, gestörte Mikrozirkulation)
Exogene Noxen (z.B. Alkohol, Nikotin)	Insuffizienter venöser Abfluss
Stress	Lokaler Druck
Ernährungszustand	Ödembildung
Medikamente (z.B. Immunsuppressiva, Kortikosteroide)	Fremdkörper/nekrotisches Gewebe

1.3 Behandlung chronischer Wunden

Die Behandlung chronischer Wunden ist eine interdisziplinäre Herausforderung. Um optimale Bedingungen für die Wundheilung zu schaffen, gilt es die oben genannten Störfaktoren, so weit möglich, zu eliminieren oder zumindest zu verringern. Besonders vor elektiven Eingriffen oder dem Beginn einer Wundtherapie sollten Risikopatienten erkannt und behandelt werden (37). Beispielsweise wird für Diabetiker die Einstellung des HbA1c-Werts auf 6,5 % bzw. 7 % empfohlen, um eine Optimierung der Wundheilung zu ermöglichen (48). Auch bei ausgeprägter pAVK kann vor der eigentlichen Wundtherapie eine Revaskularisierung durch Bypass oder interventionelle Methoden erfolgen, um die Chancen auf eine erfolgreiche Wundheilung zu erhöhen (49).

Ist der Patient in Bezug auf seine Vorerkrankungen therapeutisch optimal eingestellt, erfolgt das Wundassessment. Für dieses wurde vom Wound Bed Preparation Advisory Board das TIME-Konzept eingeführt. Es beinhaltet die Beurteilung und Behandlung der Wunde anhand der vier Faktoren Wundgewebe (tissue management), Inflammations-/Infektionsstatus (infection/inflammation), Exsudat (moisture balance) und Wundrand (Edge) (50). Diese vier Grundpfeiler stehen in enger Interaktion miteinander und müssen deshalb auch zusammen beurteilt werden. Beim Gewebemanagement geht es um die Entfernung von nekrotischem Gewebe und Wundbelägen. Die Schwere der Infektion wird an den typischen Merkmalen Schmerzen, Rötung, Schwellung und Hitze im und um den Bereich der Wunde beurteilt. Auch Foetor und Eiter fließen in die Beurteilung mit ein, genauso wie eine vermehrte Exsudation von Wundflüssigkeit. Diese ist nicht nur ein Zeichen für Entzündung, sondern beeinflusst auch das Wundmilieu und kann auf ein behandlungsbedürftiges Ödem hinweisen. Der Wundrand sollte

auf die Entzündungszeichen Rötung, Schwellung und Mazerationen untersucht werden. Häufig sind die Wundränder chronischer Wunden inaktiv, was bedeutet, dass die Proliferation der Fibroblasten stark eingeschränkt ist (50–52).

Nach der Beurteilung der Wunde und dem Treffen einer Therapieentscheidung folgt als nächster Schritt meist ein Debridement. Physiologisch ist das autolytische Debridement, bei dem es, wie unter 1.2 beschrieben, zu einer natürlichen Reinigung des Wundbetts durch Proteasen kommt. Bei chronischen Wunden ist dies aber oftmals nicht suffizient und muss deshalb mit einem zusätzlichen Debridement unterstützt werden. Meist wird ein chirurgisches Debridement durchgeführt, lässt die Schmerzsituation dies nicht zu und ist der Patient für eine Anästhesie nicht geeignet, bestehen weitere Möglichkeiten, wie beispielsweise ein biologisches Debridement mit Goldfliegenlarven oder ein enzymatisches Debridement (2,52,53, S. 53). Die Wahl der Reinigungsart sollte immer anhand der Menge des nekrotischen Gewebes, des Infektionsstatus und patientenspezifischen Faktoren ausgewählt werden. Beim chirurgischen Debridement werden nekrotisches und entzündliches Gewebe sowie Beläge entfernt, um frische Wundränder zu generieren. So soll die Wunde zum einen gereinigt und zum anderen aus ihrem chronischen in ein akutes Stadium überführt werden. Idealerweise erfolgt dann die Heilung, indem die Phasen der physiologischen Wundheilung regulär durchlaufen werden.

Des Weiteren werden nach Beendigung des Debridements intraoperativ mikrobiologische Abstriche des Wundgewebes angefertigt, um die Art und das Ausmaß der bakteriellen Besiedelung zu beurteilen. Debridement und Abstriche werden im Behandlungsverlauf regelmäßig wiederholt, um sicherzustellen, dass die Wunde frei von nekrotischem Material und Debris bleibt. Auch die Menge der Bakterien wird hierbei reduziert, was das Risiko einer Wundinfektion senkt (53, S. 53). Um die Wunde noch weiter von mikrobiologischen Erregern zu reinigen ist auch der Einsatz von topischen Antiseptika wie Povidon-Iod, Polyhexanid 0,04 % oder Octenidin dihydrochloride 0,1 % oder die Gabe von systemischen Antibiotika üblich (54,55).

Auch die Auswahl eines geeigneten Verbands ist ein wichtiger Bestandteil der Behandlung. Eine feuchte Wundumgebung fördert die Proliferation von Granulationsgewebe, gleichzeitig ist die übermäßige Produktion von Exsudat ein Problem für Wundheilung, Patient und Pflege. Es gibt eine breite Auswahl von unterschiedlichen Verbänden, mit verschiedenen Vor- und Nachteilen für unterschiedliche Wunden. Grob einteilen kann man diese in Folienverbände, textile Wundverbände wie die klassische Gaze, Hydrogele und Hydrokolloide, polymere Schwämme und Unterdruckverbände (55). Während Folienverbände die Wunde vor dem Austrocknen schützen und relativ dünn und komfortabel zu tragen sind, nehmen sie im

Gegensatz zu textilen Wundverbänden und polymeren Schwämmen sehr wenig Flüssigkeit auf. Für stark exsudative Wunden sind Gaze und Schwamm also dem Folienverband vorzuziehen. Außerdem besteht die Möglichkeit diese Verbände bei Vorliegen einer Infektion mit Antiseptika zu tränken (55).

Nach Anlage des Verbands sollte eine regelmäßige Evaluierung des Wundstatus gemäß den oben beschriebenen Kriterien erfolgen und die Therapie entsprechend angepasst werden.

1.3.1 Unterdrucktherapie mit Instillation

Eine etablierte Möglichkeit, um eine chronische Wunde zu behandeln, ist die Unterdrucktherapie, auch negative pressure wound therapy (NPWT) oder vacuum assisted closure Therapie (V.A.C[®]-Therapie), genannt. Bei diesem Verfahren wird, nach einem ausreichenden chirurgischen Debridement, ein Schwamm direkt auf das Wundbett gelegt und mit einem Folienverband luft- und wasserdicht verschlossen. Somit handelt es sich um eine Kombination aus polymerem Schwamm und Folienverband. Über ein sogenanntes „Trackpad“ wird über einen daran angebrachten Schlauch eine Verbindung zu einer Pumpe hergestellt, welche in der Lage ist, intermittierend oder kontinuierlich einen subatmosphärischen Druck zu erzeugen. Dadurch wird überschüssiges Wundexsudat und Debris in einen integrierten Abfallbehälter drainiert. Durch die Kombination aus Folienverband, Polyurethanschwamm und Unterdruck wird so eine feuchte Wundhöhle kreiert, ohne dass überschüssige Flüssigkeit pathogenen Keimen einen Nährboden zum Wachsen gibt (56, S. 123).

Bei der Unterdrucktherapie mit Instillation (NPWTi) wird durch einen zusätzlichen Kreislauf Flüssigkeit ins Wundbett geleitet. Bei dieser Form der NPWT ergeben sich dadurch zwei Therapiephasen: eine Drainagephase, in der Unterdruck herrscht und eine Instillationsphase, in der eine Spülflüssigkeit in den Verband instilliert und nach einer bestimmten Zeit wieder abgesaugt wird. In der Unterdruckphase kann zwischen intermittierendem und kontinuierlichem Sog in einem Bereich von -25mm/Hg bis -200mm/Hg gewählt werden. Eine generelle Empfehlung zur Einstellung des optimalen Drucks ist weder bei der NPWT noch bei der NPWTi vorhanden. Laut Morykwas et al. Ist ein Druck von -125mm/Hg bei der NPWT vorteilhaft für die Ausbildung von Granulationsgewebe (57). Wird dies, z.B bei starken Schmerzen, nicht toleriert, kann der Druck aber auch entsprechend angepasst werden. Eine Einstellung des Drucks sollte daher immer individuell erfolgen (57,58).

Während der Instillationsphase herrscht im Verband der atmosphärische Druck, sodass sich die eingespülte Flüssigkeit gleichmäßig über die gesamte Wundfläche verteilen kann. Es liegt noch keine Leitlinie für die Auswahl der Instillationsflüssigkeit vor, jedoch hat Kim et al. 2019

gemeinsam mit anderen Experten eine Handlungsempfehlung erstellt (59). Bei stark infizierten Wunden ist die Applikation von antiseptischen Flüssigkeiten wie Octenidin oder Polyhexanid klinische Praxis und trägt nachweislich zur Verringerung der Keimzahl bei (60,61). Eine Applikation in niedriger Konzentration ist notwendig, da sonst das neue Gewebe und das Wundgewebe zu starke Schädigung erfahren. Doch selbst bei der Instillation von Kochsalzlösung konnte die Erregerlast nachweislich gesenkt und die Wundheilung angeregt werden (62,63). Kochsalzlösung hat den Vorteil, dass sie umliegendes und neugebildetes Gewebe schont. Meist wird eine Einwirkzeit von 20 Minuten empfohlen, da so die antiseptischen Flüssigkeiten lange genug einwirken können, aber auch kürzere und längere Intervalle zwischen fünf bis 30 Minuten führen in Studien zu einem positiven Effekt auf die Wundheilung (61,64).

Um das korrekte Volumen zu instillieren, wurde bei dem in dieser Studie eingesetzten Gerät entweder das gewünscht Füllvolumen vorab definiert, oder unter Sicht die Installation manuell beendet und somit indirekt das Instillationsvolumen definiert. Generell wird die Wunde durch die Instillation gereinigt und befeuchtet. Jede Instillation entspricht so gesehen einem kleinen Verbandswechsel, der automatisiert abläuft und damit für Patient und Pflege Zeit spart und trotzdem eine intensive Wundtherapie ermöglicht.

Auch andere individuelle Einstellungen der NPWT werden noch weiter untersucht. Dabei geht es neben der Spülflüssigkeit und der Länge der verschiedenen Zyklen auch um die Auswahl geeigneter Wundauflagen (65). Hier kommen Schwämme aus unterschiedlichen Materialien zum Einsatz, am geläufigsten sind Polyurethanschwämme. Die Auswahl des passenden Schwamms erfolgt anhand des Therapieziels. Verschiedene Anbieter haben hierfür passende Wundauflagen für verschiedene Situationen entwickelt. Steht beispielsweise das Ableiten von zähflüssigem Exsudat und die Wundreinigung im Vordergrund wird bei 3M™ für NPWTi das 3M™ V.A.C. Veraflo Cleanse Choice™ Dressing empfohlen. Dieser Schwamm bietet durch seinen Aufbau und relativ große Poren hier einen Vorteil, dafür wird, im Vergleich zum herkömmlichen kleinporigen Polyurethanschwamm die Bildung von Granulationsgewebe nicht so stark gefördert (66).

Durch den Schwamm wird die instillierte Flüssigkeit gut aufgenommen und gleichmäßig verteilt, andererseits wird in der Drainagephase das überschüssige Exsudat gut abgeleitet. Außerdem wird durch die mechanischen Eigenschaften ein zu starkes Anhaften am Wundgrund verhindert, gleichzeitig aber die Bildung von neuem Granulationsgewebe angeregt (67, S. 252). Ein regelmäßiger Verbandswechsel ist somit sehr wichtig, da das neue Gewebe, vor allem bei der Verwendung eines Polyurethanschwamms, teilweise in den Schwamm hinein granuliert.

Durch die Unterdrucktherapie mit Instillation werden die wichtigen Bestandteile der Wundbehandlung, Wundreinigung, Infektionskontrolle und Exsudatmanagement abgedeckt. Lediglich die regelmäßige Beurteilung der Wundränder und des neugebildeten Gewebes bleibt schwierig, da der Verband bei gutem Infektionsstatus zwischen zwei bis fünf, maximal sieben Tagen anliegt. Hierdurch ergibt sich aber auch aus mikrobiologischer Sicht einen Vorteil (61,65). Insbesondere bei mit multiresistenten Erregern besiedelten Wunden kann durch NPWT die Gefahr der Übertragung und der pflegerische Aufwand reduziert werden. Andersherum sinkt auch das Risiko der Kontamination mit Keimen von außen (68). Als Nachteile werden im Vergleich zur NPWT, die erschwerte Handhabung des Geräts genannt, hierfür ist eine Schulung des Personals notwendig (63). Zudem wird generell diskutiert, ob durch die Okklusion das Wachstum bestimmter Keime gefördert wird (69).

1.3.2 Wirkweise der Unterdrucktherapie mit Instillation auf die Wundheilung

Bereits im Jahr 1983 wurde von P. Svedman bei ersten Versuchen im Bereich der Wundspülung eine vermehrte Bildung von Granulationsgewebe und verbesserter Durchblutung festgestellt (70). In den 1990er Jahren wurde dann zeitgleich von Morykwas und Argenta in den USA und von Fleischmann in Deutschland das Konzept der Unterdrucktherapie entwickelt (71–73). Als Kombination der beiden Ansätze ist die Unterdrucktherapie mit Instillation entstanden. Wobei zwischen den initial erforschten Wundspülungen und der heute etablierten Instillationstherapie wichtige Entwicklungen gemacht wurden, sodass diese beiden Methoden kaum mehr vergleichbar sind. Bei der Instillation kommt es im Vergleich zur Wundspülung zu längeren Kontaktzeiten der instillierten Lösung mit dem Wundbett und zur gleichmäßigeren Verteilung der instillierten Flüssigkeit.

Die Wirkung der NPTWi auf die Wundheilung ist noch nicht vollständig verstanden, trotzdem hat sie sich bei der Behandlung von chronischen und akuten Wunden etabliert. Einige Aspekte bezüglich der Wirkweise konnten in vorhergehenden Studien schon aufgeklärt werden, obwohl über die individuellen Einstellungen zur Optimierung der Wundheilung weiterhin Uneinigkeit herrscht (62,74).

Der Sog führt zum gleichmäßigen Anmodellieren des Schwamms an das Wundbett. Diese Reizung des Wundgewebes in Kombination mit den mechanischen Eigenschaften des Schwamms führt zu einer Makro- und einer Mikrodeformation (65,75,76). Mit Makrodeformation ist ein Annähern der Wundränder aneinander, ähnlich wie bei der physiologischen Wundkontraktion gemeint, dadurch wird die Wundfläche verkleinert. Bei der Mikrodeformation kommt es durch mechanische Wechselwirkung zwischen dem offenporigen

Schwamm und dem neuen Gewebe zu Scherkräften die nachweislich die Zellproliferation anregen (61). Es zeigte sich, auch im Vergleich zur NPWT, eine erhöhte Bildung von Granulationsgewebe am Schweinemodell (77). Außerdem wird durch den applizierten Sog die Bildung eines Wundödems verringert, was der Mikrozirkulation des Gewebes zugutekommt (61).

Generell ist die Wirkung von NPWT auf die Durchblutung umstritten. Sie ist Gegenstand intensiver Forschung, wobei manche Autoren der Meinung sind, dass der Blutfluss im Wundbett wird durch die Druckerniedrigung im Wundbett direkt erhöht und das Blut sozusagen angesaugt (78). Andere Studien hingegen legen nahe, dass es durch NPWT zu einer Kompression des Gewebes kommt, was die Durchblutung und somit die Versorgung mit Sauerstoff zunächst erniedrigt, gleichzeitig das Gewebe aber zur vermehrten Sekretion von Wachstumsfaktoren anregt und der positive Effekt auf die Zellproliferation so zum Tragen kommt (79,80).

Bei der Etablierung der NPWT wurde eine Reduktion der Keimbelastung durch den applizierten Sog und das verringerte Sauerstoffangebot postuliert. Inzwischen wird diese These als zu einfach angesehen (81). So konnte in vitro gezeigt werden, dass NPWT zwar die Wundoberfläche von Bakterien befreit, diese sich dafür aber im Verbandsschwamm sammeln (82). Für NPWTi konnten jedoch im Vergleich zu konventionellen NPWT mehrere in vitro Studien zeigen, dass die Instillation von antiseptischen oder isotonischen Lösungen die Keimmenge sowie Eindringtiefe der Bakterien in Wunden vermindert (81,83). Man geht davon aus, dass durch die zusätzliche Instillation von Flüssigkeit bei NPWTi die Anzahl der Bakterien im Wundbett im Vergleich zur Behandlung mit anderen Verbandarten, inklusive der herkömmlichen NPWT, verringert wird (60,84).

Außerdem wird die Wunde befeuchtet, was generell förderlich für die Wundheilung ist. Gleichzeitig wird in den Unterdruckphasen überschüssiges Wundexsudat abgesaugt. So wird ein Sekretstau, welcher zu Mazerationen am Wundrand führen kann, verhindert und Abfallprodukte abtransportiert.

1.3.3 Anwendungsbereiche und Kontraindikationen

Das Anwendungsfeld der NPWTi ist, im Vergleich zum Anwendungsfeld der NPWT, eher klein. Durch die zusätzliche Instillationsphase entfallen die Anwendungsgebiete des temporären abdominellen Verschlusses sowie die postoperative Behandlung mittels Transplantats bzw. Lappenplastik verschlossener Wunden. Sie eignet sich aber zur Anwendung bei allen chronischen Wunden, deren Lokalisation eine Anlage erlaubt. Besonders bei

infizierten Wunden ist die NPWTi der NPTW bezüglich der benötigten chirurgischen Interventionen bis zum Wundverschluss und der Reduktion von Bakterien überlegen (83,85). Obwohl NPWTi eine sehr nebenwirkungsarme Therapieform ohne systemische Wirkung ist, gibt es doch einige lokal bedingte Kontraindikationen. Beispielsweise könnte es bei malignen Tumoren im Wundgebiet zu einer Verschleppung von malignen Zellen kommen, weshalb der Einsatz von NPWTi hier kontrovers diskutiert wird (67, S. 256). Weiter sind eine Osteomyelitis, freiliegende Blutgefäße oder Nerven im Wundgebiet als Kontraindikation zu nennen, da es zur Blutung oder starken Schmerzen kommen kann (67, S. 256). Die Anwendung kann in einer palliativen Situation trotz Kontraindikationen erfolgen (67, S. 256).

1.4 Wundexsudat und Biomarker für Wundheilung

Ein suffizientes Exsudatmanagement ist einer der Grundpfeiler der Wundtherapie. Ist eine Wunde zu trocken kann sich ein Eschar bilden, bei übermäßiger Feuchtigkeit hingegen kommt es zu Mazerationen am Wundrand (52). Doch nicht nur die Quantität, auch die Zusammensetzung des Wundexsudats ist entscheidend für die Wundheilung. Das Exsudat chronischer Wunden unterscheidet sich nachweislich vom Exsudat heilender Wunden. So konnte bei der Zugabe von Exsudat chronischer Wunden zu verschiedenen Zellkulturen ein Rückgang der Zellproliferation nachgewiesen werden, bei der Zugabe von Exsudat aus akuten Wunden hingegen wurde das Gegenteil beobachtet (86,87). Passend zu der Annahme einer verlängerten Inflamationsphase bei chronischen Wunden, konnten in deren Exsudat erhöhte Werte proinflammatorischer Zytokine und proteolytisch aktiver Kinasen gemessen werden (29,88). Im Exsudat sind also wichtige Informationen zum Status der Wunde enthalten, trotzdem ist seine Untersuchung in der Praxis nach wie vor eine Herausforderung. Zum einen ist die Probenabnahme aufwändig. Eine erprobte Methode für die Untersuchung von Wundflüssigkeit ist die Folientechnik. Hierbei wird Wundflüssigkeit unter einer Verbandsfolie, meist über mehrere Tage, angesammelt und anschließend direkt abpunktiert oder aus einliegenden Wundauflagen entnommen (89–91). Jedoch gibt es keine standardisierte Vorgehensweise hierfür, beispielsweise nach welchem Zeitraum die Flüssigkeit entnommen wird. Des Weiteren fehlen Referenzwerte, um gemessene Konzentrationen potenzieller Biomarker konkret einzuordnen. Dennoch gibt es interessante Erkenntnisse, welche nahelegen, dass das Mikromillieu im Wundexsudat ein Abbild des Heilungsprozesses der Wunde ist und dass sich dieser über potenzielle Biomarker monitoren lässt.

1.4.1 Biomarker für Wundheilung

Laut world health organization (WHO) werden Biomarker als jede Substanz, Struktur oder Prozess definiert, die/der im Körper oder seinen Produkten gemessen werden und gleichzeitig den Verlauf einer Erkrankung beeinflussen oder vorhersagen kann (92). So kann beispielsweise über die Bestimmung des CRP-Werts der Verlauf einer Entzündung im Körper gemonitort werden. Es wurden bereits verschiedene Ansätze verfolgt, um die Bedeutung einzelner Zytokine, Wachstumsfaktoren, Zellen und weiterer Faktoren für die Wundheilung herauszuarbeiten und so die Wundheilung auf molekularer Ebene zu beurteilen (41).

Ein Beispiel hierfür sind die an der Wundheilung beteiligten Immunzellen. Neutrophile Granulozyten sind für die Abwehr von Erregern und Fremdkörpern verantwortlich und wandern unmittelbar nach einer Verletzung ins Wundgebiet ein (11). Im Verlauf kommt es zur Apoptose der Granulozyten und Phagozytose durch Makrophagen bzw. zur reversen Migration, also einem Wiedereintritt ins Blut (93). Somit nimmt die Zahl von Neutrophilen in der Wunde physiologischer Weise nach einigen Tagen ab (11). Gleichzeitig sezernieren Neutrophile auch Zytokine die weitere Neutrophile anlocken, ROS und MMPs, wodurch sie zur Verlängerung der Inflammationsphase und somit zu einer Verzögerung der Wundheilung führen können (94). Monozyten, welche im Gewebe zu Makrophagen ausdifferenzieren, sind für die Phagozytose von abgestorbenen Zellen und Fremdkörpern zuständig. Bei einer verminderten Anzahl von Monozyten werden Neutrophile und Debris langsamer abgebaut und es kommt so zu einer Verlängerung der Entzündungsphase (95,96). Weitere wichtige Zellen für die Wundheilung sind Fibroblasten und Endothelzellen. Diese befinden sich zwar hauptsächlich im Gewebe haben aber dennoch Einfluss auf die Zusammensetzung des Exsudats, denn Fibroblasten in chronischen Ulcera reagieren vermindert auf Wachstumshormone (97). Es wird vermutet, dass es durch die ausbleibende Reaktion über Rückkopplungsmechanismen zu erhöhten Zytokinwerten, wie IL-6 und TNF- α kommt (97). IL-6, IL-8 und TNF- α sind entzündungsfördernde Zytokine und wichtig für die Induktion und Aufrechterhaltung der Inflammationsphase. Außerdem spielt IL-6 eine Rolle bei der Angiogenese und bei der Kollagenproduktion (98). Insbesondere TNF- α ist bei der Aktivierung von Makrophagen beteiligt und wird auch durch sie gebildet (97), während IL-8 chemotaktisch auf neutrophile Granulozyten und somit ebenfalls proinflammatorisch wirkt (99). In chronischen sowie akuten Wunden konnten im Vergleich zum Serum erhöhte Konzentrationen von IL-6, TNF- α und IL-8 gemessen werden, gleichzeitig zeigte sich ein signifikanter Abfall der Konzentration von IL-6 und TNF- α in der Wundflüssigkeit chronischer Ulzera im Verlauf der Heilung (87,100).

Initial ist eine hohe Konzentration von Immunzellen und proinflammatorischen Zytokinen also wünschenswert, erhöhte Level über längere Zeit sprechen jedoch für eine prolongierte Entzündungsphase.

Ebenfalls gut untersucht ist der pH-Wert in Wunden. Er beeinflusst die Funktion von vielen Enzymen im Körper, dies gilt auch für das Wundmilieu und die dort vorkommenden Enzyme wie beispielsweise die MMPs. Der pH-Wert heilender Wunden sinkt von alkalischen Werten um 8,8 im Verlauf ab, bis bei Heilung der Wunde hautneutrale Werte von 5,5 erreicht werden (101). In chronischen Wunden konnten hingegen dauerhaft hohe pH-Werte gemessen werden, was die Zellproliferation und Differenzierung vermindert (102,103). Eine Überwachung des pH-Wertes kann daher dazu beitragen, die Wundheilung zu fördern (104).

Zur Beurteilung von Wunden konnte sich trotz intensiver Forschung im klinischen Alltag bisher kein Biomarker etablieren, sodass routinemäßig weiterhin nur die makroskopische Beurteilung der Wunde Anwendung findet.

1.5 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit war, zum ersten Mal das Gemisch aus Spülflüssigkeit und Wundexsudat aus einer Unterdrucktherapieeinheit mit Instillationsoption im täglichen Intervall zu untersuchen. Eine mit NPWTi behandelte Wunde bleibt während der Behandlung mehrere Tage verschlossen und kann nicht beurteilt werden. Durch zusätzliche Informationen zur Wunde in dieser Phase könnte in Zukunft eine Individualisierung der Wundtherapie möglich werden. Zudem könnten einzelne Marker als zusätzliche Sicherheitsfaktoren dienen, wie steigender Hämoglobingehalt bei akuter Blutung oder Marker für steigende bakterielle Besiedelung.

In vorherigen Studien ist die Bedeutung der Zusammensetzung des Wundexsudats für die Wundheilung deutlich geworden. Sie kann als Abbild der Vorgänge in der Wunde gesehen werden. Die erstmals in dieser Studie durchgeführten Analyse des Gemischs aus Spülflüssigkeit und Wundexsudat ist ein Versuch, anhand potenzieller Biomarker, die durch NPWTi verschlossenen Wunden zwischen zwei Debridements zu monitoren. Hierfür wurden im Rahmen dieser Studie im täglichen Intervall Proben von stationär mit NPWTi behandelten Patienten generiert und labortechnisch analysiert. Konkret wurden drei Fragestellungen untersucht:

- 1) Ist es möglich, im Gemisch aus Spül- und Wundflüssigkeit die Konzentration von Kalium, Phosphat, LDH, IL8, IL6, TNF- α , bFGF und VEGF zu bestimmen, den pH-Wert zu messen und die Zusammensetzung des Zellbilds zu ermitteln?
- 2) Lassen sich bei den Messungen, der oben genannten Parametern signifikante Veränderungen von Tag null auf Tag eins, von Tag null auf Tag zwei und von Tag null auf Tag drei bei einem Signifikanzniveau von $p < 0,05$, ermitteln?
- 3) Können Ursachen für diese Veränderungen identifiziert werden, indem man zwei bzw. drei Gruppen mit den Merkmalen pAVK/kein pAVK, Diabetes mellitus/kein Diabetes mellitus und bakterieller Wundbefall/Candida albicans Befall/kein Keim an den Messtagen null, eins, zwei und drei miteinander vergleicht?

2. Material und Methoden

2.1 Studiendesign

Um die oben definierten Fragen zu beantworten, wurde eine einarmige, monozentrische Beobachtungsstudie durchgeführt. Von Juni 2019 bis Mai 2020 wurden aus 31 Wunden Proben aus den Auffangkanistern der NPWTi Geräte entnommen.

Als primärer Endpunkt ist die tägliche Bestimmung von Zellzusammensetzung, Kalium, Phosphat, LDH, IL6, IL8, TNF- α , VEGF, bFGF, Gesamtprotein und pH-Wert in der Wundflüssigkeit, sowie eine zytomorphologische Beurteilung festgelegt.

Sekundäre Endpunkte sind die Korrelation zwischen der Verlaufskurve der gemessenen Parameter und den vorhandenen Vorerkrankungen pAVK oder Diabetes, beziehungsweise einem mikrobiellen Befall mit Bakterien oder Candida albicans.

Die Studie ist im Deutschen Register für klinische Studien registriert (DRKS00017669) und hat ein positives Ethikvotum am Universitätsklinikum Regensburg nach den CONSORT (CONsolidated Standarts of Reporting Trials) 2010 Richtlinien erhalten (18-1264-101).

Die schriftliche Einwilligung zur Teilnahme an der Studie wurde, nach mündlicher Aufklärung und Aushändigen von schriftlichen Informationen, von allen Patienten oder ihren gesetzlichen Vertretern, eingeholt.

2.2 Das V.A.C. VERAFLORTM Therapy-System

Alle untersuchten Proben sind aus demselben NPWTi- System (V.A.C. VERAFLORTM Therapy, KCI Medizinprodukte GmbH, Wiesbaden, Deutschland) gewonnen.

Dieses setzt sich aus den im Folgenden beschriebenen Komponenten zusammen.

2.2.1 VACULTATM Therapieeinheit

Die VACULTATM Therapieeinheit (KCI Medizinprodukte GmbH, Wiesbaden, Deutschland) ist eine Unterdrucktherapieeinheit der vierten Generation für den stationären Einsatz im Krankenhaus. Es lässt dem Benutzer die Wahl zwischen herkömmlicher V.A.C[®]-Therapie, PREVENATM Therapie, ABTHERATM Therapie und der im vorliegenden Fall verwendeten V.A.C VERAFLORTM Therapie. An das Gerät wird ein Einweg-Plastikkanister, der als Auffangbehälter für die drainierte Wundflüssigkeit dient, angebracht, dieser ist in unterschiedlichen Größen verfügbar. Verwendet wird hier der INOV.A.CTM sowie eine Variante des INOV.A.CTM Kanisters ohne Gel. Bei dem Gel handelt es sich um herkömmliches

Silicagel, welches nach Kontakt mit der Wundflüssigkeit, im Drainagekanister aufquillt und sich zusammen mit ihr zu einer geleeartigen Masse vermischt.

2.2.2 Spülvorrichtung und Spülflüssigkeit

Um die V.A.C VERAFLORTM Therapie zu verwenden wird die V.A.C. VERALINKTM Kassette (KCI Medizinprodukte GmbH, Wiesbaden, Deutschland) seitlich an die VACULTATM Therapieeinheit angebaut und dient dann als Aufhängung für die Spülflüssigkeit und gleichzeitig als Verbindung zum sog. T.R.A.C.[®]-Pad. Um eine möglichst unveränderte Zusammensetzung des Wundsekrets zu erhalten, wurden alle Wunden der Patienten über die gesamte Dauer der Behandlung mit 0,9 % NaCl (B. Braun, Ecolav[®], 500 ml bzw. 250 ml) gespült.

2.2.3 Schwamm, Folie und T.R.A.C.-Pad[®]

Direkt mit der Wunde in Kontakt stehend, ist die verwendete Wundauflage entscheidend für einige Aspekte der Wirkweise der NPWTi. Im Gegensatz zur herkömmlichen Unterdrucktherapie, bei der es eine Vielzahl an unterschiedlichen Schwämmen zur Auswahl gibt, kamen für NPWTi mit dem V.A.C VERAFLORTM Therapiesystem zum Zeitpunkt der Studie nur zwei Polyurethanschwämme in Frage; das V.A.C. VERAFLORTM Dressing sowie das V.A.C. VERAFLORTM CLEANSE CHOICE Dressing (beide KCI Medizinprodukte GmbH, Wiesbaden, Deutschland) für besonders stark verschmutzte Wunden. Beide zeichnen sich durch eine erhöhte Zugfestigkeit sowie eine verminderte Hydrophobie im Vergleich zu herkömmlichen Schwammverbänden aus Polyurethan aus.

Durch die großen Poren des Schwamms und seine weniger hydrophobe Eigenschaft ist er gut durchlässig für instillierte Flüssigkeit, die sich gleichmäßig verteilen soll und das Exsudat, welches abgeleitet wird. Zusätzlich lässt er sich besser von neu gebildetem Granulationsgewebe entfernen. Die selbstklebende Folie besteht ebenfalls aus Polyurethan, sie ist wasserdampfdurchlässig und atmungsaktiv, aber wasserdicht. Sie ist durchsichtig, dadurch lassen sich die Wundränder während der Therapie teilweise beurteilen. Das T.R.A.C.[®]-Pad ist das Verbindungsstück zwischen Wunde und Therapieeinheit. Ähnlich einem Saugnapf wird darüber die Luft aus dem Verband gesaugt und so ein Unterdruck generiert. Um Flüssigkeit zu instillieren, gibt es einen zweiten Zugang im Pad, der über ein Ventil in der Unterdruckphase geschlossen ist. Für alle Patienten wurden die von KCI vorgefertigten V.A.C. VERAFLORTM Dressing Kits, erhältlich in den Größen klein, mittel und groß, verwendet. Sie enthalten alle

Komponenten, die zum Anlegen des Verbandes notwendig sind: zwei V.A.C. VERAFL0™ Dressings, zwei Blätter V.A.C.® Advanced Drape, ein Schaummengenetikett, zwei Packungen 3M™ Cavilon™ No Sting Barrier-Film, denn durch Entfetten der Haut klebt die Folie besser, ein V.A.C. VERAT.RAC™ Pad- und Schlauchset und ein Einweglineal, mit dem die Wundgröße abgeschätzt werden kann.



Abbildung 2: V.A.C VERAFL0™ Therapy System mit T.R.A.C.® Pad, Polyurethanschwamm und Folienverband, mit freundlicher Bereitstellung durch 3M Corp. (66)

2.2.4 Verbandsanlage

Die Anlage eines Unterdruckverbandes mit Instillation findet meist im Operationssaal statt. Zunächst wird der Schwamm an die Wundgröße angepasst und ins Wundbett eingelegt (→ **Abbildung 3 a,b**). Anschließend wird die Wunde mit der selbstklebenden Folie versiegelt (→ **Abbildung 3c**). Danach wird in die Folie ein kleines Loch geschnitten und darauf das selbstklebende T.R.A.C.®-Pad mit angeschlossenem Schlauchset angebracht (→ **Abbildung 3d**). Das Schlauchset ist die Verbindung zwischen der Instillationseinheit, der Wunde und dem Drainagekanister. Wunde und Therapieeinheit ergeben dann ein geschlossenes System.

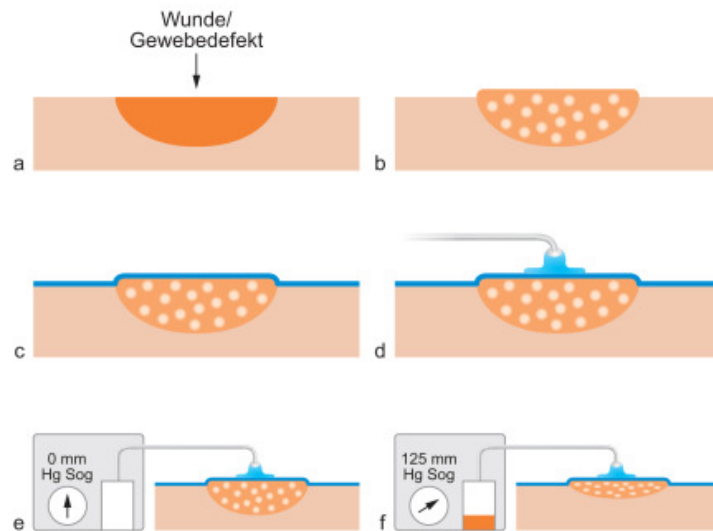


Abbildung 3: Anlage des Verbands nach Dissemond et al. (67, S. 253), mit freundlicher Genehmigung des Elsevir Verlags

2.2.5 V.A.C VERAFLTM Therapy Einstellungen und Generieren der Probe

Nach chirurgischem Debridement erfolgt bei allen Patienten die Anlage des V.A.C VERAFLTM Therapy Systems. Für alle untersuchten Wunden sind die Therapieeinstellungen wie folgt festgelegt: Auf eine 3,5-stündige Unterdruckphase bei kontinuierlichem Druck von 125mm/Hg folgt eine 20-minütige Instillationsphase mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9 % B. Braun, Ecolav[®], 500 ml bzw. 250 ml). Die Menge an instillierter Flüssigkeit ist individuell, je nach Wundgröße, festgelegt. Die Verwendung des V.A.C VERAFLTM Therapy Systems unter diesen Einstellungen entspricht der am Universitätsklinikum Regensburg gängigen Norm und orientiert sich an aktuellen Expertenmeinungen (61).

Um die Proben zu gewinnen wird jeder Patient täglich über die Dauer der gesamten V.A.C VERAFLTM Therapie während einer Unterdruckphase aufgesucht. Über die Einstellung „Befeuchten des Verbandes“ wird dann eine Instillationsphase eingeleitet. Nach Abdichten des Verbandes, Instillation und 20-minütiger Einwirkzeit wird die Probe entnommen. Für 80 Proben wird von KCI (Wiesbaden, Deutschland) INOV.A.CTM Kanister ohne Silicagel zur Verfügung gestellt, sodass die Probenentnahme nach dem „Entfernen der Flüssigkeit“ aus dem Verband direkt aus dem frisch gewechselten Kanister erfolgt. Alle anderen Proben werden ebenfalls nach 20-minütiger Einwirkzeit, allerdings noch vor Entfernen der Flüssigkeit, durch Erzeugen eines Unterdrucks mit Hilfe einer sterilen 20 ml Spritze (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg) an der Verbindungsstelle der beiden Wundflüssigkeit ableitenden Schlauchsysteme entnommen.

2.3 Labormedizinische Analyse der Wundflüssigkeit

Nach der Abnahme werden die Proben in der sterilen Spritze unmittelbar ins Zentrallabor der Universität Regensburg gebracht, um dort über die Probenannahme an die verschiedenen Routinearbeitsplätze verteilt zu werden. Dafür wird die Probenflüssigkeit zunächst gleichmäßig auf vier 9 ml Serumröhrchen (S-Monovette® Serum 9 ml, Firma Sarsted) aufgeteilt. Anschließend wurden zwei der vier Serumröhrchen bei 24 °C für zehn Minuten bei 3000 rpm zentrifugiert. Die nicht zentrifugierten Proben dienen der Bestimmung des pH-Wertes und des Zellbildes. Die zentrifugierten Proben hingegen werden zur Bestimmung von Kalium, Phosphat, LDH, IL-6 und IL-8 verwendet.

Außerdem werden fünf Aliquotes a 0,5 ml bei -80 °C für die spätere Bestimmung von VEGF, bFGF und des Gesamtproteins asserviert.

2.3.1 Zellbild

Die Beurteilung des Zellbilds erfolgt per Durchflusszytometrie mittels eines vollautomatischen XE-5000 Sysmex Analyzer (Sysmex America Inc., Mundelein, IL, USA/Sysmex Deutschland GmbH, Norderstedt, Germany). Man erhält so die Zahl der roten Blutzellen und die Zahl aller kernhaltiger Zellen insgesamt, im weiteren Verlauf alle Zellen genannt, sowie die Anzahl der verschiedenen kernhaltigen Zellgruppen. Es wird unterschieden zwischen mononukleären Zellen, welche für Monozyten bzw. Makrophagen stehen und polymorphnukleären Zellen, welche für reife neutrophile Granulozyten stehen. Der XE-5000 Sysmex Analyzer verfügt über mehrere Messkanäle, denen unterschiedliche Funktionsweisen zu Grunde liegen, je nach Einstellung durchläuft die Probe die jeweiligen Kanäle. Hier erfolgt die Messung im Body-fluid-Modus. Die für diesen Modus relevanten Kanäle sind der sogenannte RBC/PLT-Kanal zur Zählung der Erythrozyten und Thrombozyten, sowie der DIFF-Kanal in welchem die weißen Blutzellen gezählt und weiter spezifiziert werden. Im RBC/PLT-Kanal wird die Probe zunächst mit einem speziellen Reagenz in einer Konzentration 1:500 verdünnt. Anschließend wird ein fixes Volumen dieser Verdünnung in der Messkammer über ein Spannungsfeld durch eine Kapillare geschickt. Beim Durchtritt der Zellen durch die Kapillare, welcher einzeln stattfindet, kommt es hierbei bei jeder Zelle zu einer Widerstandsänderung im Stromkreislauf, die als elektrischer Impuls messbar ist. Über Anzahl und Stärke der Impulse können die Zellen so quantifiziert und ihre Größe bestimmt werden. Im zweiten Kanal, dem DIFF-Kanal, wird der Probe ein Gemisch aus Reagenzien zugeführt welches einerseits die Erythrozyten lysiert und die Zellmembran der Leukozyten durchlässig macht und andererseits einen fluoreszierenden

Farbstoff enthält, der dann in die Leukozyten eindringt. Dort färbt er vor allem Nukleinsäuren an. Anschließend erfolgt die Analyse der Probe in einer Durchflusszelle, wo die Probe mit dem monochromatischen Licht eines Halbleiterlasers bestrahlt wird. Die Messzelle misst dabei die Streustrahlung, die beim Bestrahlen der Zellen entsteht. Die Richtung der Strahlung gibt so Aufschluss über Größe oder innere Struktur und Granulation der Zellen und macht sie unterscheidbar. Hierbei wird zusätzlich die Fluoreszenz der Zellen gemessen, was Aufschluss über den Gehalt an RNA/DNA und somit über die Kernstruktur und Zellaktivität gibt. Vereint man diese Informationen ist es möglich, die Zellen zu differenzieren, die Ergebnisse der Messungen werden anschließend in einem Scattergramm angezeigt.

2.3.2 Interleukin 6, Interleukin 8 und Tumornekrosefaktor α

Die Konzentrationen von TNF- α und IL-8 wird jeweils über einen Chemilumineszenz Immunoassay (Immulate/Immulate 1000 TNF- α / Immulate/Immulate 1000 IL-8, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen) gemessen. Es handelt sich um einen Sandwich-Assay, bei dem als Quantifizierung die Messung von elektromagnetischer Strahlung, welche durch Chemilumineszenz entsteht, Anwendung findet. Hierfür werden spezielle Probenröhrchen mit einer antikörperbeschichteten Kugel als feste Phase verwendet. Zunächst erfolgt die Zugabe der Probe und des zweiten Antikörpers, welcher mit einer alkalischen Phosphatase verbunden ist, in das Röhrchen, gefolgt von einer Inkubationsphase. Im anschließenden Waschschrift wird die komplette Flüssigkeit durch Rotation aus dem Röhrchen entfernt, so verbleibt nur die Kugel, auf deren Oberfläche sich Komplexe aus TNF- α /IL-8 und den entsprechenden Antikörpern gebildet haben. Durch Zugabe einer Dioxetanphosphat-Lösung kommt es zu einer chemischen Reaktion, bei der dieses durch die am IL-8/TNF- α fixierten Phosphatasen gespalten wird. Die dabei entstehende elektromagnetische Strahlung wird mit einem Photomultiplier gemessen und die Konzentration von IL-8/ TNF- α anschließend automatisch errechnet.

Interleukin 6 wird mittels eines (ECLIA) (Elecsys IL-6, Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim) in einem Cobas e411 (Roche Diagnostics GmbH, 68305 Mannheim) gemessen. Dabei handelt es sich um einen Sandwich-Assay, bei dem zwei unterschiedliche monoklonale Antikörper das IL-6 in der Probe binden, sodass ein Komplex entsteht. Diese Antikörper sind im Fall des verwendeten ECLIAS mit Ruthenium und Biotin verbunden. Außerdem werden streptavidinbeschichtete Mikropartikel hinzugefügt, welche sich zusätzlich über eine sehr starke Bindung an das Biotin des einen Antikörpers an die gebildeten Komplexe anlagern. So bleiben diese in der Messzelle an einer Elektrode haften, während die übrigen

Probenbestandteile ausgewaschen werden. Anschließend wird eine Spannung angelegt, wodurch eine chemilumineszenz-Reaktion abläuft. Zu einem bestimmten Zeitpunkt wird die Lichtintensität mit dem integrierten Photomultiplier gemessen und die Menge an IL-6 automatisch rechnerisch bestimmt.

2.3.3 Vascular endothelial growth factor und basic fibroblast growth factor

Die Ermittlung der Konzentration von VEGF und bFGF erfolgt mittels ELISA. Dafür werden vorgefertigte Kits (Quantikine ELISA Human VEGF/ Quantikine ELISA Human FGF basic, R&D-Systems, Inc., Minneapolis, Minnesota, USA) zusammen mit den passenden Kontrollen (Human VEGF Controls, Human FGF basic controls, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA) verwendet. Die Kits bieten die Möglichkeit, durch leichte Veränderungen bei der Durchführung, zum einen Zellkulturüberstände und zum anderen Plasma- bzw. Serumproben zu untersuchen. In diesem Fall wird nach dem Protokoll für Zellkulturüberstände vorgegangen. Die verwendete ELISA-Technik beruht auf einem Sandwichprinzip, bei der ein bestimmtes Protein mittels eines spezifischen Antikörpers zunächst bindet und anschließend über eine enzymatische Farbreaktion quantitativ bestimmt wird. Hierfür wird zunächst auf eine, mit monoklonalen Antikörpern gegen VEGF bzw. bFGF beschichtete, 96 Well Mikrotiterplatte 50 µl des Testverdünnungsmittels und 200 µl der Standards, Kontrollen und Proben aufgetragen und 2 Stunden bei Raumtemperatur auf dem Schüttler inkubiert. So wird freies VEGF bzw. bFGF über den immobilisierten Antikörper an der Platte eingefangen. Nach dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (400 µl/well), welches Proteinreste eliminiert, wurde ein spezifischer polyklonaler Antikörper mit angehängtem Enzym, der Meerrettichperoxidase (HRP), (200 µl/well) auf die Platte aufgetragen. Dieser Antikörper-Enzym-Komplex bindet während der zweistündigen Inkubationszeit an das auf der Platte fixierte VEGF bzw. bFGF. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit Waschpuffer (400 µl /well), um übrige Antikörper-Enzymkomplexe zu eliminieren, werden 200 µl Tetramethylbenzidinlösung zu jedem Well hinzugefügt. Proportional zur vorhandenen Menge an Protein läuft so mit dem am VEGF bzw. bFGF fixierten Enzym eine Redox-Reaktion mit diesem Substrat ab. Diese wird, nach 30 Minuten Inkubation im Dunkeln, durch 50 µl einer weiteren, sauren Lösung gestoppt. Durch einen Farbumschlag von blau zu gelb wird das Hinzufügen dieser Stopp-Lösung sichtbar. Das Ergebnis wird mittels eines Spektrophotometers für Mikrotiterplatten (Sunrise, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) innerhalb von 30 Minuten bei einer optischen Dichte von 450 nm und Korrektur der Wellenlänge bei 540 nm beurteilt. Die Konzentrationen werden anschließend anhand der ermittelten linearen Standardkurve bestimmt.

2.3.4 PH, Kalium, Phosphat und Laktatdehydrogenase

Die Bestimmung der Ionen in der Probe erfolgt vollautomatisch über eine ionensensitive Elektrode, hierbei wird eine Elektrode mit einer ionensensitiven Membran und eine Referenzelektrode in die Probe getaucht. Über die gemessene Spannung zwischen den zwei Elektroden können dann Rückschlüsse über die Ionenaktivität, sprich die Konzentration der Ionen in der Probe, gezogen werden. Dieses Verfahren nennt man auch elektrochemische Potentiometrie und es findet Anwendung bei der Messung des pH-Werts (Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) sowie beim Kalium (Dimension Vista 1500, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen).

Phosphat und Lactat-Dehydrogenase (LDH) werden über Photometrie vollautomatisch (Dimension Vista 1500, Siemens Healthcare GmbH, Erlangen) gemessen. Um die Aktivität der LDH zu ermitteln, wird dafür L-Laktat und NAD^+ als Substrate der Probe zugegeben. Diese oxidiert LDH zu Pyruvat und NADH, welches Licht bei einer Wellenlänge von 340 nm absorbiert. Die Geschwindigkeit, mit der diese Reaktion abläuft, lässt sich photometrisch über die Höhe der Absorption bei 340 nm messen, welche für das vorhandene NADH und somit indirekt für die Laktatdehydrogenase-Aktivität steht.

Bei der Messung von Phosphat kommt eine vom Prinzip her ähnliche Methode zum Einsatz. Sie wird als modifizierte Phosphomolybdate Methode bezeichnet. Hierfür wird der Probe Molybdate (MoO_4) zugegeben, sodass sich zusammen mit dem in der Probe befindlichen Phosphat Phosphomolybdate-Komplexe ausbilden. Im sauren Milieu wird dieser Komplex nach der Zugabe von p-Methylaminophenol und Bisulfit zu einem Komplex reduziert, der bei 340 nm absorbiert. Die Absorption wird photometrisch erfasst und gibt Aufschluss über die Konzentration von Phosphat in der Lösung.

2.3.5 Gesamtprotein

Das Gesamtprotein der Proben wird unter Anwendung des BCA-Assay Protein Quantitation Kits (Interchim, Montulocedex, Frankreich) ermittelt. Bei diesem Bicinchonin-Säure-Assay binden zweiwertige Kupferionen an die Peptidbindungen der zu quantifizierenden Proteine und werden dadurch zu einwertigen Kupferionen reduziert. Diese einwertigen Kupferionen bilden mit zwei Bicinchoninsäure-Molekülen über eine Chelatbindung einen Komplex, welcher eine tief violette Farbe hat (105). Die Anzahl des Proteins ist also proportional zum gebildeten farbigen Komplex. Durch die Messung der optischen Dichte wird dann die Proteinmenge quantifiziert. Die Reaktion findet unter alkalischen Bedingungen statt. Für die Messungen wird das vorgeschlagene Standardprotokoll verwendet, alle Proben wurden

doppelt in zweifacher und zehnfacher Verdünnung gemessen. Hierfür werden zunächst die im Kit enthaltenen Reagenzien A und B in einem Verhältnis 50:1 gemischt. Die Herstellung der Standards erfolgt aus einer im Kit enthaltenen Albuminlösung mit einer Konzentration 2 mg/dl nach Anleitung. Anschließend werden auf 96-Well-Mikrotiterplatten je 0,1 ml von Standards, Kontrollen und Proben, in zweifacher und zehnfacher Verdünnung, in doppelter Ausführung aufgetragen. Dazu kommen je 2 ml des BCA-Reagenzes gefolgt von einer 30-minütigen Inkubationszeit bei 37 °C in der Wärmekammer. Nach Ablauf der Zeit erfolgt die Messung der optischen Dichte mittels Spektrophotometer (Sunrise, Tecan Trading AG, Männedorf, Schweiz) bei einer Wellenlänge von 562 nm. Die Proteinkonzentrationen in den Wells werden anhand der erstellten Standardkurve ermittelt und mit den Verdünnungsfaktoren verrechnet, um die ursprüngliche Proteinkonzentration der Proben zu erhalten.

2.4 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgt mittels SPSS, Version 25.0 (Statistical Package for the Social Sciences, SPSS Inc. Chicago, IL, USA). Es werden anhand der erhobenen Daten mit diesem Programm Graphen erstellt, die die Verläufe der Mittelwerte der unterschiedlichen Parameter veranschaulichen. Zunächst wird der Verlauf der Messparameter insgesamt über alle Tage seit der ersten Intervention betrachtet. Diese Ansicht bietet einen guten Überblick über die gemittelten Werte der Patienten. Grundsätzlich ist zu beachten, dass je größer die Amplitude des Standardfehlers, desto weiter sind die Messwerte um den, durch den Graphen abgebildeten Mittelwert gestreut.

An den Tagen null bis drei erfolgen statistische Berechnungen. Um die Wahrscheinlichkeitsverteilung der Variablen zu überprüfen, wird der Kolmogorov-Smirnov-Test durchgeführt. Keiner der Parameter zeigt eine Normalverteilung, weswegen zur weiteren Auswertung ausschließlich nicht parametrische Tests verwendet werden. Es wird der Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Test bei verbundenen Stichproben für den Vergleich der Mediane von Tag null und Tag eins, von Tag null und Tag zwei und von Tag null und Tag drei verwendet, um zu ermitteln, ob und an welchem Tag es zu einer signifikanten Veränderung der Messwerte kommt. Anschließend erfolgt eine Unterteilung der Patienten in unterschiedliche Gruppen entsprechend ihrer Vorerkrankungen. Untersucht wird mittels Mann-Whitney-U-Tests, ob an den Tagen 0, 1, 2 und 3 bei Patienten mit Diabetes mellitus und ohne Diabetes mellitus ein signifikanter Unterschied bei den gemessenen Werten auftritt. Das Gleiche wird für zwei Gruppen mit und ohne peripherer arterieller Verschlusskrankheit analysiert. Des Weiteren

werden die Proben hinsichtlich der mikrobiellen Besiedelung der Wunden unterteilt. So ergeben sich die Gruppen bakterielle Besiedelung, kein Keim und Besiedelung mit *Candida albicans*. Auch hier wird mit Hilfe des Kruskal-Wallis-Tests der Unterschied zwischen den Gruppen an allen vier Zeitpunkten getestet. Das Signifikanzniveau ist in allen Fällen auf $p < 0,05$ festgelegt. Hier erfolgt die Darstellung mittels Boxplots. Die Ausreißer in den abgebildeten Boxplots sind in allen Darstellungen in milde, dargestellt durch einen Punkt und, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand, in extreme, dargestellt durch einen Stern, unterteilt.

3. Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv und Probenzahl

Zunächst kommen 31 Patienten, die sich im Zeitraum von Juni 2019 bis Mai 2020, wegen akuter oder chronischer Wunden in stationärer Behandlung befinden und bei denen eine Indikation zur komplexen Unterdrucktherapie mit Instillation besteht, für die Teilnahme an der Studie in Frage. Ausschlusskriterien sind Allergien gegen das bei NPWTi verwendete Verbandsmaterial, kritische Ischämie im Wundareal, offene, abdominelle Wunden und Wunden, die in Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung stehen. Trotz sorgfältiger Auswahl der Patienten stellte sich bei zwei Patienten im Behandlungsverlauf ein Zusammenhang mit einer Tumorerkrankung heraus. Vier der 31 Patienten scheiden trotz Erfüllen aller Einschlusskriterien aus, da es auf Grund der sakralen Lage der Wunden wiederholt zu größeren Leckagen nach Anlage des NPWTi-Verbandes kommt.

Zwei Patienten werden mit mehreren Wunden, die, wie **Tabelle 2** zeigt, zeitlich und örtlich voneinander unabhängig sind, in die Studie eingeschlossen. So stammen die Wunden fünf, sechs, 29 und 30 vom selben Patienten, der multiple behandlungsbedürftige Druckulzera an verschiedenen Stellen des Körpers vorzuweisen hat. Bei Wunde 26 handelt es sich zunächst um eine offene Tibiafraktur, bei deren Abheilung es rund sechs Wochen nach Abschluss der primären Behandlung zur Revision kam (Wunde 31). Insgesamt werden 27 Patienten mit 31 unterschiedlichen Wunden untersucht. Der genaue Zeitraum und die Lokalisation dieser Wunden sind in **Tabelle 2** aufgeführt.

Tabelle 2: Patienten mit mehreren Wunden

Patient	Wunde	Beobachteter Zeitraum	Lokalisation
1	5	18.06.19-21.06.19	Sitzbein rechts
1	6	22.06.19-02.07.19	Ferse rechts
1	28	15.01.20-02.02.20	Unterschenkel und Fuß links
1	29	15.01.20-02.02.20	Unterschenkel rechts
2	26	05.12.19-10.12.19	prätibial links
2	31	30.01.20-09.02.20	prätibial links

Unter den eingeschlossenen 27 Patienten mit insgesamt 31 Wunden befinden sich 16 (59,3 %) männliche und 11 (40,7 %) weibliche Teilnehmer, wobei 20 (64,5 %) der Wunden auf die

männlichen Teilnehmer und 11 (35,5 %) auf die weiblichen entfallen. Das Durchschnittsalter beläuft sich auf 63 Jahre (SD 16,9).

Tabelle 3: Geschlechter-Verteilung bezogen auf Anzahl der Patienten und Wunden in Absolut- und Prozentwerten

	Patienten		Wunden	
Männlich	16	59,3 %	20	64,5 %
Weiblich	11	40,7 %	11	35,5 %
Gesamt	27	100 %	31	100 %

Bei jeder Wunde werden im Schnitt zwei (SD 0,8) NPWTi Wechsel und die Entnahme von sechs Wundflüssigkeitsproben (SD 2,8) durchgeführt, insgesamt werden 192 Proben generiert. Im Mittel vergehen zwischen einem Verbandswechsel oder dem Abschluss der Behandlung 5,4 (SD 2) Tage, wie in Tabelle 4 zusammengefasst. Von zwei Patienten kann auf Grund von mangelnder Compliance nur eine Probe genommen werden, ein Patient verstirbt vor Therapieende.

Tabelle 4: Probenanzahl und Verbandswechsel

	Probenanzahl	Tage zwischen Wechsel	Debridements
Mittelwert	6,0	5,4	1,8
Standardabweichung	2,8	2,0	0,8

Bei jedem Verbandswechsel wird die Wundgröße mit Hilfe eines sterilen Lineals abgeschätzt und in klein ($<10 \text{ cm}^3$) $n=5$, mittel ($10 - 100 \text{ cm}^3$) $n=21$ und groß ($>100 \text{ cm}^3$) $n=5$ unterteilt. Das daraus geschätzte mittlere Volumen beträgt 59 cm^3 (SD 83,6).

Bei Betrachtung der Wundgenese, dargestellt in Tabelle 5, liegt eine Unterscheidung zwischen Wunden mit chronischem und akutem Verlauf nahe. Ursachen für chronischen Wunden ($n=22$) sind posttraumatische/postinfektiöse Wundheilungsstörung ($n=11$), Ulzeration bei Dekubitus ($n=6$), Karzinom-assoziiert ($n=3$), chronische Ischämie bei pAVK ($n=2$), während akute Wunden ($n=9$) durch Trauma ($n=5$) wie z.B. offene Brüche, akute Ischämie ($n=3$) bei Thrombose/Kompartiment-Syndrom oder Verbrennung ($n=1$) entstehen.

Tabelle 5: Wundgenese

chronische Wunden		akute Wunden	
posttraumatisch/infektiös	12	traumatisch	4
Druckkulus	6	akute Ischämie	3
Karzinom-assoziiert	3	Verbrennung	1
chronische Ischämie	2		
gesamt	23	gesamt	8

Die Anzahl der Messwerte pro Tag ist in Abbildung 4 dargestellt. Hier lässt sich erkennen, dass die Probenzahl ab Tag zwei von einem Wert von 23 fast kontinuierlich absinkt und an Tag neun noch einen Wert von fünf hatte. Dieser Wert wurde mit einer Probenanzahl von sechs an Tag zehn nochmal überschritten, bleibt dann aber durchgehend auf niedrigem Niveau. An den Tagen 13 bis 18 werden nur zwei bzw. drei Proben analysiert.

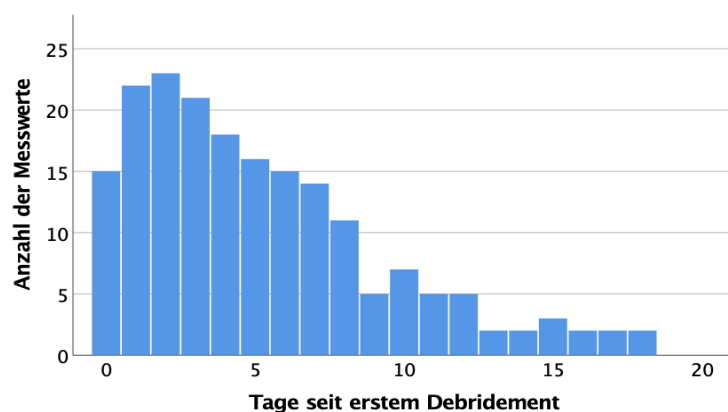


Abbildung 4: Anzahl der Messwerte pro Tag ab dem ersten Debridement

3.2 Verteilung der Störfaktoren der Wundheilung

Aus den Vorbefunden der Patienten werden elf mit einer gesicherten peripheren arteriellen Verschlusskrankheit und sechs mit Diabetes mellitus identifiziert. Vier dieser Patienten leiden an beiden Krankheiten.

Intraoperativ wird bei jeder Verbandanlage sowie bei jedem Wechsel ein mikrobiologischer Abstrich genommen, dessen Ausplattierung und Befundung durch die Abteilung für Mikrobiologie erfolgt. Dabei kann in 26 Wunden von Anfang an, oder im Verlauf der Behandlung, ein oder mehrere Keime nachgewiesen werden. In fünf Wunden wird über die gesamte Behandlungsdauer kein Keim durch den Abstrich ermittelt. In drei Wundabstrichen

wird *Candida albicans* nachgewiesen, während in den restlichen 23 Wunden Bakterien nachgewiesen werden. In sieben Wunden können zwei oder mehr Keime nachgewiesen werden. Eine genaue Auflistung der verschiedenen Keime ist in **Tabelle 6** zu finden.

Tabelle 6: Art der mikrobiellen Besiedelung und Anzahl der so besiedelten Wunden

Nachgewiesener Keim	befallene Wunden
<i>Staphylococcus aureus</i>	10
<i>Enterococcus faecalis</i>	6
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	4
<i>Escherichia coli</i>	3
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	3
<i>Streptococcus pyogenes</i>	2
<i>Proteus mirabilis</i>	2
<i>Proteus vulgaris</i>	2
<i>Klebsiella oxytoca</i>	2
<i>Streptococcus massilensis</i>	1
<i>Streptococcus anginosus</i>	1
<i>Candida albicans</i>	3
Wunden mit polymikrobiellem Befall	7
Kein Keim	5

3.3 Messergebnisse der zellulären Parameter

Zur Messung der zellulären Parameter wird das Gemisch aus Wundexsudat und Spülflüssigkeit durch eine laborchemische Analyse hinsichtlich der zellulären Bestandteile untersucht. Für einen Überblick werden die Messungen der gesamten 18 Tage graphisch dargestellt. In den Gesamtverläufen aller Messwerte sind nach den Werten $x=5,4$ und $x=10,9$ zusätzlich Bereiche markiert, in denen der Großteil der zweiten und dritten Debridements stattgefunden hat. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten. Die eingezeichneten Fehlerbalken stellen in den folgenden Abbildungen den Standardfehler (Konfidenzintervall 95 %) dar.

Der Gesamtverlauf der roten Blutzellen, zu sehen in **Abbildung 5** und **Tabelle 7**, sinkt nach hohen Werten von $168 \text{ n} \cdot 10^3/\mu\text{l}$ an Tag null rapide ab und bleibt ab Tag zwei auf einem niedrigen Niveau. Lediglich am 8., 12. und 14. Tag sind die Werte wieder erhöht, wie in **Tabelle 7** zu sehen ist.

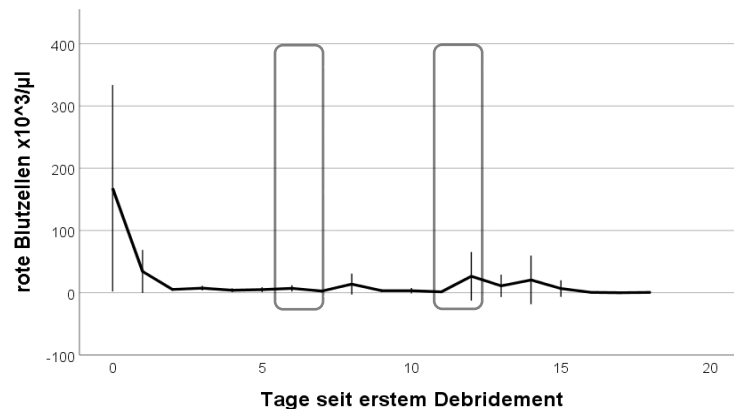


Abbildung 5: Mittelwerte des Gesamtverlaufs roter Blutzellen ($n \cdot 10^3/\mu\text{l}$) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 7: Mittelwerte der roten Blutzellen ($n \cdot 10^3/\mu\text{l}$) an Tag 1-18

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
RBC	168	34	5	7	4	5	7	3	14	3	3	1	26	11	21	7	1	0	1

Der Gesamtverlauf aller kernhaltiger Zellen, siehe **Abbildung 6** und **Tabelle 8**, zeigt hingegen einen konträren Verlauf. Nachdem der Wert über die Tage null bis vier kontinuierlich von 144 n/ μl auf 1416 n/ μl steigt, zeigt sich nach einem leichten Abfall an Tag fünf eine Erhöhung an Tag sechs von 679 n/ μl auf 4544 n/ μl , welche zusammenfällt mit der zweiten Intervention. Danach zeigt sich bei Tag neun eine leichte Spitze bei sonst konstant niedrigem Verlauf. Ab Tag elf, dem Tag der dritten Intervention, steigt der Wert an und erreicht an Tag 14 seinen Höchstwert. Danach fällt er bis Tag 17 ab und steigt dann an Tag 18 wieder leicht an.



Abbildung 6: Gesamtverlauf alle Zellen (n/μl) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 8: Mittelwerte alle kernhaltigen Zellen (n/μl) an Tag 1-18

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
alle Zellen	144	405	1077	1366	1416	679	4544	1444	354	1641	302	315	632	4739	11163	5934	298	5	421

Nach einem Anstieg der PMNs von 102 n/μl an Tag null auf 1145 n/μl an Tag vier fällt der Wert an Tag fünf leicht ab um an Tag sechs auf 3667 n/μl anzusteigen. Danach bleiben die Werte auf einem niedrigen Niveau, mit einem kleinen Peak an Tag neun (1508 n/μl), um ab Tag zwölf anzusteigen zum Wert von 6327 n/μl an Tag 14, siehe **Abbildung 7** und **Tabelle 9**.

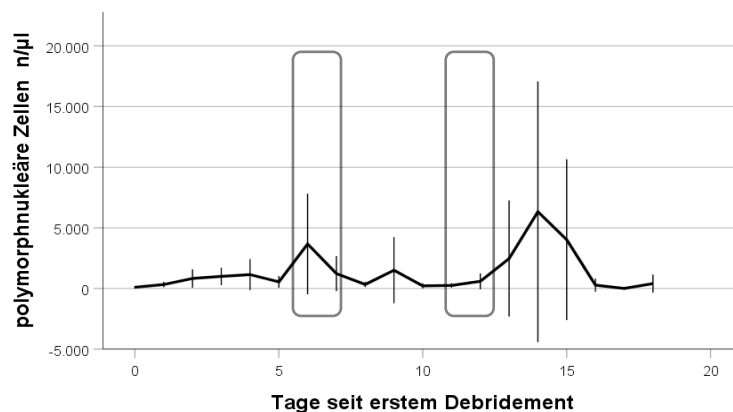


Abbildung 7: Gesamtverlauf polymorphnukleäre Zellen (n/μl) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 9: Mittelwerte polymorphnukleäre Zellen (n/μl) an Tag 1-18

Tage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
PMN	102	328	827	997	1145	546	3667	1226	333	1508	217	252	590	2467	6327	4023	277	4	407

Auch die mononukleären Zellen, zu sehen in **Abbildung 8** und **Tabelle 10**, steigen von einem Wert von 38 n/μl an Tag null auf einen Wert von 347 n/μl an Tag drei. Nach einem Abfall an den Tagen vier und fünf kommt es an Tag sechs zu einem erneuten Anstieg auf 770 n/μl. Danach fallen die Werte und bleiben konstant niedrig, bis sie an Tag 13 wieder ansteigen und an Tag 14 den Höchstwert von 4786 n/μl erreichen. Danach fallen sie steil ab und bleiben bis Tag 18 auf einem niedrigen Niveau.

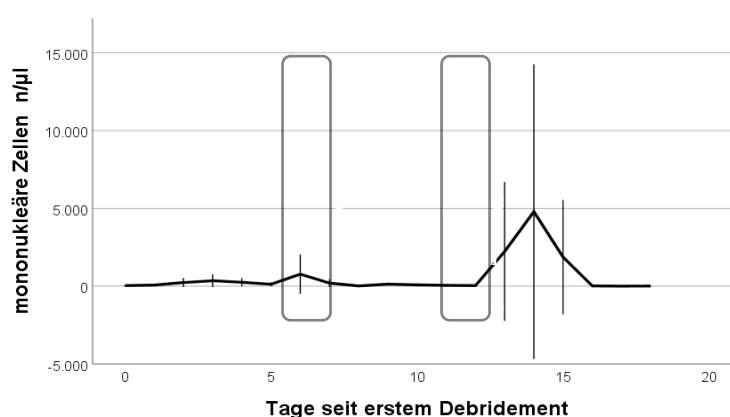


Abbildung 8: Gesamtverlauf mononukleäre Zellen (n/μl) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 10: Mittelwerte mononukleäre Zellen (n/μl) an Tag 1-18

Tage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
MNC	38	69	233	347	248	120	770	197	15	129	80	53	34	2232	4786	1862	17	1	10

Die Anzahl der roten Blutzellen, siehe **Abbildung 9** fällt vom Tag der ersten Intervention bis zum zweiten Tag von einem Median von $26 \times 10^3/\mu\text{l}$ auf $4 \times 10^3/\mu\text{l}$ signifikant ab ($p=0,038$) und bleibt am dritten Tag bei diesem Wert.

Der Median aller kernhaltiger Zellen, in **Abbildung 10** als alle Zellen zu sehen, steigt von $39/\mu\text{l}$ an Tag null auf $188/\mu\text{l}$ an Tag zwei signifikant an ($p=0,037$) und steigt weiter auf $239/\mu\text{l}$ an Tag drei.

Bei den polymorphnukleären Zellen, zu sehen in **Abbildung 11**, findet bereits von Tag null auf Tag eins ein signifikanter Anstieg des Medians von 32/ μ auf 93/ μ statt ($p=0,028$), welcher sich an Tag zwei auf 172,5/ μ und an Tag drei auf 150/ μ fortsetzt.

Bei den mononukleären Zellen in **Abbildung 12** zeigt sich ebenfalls ein Anstieg von 2/ μ an Tag null auf 14/ μ an Tag eins und signifikant auf 12,5/ μ an Tag zwei ($p=0,038$) bis zu 33/ μ an Tag drei.

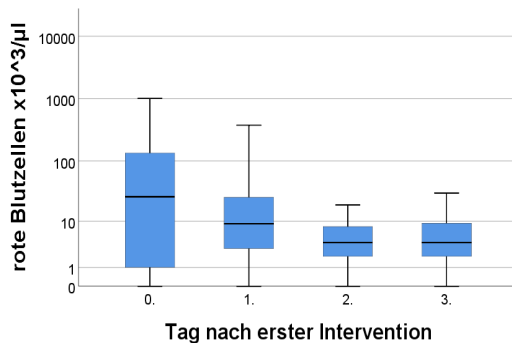


Abbildung 9: rote Blutzellen ($n \cdot 10^3/\mu\text{l}$) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach

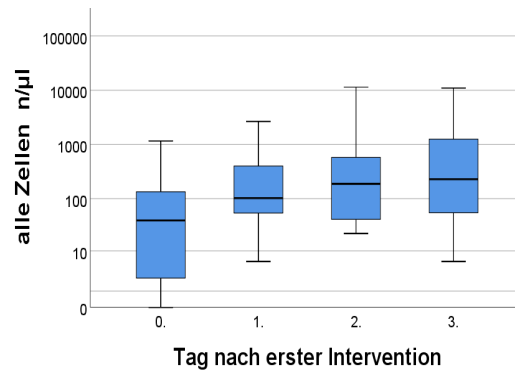


Abbildung 10: alle kernhaltigen Zellen ($n/\mu\text{l}$) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach

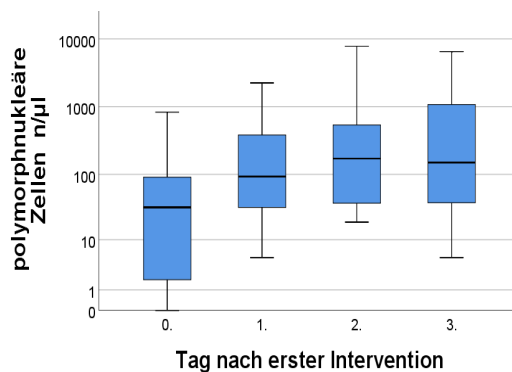


Abbildung 11: polymorphnukleäre Zellen ($n/\mu\text{l}$) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach

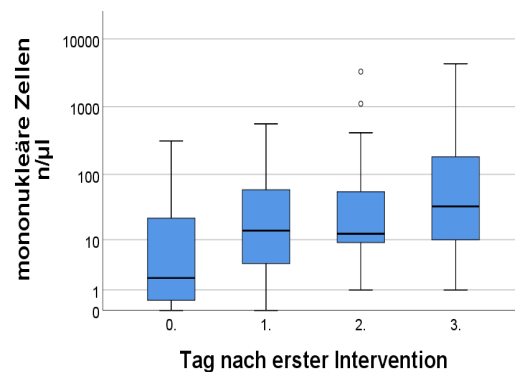


Abbildung 12: mononukleäre Zellen ($n/\mu\text{l}$) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt

Die Ergebnisse aller Berechnungen für die ersten drei Tage sind in **Tabelle 11** zusammengefasst. Dies dient der Veranschaulichung der zellulären Messparameter in den ersten drei Tagen.

Tabelle 11: Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für die zellulären Messparameter an den Tagen 0-3 (Signifikanzniveau 95 %), signifikante Werte sind mit einem * markiert und zeigen einen Abfall bzw. Anstieg des Wertes im Vergleich zu Tag 0

	p-Wert 0 auf 1	p-Wert 0 auf 2	p-Wert 0 auf 3
Rote Blutzellen	0,146	0,038*	0,018*
Alle kernhaltigen Zellen	0,064	0,037*	0,017*
Polymorphnukleäre Zellen	0,028*	0,038*	0,025*
Mononukleäre Zellen	0,130	0,037*	0,012*

In Zusammenschau mit den oben gezeigten Abbildungen 9-12 zeigt sich ein Abfall der Erythrozyten und ein Anstieg der kernhaltigen Zellen, PMNs und MNCs.

3.4 Messergebnisse der Zytokine und Wachstumshormone

Die Mittelwerte des proinflammatorischen Zytokins IL-6, dargestellt in **Abbildung 13** und **Tabelle 12**, steigen direkt von Tag null auf Tag eins auf einen Wert von 7921 pg/ml an. Nach einem Abfall bis Tag vier steigt der Wert wieder an auf 3228 pg/ml an Tag fünf und 3048 pg/ml an Tag sechs. Bis zu einem rapiden Abfall an Tag elf bleiben die Werte an den Tagen sieben bis zehn konstant um die 2500 pg/ml. Nach einem erneuten Höchstwert an Tag zwölf von 5502 pg/ml fällt der Wert erst schnell und dann langsamer ab.

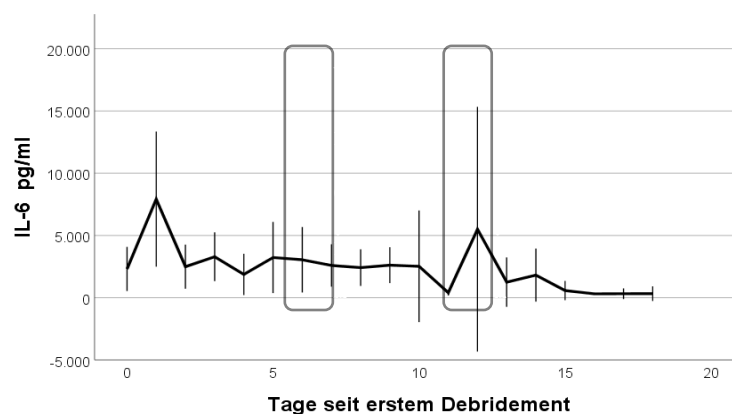


Abbildung 13: Gesamtverlauf IL-6 (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 12: Mittelwerte IL-6 (pg/ml) an Tag 1-18

Tage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
IL-6	2311	7921	2493	3291	1871	3228	3048	2590	2417	2614	2520	403	5502	1250	1815	575	311	320	324

Die Mittelwerte des Zytokins IL-8, welches chemotaktisch auf PMNs und somit proinflammatorisch wirkt, siehe **Abbildung 14** und **Tabelle 13**, weisen im Vergleich zu IL-6 leicht verzögerte Spitzen auf. Besonders hoch sind hier die Werte der Tage drei mit 67407 pg/ml, sechs mit 74907 pg/ml und zwölf mit 82219 pg/ml. Zu Beginn der Messreihe finden sich generell höhere Werte, wohingegen sich nach dem zweiten Hoch an Tag sechs alle Werte unter der 2000er Marke befinden, bis zum erneuten Anstieg an Tag zwölf. Danach flacht der Graph wieder ab.

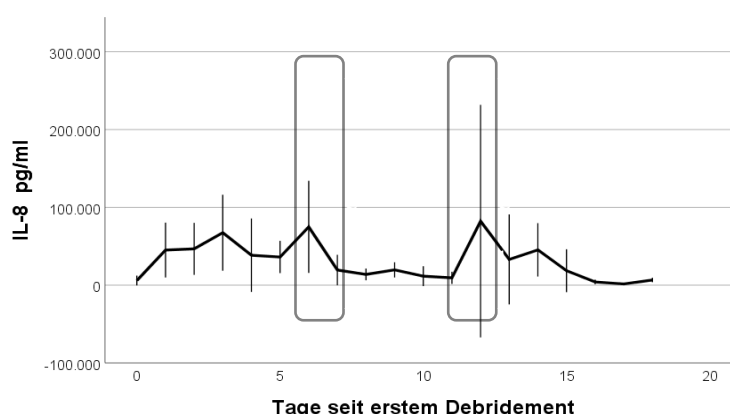


Abbildung 14: Gesamtverlauf IL-8 (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 13: Mittelwerte IL-8 (pg/ml) an Tag 1-18

Tage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
IL-8	5959	45118	46669	67407	38435	36154	74907	19429	13812	19636	11521	9369	82219	33053	45325	18559	4094	1587	6630

Auch TNF- α steigt zuerst an und erreicht an Tag drei mit 206 pg/ml seinen Höchstwert. Danach fällt der Wert auf 27 pg/ml an Tag acht ab und bleibt bis auf einen Peak an Tag neun von 67 pg/ml auf niedrigem Niveau, bis an Tag 12 ein Wert von 163 pg/ml erreicht wird. Die Werte sind in **Abbildung 15** und **Tabelle 14** dargestellt.

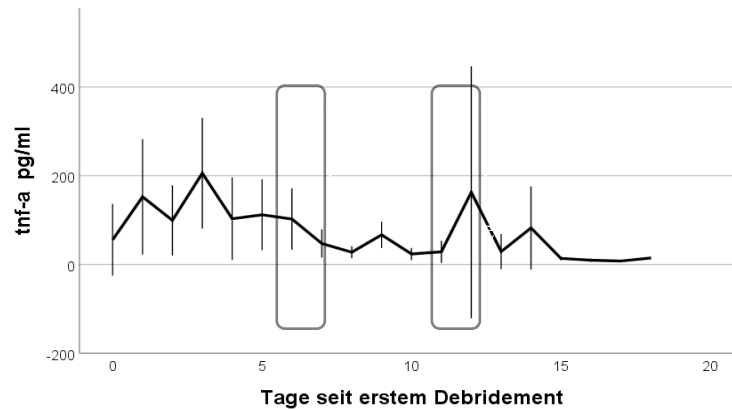


Abbildung 15: Gesamtverlauf TNF- α (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 14: Mittelwerte TNF- α (pg/ml) an den Tagen 1-18

Tage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
TNF-alpha	56	152	99	206	103	112	102	47	27	67	24	28	163	29	82	14	9	8	14

Der Wachstumsfaktor VEGF, steigt am ersten Tag von einem Wert von 266 pg/ml auf einen Wert von 583 pg/ml. Danach schwankt er um die 500er-Marke bis er an Tag sechs von einem Wert von 635 pg/ml auf Werte unter 500 pg/ml absinkt. An Tag zwölf und 14 erreicht er dann nach einem schnellen Anstieg die Werte 672 pg/ml bzw. 641 pg/ml. Danach fallen die Werte, graphisch dargestellt in **Abbildung 16** wieder ab. Die Mittelwerte aller Tage sind **Tabelle 15** zu entnehmen.

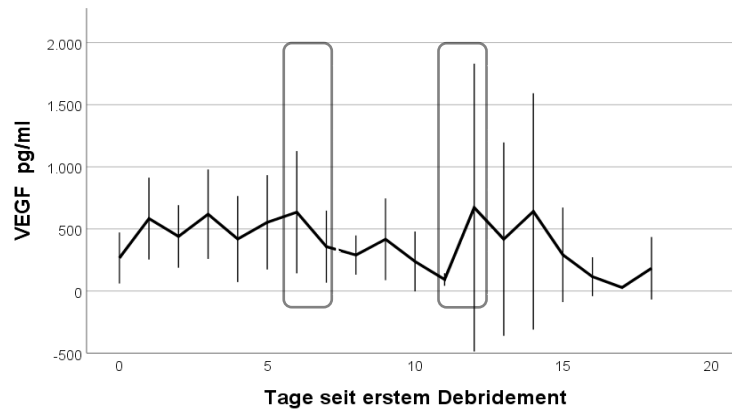


Abbildung 16: Gesamtverlauf VEGF (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreise markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 15: Mittelwerte VEGF (pg/ml) an Tag 1-18

Tage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
VEGF	266	583	440	619	419	553	635	357	290	417	238	93	672	417	641	291	116	28	183

Der Wachstumsfaktor bFGF wirkt sich maßgeblich auf die Fibroblasten Proliferation und Differenzierung aus. Seine Mittelwerte können der **Tabelle 16** entnommen werden. BFGF beginnt, mit einem Wert von 45 pg/ml an Tag null, bereits hoch, steigt an Tag eins weiter auf 67pg/ml um dann an den Tagen zwei bis sieben um Werten bei 30 pg/ml zu schwanken. An Tag acht fällt die mittlere Konzentration auf 14 pg/ml und stagniert auf niedrigem Niveau. Dann kommt es erneut zum Anstieg mit einem Peak auf Tag zwölf mit 29 pg/ml und bei Tag 14 mit 33 pg/ml. Danach fällt der Wert ab und stagniert bei 10 pg/ml. Der Graph zum Langzeitverlauf von bFGF findet sich unter 8.1. im Anhang.

Tabelle 16: Mittelwerte bFGF (pg/ml) an Tag 1-18

Tage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
bFGF	45	67	30	35	23	33	33	34	14	15	14	10	29	16	33	12	10	10	10

Bei der Analyse der Tage null bis drei im Hinblick auf die Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α und den Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF können folgende Ergebnisse ermittelt werden:

IL-6, zu sehen in **Abbildung 17** steigt von Tag null von 583,5 pg/ml signifikant ($p=0,011$) auf 1543 pg/ml an Tag eins an, nach einem Abfall auf 755 pg/ml an Tag zwei folgt ein leichter Anstieg auf 861 pg/ml an Tag drei.

IL-8, welches in **Abbildung 18** zu sehen ist, steigt von Tag null auf 1 signifikant ($p=0,005$) von 2378 pg/ml auf 10644 pg/ml um dann ebenso wie IL-6 an Tag zwei leicht abzusinken (8732 pg/ml). An Tag drei erreicht es den Höchstwert von 19395 pg/ml.

TNF- α steigt von Tag null mit einem Wert von 11 pg/ml signifikant ($p=0,005$) auf 22 pg/ml an Tag eins auf 26 pg/ml an Tag zwei und 44 pg/ml an Tag drei. Dies ist in **Abbildung 19** zu erkennen.

VEGF, dargestellt in **Abbildung 20**, beginnt an Tag null mit einem Wert von 35 pg/ml und steigt signifikant ($p=0,004$) auf 202 pg/ml an Tag eins. An Tag zwei folgt ein leichter Abstieg auf 120 pg/ml und an Tag drei ein erneuter Anstieg auf 247 pg/ml.

Bei der Messung von bFGF kann kein signifikanter Anstieg oder Abstieg ermittelt werden. Die Mediane erreichen bereits an Tag null mit 23 pg/ml ihren höchsten Wert und sinken dann über 13 pg/ml an Tag eins auf 10 pg/ml an Tag zwei und drei.

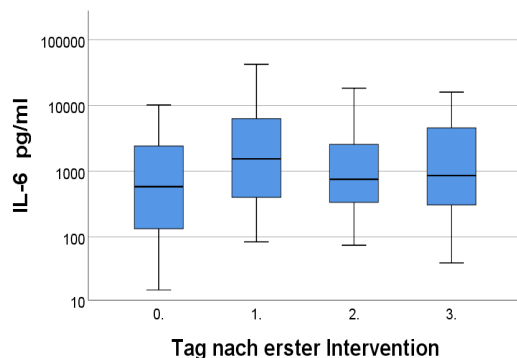


Abbildung 17: IL-6 (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach

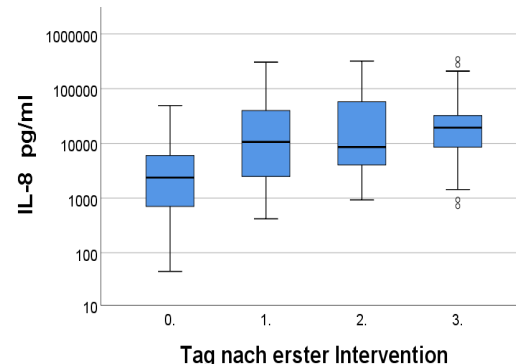


Abbildung 18: IL-8 (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt

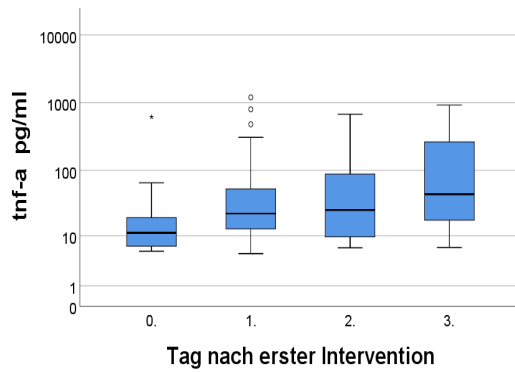


Abbildung 19: TNF- (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

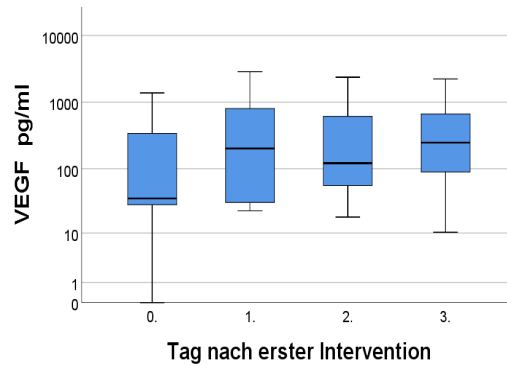


Abbildung 20: VEGF (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach

Die in der **Tabelle 17** aufgelisteten Ergebnisse machen in Kombination mit den Boxplots deutlich, zu welchem Zeitpunkt es bei den Zytokinen und Wachstumshormonen in den ersten vier Tagen zu einem signifikanten Anstieg oder Abfall der Konzentration kommt.

Tabelle 17: Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für die Zytokine und Wachstumsfaktoren Messparameter an den Tagen 0-3 (Signifikanzniveau 95 %), signifikante Werte sind mit einem * markiert und zeigen einen Abfall bzw. Anstieg des Wertes im Vergleich zu Tag 0

	p-Wert 0 auf 1	p-Wert 0 auf 2	p-Wert 0 auf 3
IL-6	0,011*	0,721	0,036*
IL-8	0,005*	0,007*	0,012*
TNF-α	0,005*	0,005*	0,012*
VEGF	0,004*	0,241	0,07
bFGF	0,214	0,066	0,35

IL-6 und VEGF zeigen also zunächst einen signifikanten Anstieg und schwanken dann. IL-8 und TNF-α steigen über alle vier Tage an. bFGF hingegen zeigt keinen signifikanten Anstieg oder Abfall, sondern schwankt um die Baseline.

3.5 Messergebnisse von pH, Gesamtprotein, Kalium, Phosphat und Laktatdehydrogenase

Bei der Untersuchung des pH-Werts der Wundflüssigkeit, dargestellt in **Abbildung 21** und **Tabelle 18**, zeigt sich an Tag null ein Wert von 7,14, welcher sich dann von Tag zwei bis sieben zwischen 7,04 und 6,90 bewegt. An Tag 14 erreicht er mit 6,8 seinen tiefsten Wert und an Tag 16 und 17 mit 7,18 seine beiden höchsten Werte, um an Tag 18 dann wieder leicht abzufallen auf 7,02.

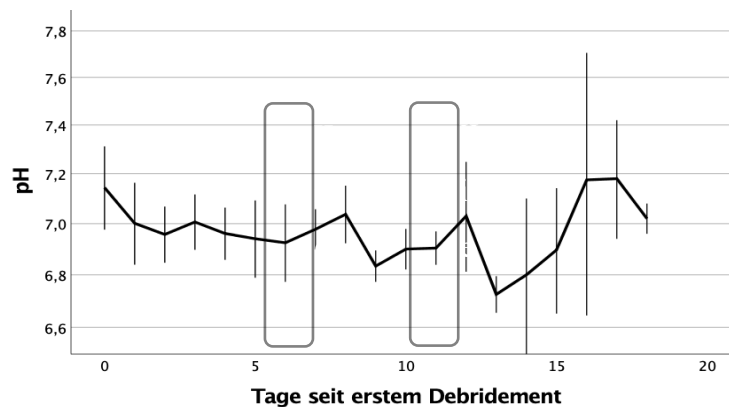


Abbildung 21: Gesamtverlauf pH vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 18: Mittelwerte pH-Wert an Tag 1-18

Tag	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
pH	7,14	7,00	6,96	7,01	6,96	6,94	6,92	6,98	7,04	6,83	6,90	6,90	7,03	6,73	6,80	6,90	7,18	7,18	7,02

Das Gesamtprotein, dargestellt in **Abbildung 22** und **Tabelle 19** sinkt von seinem Höchstwert von 3710 µg/ml auf einen Wert von 1934 µg/ml an Tag zwei, steigt dann an Tag drei auf einen Mittelwert von 2537 µg/ml. Nach einem Tief von 1579 µg/ml an Tag vier und einem leichten Anstieg auf 2147 µg/ml an Tag fünf sinkt es fast kontinuierlich bis auf einen Wert von 388 µg/ml an Tag elf ab, um anschließend an Tag zwölf auf 2411 µg/ml anzusteigen. Nach einem Abfall auf 872 µg/ml an Tag 13 und einem erneuten Anstieg auf 1619 µg/ml an Tag 14 erfolgt ein kontinuierlicher Abfall auf den Tiefstwert von 228 µg/ml an Tag 18.



Abbildung 22: Gesamtverlauf Gesamtprotein ($\mu\text{g/ml}$) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

Tabelle 19: Mittelwerte Gesamtprotein ($\mu\text{g/ml}$) an Tag 1-18

Tage	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
Gesamtprotein	3710	3188	1934	2537	1579	2147	2002	2058	1755	1243	1066	388	2411	872	1619	609	592	315	228

Die Ergebnisse der Messungen von Kalium, LDH und Phosphat werden zusammengefasst in **Tabelle 20:** Mittelwerte der Langzeitverläufe von Kalium, LDH und Phosphat an Tag 1-18 dargestellt. Zur weiteren Veranschaulichung finden sich die entsprechenden Graphen unter 8.1. im Anhang. Kalium zeigt seinen Höchstwert bereits an Tag null mit 1,41 mmol/l, dann sinken die Messwerte bis Tag fünf auf einen Wert von 1,04 mmol/l um an Tag sechs wieder auf 1,2 mmol/l anzusteigen und fällt dann erneut fast kontinuierlich ab bis zu einer leichten Spitze von 1,1 mmol/l an Tag zwölf. Der tiefste Wert wird mit 0,25 mmol/l an Tag 18 erreicht. LDH verhält sich zunächst ähnlich wie Kalium und sinkt von einem Wert von 314 U/l auf 222 U/l an Tag vier, steigt dann allerdings an Tag fünf schon wieder auf 305 U/l an und erreicht an Tag sechs mit 433 U/l seinen vorläufigen Höchstwert. Dann sinkt er fast kontinuierlich ab und erreicht bei 57 U/l an Tag elf ein Tief aus dem er bis Tag 14 wieder auf 878 U/l ansteigt. Danach fällt der Wert bis auf 12 U/l an Tag 17 und endet bei 67 U/l an Tag 18. Phosphat startet mit seinem Höchstwert von 0,16 mmol/l an Tag null, fällt an Tag zwei auf 0,13 mmol/l und schwankt dann um die Werte 0,06-0,09 bis es an Tag sechs ein erneutes Hoch von 0,14 mmol/l erreicht. Anschließend schwankt der Wert wieder bei 0,06-0,09 mmol/l, erreicht an Tag 12 mit 0,12 mmol/l und Tag 16 mit 0,15 mmol/l nochmals ein Hoch und an Tag 17 mit 0,03 mmol/l seinen Tiefpunkt.

Tabelle 20: Mittelwerte der Langzeitverläufe von Kalium, LDH und Phosphat an Tag 1-18

Tag	Kalium (mmol/l)	LDH (U/l)	Phosphat (mmol/l)
0	1,41	314	0,16
1	1,33	305	0,13
2	1,18	288	0,07
3	1,19	293	0,09
4	1,13	222	0,06
5	1,04	305	0,09
6	1,20	433	0,14
7	1,04	220	0,08
8	0,88	104	0,07
9	0,72	132	0,06
10	0,81	76	0,07
11	0,70	57	0,09
12	1,10	246	0,12
13	1,00	505	0,05
14	1,00	878	0,10
15	0,50	432	0,11
16	0,65	51	0,15
17	1,00	12	0,03
18	0,25	67	0,10

Beim pH-Wert kommt es zwischen Tag null und zwei zu einer signifikanten Abnahme des pH-Wertes ($p=0,033$), dargestellt in **Abbildung 23**. Der Median befindet sich an Tag null bei 7,02, sinkt dann auf 6,92 an Tag eins, steigt wieder leicht auf 6,97 an Tag zwei und sinkt dann wieder auf 6,94.

Auch beim Gesamtprotein in **Abbildung 24** schwankt der Wert. Von zunächst 1580 µg/ml an Tag null steigt er auf 2549 µg/ml an, um an Tag zwei wieder auf 1130 µg/ml abzusinken und an Tag drei erneut auf 1596 µg/ml anzusteigen.

Bei den Messwerten Gesamtprotein, Kalium und LDH kann kein signifikanter Unterschied zwischen Tag null und Tag eins, zwei bzw. drei ermittelt werden. Bei Phosphat kommt es von

Tag null auf Tag eins zu einem signifikanten Abfall der Konzentration ($p=0,018$). Die Boxplots sind im Anhang unter 8.2 aufgeführt.

Die Ergebnisse der Analyse sind in **Tabelle 21** aufgelistet.

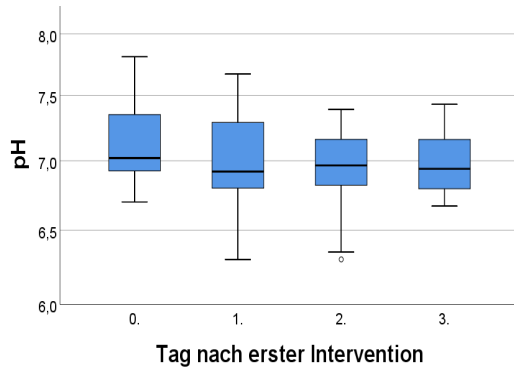


Abbildung 23: pH-Wert am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt

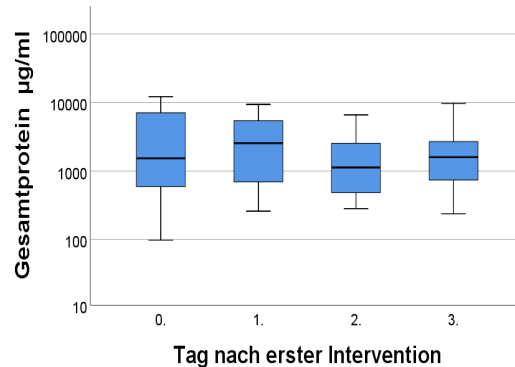


Abbildung 24: Gesamtprotein ($\mu\text{g/ml}$) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach

Tabelle 21: Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für pH-Wert, Gesamtprotein, Kalium, LDH und Phosphat an den Tagen 0-3 (Signifikanzniveau 95 %), signifikante Werte sind mit einem * markiert und zeigen einen Abfall bzw. Anstieg des Wertes im Vergleich zu Tag 0

	p-Wert Tag 0 - 1	p-Wert Tag 0 - 2	p-Wert Tag 0 - 3
pH-Wert	0,600	0,033*	0,667
Gesamtprotein	0,196	0,059	0,208
Kalium	0,249	0,715	0,465
LDH	0,701	0,721	0,208
Phosphat	0,018*	0,123	0,075

3.6 Einfluss verschiedener Störfaktoren der Wundheilung auf die Messparameter

3.6.1 Periphere arterielle Verschlusskrankheit

Beim Vergleich der Gruppen mit und ohne pAVK zeigen sich nur bei den Messwerten der polymorphnukleären und mononukleären Zellen und VEGF jeweils an Tag zwei signifikante Unterschiede ($p=0,039$, $p=0,047$, $p=0,039$). Die weiteren Ergebnisse sind **Tabelle 23** im

Anhang zu entnehmen. Bei der genaueren Betrachtung einiger Messwerte wie den Erythrozyten, zu sehen in Abbildung 25, den polymorphnukleären und mononukleären Zellen, zu sehen in Abbildung 26 und Abbildung 27, sowie der VEGF, dargestellt in Abbildung 28, lassen sich Mediane um einen ähnlichen Wert erkennen. So liegen die Mediane beider Gruppen bei der Messung der roten Blutzellen am Tag der Operation mit den Werten $64 \times 10^3/\mu\text{l}$ und $13 \times 10^3/\mu\text{l}$ am weitesten auseinander. An den Tagen eins bis drei weisen sie mit 10 und $8 \times 10^3/\mu\text{l}$, 3 und $7 \times 10^3/\mu\text{l}$ und nochmals 3 und $7 \times 10^3/\mu\text{l}$ ähnliche Werte auf. Anders bei den polymorphnukleären Zellen. Hier wird zunächst mit einem ähnlichen Wert, $31/\mu\text{l}$ und $35/\mu\text{l}$ gestartet, im weiteren Verlauf wird die Differenz zwischen den Medianen immer größer. Erst ist der Median der von pAVK-Betroffenen noch höher, mit $155/\mu\text{l}$ im Vergleich zu $82/\mu\text{l}$, an Tag zwei und drei liegen die Mediane der nicht an pAVK-Erkrankten mit $331/\mu\text{l}$ und $861,5/\mu\text{l}$ deutlich über dem der an pAVK-Erkrankten ($94/\mu\text{l}$). Bei den mononukleären Zellen liegen die Mediane der nicht Erkrankten immer über denen der an pAVK erkrankten mit $7,5/\mu\text{l}$, $14/\mu\text{l}$, $32/\mu\text{l}$ und $78,5/\mu\text{l}$ im Vergleich zu $2/\mu\text{l}$, $11,5/\mu\text{l}$, $9/\mu\text{l}$ und $12/\mu\text{l}$ an den Tagen null, eins, zwei und drei. Bei den mononukleären und polymorphnukleären Zellen zeigt sich an den Tagen zwei und drei, bei den Gruppen pAVK/kein pAVK, gegensätzliche Trends. Während die Werte bei den nicht pAVK-Erkrankten weiterhin ansteigen, fallen sie bei den an pAVK-Erkrankten bereits wieder ab oder stagnieren.

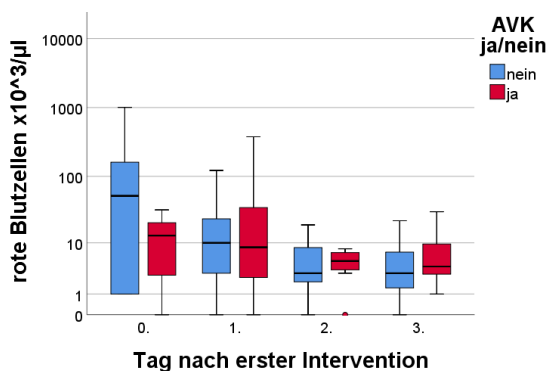


Abbildung 25: rote Blutzellen $\times 10^3/\mu\text{l}$ am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen AVK/kein AVK

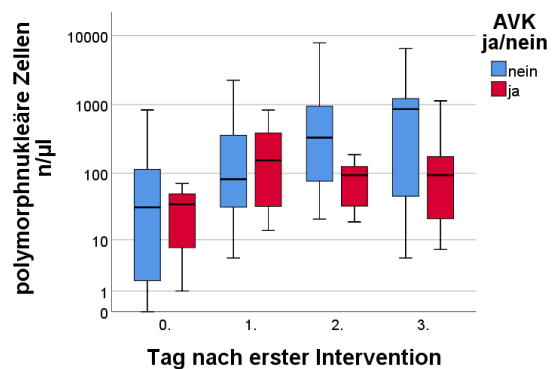


Abbildung 26: polymorphnukleäre Zellen ($\text{n}/\mu\text{l}$) am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen AVK/kein AVK

Beim VEGF liegt der Median der nicht-Erkrankten an Tag null mit $31,7 \text{ pg/ml}$ deutlich unter dem der Erkrankten mit $100,5 \text{ pg/ml}$. Dies wechselt bereits an Tag eins, der Median der nicht-Erkrankten steigt auf $433,3 \text{ pg/ml}$ während der der Erkrankten nur auf 189 pg/ml ansteigt. Beide

Gruppen erreichen an Tag eins ihren Höchstwert und fallen dann an Tag zwei auf 418,8 pg/ml bzw. 76,6 pg/ml und erreichen an Tag drei 248,5 pg/ml bzw. 90,1 pg/ml.

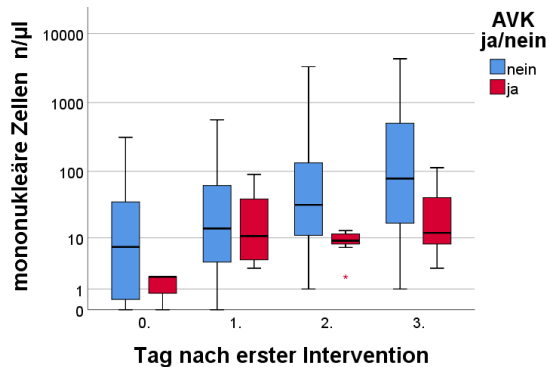


Abbildung 27: mononukleäre Zellen (n/μl) am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen AVK/kein AVK, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

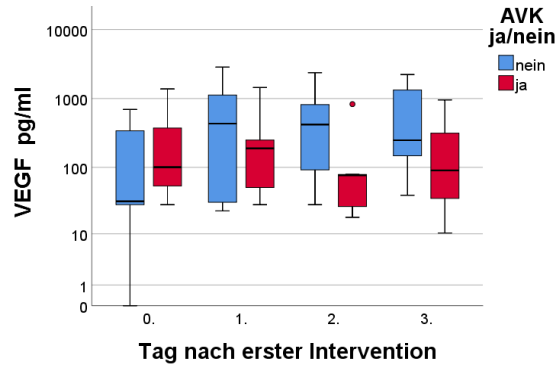


Abbildung 28: VEGF (pg/ml) am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen AVK/kein AVK, Ausreißer sind durch ° dargestellt

Insgesamt zeigt sich bei den Erythrozyten an Tag eins in der Gruppe der pAVKler ein niedrigerer Wert, ansonsten liegen die Werte über denen, der Kontrollgruppe. Des Weiteren zeigen sich auch die PMNs und MNCs an Tag zwei und drei in der Gruppe mit pAVK niedriger. Bei VEGF, welches durch Hypoxie vermehrt produziert und ausgeschüttet wird, liegen die Werte der pAVKler an Tag eins bis drei unter denen der Kontrollgruppe.

3.6.2 Diabetes mellitus Typ II

Beim Vergleich der Gruppen Diabetes/ kein Diabetes kann bei keinem Messparameter ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Die Ergebnisse finden sich in im Anhang in **Tabelle 24**. Es lassen sich jedoch an den Boxplots der Zytokine, der Wachstumsfaktoren und des pH-Werts einige Beobachtungen machen.

Bei IL-6, zu sehen in **Abbildung 29**, ergibt sich für die Gruppe der Nichtdiabetiker an Tag null ein Median von 428 pg/ml im Vergleich zu 762 pg/ml bei den Diabetikern. Dieser steigt in beiden Gruppen an auf 2100 pg/ml bzw. 1399 pg/ml und fällt an Tag zwei auf 760 pg/ml bzw. 629 pg/ml. Der deutlichste Unterschied zeigt sich an Tag drei. Hier wird für die Nichtdiabetiker

ein Median von 1731 pg/ml bestimmt, für die Diabetiker einen Median von 207 pg/ml. Der Unterschied ist nicht signifikant ($p=0,261$).

Auch bei IL-8, abgebildet in **Abbildung 30**, zeigen sich Unterschiede bezüglich der Mediane. An Tag null, eins, und zwei liegen die Werte der Nichtdiabetiker mit 2205 pg/ml, 9938 pg/ml und 6382 pg/ml unter denen der Diabetiker mit 3118 pg/ml, 16101 pg/ml und 10390 pg/ml. An Tag drei dreht sich diese Konstellation und der Median der Nichtdiabetiker liegt mit 19474 pg/ml über dem der Diabetiker mit 10828 pg/ml. Bei beiden Zytokinen kommt es also an Tag drei zu einem deutlichen Konzentrationsabfall bei den Diabetikern, während es bei den Nichtdiabetikern zu einem Anstieg kommt.

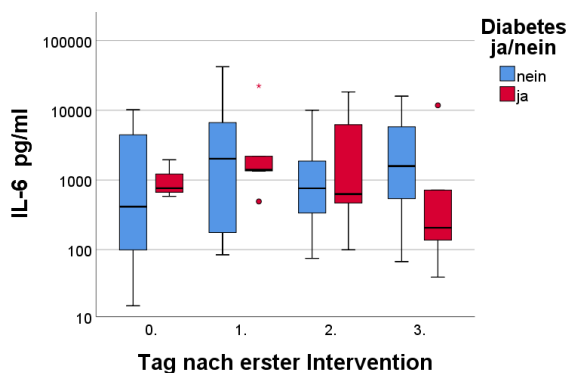


Abbildung 29: IL-6 am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch $\circ$ dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

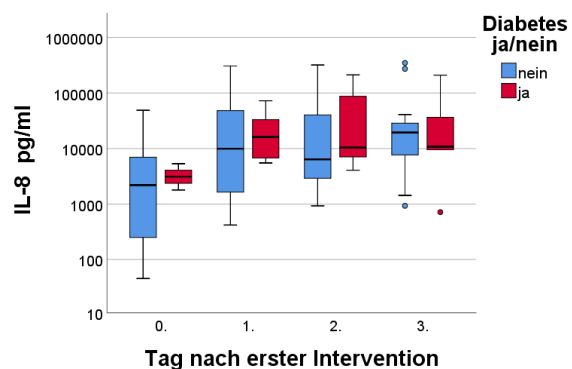


Abbildung 30: IL-8 am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch $\circ$ dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

Der Wachstumsfaktoren VEGF, **Abbildung 31**, zeigt sich in den ersten beiden Tagen in der Gruppe der Diabetiker mit Medianen von 101 pg/ml und 246 pg/ml im Vergleich zu den Nichtdiabetikern mit 31 pg/ml und 189 pg/ml erhöht. Dann kommt es bei den Diabetikern zu einem Abfall auf 78 pg/ml an Tag zwei und auf 90 pg/ml an Tag drei. Entgegengesetzt kommt es bei den Nichtdiabetikern nach einem Abfall auf 123 pg/ml an Tag zwei zu einem Anstieg auf 249 pg/ml.

Bei bFGF, **Abbildung 32**, liegen die Werte der Diabetiker an allen Tagen über denen der Nichtdiabetiker. Nach anfänglich hohen Werten von 37 pg/ml kommt es zu einem Abfall auf 22 pg/ml an Tag eins und 11 pg/ml an Tag zwei. An Tag drei steigt der Wert wieder auf 12

pg/ml. Bei den Nichtdiabetikern kommt es zu einem kontinuierlichen Abfall von 21 pg/ml an Tag null auf 10 pg/ml an Tag eins bis drei.

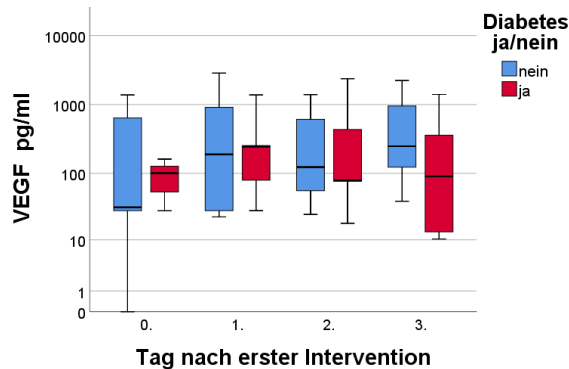


Abbildung 31: VEGF am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein

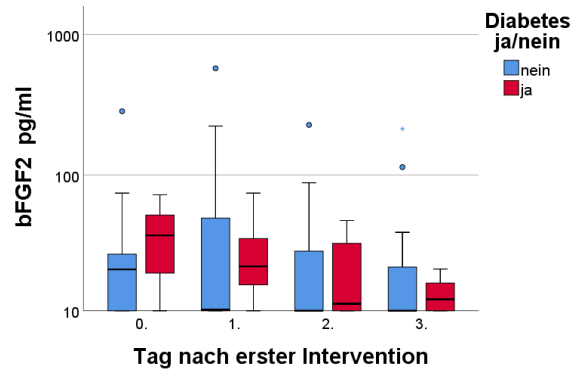


Abbildung 32: bFGF am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch ° dargestellt

Für TNF- α , zu sehen in **Abbildung 33**, zeigen sich in der Gruppe der Diabetiker Mediane von 15,8 pg/ml, 26 pg/ml und 47 pg/ml an den Tagen null bis zwei deutlich höher als in der Gruppe der Nichtdiabetiker mit 9 pg/ml, 18 pg/ml und 20 pg/ml. An Tag drei holen die Nichtdiabetiker aber auf und liegen mit 43 pg/ml nur noch knapp unter dem relativ konstanten Wert der Diabetiker von 44 pg/ml.

Beim pH-Wert, dargestellt in **Abbildung 34**, ist der Wert der Diabetiker durchgehend niedriger als der, der Nichtdiabetiker. Diese erreichen Mediane von 7,13, 7,087, 6,99 und 6,99 an den Tagen null bis drei, während die Wunden der Diabetiker mit den Medianen bei 6,93, 6,71, 6,82 und 6,84 durchgehend unter 7 sind und somit tendenziell saurer als die der Nichtdiabetiker.

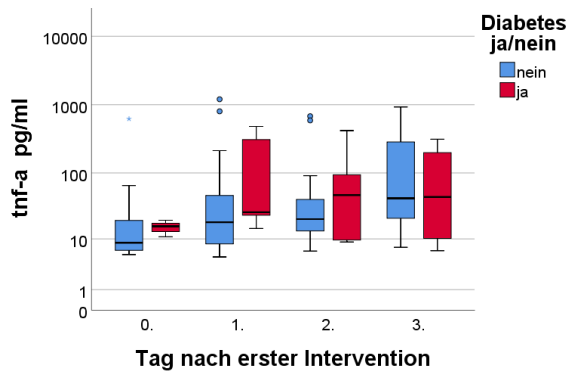


Abbildung 33: *TNF- α am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch $\circ$ dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als **

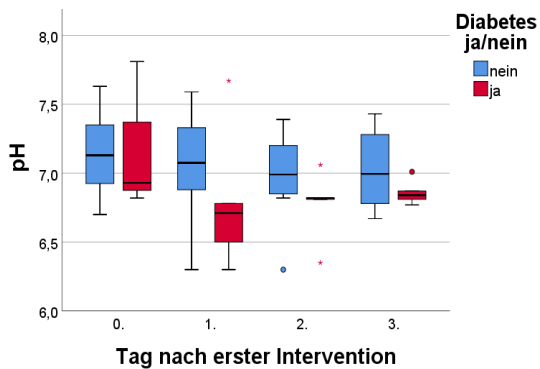


Abbildung 34: *pH-Wert am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch $\circ$ dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als **

Es ergibt sich somit kein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen Diabetes/kein Diabetes.

3.6.3 Mikrobiologie

Beim Vergleich der Gruppen bakterieller Befall, kein Keim und Befall mit *Candida albicans*, ergibt sich für die mononukleären Zellen und IL-8 jeweils an Tag drei ein signifikanter Unterschied ($p=0,012$ bzw. $0,049$). Sie sind zusammen mit den restlichen Werten in

Tabelle 22 weiter unten dargestellt.

Nicht nur bei den mononukleären Zellen und IL-8 zeigt sich besonders an Tag drei ein Unterschied zwischen den Gruppen. Auch bei den Werten IL-6 und den polymorphnukleären Zellen zeigen sich deutliche Differenzen bezüglich der Mediane, besonders bei den Gruppen kein Keim/bakterieller Befall. So steigen die Werte der Mediane der Wunden mit nachgewiesenem bakteriellem Befall sowohl bei den polymorphnukleären, zu sehen in **Abbildung 35**, als auch bei den mononukleären Zellen, zu sehen in **Abbildung 36**, stetig nach oben, von 33,5/ μ l an Tag null auf 788/ μ l an Tag drei bzw. von 2/ μ l an Tag null auf 109/ μ l an Tag drei. Bei den Wunden ohne Keim sind die Werte zu Anfang höher, mit 73,5/ μ l bzw. 15/ μ l an Tag null, steigen zunächst an auf 394/ μ l bzw. stagnieren bei 15/ μ l an Tag eins und fallen dann kontinuierlich ab auf 10,5/ μ l bzw. 5,0/ μ l an Tag drei. Die Gruppe der mit candida befallenen Wunden verhält sich ähnlich wie die der Wunden mit bakteriellem Befall, jedoch sind die Werte insgesamt weniger hoch. Die Messwerte an Tag null und zwei können nicht als repräsentativ gewertet werden, da die Gruppenstärke hier gleich eins ist.

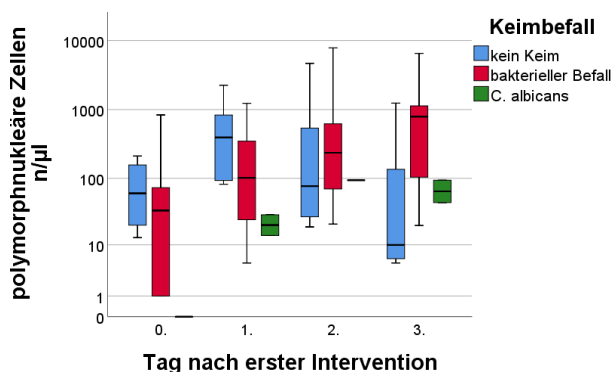


Abbildung 35: polymorphnukleäre Zellen (n/ μ l) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit *C. albicans*

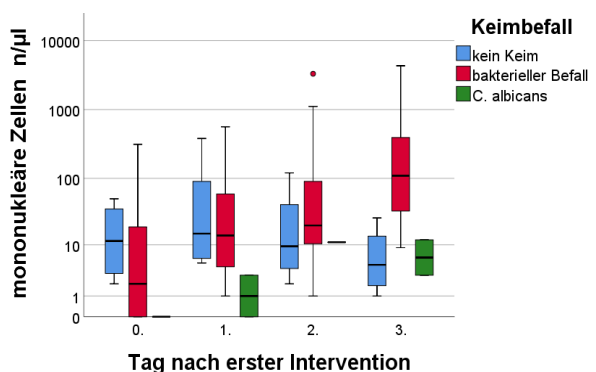


Abbildung 36: mononukleäre Zellen (n/ μ l) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit *C. albicans*, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

Auch beim IL-6 zu sehen in **Abbildung 37**, verhalten sich die Gruppen unterschiedlich. Die Gruppe ohne Keim startet bei einem Median von 2153,5 pg/ml, hat an Tag eins ihren

Höhepunkt bei 5959 pg/ml und sinkt dann kontinuierlich ab über 844,4 pg/ml an Tag zwei zu 291,7 pg/ml an Tag drei. Während die Gruppe mit bakteriellem Befall an Tag eins mit einem Median von 557,9 pg/ml startet und auf 1471 pg/ml ansteigt, um an Tag zwei auf 760 pg/ml abzusinken und dann bei 2426 pg/ml an Tag drei den Höchstwert zu erreichen. Die Gruppe der Wunden mit Candida-Befall verhält sich hier ähnlich wie die Wunden ohne Keim. Auch IL-8, dargestellt in **Abbildung 38**, zeigt einen Unterschied bei den beiden Gruppen. Während die Gruppe ohne Keim bei 7057 pg/ml startet, anschließend auf 16101 pg/ml ansteigt und dann kontinuierlich abfällt über 5224,5 pg/ml auf 1183,5 pg/ml, startet die Gruppe mit bakteriellem Befall nur bei 2204,5 und steigt dann kontinuierlich an über 9937 pg/ml auf 11982 pg/ml bis zum Höchstwert von 27005 pg/ml an Tag drei. An Tag drei besteht auch, wie oben beschrieben ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen. Die Gruppe mit Candidabefall startet bei 83,3 pg/ml und steigt dann bis Tag zwei auf 7074 pg/ml um an Tag drei auf einen Wert von 5501,5 pg/ml abzufallen.

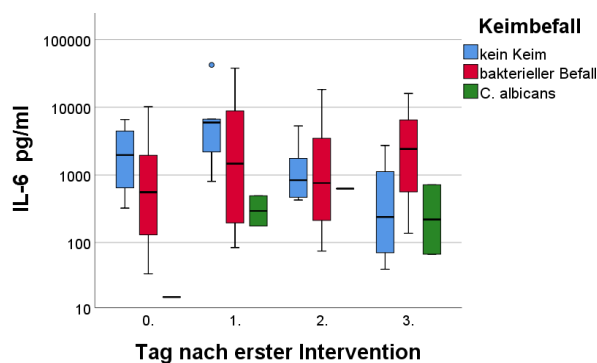


Abbildung 37: IL-6 (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit *C. albicans*, Ausreißer sind durch ° dargestellt

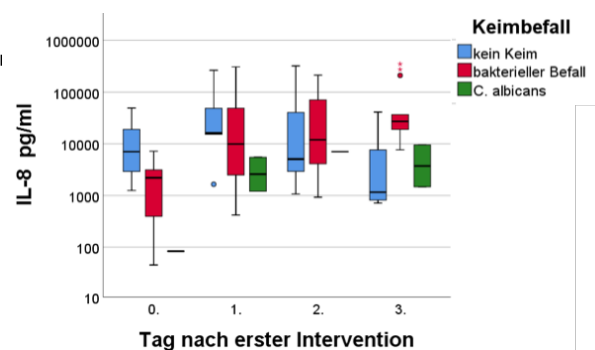


Abbildung 38: IL-8 (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit *C. albicans*, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

Auch bei TNF- α , zu sehen in **Abbildung 39**, steigen die Werte der Gruppe ohne Keim zunächst an, von 15,5 pg/ml auf 24,1 pg/ml und fallen dann auf 16,9 pg/ml und steigen dann aber nochmals leicht an auf 18,4 pg/ml an Tag drei. Die Mediane der Gruppe mit bakteriellem Befall steigen dagegen kontinuierlich, vom 12,3 pg/ml über 21,4 pg/ml und 38,4 pg/ml auf 199 pg/ml.

Auch der Wert der Candida-Gruppe steigt von Tag null, mit 6,3 pg/ml, auf 25,7 pg/ml an Tag drei. Auch beim pH-Wert zeigen sich in der **Abbildung 40** Unterschiede zwischen den drei Gruppen. Insgesamt sind die pH-Werte der Wunden mit Keimbefall niedriger, als die der Wunden ohne Keim. Diese liegen konstant über 7, an Tag null bei 7,27, an Tag eins bei 7,34, an Tag zwei bei 7,17 und an Tag drei bei 7,14. Im Vergleich dazu liegen die Werte der Wunden mit bakteriellern Befall konstant unter 7. So ergeben sich im Median Werte von 6,69 an Tag null, 6,9 an Tag eins, 6,85 an Tag zwei und 6,89 an Tag drei. Auch die Werte der mit *C. albicans* befallenen Wunden liegen durchgängig im Bereich unter sechs.

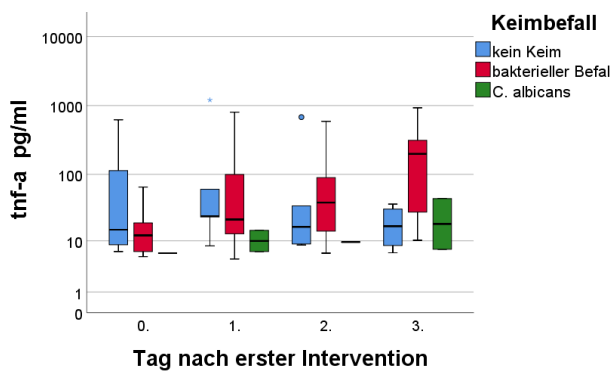


Abbildung 39: TNF- (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit *C. albicans*, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

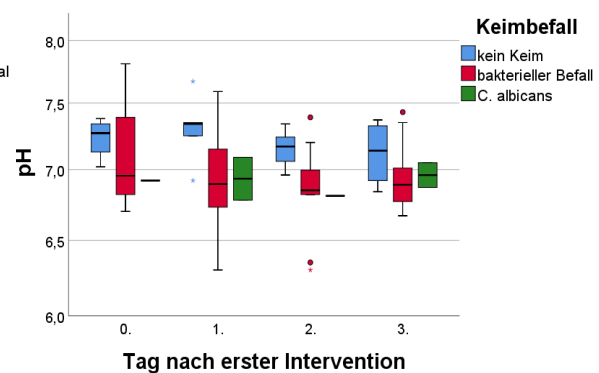


Abbildung 40: pH-Wert am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit *C. albicans*, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

Insgesamt stellt sich, bei allen dargestellten Graphen, eine Entwicklung in unterschiedliche Richtungen dar, besonders bezüglich der Gruppen bakterieller Befall und kein Keim.

Tabelle 22: Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests zum Vergleich der Gruppen bakterieller Befall/ kein Keim/ Befall mit *C. albicans* an den Tagen 0, 1, 2 und 3 zum Signifikanzniveau 95 %, signifikante Ergebnisse sind mit einem * markiert und weisen auf einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen an diesem Tag hin

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Rote Blutzellen	0,568	0,263	0,338	0,675
Alle kernhaltigen Zellen	0,216	0,076	0,719	0,072
Polymorphnukleäre Zellen	0,194	0,076	0,651	0,127
Mononukleäre Zellen	0,265	0,121	0,528	0,012*
IL-6	0,175	0,183	0,939	0,074
IL-8	0,102	0,336	0,927	0,049*
TNF-α	0,307	0,316	0,560	0,060
VEGF	0,133	0,129	0,182	0,193
bFGF	0,484	0,333	0,690	0,580
pH-Wert	0,445	0,122	0,050	0,398
Gesamtprotein	0,118	0,110	0,714	0,193
Kalium	0,142	0,152	0,883	0,138
LDH	0,179	0,149	0,847	0,059
Phosphat	0,861	0,400	0,316	0,363

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wird das Gemisch aus Spül- und Wundflüssigkeit von Wunden, die mit NPWTi behandelt werden, untersucht. Hierfür wird über die Dauer des stationären Aufenthalts täglich nichtinvasiv aus dem Drainagekanister eine Probe entnommen. Es werden verschiedene Parameter laborchemisch analysiert, um zu überprüfen, ob sich diese Methode dazu eignet, aus der extrahierten Flüssigkeit Informationen über die Zusammensetzung des Wundexsudats im Verlauf zu gewinnen. Alle untersuchten Faktoren sind in ausreichend hoher Konzentration vorhanden, um gemessen zu werden. Bei der statistischen Auswertung der Daten zeigen sich zum Großteil Ergebnisse, die mit den vorbekannten Abläufen der Wundheilung gut in Einklang zu bringen sind. Bei den zellulären Parametern kann bei den roten Blutzellen ein signifikanter Abfall der Konzentration an Tag zwei ($p=0,038$) und im Gegensatz dazu ein signifikanter Anstieg der neutrophilen Granulozyten an Tag eins ($p=0,028$) und der Monozyten an Tag zwei ($p=0,037$) gemessen werden. Dies ist vergleichbar mit der Hämostase und dem Beginn der Inflammationsphase. Bei den Zytokinen kommt es bei IL-6 ($p=0,011$) und TNF- α ($p=0,005$) bereits an Tag eins zu einem signifikanten Anstieg, ebenso bei IL-8 ($p=0,005$). Insgesamt passen auch diese Ergebnisse zur beginnenden Inflammationsphase.

Außerdem wird bei dieser Beobachtungsstudie untersucht, ob sich die Störfaktoren der Wundheilung – wie Diabetes mellitus, pAVK und mikrobiologische Besiedelung - messbar auf die Zusammensetzung des Wundexsudats auswirken. Beim Vergleich der Gruppen pAVK/keine pAVK ergeben sich bei den Messwerten der Neutrophilen und mononukleären Zellen an Tag zwei signifikant niedrigere Werte für die Gruppe mit pAVK ($p=0,039$, $p=0,047$). Die verringerte Anzahl von PMNs und MNCs an Tag zwei und drei in der Gruppe mit pAVK ist auf Grund der schlechteren Perfusion des Wundgebiets zu erwarten. Für die Gruppen Diabetes mellitus/kein Diabetes mellitus kann zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Da durch Diabetes mellitus Typ II eine Mikro- und Makroangiopathie und somit eine schlechtere Perfusion besteht, erwartet man eigentlich ähnliche Ergebnisse wie bei Patienten mit pAVK. Bei den Gruppen Bakterien/C. albicans/kein Keim kommt es an Tag drei zu signifikanten Unterschieden bezüglich der Konzentration von IL-8 und Monozyten ($p=0,012$, $p=0,049$). Dies deutet auf eine beginnende prolongierte Inflammationsphase hin und identifiziert die bakterielle Besiedelung als Einflussfaktor auf die Zusammensetzung des Wundexsudats.

4.1 Diskussion der Methoden

Im Moment fehlt eine geeignete Methode, um Wunden routinemäßig hinsichtlich ihres Wundstatus auf molekularer Ebene zu untersuchen. In vorhergehenden präklinischen Studien am Tiermodell kamen bereits einige invasive Methoden zum Einsatz, bei denen beispielsweise Stanzbiopsien aus Wunden am Rattenmodell entnommen wurden, um eine genetische Analyse durchzuführen (108). Auch am Menschen wurde diese Methode angewandt. Deonarine et al. führten in einer klinischen Studie zur Wundheilung genetische Analysen aus Stanzbiopsaten von Basalzellkarzinomen, die mit Imiquimod behandelt wurden, durch (109). Diese Methode scheint im Vergleich zur Methode dieser Studie sehr invasiv und kaum geeignet für den klinischen Alltag. Weniger invasiv als eine Biopsie ist die Untersuchung von Wundflüssigkeit. Häufig kommt hier die Folientechnik zum Einsatz, bei der sich unter einem Folienverband Wundflüssigkeit ansammelt. Anschließend wird der Verband mit einer Spritze punktiert oder die Flüssigkeit wird aus einliegenden Wundauflagen gewonnen, wie in Studien von Ligi et al. oder Trengove et al. (110,111). Es wurde auch bereits die Wundflüssigkeit aus Unterdruckverbänden untersucht. Bei einer Studie von Moues et al. erhielten 33 Patienten über zehn Tage entweder NPWT oder konventionelle Gazebehandlung bei komplexen Wunden (112). Für das Sammeln von Wundflüssigkeit wurden Polyvinylidenfluorid-Filter (Durapore-Membranfilter, Millipores, Amsterdam, Niederlande) verwendet. Diese wurden bei jedem Verbandswechsel zufällig über der Oberfläche der Wunden platziert, bis sie vollständig gesättigt waren. Um Flüssigkeit zu sammeln, muss nach der Methode von Moues et al. täglich der Verband geöffnet werden (112). Dies ist vor allem bei NPWT von Nachteil, da es mit einem erhöhten Leakage-Risiko und einem erhöhten Materialaufwand einhergehen kann. Außerdem wird ein Folienverband für NPWT standardmäßig unter sterilen Bedingungen im OP angelegt. Durch ein regelmäßiges Öffnen des Verbands können mehr Keime von außen ins Wundgebiet eindringen. Bei der hier untersuchten Methode hingegen muss nicht am Verband manipuliert werden, um eine Probe zu generieren. Vielmehr wird ein Abfallprodukt der Wundtherapie untersucht. Daher ist die hier erstmals erprobte Methode in Bezug auf die Invasivität anderen Methoden überlegen.

Im Vergleich zu anderen Studien, in denen Wundflüssigkeit analysiert wird, hebt sich die vorliegende Studie durch weitere Unterschiede ab. Zunächst erscheint die Kohorte mit 31 untersuchten Wunden gering. Im Vergleich zu anderen Studien, in denen Wundflüssigkeit untersucht wurde, wie die von Trengove et al. oder von Cerny et al., wurden allerdings mit acht und 22 Wunden vergleichbare Kohortengrößen erzielt (89,111). Besonders an der vorgelegten

Studie ist, dass die Messungen im Verlauf fast täglich durchgeführt und somit insgesamt 192 Proben gewonnen werden. In den vergleichbaren Studien von Trengove et al. und Cerny et al. wurden beispielsweise nur zwei Messungen, bzw. eine Messung an der Wundflüssigkeit pro Wunde durchgeführt, sodass hier insgesamt nur 16 bzw. 22 Exsudatproben gesammelt wurden. Durch die täglichen Messungen werden in der vorliegenden Studie die Umschlagspunkte, ab denen ein signifikanter Anstieg oder Abfall eines Faktors stattfindet, deutlich dargestellt. So kann in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es möglich ist, eine Wunde im Verlauf zu monitoren, ähnlich wie bei Blutwerten (87,90,111).

So können die Ergebnisse der zellulären Messparameter insgesamt als Beleg für die Genauigkeit der Methode gewertet werden. Die initiale Hämostase und der Beginn der Inflammation werden durch die Ergebnisse abgebildet. Von Tag null auf eins kommt es zu einem signifikanten Abfall von Erythrozyten und Anstieg von Neutrophilen, während die Monozyten, welche nach den Neutrophilen einwandern, erst an Tag zwei signifikant ansteigen (11).

Ein weiterer Vorteil ist die unmittelbare Verarbeitung der Flüssigkeitsproben und die Verwendung bereits etablierter Laborinstrumente und Methoden. Das Probenmaterial wird umgehend nach Abnahme in die Routinediagnostik des Universitätsklinikums Regensburg eingeschleust und dort prozessiert. So können methodische Fehler bei der Laborarbeit auf ein Minimum beschränkt werden.

Als hypothesengenerierende Pilotstudie mit verschiedenen Endpunkten ist keine Kontrollgruppe vorhanden. Andere Studien führen als Referenzwerte teilweise Serumkonzentrationen auf. Beispielsweise analysierten Polykandriotis et al. das Wundexsudat aus dem NPWT-Leitungssystem bezüglich der Konzentrationen systemisch verabreichter Antibiotika (113). So konnten sie eine Stunde nach der intravenösen Verabreichung fast zwei Drittel der Plasmakonzentration in der Wundflüssigkeit nachweisen (113). Dies belegt, dass das Wundmilieu im Austausch mit dem Blutkreislauf steht. Allerdings untersuchte Gohel et al. diesen Zusammenhang an unterschiedlichen Zytokinen und Wachstumsfaktoren bei chronisch venösen Ulcera (114). Dabei wurde keine Korrelation zwischen den Serumwerten der untersuchten Parametern und der Konzentration in Wundflüssigkeit festgestellt (114). Daher sind Serumwerte bei den hier untersuchten Parametern als Kontrollwerte zum Wundexsudat nur bedingt sinnvoll, weswegen sie nicht in die vorliegende Studie einfließen.

Des Weiteren lässt sich aus der hohen Amplitude der Standardfehler ableiten, dass Exsudat aus unterschiedlichen Wunden sehr verschieden hohe Konzentrationen bezüglich der Messparameter aufweist. Manche Wunden zeigen dabei bei allen Parametern hohe Werte,

andere bei allen niedrige. Der Versuch, gemeinsame Merkmale von Wunden mit besonders hohen Messwerten zu ermitteln, ist nicht erfolgreich. Weder durch die Zuordnung zu einem, im Rahmen dieser Studie näher diskutierten Merkmale wie Diabetes, pAVK oder mikrobielle Besiedelung, noch über andere Merkmale wie Wundalter oder Wundgenese, kann ein Zusammenhang hergestellt werden. In einer vorherigen Studie konnte ein Zusammenhang zwischen der Konzentration von Zytokinen und Wachstumsfaktoren in der Wundflüssigkeit chronisch venöser Ulcera und der Wundgröße gezeigt werden (114). Auch diesbezüglich kann in der vorliegenden Studie kein Zusammenhang hergestellt werden.

Auch zeigt sich eine große Spannbreite an Messwerten im Vergleich zu anderen Studien. Bei einer vergleichbaren Studie von Trengove et al. wurden beispielsweise Kaliumwerte zwischen 3,2 mmol/l und 5,7 mmol/l in der Wundflüssigkeit chronischer und akuter Wunden gemessen (111). Die Breite, der in unserer Studie gemessenen Mittelwerte für Kalium erstrecken sich von 0,25 mmol/l bis 1,41 mmol/l. Eine mögliche Erklärung für die große Spanne der Messwerte ist die ungleichmäßige Verdünnung durch das instillierte NaCl 0,9 %. Liegen zudem wenig Wundflüssigkeit und eine geringe sekretorische Aktivität der Wunde vor, ergibt sich durch die instillierte Flüssigkeit eine höhere Verdünnung als beim Vorliegen von reichlich Wundexsudat und einer hohen sekretorischen Aktivität der Wunde. Dies führt zusätzlich zu einer ungleichen Verdünnung. Sicherlich kommt es während der 20-minütigen Einwirkphase zu einer ausgleichenden homöostatischen Reaktion. Diese wird die anderen beiden Faktoren jedoch nur bedingt ausgleichen können. So scheint es umso schwieriger die Werte verschiedener Wunden miteinander zu vergleichen. Bei einer Messung im Verlauf, wie im Rahmen dieser Studie, lassen sich jedoch die Werte einer Wunde gut untereinander vergleichen.

Im Hinblick auf die Methodik weist die Studie weitere Limitationen auf. Die Langzeitverläufe bieten einen guten Überblick über alle gemessenen Werte. Jedoch sinkt hierbei die Fallzahl mit zunehmendem Tag fast kontinuierlich. Wie in Abbildung 4 zu sehen ist, sinkt die Anzahl der Messwerte bereits an Tag sieben auf unter 15 und ab Tag 13 befinden sich noch drei Fälle in der Messreihe. Außerdem verringert sich die Vergleichbarkeit der Werte untereinander ab Tag vier zusätzlich dadurch, dass zu unterschiedlichen Zeitpunkten erneute Debridements durchgeführt werden. Bei vielen Werten zeigen sich im Bereich der Debridements oder kurz danach Spitzenwerte. Durchschnittlich wird nach 5,4 Tagen der zweite und nach 10,9 Tagen der dritte Verbandswechsel mit Debridement durchgeführt. Insbesondere nach der zweiten Intervention lässt sich dies bei den polymorphnukleären und den mononukleären Zellen, IL-8, Kalium, LDH und Phosphat an den Mittelwerten erkennen. Bei der dritten Intervention ist der

Effekt bei allen Zellarten, IL-6, IL-8, TNF- α , VEGF und dem Gesamtprotein messbar. Debridements wirken sich also auf die Zusammensetzung der Wundflüssigkeit aus. Deshalb und auf Grund der nicht durchgängigen Messreihen und der abnehmenden Anzahl an Flüssigkeitsproben kann eine Interpretation der Gesamtdaten aller 18 Tage über eine deskriptive Analyse hinaus nicht durchgeführt werden. Um die Vergleichbarkeit zu erhöhen, sollte man in folgenden Studien ein striktes Messprotokoll erstellen und die Messungen nach den Debridements ausrichten. So würde sich die statistische Auswertbarkeit und damit die Aussagekraft erhöhen.

Des Weiteren kann bei der Darstellung der Langzeitverläufe die Verwendung von Mittelwerten anstatt des Medians diskutiert werden. Da es sich bei allen Messergebnissen um nicht normalverteilte Parameter handelt, wird bei der Darstellung eigentlich der Median dem Mittelwert vorgezogen. Denn dieser ist stabiler gegenüber Ausreißern. Dies lässt sich an den besonders hohen Amplituden der Standardfehler, speziell an den Tagen 13-15, erkennen. Hier sind die graphisch abgebildeten Mittelwerte nicht repräsentativ für die tatsächlich gemessenen Werte. Diese befinden sich weit unter- oder oberhalb des Mittelwertes. Im Rahmen dieser Arbeit wird sich dennoch für die Darstellung der Langzeitverläufe als Mittelwerte entschieden. Da die Messreihe ab Tag 13 zeitweise nur aus zwei Werten besteht, ist eine anschauliche graphische Darstellung mittels Medianen nicht möglich.

Insgesamt und beim Betrachten der Verläufe passen die Ergebnisse zur physiologischen Wundheilung und werden von vergleichbaren Studien untermauert.

4.2 Diskussion der Messwerte

4.2.1 Zellen

In der vorgelegten Studie können signifikante Mengen verschiedener Zellen in dem Gemisch aus Wund- und Spülflüssigkeit von NPWTi-Geräten quantifiziert werden. Aus der deskriptiven Analyse der Langzeitverläufe lassen sich einige Beobachtungen ableiten. Die ermittelten Langzeitverläufe der zellulären Bestandteile der Wundflüssigkeit zeigen ein Bild, das mit der Physiologie der Wundheilung in Einklang gebracht werden kann (6). So sinken die Erythrozyten von initial hohen Werten auf konstant niedrige Werte. Beim ersten chirurgischen Debridement werden häufig die Wundränder angefrischt, sodass es vermehrt zu Blutungen und demnach vermehrt zu Erythrozyten in der Wundflüssigkeit kommt. Zeichnet sich eine Tendenz zur Wundheilung ab, ist bei den folgenden Debridements kein radikales chirurgisches Vorgehen notwendig, was die konstant niedrigen Werte erklärt. Die Langzeitanalysen aller

kernhaltigen Zellen, der polymorphnukleären Zellen und der mononukleären Zellen verhalten sich ähnlich. Zunächst zeigen sich noch niedrige Werte, zeitlich überlappend mit der physiologischen Entzündungsreaktion zeigen sich dann im Verlauf erhöhte Werte.

Bei der statistischen Analyse der Zellkonzentrationen können interessante Ergebnisse interpretiert werden.

Die Anzahl der Erythrozyten fällt am zweiten postoperativen Tag signifikant ab ($p=0,038$). Bei den PMNs kommt es, konträr zu den Erythrozyten, bereits an Tag eins zu einem signifikanten Anstieg ($p=0,028$). Das vermehrte Auftreten von PMNs deutet auf den Beginn der entzündlichen Gewebereaktion hin. Granulozyten werden normalerweise nicht in der normalen Haut beobachtet. Sie sind Zellen des angeborenen Immunsystems. Daher ist ihre primäre Aufgabe, den Körper, und auch die Haut, schnell vor Infektionen zu schützen. Sie sind die ersten Zellen, die nach einer Hautverletzung in die Wunde einwandern (115). Dies wird unter anderem induziert durch die von den lokalen Zellen, wie Thrombozyten oder Fibroblasten, verursachte Chemotaxis und Zytokinproduktion (115,116). Der hier gemessene signifikante Anstieg an Tag eins lässt sich damit gut erklären.

Betrachtet man die mononukleären Zellen, also Monozyten, die in der Wunde zu Makrophagen ausdifferenzieren, zeigt sich ein signifikanter Anstieg der Konzentration an Tag zwei ($p=0,037$). Auch dies passt gut zu den physiologischen Vorgängen bei der Wundheilung, denn wie vorhergegangene Studien zeigen, folgen die Monozyten den Neutrophilen (116). Ihre Aufgabe ist die Phagozytose von Fremdkörpern aber auch von apoptotischen Neutrophilen. Durch deren Eliminierung wird die Entzündung in der Wunde beendet, hierfür sind die Makrophagen sehr wichtig (93,115,116).

Persistieren Neutrophile, besteht die Gefahr einer prolongierten Entzündung. Es gibt zahlreiche Studien, die die proinflammatorischen Mediatoren, welche von Neutrophilen produziert werden, untersuchen. Darunter fallen beispielsweise MMPs und ROS (116). Diese treten in chronischen Ulcera in erhöhter Konzentration auf und hemmen nachweislich die Wundheilung (91,116–118). Obwohl es sehr viele Studien zu den sezernierten Mediatoren der Neutrophilen gibt, fehlen für die Konzentration von Neutrophilen in der Wundflüssigkeit nach wie vor Referenzwerte, was einen direkten Vergleich mit anderen Studien schwierig macht. Monozyten und PMNs bilden zusammen den Großteil aller kernhaltigen Zellen in der Wundflüssigkeit ab. Genau wie bei PMNs und Monozyten kommt es auch bei der Messung aller Zellen in der Wundflüssigkeit zu einem signifikanten Anstieg an Tag zwei ($p=0,037$).

4.2.3 Zytokine und Wachstumshormone

Analog zu den Werten der Immunzellen sind die Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α bereits in den ersten Tagen erhöht. Sie sind als proinflammatorische Mediatoren wichtig für die initiale Inflammationsphase. Die Graphen von IL-6, IL-8 und TNF- α zeigen im Verlauf starke Schwankungen mit hohen Standardabweichungen. Eine mögliche Erklärung hierfür ist eine persistierende Inflammation mit entsprechend hohen proinflammatorischen Mediatoren in manchen Wunden, während andere Wunden den Wechsel in die Proliferationsphase vollziehen. Die Wachstumsfaktoren VEGF und bFGF zeigen hingegen einen schwankenden Verlauf, der durch die statistische Analyse im Folgenden noch genauer untersucht werden muss. Anders als die zellulären Parameter, wurden die Konzentrationen von Zytokinen und Wachstumshormonen in Wundflüssigkeit bereits in vielen Studien untersucht und ihre Eignung als Biomarker diskutiert (16,97). Um die gemessenen Werte generell in einen Zusammenhang zu bringen ist es sinnvoll, sie hinsichtlich ihrer Größe einzuordnen. IL-6 ist gemeinsam mit TNF- α ein zentrales proinflammatorisches Zytokin, welches besonders bei der Initiierung der Inflammationsphase wichtig ist (16). Grellner et al. untersuchte in einer Studie die Konzentration von IL-6 und TNF- α aus Hautbiopsien aus normaler Haut im Vergleich zu Biopsien aus akuten Wunden (119). Hierbei konnte für IL-6 ein Mittelwert von 205 pg/g, und für TNF- α von 1471 pg/g in normaler Haut ermittelt werden. Da bei den Messungen der Wundbiopsien starke individuelle Schwankungen bezüglich der Zytokinkonzentrationen auftraten, wurde für die statistische Auswertung ein Quotient aus dem Kontrollwert der gesunden Haut und dem Wert der Wunde gebildet (119). In der hier durchgeführten Studie ergaben sich Mittelwerte zwischen 311 - 7921 pg/ml für IL-6 und für TNF- α 8 - 206 pg/ml. Daraus könnte man, bei eingeschränkter Vergleichbarkeit der beiden Methoden, ableiten, dass IL-6 vermehrt in die Wundflüssigkeit sezerniert wird, während TNF- α im Gewebe höher konzentriert ist als in der Wundflüssigkeit. Vergleichbare Werte liefern Trengove et al. in ihrer Studie wurde ebenfalls die Konzentration von IL-6 und TNF- α in der Wundflüssigkeit von chronischen im Vergleich zu heilenden Wunden untersucht (87). Hierbei konnte ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden Gruppen ermittelt werden. Außerdem zeigte sich in unverdünnter Wundflüssigkeit chronischer Ulcera im Median eine Konzentration von 77762 pg/ml für IL-6 und 4732 pg/ml für TNF- α (87). Im Vergleich fällt auf, wie stark die Verdünnung durch die Instillationstherapie die Zytokinkonzentration beeinflusst. Insgesamt zeigt sich aber in der vorliegenden Arbeit bei beiden Parametern bereits am ersten Tag ein signifikanter Anstieg der Konzentration in der Wundflüssigkeit ($p=0,011$, bzw. $0,048$),

wie ihn auch Grellner et al. bei ihrer Studie an Hautbiopsien messen konnten (119). Auch in unserer Studie unterliegt die Konzentration von IL-6 und TNF- α starken individuellen Schwankungen. Dies zeigt, wie schwierig das Etablieren von Referenzwerten ist und, dass tägliche Messungen im Verlauf sinnvoll sind, um einzelne Wunden besser zu beurteilen.

Es existieren einige Studien, die die Funktion von Zytokinen als Biomarker für Wundheilung untersucht haben. Bei einer von Forsberg et al. durchgeführten Studie wurden Zytokinlevel in der Wundflüssigkeit akuter Wunden gemessen (120). Anschließend wurde versucht eine Vorhersage zu machen, welche Wunden heilen und welche nicht. Dabei wurde lediglich für die IL-13-Konzentration eine Korrelation mit der Heilungswahrscheinlichkeit gefunden (120). Des Weiteren wurde im Zuge vorhergegangener Studien ermittelt, dass die Zytokinwerte innerhalb einer Wunde stark schwanken. Aus diesem Grund und auch dadurch, dass die Zytokinkonzentration nicht zwangsläufig mit der Zytokinaktivität korreliert, bleibt der Einsatz von IL-6 und TNF- α als Biomarker für Wundheilung umstritten (16,119,121).

Ein weiteres wichtiges Zytokin ist IL-8. Es hat einen direkten Einfluss auf die Migration und Adhäsion von Keratinozyten, was die Wundheilung erheblich beeinflusst (122). Bei chronischen Wunden sind Untereinheiten des IL-8-Rezeptors, IL-8RB, deutlich vermindert und schränken damit seine Funktion ein, was zeigt, dass eine hohe Konzentration nicht unbedingt mit einer gesteigerten Aktivität einhergeht (122). Allerdings hat IL-8 eine starke chemotaktische Wirkung auf Neutrophile, wodurch es seine proinflammatorische Wirkung entwickelt (122). Bei den durchgeführten Messungen zeigt sich, ebenso wie bei IL-6, direkt ein Anstieg der Konzentration, sodass ein signifikanter Unterschied ($p=0,005$) an Tag eins ermittelt wird. Auch eine Studie von Bleidler et al. zeigte ergänzend signifikant erhöhte IL-8 Werte in chronischen Ulcera (123). Daraus lässt sich insgesamt zu den untersuchten Zytokinen ableiten, dass erhöhte Werte von IL-6, IL-8 und TNF- α mit einer verlängerten Inflammation und einer verzögerten Wundheilung einhergehen (123). Die im Rahmen unserer Studie ermittelten Daten fügen sich in das Bild der bisher gesammelten Erkenntnisse, dass die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α zu Beginn der physiologischen Inflamationsphase schnell ansteigen (87,121,123). Durch die seriellen täglichen Messungen können in der vorgelegten Studie die Messwerte von unterschiedlichen Tagen miteinander verglichen werden. Durch diese Methode könnte man, auch bei fehlenden Referenzwerten, Wunden mit dauerhaft hohen Zytokinleveln und somit prolongierter Inflamationsphase erkennen.

Auch Wachstumshormone werden in dieser Studie untersucht. VEGF ist ebenfalls ein wichtiger Spieler in der Wundheilungskaskade und maßgeblich an der Neoangiogenese im Bereich der Wunde beteiligt (124,125). Mit Mittelwerten zwischen von 672 pg/ml – 28 pg/ml zeigt sich die

Konzentration niedriger als bei vorherigen Studien mit unverdünnter Wundflüssigkeit. Ligi et al. konnten bei der Analyse von Wundflüssigkeit aus chronischen Ulcera eine signifikante Erhöhung von VEGF bei Ulcera in der Inflammationsphase im Vergleich zu Ulcera in der Granulationsphase ermitteln (110). Dies passt zu den Ergebnissen dieser Studie. Bereits am ersten Tag kann ein signifikanter Anstieg von VEGF in der Wundflüssigkeit gemessen werden ($p=0,004$). Zeitlich fällt dieser Anstieg mit der Inflammationsphase zusammen.

BFGF ist ein Wachstumsfaktor, der sich auf die Proliferation und Differenzierung von Fibroblasten auswirkt (41). Die Bedeutung für die Wundheilung von bFGF wurde in verschiedenen Studien mit bFGF knock-out Mäusen bewiesen. Durch eine Eliminierung von bFGF kam es zur verzögerten Wundheilung bei den Versuchsmäusen (41). In der Studie von Trengove et al. wurden Werte im Bereich von 44 – 1390 pg/ml gemessen (87). Die im Rahmen dieser Studie erhobenen Mittelwerte befanden sich zwischen 10 – 67 pg/ml und damit in einem viel niedrigeren Bereich als bei unserer Studie. Es kann kein signifikanter Anstieg ermittelt werden, auch wenn an Tag zwei ein Spitzenwert erreicht wurde ($p=0,066$). Insgesamt zeigte sich in der Studie von Trengove et al. kein signifikanter Unterschied zwischen der Konzentration von bFGF und anderen Wachstumsfaktoren in chronischen und heilenden Ulcera (87). Daraus leiten Trengove et al. ab, dass die Heilung eher von Zytokinen abhängig ist als von Wachstumsfaktoren. Diese These konnte durch nachfolgende Studien gestützt werden. Dafür wurden Fibroblasten aus chronischen und akuten Wunden bezüglich ihrer Reaktion auf Wachstumshormone untersucht (126). Es wurde festgestellt, dass Fibroblasten aus chronischen Wunden vermindert auf Wachstumsfaktoren reagieren und somit nicht nur ihre Konzentration ausschlaggebend für die Wirkung ist (87,97,126).

In einem systematischen Review von Burian et al. wurden 23 verschiedenen Studien, die insgesamt 38 unterschiedliche Zytokine und Wachstumshormone in chronisch venösen Ulcera untersuchten, miteinander verglichen (127). Größtenteils wurde Wundflüssigkeit analysiert, teilweise auch Biopsien oder Serumproben. Bei der Auswertung zeigte sich, dass in chronischen Ulcera erhöhte Level von IL-6, IL-8, TNF- α und VEGF vorliegen, diese nehmen im Zuge der Heilung ab (127). Eine Erhöhung von bFGF konnte hingegen nicht gemessen werden (127). In der hier durchgeführten Studie sind neben chronisch venösen Ulcera auch Wunden anderer Genese eingeschlossen. Deshalb sind die Ergebnisse bedingt vergleichbar. Allerdings zeigt sich auch bei den vorliegenden Messungen ein signifikanter Anstieg von IL-6, IL-8, TNF- α und VEGF. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass auch bei chronischen Wunden anderer Genese, wie z.B. Druckulzera, erhöhte Level von Zytokinen in der Wundflüssigkeit vorhanden sind (127). Eine generelle Herausforderung bei der Messung von

Zytokinen und Wachstumsfaktoren bleibt die Inkonsistenz ihrer Konzentration im Serum und Wundexsudat (97,121).

4.2.4 Elektrolyte, Laktatdehydrogenase, Gesamtprotein, pH-Wert

Betrachtet man die Langzeitverläufe von pH und Gesamtprotein, so sinken diese im Verlauf tendenziell ab. Beim pH-Wert ergeben sich im späteren Verlauf noch starke Schwankungen mit hoher Standardabweichung. Dennoch entsprechen die ermittelten Werte denen anderer Studien (128). Das Gesamtprotein hingegen verhält sich konträr zu den Erwartungen. In vorherigen Studien wurde ein signifikanter Anstieg von Protein in Wundflüssigkeit heilender Wunden festgestellt (111,112). Daher würde man bei optimaler Wundbehandlung und vorhandener Heilungstendenz einen Anstieg des Proteins erwarten, in dieser Studie sinkt es aber über die 18 Tage tendenziell ab. Bei den Langzeitverläufen der Elektrolyte und LDH lassen sich ebenfalls Beobachtungen machen. Kalium hat seinen Höchstwert bereits an Tag null und fällt dann tendenziell ab. Kalium ist ein wichtiger Elektrolyt, der für viele zelluläre Funktionen erforderlich ist und sich hauptsächlich innerhalb von Zellen befindet. Dass bedeutet, dass ein erhöhter Kaliumspiegel ein Indikator für erhöhten Zelluntergang sein kann. Dies ist mit dem vorhergehenden Debridement vereinbar. Auch LDH zeigt gleich zu Beginn einen hohen Wert. LDH ist ein Enzym, das in vielen Zellen vorkommt und bei ihrem Untergang freigesetzt wird. Ein erhöhter LDH-Spiegel kann somit auf Zellschäden oder einen erhöhten Zellabbau hinweisen. Kalium und LDH zeigen beide im Verlauf weitere Spitzen um die Zeitpunkte der Debridements. Diese chirurgischen Interventionen führen durch die Manipulation am Wundbett zu vermehrtem Zellstress und Zelluntergang, was die hohen Kalium- und LDH- Werte somit gut erklärt. Phosphat als weiterer Elektrolyt zeigt über den gesamten Verlauf unregelmäßige Schwankungen, obwohl man, da es sich ebenfalls um ein hauptsächlich intrazellulär vorkommendes Ion handelt, einen ähnlichen Verlauf wie bei Kalium erwarten würde.

Durch die statistische Analyse der Tage null bis drei können die gemessenen Werte besser mit vorgehenden Studien verglichen werden. In den ersten vier Tagen der Wundbehandlung kommt es hinsichtlich der Elektrolyte und LDH nur bei Phosphat zu einem signifikanten Abfall der Konzentration von Tag null auf Tag eins. Bei LDH, Kalium, Phosphat und Gesamtprotein kann ein eingeschränkter Vergleich der Ergebnisse mit einer Studie von Trengove et al. erfolgen (111). Bei dieser Studie wurde die Wundflüssigkeit aus acht chronischen Fußulzera untersucht. Es wurden je eine Probe in der chronischen Phase und je eine Probe im Heilungsverlauf entnommen. Diese Werte sind hinsichtlich ihrer Konzentration wieder nur bedingt mit den Werten dieser Studie zu vergleichen, da hier das Gemisch aus NaCl 0,9 % und der

Wundflüssigkeit untersucht wurde und somit mit einer Verdünnung unklaren Faktors zu rechnen ist. Im Vergleich zur vorliegenden Studie wurden nur zu zwei Zeitpunkten Proben entnommen, sodass eventuelle Schwankungen nicht berücksichtigt werden konnten. Bei dem in unserer Studie gewählten Studiendesign lässt sich der genaue Zeitpunkt eines statistisch signifikanten Anstiegs durch die fast täglichen Messungen genauer bestimmen. Trengove et al. bestimmten zum Vergleich Serumwerte (111). Diese ergaben für beide Gruppen im Median 4,9 mmol/l für Kalium, 1,16 mmol/l für Phosphat und 381 U/l für LDH und liegen Großteils in den für Serum angegebenen Referenzbereichen, bzw. leicht oberhalb davon. Kalium lag in der Wundflüssigkeit mit einem Median von 4,4 mmol/l signifikant unter dem Serumvergleichswert, während Phosphat mit 1,27 mmol/l leicht darüber lag. LDH, mit einem Wert von 5378 U/l zeigte sich in Wundflüssigkeit um ein Vielfaches und signifikant höher als im Serum (111). In unserer Studie ergeben sich für Kalium Mittelwerte zwischen 0,25 – 1,41 mmol/l, 0,03 – 0,16 mmol/l für Phosphat und 67- 878 U/l für LDH. Damit liegen alle Werte weit unter den Konzentrationen von Trengove et al., was zu erwarten war.

Kalium zeigt am ersten Tag nach dem initialen Debridement einen nicht signifikanten Anstieg. Die chirurgische Entfernung von infiziertem und entzündetem Gewebe beim Wunddebridement führt zur Zerstörung von Zellen. Da Kalium ein hauptsächlich intrazellulär vorkommender Elektrolyt ist, könnte man mit einer Erhöhung der Kaliumkonzentration unmittelbar nach dem Debridement rechnen. Möglicherweise wurde das durch das Debridement an Tag null anfallende Kalium durch die vor der Messung durchgeführte NPWTi bereits vor der Probensammlung ausgespült. Eine weitere mögliche Erklärung ist, dass die Werte durch den in der Inflammationsphase physiologischen Zelluntergang konstant auf hohem Niveau verbleiben und deshalb keine signifikante Änderung zeigen. Auch Phosphat ist ein Elektrolyt, der intrazellulär in höherer Konzentration vorliegt als extrazellulär. Insgesamt befindet sich der größte Anteil als Calciumphosphat im Knochen gebunden, nur ca. 15 % befinden sich intrazellulär, während ca. 1 % extrazellulär zu finden ist (129,130). Der signifikante Abfall von Tag null auf Tag eins lässt sich somit möglicherweise mit dem Ausspülen von Phosphat aus dem Wundbett durch NPWTi und der anschließend nur langsam beginnenden Inflammation erklären. Ein hoher Phosphatwert könnte außerdem auf eine ossäre Beteiligung der Wunde hindeuten. Kalium und Phosphat wurden von Trengove et al. nicht weiter statistisch untersucht, weitere Studien, in denen Kalium und Phosphat in Wundflüssigkeit analysiert werden, fehlen. Um definitive Aussagen zu treffen, sind weitere klinische Studien notwendig. LDH ist bei onkologischen Erkrankungen als Serummarker für Zelluntergang bereits im klinischen Alltag etabliert (131,132). LDH könnte also auch in Wunden dafür geeignet sein,

erhöhten Zelluntergang, wie er im Rahmen einer prolongierten Inflammationsphase vorkommen kann, zu detektieren. In den von uns untersuchten vier Tagen kommt es zu keiner signifikanten Veränderung der LDH-Konzentration in der Wundflüssigkeit. Leider fehlen weitere Studien, um diese Ergebnisse in einen Kontext zu setzen. Es sollten weitere klinische Studien durchgeführt werden, die den Zusammenhang zwischen der LDH-Konzentration in der Wundflüssigkeit und einer prolongierten Inflammationsphase untersuchen.

Bei der Untersuchung des Gesamtproteins ergaben sich in der bereits oben aufgeführten Studie von Trengove et al. in der Wundflüssigkeit ungefähr halb so hohe Konzentrationen wie im Serum (111). Es kam beim Vergleich der im chronischen und im heilenden Stadium entnommenen Proben jedoch zu einem statistisch signifikanten Anstieg der Konzentration (111). Auch in einer Arbeit von Moues et al. konnte gezeigt werden, dass es in Wunden mit einer Heilungstendenz zu einem signifikanten Anstieg des Albumins in der Wundflüssigkeit kam, während in Wunden bei denen sich ein chronischer Verlauf abzeichnete, ein signifikanter Abfall detektiert werden konnte (112). Die Konzentration des Proteins in der Wundflüssigkeit scheint demnach Aussagekraft zu besitzen. In der vorliegenden Studie kann allerdings kein signifikanter Anstieg oder Abfall ermittelt werden. Dies könnte daran liegen, dass der statistisch untersuchte Zeitraum von vier Tagen zu kurz ist, um eine signifikante Veränderung zu detektieren, da die Inflammationsphase an Tag vier noch nicht abgeschlossen ist.

Der pH-Wert der Hautoberfläche (ss-pH) liegt regulär zwischen 5,4 und 5,9 und kann abhängig von äußeren Faktoren wie Alter und Lokalisation auch Werte zwischen 4 – 6,3 annehmen (133). Im Bereich von Wunden ist diese azide Barriere in ihrer Integrität gestört und das darunterliegende Gewebe mit dem pH-Wert von ca. 7,4 ist exponiert (133–135).

Daher ist ein Wund-pH-Wert höher als der reguläre ss-pH. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen dieser Studie. Generell ist beim Vergleich der hier erzielten Ergebnisse ein gewisser Verdünnungseffekt durch die Instillationsflüssigkeit zu berücksichtigen. Da die Wunde während der Instillationsphase für 20 Minuten im Kontakt mit der instillierten Flüssigkeit steht kommt es vermutlich zu einem homöostatischen Austausch, welcher diesen Verdünnungseffekt sicherlich abschwächt, sodass sich der Faktor der Verdünnung nicht allein über das applizierte Volumen im Verhältnis zur Wundgröße ermitteln lässt. Zudem sind in der Wundflüssigkeit vermutlich auch physiologische Puffersysteme wie Posphat oder HCO_3^- enthalten, die weiteren Einfluss auf den pH-Wert haben.

Mit Mittelwerten zwischen 6,9 – 7,18 sind die pH-Werte dennoch vergleichbar mit denen, von sechs Tage alten Spalthautentnahmestellen. Diese wurden von Schreml et al. im Rahmen einer Studie untersucht (136). Hierbei wurde eine kontinuierliche Abnahme des pH-Wertes vom Tag

der Intervention bis zur Wiederherstellung der aziden Hautbarriere ermittelt. Da Spalthautentnahmestellen akute Wunden sind, bilden die Ergebnisse von Schreml et al. die physiologischen Abläufe der Wundheilung ab (136). In der Theorie sollen komplexe Wunden durch ein chirurgisches Debridement in eine akute Wunde überführt werden, dementsprechend könnte man im Rahmen dieser Studie ähnliche pH-Werte erwarten wie in der Studie von Schreml et al. Auch bei den hier durchgeführten Messungen zeigt sich bis zu Tag zwei ein signifikanter ($p=0,033$) Abfall des pH-Wertes. Dann steigt der Wert allerdings wieder leicht an. Nicht bei allen komplexen Wunden gelingt nach dem ersten Debridement die Transformation zur akuten heilenden Wunde und weitere Interventionen sind notwendig. Daher sollten die Ergebnisse auch mit Studien über chronische Wunden verglichen werden. Generell befindet sich der pH-Wert chronischer Wunden eher im alkalischen Bereich. Greener et al. untersuchten den pH-Wert der Wundflüssigkeit chronischer Wunden (137). In 19 Proben konnten Werte zwischen 7,5 und 8,9 ermittelt werden, was im Vergleich zu den Ergebnissen dieser Studie hoch ist (137).

Auerswald et al. untersuchten chronische Wunden nach Strahlentherapie (103). Diese zeigten im Mittel einen pH-Wert von 7,53 und sind somit eher vergleichbar mit unseren Ergebnissen (103).

Bei kutanen Wunden sind viele Faktoren der Heilungskaskade, z. B. Enzyme wie Matrixmetalloproteinasen und Kollagenasen pH-abhängig. Außerdem hat der pH-Gradient im Wundbett Auswirkungen auf die zelluläre Funktion (138). Daher ist der pH-Wert essenziell für die Wundheilung. Aus diesem Grund haben sich viele Studien ausschließlich mit ihm beschäftigt und ausgefeilte Methoden entwickelt, um den pH-Wert in verschiedenen Wundbereichen exakt zu bestimmen (101,103,135). In unserer Studie wurde der pH-Wert durch die Routinediagnostik mit etablierten Geräten gemessen, was gegenüber den anderen Methoden einen klaren zeitlichen und wirtschaftlichen Vorteil bringt. Allerdings ist der pH-Wert in Wunden ein vieluntersuchtes Thema und es bleibt fraglich, ob die hier angewandte Methodik beispielsweise im Vergleich zu 2D-luminescence-Messungen, wie von Schreml et al. (139) und Auerswald et al. (103) durchgeführt, der Komplexität des Themas gerecht wird. Hier zeigte sich ein zentripetal abnehmender pH-Gradient in Wunden (103,136). Dennoch hat die Messung des pH-Wertes aus dem Abfallprodukt der NPWTi Potential, in der klinischen Praxis Anwendung zu finden. Geht man von einem kontinuierlich abfallenden pH-Wert über die Dauer der Wundheilung aus, so könnte die hier verwendete Methode genutzt werden, um Wunden zu identifizieren, die von diesem Muster abweichen, um therapeutisch zu intervenieren.

4.3 Einfluss von DM Typ II und pAVK auf die Zusammensetzung der Wundflüssigkeit

An den Tagen 0-3 wird untersucht, ob das Vorliegen einer pAVK und/oder DM Typ II die Zusammensetzung der Wundflüssigkeit beeinflussen. Bei beiden Erkrankungen kommt es in der Folge zu einer Angiopathie, die wiederum zu einer verringerten Perfusion und somit Minderversorgung im Wundgebiet führt, sodass eine Beeinflussung des Mikromilieus der Wunde denkbar ist (140). Während bei einer pAVK eine arterielle Makroangiopathie führend ist, kommt es beim Diabetes mellitus zusätzlich zu einer Beteiligung der kleinen arteriellen Gefäße im Sinne einer Makro- und Mikroangiopathie (37).

Beim Vergleich der Gruppen pAVK/keine pAVK zeigen sich bei den Messwerten der PMNCs, MNCs und VEGF jeweils an Tag zwei signifikante Unterschiede ($p=0,039$, $p=0,047$, $p=0,039$). Hierbei liegen die Werte der pAVK-Patienten immer unterhalb der Vergleichsgruppe.

Durch die verminderte Perfusion im Gewebe bei pAVK kommt es zu einem Sauerstoffmangel. Da Hypoxie die vermehrte Produktion von VEGF induziert (125), könnte man davon ausgehen, dass in Wunden von pAVK-Patienten erhöhte Werte von VEGF gemessen werden können. Dies ist in der vorliegenden Arbeit nur an Tag null und Tag eins der Fall.

In früheren Arbeiten zeigten sich erhöhte VEGF-Plasmaspiegel bei pAVK (141). Allerdings ist hier wichtig zu beachten, dass VEGF, insbesondere VEGF-A, in verschiedene Unterformen gespleißt wird, die auch antiangiogenetisch wirken können (40,141). So konnten Kikuchi et al. am Mausmodell zeigen, dass bei pAVK vermehrt die antiangiogene Form von VEGF-A zirkuliert, während die angiogen wirksame Unterform vermindert ist (40). Das zeigt, dass ein erhöhter VEGF-Spiegel nicht unbedingt mit einer erhöhten Angiogenese einhergehen muss. Zudem bleibt ein Vergleich von Plasma- mit Wundflüssigkeitskonzentrationen schwierig. Studien, in denen die Wundflüssigkeit von pAVK-Patienten bezüglich des VEGFs untersucht wurden, fehlen. Außerdem interessant ist aber, dass VEGF seine angiogene Wirkung über die Erhöhung der Gefäßpermeabilität entfaltet. Gleichzeitig werden so Endothelzellen, aber auch Makrophagen, chemotaktisch in das Wundgebiet gelockt (124). Da VEGF bei Patienten mit pAVK in der Vorliegenden Studie erniedrigt ist, könnte man durch diese Wirkweise auch die signifikant niedrigere Anzahl von PMNs und MNCs an Tag zwei in der Wundflüssigkeit erklären. Betrachtet man auch die weiteren Tage ohne signifikanten Unterschied zeigen sich bezüglich den MNCs durchgehend niedrigere Werte als in der Vergleichsgruppe.

Obwohl im Falle der Erythrozyten kein signifikanter Unterschied ermittelt werden kann, zeigen sich an den Tagen null und eins deutlich niedrigere Mediane in der Gruppe der pAVK. Dies könnte das Ergebnis der durch die pAVK verschlechterte Durchblutung sein.

Beim Vergleich der Gruppen DM Typ II/kein DM Typ II kann bei keinem Parameter ein signifikanter Unterschied ermittelt werden. Bezüglich des pH-Wertes zeigte sich auch in einer von Dissemond et al. durchgeführten Studie kein Unterschied zwischen Wunden von Diabetikern und Wunde von Nichtdiabetikern (142). Diese Ergebnisse können im Rahmen unserer Studie bestätigt werden.

Auch über die Auswirkung von DM Typ II auf Zytokine und Wachstumsfaktoren sind einige Erkenntnisse vorhanden. Lee et al. untersuchten am Mausmodell die Auswirkungen von Hyperglykämie auf die IL-6-Produktion (39). Sie stellten dabei bei an DM Typ II erkrankten Mäusen eine verzögerte Wundheilung fest, die mit einer höheren Sekretion von IL-6 und dessen Rezeptor in der Wunde einherging als bei der Kontrollgruppe (39). In unserer Studie zeigen Patienten mit DM Typ II keinen signifikanten Unterschied in Bezug auf IL-6. Zu Beginn liegen die IL-6 Werte der Diabetiker noch über der Kontrollgruppe, aber bereits an Tag eins werden sie von ihnen überholt. Andere Studien, die die IL-6 Konzentration in humaner Wundflüssigkeit von Diabetikern mit Nichtdiabetikern vergleichen, fehlen. In verschiedenen Diabetes Tiermodellen wurden aber erhöhte IL-6 Werte in Wunden gemessen (143).

Die Messwerte der Diabetiker für IL-8 liegen in unserer Studie an den Tagen null bis zwei höher als die der Nichtdiabetiker. Auch Meng et al. untersuchten das Wundexsudat diabetischer Ulzera und fanden dort signifikant erhöhte IL-8 Konzentrationen von bis zu 600 pg/ml (144). Darüber hinaus führte die in-vitro-Stimulation von Fibroblasten der Unterarmhaut mit Glykierungsendprodukten, wie sie bei Diabetes mellitus vorkommen, zu einer 30-fachen Erhöhung der IL-8-Produktion im Vergleich zur Kontrollgruppe (144). Auch andere Studien konnten erhöhte IL-8 Konzentrationen in diabetischen Wunden messen. Dadurch, dass IL-8 chemotaktisch auf Neutrophile wirkt, wird ihm eine Schlüsselrolle bei der Aufrechterhaltung der Inflammation in diabetischen Wunden zugeschrieben (38,145,146). Auch in unserer Studie zeigen Diabetiker im Vergleich zu Nichtdiabetikern tendenziell höhere IL-8-Werte, was mit den Ergebnissen vorhergehender Studien vergleichbar ist.

Ein weiteres zentrales Zytokin, das vorwiegend von Makrophagen produziert wird und eine proinflammatorische Reaktion auslöst, ist TNF- α (147). Siqueira et al. untersuchten die Rolle von TNF- α bei der Wundheilung an diabetischen Mäusen (148). Im Vergleich zu nicht-diabetischen Mäusen fanden sie erhöhte Apoptoseraten bei Fibroblasten und einen dreifach so

hohen TNF- α -Spiegel. Eine systemische Hemmung von TNF- α führte zu weniger Apoptose und einer verbesserten Wundheilung (148). Auch in unserer Studie zeigen Patienten mit Diabetes im Median durchgehend höhere Werte als die Nichtdiabetiker.

Cerny et al. untersuchte bereits Wundflüssigkeit aus Okklusivverbänden von 22 Patienten, davon 11 mit DM Typ II (90). Auch hier zeigten sich höhere Konzentrationen von LDH und VEGF-A, allerdings war der Unterschied zur Kontrollgruppe ohne DM Typ II nicht signifikant. Der Einfluss der Wundflüssigkeit auf die Neoangiogenese und Migration der Fibroblasten in einer Zellkultur war im Vergleich zur Wundflüssigkeit aus Wunden von Nichtdiabetikern jedoch signifikant erhöht (90). Auch in unserer Studie zeigen sich an den ersten beiden Tagen erhöhte Werte von VEGF, allerdings ohne signifikanten Unterschied. VEGF ist der bekannteste proangiogenetische Wachstumsfaktor der Wundheilung und eine inadäquate lokale Angiogenese spielt vermutlich eine wichtige Rolle bei diabetischen Wunden (149). In einer Arbeit von Krisp et al. konnte aber zudem im Exsudat diabetischer Wunden im Vergleich zum Exsudat von Spalthautentnahmestellen eine verringerte Konzentration anderer proangiogener Proteine identifiziert werden (150). Diese scheinen demnach neben VEGF ebenfalls einen Einfluss zu haben.

BFGF ist ein wichtiger Faktor und für Zellmigration, -wachstum und -differenzierung. Bei diabetischen Wunden konnte eine verzögerte Wundheilung, insbesondere eine geringere Zellmigration, mit der Hemmung des bFGF-Signalwegs in Verbindung gebracht werden (151). In unserer Studie ergeben sich bei den Diabetikern durchgehend höhere Konzentrationen bezüglich bFGF. Dies könnte somit an einer Gegenregulation liegen, um den gehemmten Signalweg zu kompensieren. Yang et al. untersuchte die Auswirkung von NPWT auf diabetische Wunden im Vergleich zur konventionellen Mulltherapie, hierbei zeigten sich signifikant erhöhte bFGF-Level in der NPWT-Gruppe (152). Diabetische Wunden reagieren auf NPWT also mit einer vermehrten Produktion von bFGF, was eine weitere Erklärung für die hohen Werte sein kann.

Insgesamt bleibt für alle Ergebnisse der pAVK und Diabetes-Gruppen eine gewisse Studienlimitierung zu beachten. Es erfolgt keine genaue Einteilung hinsichtlich der Schwere der pAVK bzw. dem Stadium der diabetischen Polyneuropathie oder Vaskulopathie. Für die Wundumgebung macht es einen Unterschied, ob der Patient an einer pAVK im Stadium I oder im Stadium IV leidet. Bereits ab Stadium III nach Fontaine kommt es im betroffenen Bereich zu einer kritischen Ischämie, was sich definitiv stärker auf die Wundheilung auswirkt, als ein Stadium I. Analog zur pAVK wird auch beim Diabetes mellitus nicht anhand des HbA1cs bestimmt, wie gut dieser eingestellt ist. Wie in der Einleitung beschrieben korreliert die

Einstellung des HbA1cs mit der Wundheilung. Dies kann im Rahmen dieser Studie auf Grund der geringen Fallzahl nicht berücksichtigt werden. So bleibt die Frage, ob pAVK und Diabetes mellitus die Zusammensetzung der Wundflüssigkeit beeinflussen, durch die Ergebnisse dieser Studie nicht eindeutig beantwortbar. Vorhergehende Studien konnten bereits Daten liefern, die darauf hinweisen, dass Diabetes Mellitus und pAVK das Mikromillieu von Wunden beeinflussen (39,40,146,148,151). Daher sollten zukünftige Studien mit größerer Kohorte und unter Berücksichtigung des Krankheitsstadiums durchgeführt werden.

4.4 Einfluss der mikrobiologischen Besiedelung auf die Zusammensetzung der Wundflüssigkeit

Bei der Analyse des Einflusses der mikrobiellen Besiedelung auf die Zusammensetzung der Wundflüssigkeit erfolgt die Unterteilung in die Gruppen „bakterieller Befall“, „Befall mit *Candida albicans*“ und „kein Keim“. Der Kategorie „kein Keim“ werden Wunden zugeteilt, in denen, durch einen intraoperativen Abstrich mit anschließender mikrobiologischer Anzucht keine Erreger nachgewiesen werden kann. Vor der Diskussion konkreter Ergebnisse soll hier verdeutlicht werden, dass eine Wunde bereits kurz nach ihrer Entstehung mit Bakterien besiedelt ist. Diese wandern von der umliegenden Haut und der Umwelt ein. Dementsprechend gibt es keine chronische Wunde ohne bakterielle Besiedelung (45). Eine Beeinträchtigung der Wundheilung findet erst ab einer Anzahl von 10^5 Bakterien statt, man spricht dann von einer kritischen Kolonialisierung (153). Die Bakterien können sich hierbei an der Wundoberfläche, aber auch unterhalb der Wundoberfläche ansiedeln. Durch einen oberflächlichen Wundabstrich können also nicht alle Bakterien detektiert werden, vor allem nicht solche, die in tieferen Gewebeschichten sitzen. Dennoch ist der Wundabstrich und die anschließend semiquantitative Analyse der Keimzahl die Routinediagnostik bei Verdacht auf eine kritische Kolonisierung bzw. Wundinfektion (153).

Bei der Untersuchung ergibt sich in dieser Studie für die MNCs ($p=0,012$) und IL-8 ($p=0,049$) an Tag drei ein signifikanter Unterschied zwischen den drei Gruppen. Schon 1985 konnten Laato et al. am Mausmodell erhöhte Konzentrationen von MNCs und Makrophagen in der Wundflüssigkeit von mit *S. aureus* besiedelten Wunden detektieren (154), wie sie auch in unserer Studie ermittelt werden.

Zu IL-8 wurden in Zusammenhang mit der mikrobiellen Besiedelung von Wunden noch keine Untersuchungen des Wundexsudats durchgeführt. Insgesamt ist eine Erhöhung von IL-8 in

bakteriell besiedelten Wunden aber vermutlich mit der, durch die Bakterien tendenziell verstärkte, Inflammation im Wundbett erklärbar.

Auch bei der Betrachtung der nichtsignifikanten Ergebnisse lassen sich interessante Beobachtungen machen. Über die Mediane der Gruppen mit blandem Wundabstrich und die mit nachgewiesenem bakteriellem Befall lässt sich ableiten, dass die Anwesenheit von Bakterien die Konzentration von proinflammatorischen Zellen und Zytokinen fördert. Kunimitsu et al. konnten ein Mausmodell für kritisch kolonisierte Wunden etablieren und fanden in den Wunden eine signifikante Erhöhung der PMNs (155). Auch wir können diese Ergebnisse bestätigen. So zeigen neben den MNCs auch die PMNs in den Wunden mit bakterieller Besiedelung einen konstanten Anstieg, während in den Wunden ohne Keimnachweis die Werte nach einem Peak an Tag zwei abfallen. Diese Entwicklung in unterschiedliche Richtungen zeigt die Aktivität der Inflammation auf. Die Werte der *C. albicans* Gruppe liegen im Fall der PMNs zwischen denen der anderen. Auch bei IL-6 liegen die Mediane der Gruppe mit bakteriellem Befall über den Vergleichsgruppen. Dies passt zu den Ergebnissen von Secor et al., die in-vitro die Auswirkungen eines durch *S. aureus* gebildeten Biofilms auf die Zytokinproduktion von Keratinozyten untersuchten (156). Auch hier zeigten sich in Anwesenheit von *S. aureus* signifikant erhöhte IL-6 Level (156). Fahey et al. untersuchten am Mausmodell die TNF- α Sekretion von Fibroblasten. Hierfür wurden Fibroblasten aus chronischen Wunden durch Lipopolysaccharide (LPS), wie sie an der Membran gramnegativer Bakterien vorkommen, stimuliert (157). Es zeigte sich, dass Fibroblasten aus chronischen Wunden erhöhte Mengen an TNF- α produzieren, wenn sie LPS ausgesetzt sind. Als Kontrollgruppe wurden Fibroblasten gesunder Mäuse verwendet. Dies zeigte, dass Fibroblasten unterschiedliche Phänotypen aufweisen und Wundfibroblasten in der Gegenwart von Bakterien vermehrt TNF- α produzieren (157). Auch in unserer Untersuchung gibt es einen stetigen TNF- α -Anstieg in der Gruppe mit bakterieller Besiedelung mit höheren Werten an den Tagen zwei und drei. Auch hier verhalten sich die Messwerte der *C. albicans* Gruppe anders, was sich in niedrigeren TNF- α -Werten zeigt.

Zusammengefasst führt also eine bakterielle Besiedelung oder Infektion in Wunden sehr wahrscheinlich zu einer Erhöhung proinflammatorischer Zytokine und Zellen und somit zur Verlängerung der Inflammationsphase. Dies gehört zu den bekannten Pathomechanismen der Wundheilungsstörung und auch wir können diese Ergebnisse durch unsere Studie bestätigen. Interessant ist auch der Verlauf des pH-Wertes in bakteriell besiedelten Wunden. Im Vergleich zu den Wunden ohne Keimnachweis werden an allen vier Tagen niedrigere Werte gemessen. Ein niedriger pH-Wert hemmt tendenziell das Wachstum humanpathogener Keime (128). Im

Hinblick darauf erscheinen die Ergebnisse widersprüchlich. Man würde eher in Wunden ohne bakterielle Besiedelung niedrige pH-Werten erwarten, da der pH-Wert im Verlauf der Heilung bis zum Erreichen des leicht aziden ss-pH abnimmt, ferner wird die Biofilmbildung und bakterielles Wachstum im alkalischen Milieu begünstigt (158). Gleichzeitig muss erneut berücksichtigt werden, dass es durch die Instillation von NaCl zu einer gewissen Verdünnung der Wundflüssigkeit kommt, welche sich auf den pH-Wert auswirkt.

Die Diskussion der Gruppe, der mit *Candida albicans* besiedelten Wunden bleibt aufgrund der geringen Anzahl der Messwerte zwischen eins und drei schwierig und lässt keine sinnvolle Auseinandersetzung zu. In Bezug auf die proinflammatorischen Zytokine wie IL-8 zeigt die *C. albicans* Gruppe sogar niedrigere Werte im Vergleich zur Gruppe ohne Keimnachweis. Dies verdeutlicht, dass eine Einteilung in einer gesonderten Gruppe in unserem Fall sinnvoll ist, da sich die Messwerte stark von denen mit bakterieller Besiedelung unterscheiden und eine Verzerrung der Ergebnisse verursachen würden. Allerdings führt die Einteilung in eine gesonderte Gruppe auch zu weniger statistisch signifikanten Ergebnissen.

Auch sollte man über die Zuordnung der Gruppen mittels intraoperativem Wundabstrich diskutieren. Laut Healy und Freedman et al. ist eine Wunde ab 10^5 koloniebildenden Einheiten pro Gramm Wundgewebe eine kritisch kolonisierte Wunde, die in ihrer Heilung eingeschränkt ist (153). Eine Besiedelung unterhalb dieses Wertes wird als Kontaminierung oder Kolonialisierung beschrieben (153). Um eine Wundinfektion handelt es sich, sobald lokale Entzündungszeichen wie Rötung, Schwellung und Überwärmung bzw. eine Veränderung des Wundexsudats auftreten. Diese Abstufungen sind in Bezug auf die Wundheilung sehr wichtig, da alle Wunden ein Mikrobiom besitzen. Durch eine Kontaminierung oder Kolonialisierung kommt es aber nicht zwangsweise zu einer verzögerten Heilung. Diese tritt erst durch die kritische Kolonialisierung oder eine Wundinfektion ein (153). Die genaue Quantität der Bakterien kann mit der Methode des oberflächlichen Wundabstrichs nicht ermittelt und somit auch nicht bei der Gruppeneinteilung berücksichtigt werden.

Neben der Bakterienanzahl zeichnet sich auch ab, dass bestimmte Bakterienstämme besonders schlecht für die Wundheilung sind. So sind beispielsweise Staphylokokken und *Pseudomonas aeruginosa* besonders häufig für die Ausbildung eines Biofilms in chronischen Wunden verantwortlich (159). Dies ist hinderlich für die Wundheilung, da ein Biofilm eine Barriere gegenüber Immunzellen und Antibiotika darstellt und so die Chronifizierung der Entzündung bewirken kann (159). Auch in unserer Studie wurden in 14 Wunden Staphylokokken und in drei *P. aeruginosa* nachgewiesen. Darüber hinaus gibt es besonders virulente Stämme, die gewebeschädigende Proteasen produzieren. Die Aktivität dieser Proteasen wurden von Serena

et al. im Rahmen einer multizentrischen Studie untersucht (160). Hierbei zeigte sich, dass der Nachweis einer erhöhten bakteriellen Proteaseaktivität zum frühen Detektieren von Wundinfektionen geeignet ist (160). Deshalb muss in zukünftigen Studien, gegebenenfalls unter Einsatz einer weiterführenden Methodik, neben der genauen Quantifizierung, auch die Auswirkungen verschiedener Bakterienstämme auf die Zusammensetzung des Wundexsudats untersucht werden. Denn um suffizient antibiotisch zu behandeln, sollten vor allem die virulenten Stämme im Wirkspektrum des Antibiotikums liegen, um eine Resistenzbildung und Überkolonialisierung zu verhindern. Insgesamt können wir mit unseren Ergebnissen bestätigen, dass sich die mikrobielle Besiedelung auf die Zusammensetzung des Wundexsudats auswirkt. Es zeigen sich erhöhte Konzentrationen proinflammatorischer Zellen und Zytokinen in bakteriell besiedelten Wunden.

4.5 Fazit und Ausblick

In dieser Studie können wir die bei der Behandlung chronischer Wunden etablierte NPWTi nutzen, um wichtige Informationen über die unter dem Verband ablaufende Inflamationsphase zu sammeln.

In einem nächsten Schritt könnte, unter Optimierung der Methodik und Auswertung weiterer Proben, die Exsudatanalyse als nützliches Überwachungsinstrument validiert werden. Beispielsweise könnte die regelmäßige Messung der Erythrozyten – ggf. auch unter Nutzung von künstlicher Intelligenz – der Erkennung einer erneuten Blutung dienen. So könnte die Patientensicherheit erhöht werden. Darüber hinaus könnte der Wundstatus im Hinblick auf eine persistierende Inflammation, durch Zunahme der proinflammatorischen Zellen wie PMNs, überwacht werden. Ähnliche Technologien, wie die konventionelle NPWT, könnten ebenfalls weiter untersucht werden, da auch bei dieser Methode Wundflüssigkeit wenig invasiv entnommen werden kann. Außerdem sollten weitere Faktoren, die die Wundheilung beeinflussen im Wundexsudat untersucht werden, um daraus in Zukunft eine Optimierung der Wundheilung erreichen zu können.

5. Zusammenfassung

Aufgrund des demographischen Wandels und lebensstilbedingten Erkrankungen wie DM Typ II leiden immer mehr Menschen an komplexen Wunden, deren Therapie eine Herausforderung ist und einer interdisziplinären Herangehensweise bedarf. Die Unterdrucktherapie mit Instillation ist eine etablierte Behandlungsmöglichkeit bei komplexen Wunden. In dieser Studie erfolgt die Untersuchung der Zusammensetzung des Wundexsudats während der NPWTi mit dem Ziel, ein Monitoringtool für die Vorgänge unter dem über mehrere Tage versiegelten Verband zu etablieren. Außerdem soll der Einfluss von pAVK, DM Typ II und der mikrobiellen Besiedelung auf das Wundexsudat untersucht werden.

Es wird das Exsudat von 31 durch NPWTi versorgte Wunden untersucht. Die Instillation erfolgt alle vier Stunden mittels isotoner Kochsalzlösung über einen Zeitraum von 20 Minuten. Dazwischen erfolgen Phasen mit kontinuierlichem Unterdruck von -125 mmHg. Die Probenentnahme erfolgt unmittelbar nach einer Instillationsphase. Die Analyse von Kalium, LDH, Phosphat, pH, IL-6, IL-8, TNF- α und der zellulären Bestandteile erfolgt über eine etablierte klinische Routinediagnostik. Die laborchemische Bestimmung von VEGF, bFGF und Gesamtprotein erfolgt im Anschluss gesondert. Die Beurteilung des Wundexsudats im Verlauf für eine einzelne Wunde ist durch die angewendete Methode möglich und wenig invasiv. Zellen, Zytokine und Wachstumshormone können in sinnvoller Konzentration quantifiziert werden. Die statistische Auswertung der Tage null bis drei ergibt einen signifikanten Abfall der Erythrozyten und des pH-Werts an Tag zwei ($p=0,038$, $p=0,033$), einen signifikanten Anstieg der Neutrophilen an Tag eins ($p=0,028$) und der Monozyten an Tag zwei ($p=0,037$). Des Weiteren steigen die proinflammatorischen Zytokine IL-6, IL-8 und TNF- α ($p=0,011$, $p=0,005$, $p=0,005$) an Tag eins signifikant an. Daraus lässt sich ableiten, dass die Analyse des Wundexsudats aus NPWTi-Einheiten zur Überwachung von Wunden hinsichtlich ihres Inflammationsstatus, oder dem Auftreten von Blutungen ohne Entfernung des Verbandes dienen könnte.

Obwohl im Rahmen dieser Studie für pAVK nur wenige und für Diabetes keine signifikanten Unterschiede vorliegen, ist eine Beeinflussung der Wundexsudatzusammensetzung durch diese Faktoren wahrscheinlich.

Beim Vergleich der Gruppen bakterieller Befall/C. albicans/kein Keim ergab sich an Tag drei bei den MNCs ($p=0,012$) und IL-8 ($p=0,049$) ein statistisch signifikanter Unterschied. Die erhöhten proinflammatorischen Zellen und Zytokine legen den Schluss nahe, dass die mikrobielle Besiedelung Einfluss auf die Wundheilung zu haben scheint. Weitere Studien mit

höheren Fallzahlen sind notwendig, um die Ergebnisse zu bestätigen und die Methodik zu optimieren.

6. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: systemische und lokale Störfaktoren (7,33,44)	15
Tabelle 2: Patienten mit mehreren Wunden	35
Tabelle 3: Geschlechter-Verteilung bezogen auf Anzahl der Patienten und Wunden in Absolut- und Prozentwerten.....	36
Tabelle 4: Probenanzahl und Verbandswechsel.....	36
Tabelle 5: Wundgenese	37
Tabelle 6: Art der mikrobiellen Besiedelung und Anzahl der so besiedelten Wunden	38
Tabelle 7: Mittelwerte der roten Blutzellen ($n \cdot 10^3/\mu\text{l}$) an Tag 1-18.....	39
Tabelle 8: Mittelwerte alle kernhaltigen Zellen ($n/\mu\text{l}$) an Tag 1-18.....	40
Tabelle 9: Mittelwerte polymorphnukleäre Zellen ($n/\mu\text{l}$) an Tag 1-18	41
Tabelle 10: Mittelwerte mononukleäre Zellen ($n/\mu\text{l}$) an Tag 1-18.....	41
Tabelle 11: Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für die zellulären Messparameter an den Tagen 0-3 (Signifikanzniveau 95 %), signifikante Werte sind mit einem * markiert und zeigen einen Abfall bzw. Anstieg des Wertes im Vergleich zu Tag 0	43
Tabelle 12: Mittelwerte IL-6 (pg/ml) an Tag 1-18	44
Tabelle 13: Mittelwerte IL-8 (pg/ml) an Tag 1-18	44
Tabelle 14: Mittelwerte TNF- α (pg/ml) an den Tagen 1-18	45
Tabelle 15: Mittelwerte VEGF (pg/ml) an Tag 1-18.....	46
Tabelle 16: Mittelwerte bFGF (pg/ml) an Tag 1-18.....	46
Tabelle 17: Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für die Zytokine und Wachstumsfaktoren Messparameter an den Tagen 0-3 (Signifikanzniveau 95 %), signifikante Werte sind mit einem * markiert und zeigen einen Abfall bzw. Anstieg des Wertes im Vergleich zu Tag 0.....	48
Tabelle 18: Mittelwerte pH-Wert an Tag 1-18.....	49
Tabelle 19: Mittelwerte Gesamtprotein ($\mu\text{g/ml}$) an Tag 1-18	50
Tabelle 20: Mittelwerte der Langzeitverläufe von Kalium, LDH und Phosphat an Tag 1-18	51
Tabelle 21: Ergebnisse des Wilcoxon-Vorzeichen-Rang-Tests für pH-Wert, Gesamtprotein, Kalium, LDH und Phosphat an den Tagen 0-3 (Signifikanzniveau 95 %), signifikante Werte sind mit einem * markiert und zeigen einen Abfall bzw. Anstieg des Wertes im Vergleich zu Tag 0.....	52
Tabelle 22: Ergebnisse des Kruskal-Wallis-Tests zum Vergleich der Gruppen bakterieller Befall/ kein Keim/ Befall mit <i>C. albicans</i> an den Tagen 0, 1, 2 und 3 zum Signifikanzniveau 95	

%, signifikante Ergebnisse sind mit einem * markiert und weisen auf einen signifikanten Unterschied zwischen den drei Gruppen an diesem Tag hin	61
Tabelle 23: Ergebnisse Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Gruppen AVK/kein AVK an den Tagen 0, 1, 2 und 3 zum Signifikanzniveau 95 %, signifikante Ergebnisse sind mit einem * markiert und weisen auf einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen an diesem Tag hin	106
Tabelle 24: Ergebnisse Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Gruppen Diabetes mellitus/kein Diabetes mellitus an den Tagen 0, 1, 2 und 3 zum Signifikanzniveau 95 %, signifikante Ergebnisse sind mit einem * markiert und weisen auf einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen an diesem Tag hin	107

7. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: die Phasen der Wundheilung nach Dissemond et al., 2020 (5, S. 52), mit freundlicher Genehmigung des Elsevir Verlags.....	8
Abbildung 2: V.A.C VERAFLOR TM Therapy System mit T.R.A.C. [®] Pad, Polyurethanschwamm und Folienverband, mit freundlicher Bereitstellung durch 3M Corp. (66)	27
Abbildung 3: Anlage des Verbands nach Dissemond et al. (67, S. 253), mit freundlicher Genehmigung des Elsevir Verlags	28
Abbildung 4: Anzahl der Messwerte pro Tag ab dem ersten Debridement.....	37
Abbildung 5: Mittelwerte des Gesamtverlaufs roter Blutzellen ($n \cdot 10^3/\mu\text{l}$) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	39
Abbildung 6: Gesamtverlauf aller Zellen ($n/\mu\text{l}$) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	40
Abbildung 7: Gesamtverlauf polymorphnukleäre Zellen ($n/\mu\text{l}$) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	40
Abbildung 8: Gesamtverlauf mononukleäre Zellen ($n/\mu\text{l}$) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die	

durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw.	
3. Debridements	41
Abbildung 9: rote Blutzellen ($n \cdot 10^3/\mu\text{l}$) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach	42
Abbildung 10: alle kernhaltigen Zellen ($n/\mu\text{l}$) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach ...	42
Abbildung 11: polymorphnukleäre Zellen ($n/\mu\text{l}$) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach	42
Abbildung 12: mononukleäre Zellen ($n/\mu\text{l}$) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt	42
Abbildung 13: Gesamtverlauf IL-6 (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	43
Abbildung 14: Gesamtverlauf IL-8 (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	44
Abbildung 15: Gesamtverlauf TNF- α (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	45
Abbildung 16: Gesamtverlauf VEGF (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	46
Abbildung 17: IL-6 (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach	47
Abbildung 18: IL-8 (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt.....	47
Abbildung 19: TNF- (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	48
Abbildung 20: VEGF (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach.....	48
Abbildung 21: Gesamtverlauf pH vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements.....	49
Abbildung 22: Gesamtverlauf Gesamtprotein ($\mu\text{g/ml}$) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch	

Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	50
Abbildung 23: pH-Wert am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt	52
Abbildung 24: Gesamtprotein (µg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach.....	52
Abbildung 25: rote Blutzellen $\times 10^3/\mu\text{l}$ am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen AVK/kein AVK	53
Abbildung 26: polymorphnukleäre Zellen (n/µl) am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen AVK/ kein AVK	53
Abbildung 27: mononukleäre Zellen (n/µl) am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen AVK/kein AVK, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	54
Abbildung 28: VEGF (pg/ml) am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen AVK/kein AVK, Ausreißer sind durch ° dargestellt.....	54
Abbildung 29: IL-6 am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	55
Abbildung 30: IL-8 am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	55
Abbildung 31: VEGF am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein	56
Abbildung 32: bFGF am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch ° dargestellt	56
Abbildung 33: TNF-α am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *.....	57
Abbildung 34: pH-Wert am Tag des 1. Debridements und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen Diabetes ja/nein, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *.....	57
Abbildung 35: polymorphnukleäre Zellen (n/µl) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit <i>C. albicans</i>	58
Abbildung 36: mononukleäre Zellen (n/µl) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit <i>C. albicans</i> , Ausreißer	

sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	58
Abbildung 37: IL-6 (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit C. albicans, Ausreißer sind durch ° dargestellt	59
Abbildung 38: IL-8 (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit C. albican, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	59
Abbildung 39: TNF- (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit C. albicans, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	60
Abbildung 40: pH-Wert am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, aufgeteilt in die Gruppen kein Keim, bakterieller Befall, und Befall mit C. albicans, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	60
Abbildung 41: Gesamtverlauf Kalium (mmol/l) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	103
Abbildung 42: Gesamtverlauf bFGF2 (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	103
Abbildung 43: Gesamtverlauf Phosphat (mmol/l) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	104
Abbildung 44: Gesamtverlauf LDH (U/l) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements	104
Abbildung 45: basic FGF (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	105
Abbildung 46: Kalium (mmol/l) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *	105

Abbildung 47: Phosphat (mmol/l) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *.. 105

Abbildung 48: LDH (U/l) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als * 105

8. Literaturverzeichnis

1. Ongarora BG. Recent technological advances in the management of chronic wounds: A literature review. *Health Sci Rep.* 19. Mai 2022;5(3):e641.
2. Klein S, Schreml S, Dolderer J, Gehmert S, Niederbichler A, Landthaler M, u. a. Evidence-based topical management of chronic wounds according to the T.I.M.E. principle. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 2013;11(9):819–29.
3. Dill-Müller D, Tilgen W. Bewährte und aktuelle Verfahren in der Wundheilung. *Hautarzt.* Mai 2005;56(5):411–22.
4. Dumville JC, Owens GL, Crosbie EJ, Peinemann F, Liu Z. Negative pressure wound therapy for treating surgical wounds healing by secondary intention. *Cochrane Database Syst Rev* [Internet]. 2015 [zitiert 15. September 2019];(6). Verfügbar unter: <https://www.cochranelibrary.com/cdsr/doi/10.1002/14651858.CD011278.pub2/full>
5. Eming S, Schreml S. Kapitel 8 - Physiologie und Pathologie der Wundheilung. In: Dissemmond J, Kröger K, Hamburg MA, Essen FA, Hamburg CB, Tübingen AD, u. a., Herausgeber. *Chronische Wunden.* Munich: Urban & Fischer; 2020. S. 52–54.
6. Singer AJ, Clark RAF. Cutaneous Wound Healing. Epstein FH, Herausgeber. *N Engl J Med.* 2. September 1999;341(10):738–46.
7. Guo S, DiPietro LA. Factors Affecting Wound Healing. *J Dent Res.* März 2010;89(3):219–29.
8. Broughton G, Janis JE, Attinger CE. The Basic Science of Wound Healing: *Plast Reconstr Surg.* Juni 2006;117(SUPPLEMENT):12S-34S.
9. Martin P. Wound Healing--Aiming for Perfect Skin Regeneration. *Science.* 4. April 1997;276(5309):75–81.
10. Hübner G, Brauchle M, Smola H, Madlener M, Fässler R, Werner S. Differential regulation of pro-inflammatory cytokines during wound healing in normal and Glucocorticoid-treated mice. *Cytokine.* 1. Juli 1996;8(7):548–56.
11. Rodrigues M, Kosaric N, Bonham CA, Gurtner GC. Wound Healing: A Cellular Perspective. *Physiol Rev.* 1. Januar 2019;99(1):665–706.

12. Diegelmann R F. Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. *Front Biosci.* 2004;9(1–3):283.
13. Willenborg S, Eming SA. Macrophages – sensors and effectors coordinating skin damage and repair. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges.* 2014;12(3):214–21.
14. Ritsu M, Kawakami K, Kanno E, Tanno H, Ishii K, Imai Y, u. a. Critical role of tumor necrosis factor- α in the early process of wound healing in skin. *J Dermatol Dermatol Surg.* 1. Oktober 2016;21.
15. Mast BA, Schultz GS. Interactions of cytokines, growth factors, and proteases in acute and chronic wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* Oktober 1996;4(4):411–20.
16. Agyare C, Osafo N, Boakye YD. Biomarkers of Wound Healing. *Wound Heal - Curr Perspect* [Internet]. 17. Dezember 2018 [zitiert 22. Juli 2019]; Verfügbar unter: <https://www.intechopen.com/books/wound-healing-current-perspectives/biomarkers-of-wound-healing>
17. Falanga V. Wound healing and its impairment in the diabetic foot. *The Lancet.* 12. November 2005;366(9498):1736–43.
18. Auböck J. Biologie der Wundheilung. In: Wild T, Auböck J, Herausgeber. *Manual der Wundheilung: Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung* [Internet]. Vienna: Springer; 2007 [zitiert 25. Oktober 2021]. S. 1–10. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-211-69454-1_1, S. 4-6
19. Gabbiani G. The myofibroblast in wound healing and fibrocontractive diseases. *J Pathol.* 2003;200(4):500–3.
20. Schultz GS, Davidson JM, Kirsner RS, Bornstein P, Herman IM. Dynamic Reciprocity in the Wound Microenvironment. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* März 2011;19(2):134–48.
21. Li J, Chen J, Kirsner R. Pathophysiology of acute wound healing. *Clin Dermatol.* 1. Januar 2007;25(1):9–18.
22. Arpino V, Brock M, Gill SE. The role of TIMPs in regulation of extracellular matrix proteolysis. *Matrix Biol J Int Soc Matrix Biol.* 2015;44–46:247–54.
23. Falanga V. Classifications for wound bed preparation and stimulation of chronic wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* Oktober 2000;8(5):347–52.
24. Biermann N, Geissler EK, Brix E, Schiltz D, Prantl L, Kehrer A, u. a. Oxygen levels during negative pressure wound therapy. *J Tissue Viability.* November 2019;28(4):223–6.

25. Biermann N, Geissler EK, Brix E, Schiltz D, Muehle C, Prantl L, u. a. Pressure distribution and flow characteristics during negative pressure wound therapy. *J Tissue Viability*. Februar 2020;29(1):32–6.
26. Dissemond J. Wann ist eine Wunde chronisch? *Hautarzt*. 1. Januar 2006;57(1):55–55.
27. Scharffetter-Kochanek K, Schüller J, Meewes C, Hinrichs R, Eich D, Eming S, u. a. Das chronisch venöse Ulcus cruris. *JDDG J Dtsch Dermatol Ges*. 2003;1(1):58–68.
28. Eming SA, Kaufmann J, Löhner R, Krieg T. Chronische Wunde: Neue Wege in Forschung und Therapie. *Hautarzt*. November 2007;58(11):939–44.
29. Barrick B, Campbell EJ, Owen CA. Leukocyte proteinases in wound healing: roles in physiologic and pathologic processes. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. Dezember 1999;7(6):410–22.
30. McCarty SM, Percival SL. Proteases and Delayed Wound Healing. *Adv Wound Care*. Oktober 2013;2(8):438–47.
31. Jude EB, Blakytyn R, Bulmer J, Boulton AJM, Ferguson MWJ. Transforming growth factor-beta 1, 2, 3 and receptor type I and II in diabetic foot ulcers. *Diabet Med J Br Diabet Assoc*. Juni 2002;19(6):440–7.
32. Trengove NJ, Stacey MC, Macauley S, Bennett N, Gibson J, Burslem F, u. a. Analysis of the acute and chronic wound environments: the role of proteases and their inhibitors. *Wound Repair Regen*. 1999;7(6):442–52.
33. Riedel K, Ryssel H, Koellensperger E, Germann G, Kremer T. Pathophysiologie der chronischen Wunde. *Chir*. 1. Juni 2008;79(6):526–34.
34. Becker HD, Coerper S. Wunde, Wundheilung und Wundbehandlung. In: Siewert JR, Allgöwer M, Bartels H, Becker HD, Becker HM, Biemer E, u. a., Herausgeber. *Chirurgie [Internet]*. Berlin, Heidelberg: Springer; 2001 [zitiert 18. März 2021]. S. 113–127. (Springer Lehrbuch). Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-662-06245-6_8, S. 121
35. Medina A, Scott PG, Ghahary A, Tredget EE. Pathophysiology of Chronic Nonhealing Wounds. *J Burn Care Res*. 1. Juli 2005;26(4):306–19.
36. Gosain A, DiPietro LA. Aging and Wound Healing. *World J Surg*. 1. März 2004;28(3):321–6.
37. Ackermann PW, Hart DA. Influence of Comorbidities: Neuropathy, Vasculopathy, and Diabetes on Healing Response Quality. *Adv Wound Care*. Oktober 2013;2(8):410–21.
38. Lan CCE, Wu CS, Huang SM, Wu IH, Chen GS. High-Glucose Environment Enhanced Oxidative Stress and Increased Interleukin-8 Secretion From Keratinocytes. *Diabetes*. 1. Juli 2013;62(7):2530–8.

39. Lee EG, Luckett-Chastain LR, Calhoun KN, Frempah B, Bastian A, Gallucci RM. Interleukin 6 Function in the Skin and Isolated Keratinocytes Is Modulated by Hyperglycemia. *J Immunol Res.* 3. April 2019;2019:5087847.
40. Kikuchi R, Nakamura K, MacLauchlan S, Ngo DTM, Shimizu I, Fuster JJ, u. a. An antiangiogenic isoform of VEGF-A contributes to impaired vascularization in peripheral artery disease. *Nat Med.* Dezember 2014;20(12):1464–71.
41. Werner S, Grose R. Regulation of Wound Healing by Growth Factors and Cytokines. *Physiol Rev.* 1. Juli 2003;83(3):835–70.
42. Smith PDC, Thomas P, Scurr JH, Dormandy JA. Causes of venous ulceration: a new hypothesis. *Br Med J Clin Res Ed.* 18. Juni 1988;296(6638):1726–7.
43. Coerper S, Köveker G, Flesch I, Becker HD. Ulcus cruris venosum: chirurgisches debridement, antibiotische therapie und stimulation mit thrombozytären wachstumsfaktoren. *Langenbecks Arch Für Chir.* 1. März 1995;380(2):102–7.
44. Mustoe TA, O'Shaughnessy K, Kloeters O. Chronic Wound Pathogenesis and Current Treatment Strategies: A Unifying Hypothesis: *Plast Reconstr Surg.* Juni 2006;117(SUPPLEMENT):35S-41S.
45. Bowler PG. Wound pathophysiology, infection and therapeutic options. *Ann Med.* Januar 2002;34(6):419–27.
46. Robson MC, Stenberg BD, Heggers JP. Wound Healing Alterations Caused by Infection. *Clin Plast Surg.* 1. Juli 1990;17(3):485–92.
47. Witte MB, Barbul A. GENERAL PRINCIPLES OF WOUND HEALING. *Surg Clin North Am.* Juni 1997;77(3):509–28.
48. Anderson K, Hamm RL. Factors That Impair Wound Healing. *J Am Coll Clin Wound Spec.* Dezember 2012;4(4):84–91.
49. Dinh T, Scovell S, Veves A. Peripheral arterial disease and diabetes: a clinical update. *Int J Low Extrem Wounds.* Juni 2009;8(2):75–81.
50. Schultz GS, Barillo DJ, Mozingo DW, Chin GA. Wound bed preparation and a brief history of TIME. *Int Wound J.* 2004;1(1):19–32.
51. Ayello EA, Dowsett C, Schultz GS, Sibbald RG, Falanga V, Harding K, u. a. TIME heals all wounds: *Nursing (Lond).* April 2004;34(4):36–42.
52. Harries RL, Bosanquet DC, Harding KG. Wound bed preparation: TIME for an update. *Int Wound J.* 2016;13(S3):8–14.
53. Kitzinger HB, Kamolz LP, Frey M. Chirurgisches Debridement. In: Wild T, Auböck J, Herausgeber. *Manual der Wundheilung: Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen*

Wundbehandlung [Internet]. Vienna: Springer; 2007 [zitiert 25. Oktober 2021]. S. 53–56. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-211-69454-1_7, S. 53

54. Kujath P, Michelsen A. Wounds – From Physiology to Wound Dressing. Dtsch Ärztebl Int. März 2008;105(13):239–48.

55. Fleischmann W, Russ MK, Moch D. Chirurgische Wundbehandlung: Chir. Februar 1998;69(2):222–32.

56. Horch RE, Leffler M. Grundlagen, Indikationen, grundlegende therapeutische Konzepte und Kontraindikationen bei der Wundbehandlung mit der Vakuumtherapie. In: Wild T, Auböck J, Herausgeber. Manual der Wundheilung: Chirurgisch-dermatologischer Leitfaden der modernen Wundbehandlung [Internet]. Vienna: Springer; 2007 [zitiert 25. Oktober 2021]. S. 123–128. Verfügbar unter: https://doi.org/10.1007/978-3-211-69454-1_15, S. 123

57. Morykwas MJ, Faler BJ, Pearce DJ, Argenta LC. Effects of Varying Levels of Subatmospheric Pressure on the Rate of Granulation Tissue Formation in Experimental Wounds in Swine. Ann Plast Surg. November 2001;47(5):547–51.

58. Borgquist O, Ingemansson R, Malmsjö M. Individualizing the use of negative pressure wound therapy for optimal wound healing: a focused review of the literature. Ostomy Wound Manage. April 2011;57(4):44–54.

59. Kim PJ, Attinger CE, Constantine T, Crist BD, Faust E, Hirche CR, u. a. Negative pressure wound therapy with instillation: International consensus guidelines update. Int Wound J. 30. Oktober 2019;17(1):174–86.

60. Goss SG, Schwartz JA, Facchin F, Avdagic E, Gendics C, Lantis JC. Negative Pressure Wound Therapy With Instillation (NPWTi) Better Reduces Post-debridement Bioburden in Chronically Infected Lower Extremity Wounds Than NPWT Alone. J Am Coll Clin Wound Spec. Dezember 2012;4(4):74–80.

61. Back DA, Scheuermann-Poley C, Willy C. Recommendations on negative pressure wound therapy with instillation and antimicrobial solutions - when, where and how to use: what does the evidence show?: Recommendations on NPWTi. Int Wound J. Dezember 2013;10(s1):32–42.

62. J Kim P, E Attinger C, Oliver N, Garwood C, K Evans K, S Steinberg J, u. a. Comparison of Outcomes for Normal Saline and an Antiseptic Solution for Negative-Pressure Wound Therapy with Instillation. Plast Reconstr Surg. 27. Oktober 2015;136:657e–64e.

63. Fluieraru S, Bkara F, Naud M, Herlin C, Faure C, Trial C, u. a. Sterile-water negative pressure instillation therapy for complex wounds and NPWT failures. J Wound Care. 1. Juni 2013;22(6):293–9.

64. De Pellegrin L, Feltri P, Filardo G, Candrian C, Harder Y, Galetti K, u. a. Effects of negative pressure wound therapy with instillation and dwell time (NPWTi-d) versus NPWT or standard of care in orthoplastic surgery: A systematic review and meta-analysis. *Int Wound J* [Internet]. [zitiert 20. April 2023];n/a(n/a). Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/iwj.14072>
65. Anghel EL, Kim PJ, Attinger CE. A solution for complex wounds: the evidence for negative pressure wound therapy with instillation. *Int Wound J*. 2016;13(S3):19–24.
66. 3M Corp. VAC VERAFLORTM Therapie [Internet]. 2020 [zitiert 18. Juni 2020]. Verfügbar unter: <https://www.acylity.com/healthcare-professionals/history-of-innovation/vac-veraflo-therapy>
67. Dissemond J, Herberger K, Karrer S, Willy C. Kapitel 28 - Systematik der physikalischen Wundtherapien. In: Dissemond J, Kröger K, Hamburg MA, Essen FA, Hamburg CB, Tübingen AD, u. a., Herausgeber. *Chronische Wunden* [Internet]. Munich: Urban & Fischer; 2020 [zitiert 27. August 2020]. S. 249–264. Verfügbar unter: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9783437256417000285>, S. 252, S. 253, S.256
68. Allen D, LaBarbera LA, Bondre IL, Lessing MC, Rycerz AM, Kilpadi DV, u. a. Comparison of tissue damage, cleansing and cross-contamination potential during wound cleansing via two methods: lavage and negative pressure wound therapy with instillation. *Int Wound J*. 2014;11(2):198–209.
69. Yue BNB. Biological effects and clinical application of negative pressure wound therapy: a review. *J Wound Care* [Internet]. 9. November 2016 [zitiert 23. April 2024]; Verfügbar unter: <https://www.magonlinelibrary.com/doi/10.12968/jowc.2016.25.11.617>
70. Svedman P. Irrigation treatment of leg ulcers. *The Lancet*. 3. September 1983;322(8349):532–4.
71. Morykwas MJ, Argenta LC, Shelton-Brown EI, McGuirt W. Vacuum-Assisted Closure: A New Method for Wound Control and Treatment: Animal Studies and Basic Foundation. *Ann Plast Surg*. Juni 1997;38(6):553–62.
72. Argenta LC, Morykwas MJ. Vacuum-assisted closure: a new method for wound control and treatment: clinical experience. *Ann Plast Surg*. Juni 1997;38(6):563–76; discussion 577.
73. Fleischmann W, Strecker W, Bombelli M, Kinzl L. [Vacuum sealing as treatment of soft tissue damage in open fractures]. *Unfallchirurg*. September 1993;96(9):488–92.
74. Kim PJ, Attinger CE, Steinberg JS, Evans KK. Negative pressure wound therapy with instillation: past, present, and future. *Surg Technol Int*. Mai 2015;26:51–6.

75. Huang C, Leavitt T, Bayer LR, Orgill DP. Effect of negative pressure wound therapy on wound healing. *Curr Probl Surg*. 1. Juli 2014;51(7):301–31.
76. Aycart M. A, Eble D. J, Orgill D. P. Mechanisms of Action of Instillation and Dwell Negative Pressure Wound Therapy with Case Reports of Clinical Applications. *Cureus* [Internet]. 27. September 2018 [zitiert 19. Juli 2019];10(9). Verfügbar unter: <https://www.cureus.com/articles/14925-mechanisms-of-action-of-instillation-and-dwell-negative-pressure-wound-therapy-with-case-reports-of-clinical-applications>
77. Lessing MC, James RB, Ingram SC. Comparison of the Effects of Different Negative Pressure Wound Therapy Modes-Continuous, Noncontinuous, and With Instillation-on Porcine Excisional Wounds. *Eplasty*. 2013;13.
78. Timmers MS, Le Cessie S, Banwell P, Jukema GN. The Effects of Varying Degrees of Pressure Delivered by Negative-Pressure Wound Therapy on Skin Perfusion. *Ann Plast Surg*. Dezember 2005;55(6):665–71.
79. Kairinos N, Solomons M, Hudson DA. Negative-Pressure Wound Therapy I: The Paradox of Negative-Pressure Wound Therapy: *Plast Reconstr Surg*. Februar 2009;123(2):589–98.
80. Kairinos N, Voogd AM, Botha PH, Kotze T, Kahn D, Hudson DA, u. a. Negative-Pressure Wound Therapy II: Negative-Pressure Wound Therapy and Increased Perfusion. Just an Illusion?: *Plast Reconstr Surg*. Februar 2009;123(2):601–12.
81. Glass GE, Murphy GRF, Nanchahal J. Does negative-pressure wound therapy influence subjacent bacterial growth? A systematic review. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*. 1. August 2017;70(8):1028–37.
82. Biermann N, Taeger CD, Schatz V, Eigenberger A, Prantl L, Felthaus O. The influence of negative pressure wound therapy on bacterial and fungal growth. *J Tissue Viability*. 1. Juli 2023;S0965-206X(23)00075-X.
83. Tingting S, Xinyue F, Tiantian Y, Xiao A, Rui L, Feng L, u. a. Comparison of the effects of negative pressure wound therapy and negative pressure wound therapy with instillation on wound healing in a porcine model. *Front Surg*. 2023;10:1080838.
84. Gabriel A, Shores J, Heinrich C, Baqai W, Kalina S, Sogioka N, u. a. Negative pressure wound therapy with instillation: a pilot study describing a new method for treating infected wounds. *Int Wound J*. 2008;5(3):399–413.
85. Milcheski DA, Portocarrero ML, Alvarez DM, Mazuca LG de MP, Monteiro Junior AA, Gemperli R, u. a. Initial experience with negative-pressure wound therapy with instillation in complex wounds. *Rev Colégio Bras Cir*. August 2017;44(4):348–53.

86. Bucalo B, Eaglstein WH, Falanga V. Inhibition of cell proliferation by chronic wound fluid. *Wound Repair Regen.* Juli 1993;1(3):181–6.
87. Trengove NJ, Bielefeldt-Ohmann H, Stacey MC. Mitogenic activity and cytokine levels in non-healing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 2000;8(1):13–25.
88. Wiegand C, Schönfelder U, Abel M, Ruth P, Kaatz M, Hipler UC. Protease and pro-inflammatory cytokine concentrations are elevated in chronic compared to acute wounds and can be modulated by collagen type I in vitro. *Arch Dermatol Res.* August 2010;302(6):419–28.
89. Cerny MK, Hopfner U, Kirsch M, Haas EM, Wu F, Giunta R, u. a. Occlusive dressing-induced secretomes influence the migration and proliferation of mesenchymal stem cells and fibroblasts differently. *Eur J Med Res.* 26. Dezember 2018;23(1):60.
90. Cerny MK, Wiesmeier A, Hopfner U, Topka C, Zhang W, Machens HG, u. a. Wound fluid under occlusive dressings from diabetic patients show an increased angiogenic response and fibroblast migration. *J Tissue Viability.* August 2021;30(3):446–53.
91. Mwaura B, Mahendran B, Hynes N, Defreitas D, Avalos G, Adegbola T, u. a. The Impact of Differential Expression of Extracellular Matrix Metalloproteinase Inducer, Matrix Metalloproteinase-2, Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinase-2 and PDGF-AA on the Chronicity of Venous Leg Ulcers. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 1. März 2006;31(3):306–10.
92. Biomarkers In Risk Assessment: Validity And Validation (EHC 222, 2001) [Internet]. [zitiert 19. Juni 2023]. Verfügbar unter: <https://www.inchem.org/documents/ehc/ehc/ehc222.htm>
93. Bratton DL, Henson PM. Neutrophil clearance: when the party is over, clean-up begins. *Trends Immunol.* 1. August 2011;32(8):350–7.
94. Chen WYJ, Rogers AA. Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. *Wound Repair Regen* [Internet]. 2007 [zitiert 29. Juni 2023];15(4):434–49. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1524-475X.2007.00250.x>
95. Khanna S, Biswas S, Shang Y, Collard E, Azad A, Kauh C, u. a. Macrophage dysfunction impairs resolution of inflammation in the wounds of diabetic mice. *PloS One.* 4. März 2010;5(3):e9539.
96. Chen WYJ, Rogers AA. Recent insights into the causes of chronic leg ulceration in venous diseases and implications on other types of chronic wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc.* 2007;15(4):434–49.
97. Shah JMY, Omar E, Pai DR, Sood S. Cellular events and biomarkers of wound healing. *Indian J Plast Surg Off Publ Assoc Plast Surg India.* Mai 2012;45(2):220–8.

98. Lin ZQ, Kondo T, Ishida Y, Takayasu T, Mukaida N. Essential involvement of IL-6 in the skin wound-healing process as evidenced by delayed wound healing in IL-6-deficient mice. *J Leukoc Biol.* 2003;73(6):713–21.
99. Rennekampff HO, Hansbrough JF, Kiessig V, Doré C, Sticherling M, Schröder JM. Bioactive interleukin-8 is expressed in wounds and enhances wound healing. *J Surg Res.* September 2000;93(1):41–54.
100. Labler L, Mica L, Härter L, Trentz O, Keel M. Einfluss der V.A.C.®-Therapie auf Zytokine und Wachstumsfaktoren in Traumatischen Wunden. *Zentralblatt Für Chir.* April 2006;131(S 1):62–7.
101. Schreml S, Szeimies RM, Karrer S, Heinlin J, Landthaler M, Babilas P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2010;24(4):373–8.
102. Weiß KT, Fante M, Köhl G, Schreml J, Haubner F, Kreutz M, u. a. Proton-sensing G protein-coupled receptors as regulators of cell proliferation and migration during tumor growth and wound healing. *Exp Dermatol.* 2017;26(2):127–32.
103. Auerswald S, Schreml S, Meier R, Blancke Soares A, Niyazi M, Marschner S, u. a. Wound monitoring of pH and oxygen in patients after radiation therapy. *Radiat Oncol.* 11. November 2019;14(1):199.
104. Schreml S, Szeimies RM, Karrer S, Heinlin J, Landthaler M, Babilas P. The impact of the pH value on skin integrity and cutaneous wound healing. *J Eur Acad Dermatol Venereol* [Internet]. 2010 [zitiert 30. Juni 2023];24(4):373–8. Verfügbar unter: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1468-3083.2009.03413.x>
105. Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, u. a. Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* Oktober 1985;150(1):76–85.
106. Taeger CD, Wallner S, Martini T, Schiltz D, Kehrer A, Prantl L, u. a. Analysis of Rinsing Fluid during Negative Pressure Wound Therapy with Instillation: A Potential Monitoring Tool in Acute and Chronic Wound Treatment. A Pilot Study. *Cells.* April 2021;10(4):732.
107. Biermann N, Wallner S, Martini T, Spoerl S, Prantl L, Taeger CD. Negative Pressure Wound Therapy with Instillation: Analysis of the Rinsing Fluid as a Monitoring Tool and Approach to the Inflammatory Process: A Pilot Study. *J Clin Med.* 16. Januar 2023;12(2):711.
108. Derrick KL, Norbury K, Kieswetter K, Skaf J, McNulty AK. Comparative analysis of global gene expression profiles between diabetic rat wounds treated with vacuum-assisted closure therapy, moist wound healing or gauze under suction. *Int Wound J.* 2008;5(5):615–24.

109. Deonarine K, Panelli MC, Stashower ME, Jin P, Smith K, Slade HB, u. a. Gene expression profiling of cutaneous wound healing. *J Transl Med.* 21. Februar 2007;5:11.
110. Ligi D, Mosti G, Croce L, Raffetto JD, Mannello F. Chronic venous disease – Part I: Inflammatory biomarkers in wound healing. *Biochim Biophys Acta BBA - Mol Basis Dis.* 1. Oktober 2016;1862(10):1964–74.
111. Trengove NJ, Langton SR, Stacey MC. Biochemical analysis of wound fluid from nonhealing and healing chronic leg ulcers. *Wound Repair Regen.* 1996;4(2):234–9.
112. Mouës CM, Toorenenbergen AWV, Heule F, Hop WC, Hovius SER. The role of topical negative pressure in wound repair: Expression of biochemical markers in wound fluid during wound healing. *Wound Repair Regen.* 2008;16(4):488–94.
113. Polykandriotis E, Horch RE, Jost M, Arkudas A, Kees F, Schmitz M. Can systemically administered antibiotics be detected in wound tissues and surfaces under negative pressure wound therapy? *Int Wound J.* 2019;16(2):503–10.
114. Gohel MS, Windhaber RAJ, Tarlton JF, Whyman MR, Poskitt KR. The relationship between cytokine concentrations and wound healing in chronic venous ulceration. *J Vasc Surg.* November 2008;48(5):1272–7.
115. Eming SA, Krieg T, Davidson JM. Inflammation in Wound Repair: Molecular and Cellular Mechanisms. *J Invest Dermatol.* 1. März 2007;127(3):514–25.
116. Wilgus TA, Roy S, McDaniel JC. Neutrophils and Wound Repair: Positive Actions and Negative Reactions. *Adv Wound Care.* September 2013;2(7):379–88.
117. Dunnill C, Patton T, Brennan J, Barrett J, Dryden M, Cooke J, u. a. Reactive oxygen species (ROS) and wound healing: the functional role of ROS and emerging ROS-modulating technologies for augmentation of the healing process. *Int Wound J.* 2017;14(1):89–96.
118. Moseley R, Hilton JR, Waddington RJ, Harding KG, Stephens P, Thomas DW. Comparison of oxidative stress biomarker profiles between acute and chronic wound environments. *Wound Repair Regen.* 2004;12(4):419–29.
119. Grellner W, Georg T, Wilske J. Quantitative analysis of proinflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6, TNF- α) in human skin wounds. *Forensic Sci Int.* 11. September 2000;113(1):251–64.
120. Forsberg JA, Elster EA, Andersen RC, Nylen E, Brown TS, Rose MW, u. a. Correlation of procalcitonin and cytokine expression with dehiscence of wartime extremity wounds. *J Bone Joint Surg Am.* März 2008;90(3):580–8.
121. Patel S, Maheshwari A, Chandra A. Biomarkers for wound healing and their evaluation. *J Wound Care.* 2. Januar 2016;25(1):46–55.
122. Jiang WG, Sanders AJ, Ruge F, Harding KG. Influence of interleukin-8 (IL-8) and IL-

8 receptors on the migration of human keratinocytes, the role of PLC- γ and potential clinical implications. *Exp Ther Med*. 1. Februar 2012;3(2):231–6.

123. Beidler SK, Douillet CD, Berndt DF, Keagy BA, Rich PB, Marston WA. Inflammatory cytokine levels in chronic venous insufficiency ulcer tissue before and after compression therapy. *J Vasc Surg*. April 2009;49(4):1013–20.

124. Heits F, Wiedemann GJ, Jelkmann W. [Vascular endothelial growth factor VEGF stimulates angiogenesis in good and bad situations]. *Dtsch Med Wochenschr* 1946. 27. Februar 1998;123(9):259–65.

125. Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*. 29. Oktober 1992;359(6398):843–5.

126. Loot MAM, Kenter SB, Au FL, van Galen WJM, Middelkoop E, Bos JD, u. a. Fibroblasts derived from chronic diabetic ulcers differ in their response to stimulation with EGF, IGF-I, bFGF and PDGF-AB compared to controls. *Eur J Cell Biol*. März 2002;81(3):153–60.

127. Burian EA, Sabah L, Karlsmark T, Kirketerp-Møller K, Moffatt CJ, Thyssen JP, u. a. Cytokines and Venous Leg Ulcer Healing-A Systematic Review. *Int J Mol Sci*. 10. Juni 2022;23(12):6526.

128. Dissemond J, Witthoff M, Brauns TC, Haberer D, Goos M. pH-Wert des Milieus chronischer Wunden. *Hautarzt*. 1. Oktober 2003;54(10):959–65.

129. Fukumoto S. Phosphate metabolism and vitamin D. *BoneKEY Rep*. 5. Februar 2014;3:497.

130. Błaszczuk JW. Metabolites of Life: Phosphate. *Metabolites*. 19. Juli 2023;13(7):860.

131. Montesinos P, Lorenzo I, Martín G, Sanz J, Pérez-Sirvent ML, Martínez D, u. a. Tumor lysis syndrome in patients with acute myeloid leukemia: identification of risk factors and development of a predictive model. *Haematologica*. Januar 2008;93(1):67–74.

132. Benboubker L, Valat C, Linassier C, Cartron G, Delain M, Bout M, u. a. A new serologic index for low-grade non-Hodgkin's lymphoma based on initial CA125 and LDH serum levels. *Ann Oncol*. 1. November 2000;11(11):1485–91.

133. Braun-Falco O, Korting HC. [Normal pH value of human skin]. *Hautarzt Z Dermatol Venerol Verwandte Geb*. März 1986;37(3):126–9.

134. Choi EH. Gender, Age, and Ethnicity as Factors That Can Influence Skin pH. *Curr Probl Dermatol*. 2018;54:48–53.

135. Schneider LA, Korber A, Grabbe S, Dissemond J. Influence of pH on wound-healing: a

- new perspective for wound-therapy? Arch Dermatol Res. 1. Februar 2007;298(9):413–20.
136. Schreml S, Meier RJ, Wolfbeis OS, Landthaler M, Szeimies RM, Babilas P. 2D luminescence imaging of pH in vivo. Proc Natl Acad Sci. 8. Februar 2011;108(6):2432–7.
 137. Greener B, Hughes AA, Bannister NP, Douglass J. Proteases and pH in chronic wounds. J Wound Care. Februar 2005;14(2):59–61.
 138. Haller HL, Sander F, Popp D, Rapp M, Hartmann B, Demircan M, u. a. Oxygen, pH, Lactate, and Metabolism—How Old Knowledge and New Insights Might Be Combined for New Wound Treatment. Medicina (Mex). 1. November 2021;57(11):1190.
 139. Schreml S, Meier RJ, Kirschbaum M, Kong SC, Gehmert S, Felthaus O, u. a. Luminescent Dual Sensors Reveal Extracellular pH-Gradients and Hypoxia on Chronic Wounds That Disrupt Epidermal Repair. Theranostics. 30. April 2014;4(7):721–35.
 140. Madonna R, De Caterina R. Cellular and molecular mechanisms of vascular injury in diabetes--part I: pathways of vascular disease in diabetes. Vascul Pharmacol. 2011;54(3–6):68–74.
 141. Blann AD, Belgore FM, McCollum CN, Silverman S, Lip PL, Lip GYH. Vascular endothelial growth factor and its receptor, Flt-1, in the plasma of patients with coronary or peripheral atherosclerosis, or Type II diabetes. Clin Sci. 3. Januar 2002;102(2):187–94.
 142. Dissemond J, Witthoff M, Brauns TC, Haberer D, Goos M. pH-Wert des Milieus chronischer Wunden. Hautarzt [Internet]. 1. Oktober 2003 [zitiert 15. Mai 2020];54(10):959–65. Verfügbar unter: <https://doi.org/10.1007/s00105-003-0554-x>
 143. Nirenjen S, Narayanan J, Tamilanban T, Subramaniyan V, Chitra V, Fuloria NK, u. a. Exploring the contribution of pro-inflammatory cytokines to impaired wound healing in diabetes. Front Immunol. 27. Juli 2023;14:1216321.
 144. Meng L, Guo X, Yang X, Liu H, Yu M, Wu Y, u. a. Human α defensins promote the expression of the inflammatory cytokine interleukin-8 under high-glucose conditions: Novel insights into the poor healing of diabetic foot ulcers. J Biochem Mol Toxicol. August 2019;33(8):e22351.
 145. Singh K, Agrawal NK, Gupta SK, Sinha P, Singh K. Increased expression of TLR9 associated with pro-inflammatory S100A8 and IL-8 in diabetic wounds could lead to unresolved inflammation in type 2 diabetes mellitus (T2DM) cases with impaired wound healing. J Diabetes Complications. 2016;30(1):99–108.
 146. Rai V, Moellmer R, Agrawal DK. The role of CXCL8 in chronic nonhealing diabetic foot ulcers and phenotypic changes in fibroblasts: a molecular perspective. Mol Biol Rep. Februar 2022;49(2):1565–72.

147. Claudy AL, Mirshahi M, Soria C, Soria J. Detection of undegraded fibrin and tumor necrosis factor- α in venous leg ulcers. *J Am Acad Dermatol*. 1. Oktober 1991;25(4):623–7.
148. Siqueira MF, Li J, Chehab L, Desta T, Chino T, Krothpali N, u. a. Impaired wound healing in mouse models of diabetes is mediated by TNF- α dysregulation and associated with enhanced activation of forkhead box O1 (FOXO1). *Diabetologia*. Februar 2010;53(2):378–88.
149. Eming SA, Martin P, Tomic-Canic M. Wound repair and regeneration: Mechanisms, signaling, and translation. *Sci Transl Med*. 3. Dezember 2014;6(265):265sr6.
150. Krisp C, Jacobsen F, McKay MJ, Molloy MP, Steinstraesser L, Wolters DA. Proteome analysis reveals antiangiogenic environments in chronic wounds of diabetes mellitus type 2 patients. *Proteomics*. September 2013;13(17):2670–81.
151. Xuan YH, Huang BB, Tian HS, Chi LS, Duan YM, Wang X, u. a. High-glucose inhibits human fibroblast cell migration in wound healing via repression of bFGF-regulating JNK phosphorylation. *PloS One*. 2014;9(9):e108182.
152. Yang SL, Han R, Liu Y, Hu LY, Li XL, Zhu LY. Negative pressure wound therapy is associated with up-regulation of bFGF and ERK1/2 in human diabetic foot wounds. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc*. 2014;22(4):548–54.
153. Healy B, Freedman A. Infections. *BMJ*. 8. April 2006;332(7545):838–41.
154. Laato M, Lehtonen OP, Niinikoski J. Granulation tissue formation in experimental wounds inoculated with *Staphylococcus aureus*. *Acta Chir Scand*. 1985;151(4):313–8.
155. Kunimitsu M, Nakagami G, Minematsu T, Koudounas S, Sanada H. An in vivo critically colonised wound model with dysbiotic wound microbiota. *Int Wound J*. März 2023;20(3):648–58.
156. Secor PR, James GA, Fleckman P, Olerud JE, McInnerney K, Stewart PS. *Staphylococcus aureus* Biofilm and Planktonic cultures differentially impact gene expression, mapk phosphorylation, and cytokine production in human keratinocytes. *BMC Microbiol*. 21. Juni 2011;11:143.
157. Fahey TJ, Turbeville T, McIntyre K. Differential TNF Secretion by Wound Fibroblasts Compared to Normal Fibroblasts in Response to LPS. *J Surg Res*. 1. Juni 1995;58(6):759–64.
158. Percival SL, McCarty S, Hunt JA, Woods EJ. The effects of pH on wound healing, biofilms, and antimicrobial efficacy. *Wound Repair Regen*. 2014;22(2):174–86.
159. Rahim K, Saleha S, Zhu X, Huo L, Basit A, Franco OL. Bacterial Contribution in Chronicity of Wounds. *Microb Ecol*. 1. April 2017;73(3):710–21.
160. Serena TE, Bayliff SW, Brosnan PJ. Bacterial protease activity: a prognostic biomarker

of early wound infection. *J Wound Care*. 2. April 2022;31(4):352–5.

9. Anhang

9.1 Gesamtverläufe weiterer Messparameter

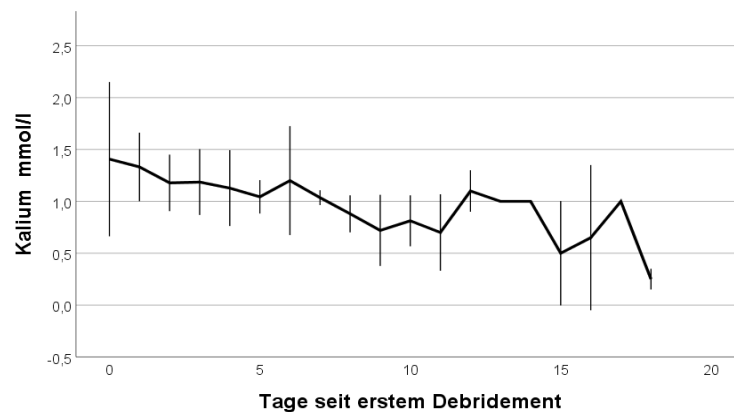


Abbildung 41: Gesamtverlauf Kalium (mmol/l) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

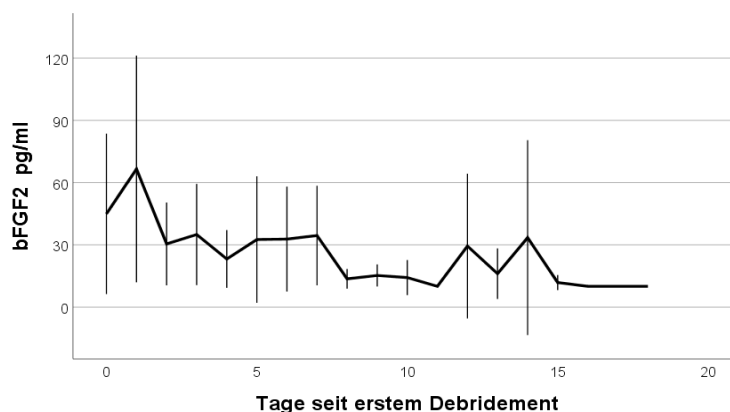


Abbildung 42: Gesamtverlauf bFGF2 (pg/ml) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

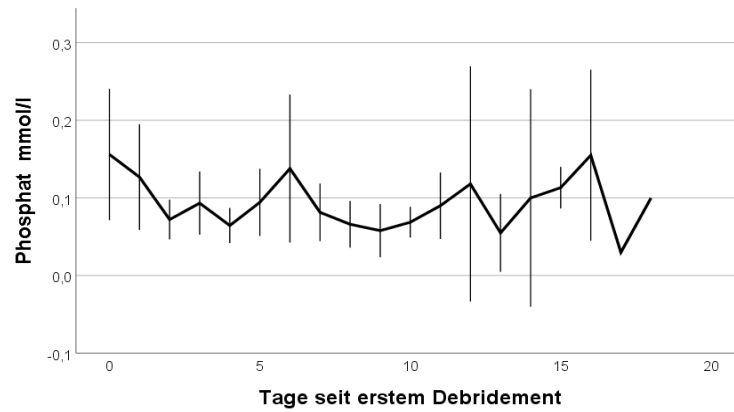


Abbildung 43: Gesamtverlauf Phosphat (mmol/l) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

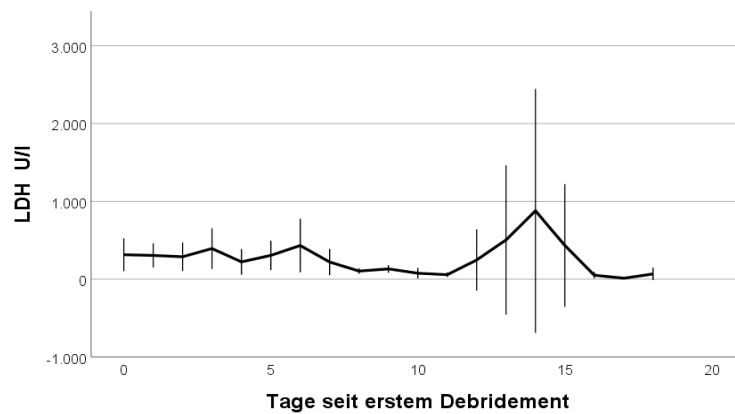


Abbildung 44: Gesamtverlauf LDH (U/l) vom Tag des ersten Debridements bis zum 18. Tag danach, mit Standardfehler, dargestellt durch Fehlerbalken (KI 95 %), die durch Einkreisen markierten Bereiche entsprechen dem Zeitraum nach dem Großteil des 2. bzw. 3. Debridements

9.2 Tag 0-3, weitere graphische Darstellungen

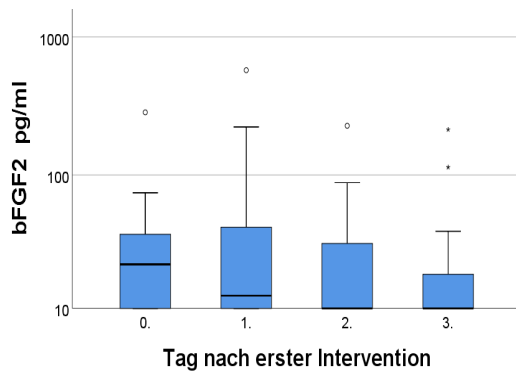


Abbildung 45: basic FGF (pg/ml) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

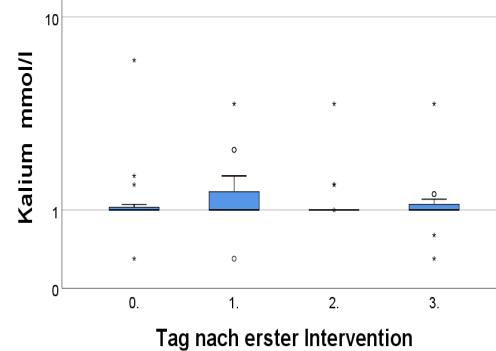


Abbildung 46: Kalium (mmol/l) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

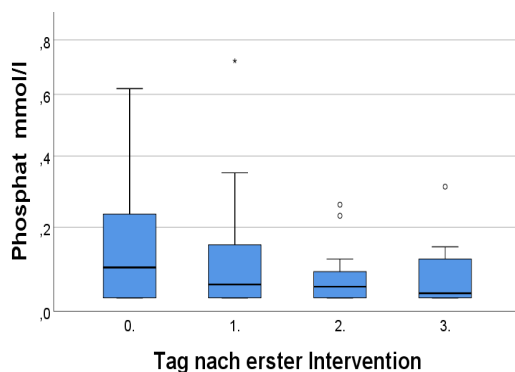


Abbildung 47: Phosphat (mmol/l) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

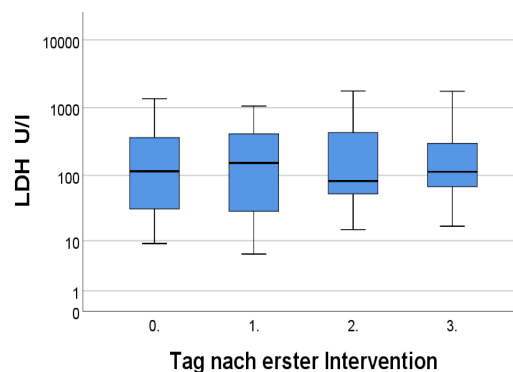


Abbildung 48: LDH (U/l) am Tag der Operation und Tag 1-3 danach, Ausreißer sind durch ° dargestellt, ab einem 2,5-fachen Quartilsabstand: Darstellung der Ausreißer als *

9.3 Ergebnisse des Man-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Gruppen AVK/keine AVK bzw. Diabetes/ kein Diabetes

*Tabelle 23: Ergebnisse Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Gruppen AVK/kein AVK an den Tagen 0, 1, 2 und 3 zum Signifikanzniveau 95 %, signifikante Ergebnisse sind mit einem * markiert und weisen auf einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen an diesem Tag hin*

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Rote Blutzellen	0,365	1,0	0,783	0,384
Alle kernhaltigen Zellen	0,536	0,875	0,056	0,142
Polymorphnukleäre Zellen	0,840	0,776	0,039 *	0,167
Mononukleäre Zellen	0,295	0,875	0,047 *	0,167
IL-6	0,536	0,591	0,106	0,261
IL-8	0,365	0,875	0,106	0,196
TNF-α	0,840	0,728	0,091	0,120
VEGF	0,448	0,681	0,039 *	0,196
bFGF	0,456	0,591	0,368	0,773
pH-Wert	0,536	0,238	0,298	0,773
Gesamtprotein	0,659	0,728	0,332	0,167
Kalium	1,00	0,825	0,783	0,384
LDH	0,945	1,00	0,185	0,384
Phosphat	1	0,506	0,185	0,227

Tabelle 24: Ergebnisse Mann-Whitney-U-Tests zum Vergleich der Gruppen Diabetes mellitus/kein Diabetes mellitus an den Tagen 0, 1, 2 und 3 zum Signifikanzniveau 95 %, signifikante Ergebnisse sind mit einem * markiert und weisen auf einen signifikanten Unterschied zwischen den zwei Gruppen an diesem Tag hin

	Tag 0	Tag 1	Tag 2	Tag 3
Rote Blutzellen	0,945	0,446	1,00	0,391
Alle kernhaltigen Zellen	0,840	0,538	0,820	0,823
Polymorphnukleäre Zellen	1,00	0,446	0,880	0,964
Mononukleäre Zellen	0,633	0,290	0,543	0,754
IL-6	0,633	1,00	0,762	0,257
IL-8	0,734	0,446	0,401	0,754
TNF-α	0,536	0,199	0,543	0,559
VEGF	0,840	0,971	0,880	0,343
bFGF	0,659	0,538	0,704	1,00
pH-Wert	0,945	0,446	0,283	0,257
Gesamtprotein	1,00	0,914	0,940	0,298
Kalium	0,840	0,290	0,940	0,893
LDH	0,840	0,491	0,401	0,823
Phosphat	0,945	0,403	0,940	0,130

10. Publikationsverzeichnis

01.2023 Negative Pressure Wound Therapy with Instillation: Analysis of the Rinsing Fluid as a Monitoring Tool and Approach to the Inflammatory Process: A Pilot Study

Journal of clinical medicine, DOI: 10.3390/jcm12020711

03.2021 Analysis of Rinsing Fluid during Negative Pressure Wound Therapy with Instillation: A Potential Monitoring Tool in Acute and Chronic Wound Treatment. A Pilot Study

Cells, DOI: 10.3390/cells10040732.

Danksagung

Besonderer Dank gilt Prof. Dr. med. C. Taeger für das Überlassen dieses interessanten und aktuellen Dissertationsthemas sowie für die Begutachtung der Promotionsarbeit.

Darüber hinaus möchte ich mich bei PD Dr. med. N. Biermann bedanken, der mir mit Tat und Rat beiseite stand. Vielen Dank für die sehr gute Betreuung und die Begutachtung der Promotionsarbeit.

Zudem danke ich Dr. S. Wallner, für die Beratung beim Auswerten der Ergebnisse und D. Biermeier und H. Staudner für die Unterstützung bei der Planung und Durchführung der Laborarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich bei Dr. A. Henze, M. Martini und C. Käss für die Unterstützung bedanken.

Großer Dank gilt auch dem Rest meiner Familie und meinen Freund:innen für die immer herzlichen und motivierenden Worte.

Lebenslauf

Teresa Sophie Martini

2006 - 2014	Bernhard-Strigel-Gymnasium, Memmingen
2014	Abitur in Memmingen
2014 - 2015	Grob Werke GmbH, Mindelheim, Praktikum im Bereich HR
2015 - 2016	Studium der Molekularen Medizin, B.sc., Universität Regensburg
2016	Studium der Humanmedizin an der Universität Regensburg
2018	Bestehen des 1. humanmedizinischen Staatsexamens in Regensburg
2021 – 2022	Auslandssemester an der „Università degli studi Tor Vergata“ in Rom
2022	Bestehen des 2. humanmedizinischen Staatsexamens in Regensburg
2023	Bestehen des 3. Staatsexamens in Regensburg und Approbation als Ärztin