

Einsatz von funktionellen Biomarkern in der Verlaufskontrolle von chronischen Wunden

Popovits M¹, Aigner F¹, Schoefmann N², Doerfler P², Wolff-Winiski B²

¹Abteilung für Chirurgie, Krankenhaus der Barmherzigen Brüder Graz, ² Akribes Biomedical GmbH, Wien

Zielsetzung

Die pathogenen Treiber der Wundchronizität sind im Wundexsudat enthalten, z. B. Proteasen, bakterielle Toxine, proinflammatorische Mediatoren und toxische Metabolite, die das Zellwachstum hemmen und damit die Wundheilung verzögern. In einem neuen *ex vivo* Wundmodell wird die Hemmung der Proliferation und der extrazellulären Matrixbildung von primären humanen Fibroblasten in Anwesenheit von Wundexsudat heilender und nicht heilender Wunden untersucht, wie schematisch in Abbildung 1 dargestellt.

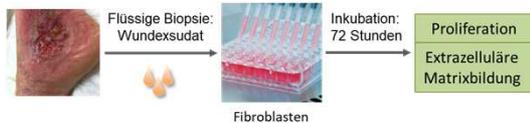


Abbildung 1: Schematische Darstellung des *ex vivo* Fibroblastenassays

Darüber hinaus wurden Enzymaktivitäten von Matrix Metalloproteinasen, Elastase und Myeloperoxidase aus den Wundexsudaten direkt bestimmt, um festzustellen, ob diese Parameter mit Wundinfektion oder den Ergebnissen des *ex vivo* Assays korrelieren.

In dieser Fallstudie soll die Korrelation der klinischen gängigen Parameter der Wundheilung mit *ex vivo* Daten abgeglichen werden. Im *ex vivo* Proliferationsassay sollen in der Zukunft Medikamente auf ihre potenzielle Wirksamkeit bei individuellen Wunden getestet werden. Das Ziel ist die Entwicklung von personalisierter lokaler oder generalisierter medikamentöser Wundtherapie.

Methoden

Wundexsudate wurden entweder aus NPWT-Schwämmen (negative pressure wound therapy) oder aus Wundabstrich-Tupfern von mehr als 40 Wunden von 16 Patienten unterschiedlicher Ätiologien wie Diabetisches Fußsyndrom, Ulcus cruris mixtum und postoperative- bzw. posttraumatische Wunden über einen Zeitraum von Tagen bis Wochen bis zum Wundverschluss analysiert. Die Definition „heilend“ oder „nicht heilend“ erfolgte aufgrund der klinischen Präsentation.

Diese Exsudate wurden extrahiert und in Zellkulturmedium verdünnt, so dass sich Endkonzentrationen von 1 – 8% Wundexsudat ergaben. Nach Sterilfiltration wurden die verdünnten Exsudate mit primären humanen Hautfibroblasten 72 Stunden in 384-well Zellkulturplatten bei 37° C inkubiert. In einigen Fällen wurden diesen Kulturen Arzneisubstanzen zugesetzt. Danach wurden Zellproliferation und extrazelluläre Matrixbildung nach Fixierung und Färbung quantitativ bestimmt. Die Resultate wurden mit den Kontrollzellen mit Medium allein und ohne Wundexsudat bzw. Arzneisubstanz (entsprechend 100% Proliferation) verglichen und als Prozent der Kontrollen angegeben. Hemmende Exsudate ergeben daher Werte < 100%. Wenn angegeben, wurden die Inkubationen in Triplikaten durchgeführt und die Ergebnisse sind als Mittelwerte ± Standardabweichung (SD) angegeben.

Außerdem wurden im Exsudat selbst die Enzymaktivitäten von Matrix Metalloproteinasen, Elastase und Myeloperoxidase mit Hilfe spezifischer fluorogener Substrate bestimmt.

Resultate

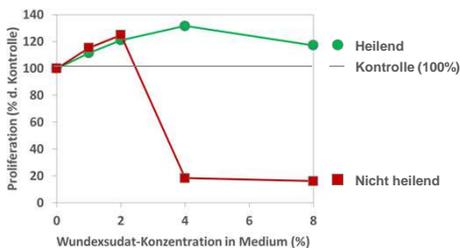
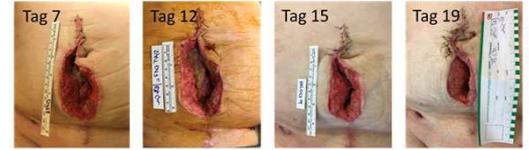


Abbildung 2: Einfluss von Wundexsudaten (VAC) auf Proliferation und extrazelluläre Matrixbildung von Fibroblasten *ex vivo*

- **Nicht heilende** Wundexsudate **hemmen** Proliferation und extrazelluläre Matrixbildung von Fibroblasten *ex vivo* in Abhängigkeit von ihrer Konzentration (Werte < 100% bei steigenden Mengen Exsudat im Medium).
- **Heilende** Wundexsudate **fördern** Proliferation und extrazelluläre Matrixbildung von Fibroblasten *ex vivo* (Werte ≥ 100%).
- Unabhängig von der Art der Wunde wurde bei 19/19 nicht heilenden Vakuumproben und 12/22 nicht heilenden Tupferproben der klinische Phänotyp *ex vivo* bestätigt.



Tag	1	4	7	12	15	19
Art der Probe	Tupfer	VAC	VAC	VAC	VAC	VAC
Klinische Beurteilung	NH	NH	NH	H	H	H
Ex vivo Beurteilung	NH	NH	NH	H	H	H

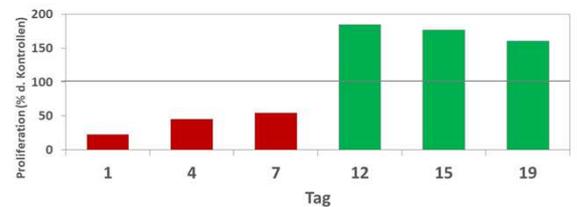


Abbildung 3: Verlauf der Wundheilung *in vivo* korreliert mit *ex vivo* Evaluation: Patient 17 (Platzbauch); NH = nicht heilend, H = heilend

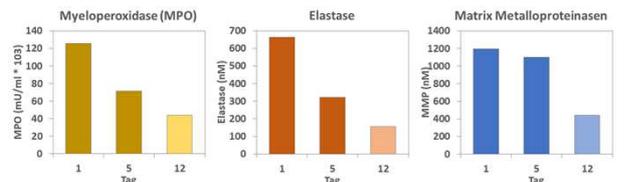


Abbildung 4: Sinkende Enzymaktivitäten im Wundexsudat korrelieren mit Abnahme der Infektion: Patient 13 (Ulcus cruris post-traumatisch); dunkle Farben: Infektion, helle Farben: keine Infektion

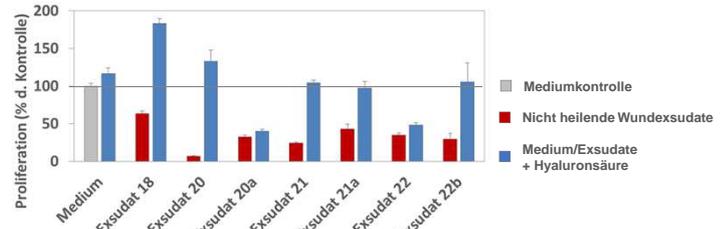


Abbildung 5: Testung von Wundheilungstherapeutika im *ex vivo* Fibroblastenassay: Hyaluronsäure

- Hyaluronsäure hebt die toxischen Aktivitäten der Wundexsudate auf Fibroblasten in 5/7 Fällen auf.
- Durch gezielte Untersuchungen an Patienten soll die Vorhersagekraft des *ex vivo* Assays für die Wundheilung überprüft werden.

Schlussfolgerungen

- Die *ex vivo* beobachtete reduzierte Fibroblastenproliferation korrelierte vorwiegend mit klinisch nicht heilenden Wunden. Der Verlauf von Wundinfektionen konnte mit Hilfe der Enzymaktivitäten von Elastase und Myeloperoxidase (bei 8/9 Patienten) evaluiert werden.
- Im *ex vivo* Proliferationsassay sollen in der Zukunft Medikamente auf ihre potenzielle Wirksamkeit bei individuellen Wunden getestet werden. Das Ziel ist die Entwicklung von personalisierter lokaler oder generalisierter medikamentöser Wundtherapie.