

Antimikrobielle Peptide und Fibrinkleber in Verbrennungen

Biologische Potenz gegen multiresistente *Pseudomonas-aeruginosa*-Bakterien in Verbrennungen der Tiefe IIb

Infizierte Brandwunden stellen eine Quelle hoher Morbidität und Mortalität dar. Die fehlende Schutzfunktion verbrannter Haut erleichtert eine rasche Infektion aus bakterieller Kolonisation. Unbehandelt kann je nach Keimspektrum, Infektdauer und Resistenz des betroffenen Organismus, je nach Virulenz, Art und Ausdehnung der Verbrennung ein „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS), Multiorganversagen und Sepsis folgen. Aus einem lokalen Wundproblem wird ein den gesamten Organismus bedrohendes Krankheitsbild. Ein Fundament der Therapie des Schwerbrandverletzten stellt die lokale antibakterielle Therapie dar. Topische Antibiotika sind zwar effektiv, führen jedoch unter Umständen zur Resistenzentwicklung und/oder der Allergisierung.

Eine neue Substanzgruppe, antimikrobielle Peptide (AMPs), sind natürlich vorkommende Peptidmoleküle mit sehr breiter Wirkung gegen grampositive und gramnegative Bakterien, Viren (mit Lipidhüllen) und Pilze. Sie werden als alte evolutionäre Waffen [23] bezeichnet, die eine „Achillesferse“ der attackierenden Einzeller angreifen, nämlich deren Zellmembran, die sich prinzipiell strukturell von der der Mehrzeller unterscheidet. AMPs werden bei

Tieren, Pflanzen und dem Menschen beschrieben, sind seit ca. 70 Jahren bekannt und werden nicht nur in der medizinischen Forschung, sondern auch in der Tabakindustrie und im Kartoffelanbau zur Ertragssteigerung eingesetzt [2].

Verbrennungswunden weisen nicht nur Eintrittspforten für Mikroorganismen auf, sondern über sie gehen Flüssigkeit und Eiweiße verloren. Einen kutanen Wundabschluss im Rahmen der Heilung bewirkt Fibrin und die stufenweise ablaufenden Phasen der Gerinnung. Das Rationale des Einsatzes von Fibrinkleber besteht darin, das Einsprossen von Immuneffektorzellen und epithelbildenden Zellen zu erleichtern und die frühen Stufen der Wundheilung in Gang zu setzen. Allerdings bietet nati-

ves Fibrin ein Nährmedium für Bakterienwachstum, dem es entgegenzuwirken gilt. Die naheliegende Idee, Antibiotika zum Fibrinkleber zu mischen und dadurch einerseits die Angriffsfläche des Kleber-Antibiotika-Gemisches zu vergrößern sowie die Kontaktdauer zu verlängern und andererseits die unerwünschten Nebenwirkungen zu reduzieren, um gleichzeitig lokale antimikrobielle Effekte zu erzielen, wurde bereits unter verschiedenen Gesichtspunkten mehrerer Forschergruppen untersucht und publiziert [21, 16, 17]. Im aktuellen innovativen Ansatz wird Fibrinkleber als Vektor zur Applikation der AMPs eingesetzt. Daten zu diesem Vorhaben liegen derzeit noch nicht vor, technische Details sind noch nicht etabliert.

Abb. 1 ► Primäre und sekundäre Struktur von Protegrin-1 (PG-1), mit 2 Disulfidbrücken, Molekulargewicht von 2157 Da (Dalton)

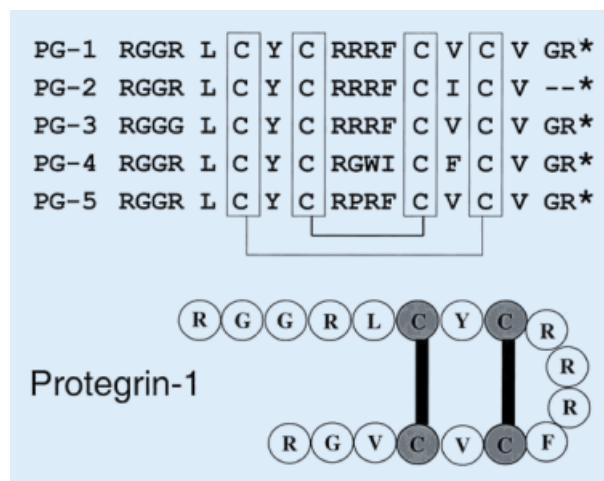


Tabelle 1

In-vitro-Studie: Konzentrationen und Verhältnisse von PG-1 und dem Fibrinklebergemisch mit seinen Komponenten				
Konzentration (Mischung von Kleberprotein + Fibrinogen/PG1)	Kleberproteinlösung (+ Aprotinin)	Thrombinlösung (+ CaCl ₂)	PG-1, 100 µg/ml	Volumen pro Well
1:1	7,5 µl	7,5 µl	15 µl	30 µl
1:2	5 µl	5 µl	20 µl	30 µl
2:1	10 µl	10 µl	10 µl	30 µl

Ziel der vorliegenden Studie war daher die Frage, ob antimikrobielle Peptide gemischt mit Fibrinkleber potente Effekte der Bakterienhemmung in infizierten Brandwunden sein können.

Material und Methoden

In-vitro-Experimente

Protegrin-1

Das unsererseits verwendete antimikrobielle Peptid Protegrin-1 (PG-1), ursprünglich aus Schweine-Neutrophilen isoliert, wurde entsprechend der publizierten Strukturformel [18] (Abb. 1) aus 18 Aminosäuren und 2 Disulfidbrücken kommerziell in Auftrag gegeben und hergestellt (BioSynthesis, Lewisville TX, USA). Das gelieferte lyophilisierte Peptid wurde entsprechend den Vorgaben des Herstellers gelöst und dadurch in die biologisch aktive Form transferiert, die Effektivität des Proteins wurde durch Radial-Diffusions-Assays getestet [19].

Radial-Diffusions-Assay

Mittels eines Radial-Diffusions-Assay (bakterieller Wachstumshemmtest gegen antibakteriell wirksame Substanzen) wurde die In-vitro-Aktivität des neuen Gemisches aus Protegrin-1 und dem Gewebekleber überprüft.

Zusammengefasst bestand die erste der zwei Schichten aus 1% Agarose (Sigma Chemical, St. Louis, MO USA) und 0,03% Trypticase Soy Broth mit 10 mM Natriumphosphat und 100 mM NaCl bei einem pH von 7,4. Die nachfolgende Abdeckschicht bestand aus 6%igem Trypticase Soy Broth und 1%iger Agarose in phosphatgepuffertem Kochsalz. Als Kontrollorganismus wurde hier *E. coli* (eingestellt auf 200 µl mit 4×10⁷ Bakterien) mit 10 ml des ersten Mediums gemischt und in 10 cm Petrischalen ausgegossen. Nach dem Erstarren wurden 3-mm-Löcher in das Zentrum des Agars gestanzt und mit 30 µl der jewei-

ligen Testsubstanzen gefüllt (Abb. 1). Das Sealer-Protein, der Fibrinolyseinhibitor, Thrombin und Kalziumchlorid wurden entsprechend den Vorgaben des Erzeugers (Baxter Healthcare, Glendale, CA USA) gemischt und kurzfristig bei 37°C gehalten, bis die Komponenten verwendet wurden. Gentamycin mit einer Konzentration von 3,16 µg/ml wurde als Positivkontrolle desselben Volumens im zentralen Stanzloch appliziert. Nachfolgend wurden alle Platten denselben Bedingungen ausgesetzt und bei 37°C für 3 h inkubiert, danach folgte das Abdecken durch den zweiten, nährstoffreichen Agar (10 ml) als Overlay.

Nach 18 h Inkubation in einem Brutschrank bei 37°C wurden die Platten analysiert. Die klaren Zonen um die Stanzlöcher lassen auf gehemmtes Bakterienwachstum schließen (positives Ergebnis), wohingegen der restliche Agar trüb, da mit Bakterien durchsetzt, erscheint. Der Durchmesser dieser hellen Zonen wurde mit der Positivkontrolle (Gentamycin) derselben Platte korreliert, um ein Maß der antibakteriellen Aktivität zu erhalten (Abb. 2).

Tisseel®, Tissucol® (Baxter, IL, USA)

Entsprechend dem Protokoll des Herstellers wurden die insgesamt 4 Komponenten des kommerziell erhältlichen Gewebeklebers auf 37°C erwärmt und zu zwei Komponenten vermischt (Fibrinogen und Thrombin). Bis zur endgültigen Mischung beider Teile zum aktiven Fibrin, wurde die o.g. Temperatur für wenige Minuten beibehalten und in fallender Konzentration erfolgte die Mischung des vorbereiteten Protegrin-1 mit der Thrombinkomponente in entsprechenden Verhältnissen (s. Tabelle 1). Die resultierenden Mischungen wurden erst im ausgestochenen Stanzdefekt des Agars zusammengeführt und somit die Fibrinbildung mit PG-1-Inhalt initiiert.

Abb. 2 zeigt den Versuchsansatz in unterschiedlichen Mischungsverhältnissen der PG-1- und Fibrinkleber-Komponenten auf den Radial-Diffusionsplatten. Das dabei ermittelte, für die weiteren Versuche adäquate Mischungsverhältnis wurde für die Anwendung in den In-vivo-Experimenten eingesetzt.

In-vivo-Experimente

Für die In-vitro-Experimente wurden männliche, ausgewachsene Sprague-Dawley-Ratten ($n=15$) mit einem Durchschnittsgewicht von 250 g einer 15%igen Verbrennung/Verbrühung ihrer Körperoberfläche unterzogen (Tiefe IIb) und in 3 gleiche Gruppen randomisiert. Die Verbrennung wurde entsprechend den Vorgaben des National Institutes of Health (NIH) und der Tierexperimentellen Einrichtung der University of Michigan (ULAM, UCUCA) für kleine Nager in Allgemeinnarkose mit gewichtsadaptierter Gabe von Ketamin und Xylazin intraperitoneal durchgeführt und von der Ethikkommission genehmigt. Postoperativ erfolgte die gewichtsadaptierte Analgesie mit Bupivacain (Buprenex®) alle 6–8 h. Die Tiere wurden bis zur völligen Mobilität überwacht, der Flüssigkeitersatz erfolgte durch die subkutane Applikation von physiologischer Kochsalzlösung. Die Ermittlung der Verbrennungsfläche ergab sich aus der Formel von Meeh [9]. Die Wunden wurden sofort nach der Verbrühung unter sterilen Kautelen mittels 1×10⁶ *Pseudomonas aeruginosa* inokuliert. Die *Pseudomonas*-Bakterien waren durch ein Bakteriogramm vor den Experimenten als multiresistent (u. a. Silvadene®/Silbersulfadiazine) eingestuft worden.

In den 3 Gruppen (je 5 Tiere) wurde entweder topisch ein Gemisch aus Fibrinkleber und Protegrin-1 (PG-1; 50 Volumenprozent PG-1, Konzentration des PG-1 100 µg/ml, 50 Volumenprozent der Thrombin-Fibrinogen-Mischung, 2,5 ml

pro Applikation) oder *ungemischtes, flüssiges PG-1* (2,5 ml, Konzentration: 100 µg/ml, Kontrollgruppe) oder 2,5 ml des *Fibrinklebergemisches* (negative Kontrolle) topisch appliziert. Pro Untersuchungsgruppe wurde die Mischung aus Protegrin mit dem Kleber und die einzelnen Komponenten zusammen mit den Bakterien unter sterilen okklusiven Verbänden aufgebracht, um Kreuzkontaminationen für die Zeit des Versuches zu vermeiden (■ **Abb. 3**). Es wurde hierzu ein steriler Tupfer auf das Verbrennungsareal mit den unterschiedlichen Komponenten aufgebracht, durch eine Klebefolie (ähnlich einer OP-Folie) verschlossen und eine Manipulation durch das Tier ausgeschlossen, indem selbsthaftendes, elastisches Verbandsmaterial überwickelt wurde, das die Mobilität zur Reinigung und Nahrungsaufnahme der Tiere nicht beeinträchtigte.

Nach einer Inkubation über 24 h wurden Hautbiopsien entnommen, gewogen, homogenisiert und als Verdünnungsreihe in Triplets auf Schafblutagarplatten aufgebracht und über Nacht inkubiert. Am folgenden Tag wurden die *Pseudomonas*-kulturen untersucherblindet ausgezählt. Die Bestimmung des *Pseudomonas*-wachstums erfolgte morphologisch anhand der Kulturen. Daraus wurden die Bakterienzahlen pro Gramm Haut im Vergleich der 3 Gruppen ermittelt (■ **Abb. 4**).

Ergebnisse

In-vitro-Experimente

Im Radial-Diffusions-Assay zeigte sich eine von der jeweiligen PG-1-Menge abhängige antimikrobielle Wirkung des ungemischten PG-1 und der PG-1-Kleber-Gemische (■ **Abb. 2**). Die antimikrobielle Aktivität des PG-1 wurde durch das Beimischen von Fibrinkleber nicht inaktiviert, sondern proportional zum Verdünnungsvolumen reduziert. Das in Mischung eingebrachte PG-1 zeigte abhängig vom Volumenanteil eine Wachstumshemmung der in Agar wachsenden *E.-coli*-Bakterien, erkennbar am „Hemmhof“. Die Zone der Wachstumshemmung (mit Gentamycin als 100%) zeigte eine Verminderung auf 50,7% mit Protegrin-1 allein, auf 29,4% mit dem Peptid-Fibrinkleber-Gemisch

Chirurg 2006 · 77:251–256
DOI 10.1007/s00104-005-1089-8
© Springer Medizin Verlag 2005

L. U. Lahoda · S. C. Wang · P. M. Vogt

Antimikrobielle Peptide und Fibrinkleber in Verbrennungen. Biologische Potenz gegen multiresistente *Pseudomonas-aeruginosa*-Bakterien in Verbrennungen der Tiefe IIb

Zusammenfassung

Hintergrund. Antimikrobielle Peptide sind natürlich vorkommende kationische Peptidmoleküle. Die erste Verteidigungslinie der Verbrennungswunde stellt das angeborene Immunsystem dar, deren Bestandteile diese Peptide sind. Um die topische Anwendbarkeit in infizierten Verbrennungswunden zu vereinfachen wurde die Wirksamkeit in Fibrinkleber in vivo und in vitro getestet.

Material und Methoden. Nach In-vitro-Testung erhielten 15 männliche Sprague-Dawley-Ratten eine tief zweitgradige Verbrennung, wurden mit multiresistenten *Pseudomonas aeruginosa* infiziert und mit Protegrin-1 (PG-1; 100 µg/ml, $n=5$), Fibrinkleber ($n=5$) oder einem Gemisch aus beiden ($n=5$) topisch behandelt, die Wirkung wurde zuvor durch einen Radial-Diffusions-Assay bestätigt; 24 h später wurde die verbrannte und infizierte Haut gewonnen und

die Bakterienanzahl pro Gramm Haut bestimmt.

Ergebnisse. In vitro ließ sich die biologische Aktivität bestätigen. Die Gruppe aus entweder PG-1 oder Fibrinkleber zeigte in vivo keine signifikanten Unterschiede in der Bakterienanzahl, hingegen ließ sich in der Gruppe des Gemisches eine signifikante antibakterielle Wirkung nachweisen ($p<0,04$ und $p<0,01$).

Schlussfolgerungen. Eine Mischung aus dem antimikrobiellen Peptid PG-1 und Fibrinkleber reduziert die Bakterienzahl eines definierten Infektes einer IIb-Verbrennung in vivo signifikant im Vergleich zu den Kontrollgruppen.

Schlüsselwörter

Verbrennung · Angeborenes Immunsystem · Infektion · Antimikrobielle Peptide · Fibrinkleber

A mixture of antimicrobial peptides and fibrin glue in treatment of partial-thickness burn wounds

Abstract

Background. Antimicrobial peptides are naturally occurring cationic peptides. The first-line of defense in infected burns is the innate immune system, of which antimicrobial peptides are essential parts. To facilitate their topical use in infected partial-thickness burns, the efficacy of a mixture with fibrin glue in vitro and in vivo was tested.

Methods. After in vitro tests, 15 male Sprague-Dawley rats received partial-thickness burns. Afterwards, the wounds were infected with multiresistant *Pseudomonas aeruginosa*. The animals received PG-1 (100 µg/ml, $n=5$), fibrin glue ($n=5$), or a mixture of both ($n=5$) topically. The efficacy of the materials was previously proven by radial diffusion assay. After 24 h, the infected and

burned skin was harvested and quantitative bacterial counts per gram of skin performed.

Results. The biologic effect of the peptides was confirmed in vitro. The PG-1 and fibrin glue groups did not show significant differences in bacterial numbers, whereas the mixture group showed significant reduction in *Pseudomonas* in vivo ($P<0.04$ and $P<0.01$).

Conclusion. A mixture of an antimicrobial peptide and commercially available fibrin glue is capable of significantly reducing bacteria in infected partial thickness burns in vivo compared to controls.

Keywords

Burns · Innate immune system · Infection · Antimicrobial peptides · Fibrin glue

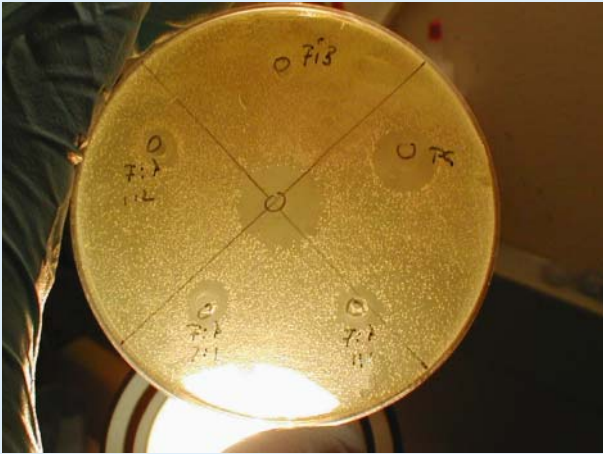
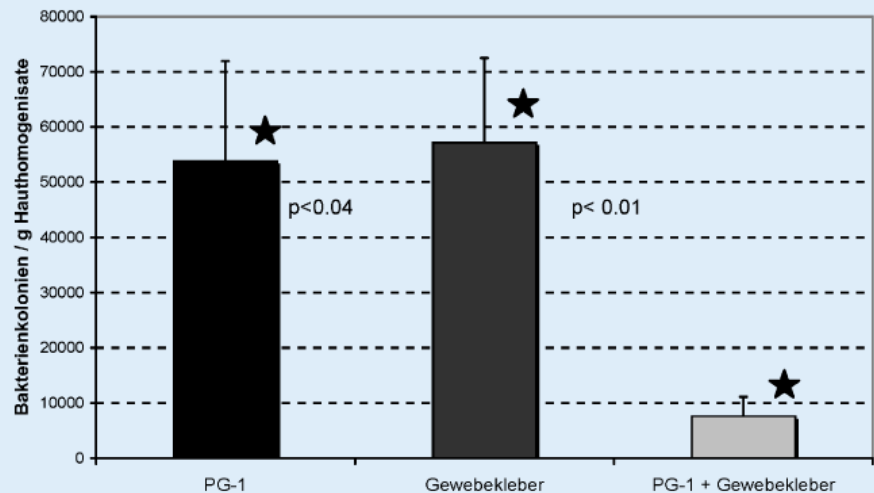


Abb. 2 ▲ Radial-Diffusions-Assay (Durchlichtbetrachtung): Hemmung von Bakterienwachstum durch PG-1 („PG“ und „P“), Fibrinkleber („FIB“ und „F“) und verschiedenen Mischungsverhältnissen (F:P) der beiden Komponenten. Zentral die Positivkontrolle durch Gentamycin



Abb. 3 ▲ Betäubte Sprague-Dawley-Ratte mit okklusivem Verband entsprechend der Versuchsanordnung unter selbstklebendem und elastischem Schutzverband gegen die Manipulation durch das Tier; freie Mobilität mit dem Verband bleibt erhalten

Abb. 4 ► Reduktion der Keimzahlen in pseudomonasinfizierten Verbrennungswunden (Hauthomogenisate). Signifikanter antimikrobieller Effekt bei Vermischung von PG-1 mit Fibrinkleber gegenüber den ungemischten Komponenten ($p < 0,04$ und $p < 0,01$)



(Mischungsverhältnis 1:1), auf 26,3% mit einem Mischungsverhältnis von 1:2 Fibrinkleber zu PG-1 und auf 16,5% mit dem Mischungsverhältnis 2:1 Kleber zu PG-1 (■ Tabelle 2).

Die positive und negative Kontrolle sind als „proof of concept“ des wissenschaftlichen Ansatzes zu werten. Es zeigte sich eine maximale bakterielle Inhibition durch das zentral verbrachte Gentamycin und keine bakterielle Hemmung durch den reinen Fibrinkleber. Die In-vitro-Experimente des Radial-Diffusions-Assay bestätigten somit unseren wissenschaftlichen Ansatz, dass die Mischung aus Gewebekleber und Protegrin-1 ebenso wie das antimikrobielle Peptid allein eine antibakterielle Wirksamkeit auch gegen einen resistenten *Pseudomonas aeruginosa* Stamm besitzt.

In-vivo-Experimente

Die Bakterienzahlen in den In-vivo-Experimenten zeigten keine signifikanten Unterschiede im Vergleich der ungemischten Protegrin-1- und Gewebekleber-Gruppen (■ Abb. 4) nach der Übernachtinkubation (Gruppe PG-1: 53.908 ± 18.020 (Kolonien/g Hauthomogenisat), $p < 0,04$; Gruppe Fibrinkleber: 57.219 ± 15.273 , $p < 0,01$; Gruppe PG-1 plus Fibrinkleber: 7621 ± 3495). ■ Abbildung 4 zeigt die Anzahl der Bakterienkolonien (Mittel aus 3-fachem Ansatz) pro Gramm Haut im Vergleich der 3 gebildeten Gruppen. Die Tiere, welche die Mischung aus dem Gewebekleber und dem PG-1 erhalten hatte, zeigten eine signifikante Verminderung der Zahl der Bakterien verglichen mit den beiden Kontrollgruppen ($p < 0,04$ und $p < 0,01$). Kein Tier

verstarb während des Experimentes (Statistik: „unpaired means of comparison“, StatView®, SAS Inc. USA). Im Vergleich beider Kontrollgruppen mit der Mischung aus Kleber und dem antimikrobiellen Peptid, ergab sich eine Reduktion der Bakterien auf ca. ein Fünftel. In unserer Analyse wurde keine Kreuzkontamination mit anderen Bakterien als Pseudomonaden gesehen.

Diskussion

Antimikrobielle Peptide sind bereits seit ungefähr 70 Jahren im Tier- und Pflanzenreich bekannt [8]. So besitzt selbst *Drosophila melanogaster* die Fähigkeit zu ihrer Produktion. Gewöhnlich sind diese Peptide ungefähr 100 Aminosäuren lang und werden von individuellen Genen ko-

diert, die eine Intron-Exon-Struktur aufweisen [15]. Bis heute kennt man über 500 solcher antimikrobieller Peptide, wobei regelmäßig neue Beschreibungen publiziert werden (<http://www.bbcm.univ.trieste.it/~tossi/antimic.html>).

Charakteristischerweise bestehen sie aus hydrophilen und hydrophoben dreidimensionalen Strukturen, die es ihnen ermöglichen, durch Einbau in die bekannten Lipidschichten der Zellwände „Poren“ zu formen und durch einen Austausch von extra- und intrazellulären Ionen zum Zelltod zu führen (Shai-Matsuzaki-Huang-Modell) [10, 22]. Aktuell wird diskutiert, dass der Zellwandaufbau (die Mischung der unterschiedlichen Lipide) einen essenziellen Einfluss auf die Effizienz dieser Peptide spielt und zur Unterscheidung zwischen „körpereigen“ und „körperfremd“, im Vergleich der Mehrzeller zu den Einzellern, beiträgt. Lymphozyten, Endothelzellen und Keratinozyten produzieren AMPs und geben dadurch deutliche Hinweise auf deren Wichtigkeit zum Schutz der endothelialen wie der epithelialen Oberflächen der Lunge, der Haut und des Gastrointestinaltraktes [5, 1]. Im Menschen finden sich Defensine, Cathelizidine (wie Protegrin-1, LL37 usw.) und Histatine [15]. Wenn man nach einem „Mangelsyndrom“ der AMPs als Ursache von Erkrankungen oder möglichen Hinweisen auf die Pathogenese dieser Erkrankungen sucht, so ergeben sich Verbindungen zum Chediak-Higashi-Syndrom, zur zystischen Fibrose und Einflüsse bei genereller Immundefizienz [2, 7]. Diesem postulierten Mangel steht die genetisch nachweisbare „up-regulation“ durch die Anwesenheit und Stimulation von Lipopolysaccharid (LPS, Synonym für „Endotoxin“ und entspricht dem wesentlichen Bestandteil von gramnegativen Bakterienwänden), Interleukin 6 und retinoischer Säure gegenüber.

Protegrin-1 (PG-1, **Abb. 1**), ein Vertreter der antimikrobiellen Peptide, das ursprünglich aus Schweine-Neutrophilen isoliert wurde, konnte in Vorversuchen unseres Labors die bakterielle Infektionsrate in einem Rattenverbrennungsmodell deutlich reduzieren [20]. Andere Untersucher konnten in ihren Tiermodellen zeigen, dass sich einerseits die Überlebensrate durch die topische Anwendung der Peptide in Verbrennungen dramatisch stei-

gern ließ [3], in einem anderen Fall wurde die Menge eines Oberflächenpeptids (humanes β -Defensin) in bronchoalveolären Lavagen von Patienten mit Verbrennungen im Vergleich zu einer Kontrollgruppe untersucht [12]. Auch hier zeigten sich erhöhte Werte bei Verbrennungspatienten, ein Hinweis für die vermehrte Produktion durch das Verbrennungstrauma. In einem weiteren Versuch konnte gezeigt werden, dass in Verbrennungsarealen verminderte Konzentrationen der Peptide (Defensine) perifokal vorlagen und korrelierten [13], bei zweitgradigen Verbrennungen verlagerten sich die Produktionsstätten der Peptide aus der Dermis in deren Anhängsel wie Haarfollikel oder Schweißdrüsen. Die Wirkung der Peptide ist demnach nicht nur einem einzigen Peptid zuzuordnen. Im Gegensatz zu unserem Verbrennungsmodell verwenden die meisten Untersucher derzeit drittgradige Verbrennungen, ausgenommen Milner et al. [13].

Verbrennungen bis zur Tiefe IIb sind Gegenstand unseres Interesses, da sich die Frage stellt, ob bei tiefdermalen Verbrennungen der Organismus in der Lage ist, das infizierte Wundmilieu bei verlorengegangener Schutzschicht der Haut durch die ortständige Abwehr des angeborenen Immunsystems zu kompensieren und wie die lokalen Defensivstrategien gegen eindringende Krankheitserreger aussehen. In mehreren Versuchen der klinischen Umsetzung der attraktiven Potenz antimikrobieller Peptide werden zurzeit Phase-II- und -III-Tests durchgeführt [2], die sich allerdings auf Themen wie den diabetischen Fuß und dessen komplizierende Ulzerationen sowie die orale Mukositis [4] und das Beschichten von intravenösen Dauerkathetern konzentrieren.

Die Erforschung im Rahmen von Verbrennungen wird derzeit nur von wenigen internationalen Forschergruppen vorgenommen. Entsprechend unserem Forschungsschwerpunkt, wurde nach Etablierung eines standardisierten Verbrennungsmodells an kleinen Nagern, Untersuchungen zur Wirkung der lokale Applikation von Protegrin-1 (PG-1) in infizierten Verbrennungen der Tiefe IIb durchgeführt. Es sollte die biologische Aktivität und Wirkung von einem Gemisch aus Firinkleber mit PG-1 gegen einen multiresistenten Stamm *Pseudomonas aeruginosa*

Tabelle 2

Hemmwirkung auf das Bakterienwachstum der experimentellen Gruppen in vitro in Relation zur Positivkontrolle im Radial-Diffusions-Assay (s. **Abb. 2)**

Versuchsansatz	Wachstumshemmung
Gentamycin	100%
PG-1	50,7%
Kleber-PG1 1:1	29,4%
Mischung Kleber-PG1 1:2	26,3%
Mischung Kleber-PG1 2:1	16,5%

Positivkontrolle: Gentamycin,
Negativkontrolle: Kleber.

nach Vorversuchen in vitro und in vivo bestimmt werden.

Das in flüssiger Form vorliegende aktive Peptid stellte eine Herausforderung im Handling dar. Ein Lösungsansatz ergab sich durch die Kombination mit Gewebekleber, um nunmehr einfachere Anwendbarkeit, die Problematik der Applikation auf unebenen Oberflächen und die gewünschte topische antibakterielle Aktivität möglichst optimal verbinden zu können. In aus der Literatur bekannten Studien war die Umsetzung der Idee topischer antibakteriell wirksamer Substanzen vorbeschrieben [21, 16, 17, 14, 11, 6]. Nach einer Serie von In-vitro-Versuchen mit unterschiedlichen Konzentrations- und Mischungsverhältnissen, in enger Anlehnung an die Richtlinien zur Verwendung des Gewebeklebers, zeigte sich die mögliche klinische Anwendbarkeit, indem das verwendete Peptid nicht durch den Kleber in seiner antibakteriellen Wirkung neutralisiert wurde. Zudem erleichterte sich das Aufbringen des Protegrins in vivo durch den Kleber.

Die Ergebnisse unserer Tierstudien erklären sich auch durch die Art der Applikation einerseits als flüssiges Medium des puren Peptids, andererseits des Klebergemisches plus Peptid. Erwartungsgemäß sollten die Bakterien durch das „pure“, unvermischte Protegrin-1 deutlich reduziert werden, allerdings ist die Zahl der Bakterienkolonien ähnlich hoch wie in der Gruppe der nur mit dem Kleber „behandelten“ Tiere. Eine mögliche Erklärung ist die zunehmende Kontaktzeit des Peptids zusam-

men mit dem Kleber, der in nur flüssiger Form leicht von der Rattenhaut abtropft und durch Aufnahme in den sterilen Verband an Wirkung zu verlieren scheint. Im Gegensatz dazu ist durch das Mischen mit dem Kleber ein Film aus Kleber-Peptid-Gemisch auf der Haut präsent, der dort seine antibakterielle Effizienz lokal verbreiten kann, ein Effekt der durch den Kleber allein nicht auftritt.

Es ist bekannt, dass die Peptide ca. 6 h Wirksamkeit aufweisen, bevor das bakterielle Wachstum wieder in Gang kommt und die zuvor erzielte Keimzahlreduktion bald wieder zunichte macht. Der Organismus schafft dies durch ständige Neuproduktion und Mischung verschiedener Klassen von AMPs im klinischen Bedarfsfall. In unseren Experimenten wurde einmalig extern Protegrin-1 hinzugefügt, jedoch nicht kontinuierlich, weshalb die Reduktion der Krankheitserreger als nur kurzfristig gesehen werden darf. Dennoch bietet dieser Effekt neben dem Vorteil der bisher nicht und als extrem unwahrscheinlich einzustufenden Resistenzentwicklung, noch den Zeitgewinn in der Kolonialisierung und Infektion sowie die breite Wirksamkeit gegen die eingangs erwähnten gramnegativen und grampositiven Bakterien, spezielle Pilze und je nach Aufbau der externen Membranen, auch pathogenen Viren. Dieser Pluripotenz stehen im Experiment die Produktionskosten gegenüber.

Fazit für die Praxis

Wir konnten in unseren Studien zeigen, dass die Applikation eines Gemisches aus Protegrin-1 (einem kommerziell erhältlichen antimikrobiellen Peptid) und einem kommerziell erhältlichen Gewebekleber die bakterielle Keimbesiedelung in Verbrennungswunden signifikant zu reduzieren vermochte. Beide Komponenten erwiesen sich in unseren Händen als stabil und deaktivierten sich nicht gegenseitig. Eine Behandlung im Rahmen der klinischen Umsetzung an Verbrennungspatienten könnte kombiniert mit Hauttransplantaten und künstlichem Hautersatz Verwendung finden, um in der im Outcome so wichtigen Frühphase nach Trauma eine topische Unterstützung im Kampf gegen Krankheitserreger bereitzustellen. Weitere Anwendungsbereiche au-

ßerhalb der Verbrennungsmedizin sind denkbar. Ergänzende, vor allem aber klinische Studien lassen weitergehende Kenntnisse über diese natürlichen Bausteine des angeborenen Immunsystems erwarten.

Korrespondierender Autor

Dr. L. U. Lahoda

Klinik für Plastische, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Schwerverbranntenzentrum, Replantationszentrum der Medizinischen Hochschule Hannover, Oststadtkrankenhaus, Podbielskistraße 380, 30659 Hannover
E-Mail: lu.lahoda.oststadt@klinikum-hannover.de

Interessenkonflikt: Der korrespondierende Autor versichert, dass keine Verbindungen mit einer Firma, deren Produkt in dem Artikel genannt ist, oder einer Firma, die ein Konkurrenzprodukt vertreibt, bestehen.

Literatur

- Agerberth B, Charo J, Werr J, Olsson B et al. (2000) The human antimicrobial and chemotactic peptides LL-37 and alpha-defensins are expressed by specific lymphocyte and monocyte populations. *Blood* 96:3086–3093
- Bals R (2000) [Antimicrobial peptides and peptide antibiotics]. *Med Klin* 95:496–502
- Chalekson CP, Neumeister MW, Jaynes J (2003) Treatment of infected wounds with the antimicrobial peptide D2A21. *J Trauma* 54:770–774
- Chen J, Falla TJ, Liu H, Hurst MA et al. (2000) Development of protegrins for the treatment and prevention of oral mucositis: structure-activity relationships of synthetic protegrin analogues. *Biopolymers* 55:88–98
- De Y, Chen Q, Schmidt AP et al. (2000) LL-37, the neutrophil granule- and epithelial cell-derived cathelicidin, utilizes formyl peptide receptor-like 1 (FPR1) as a receptor to chemoattract human peripheral blood neutrophils, monocytes, and T cells. *J Exp Med* 192:1069–1074
- Fujimoto K, Yamamura K, Osada T, Hayashi T (1997) Subcutaneous tissue distribution of vancomycin from a fibrin glue/Dacron graft carrier. *J Biomed Mater Res* 36:564–567
- Ganz T, Metcalf JA, Gallin JI, Boxer LA, Lehrer RI (1988) Microbicidal/cytotoxic proteins of neutrophils are deficient in two disorders: Chediak-Higashi syndrome and „specific“ granule deficiency. *J Clin Invest* 82:552–556
- Ganz T (2001) Antimicrobial proteins and peptides in host defense. *Semin Respir Infect* 16:4–10
- Gilpin DA (1996) Calculation of a new Meeh constant and experimental determination of burn size. *Burns* 22:607–611
- Lehrer RI, Ganz T (2002) Defensins of vertebrate animals. *Curr Opin Immunol* 14:96–102
- Marone P, Monzillo V, Segu C, Antoniazzi E (1999) Antibiotic-impregnated fibrin glue in ocular surgery: in vitro antibacterial activity. *Ophthalmologica* 213:12–15
- Milner SM, Cole A, Ortega MR, Bakir MH, Gulati S, Bhat S, Ganz T (2003) Inducibility of HBD-2 in acute burns and chronic conditions of the lung. *Burns* 29:553–555
- Milner SM, Bhat S, Buja M, Gulati S, Poindexter BJ, Bick RJ (2004) Expression of human beta defensin 2 in thermal injury. *Burns* 30:649–654
- Nishimoto K, Yamamura K, Fukase F, Kobayashi M, Nishikimi N, Komori K (2004) Subcutaneous tissue release of amikacin from a fibrin glue/polyurethane graft. *J Infect Chemother* 10:101–104
- Nizet V, Ohtake T, Lauth X et al. (2001) Innate antimicrobial peptide protects the skin from invasive bacterial infection. *Nature* 414:454–457
- Osada T, Yamamura K, Yano K, Fujimoto K, Mizuno K, Sakurai T, Nabeshima T (2000) Distribution and serum concentration of sisomicin released from fibrin glue-sealed dacron graft in the rat and human. *J Biomed Mater Res* 52:53–57
- Patrlj L, Kocman B, Martinac M, Jadrijevic S, Sosa T, Sebecic B, Brkljacic B (2000) Fibrin glue-antibiotic mixture in the treatment of anal fistulae: experience with 69 cases. *Dig Surg* 17:77–80
- Qu XD, Harwig SS, Shafer WM, Lehrer RI (1997) Protegrin structure and activity against *Neisseria gonorrhoeae*. *Infect Immun* 65:636–639
- Steinberg DA, Lehrer RI (1997) Designer assays for antimicrobial peptides. Disputing the „one-size-fits-all“ theory. *Methods Mol Biol* 78:169–186
- Steintraesser L, Klein RD, Aminlari A et al. (2001) Protegrin-1 enhances bacterial killing in thermally injured skin. *Crit Care Med* 29:1431–1437
- Thompson DF, Davis TW (1997) The addition of antibiotics to fibrin glue. *South Med J* 90:681–684
- Zanetti M, Gennaro R, Romeo D (1995) Cathelicidins: a novel protein family with a common proregion and a variable C-terminal antimicrobial domain. *FEBS Lett* 374:1–5
- Zasloff M (2002) Antimicrobial peptides of multicellular organisms. *Nature* 415:389–395