

**ENTWICKLUNG EINER ENZYMATISCH ABBAUBAREN,
BIOCHIRURGISCH WIRKENDEN WUNDAUFLAGE**



DISSERTATION
ZUR ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER CHRISTIAN-ALBRECHTS-UNIVERSITÄT
ZU KIEL

vorgelegt von
Steve Minde

Kiel 2006

Referent : Prof. Dr. Dr. h. c. B.W. Müller
Korreferent : PD Dr. H. Steckel
Mündliche Prüfungen :
Zum Druck genehmigt :

Das Fehlen einer besonderen Kennzeichnung oder eines entsprechenden Hinweises auf ein Warenzeichen, ein Gebrauchsmuster oder einen Patentschutz lässt nicht den Schluss zu, dass über die in dieser Arbeit angegebenen Dinge frei verfügt werden kann.

Teile dieser Arbeit sind bereits veröffentlicht oder zur Veröffentlichung eingereicht in:

Tagungsbeiträge

Minde, S. und Müller, B.W., Adsorptive properties of coated cellulose fibres. Proc. DPhG Jahrestagung, Mainz, 5-8 October (2005)

Minde, S. und Müller, B.W., Stabilisation of larval secretion of *Lucilia Sericata* for wound healing. Proc. International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Geneva, 27-30 March (2006)

Minde, S., Rupp, C. und Müller, B.W., Control of drug delivery from cellulose fibres. Proc. International Meeting on Pharmaceutics, Biopharmaceutics and Pharmaceutical Technology, Geneva, 27-30 March (2006)

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG	1
1.1	Einleitung	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	3
2	THEORETISCHE GRUNDLAGEN	5
2.1	Einsatz steriler Fliegenmaden zur Behandlung chronischer Wunden	5
2.1.1	Physiologie der Wundheilung	5
2.1.2	Problematik der Chronischen Wundheilung	6
2.1.3	Verwendung Steriler Fliegenmaden zur Wundheilung	7
2.1.3.1	Erfolge der Madentherapie	7
2.1.3.2	Wirkmechanismen der Madentherapie	8
2.1.3.3	Problematik der Madentherapie	9
2.2	Enzymatische Degradation von Cellulosematerialien	12
2.2.1	Struktur der Cellulose	12
2.2.2	Cellulolytische Enzyme	13
2.2.2.1	Allgemeines	13
2.2.2.2	Abbau von Cellulose	14
2.2.3	Anfärben von Cellulosematerialien mit Reaktivfarbstoffen	15
3	METHODEN	17
3.1	Einleitung	17
3.2	Methoden zur Strukturaufklärung	17
3.2.1	Röntgendiffraktometrie	17
3.2.2	Rasterelektronenmikroskopie	18
3.3	Thermoanalytische Methoden	19
3.3.1	Feuchtegehalt/Thermogravimetire	19
3.3.2	Differential Scanning Calorimetry (DSC)	19
3.3.2.1	Einleitung	19
3.3.2.2	Durchführung	20
3.4	Adsorptionsmethoden	21

3.4.1	Dynamische Wasserdampf Sorption	21
3.4.1.1	Einleitung	21
3.4.1.2	Durchführung	21
3.4.2	Inverse Gaschromatographie	22
3.4.2.1	Dispersive Interaktionen (Oberflächenenergie einer Feststoffoberfläche)	25
3.4.2.2	Spezifische Interaktionen (Säure-Base-Parameter)	27
3.4.2.3	Erstellung von Isothermen	30
3.4.2.4	Durchführung	32
3.5	Trocknungsmethoden	34
3.5.1	Gefriertrocknung	34
3.5.1.1	Herstellung der Zubereitungen	34
3.5.1.2	Gefriertrocknung	34
3.6	Enzymatische Bestimmungsmethoden	35
3.6.1	Einleitung	35
3.6.2	Tryptische Aktivität	35
3.6.3	Leucinaminopeptidase-Aktivität	37
3.6.4	Quantifizierung der Glukosekonzentration	38
4	TRÄGERMATERIALIEN	41
4.1	Einleitung	41
4.2	Cellulosematerialien	42
4.2.1	Viskose	42
4.2.2	Baumwolle	52
4.2.3	Mull	56
4.2.4	weitere Materialien	60
4.2.4.1	Mikrobielle Cellulose	60
4.2.4.2	Hohlfaser	63
4.3	Zusammenfassung	64
5	ABBAU DER MATERIALIEN	67
5.1	Einfluss einer Säurebehandlung auf die Faser	67
5.1.1	Einleitung	67

5.1.2	Physikochemische Eigenschaften	69
5.1.3	Zusammenfassung	86
5.2	Einfluss einer Cellulasebehandlung auf die Faser	87
5.2.1	Einleitung	87
5.2.2	Abbau der Fasern	88
5.2.2.1	Allgemeines	88
5.2.2.2	Einfluss auf die Fasereigenschaften	89
5.2.2.3	Masseverlust	100
5.2.2.4	Säurebehandeltes Material	101
5.2.3	Verwendung von Remazolblau	106
5.2.3.1	Einleitung	106
5.2.3.2	Veränderung der Fasereigenschaften	107
5.2.3.3	Remazolblau als Modellarzneistoff	109
5.2.4	Zusammenfassung	113
5.3	Einfluss einer Cellulasebehandlung auf die Filme	114
5.3.1	Einleitung	114
5.3.2	Integration von Cellulase in den Film	115
5.3.3	Integration von Cellulase in das Puffersystem	115
5.3.4	Zusammenfassung	123
6	STABILISIERUNG VON MADENSEKRET DER FLIEGENGATTUNG <i>LUCILIA SERICATA</i>	124
6.1	Einleitung	124
6.2	Gewinnung von Madensekretionslösung	124
6.3	Charakterisierung der Madensekretionslösung	126
6.3.1	Antibiotische Aktivität	127
6.3.1.1	Madensekretionslösung	127
6.3.1.2	Isolierte Maden	128
6.3.2	Enzymatische Aktivität	131
6.4	Gefriertrocknung der Madensekretionslösung	132
6.4.1	Eigenstabilisierung und einatz einer oberflächenaktiven Substanz	132

6.4.2	Stabilisierung durch Einsatz verschiedener Hilfsstoffmatrices	134
6.4.2.1	Maltodextrin	134
6.4.2.2	Hydroxypropylmethylcellulose	138
6.4.2.3	Hydroxypropyl- β -cyclodextrin	141
6.4.2.4	Hydroxyethylstärke	143
6.4.2.5	Dextran, Trehalose und deren Kombination	144
6.4.2.6	Zusammenfassung	147
6.4.3	Stabilisierung durch Hilfsstoffe und Faser	153
6.4.4	Stabilisierung durch die Faser	159
6.5	Zusammenfassung	167
7	FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN AUS DER WUNDAUFLAGE	169
7.1	Einleitung	169
7.2	Insulin als Modellarzneistoff	169
7.2.1	Allgemeines	169
7.2.2	Herstellung von Insulinlösungen	171
7.3	Freisetzung aus der unbefilmten Faser	171
7.3.1	Adsorption von Insulin an die Faser	171
7.3.2	Freisetzungsprofile	173
7.3.3	Zusammenfassung	174
7.4	Freisetzung aus der befilmten Faser	175
7.4.1	Einleitung	175
7.4.2	Diffusionskontrollierte Freisetzung	175
7.4.3	Cellulasekontrollierte Freisetzung	180
7.4.4	Zusammenfassung	185
8	ZUSAMMENFASSUNG	186
9	ABSTRACT	190
10	ANHANG	193
10.1	Abkürzungen und Symbole	193
10.2	HPLC-Analytik	194
10.2.1	Apparativer Aufbau	194

10.2.2	Insulinanalytik	194
11	LITERATURVERZEICHNIS	195

1 EINLEITUNG UND ZIELSETZUNG

1.1 EINLEITUNG

Die Zahl der Patienten in Deutschland, die unter chronischen Wunden leiden, liegt bei über drei Millionen (Diehm, 2005). Die häufigsten Formen der chronischen Wunden sind der Dekubitalulkus, *Ulcus cruris* (Landendörfer, 2005) und das diabetische Fußsyndrom. Aufgrund der demographischen Entwicklung der Bevölkerung und der stetig steigenden Anzahl an *Diabetes mellitus* erkrankten Menschen (Tuomilehto, Lindstrom *et al.*, 2001) ist mit einem Rückgang dieser Problematik nicht zu rechnen. Das Krankheitsbild der chronischen Wunde belastet jedoch nicht nur den Betroffenen, sondern beinhaltet auch enorme volkswirtschaftliche Probleme, die schwer abzuschätzen sind.

Zudem sind viele chronische Wunden mit Bakterien infiziert (Hansson, Hoborn *et al.*, 1995), wodurch der Heilungsverlauf zusätzlich eingeschränkt wird. Die Beseitigung der Infektionen ist demnach das wichtigste Ziel für eine beschleunigte Wundheilung und eine Gabe von Antibiotika bei mehr als der Hälfte der Patienten mit chronischen Wunden indiziert (Tammelin, Lindholm *et al.*, 1998). Allerdings erfordert die effektive Antibiose, aufgrund ständig steigender und neuer Resistenzen der Bakterien (Mason, Howard *et al.*, 2003; Shah und Mohanraj, 2003), eine sorgfältige Analyse des Keimspektrums und häufig eine systemische Antibiotikagabe. Dementsprechend sollte eine lokale Therapie der Wunde vermieden werden, da die Möglichkeiten der lokalen Antibiotikatherapie stark begrenzt sind und mehrfach von einer systemischen Antibiose unterstützt werden müssen (Howell-Jones, Wilson *et al.*, 2005). Da bereits mehr als die Hälfte des isolierten Wundkeims *Staphylococcus aureus* eine Resistenz zeigen (Colsky, Kirsner *et al.*, 1998), wird vermehrt nach alternativen Behandlungsmethoden gesucht. Hierbei konnte die Therapie mit sterilen Fliegenmaden für die Zwecke der modernen Wundheilung wiederentdeckt werden (Sherman, Hall *et al.*, 2000). Obwohl bereits viele

Erfolge bei der Behandlung von mit resistenten Keimen infizierten Wunden mit Fliegenmaden erzielt werden konnten (Dissemond, Koppermann *et al.*, 2002), ist die Vorstellung der Applikation von Maden auf die offene Wunde abschreckend. Die Erforschung des Wirkmechanismus der Maden führte zu der Erkenntnis, dass besonders das Sekret der Maden die erfolgreiche Behandlung von Wunden ermöglicht (Grassberger und Frank, 2003).

Neben der Problematik der effektiven Desinfektion chronischer Wunden ist die Wundversorgung mit dem richtigen Verbandmaterial ein weiterer wichtiger Faktor. Es existiert ein großes Spektrum an modernen Wundverbänden, die oft das Ziel einer feuchten Wundversorgung verfolgen (Wolf, 1998). Zudem ist es wichtig die Frequenz eines Verbandwechsels so gering wie möglich zu halten. Hierdurch wird primär die Wundheilung gefördert, aber es kommen auch pragmatische Vorteile hinzu. Der Betreuungsaufwand durch Fachpersonal wird minimiert und die Vermeidung von Verbandmüll beinhaltet einen wichtigen ökologischen Nutzen.

Um einen optimalen Wundverband zu erhalten, der nicht nur eine wirksam desinfizierende Substanz beinhaltet, die über einen längeren Zeitraum die Wunde versorgt, sondern der auch ökologisch betrachtet effektiv ist, kann der Einsatz von bioresorbierbaren Polymeren eine Alternative darstellen (Behrend, Schmitz *et al.*, 2000). Das Problem dieser Polymere besteht allerdings darin, dass sie nicht nur wenig Kapazität für die Aufnahme eines Wirkstoffes haben, sondern auch deren vollständiger Abbau eine Zeitdauer von mehreren Monaten erfordert (Behrend, Schmitz *et al.*, 2000). Diese Polymere lassen sich in synthetische und natürliche Materialien einteilen. Ein natürliches Polymer, das auch in der Wundheilung nicht zu ersetzen ist, stellt hierbei die Cellulose dar. Die typischen Cellulosematerialien sind Baumwolle und Viskose, jedoch erstreckt sich das medizinische Einsatzgebiet von mikrobieller Cellulose bis zum Gefäßersatz in der Mikrochirurgie (Marsch, Udhardt *et al.*, 2000). Die Verwendung von Cellulosematerialien in der chronischen Wundheilung beinhaltet einige Nachteile, wie z.B. die Bildung kleiner Fragmente oder das Verkleben

mit der Wunde. Obwohl diese Probleme zu einem rückläufigen Einsatz der Cellulose führt, bietet die Cellulose viele Vorteile. Die Cellulose ist das häufigste Biopolymer auf der Erde. Zudem bieten die Cellulosematerialien aufgrund der Faserstruktur eine hohe Aufnahmekapazität für ein mögliches Therapeutikum zur lokalen Behandlung der Wunde und der Abbau dieses Polymers ist durch enzymatische Hydrolyse möglich (Schurz, Hönel *et al.*, 1985). Der Einsatz von cellulolytischen Enzymen rückt aufgrund des regen Interesses am Rohstoff Cellulose immer mehr in den Mittelpunkt und ist demzufolge genau untersucht (Lynd, Weimer *et al.*, 2002). Für die Wundheilung könnte sich hieraus ein interessantes Einsatzgebiet ergeben, da der Abbau der Cellulose bis auf seinen Grundbaustein Glukose möglich ist und auf einen mit Nachteilen verbundenen Verbandwechsel verzichtet werden kann. Das „Abfallprodukt“ Glukose kann vom Körper aufgenommen werden und hat keinen negativen Einfluss auf die Wundheilung (Koessi, Peltonen *et al.*, 1999).

1.2 ZIELSETZUNG DER ARBEIT

Obwohl das Krankheitsbild der chronischen Wunde genau erforscht ist und die Möglichkeiten der modernen Wundtherapie sehr vielseitig sind, müssen ständig neue Alternativen entwickelt werden. Hierbei stehen vor allem der Patient und die effektive Behandlung seiner Erkrankung im Vordergrund. Jedoch rücken auch wirtschaftliche und ökologische Faktoren immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses. Eine innovative Wundauflage muss dementsprechend eine wirksame Wunddesinfektion, im Idealfall nur durch eine lokale Applikation des Therapeutikums, eine Minimierung der Häufigkeit des Verbandwechsels sowie den Einsatz natürlicher Ressourcen ermöglichen. In der vorliegenden Arbeit sollen die Grundlagen zur Entwicklung einer Wundauflage geschaffen werden. Die Wundauflage soll aus dem natürlichen

Rohstoff Cellulose bestehen und einen Wirkstoff enthalten, der über einen längeren Zeitraum hinweg in gleichmäßiger Konzentration an das Wundmilieu abgegeben wird. Die Steuerung der Wirkstofffreisetzung soll parallel zum bzw. durch den enzymatischen Abbau des Cellulosematerials durch eine Cellulase stattfinden. Dadurch könnte die Wundaufgabe mehrere Tage auf der Wunde verbleiben und sich schließlich komplett auflösen. Aufgrund der strengen Indikationsstellungen für viele Lokaltherapeutika zur Behandlung chronischer Wunden und der Effektivität von sterilen Maden in der Wundheilung soll das Sekret der Maden der Fliegengattung *Lucilia sericata* als Wirkstoff in den Träger integriert werden. Für die Realisierung dieser patentierten Idee (Fleischmann, 2000) soll das Sekret durch Gefriertrocknung in eine feste Form überführt und an ein Cellulosematerial adsorbiert werden.

Die Charakterisierung möglicher Cellulosematerialien soll sowohl in Hinblick auf deren Eignung als Träger für das Madensekret als auch auf deren Abbau durch ein Enzym stattfinden. Hierbei sollen Eigenschaften ermittelt werden, die eine Wechselwirkung zwischen dem Madensekret und der Trägeroberfläche positiv bezüglich der Stabilität des Sekrets beeinflussen. Nach der Auswahl von möglichen Trägermaterialien sollen der enzymatische Abbau und die Freisetzung des Wirkstoffes genauer untersucht werden.

Die Arbeiten wurden im Rahmen eines Verbundprojekts mit den Hohensteiner Instituten durchgeführt und mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung (BMBF) finanziert.

2 THEORETISCHE GRUNDLAGEN

2.1 EINSATZ STERILER FLIEGENMADEN ZUR BEHANDLUNG CHRONISCHER WUNDEN

2.1.1 PHYSIOLOGIE DER WUNDHEILUNG

Eine Wunde ist ein, meist durch eine Verletzung entstandener, Defekt des Deckgewebes oder eine mit Gewebeverlust einhergehende Gewebetrennung (Thews, Mutschler *et al.*, 1999). Die nach Entstehung einer Wunde einsetzende kutane Wundheilung ist durch ein Zusammenspiel von zellulären und extrazellulären Bestandteilen geprägt. Unmittelbar nach der Zerstörung des Schutzmantels der Haut wird im Körper eine vielschichtige biochemische Kaskade aktiviert, deren Ziel der zügige Wundverschluss ist. Dieser Prozess umfasst im Allgemeinen drei verschiedene Phasen, die normalerweise zeitlich hintereinander ablaufen, aber sich durchaus überschneiden können. In diesen Phasen werden unterschiedliche Wachstumsfaktoren und inflammatorische Mediatoren freigesetzt (Scheithauer und Riechelmann, 2003).

Die Einteilung der Phasen ist wie folgt möglich:

1. Exsudative Phase (1. bis 3. Tag)
2. Proliferative Phase (4. bis 7. Tag)
3. Reparationsphase (ab dem 8. Tag)

In der exsudativen Phase (Reinigungsphase) reinigt der Körper die Wunde durch vermehrte Flüssigkeitsausschwemmung. Zusätzlich kommt es zur Hämostase durch das Zusammenspiel von Thrombozyten und der Gerinnungskaskade. Zudem sind die typischen Merkmale einer physiologischen Entzündung (Rötung, Schwellung und Schmerz) zu erkennen. Bereits 2 – 4 Stunden nach der Gewebläsion beginnt die Phase der Reepithelisierung.

In der proliferativen Phase, der so genannten Granulationsphase, ist aus der beginnenden Reepithelisierung am Wundgrund bereits ein neues gefäßreiches

Gewebe entstanden, das den Defekt ausfüllt (Scheithauer und Riechelmann, 2003). In dieser Phase wandern eine Reihe von unterschiedlichen Zellen, z.B. Fibroblasten, Angioblasten und Keratinozyten in die Wunde. Sie beginnen sich zu teilen und differenzieren zu Kollagengewebe aus.

In der abschließenden Reparationsphase, der so genannten Epithelisierungsphase, kommt es zur Vollendung der Kollagensynthese. Durch eine Rückbildung der Kapillaren blasst die Wunde ab und verändert sich unter zunehmender Schrumpfung zu einer Narbe.

Im Regelfall erfolgt eine normal verlaufende Gewebereparatur, die nach spätestens sechs Wochen abgeschlossen sein sollte. Allerdings kommt es gelegentlich zu Störungen dieses Heilungsgleichgewichts und die Wunde zeigt über Wochen keine Heilungstendenz. In diesen Fällen spricht man von chronischen Wunden. Die Ursachen der gestörten Wundheilung können vielschichtig sein und lassen sich in regionale und systemische Faktoren unterscheiden (Scheithauer und Riechelmann, 2003). Zu den regionalen Faktoren gehören z.B. die Wundinfektion, Fremdkörpereinschluss oder die Lokalisation der Wunde. Beispiele für systemische Faktoren, die eine gestörte Wundheilung hervorrufen können, sind Tumorerkrankungen, das Lebensalter des Patienten oder Erkrankungen, die mit einer gestörten Wundheilung einhergehen (*Diabetes mellitus*) (Scheithauer und Riechelmann, 2003).

2.1.2 PROBLEMATIK DER CHRONISCHEN WUNDHEILUNG

Die häufigsten Wundtypen der chronischen Wunden sind das *Ulcus cruris*, der diabetische Fuß und der Dekubitus. Hierbei handelt es sich vorwiegend um Krankheitsbilder, bei denen entweder die Durchblutung von Extremitäten nicht gewährleistet ist oder aber die Versorgung mit Nährstoffen bzw. die Entsorgung von Giftstoffen in den betroffenen Bereichen nicht ausreichend ist. In allen diesen Fällen kommt es nicht selten zu therapierefraktären Wunden. Die häufigste Ursache für die lange Zeitdauer der Wundheilung liegt in einer

Wundinfektion. Diese entsteht vor allem durch nekrotische Ablagerungen in den Wunden. Aufgrund der Tatsache, dass Nekrosen von der Blutversorgung abgekoppelt sind, können keine immunkompetenten Zellen in diese Bereiche gebracht werden und einen bakteriellen Befall verhindern (Fleischmann, Russ *et al.*, 1998). Für eine erfolgreiche Wundheilung ist dementsprechend eine Beseitigung der Nekrose, aber auch der pathogenen Keime obligat. Eine rein lokale Antibiose ist nicht ausreichend und kann zu Resistenzen führen. Somit ist für eine optimale Infektionsbeseitigung nur die Erstellung eines Antibiogramms mit anschließender systemischer Antibiotikagabe denkbar (Haußmann, 2000). Weitere Möglichkeiten zur Entfernung der Nekrose sind das chirurgische bzw. das enzymatische Wunddebridement. Beim chirurgischen Eingriff besteht die Gefahr der Wundvergrößerung, da eventuell gesundes Gewebe mit entfernt werden kann. Bei der zweiten Methode ist mit einer sehr langen Behandlungszeit zu rechnen.

2.1.3 VERWENDUNG STERILER FLIEGENMADEN ZUR WUNDHEILUNG

Wenn eine Wundinfektion mit gängigen lokalen oder systemischen Antibiotika nicht mehr therapierbar ist bzw. eine Nekrose aus verschiedenen Gründen chirurgisch nicht entfernt werden kann, ist alternativ die Methode der Biochirurgie anwendbar. Der Begriff Biochirurgie ist deshalb zutreffend, da im Vergleich zum herkömmlichen Debridement nicht mit einem Skalpell, sondern mit biologischem Material gearbeitet wird (Haußmann, 2000).

2.1.3.1 Erfolge der Madentherapie

Die Ursprünge der Madentherapie liegen bereits fast 500 Jahre zurück, als Chirurgen von (nicht immer positiven) Auswirkungen der Maden in den Wunden verletzter Soldaten berichteten (Grassberger und Frank, 2003). Eine genaue Untersuchung des wundheilungsfördernden Potentials steriler

Fliegenmaden begann erst in den dreißiger Jahren des 20. Jahrhunderts (Baer, 1931). Allerdings gerieten die Erfolge dieser Behandlungsmethode mit der Erfindung der Antibiotika schnell in Vergessenheit. Mit der zunehmenden Resistenzentwicklung gegenüber Antibiotika und einhergehenden schlechten Behandlungserfolgen wurde diese Therapieform wiederentdeckt (Bonn, 2000). Besonders bei der Behandlung von Wunden mit Methicillin-resistenten *Staphylococcus aureus* (MRSA) kann die Verwendung der Fliegenmaden eine neue und kostengünstige Option darstellen (Wolff und Hansson, 1999). Zudem konnte vor allem bei älteren Patienten eine sehr gute, schnelle und effektive Wundheilung durch den alternativen Einsatz von Maden beobachtet werden (Mumcuoglu, Ingber *et al.*, 1999).

2.1.3.2 Wirkmechanismen der Madentherapie

Die am häufigsten eingesetzten Maden zur Biochirurgie stammen aus der Familie der *Calliphoridae* (Schmeißfliegen). Die Gattung heißt *Lucilia sericata* (Goldfliegen) (Dissemond, Koppermann *et al.*, 2002). Diese Maden sind reine Nekrophagen, das heißt, sie ernähren sich ausschließlich von abgestorbenem Gewebe, wobei intakte Zellen nicht beeinträchtigt werden. Damit sind Maden in der Lage zwischen lebenden und toten Zellen zu unterscheiden. Zudem sind die Maden ausschließlich aerob, womit ein Vordringen in tiefere Gewebsschichten nahezu ausgeschlossen ist (Lerch, Linde *et al.*, 2003). Interessanterweise soll sich auch die Zusammensetzung des von den Larven sezernierten Sekretes je nach Wundbeschaffenheit unterscheiden (Haußmann, 2000), womit auch bislang ausbleibende Resistenzen zu erklären sind. Das Sekret der Maden stellt die wichtigste Wirkkomponente dieser Therapieform dar und lässt sich in drei Wirkmechanismen einteilen: Nekrolyse, antimikrobielle Wirkung und Stimulation der Wundheilung. Die nekrolytische Wirkung der Maden ist vor allem auf das Vorhandensein von proteolytischen Enzymen zurückzuführen (Chambers, Woodrow *et al.*, 2003; Schmidtchen,

Wolff *et al.*, 2003; Vistnes, Lee *et al.*, 1981), die eine hohe Selektivität gegen Wundschorf und Nekrosen haben (Vistnes, Lee *et al.*, 1981). Durch die proteolytische Aktivität der Enzyme verflüssigt sich der nekrotische Belag und kann von den Maden aufgenommen und verdaut werden. Ein weiterer Grund für die sichere Nekrolyse ist stark mit der Beseitigung von Bakterien verbunden. Da sowohl die Maden, deren Sekret (Thomas, Andrews *et al.*, 1999) und auch deren Verdauungstrakt (Mumcuoglu, Miller *et al.*, 2001) eine hohe bakterizide Wirkung haben sollen, kann eine effektive Entfernung des abgestorbenen Gewebes erfolgen. Einen weiteren Ansatz zur Erklärung der antibiotischen Wirkung gibt Greenberg (Greenberg, 1968), der von einer bakteriziden Wirkung des larvalen Mitteldarms ausgeht. Zudem können ständig neue Bestandteile mit antibiotischer Wirkung aus dem Sekret isoliert und charakterisiert werden (Bexfield, Nigam *et al.*, 2004). Für die Stimulation der Wundheilung durch die Maden werden ebenfalls mehrere Gründe diskutiert. Zum einen führt die Beseitigung der Nekrose und des bakteriellen Befalls zu einer vermehrten Durchblutung und damit besseren Wundheilung. Zum anderen konnte Prete (Prete, 1997) einen wachstumsstimulierenden Effekt von Fibroblastenkulturen in Verbindung mit der Anwesenheit von Madensekreten nachweisen. Zusätzlich konnten agonistische Effekte des Madensekretes auf die Fibroblastenadhäsion gefunden werden (Horobin, Shakesheff *et al.*, 2003). Unter dem Einfluss von Fliegenmaden kommt es zu einer raschen Auffüllung der Wunde durch Granulationsgewebe und damit zu einer schnellen Wundverkleinerung (Fleischmann, Russ *et al.*, 1999).

2.1.3.3 Problematik der Madentherapie

Eine Applikation der Maden bedarf einer gewissen Übung und Erfahrung, um einen zuverlässigen Verband anzulegen. Dieser Verband muss das Entweichen der Maden aus der Wundregion verhindern, aber auch einen Kontakt zu angrenzendem Gewebe minimieren. Obwohl die Maden selektiv

abgestorbenes Gewebe angreifen, kann eine Überexpression der proteolytischen Verdauungsenzyme auch die gesunde Haut im Bereich der Wundränder angreifen (Grassberger und Frank, 2003). Diese Tatsache erfordert eine fachmännische Betreuung und ist dementsprechend zeit- und kostenintensiv. Weiterhin handelt es sich bei den Maden um Lebewesen, die sich mit Hilfe von Hakenkränzen (Abbildung 2.1-1) sehr agil auf dem Wundboden bewegen können. Die dadurch hervorgerufene mechanische Reizung kann sehr schmerzhaft sein und ein Abbruch der Behandlung erfordern.

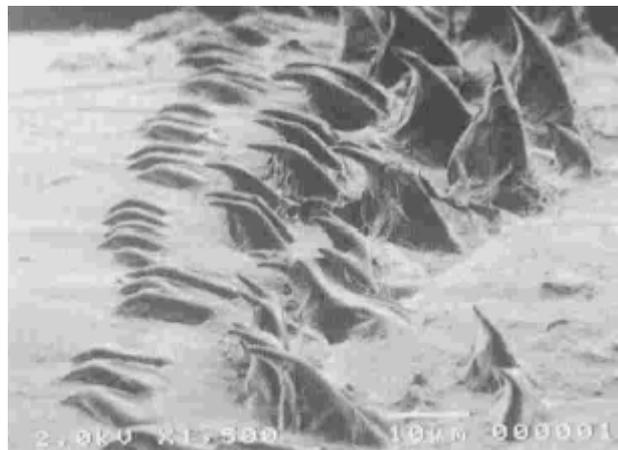


Abbildung 2.1-1 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Hakenkränzen der Fliegenmaden (Fleischmann und Grassberger, 2002)

Zudem kommt es zu einer nicht unerheblichen psychologischen Abneigung von Seiten der Patienten und auch des Personals (Arzt, Pflegepersonal) (Thomas, Jones *et al.*, 1996). Um die Akzeptanz auf beiden Seiten zu erhöhen, aber auch den Umgang mit den Maden zu erleichtern, wurde eine geschlossene Verbandstechnik entwickelt (Grassberger und Fleischmann, 2002). Der so genannte Biobag (Abbildung 2.1-2) enthält die lebenden Maden. Die dünnen Membranen sind durchlässig für die proteolytischen Enzyme der Maden, wodurch diese das nekrotische Gewebe angreifen und damit

verflüssigen können. Das saugfähige Material des Biobag erlaubt dann ein Aufsaugen dieser Flüssigkeit und dient als Nahrung für die Maden. Durch die hohe Saugfähigkeit des Biobag kann zudem vermehrt das verflüssigte Wundexsudat abtransportiert werden, was die Bildung von Granulationsgewebe fördert. Ein zusätzlicher Vorteil dieses Verbands liegt darin, dass eine Kontrolle der Wundheilung möglich ist und die Gefahr der „Madenflucht“ minimiert ist.

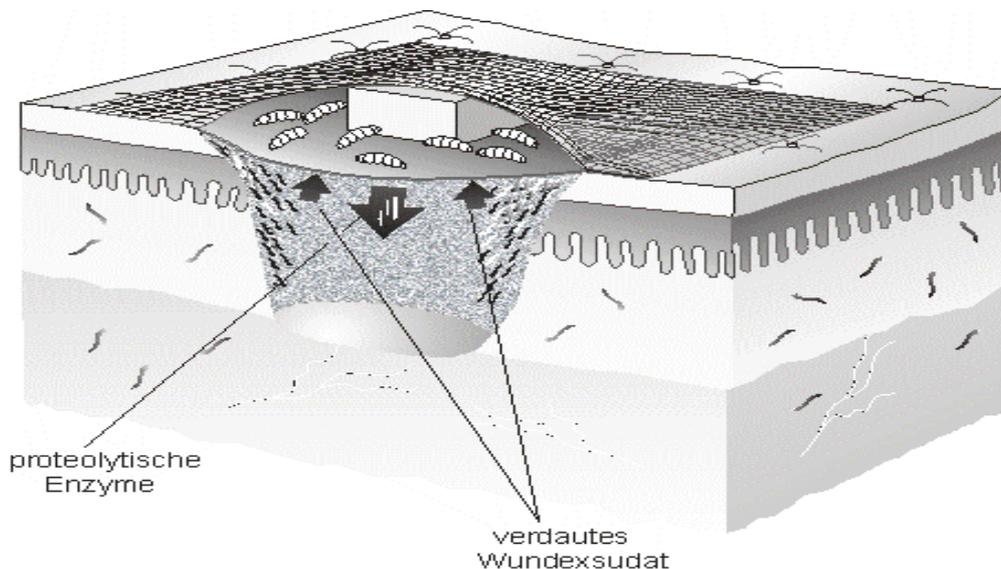


Abbildung 2.1-2 schematische Darstellung der Applikation von Maden auf Wunden in einem Biobag (modifiziert nach der Firma Biomonde)

Obwohl diese Applikationsform eine Erleichterung der Madentherapie bedeutet, bleiben einige Nachteile der lebenden Made präsent. Zum einen lässt sich der „Ekelfaktor“ zwar minimieren, aber nicht komplett beseitigen. Zum anderen erfordern sowohl der offene Verband, als auch die Applikation des Biobags, eine sorgfältige Planung des Therapieeinsatzes. So ist die „Lebenszeit“ der Maden begrenzt und eine sorgfältige Planung ihres Einsatzes erforderlich. Sicherlich auch aufgrund der oben genannten Probleme fehlen zudem große randomisierte Studien, die diese Methode als ein etabliertes

Verfahren einstufen lassen können. Deshalb ist diese Therapie auf strenge Indikationen wie chronische Wundinfektion, *Osteomyelitis* und *Ulcus cruris* beschränkt und steht nur dann zur Verfügung, wenn andere Methoden nicht zum Erfolg führen (Fleischmann, Russ *et al.*, 1999).

2.2 ENZYMATISCHE DEGRADATION VON CELLULOSEMATERIALIEN

2.2.1 STRUKTUR DER CELLULOSE

Der Hauptbestandteil von Baumwollfasern ist, neben z.B. Fetten, Wachsen, Proteinen und Pektinen, mit *circa* 90% des Fasergewichtes Cellulose (Hartzell und Hsieh, 1998). Cellulose ist einer der Hauptbestandteile in pflanzlichen Zellwänden und macht bis zu 50% des Trockengewichtes von Pflanzen aus (Lynd, Weimer *et al.*, 2002). Das Spektrum der Cellulosematerialien in der Textiltechnologie beinhaltet neben der allgemein bekannten Baumwolle auch chemisch modifizierte Stoffe wie z.B. Viskose oder so genannte Lyocellfasern. Die Cellulose ist ein Polysaccharid, das aus β -1,4-glycosidisch verknüpften Glukosemolekülen besteht (Abbildung 2.2-1). Zwei miteinander verbundene Glukosebausteine werden als Cellobiose bezeichnet.

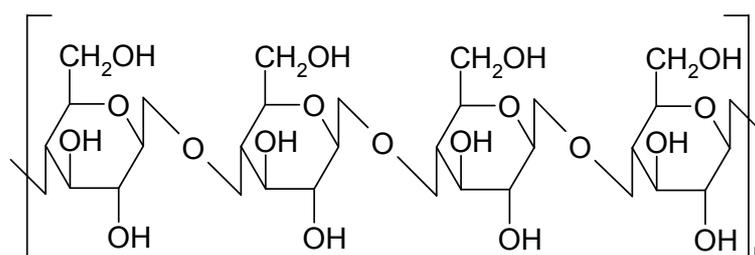


Abbildung 2.2-1 schematische Darstellung von Cellulose

Die Celluloseketten bestehen aus mehreren tausend Cellobioseeinheiten und können sich durch intermolekulare Wechselwirkungen (Wasserstoffbrückenbindungen und Van-der-Waals-Bindungen) zu Fibrillen zusammenschließen. Hierbei können sowohl amorphe als auch kristalline Bereiche

entstehen. Der kristalline Bereich lässt sich in verschiedene Kristallgittertypen einordnen, die so genannte Cellulose I; II; III; IV oder X. In der Textiltechnologie sind allerdings nur Cellulose I und II bedeutend (Nevell, 1995). In der Natur kommt vorwiegend die Cellulose I vor, diese kann jedoch durch Alkalieinfluss oder Regeneration in der Viskoseherstellung in die thermodynamisch stabile Cellulose II umgewandelt werden (Haga, Mori *et al.*, 2000).

2.2.2 CELLULOLYTISCHE ENZYME

2.2.2.1 Allgemeines

Die Synthese cellulolytischer Enzyme, den so genannten Cellulasen, kann sowohl durch Bakterien (Pere, Puolakka *et al.*, 2001) als auch durch Pilze (Hamada, Ishikawa *et al.*, 1999) erfolgen. Der Einsatz von Cellulasen ist sehr vielseitig. Neben der Verwendung in der Papierindustrie zur Verbesserung der mechanischen Eigenschaften von Papier (Levy, Shani *et al.*, 2002) werden Cellulasen vor allem in der Textiltechnologie verwendet. Hierbei werden *circa* 10% aller Cellulosematerialien und über 80% des Denims (Jeansstoff) mit Cellulase behandelt. In dieser enzymatischen Endbehandlung, dem so genannten „Biofinishing“, sollen Textilien von Cellulosefibrillen befreit werden und beim anschließenden Gebrauch weniger fusseln (Khoddami, Siavashi *et al.*, 2002). Diese Methode wurde bereits vor *circa* 30 Jahren patentiert. Ein weiteres Anwendungsgebiet für Cellulasen ist die Herstellung von Ethanol als Kraftstoff. Hierbei erfolgt der Abbau von Cellulose zu Glukose, die dann von Hefen zu Ethanol fermentiert wird. Aufgrund des massenhaften Vorkommens an Cellulose könnte eine gute Alternative geschaffen werden, die allerdings aufgrund der hohen Kosten für die Enzyme noch nicht wirtschaftlich ist. Zudem werden Cellulasen in der Nahrungsmittelindustrie eingesetzt.

2.2.2.2 Abbau von Cellulose

Der enzymatische Abbau von Cellulose ist sehr komplex und wird durch das Zusammenspiel mehrerer Enzyme ermöglicht (Lynd, Weimer *et al.*, 2002). Die Einteilung der cellulolytischen Enzyme kann in drei Typen erfolgen, die in sehr unterschiedlicher Weise die Spaltung des Cellulosemoleküls durchführen. Je nach Art des Abbaus der Ketten können die Enzyme in Endocellulasen, Exocellulasen und β -Glucosidasen eingeteilt werden. Die Zusammensetzung der Enzyme umfasst zudem noch weitere Untergruppen, die für viele Mikroorganismen bereits ausführlich untersucht worden sind. So besitzt der Pilz *Humicola insolens* mindestens zwei Exocellulasen und fünf verschiedene Endocellulasen (Schuelein, 1997). Für das Grundprinzip der Cellulolyse soll jedoch nur auf die Hauptklassen der Enzyme näher eingegangen werden. Ein Schema zum enzymatischen Abbau der Cellulose wird in Abbildung 2.2-2 gegeben (modifiziert nach (Schurz, Hönel *et al.*, 1985)).

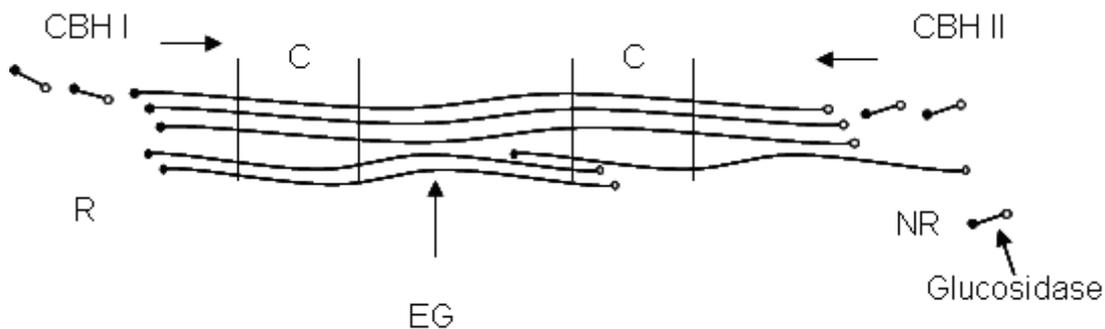


Abbildung 2.2-2 schematische Darstellung des enzymatischen Abbaus von Cellulose (Abkürzungen siehe Text)

Die Exocellulasen (Exo- β -1,4-glucanasen, Cellobiohydrolasen [CBH]) spalten überwiegend Cellobiose von den Kettenenden her ab (Irwin, Spezio *et al.*, 1993). Je nach Abbau der Kette vom reduzierenden Ende (R) oder vom nichtreduzierenden Ende (NR) werden die Enzyme CBH I und CBH II voneinander unterschieden (Barr, Hsieh *et al.*, 1996). Die Endocellulasen (Endo- β -1,4-glucanasen [EG]) spalten Celluloseketten hauptsächlich an den

amorphen Stellen in kleinere Oligomere. Der komplette Abbau zum Grundbaustein Glukose erfolgt dann durch die β -Glucosidasen (Lynd, Weimer *et al.*, 2002). Eine Hydrolyse der kristallinen Bereiche (C) ist allerdings nur durch eine synergistische Wirkung von Endo- und Exocellulasen möglich. Der Mechanismus des enzymatischen Abbaus ist ausführlich beschrieben und kann der Literatur entnommen werden (Sarkar und Eters, 2004).

2.2.3 ANFÄRBN VON CELLULOSEMATERIALIEN MIT REAKTIV-FARBSTOFFEN

Zur Bestimmung der Aktivität von Cellulasen müssen mehrere Alternativen berücksichtigt werden. So unterscheiden sich die Aktivitäten eines Cellulasesystems bereits bei unterschiedlichen Substraten. Zudem ist die Bestimmung einer Enzymkomponente nur ungenau möglich, da synergistische Effekte nicht auszuschließen sind. Die Möglichkeiten der Aktivitätsbestimmung von Cellulasen können in zwei Gruppen eingeteilt werden. Zum einen können lösliche Substrate wie z.B. Hydroxyethylcellulose verwendet werden, um die Abnahme der Viskosität oder freiwerdende reduzierende Zucker (Miller, 1959) zu bestimmen. Hierdurch ist es möglich, die Aktivität der Exocellulasen zu bestimmen. Die Quantifizierung der gesamten cellulolytischen Enzyme kann vor allem mit unlöslichen Substraten wie z.B. Baumwolle oder gefärbter mikrokristalliner Cellulose durchgeführt werden (Wood, 1988). Die Verwendung von Baumwolle als Substrat zur Aktivitätsbestimmung beinhaltet sowohl die Bestimmung der entstehenden Glukosekonzentration als auch den resultierenden Masseverlust und den „Fusselrückstand“ (Cavaco-Paulo, Almeida *et al.*, 1996).

Das Prinzip der Aktivitätsbestimmung mittels gefärbter mikrokristalliner Cellulose basiert auf der Spaltung der Celluloseketten in wasserlösliche gefärbte Kohlenhydrate. Das Färben des Cellulosematerials ist mit so genannten Direkt- oder Reaktivfarbstoffen möglich (Buschle-Diller und Traore,

1998). Bei der Verwendung von Reaktivfarbstoffen kommt es zur Ausbildung einer kovalenten chemischen Bindung zwischen dem Farbstoff und der Cellulose (Stamm, Zollinger *et al.*, 1961), so dass eine reversible Adsorption des Farbstoffes ausgeschlossen und ein reines Abwaschen von der Faser nicht möglich ist. Ein häufig verwendeter Reaktivfarbstoff ist das Remazolbrilliantblau (Abbildung 2.2-3), der zur Gruppe der Vinylsulfonreaktivfarbstoffe gehört (Stamm, 1963). Die Formel des Remazolbrilliantblaus enthält keine Vinylsulfongruppe. Diese reaktive Gruppe entsteht erst unter alkalischen Reaktionsbedingungen durch Abspaltung eines Sulfations. Anschließend können die Hydroxylgruppen der Cellulose nukleophil mit dem Vinylsulfon reagieren.

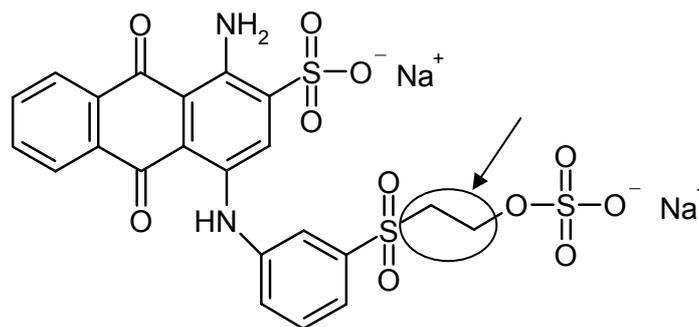


Abbildung 2.2-3 Formel von Remazolbrilliantblau (mit Angabe des reaktiven Zentrums)

3 METHODEN

3.1 EINLEITUNG

Ein sehr wesentlicher Bestandteil dieser Arbeit liegt in der Charakterisierung der Fasermaterialien, da diese die Basis für die Herstellung einer Wundauflage darstellen. Hierfür konnten gängige Methoden bzw. Analytiken verwendet werden, um einen detaillierten Einblick in die Struktur und Beschaffenheit der Fasern zu erlangen. Die in der Fasertechnologie immer häufiger verwendete Methode der inversen Gaschromatographie (Jacob und Berg, 1994) soll für ein besseres Verständnis der Resultate in diesem Kapitel genauer beschrieben werden. Wenn einige Verfahren nur sehr spezifisch in dem jeweiligen Kapitel zur Anwendung kommen, werden diese vorher kurz erläutert und in diesem Teil nicht explizit beschrieben.

3.2 METHODEN ZUR STRUKTURAUFKLÄRUNG

3.2.1 RÖNTGENDIFFRAKTOMETRIE

Um Aufschlüsse über die Kristallinität einer Probe gewinnen zu können, wurde die Röntgendiffraktometrie verwendet. Hierbei wurde ein Röntgendiffraktometer (Stoe & Cie, Darmstadt, Deutschland) ausgestattet mit einer stationären Kupferanode (40 kV, 30 mA, 1,2 kW) eingesetzt. Die von der Anode emittierte elektromagnetische Röntgenstrahlung (CuK α 1; Graphit-Monochromator) trifft auf die Probe, die in einen rotierenden Probenhalter zwischen zwei Mylar-Folien eingespannt ist. Diese Strahlung wird je nach Kristallanordnung in der Probe mehr oder weniger stark gebeugt (gestreut), mit einem Zählrohr (PSD, Position Sensitive Detector) erfasst und zu einem elektrischen Signal transformiert. Dieses charakteristische Interferenzmuster wird Röntgendiffraktogramm genannt und beinhaltet die Intensitäten der Streustrahlung aufgetragen gegen den Winkel 2θ . Dieser so genannte 2θ -Wert

bezeichnet den Winkel der von der Probe gebeugten Röntgenstrahlung. Die in dieser Arbeit dargestellten Röntgendiffraktogramme wurden einem Winkelbereich von $5^\circ 2\theta$ bis $50^\circ 2\theta$ vermessen. Sind in einer Probe keine kristallinen Bereiche vorhanden, entsteht im Röntgendiffraktogramm lediglich ein Rauschen (amorpher Halo) und es sind keine Peaks ersichtlich.

Diese Analysenmethode wurde verwendet, um Aussagen über die Kristallinität der unterschiedlich behandelten Baumwollmaterialien treffen zu können. Weiterhin ist diese Analytik zur Beurteilung der Lyophilisate nach der Gefriertrocknung sehr wichtig, da sich das Auftreten kristalliner Bereiche negativ auf die Stabilität auswirken kann.

3.2.2 RASTERELEKTRONENMIKROSKOPIE

Die Strukturaufklärung der einzelnen Proben erfolgte durch Rasterelektronenmikroskopie. Die Aufnahmen wurden mit Hilfe eines Rasterelektronenmikroskops XL 20 (Philips, Eindhoven, Niederlande) erstellt. Für die Präparation wurden die Proben auf einen Aluminiumprobenhalter aufgebracht, der mit einer beidseitig klebenden Leitfähigkeitsfolie (Leit-Tabs, Plannet GmbH, Wetzlar, Deutschland) versehen war. Anschließend wurde die Probenoberfläche unter Argonatmosphäre (50 Pa) in einem Zeitraum von 65 s mit einer Goldbeschichtung versehen (Sputtercoater SCD 005, Bal-Tec AG, Liechtenstein). Die Höhe der angelegten Beschleunigungsspannung (12 bis 15 kV) des Elektronenstrahls richtete sich nach der thermischen Stabilität der Probe.

3.3 THERMOANALYTISCHE METHODEN

3.3.1 FEUCHTEGEHALT/THERMOGRAVIMETRIE

Die Bestimmung des Feuchtegehaltes (φ) der Lyophilisate erfolgte thermogravimetrisch mit einer TGA 7 der Firma Perkin Elmer (Wellesley, USA). Hierzu wurde ein ausgeglühtes tariertes Platinpfännchen mit *circa* 5 mg Probe beladen. Diese Probenmasse (m) durchlief ein spezielles Temperaturprogramm, in dem die Probe zunächst bei 25°C für die Dauer von 1 min temperiert wurde. Anschließend wurde die Temperatur mit einer Rate von 5°C pro min auf 150°C erwärmt und der verbliebene Rückstand als Trockenmasse (m_{Tr}) deklariert. Während dieses Temperatur-Anstiegs erfolgt eine Aufzeichnung der Masseabnahme gegen die Temperatur. Der prozentuale Masseverlust der Probe wird als Feuchtigkeitsgehalt des Lyophilisates angegeben. Die Messung wurde jeweils als Doppelbestimmung durchgeführt.

3.3.2 DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY (DSC)

3.3.2.1 Einleitung

Zur Bestimmung der Hydrophilie eines Materials kann zusätzlich zur Dynamischen Wasserdampf Sorption (siehe Kapitel 3.4.1) auch das direkte Wasserbindungs-vermögen ermittelt werden. Hierbei erfolgt die Bestimmung des Wasseranteils, der von der Oberfläche der Probe so fest gebunden wird, dass dieser bei einer Temperaturerniedrigung unter den Gefrierpunkt nicht auskristallisiert. Die Ergebnisse des so ermittelten Wasserbindungsvermögens können Aussagen über die Struktur des Materials geben oder durch Vergleiche zweier Messungen die Veränderungen der Oberfläche nach einer spezifischen Behandlung durch eine Säure bzw. Cellulase zulassen.

3.3.2.2 Durchführung

Die Ermittlung des Wasserbindungsvermögens erfolgte durch eine Korrelation von fünf Messpunkten. Hierfür wurde das Fasermaterial nach 24stündiger Lagerung bei 80°C in gleich große Proben (Durchmesser 4 mm) gestanzt. Mit Hilfe einer Mikrowaage (MC5, Sartorius AG, Göttingen, Deutschland) wurde die Masse genau bestimmt. Anschließend wurden die verschiedenen Proben in 40 µl Aluminiumpfännchen gegeben und mit steigenden Wasseranteilen versetzt. Durch Differenzwägung wurde die genaue Menge des Wassers bestimmt und die Pfännchen anschließend mit einem Deckel kalt verschweißt. Die Messungen erfolgten mit der so genannten „closed pan“-Methode. Hierfür wurde ein DSC 7 (Perkin Elmer, Wellesley, USA) verwendet. Hierbei handelt es sich um ein leistungskompensiertes Gerät, das heißt, sowohl die Probe als auch die Referenzzelle werden durch zwei Öfen getrennt voneinander beheizt. Beide Elemente durchlaufen nun das gleiche Temperaturprogramm (siehe Tabelle 3.3-1), wobei die Energieunterschiede zwischen Probe und Referenz aufgezeichnet werden. Die bei der Kristallisation des ungebundenen Wassers freiwerdende Wärme wird als negatives Signal dargestellt. Mit Hilfe der Software Pyris von der Firma Perkin Elmer erfolgte die Quantifizierung der Kristallisationsenthalpien [J/g] der einzelnen Proben. Diese wurden gegen den prozentualen Wasseranteil aufgetragen und der Schnittpunkt mit der Abszisse als Wasserbindungsvermögen in Prozent festgelegt (Abbildung 4.2-4).

Tabelle 3.3-1 Temperaturprogramm der DSC zur Bestimmung des Wasserbindungsvermögens

	Temperatur [°C]	Kühlrate [°C/min]
Start	30	8
Ende	-50	

3.4 ADSORPTIONSMETHODEN

3.4.1 DYNAMISCHE WASSERDAMPF SORPTION

3.4.1.1 Einleitung

Eine Möglichkeit zur Differenzierung der einzelnen Materialien bietet die Wechselwirkung mit Wasserdampf. Da dieser Prozess auf mehreren Prinzipien wie z.B. Absorption, Adsorption, Kapillarität oder Löslichkeiten beruht, ist eine sehr detaillierte Strukturaufklärung möglich. Weiterhin können Aussagen über die Hydrophilie getroffen werden, die sehr wichtig bei möglichen Freisetzungs- (Arzneistoffe) und Abbauprozessen (Cellulase) sein können. Zur Ermittlung der Sorptionsisotherme einer Probe wird stufenweise die Luftfeuchte, die um die Probe fließt, erhöht, und die Masseänderung aufgezeichnet (Abbildung 4.2-2).

3.4.1.2 Durchführung

Alle Untersuchungen wurden mit einer Dynamischen Wasserdampf Sorption DVS1 (Surface Measurement Systems, London, UK) auf Grundlage einer gravimetrischen Messung durchgeführt. Eine Abbildung des Gerätes ist in Abbildung 3.4-1 dargestellt und zeigt den schematischen Aufbau.

Ein Trockengasstrom (1) (Stickstoff 5.0) wird quantitativ durch eine Massenflusskontrolleinheit (2) gesteuert. Die Einstellung der angestrebten Luftfeuchte erfolgt durch das Mischen zweier Gasströme in einer Kontrollschleife (8), wobei der eine Gasstrom ein Gefäß mit reinem Wasser durchströmt (Luftbefeuchtung [4]). Das Spektrum der angestrebten Luftfeuchten begann bei 0% RH und wurde in Zehnerschritten kontinuierlich auf 90% RH angehoben. Anschließend umströmt der eingestellte Gasstrom sowohl die Proben- (5) als auch die Referenzschale (6). Die Massenänderungen werden von einer Ultramikrowaage (3) (Cahn D200-Waage) ermittelt. Die Messung erfolgt unter ständiger Kontrolle der Luftfeuchte durch in den Probenkammern

befindliche Messfühler (7) und unter Einhaltung der Temperatur. Hierfür befindet sich die gesamte Messeinheit in einem temperaturkontrollierten Inkubator mit einer Solltemperatur von $25^{\circ}\text{C} \pm 0,1^{\circ}\text{C}$.

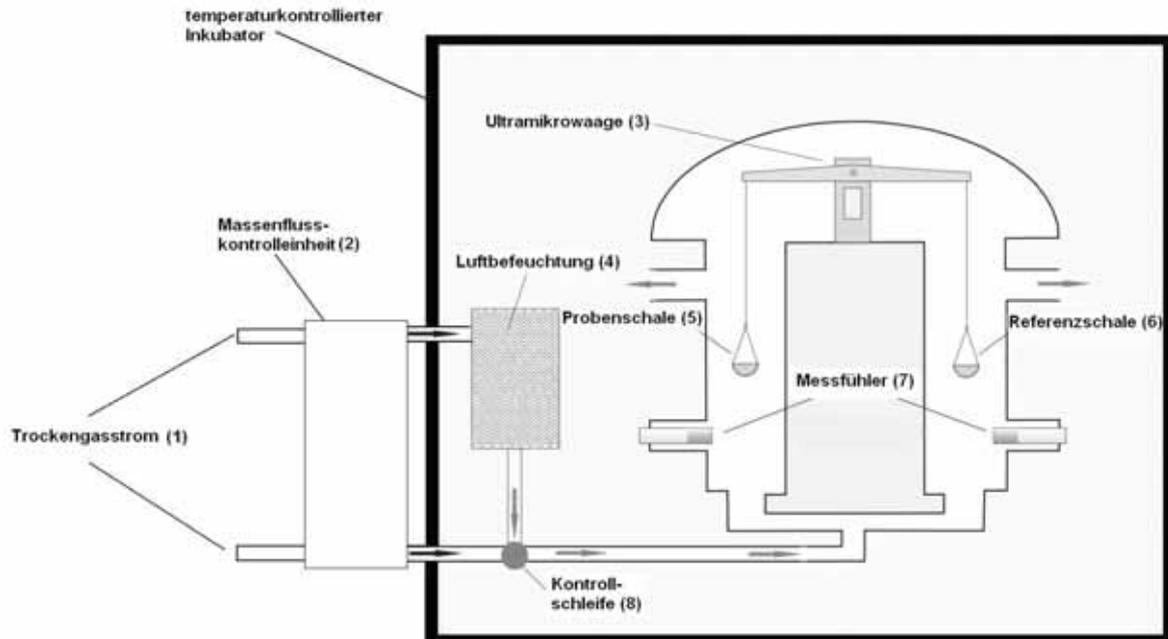


Abbildung 3.4-1 schematischer Aufbau der DVS1

3.4.2 INVERSE GASCHROMATOGRAPHIE

Für die Bestimmung der Oberflächeneigenschaften (dispersive Oberflächenenergie, Donor- und Akzeptoreigenschaften, energetische Heterogenitätsplots) unterschiedlichster Materialien wurde die Methode der inversen Gaschromatographie verwendet. Hierbei bildet das zu untersuchende Material im Gegensatz zu einem herkömmlichen Gaschromatographen die stationäre Phase und in der mobilen Gasphase wird ein Trägergas mit bekannten Eigenschaften über die Probe geleitet (Levoguer, Butler *et al.*, 2000). In Abhängigkeit der Oberflächenbeschaffenheit der stationären Phase kommt es zu spezifischen Wechselwirkungen mit den Gasen, die vorwiegend auf Adsorption basieren. Unter Adsorption versteht man eine Anlagerung von Gasen (oder Flüssigkeiten) an eine feste Oberfläche. Hierbei werden zwei

Arten der Adsorption unterschieden: die Chemisorption und die Physisorption. Bei der Chemisorption kommt es zu irreversiblen Anlagerungen an die Oberfläche aufgrund von chemischen Reaktionen. Die Physisorption umfasst dagegen nur die physikalischen Wechselwirkungen, wodurch hier reversible Wechselwirkungen zwischen dem Gas und der festen Oberfläche beschrieben werden. Der umgekehrte energieverbrauchende Prozess des Verlassens des Gases von der Oberfläche wird Desorption genannt. Die Beziehung zwischen dem adsorbierten Volumen eines Gases in Abhängigkeit des Partialdruckes wird durch eine als Adsorptionsisotherme bezeichnete Kurve dargestellt. Die Formen der einzelnen Isothermen können je nach Art des Adsorbens und Adsorbates variieren und sind der Literatur zu entnehmen (Leuenberger, 2002; Sander, 2000).

Bei einem überwiegenden Teil der Messungen mit der inversen Gaschromatographie wird das aufzugebende Gas in einem einmaligen Puls über das Material geleitet. Diese Art der Probenmolekülaufgabe bietet einige Vorteile und lässt die Berechnung wichtiger physikochemischer Parameter zu. Durch einen einmaligen Puls des Probenmoleküls werden alle Messungen in einem sehr geringen Konzentrationsbereich durchgeführt. Das bedeutet, die molekulare Adsorption ist unabhängig von der Oberflächenabdeckung, und es kommt vorwiegend nur zu Interaktionen mit den höchsten Energiezentren der Oberfläche. Außerdem befindet man sich noch im so genannten Bereich der unendlichen Verdünnung. Dieser liegt im linearen Anfangsbereich der Isotherme, bei dem der Partialdruck und damit die Beladung gegen Null gehen. Die Steigung des Anfangsabschnittes wird als Henry-Koeffizient bezeichnet und erlaubt eine Aussage über die freiwerdende Adsorptionswärme (Sander, 2000). Eine schematische Darstellung dieser Ausführungen wird in Abbildung 3.4-2 geben.

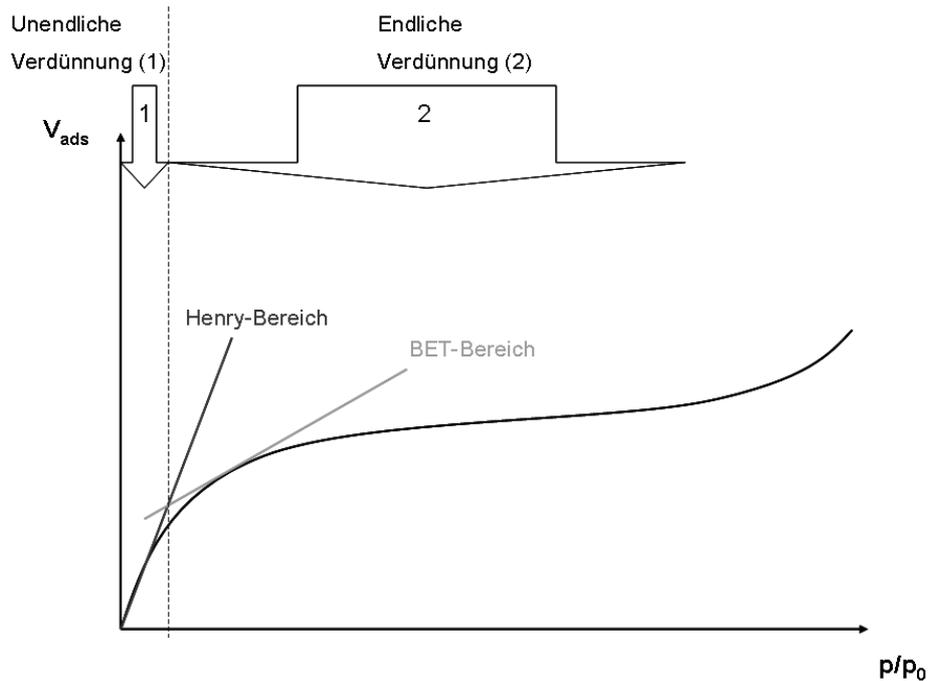


Abbildung 3.4-2 Darstellung einer Adsorptionsisotherme (Typ II) mit charakteristischen Konzentrationsbereichen

Das Arbeiten im Bereich der unendlichen Verdünnung ermöglicht eine Detektion von sehr symmetrischen Peaks, bei denen das Retentionsvolumen (V_N) durch die Gleichung 3-1 bestimmt werden kann.

$$V_N = jD(t_R - t_0)$$

Gleichung 3-1

Hierbei stellt t_R die Retentionszeit des Probenmoleküles dar. Die Variable t_0 beschreibt die Referenzretentionszeit eines nicht interagierenden Moleküls (in der Regel Methan). Der Einfluss der Trägergas-Flussrate wird durch D beschrieben und j stellt den James-Martin-Korrekturfaktor dar. Dieser beinhaltet die Kompressibilität des Gases sowie den Ein- und Auslassdruck des Gases (Belgacem, Czeremuszkina *et al.*, 1995).

3.4.2.1 Dispersive Interaktionen (Oberflächenenergie einer Feststoffoberfläche)

Aufgrund der Messungen bei sehr geringen Konzentrationen im Bereich der unendlichen Verdünnung sind Diffusions- und Adsorptionsvorgänge vernachlässigbar und die Energiebeträge der Adsorption und der Desorption gleich. Das bedeutet, es sind nur adhäsive Sekundärbindungen (verursacht durch Van-der-Waals-Kräfte) entscheidend und die Bindungsstärke kann durch eine thermodynamische Funktion ausgedrückt werden: die Adhäsionsarbeit (Fekete, Moczo *et al.*, 2004). Zwischen der Adhäsionsarbeit W_A und der dispersiven Oberflächenenergie γ_S^D einer festen Oberfläche besteht nach Fowkes (Fowkes, 1964) folgender Zusammenhang:

$$W_A = 2(\gamma_S^D \gamma_L^D)^{0,5}$$

Gleichung 3-2

Die Variable γ_L^D entspricht der dispersiven Oberflächenenergie der flüssigen Phase des verwendeten Probenmoleküls. Die Adhäsionsarbeit kann durch ein Modell von Doris und Gray die freie Energie der Adsorption eines bestimmten Probenmoleküls liefern. Die Gleichung 3-3 beschreibt dieses Modell genauer.

$$\Delta G_A^{(CH_2)} = N_{a(CH_2)} W_A^{(CH_2)}$$

Gleichung 3-3

Die bestimmte freie Energie bezieht sich in diesem Modell zunächst auf die Adsorption einer Methylengruppe (-CH₂-). N ist hier die Avogadrozahl, a_{CH_2} bezeichnet die Oberfläche einer Methylengruppe. $\Delta G_A^{(CH_2)}$ ist die freie Energie bei der Adsorption einer Methylengruppe. Damit kann für jedes n-Alkan die freie Adsorptionsenergie bestimmt werden, da die erforderliche Fläche a tabellarisch gelistet ist. Durch das Einsetzen von Gleichung 3-2 in Gleichung

3-3 kann dementsprechend die freie Energie der Adsorption eines Moleküls als eine Funktion der dispersiven Oberflächenenergie beschrieben werden.

Die freie Energie der Adsorption (G_A^0) lässt sich zusätzlich aber auch durch die Gleichung 3-4 als eine Funktion des Retentionsvolumens V_N (siehe Gleichung 3-1) darstellen.

$$\Delta G_D^0 = -\Delta G_A^0 = RT \ln \left(\frac{V_N P_0}{S m \pi_0} \right)$$

Gleichung 3-4

Neben der universellen Gaskonstante R und der Temperatur T sind weitere Faktoren notwendig: π_0 entspricht dem zweidimensionalen Spreitungsdruck des Adsorbates und P_0 dem Partialdruckes des Lösungsmittels. S , die spezifische Oberfläche, und m , die Masse, sind säulencharakteristische Materialwerte. Zur Vereinfachung können diese letzten Werte zu einer Konstanten K zusammengefasst werden, so dass sich die Gleichung 3-5 zur Ermittlung der freien Energie ergibt.

$$\Delta G^0 = RT \ln V_N + K$$

Gleichung 3-5

Da im oben bereits erwähnten Henry-Bereich die Beträge für die freie Energie ΔG^0 stets gleich sind, kann die Gleichung 3-5 mit der Kombination aus Gleichung 3-2 und Gleichung 3-3 gleichgesetzt werden. Man erhält nun einen Zusammenhang aus dem detektierten Retentionsvolumen und der dispersiven Oberflächenenergie einer festen Oberfläche, der in Gleichung 3-6 dargestellt ist.

$$RT \ln V_N = 2N(\gamma_S^D)^{0,5} a(\gamma_L^D)^{0,5} + K$$

Gleichung 3-6

Die Oberfläche a und die dispersive Oberflächenenergie der flüssigen Phase eines Probenmoleküls γ_L^D sind bekannt. Für die Bestimmung der dispersiven Oberflächenenergie der festen Oberfläche wird nun der Term $RT \ln V_N$ gegen $a (\gamma_L^D)^{0,5}$ aufgetragen. Werden für eine Reihe von n-Alkanen die Retentionsvolumina bestimmt, resultiert daraus eine Gerade (die so genannte n-Alkan-Referenzlinie) aus deren Anstieg dann die dispersive Oberflächenenergie γ_S^D der festen Oberfläche ermittelt werden kann (siehe Abbildung 3.4-3) Da es bei einer heterogenen Oberfläche zu stärkeren Wechselwirkungen kommt, resultiert daraus ein höherer Wert für die Oberflächenenergie. „Homogene“ Oberflächen ergeben demnach kleinere Werte für die dispersive Oberflächenenergie. Allerdings sind mit diesen Resultaten keine Absolutaussagen möglich und der Vergleich der Ergebnisse verschiedener Materialien ist entscheidend.

3.4.2.2 Spezifische Interaktionen (Säure-Base-Parameter)

Für die Ermittlung der dispersiven Oberflächenenergie werden nur die Wechselwirkungen mit n-Alkanen betrachtet. Ein weiterer wichtiger Parameter zur Charakterisierung der Oberfläche eines Feststoffes kann allerdings auch die polare (spezifische) Interaktion darstellen. Für diese Untersuchungen werden polare Probenmoleküle (z.B. Ethanol, Aceton oder Acetonitril) über das zu untersuchende Material gegeben. Die hierbei entstehenden Wechselwirkungen basieren auf verschiedenen Donor- und Akzeptoreigenschaften (z.B. durch vorhandene Dipole oder freie Elektronenpaare) der injizierten Probenmoleküle und der zu analysierenden Feststoffoberfläche. Die spezifische freie Energie ΔG_{sp} eines Probenmoleküls kann mit dem in Gleichung 3-7 beschriebenen Zusammenhang dargestellt werden.

$$\Delta G_{sp} = RT \ln \left(\frac{V_N}{V_N^{ref}} \right)$$

Gleichung 3-7

Mit der Variablen V_N^{ref} kommt ein neuer Ausdruck hinzu, der als Retentionsvolumen einer polaren Probe mit einem spezifischen Produkt aus γ_L^D als Abstand von der n-Alkan-Referenzlinie (siehe unten) bestimmt werden kann. Einen Überblick über die Bestimmung dieses Wertes und einiger weiterer Begriffe gibt die Abbildung 3.4-3.

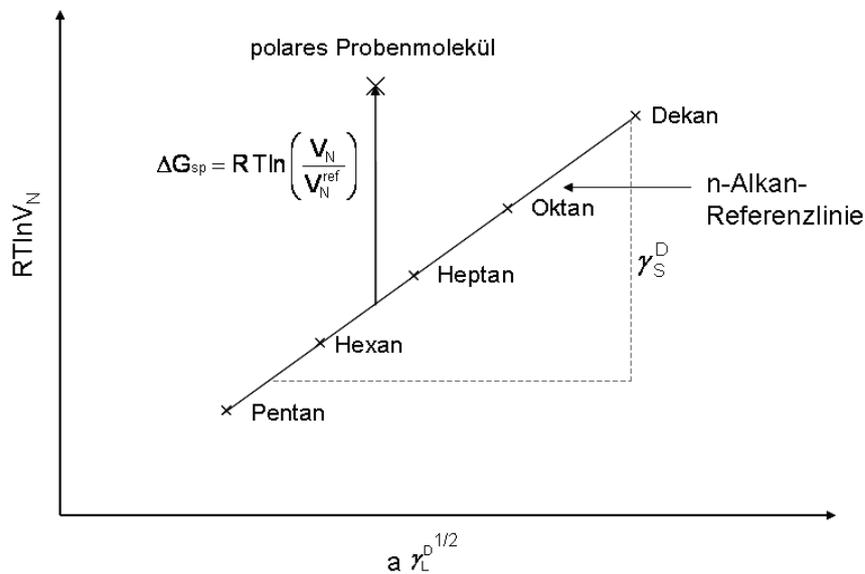


Abbildung 3.4-3 schematische Darstellung zur Ermittlung der dispersiven Oberflächenenergie γ_S^D und der spezifischen freien Energie ΔG_{sp}

Der Betrag der resultierenden spezifischen freien Energie ΔG_{sp} eines Probenmoleküls im Bezug auf eine Oberfläche wird durch seine Basizität (Elektronendonator) oder Azidität (Elektronenakzeptor) bestimmt.

Auf der Grundlage des Gutmann-Konzeptes (Gutmann, 1978) sind für polare Probenmoleküle Donor- (DN) und Akzeptorzahlen (AN) festgelegt, die der Literatur entnommen werden können (Belgacem und Gandini, 1999). Das

Verhältnis dieser beiden Zahlen beschreibt nun die Eigenschaft der Oberfläche (z.B. Ethanol AN = 37,9; DN = 20 → sauer/ n-Alkan AN = 0; DN = 0 → neutral). Mit Hilfe der spezifischen freien Energie ΔG_{sp} ist es nun möglich, eine Quantifizierung der polaren Oberflächeneigenschaften durchzuführen. Dies lässt folgender Zusammenhang zu.

$$\Delta G_{sp} = \Delta H_{sp} - T \Delta S_{sp}$$

Gleichung 3-8

In Gleichung 3-8 wird die Gibbs-Helmholtz-Gleichung beschrieben, in der die freie Energie in Abhängigkeit von der spezifischen Enthalpie ΔH_{sp} und der Entropie ΔS_{sp} dargestellt ist. Die Temperatur und die Entropie haben keinen Einfluss, somit ist der Betrag von $\Delta G_{sp} = \Delta H_{sp}$. Nach der Annahme von Felix und Gatenholm (Felix und Gatenholm, 1993) lässt sich die freie Enthalpie und die oben erwähnten Donor- und Akzeptorzahlen in den Zusammenhang der Gleichung 3-9 bringen.

$$\Delta H_{sp} = K_A DN + K_B AN$$

Gleichung 3-9

K_A und K_B sind Zahlen mit denen die Säure- und Baseeigenschaften der zu untersuchenden festen Oberfläche beschrieben werden können. Diese können durch folgenden linearen Zusammenhang bestimmt werden.

$$\frac{\Delta H_{sp}}{AN} = K_A \frac{DN}{AN} + K_B$$

Gleichung 3-10

Durch Auftragen der Werte des Quotienten $\Delta H_{sp}/AN$ für injizierte Probenmoleküle gegen des Verhältnis der zugehörigen Donor- und Akzeptoreigenschaften kann aus der Steigung dieses linearen

Zusammenhangs K_A und aus dem Achsenabschnitt K_B bestimmt werden (Abbildung 5.1-12). Mit diesen beiden Säure- und Baseparametern lassen sich nun semiquantitative Aussagen zur polaren Oberflächenbeschaffenheit des Materials treffen, da diese unmittelbar aus der polaren Interaktion der Probenmoleküle abgeleitet werden.

3.4.2.3 Erstellung von Isothermen

Alle bisherigen Betrachtungen über bestimmbare Parameter mit der inversen Gaschromatographie beinhalteten die Anwendung mehrerer verschiedener Probenmoleküle (dispersiv: n-Alkane; spezifisch: n-Alkane + polare Proben) im Bereich der unendlichen Verdünnung. Dadurch werden nur energetisch höher gelegene Zentren erfasst. Es besteht nun die Möglichkeit, die Konzentration eines Probenmoleküls stetig zu erhöhen, so dass zum einen der Bereich der endlichen Verdünnung (Abbildung 3.4-2) erreicht wird, zum anderen kommt es zur Erfassung von immer schwächeren Energie-Zentren auf der Oberfläche. Durch Verlassen des Henry-Bereiches ist es möglich eine Isotherme aufzuzeichnen, in der die adsorbierte Menge gegen den Partialdruck (dieser kann aus dem Retentionsvolumen und der Höhe des Peaks bestimmt werden (Thielmann und Florian, 2001)) dargestellt ist. Auf der Grundlage der erstellten Isotherme können die folgenden Parameter abgeleitet werden.

Energetische Oberflächenheterogenität

Die energetische Oberflächenheterogenität beschreibt die Verteilung der Adsorptionspotentiale auf einer Oberfläche für eine Substanz mit definierter Polarität (Jaroniec, Gadkaree *et al.*, 1996). Das Adsorptionspotential lässt sich durch die Gleichung 3-11 berechnen.

$$A = RT \ln \left(\frac{p_0}{p} \right)$$

Gleichung 3-11

Neben der Gaskonstante R, der Temperatur der Säule T sind p_0 der Sättigungsdruck und p der Partialdruck. Die Verteilung der Potentiale wird mit Hilfe des Verteilungsparameter ϕ charakterisiert, der die erste Ableitung des adsorbierten Anteiles n und dem korrespondierenden Adsorptionspotential bildet (Gleichung 3-12).

$$\phi = -\frac{dn}{dA}$$

Gleichung 3-12

Mit Hilfe der Oberflächenheterogenität kann die Lage der energetischen Zentren, aber auch die Bindungskapazität für eine Substanz festgelegt werden. Dieses ist zum einen die Lage des Maximums und zum anderen die Fläche unter der Kurve, bei einer graphischen Darstellung der Datenpunkte des Adsorptionspotentials A (Abszisse) und des Verteilungsparameters ϕ (Ordinate) (siehe Abbildung 4.2-6).

Bestimmung der spezifischen Oberfläche nach BET

Bei der Verwendung des unpolaren Probenmoleküls n-Hexan im Bereich der endlichen Verdünnung sind die Interaktionen zwischen Adsorbat und Adsorbens wesentlich stärker, als die zwischen den Adsorbatmolekülen (Thielmann und Florian, 2001). Daraus resultiert eine Isotherme vom Typ II, die eindeutig die Ausbildung einer monomolekularen Schicht erkennen lässt (erster Wendepunkt der Kurve; Abbildung 3.4-2). Solche Isothermen können verwendet werden, um mittels der BET-Methode die spezifische Oberfläche [m^2/g] zu bestimmen (Leuenberger, 2002). Diese Werte können leicht von den

Ergebnissen der BET-Bestimmung mit Stickstoff als Adsorbat abweichen, allerdings ist diese Methode selbst sehr fehlerbehaftet. Trotzdem sind durch das Anwenden der identischen Messmethode Vergleiche möglich und Veränderungen der zu untersuchenden Materialien erkennbar.

3.4.2.4 Durchführung

Alle Messungen wurden mit einem inversen Gaschromatographen der Firma Surface Measurement Systems (London, UK) durchgeführt. Das Gerät, dessen schematischer Aufbau in Abbildung 3.4-4 dargestellt ist, besteht aus zwei Öfen, wobei der erste für die Temperierung der Probenmoleküle (Eluenten) dient. Der zweite Ofen temperiert die Säulen und damit das zu untersuchende Probenmaterial. Beide Öfen können mit einer jeweils unterschiedlichen Temperatur bedient werden. Diese wird, wie alle weiteren Funktionen, durch eine spezielle Hewlett-Packard Agilent Software gesteuert. Das Trägergas für die einzelnen Probenmoleküle ist Helium 5.0, das massenflussgesteuert in die Eluenten geleitet wird und sich mit diesen sättigt. Anschließend strömt das Gas über eine von zwei Säulen. Diese bestehen aus silikonisiertem Glas und enthalten die gepackte Probe.

Die Retentionszeit der Probenmoleküle wird mit einem Flammenionisationsdetektor (Knallgas: gereinigte Druckluft und Wasserstoff 5.0) und einem Wärmeleitfähigkeitsdetektor bestimmt. Als Eluenten wurden die n-Alkane Dekan, Oktan, Heptan, Hexan, Pentan und als polare Probenmoleküle Ethanol, Aceton, Ethylacetat und Dioxan (alle Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) verwendet. Für die Bestimmung der Referenzretentionszeit t_0 (siehe Gleichung 3-1) wurde Methan mit einer Qualität von 4.5 ausgewählt. Zur Beladung der Säulen (Durchmesser: 0,3 cm; Länge 28 cm) wurden jeweils fünf gleich große Textilienstücke mit Hilfe eines Messingdrahtes in diese eingebracht.

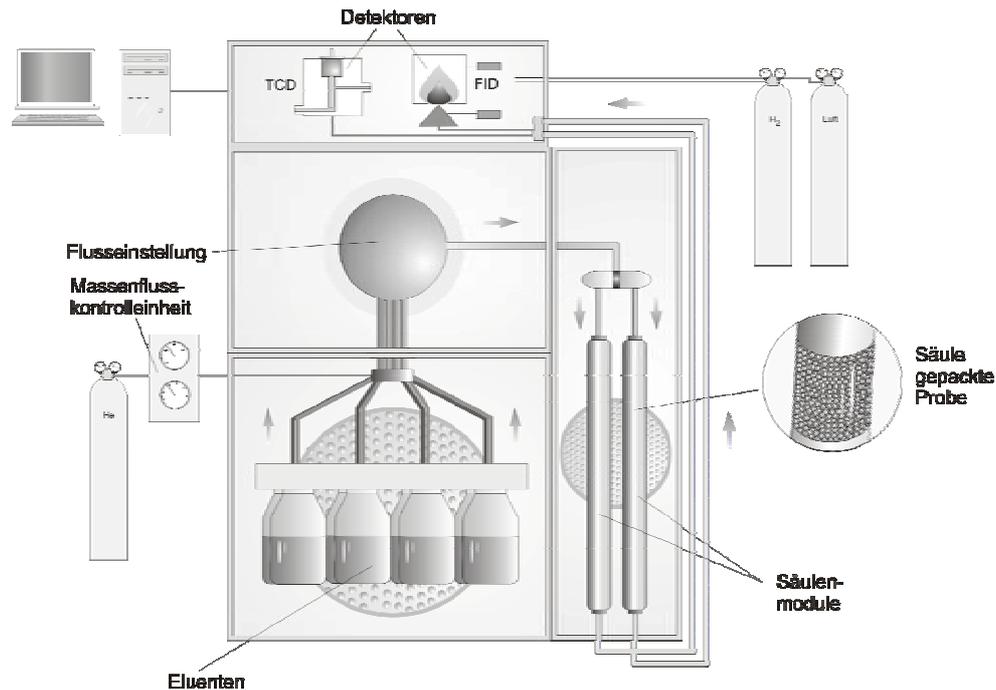


Abbildung 3.4-4 schematische Darstellung eines inversen Gaschromatographen

Für eine Reproduzierbarkeit der Daten wurden die Säulen für eine Dauer von 60 min bei einer Temperatur von 100°C vorkonditioniert. Damit konnte sichergestellt werden, dass eventuelle Verunreinigungen auf der Faser Oberfläche zerstört sind und molekulare Interaktionen nur mit dem zu untersuchenden Material stattfinden.

Alle in dieser Arbeit angegebenen Ergebnisse wurden mindestens zweimal und bei einem Unterschied der Werte von mehr als 5% ein drittes Mal vermessen (Thielmann und Butler, 2001).

3.5 TROCKNUNGSMETHODEN

3.5.1 GEFRIERTROCKNUNG

3.5.1.1 Herstellung der Zubereitungen

Alle Formulierungen wurden mit einem 0,1 molaren Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan-HCl-Puffer (pH 7,4) (Merck AG, Darmstadt, Deutschland) hergestellt. Alle Prozentangaben sind ausschließlich als Masseprozent angegeben. Die Konzentration der oberflächenaktiven Substanz wurde durch entsprechendes Verdünnen einer Stammlösung hergestellt.

3.5.1.2 Gefriertrocknung

Die Formulierungen werden in 4 ml Vials (Glastyp I, Forma Vitrum AG, St. Gallen, Schweiz) (1000 µl Endvolumen) gefüllt und mit Lyophilisationsstopfen (WEST COMPANY, Aachen, Deutschland) vorverschlossen.

Tabelle 3.5-1 Gefriertrocknungsprogramm zum Trocknen der Formulierungen

	Zeit [min]	Anfangs- temperatur [°C]	End- temperatur [°C]	Druck [mbar]
Einfrieren	15	Raumtemperatur	-30	40
Primär- Trocknung	480	-30	-5	0.8
	480	-5	-5	0.8
Sekundär- Trocknung	60	-5	15	0.1
	300	15	15	0.1

Die Trocknung wurde mit einem Gefriertrockner GFT 6 der Firma Klein Vakuumtechnik (Niederfischbach, Deutschland) durchgeführt. Der Gefriertrocknungszyklus erfolgte mit einem Standardprogramm (Tabelle 3.5-1). Nach Beendigung des Prozesses wurde die Kammer mit steril filtrierter Raumluft (0,2 µm Filter, Sartorius, Göttingen, Deutschland) belüftet, die Vials mit den Stopfen verschlossen und anschließend mit Aluminiumdeckeln verbördelt.

3.6 ENZYMATISCHE BESTIMMUNGSMETHODEN

3.6.1 EINLEITUNG

Die in dieser Arbeit durchgeführten enzymatischen Bestimmungen hatten hauptsächlich zwei Zielrichtungen. Einerseits war eine Charakterisierung der Lyophilisate im Rahmen der Stabilisierung der Madensekretionslösung erforderlich (Kapitel 6) und andererseits konnte durch eine Bestimmung der Glukosekonzentration (Kapitel 5) der enzymatische Abbau der Cellulosefasern sehr detailliert beschrieben werden.

3.6.2 TRYPTISCHE AKTIVITÄT

Die tryptische Aktivität wurde durch Verwendung des Substrates N-Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilidhydrochlorid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) bestimmt. Hierfür wurden 0,9 ml Triethanolaminpuffer (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) (pH-Wert 7,4) mit 0,1 ml der Madensekretionslösung oder Rekonstitutionslösung 20 min bei 25°C inkubiert. Nach Zusatz von 0,5 ml Substratlösung (22 mg Substrat in 20 ml bidestilliertes Wasser) erfolgte die Bestimmung der Absorptionzunahme der Lösung mit einem Cary 50 Bio UV/VIS-Spektrometer (Varian, Palo Alto, USA) für einen Zeitraum von 75 min. Das sich bildende p-Nitroanilin (Reaktionsgleichung: Abbildung 3.6-1) konnte bei einer Wellenlänge von $\lambda = 405 \text{ nm}$ per UV/VIS-Messung erfasst und der

Gehalt quantitativ bestimmt werden. Zur Auswertung wurde die Absorption gegen die Zeit aufgetragen. Zur Bestimmung der Ausgangsaktivität wurde die Madensekretionslösung mit Trispuffer im Verhältnis 1:1 verdünnt. Nach der Gefriertrocknung wurden die Lyophilisate mit 600 µl Trispuffer rekonstituiert und die Messung der Aktivität wie beschrieben durchgeführt. Die Bestimmungen erfolgten mit einer Wiederholung von n = 3. Um eine durch die Hilfsstofflösungen hervorgerufene Absorption auszuschließen, wurden diese analog vermessen und die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmung um diese Werte korrigiert.

Die Berechnung der Enzymaktivität erfolgte mittels folgender Gleichung:

$$A = \frac{1000 \times V}{\Delta t \times \varepsilon \times d \times v} \times \Delta A \left[\frac{\text{mU}}{\text{ml}} \right]$$

Gleichung 3-13

ε = Extinktionskoeffizient von p-Nitroanillin bei $\lambda = 405 \text{ nm}$ ($9,9 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)

d = Schichtdicke der Küvette (1 cm)

v = Volumen der eingesetzten Madensekretions-/ Rekonstitutionslösung (ml)

V = Summe der gesamten eingesetzten Volumina (ml)

ΔA = Änderung der Absorption

Δt = Zeit pro Messung

Da die Werte ε , d , v und V feste Größen darstellen, konnten diese vereinfachend zu einer Konstanten (Zahlenwert: 1515,15) zusammengefasst und mit der Absorptionsänderung/Zeit multipliziert werden.

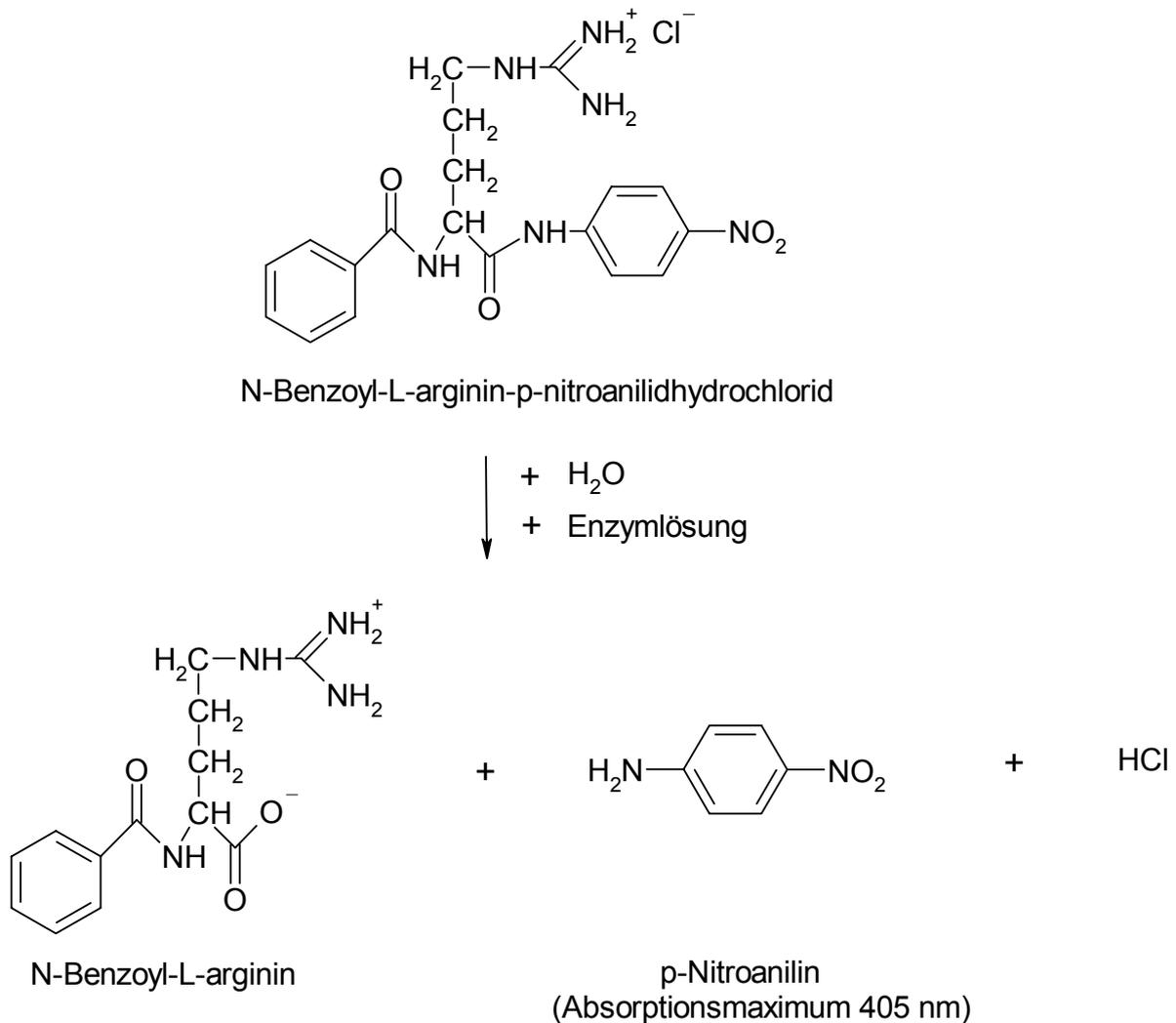


Abbildung 3.6-1 Spaltung des Substrates N-Benzoyl-L-arginin-p-nitroanilidhydrochlorid durch tryptische Aktivität der Enzymlyösung

3.6.3 LEUCINAMINOPEPTIDASE-AKTIVITÄT

Die Reaktionsbedingungen zur Bestimmung der Leucinaminopeptidase-Aktivität wurden entsprechend den Messungen der tryptischen Aktivität gewählt. Als zu spaltendes Substrat wurde hierbei L-Leucin-p-nitroanilidhydrochlorid verwendet. Die Reaktionsgleichung zur Aktivitätsbestimmung ist in Abbildung 3.6-2 dargestellt. Zur Bestimmung der

Enzymaktivität kann auch hier die Gleichung 3-13 verwendet werden, da die Absorptionsänderung des Spaltproduktes p-Nitroanilin bestimmt wurde.

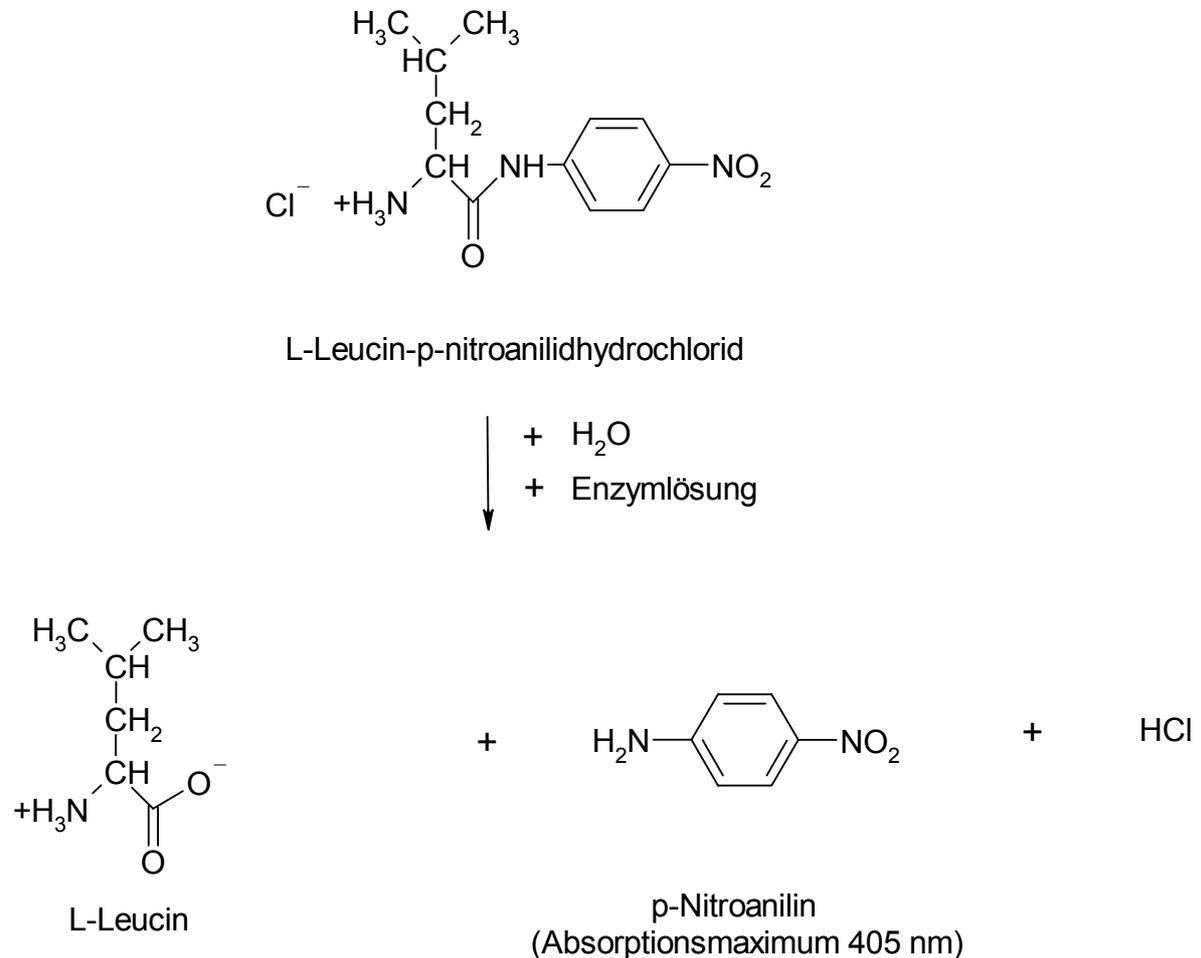


Abbildung 3.6-2 Spaltung des Substrates L-Leucin-p-nitroanilidhydrochlorid durch Leucinaminopeptidase-Aktivität der Enzymlösung

3.6.4 QUANTIFIZIERUNG DER GLUKOSEKONZENTRATION

Für die Bestimmung des Abbaus von Cellulosematerialien durch das Enzym Cellulase wurde die entstandene Glukosekonzentration bestimmt. Hierdurch war es möglich die Materialien untereinander zu vergleichen, aber auch die Aktivität der Cellulase näher zu betrachten. Die Messung der Glukosekonzentration wurde im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe einer

enzymatischen Reaktion durchgeführt. Hierdurch können wesentlich genauere Werte erzielt werden als bei herkömmlichen Farbkopplungsreaktionen (Frost, 2004).

Die Messungen wurden mit einer Reagenzlösung für die quantitative *in-vitro*-Bestimmung von Glukose in Serum oder Plasma durchgeführt. Somit konnte sichergestellt werden, dass bereits sehr geringe Konzentrationen durch diese Methode genau gemessen werden können. Die Substratlösung (DiaSys Diagnostic Systems GmbH, Holzheim, Deutschland) basiert auf einem Phosphatpuffer (pH 7,5) und enthält alle für die Reaktion erforderlichen Bestandteile wie z.B. die Kopplungsreagenzien Phenol und 4-Aminoantipyrin und die beiden Enzyme Glukoseoxidase und Peroxidase. Der Reaktionsmechanismus ist in Abbildung 3.6-3 genau dargestellt.

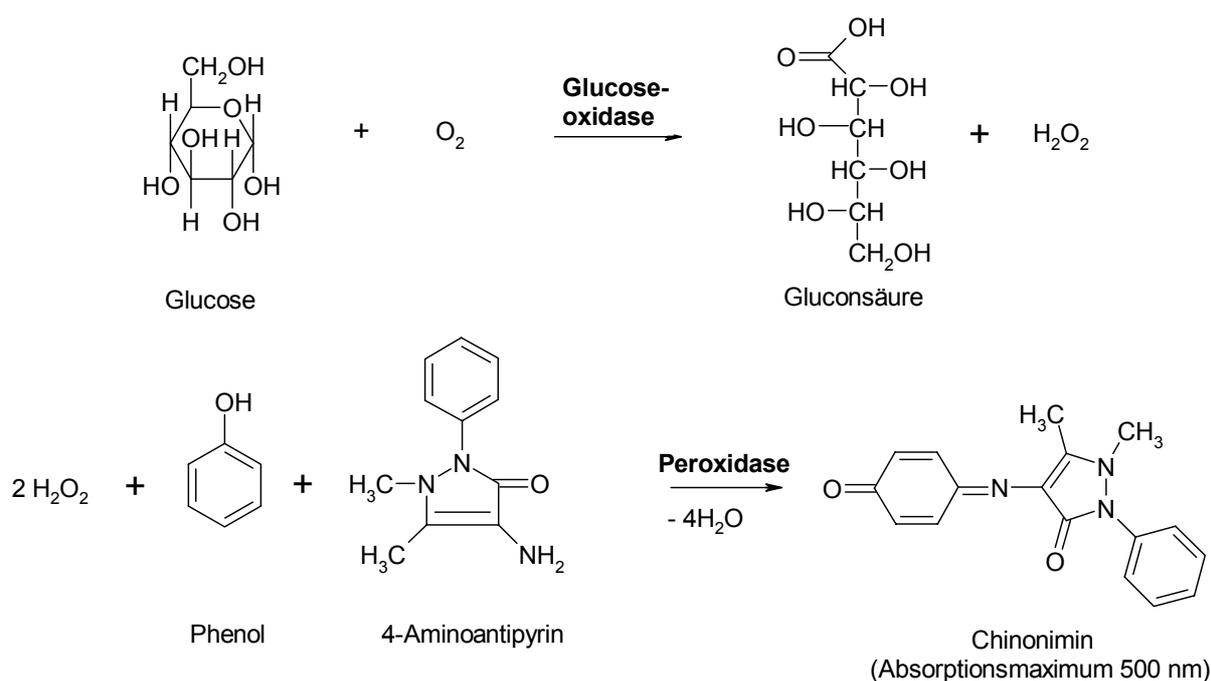


Abbildung 3.6-3 Bestimmung der Glukosekonzentration durch Glukose-oxidase

Nach enzymatischer Oxidation der Glukose durch Glukoseoxidase entsteht Wasserstoffperoxid. Dieser reagiert unter der katalytischen Einwirkung einer

Peroxidase mit Phenol und 4-Aminoantipyrin zu einem farbigen Chinonimin (Trinder-Reaktion) (Barham und Trinder, 1972), das bei einer Wellenlänge von 500 nm photometrisch vermessen werden kann. Zur Vermessung der Probe wurden 10 µl Probe mit 1000 µl Reagenz für eine Dauer von 10 min bei 25°C inkubiert und anschließend vermessen. Eine analoge Vermessung mit einem Standard ermöglichte die Quantifizierung der Messwerte.

4 TRÄGERMATERIALIEN

4.1 EINLEITUNG

Der Fokus dieses Verbundprojekts richtete sich auf die Entwicklung einer Wundauflage, aus der ein Wirkstoff gesteuert freigesetzt wird. Hierfür war es wichtig, ein Reservoir zu schaffen, in dem der Wirkstoff dosiert vorliegt und anschließend parallel zum Abbau der Wundauflage durch den Einsatz einer Cellulase abgegeben wird. Für die Konstruktion einer solchen Wundauflage wurden somit einige Anforderungen an die Materialien, insbesondere an den Träger gestellt. Dieser sollte auf dem natürlichen Rohstoff Cellulose basieren, um als Substrat von der Cellulase abgebaut werden zu können. Weiterhin war neben einer hohen Wasserbindungs- und damit gewissen Saugfähigkeit zur effektiven Aufnahme von Wundexsudat, auch ein hohes Adsorptionspotential der Faser gefordert. Durch diese Eigenschaft können Faktoren wie die Beladungskapazität mit einem Wirkstoff, aber auch der anschließende Abbau der Wundauflage entscheidend beeinflusst werden (Buschle-Diller und Traore, 1998). Zusätzlich zum Adsorptionspotential, der Eignung auf Abbaubarkeit und der spezifischen Oberfläche war die Untersuchung weiterer Oberflächeneigenschaften sehr wichtig, da neben der gesteuerten Freisetzung eines Wirkstoffs von der Faser auch eine Stabilisierung desselben durch die Faser stattfinden sollte. Mit der Verwendung von Madensekret der Fliegengattung *Lucilia sericata* wurde ein äußerst empfindlicher Wirkstoff gewählt, so dass die Beurteilung der Materialien besonders kritisch vorgenommen werden musste.

Zu Beginn der Untersuchungen wurde eine Reihe von Materialien durch den Verbundprojektpartner Hohensteiner Institute zur Verfügung gestellt, um diese im Hinblick auf ihre Eignung zu untersuchen. Der größte Teil dieser Fasern war bereits mit Säure vorbehandelt, da hierdurch ein beschleunigter Abbau durch die Cellulase vermutet wurde. Eine genauere Angabe über die Bedingungen der Säurebehandlungen erfolgt in Abschnitt 4.2. Um bessere

Vergleiche zwischen den Materialien erzielen zu können, wurden alle analytischen Methoden unter Standardbedingungen durchgeführt, die dem Methodenteil entnommen werden können. Die Entwicklung einiger Analytikmethoden zur Bestimmung der physikochemischen Parameter wird beispielhaft am Material der Viskose detailliert beschrieben.

4.2 CELLULOSEMATERIALIEN

4.2.1 VISKOSE

Bei den Viskosefasern handelt es sich um Celluloseregeneratfasern. Diese werden aus Chemiezellstoff nach dem Viskoseprozess hergestellt. Hierfür wird der Zellstoff (Celluloseanteil 98%) mit Natronlauge vorbehandelt und nach einer gewissen Einwirkzeit mit Schwefelkohlenstoff zu Cellulosexanthogenat umgesetzt. Dieses Cellulosederivat ist in Natronlauge löslich und kann mit Hilfe eines salz- und säurehaltigen (ZnSO_4 und H_2SO_4) Spinnbads koaguliert werden. Die Viskosefaser regeneriert in diesem Spinnbad und durch den Einsatz von Fadenführungsrichtungen kann die Faser abgezogen und definiert verstreckt werden (Rihm, 2003).

Viskose wird sehr häufig in der Wundheilung eingesetzt, da es sich hier um eine Endlofaser mit einer besonders glatten und gleichmäßigen Oberfläche handelt. Durch die hohe Hydrophilie kann dieses Material sehr gut Wundexsudat aufnehmen und aufgrund der porigen Faserstruktur besitzt es genügend Adsorptionseigenschaften, um einen Wirkstoff dauerhaft an sich zu binden.

Für die folgende Untersuchung der physikochemischen Eigenschaften stand Material zur Verfügung, das je 40 min, 45 min und 50 min mit 30%iger Salzsäure bei einer Temperatur von 30°C behandelt wurde. Die Chargenbezeichnungen lauten je nach Dauer der Einwirkzeit CV_40; CV_45 und CV_50.

Physikochemische Parameter

Röntgendiffraktometrie

Die Kristallinität der Faser kann den enzymatischen Abbau des Arzneistoffträgers beeinflussen (Lynd, Weimer *et al.*, 2002), da ausgeprägt kristalline Bereiche für die Enzyme sehr schwer zugänglich sind und den Abbau stark verlangsamen. Für die Beurteilung der Kristallinität wurde das Röntgendiffraktogramm der Materialien mit der Methode 3.2.1 aufgezeichnet und dieses in Abbildung 4.2-1 dargestellt.

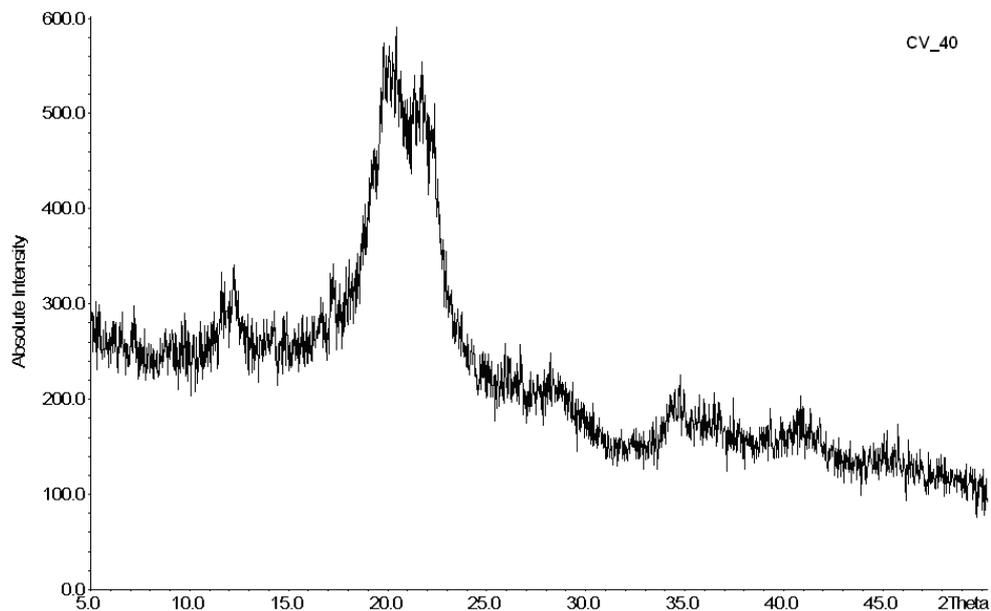


Abbildung 4.2-1 Röntgendiffraktogramm von Viskose (Säurebehandlungsdauer 40 min)

Bei der Betrachtung des Röntgendiffraktogramms ist mit Ausnahme eines großen Peaks bei $20^\circ 2\theta$ bis $23^\circ 2\theta$ keine ausgeprägte Kristallinität zu erkennen. Die Auswertung des Materials mit einer Säurebehandlungszeit von 50 min ergab ein identisches Aussehen des Diffraktogramms.

Dynamische Wasserdampf Sorption

Für die Bewertung von Wechselwirkungen der Faseroberfläche mit Wasser wurden für die Materialien unter Verwendung der Dynamischen Wasserdampf Sorption die Sorptionsisothermen aufgezeichnet. Da die Cellulose wasserunlöslich ist, war eine Veränderung der Kristallisationsstruktur (Entstehung von Hydraten), die eine erhöhte Massezunahme zur Folge hat (Levoguier und Williams, 1997), nicht zu erwarten. Um diese Aussage zu bestätigen, wurden in einem Zeit-Luftfeuchte-Programm (Abbildung 4.2-2) nacheinander zwei Zyklen von 0% bis 90% relativer Luftfeuchte mit anschließendem Absinken auf 0% vermessen, um mögliche Veränderungen der Materialien genauer bestimmen zu können.

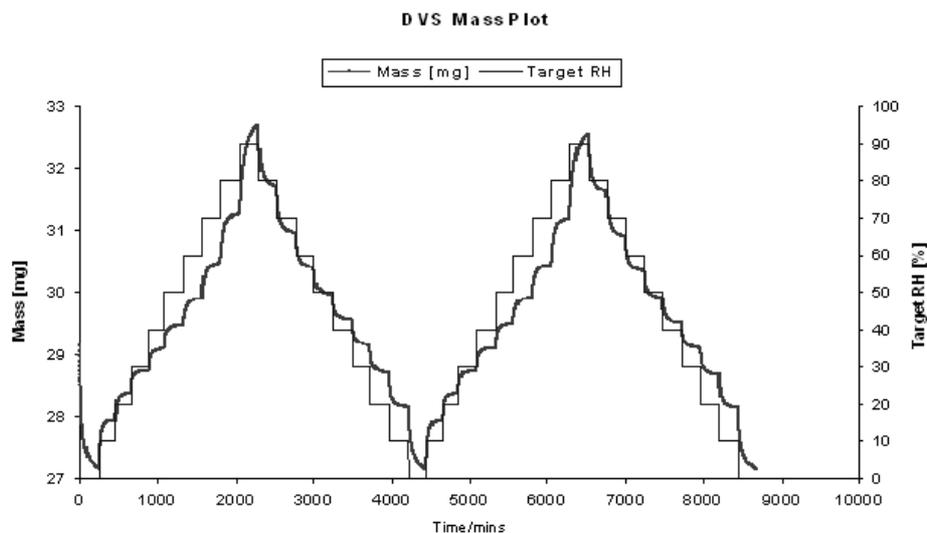


Abbildung 4.2-2 Masseplot von Viskose (Säurebehandlungsdauer 40 min)

Bei der Auswertung des Masseplots in Abbildung 4.2-2 sind keine Veränderungen bezüglich der Faserstruktur zu erkennen, da die Masseaufzeichnung im zweiten Zyklus einen nahezu identischen Kurvenverlauf ergibt. Dadurch sind auch die Kurvenverläufe der Sorptionsisothermen nahezu identisch und die Hystereseffläche zwischen Sorption und Desorption ist sehr

klein (Daten hier nicht abgebildet). Damit ist die Faseroberfläche relativ inert gegenüber Änderungen der umgebenen Luftfeuchte. Trotzdem kommt es zu Wechselwirkungen mit dem Wasserdampf und somit zur Massezunahme. Um Aussagen über die Wasserdampfaufnahme und damit über den hydrophilen Charakter der Fasern treffen zu können, wurde die Massezunahme bei einer Luftfeuchte von 90% bestimmt.

Beim Vergleich der beiden Massen ist bei einer relativen Luftfeuchte von 90% im zweiten Zyklus ein geringfügig kleinerer Wert zu verzeichnen. Der Vergleich der Massezunahmen ist in Abbildung 4.2-3 für die beiden Chargen CV_40 und CV_50 zusammengefasst. Der Unterschied zwischen den Massen des ersten Zyklus und des zweiten Zyklus beträgt 3,7% für CV_40 und 7,4% für CV_50. Aufgrund dieser geringen Unterschiede zwischen den Maximalwerten beider Zyklen und der zu erwartenden Unversehrtheit der Fasern nach Kontakt mit Wasserdampf wurden alle weiteren Sorptionsisothermen mit nur einem Zyklus aufgenommen und die Massezunahme bei 90% relativer Luftfeuchte aufgezeichnet.

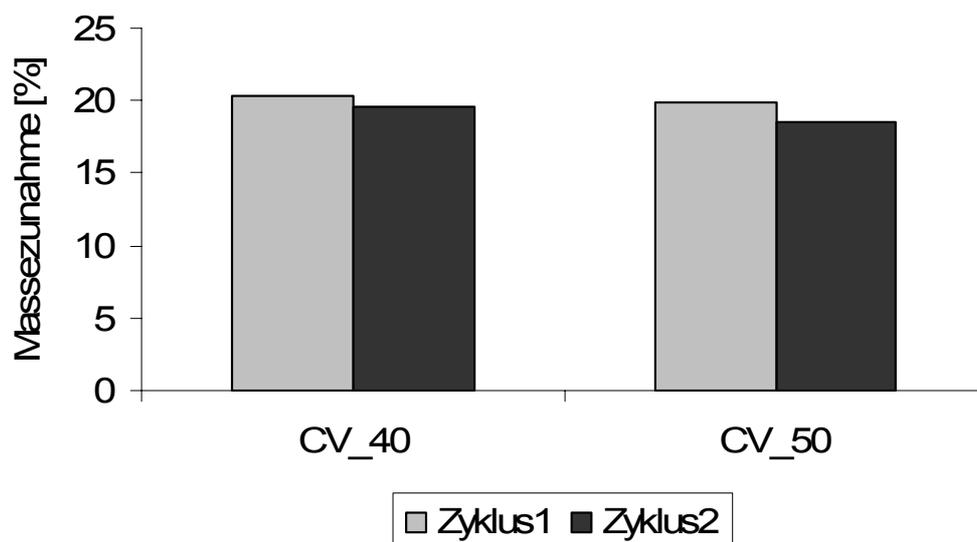


Abbildung 4.2-3 Massezunahme von Viskosematerialien (40 min/50 min) bei 90% relativer Luftfeuchte

Wasserbindungsvermögen

Zusätzlich zur Bestimmung der Sorptionseigenschaften sollte das komplette Wasserbindungsvermögen der Fasern bestimmt werden. Hiermit können Aussagen zur Beladungskapazität einer Faser, die Freisetzung von der Faser und eine mögliche adsorbierende Wirkung genauer beschrieben und verstanden werden. Außerdem steht mit diesem physikochemischen Parameter eine Möglichkeit zur Verfügung, strukturelle Veränderungen der Faser nach Cellulaseeinfluss zu charakterisieren.

Für die Bestimmung des Wasserbindungsvermögens wurde die Methode aus 3.3.2 von Hoshino (Hoshino, Kubota *et al.*, 1994) verwendet und wie folgt modifiziert. In der Studie von Hoshino erfolgen eine zeitaufwendige Konditionierung der Materialien mit dem bereits hinzugefügten Wasser und eine anschließende Messung. Die Konditionierung soll folgendermaßen durchgeführt werden: Zunächst erfolgt eine Lagerung bei -4°C für eine Dauer von 12 h, anschließend werden die Proben jeweils 8h bei 50°C und bei 25°C konditioniert und dann vermessen. Hierdurch soll eine bessere Bindung des Wassers mit der Oberfläche ermöglicht werden. Parallel wurden Proben vermessen, bei denen nur das Material für 24 h bei 80°C gelagert und anschließend das Wasser hinzu pipettiert wurde. Die bestimmten Kristallisationsenthalpien wurden gegen den Wassergehalt aufgetragen und der Schnittpunkt mit der x-Achse bestimmt, der den maximal gebundenen Wasseranteil repräsentiert. Der Vergleich der Werte mit der Methode von Hoshino mit denen der Modifizierung ist in Abbildung 4.2-4 dargestellt. Hierin sind beide Geraden abgebildet und liegen identisch übereinander.

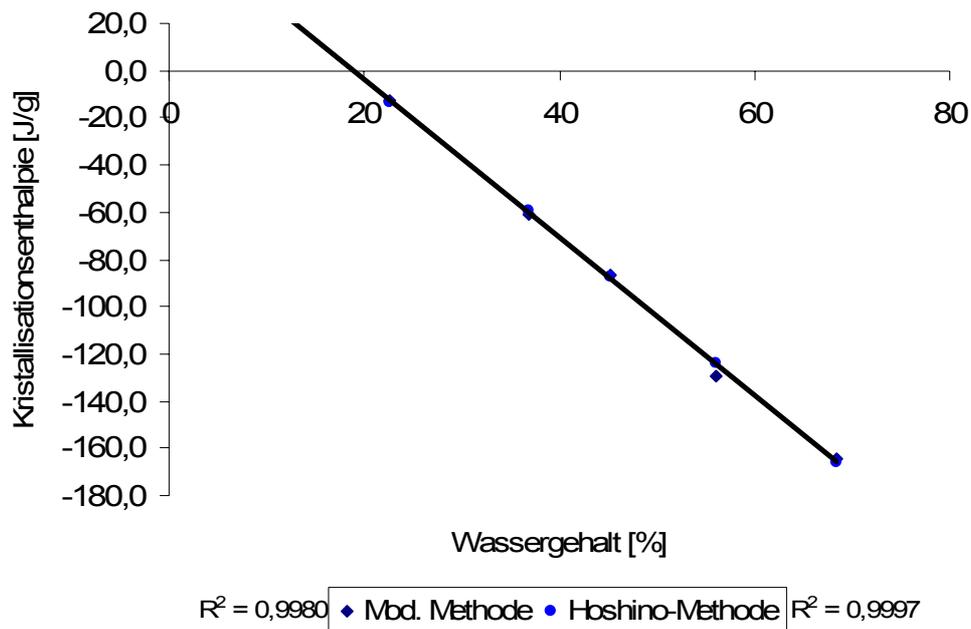


Abbildung 4.2-4 Bestimmung des Wasserbindungsvermögens der Fasern durch die Differential Scanning Calorimetry

Der Schnittpunkt mit der Abszisse ist für beide Methoden kaum voneinander zu unterscheiden. Die Methode von Hoshino ergab ein Wasserbindungsvermögen der Faser von 18,9% und die modifizierte Variante einen Wert von 18,8% für die Viskose CV_45. Damit wurde für alle folgenden Bestimmungen auf eine umfangreiche Konditionierung der Proben verzichtet und diese nur noch für 24 h bei 80°C getrocknet. Für die beiden zu untersuchenden Materialien CV_40 und CV_50 wurden Resultate von 21,2% und 21,6% bestimmt. Eine Veränderung der Werte durch eine Säurebehandlung war damit nicht feststellbar.

Inverse Gaschromatographie

Mit Hilfe der inversen Gaschromatographie sollten die physikochemischen Parameter wie z.B. die dispersive Oberflächenenergie und die Oberflächenheterogenität der Oberflächen bestimmt werden. Mittels dieses Verfahrens

können zum einen sehr sensible Unterschiede in der Oberflächenbeschaffenheit detektiert und zum anderen können Aussagen zum stabilisierenden Einfluss der Faser auf die adsorbierte Madensekretionslösung getroffen werden (für eine genaue Interpretation der Korrelationen sei auf die Kapitel 5.1.2 und 6.4.4 verwiesen).

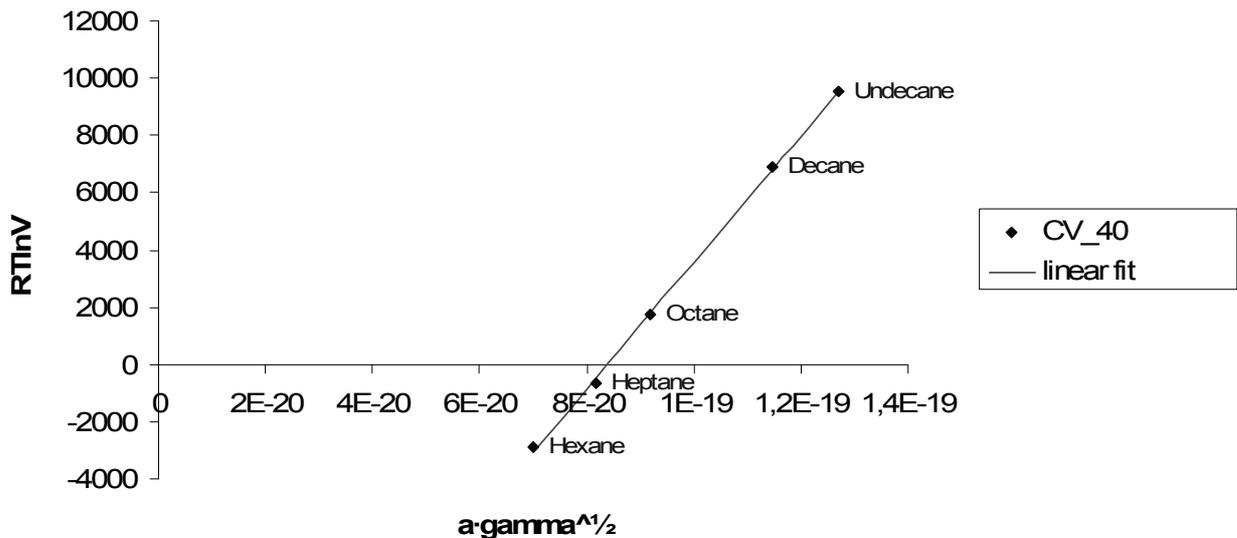


Abbildung 4.2-5 Surface Energy Plot zur Bestimmung der Oberflächenenergie von Viskose (CV_40)

Bei der Bestimmung der dispersiven Oberflächenenergien wurden die n-Alkane Undekan, Dekan, Oktan, Heptan und Hexan verwendet und aus der Steigung der Geraden in der obigen Abbildung 4.2-5, wie im Kapitel Methoden beschrieben, der Wert für die Oberflächenenergie bestimmt. Für die Charge CV_40 wurde ein Wert von 34,3 mJ/m² bei einem Korrelationskoeffizienten von 0,9997 gemessen. Unter gleichen Bedingungen wurde für CV_50 eine Oberflächenenergie von 34,6 mJ/m² bestimmt (R²=0,9998). Damit liegen diese Werte in einer typischen Größenordnung für Viskosefasern (Felix und Gatenholm, 1993).

Ein weiterer wichtiger Parameter ist die Bestimmung der Oberflächenheterogenität auf der Grundlage von Isothermen bestimmter Probenmoleküle

(polar: Ethanol und unpolar: n-Hexan). Die Messung der Heterogenitäten ermöglicht die Bestimmung des Adsorptionspotentials einer Faseroberfläche und damit der Bindungskapazität zu einem bestimmten Probenmolekül. Hierbei kommt besonders der Lage des Peakmaximums und der Fläche unter der Kurve eines Heterogenitätsplots eine besondere Bedeutung zu (eine genaue Interpretation der Daten erfolgt in Kapitel 5.1.2). In der Abbildung 4.2-6 ist ein Heterogenitätsplot für das Probenmolekül n-Hexan und das Material CV_40 gezeigt.

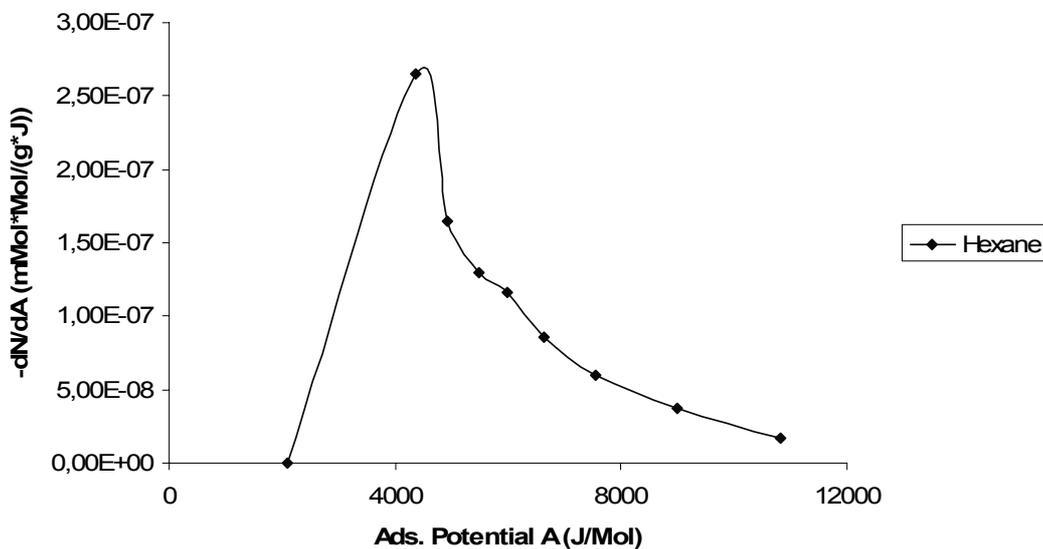


Abbildung 4.2-6 Heterogenitätsplot von Viskose CV_40 gegen das Probenmolekül n-Hexan

Obwohl in 5.1.2 der Auswertung der Heterogenitätsplots eine besondere Bedeutung beigemessen wird, soll hier auf eine detaillierte Beschreibung der Werte für beide Materialien verzichtet werden, da diese sich nur sehr geringfügig unterscheiden und in den folgenden Ausführungen keine Rolle spielen.

Eine weitere Einflussgröße, die für die Auswahl der Materialien sehr wichtig sein kann, ist die spezifische Oberfläche. Die Messung dieses Parameters war allerdings mit den herkömmlichen Messgeräten auf der Grundlage der BET-

Methode nicht möglich, da ein zu hohes „Totvolumen“ ($\sim 0,9 \text{ cm}^3$) entstand. Eine Bestimmung der spezifischen Oberfläche konnte mittels der inversen Gaschromatographie durchgeführt werden. Hierfür wurde, wie bereits beschrieben, die Heterogenität gegen n-Hexan bestimmt. Aus dem entstehenden Isothermenplot ist anschließend eine Bestimmung der spezifischen Oberfläche möglich (Thielmann und Pearce, 2001). Für die Chargen CV_40 und CV_50 wurden nahezu identische spezifische Oberflächen von $0,36 \text{ m}^2/\text{g}$ (CV_40) und $0,34 \text{ m}^2/\text{g}$ (CV_50) ermittelt.

Rasterelektronenmikroskopie

Mit Hilfe der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sollte zunächst ein Gesamtüberblick über das zu untersuchende Fasermaterial gewonnen werden. Somit waren Aussagen über die Fadendichte und –beschaffenheit möglich, die bei der Materialfindung eine entscheidende Rolle spielen können. Im Hinblick auf die Beladung mit Wirkstoffen sollten die zu verwendenden Gewebe eine hohe Fadendichte aufweisen und wenige Zwischenräume haben, da so die Adsorption des Wirkstoffes effektiver und dauerhaft stattfindet. Zudem wurden detaillierte Aufnahmen der Faseroberfläche gemacht, da die Oberflächenbeschaffenheit sehr wichtig für die Stabilisierung der Madensekretionslösung ist. Außerdem sollten eventuelle Unterschiede sowohl nach der Säurebehandlung als auch nach Cellulaseeinfluss aufgezeigt werden. In der folgenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahme ist eine Gesamtübersicht von der Charge CV_50 abgebildet.

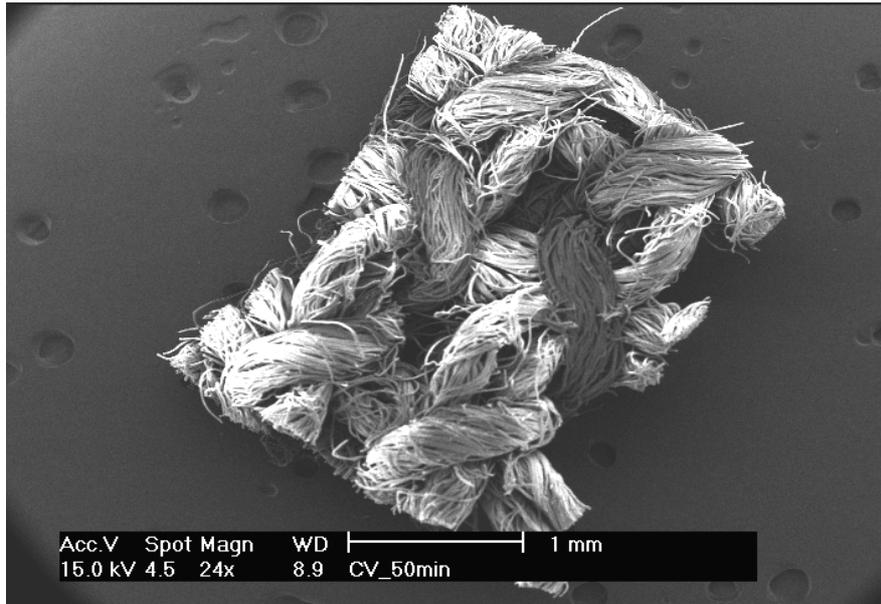


Abbildung 4.2-7 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Viskose-Gewebe (CV_50)

Das Gewebe des Viskosematerials ist sehr engmaschig, und es sind sehr viele Fasern verarbeitet. Dadurch eignet sich das Gewebe sehr gut für die Adsorption bestimmter Wirkstoffmengen. Weiterhin lassen sich hiermit die relativ hohe Sorption von Wasserdampf und das gute Wasserbindungsvermögen dieses Materials begründen. Auf eine Abbildung des Gewebes CV_40 wurde verzichtet, da eine Differenzierung zwischen den beiden Chargen nicht möglich war.

Durch die folgenden Aufnahmen (Abbildung 4.2-8) soll eine detaillierte Gegenüberstellung der Faseroberflächen beider Materialien erfolgen, um so eine mögliche Destruktion durch die Säure feststellen zu können. Bei der Gegenüberstellung beider Fasern ist eine sehr homogene Oberfläche zu erkennen. Es sind keine Unterschiede in der Beschaffenheit der Fasern zu erkennen. Eine längere Einwirkzeit der Säure hat somit keinerlei destruktive Wirkung auf die Faser, die deutlich messbare Veränderungen physikochemischer Größen hervorrufen würden. Damit konnten die obigen

Ergebnisse der physikochemischen Charakterisierung bestätigt werden, bei denen nur marginale Unterschiede gemessen werden konnten.

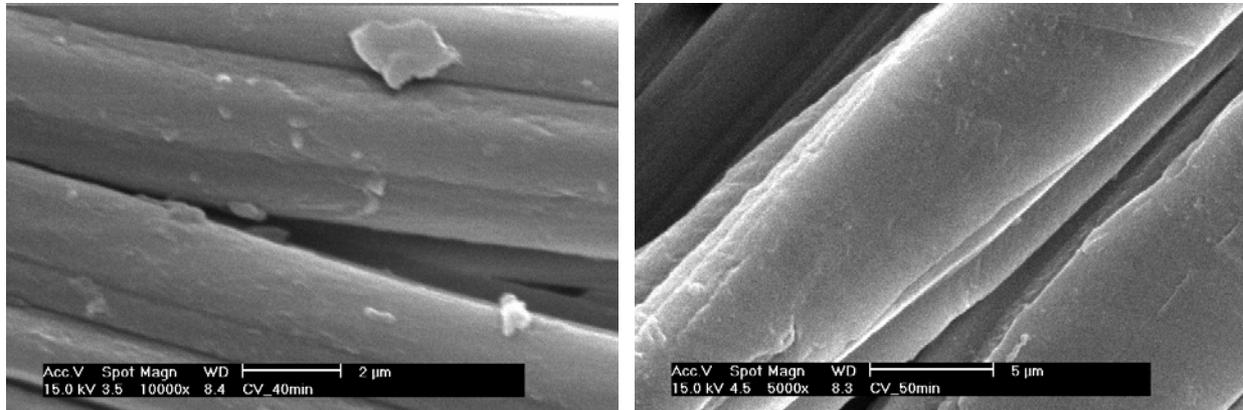


Abbildung 4.2-8 rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Faser-
oberfläche der Viskosematerialien CV_40 (links) und
CV_50 (rechts)

4.2.2 BAUMWOLLE

Bei der verwendeten Baumwolle handelt sich um ein Verbandmaterial, das zu 100% aus reiner Baumwolle besteht. Diese stellt ein textiles Flächengebilde aus Fäden dar, die sich rechtwinklig kreuzen. Im Gegensatz zur Viskose sind die Oberflächen nicht so ausgeprägt hydrophil. Im Rahmen des Verbundprojektes wurde Baumwolle zur Verfügung gestellt, die mit 30%iger Salzsäure für eine Zeitdauer von je 50 min und 60 min bei einer Temperatur von 30°C behandelt wurde. Je nach Dauer der Säurebehandlung lauten die Chargenbezeichnungen BW_50 und BW_60.

Physikochemische Parameter

In den folgenden Abschnitten werden die wichtigsten Parameter graphisch dargestellt. Die Angabe weiterer Resultate erfolgt in Form einer Tabelle (Tabelle 4.2-1) mit einer anschließenden Diskussion und Interpretation.

Röntgendiffraktometrie

Die Abbildung 4.2-9 zeigt das Röntgendiffraktogramm des Baumwollmaterials nach einer 50minütigen Salzsäurebehandlung (BW_50).

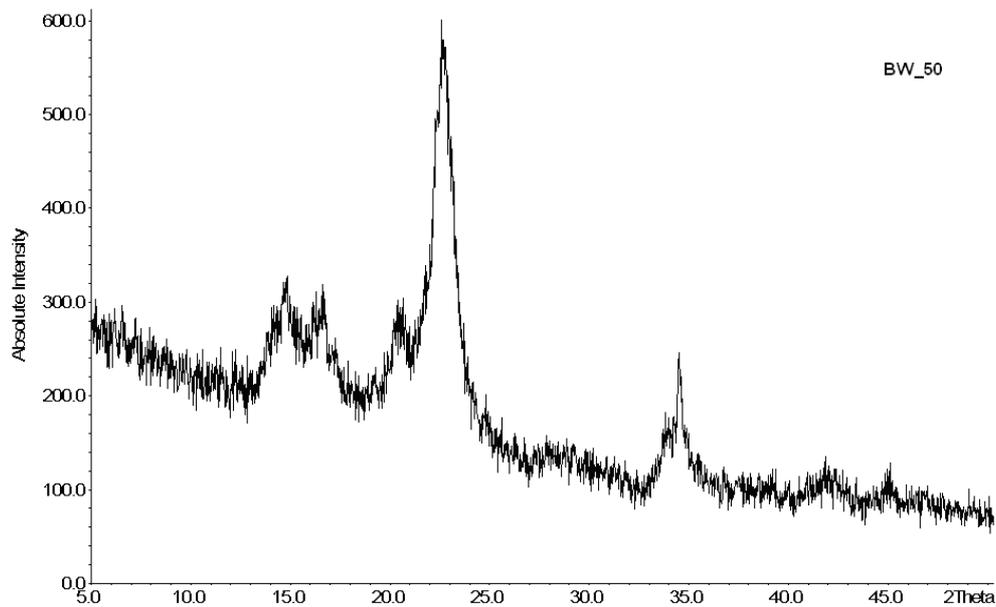


Abbildung 4.2-9 Röntgendiffraktogramm von Baumwolle (Säurebehandlungsdauer 50 min)

Das Röntgendiffraktogramm zeigt im Vergleich zum obigen Viskosematerial deutliche Unterschiede in der Kristallinitätsstruktur (Abbildung 4.2-1). Der Peak bei $23^\circ 2\theta$ ist in der Intensität viel stärker und „kristalliner“. Zusätzlich sind weitere Peaks z.B. bei *circa* $15^\circ 2\theta$ und bei $35^\circ 2\theta$ im Diffraktogramm auffällig. Beide Peaks sind beim Viskosematerial nicht vorhanden. Zusammenfassend lässt sich somit festhalten, dass die Baumwolle etwas „kristalliner“ ist als das Viskosematerial. Das heißt, obwohl beide Materialien auf dem Polymer Cellulose basieren, kommt es bedingt durch den Viskoseprozess zu einer Veränderung der Kristallinität. Diese Aussage lässt sich durch die zusätzliche Betrachtung des Diffraktogramms vom Mull in Abbildung 4.2-11 bestätigen, das dem BW-Diffraktogramm entspricht. Beim Vergleich der Baumwollmaterialien untereinander sind allerdings keine nennenswerten

Unterschiede in der Kristallstruktur ersichtlich, so dass auf eine Abbildung des Diffraktogramms für BW_60 verzichtet wurde.

Zusammenfassung physikochemischer Parameter

In der Tabelle 4.2-1 werden die Resultate der Dynamischen Wasserdampf Sorption, des Wasserbindungsvermögens und die relevanten Ergebnisse der inversen Gaschromatographie zusammengefasst.

Tabelle 4.2-1 Physikochemische Parameter des Baumwoll-Materials

Material	BW_50	BW_60
Methode		
Massezunahme (DVS; 90% RH)	10,5%	10,5%
Wasserbindungsvermögen (DSC)	11,7%	13,2%
Dispersive Oberflächenenergie (iGC)	42,7 J/m ²	41,6 J/m ²
Spezifische Oberfläche (iGC)	0,71 m ² /g	0,66 m ² /g

Die Sorptionsfähigkeit der Baumwolle für Wasserdampf war im Vergleich zur Viskose sehr viel geringer. So konnten für die Massezunahme Werte bestimmt werden, die *circa* 50% des Aufnahmevermögens von Viskose betragen. Dieser Trend setzte sich auch bei den Ergebnissen zur Bestimmung des Wasserbindungsvermögens fort, denn auch hier waren die Mengen sehr viel kleiner als bei der Viskose. Somit ist davon auszugehen, dass die Viskose hydrophiler ist und zusätzlich in der Lage ist, mehr Wasser dauerhaft zu binden. Beim Vergleich der dispersiven Oberflächenenergien beider Materialien waren die Werte der Baumwolle (ähnliche Werte sind bereits

beschrieben worden (Belgacem und Gandini, 1999)) sehr viel höher als die des Viskosematerials. Diese Tatsache kann zusätzlich beim Vergleich der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen beider Materialien (Abbildung 4.2-8 und Abbildung 4.2-10) verdeutlicht werden. Beim Vergleich beider Abbildungen lässt sich erahnen, dass die Viskoseoberfläche sehr viel homogener ist und sich damit kleinere Werte für die Oberflächenenergie ergeben.

Die spezifische Oberfläche der Baumwolle ist größer als die der Viskose. Dieser Aspekt unterstreicht nochmals die hohe Hydrophilie der Viskose, da trotz der kleineren Oberfläche eine sehr viel höhere Wasserbindungskapazität vorliegt.

Rasterelektronenmikroskopie

Zunächst soll erneut ein Gesamtüberblick des Materials dargestellt werden, um die Fadendichte und damit korrespondierend die Beladungskapazität zu beurteilen. Neben dem Gesamtüberblick wird eine detaillierte Aufnahme der Faseroberfläche gezeigt, um Aussagen über die Struktur der Faser nach einer 50minütigen Säurebehandlung treffen zu können. Beide rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen sind in Abbildung 4.2-10 aufgeführt. Bei der Betrachtung des Gesamtüberblicks des Baumwollmaterials ist im Vergleich zur Viskose eine höhere Fadendichte zu erkennen. Somit ist auch die mit der inversen Gaschromatographie ermittelte höhere spezifische Oberfläche der Baumwolle erklärbar. Die Faseroberfläche ist sehr heterogen und scheint durch die Säurebehandlung verändert zu sein. Dies spiegelt sich in den Werten der dispersiven Oberflächenenergie wider, wobei diese im Vergleich zur Viskose sehr viel größer waren.

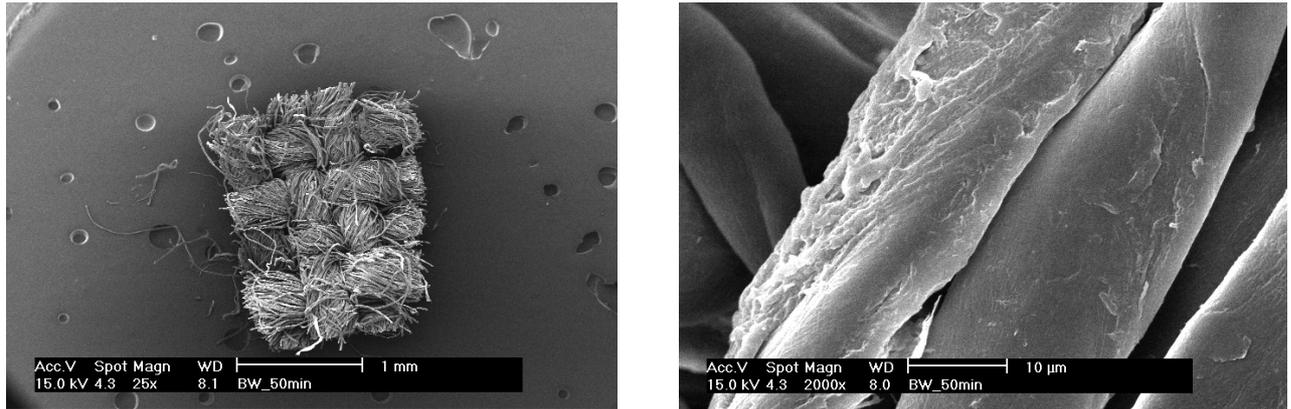


Abbildung 4.2-10 rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von Baumwolle (BW_50) (links) und der Faseroberfläche (rechts)

Zusammenfassend ist bei der Baumwolle erneut keine entscheidende Veränderung physikochemischer Parameter durch die Säurebehandlung nachweisbar.

4.2.3 MULL

Der in dieser Arbeit verwendete Mull besteht ähnlich wie die Baumwolle zu 100% aus Cellulose. Im Gegensatz zur Baumwolle ist die Fadendichte geringer, das heißt die Anzahl an Fäden pro cm² ist kleiner. Dadurch sind zwischen den einzelnen Fäden große Zwischenräume. Das Material wird vorwiegend zum Fixieren von Auflagen und nicht für den direkten Wundkontakt verwendet. Die Säurebehandlung des Mulls erfolgte mit 30%iger Salzsäure für eine Zeitdauer von 50 min (Mull_50) und 60 min (Mull_60).

Physikochemische Parameter

Röntgendiffraktometrie

In der Abbildung 4.2-11 ist das Röntgendiffraktogramm für Mull abgebildet, der 50 Minuten mit Säure behandelt wurde.

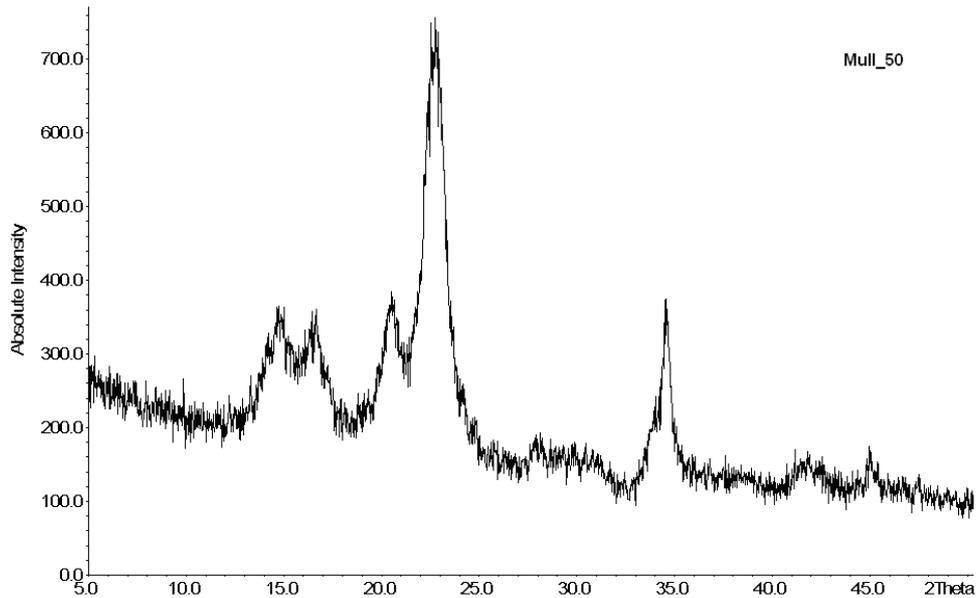


Abbildung 4.2-11 Röntgendiffraktogramm von Mull (Säurebehandlungsdauer 50 min)

Das Diffraktogramm ähnelt in der Verteilung der Peaks stark dem der Baumwolle. Ein Unterschied zwischen den beiden Chargen Mull_50 und Mull_60 ist allerdings nicht nachweisbar, so dass beispielhaft nur ein Diffraktogramm abgebildet wird. Durch den Vergleich der Kristallstrukturen der drei Materialien lässt sich nur eine grundlegende Veränderung bei der Viskose erkennen, die demnach durch den Herstellungsprozess bedingt ist. Die Regeneration der Viskosefasern führt im Vergleich zur Baumwolle und dementsprechend zum Mull zu einer etwas amorpheren Struktur (Rihm, 2003).

Zusammenfassung physikochemischer Parameter

Korrespondierend zur Baumwolle werden weitere wichtige Parameter in der Tabelle 4.2-2 zusammengefasst, um eine Bewertung des Materials vornehmen zu können.

Tabelle 4.2-2 Physikochemische Parameter des Mull-Materials

Methode	Material	Mull_50	Mull_60
Massezunahme (DVS; 90% RH)		10,2%	11,9%
Wasserbindungsvermögen (DSC)		15,1%	16,7%
Dispersive Oberflächenenergie (iGC)		35,8 J/m ²	38,8 J/m ²
Spezifische Oberfläche (iGC)		0,58 m ² /g	0,52 m ² /g

Die Massezunahme des Mulls bei der Dynamischen Wasserdampf Sorption liegt im Bereich der Baumwolle, wobei die Fähigkeit etwas ausgeprägter ist, das Wasser dauerhaft zu binden. In diesem Fall konnte für den Mull eine ungefähr 5% höhere Bindungskapazität bestimmt werden.

Die Ergebnisse der inversen Gaschromatographie liegen in ähnlichen Bereichen wie bei den anderen Materialien. Trotz der kleineren spezifischen Oberfläche kann der Mull allerdings mehr Wasser binden, was ein Zeichen für eine hydrophilere Beschaffenheit der Faser ist. Diese Eigenschaft ist jedoch nicht so stark ausgeprägt wie bei der Viskose.

Rasterelektronenmikroskopie

In der Abbildung 4.2-12 wird zunächst eine Übersicht des Materials dargestellt. Im Gegensatz zu den beiden obigen Materialien ist die Fadendichte sehr gering und zwischen den einzelnen Faserbündeln sind große Freiräume bzw. Abstände. Dies ist für eine Beladung des Gewebes mit einem Wirkstoff sehr nachteilig, da wenig Flächen für die Adsorption des Wirkstoffes zur Verfügung stehen.

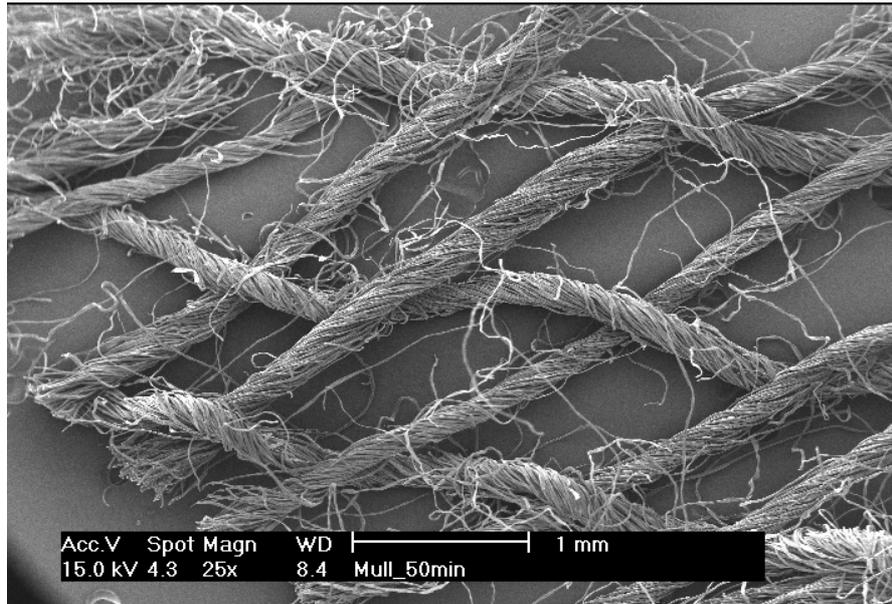


Abbildung 4.2-12 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von Mull (Mull_50)

Für die Betrachtung der Faseroberfläche und zum Nachweis einer möglichen Veränderung durch die Säureeinwirkung sind in der Abbildung 4.2-13 beide Materialien (Mull_50 und Mull_60) gegenübergestellt.

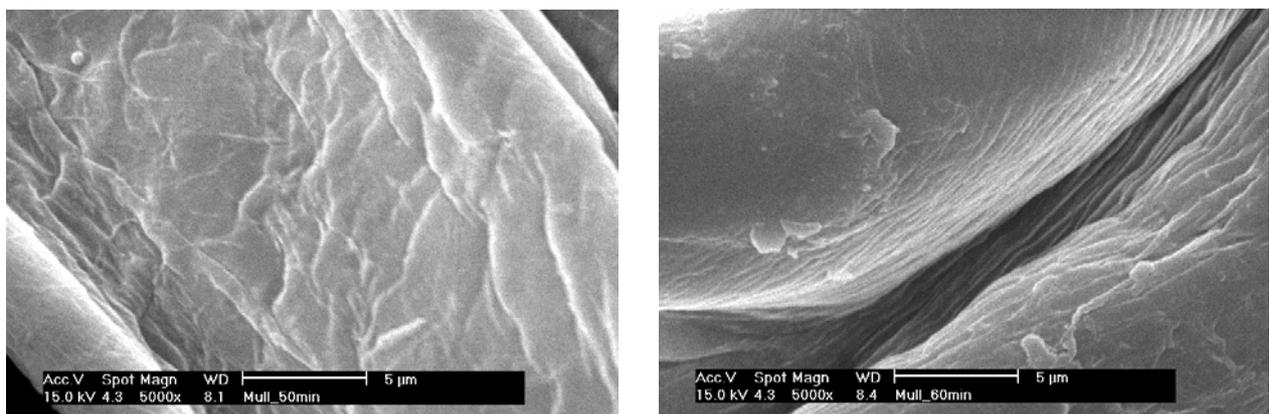


Abbildung 4.2-13 rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Faseroberfläche des Mulls Mull_50 (links) und Mull_60 (rechts)

Beim Vergleich beider Aufnahmen bestätigt sich die bei den anderen Trägern bereits getroffene Aussage, dass eine Behandlung der Materialien mit Säure kaum die Struktur der Fasern beeinflusst und dementsprechend die Eigenschaften gezielt verändert.

4.2.4 WEITERE MATERIALIEN

Im folgenden Abschnitt sollen einige weitere Materialien kurz aufgeführt werden, die im Rahmen dieser Studie bezüglich ihrer Eigenschaften und Eignung untersucht wurden.

4.2.4.1 Mikrobielle Cellulose

Eine Alternative zur pflanzlichen Cellulose stellt die mikrobielle Cellulose dar. Diese wird als ein Stoffwechselprodukt des gramnegativen aeroben Bakteriums *Acetobacter xylinum* gebildet. Da im Vergleich zur pflanzlichen Cellulose keine Vielzahl von Copolymeren wie z.B. Lignin, Hemicellulose oder Proteine enthalten sind, ist die mikrobielle Cellulose in ihrer Reinheit bedeutend höher (George, Ramana *et al.*, 2005). Für die Untersuchungen stand ein trockener Cellulosefilm zur Verfügung.

Physikochemische Parameter

Aufgrund des sehr dünnen Filmes konnte die Analytik der inversen Gaschromatographie nicht angewendet werden, da die Präparation der Säule zum einen nicht reproduzierbar war und zum anderen eine Zerstörung des Materials stattgefunden hätte. Zudem wäre ein reproduzierbarer Säulendruck nicht zu erreichen gewesen. Die Analytik der Röntgendiffraktometrie, der Wasserdampfaufnahme und die Rasterelektronenmikroskopie konnten jedoch problemlos durchgeführt werden.

Röntgendiffraktometrie

Die Abbildung 4.2-14 zeigt das Röntgendiffraktogramm der mikrobiellen Cellulose.

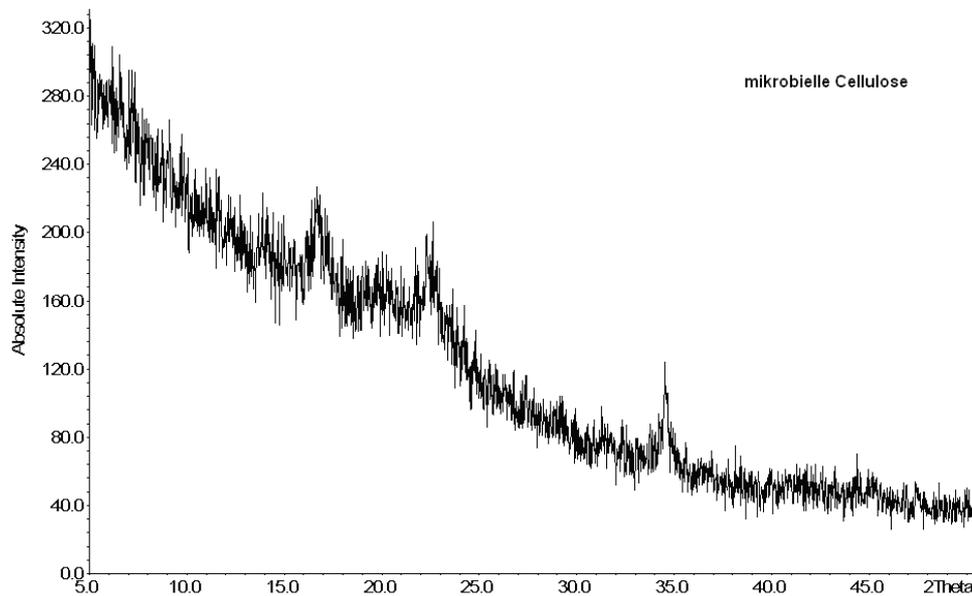


Abbildung 4.2-14 Röntgendiffraktogramm von mikrobieller Cellulose des Bakteriums *Acetobacter xylinum*

Im Gegensatz zu den obigen Cellulosen liegt hier ein großer amorpher Halo vor. Typische Peaks für Cellulose bei $23^\circ 2\theta$ und $35^\circ 2\theta$ sind in Ansätzen zu erkennen.

Wasserdampfsorptions- (DVS) und Wasserbindungsvermögen (DSC)

Die mikrobielle Cellulose zeichnet sich durch eine hohe Hydrophilie aus, was eine hohe Massezunahme bei einer Luftfeuchte von 90% zur Folge hat. So konnte mit 21,3% Massezuwachs der höchste Wert aller untersuchten Materialien ermittelt werden. Allerdings konnte dieser hohe Wert mit der Differential Scanning Calorimetry nicht bestätigt werden. Das Wasserbindungsvermögen lag bei 15,6%. Dies zeigt eine deutliche Diskrepanz, die bei den oben beschriebenen Materialien nicht auftritt. Hierdurch wird ein sehr

großer Nachteil dieser Cellulose aufgezeigt, denn trotz einer ausgeprägten Hydrophilie sind keine Strukturen vorhanden, die eine dauerhafte Adsorption von Wasser oder eventuell von einem Wirkstoff ermöglichen würde. Dieser Eindruck wird durch die Betrachtung der rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen in Abbildung 4.2-15 bestätigt.

Rasterelektronenmikroskopie

Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der mikrobiellen Cellulose (Abbildung 4.2-15) zeigt einen Film mit einer ebenen Oberfläche. Trotz der hohen Hydrophilie dieses Materials ist eine Adsorption des Wirkstoffes sehr schwierig, da im Gegensatz zu den Fasern die Oberfläche klein ist und kaum adsorptive Zentren anbietet. Aufgrund der Rissemempfindlichkeit konnten keine Adsorptionsmessungen mit der inversen Gaschromatographie durchgeführt werden, um diese Aussage zu bestätigen. Zudem ist eine dauerhafte Adsorption an dieser ebenen Oberfläche aufgrund fehlender Strukturen sehr schwer vorstellbar.

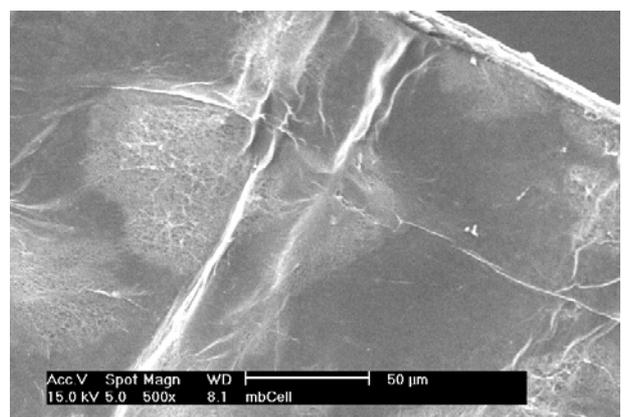
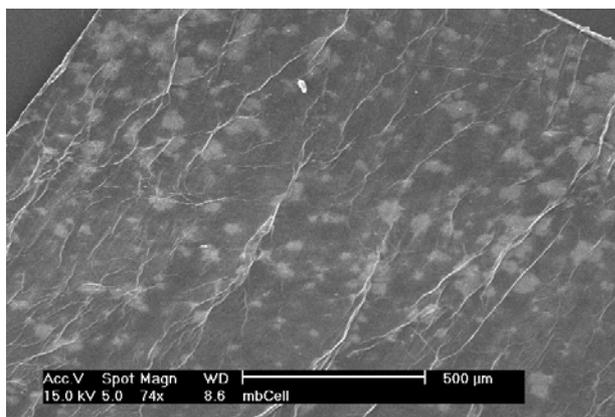


Abbildung 4.2-15 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von mikrobieller Cellulose des Bakteriums *Acetobacter xylinum*

4.2.4.2 Hohlfaser

Ein Ziel dieser Arbeit war die gesteuerte Freisetzung des Arzneistoffes aus der Wundauflage parallel zum cellulolytischen Abbau der Fasern. Hierfür hätte eine Einbettung des Wirkstoffes in die Faser stattfinden müssen, die nur durch ein Auflösen des Materials und anschließender Regeneration möglich gewesen wäre. Die Bedingungen zur Lösung des Materials sind sehr extrem und deshalb für keinen Wirkstoff ohne Stabilitätsprobleme geeignet.

Eine Alternative könnte eine regenerierte Cellulose-Hohlfaser sein, die wie folgt hergestellt wird: Zunächst wird die Cellulose gelöst und anschließend nach Formung durch eine Ringdüse wieder regeneriert. Der Innendurchmesser beträgt 210 μm und die Wanddicke *circa* 25 μm (Giese, 1999). Die Beladung der Faser ist durch Eintauchen in eine Wirkstofflösung möglich, allerdings ist dieses Material sehr leicht und äußerst empfindlich, so dass bei der Handhabung sehr sorgsam umgegangen werden muss. Aus diesem Grund konnten einige Analytiken wie die inverse Gaschromatographie und die Röntgendiffraktometrie nicht durchgeführt werden.

Physikochemische Parameter

Dynamische Wasserdampf Sorption

Die Bestimmung der Massezunahme bei einer relativen Luftfeuchte von 90% ergab einen Wert von 69,3%. Dieser extrem hohe Massezuwachs ist durch die sehr gute Kapillarität und Hydrophilie der Faser zu erklären. Erwähnenswert ist zudem die Desorption, da hier ein nahezu deckungsgleicher Verlauf zur Sorptionsisotherme stattfindet und dementsprechend die Hysterese fläche sehr klein ist. Somit ist davon auszugehen, dass die Oberfläche nicht sehr hygroskopisch ist.

Rasterelektronenmikroskopie

In den folgenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 4.2-16) soll ein Eindruck über die Beschaffenheit und Größe der Hohlfaser vermittelt werden.

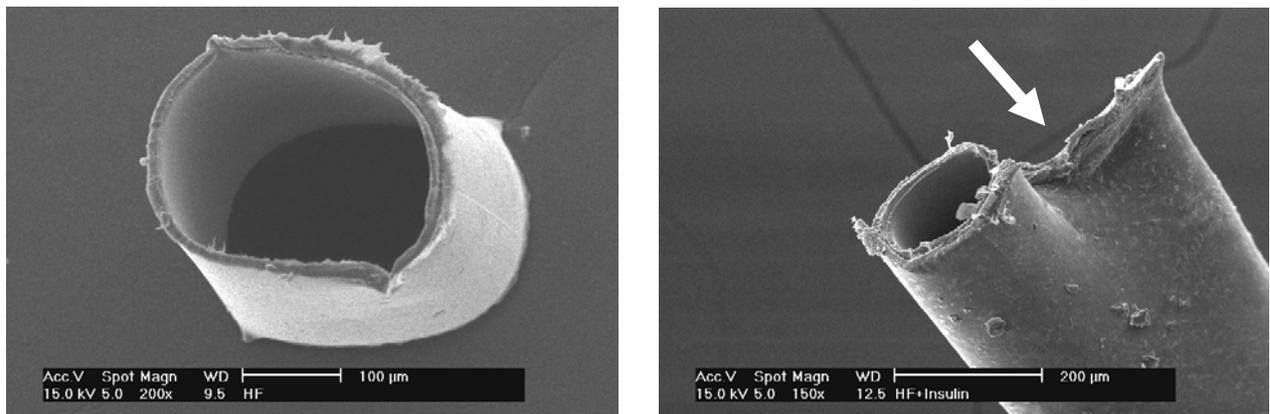


Abbildung 4.2-16 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme der Hohlfaser

Zusätzlich ist in der rechten Abbildung eine bearbeitete Faser zu erkennen. Es wurde das obere Ende mit einer Pinzette gegriffen, um eine Beladung vorzunehmen. Dadurch kam es zu einer irreversiblen Deformation der Faser (siehe weißer Pfeil), wobei die kapillare Eigenschaft der Faser minimiert wurde. Bei einem kompletten Knicken der Faser wurde kaum noch Lösung aufgenommen. Damit ist diese Faser zwar sehr hydrophil und aufgrund ihrer dünnen Wand sicherlich sehr schnell enzymatisch abbaubar, aber in ihrer Handhabung sehr empfindlich und für weitere Versuche nicht geeignet.

4.3 ZUSAMMENFASSUNG

Alle Materialien sind auf Cellulosebasis und können dementsprechend nur durch eine Adsorption mit einem Wirkstoff beladen werden. Eine Integration in die Faser ist nur durch das Auflösen der Grundlage zusammen mit dem Wirkstoff und anschließende Regeneration möglich.

Die in dieser Arbeit untersuchte Hohlfaser (4.2.4.2) ist sehr knickempfindlich und kann nur äußerst schwer mit einem Wirkstoff beladen werden. Zudem ist die Aufnahmekapazität sehr gering. Ähnlich verhält es sich auch bei der mikrobiellen Cellulose (4.2.4.1), die strukturell wenig Möglichkeiten zur Adsorption bietet und damit ungeeignet für weitere Studien ist. Beim Material Mull sind zu große Zwischenräume zwischen den einzelnen Faserbündeln, so dass auch hier die Beladung die limitierende Komponente darstellt. Aufgrund dieser Ergebnisse wurden diese Materialien für weitere Untersuchungen wie enzymatischen Abbau und Freisetzung nicht mehr verwendet.

Die Materialien Viskose und Baumwolle konnten neben der Möglichkeit einen Wirkstoff zu adsorbieren, auch sehr gute Werte im Rahmen des Wasserbindungsvermögens aufweisen. Dieses ist zum einen für die Beladung wichtig, zum anderen kann der gleichzeitig stattfindende enzymatische Abbau dadurch positiv beeinflusst werden. Zudem ist auch die Aufnahme von verflüssigtem Wundsekret hoch, was für den Abtransport aus der Wunde sehr wichtig ist, um die anschließende Granulation zu ermöglichen. Besonders erwähnenswert ist die hohe Hydrophilie der Viskose bei einer sehr kleinen spezifischen Oberfläche.

Allerdings konnten bei der Analytik der physikochemischen Eigenschaften keine Unterschiede zwischen den verschiedenen Zeiten der Säurebehandlung festgestellt werden. Bei keinem Parameter konnte eine Veränderung ermittelt werden, die durch die Säure hervorgerufen worden ist. Dies kann daran liegen, dass die Materialien bereits zu lange mit der Säure in Kontakt waren und sich damit die Eigenschaften einem bestimmten Grenzwert angenähert hatten. Eine differenzierte Untersuchung mit geringeren Zeitintervallen war jedoch nicht möglich, da durch den Verbundpartner nur behandelte Materialien zur Verfügung gestellt wurden. Die Kontrolle des durchschnittlichen Polymerisationsgrads war nicht möglich. Dieser soll nach Angaben des Verbundpartners durch die Säure kleiner geworden sein, was für einen folgenden enzymatischen Abbau sehr wichtig sein kann. Um einen genaueren

Überblick über mögliche Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften zu erlangen, wird im Kapitel 5.1 selbst eine differenziertere Säurebehandlung des unbehandelten Materials Baumwolle durchgeführt.

5 ABBAU DER MATERIALIEN

5.1 EINFLUSS EINER SÄUREBEHANDLUNG AUF DIE FASER

5.1.1 EINLEITUNG

Im vorherigen Kapitel wurden Materialien näher charakterisiert, die unterschiedlicher Säureeinwirkung ausgesetzt waren. Es konnten Unterschiede zwischen den Eigenschaften festgestellt werden, die allerdings nur von sehr geringem Ausmaß waren. Ein Vergleich zu dem unbehandelten Material war aufgrund des projektbedingten Lieferumfangs nicht möglich. Zudem wurde das Material stets für eine lange Dauer mit Säure behandelt, so dass eine detaillierte Differenzierung der entstandenen Charakteristika sehr schwierig war. Um einen genaueren Einblick in die Veränderungen der Fasereigenschaften zu erlangen, wurde in diesem Abschnitt eine differenzierte Säurebehandlung durchgeführt. Als Grundlage diente eine statistische Versuchsanalyse mit einem $2^{(2-0)}$ -Plan. Hierbei handelt es sich um einen vollen Standardplan für zweistufige Faktoren. Als unabhängige Variablen wurden die Säurekonzentration und die Dauer der Säurebehandlung definiert. Zusätzlich wurde ein so genannter Nullpunkt (Zentralpunkt) bestimmt, so dass die Anzahl der zu untersuchenden Fälle fünf betrug. Mit Hilfe der statistischen Versuchsauswertung war es möglich, Ergebnisse im Hinblick auf ihre Signifikanz und ihre Trends genauer auszuwerten.

Als Säure wurde konzentrierte Salzsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland) verwendet. Diese wurde, je nach Vorgabe des Versuchsplans, mit bidestilliertem Wasser auf die entsprechende Konzentration eingestellt. Die Grenzen der eingesetzten Säurekonzentrationen betragen 20% und 30%. Die Zeitdauer betrug im Minimum 1 min und maximal 60 min. Ein detaillierter Überblick über die Vorgaben des Konzentrationsbereiches, der Zeitintervalle und der entsprechenden Chargenbezeichnungen ist in Tabelle 5.1-1 gegeben. Das zu behandelnde Material ist einfache Baumwolle (Paul Hartmann AG,

Heidenheim, Deutschland). Die Säurebehandlung erfolgte isotherm bei einer Temperatur von 30°C. Nach der Behandlung des Gewebes bei den vorgegebenen Bedingungen erfolgte ein Waschschrift. Hierbei wurde das Material so lange mit bidestilliertem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser einen neutralen pH-Wert hatte. Für einen Vergleich der Resultate der säurebehandelten Gewebe mit dem Ausgangsmaterial wurde eine Charge bei 30°C für 30 min in bidestilliertes Wasser gegeben und als BW_normal bezeichnet. Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse der Charge BW_normal nicht berücksichtigt, da keiner der vorgegebenen unabhängigen Faktoren, Säurekonzentration und Säurebehandlungsdauer, diese Ergebnisse beeinflusst.

Tabelle 5.1-1 Systematik des säurebehandelten Materials auf der Grundlage eines 2⁽²⁻⁰⁾-Versuchsplanes

Chargenbezeichnung	Zeitdauer der Säure- behandlung [min]	Säurekonzentration [%]
BW_1_20	1	20
BW_1_30	1	30
BW_305_25	30,5	25
BW_60_20	60	20
BW_60_30	60	30

Die folgenden Ausführungen sollen einen Überblick über die Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften der Faser nach einer Säurebehandlung geben. Die dabei verwendeten Bezeichnungen der Chargen beziehen sich ausschließlich auf die obige Tabelle.

5.1.2 PHYSIKOCHEMISCHE EIGENSCHAFTEN

Röntgendiffraktometrie

Die destruktive Wirkung von Mineralsäuren auf die Struktur einer Cellulose wird bei der Herstellung von mikrokristalliner Cellulose angewendet. Hierbei kommt es zu einer Steigerung der Kristallinität, da die Säure bevorzugt amorphe Bereiche angreifen kann und diese zerstört, wodurch die Kristallinität im Verhältnis zur Amorphie ansteigt. Die behandelte Baumwolle hat ebenfalls eine Cellulosestruktur, und es sind ähnliche Veränderungen durch die Säureeinwirkungen zu erwarten. Durch eine Aufnahme der Röntgendiffraktogramme sind diese möglichen Strukturveränderungen detektierbar. In der Abbildung 5.1-1 sind die Diffraktogramme für die Proben BW_1_30 und BW_60_20 im Vergleich zum Ausgangsmaterial BW_normal dargestellt.

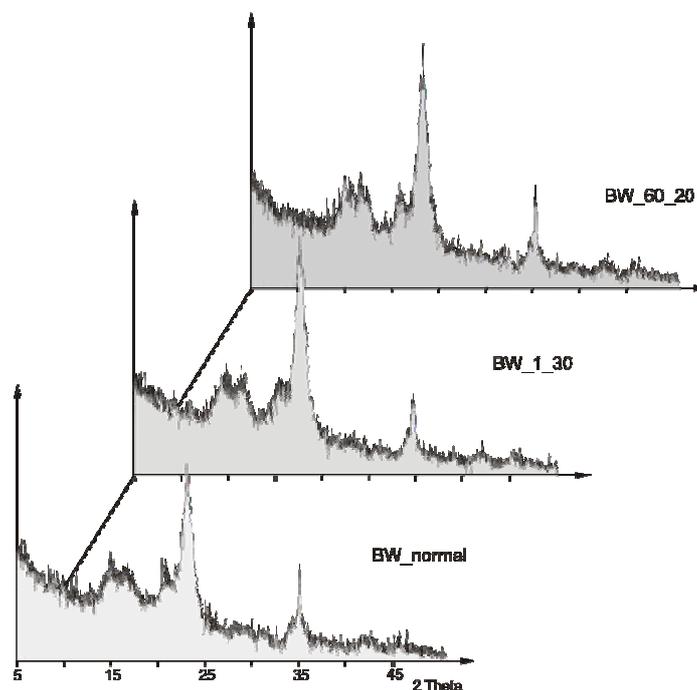


Abbildung 5.1-1 Röntgendiffraktogramme vom Ausgangsmaterial und zweier mit Säure unterschiedlich behandelter BW-Chargen

Beim Vergleich der Diffraktogramme zeigen sich zunächst keine gravierenden Veränderungen der Kristallstruktur zwischen den behandelten Materialien und dem Ausgangsprodukt. Bei einem Winkel von etwa $22^\circ 2\theta$ ist allerdings eine geringfügige Erhöhung der Peakmaxima bei den säurebehandelten Materialien feststellbar. Ob es aber zu einer Erhöhung der gesamten Kristallinität kommt, ist jedoch nicht erkennbar. Weiterhin gab es zwischen den fünf Proben des Versuchsplans keine erwähnenswerten Unterschiede, so dass in Abbildung 5.1-1 ein repräsentativer Überblick über die Kristallinitätsveränderung durch die Säurebehandlung gegeben ist. Interessanterweise scheint eine einminütige Behandlung eine ähnlich marginale Veränderung hervorzurufen, wie die Einwirkungszeit von 60 Minuten.

Dynamische Wasserdampf Sorption

Mit Hilfe der Dynamischen Wasserdampf Sorption ist es möglich, die Sorptionsisotherme eines Stoffes aufzuzeichnen. Neben dem Verlauf des Massezuwachses kann zusätzlich die maximal aufgenommene Wasserdampfmenge eines Stoffes bei einer bestimmten Luftfeuchte ermittelt werden. Da diese beiden Parameter unmittelbar mit der Beschaffenheit der Oberfläche (Hydrophilie, Oberfläche und Homogenität) korrelieren und die Dokumentation der Masseveränderung mit Hilfe einer Mikrowaage erfolgt, steht somit eine äußerst sensible Methode zur Verfügung, um bereits sehr geringe Unterschiede zwischen verschiedenen Materialien aufzuzeigen. Bei dem Vergleich der säurebehandelten Materialien sind diese Unterschiede durchaus detektierbar, jedoch sind keine Regelmäßigkeiten zu erkennen (Abbildung 5.1-2). Die statistische Auswertung der Ergebnisse der Säureeinwirkung ergab keinerlei signifikante Einflüsse.

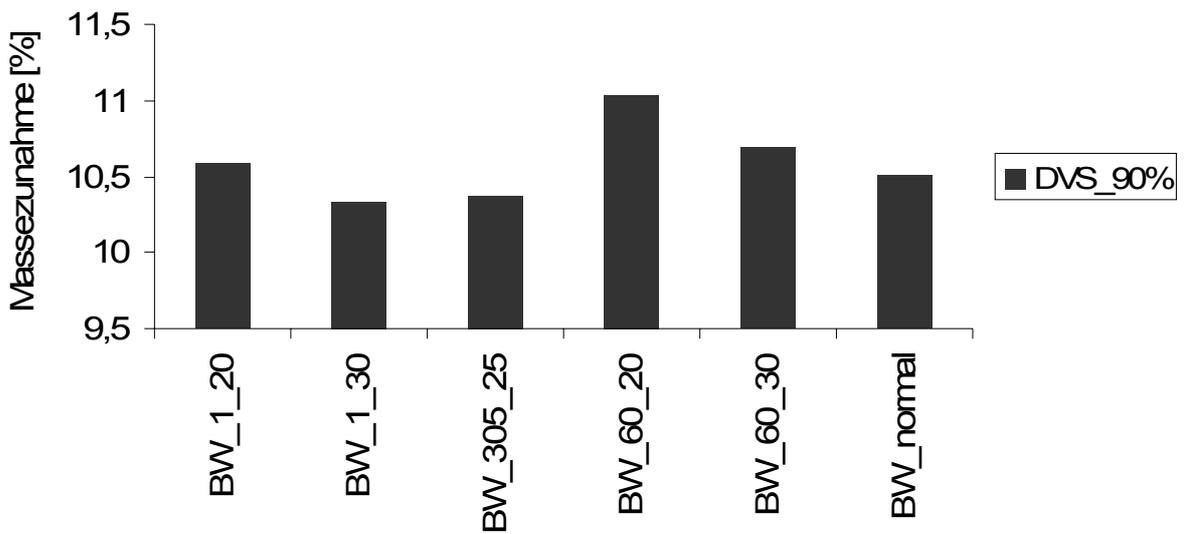


Abbildung 5.1-2 Darstellung der maximalen Wasserdampfaufnahme bei einer Luftfeuchte von 90% in der DVS der verschiedenen mit Säure behandelten Materialien

Die einzelnen Resultate des Massezuwachses liegen sowohl unter als auch über denen des Ausgangsmaterials. Dennoch sollen die Ergebnisse wie folgt differenziert werden. Durch eine kurze Säureeinwirkung (1 min) liegen die Massen unter denen des unbehandelten Materials. Möglicherweise werden durch die Säurebehandlung kleine Fragmente abgetragen, die für eine Sorption folglich nicht mehr zur Verfügung stehen. Die Erhöhung der Zeitdauer auf 60 min führt dann unabhängig von der Konzentration der eingesetzten Säure zu einer Erhöhung des aufgenommenen Wasserdampfes. Hier kommt es durch Destruktion der Fasern zur Schaffung weiterer Oberflächen, wodurch die Steigerung der Wasserdampfaufnahmefähigkeit zu erklären ist. Erwähnenswert ist allerdings der höhere Massezuwachs bei dem Material mit der geringeren Säurekonzentration (BW_60_20).

Wasserbindungsvermögen

Wie in Kapitel 4.2.1 beschrieben, ist es möglich, mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry den Anteil an Wasser zu bestimmen, der von der

Faseroberfläche dauerhaft gebunden wird. Im Gegensatz zur Dynamischen Wasserdampf Sorption wird das Material direkt mit Wasser überschichtet und kann sich vollständig sättigen. Somit lassen sich Resultate des vorherigen Abschnittes verifizieren, und es ist möglich, genauere Aussagen über neu geschaffene Oberflächen zu treffen. Ferner sind diese Ergebnisse insofern von Bedeutung als das sie zusätzlich mit der Stabilität der adsorbierten gefriergetrockneten Madensekretionslösung (Kapitel 6.4.4) korrelieren können. Die Ergebnisse des Wasserbindungsvermögens sind in Abbildung 5.1-3 zusammengefasst.

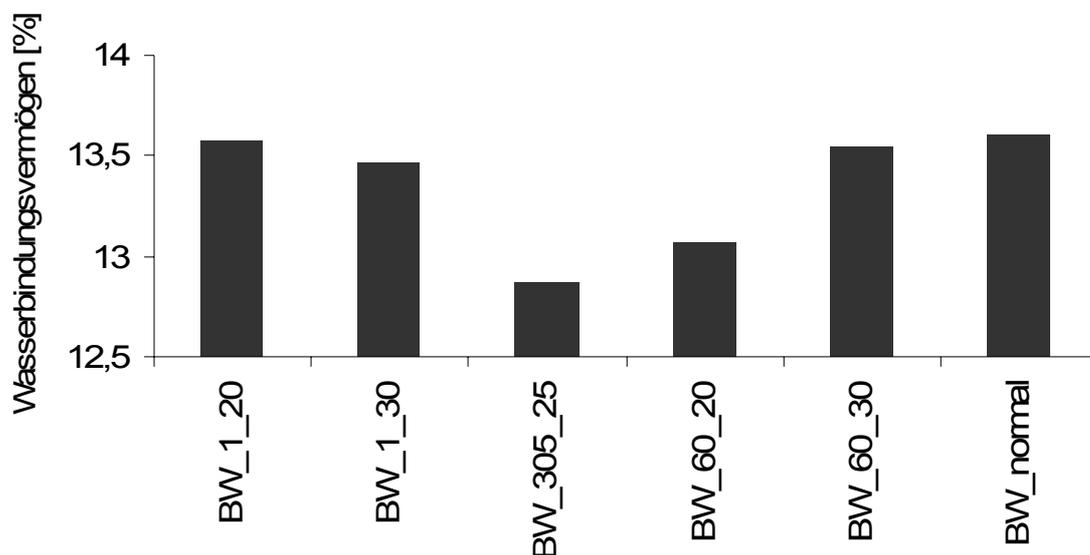


Abbildung 5.1-3 Darstellung des Wasserbindungsvermögens der verschieden mit Säure behandelten Materialien

Ähnlich wie bei den Werten der Dynamischen Wasserdampf Sorption ist weder eine Signifikanz noch eine Tendenz bei den Ergebnissen zu erkennen. Allerdings sind die Werte einheitlich kleiner als die des Ausgangsmaterials und erneut stellt die Charge BW_305_25 den Minimalwert dieser Messreihe dar.

Inverse Gaschromatographie

Mit Hilfe der inversen Gaschromatographie wurden weitere Parameter untersucht, die Aufschluss über mögliche Oberflächenveränderungen geben können.

Oberflächenenergie

Die Auswertung der Ergebnisse der dispersiven Oberflächenenergien der einzelnen Chargen zeigt Abbildung 5.1-4.

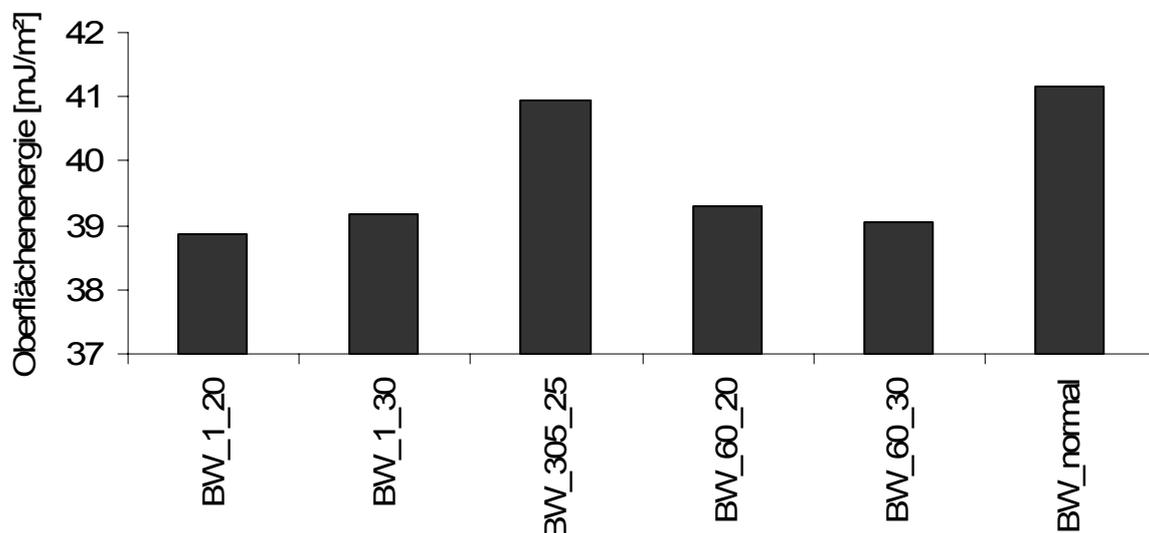


Abbildung 5.1-4 Darstellung der Oberflächenenergien der verschieden mit Säure behandelten Materialien

Die gemessenen Oberflächenenergien liegen mit ermittelten Werten von 38,9 mJ/m² bis 41,2 mJ/m² in der typischen Dimension für Baumwollfasern (Belgacem, Blayo *et al.*, 1996). Im Vergleich zum Ausgangsmaterial waren alle Werte kleiner, wobei auch wiederum keine Tendenz festzustellen ist. Es ist sehr schwierig, zwischen den verschiedenen Säurekonzentrationen und Säureeinwirkdauern zu unterscheiden, da die resultierenden Oberflächenenergien keine Korrelationen in Bezug auf diese aufweisen. Im

folgenden dreidimensionalen Flächenplot (Abbildung 5.1-5) soll die beschriebene Inhomogenität der Werte visualisiert werden.

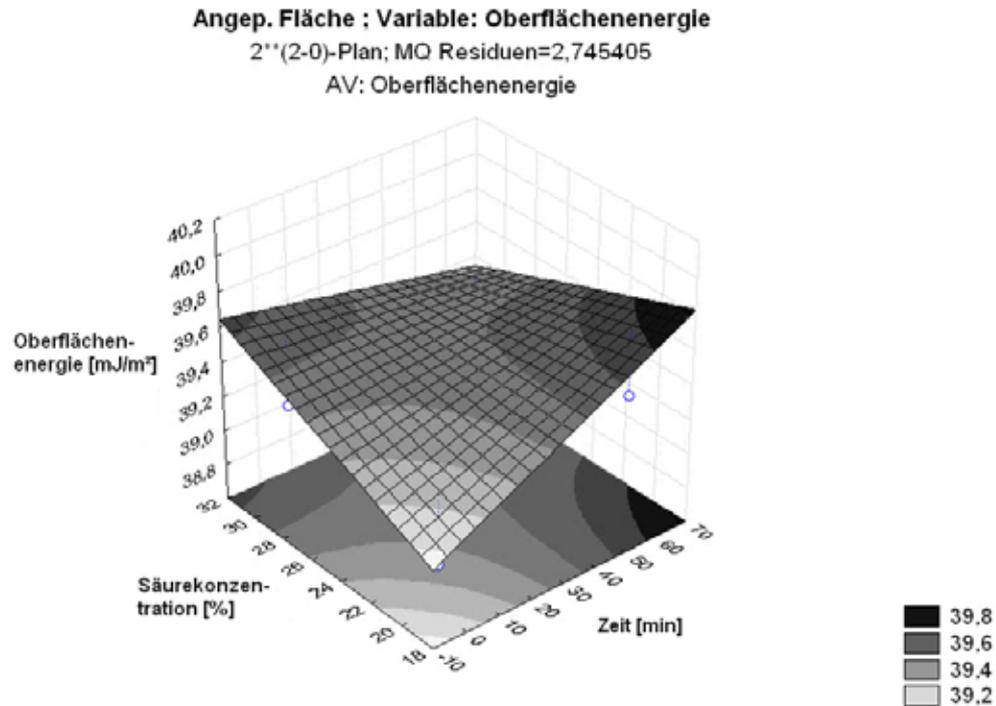


Abbildung 5.1-5 Einfluss der Säurekonzentration und Einwirkzeit auf die dispersive Oberflächenenergie

Der Flächenplot des Zusammenhangs zwischen den unabhängigen Variablen und der resultierenden Oberflächenenergie zeigt die Schwierigkeit der Linearisierung der Ergebnisse einer Säurebehandlung und der Veränderung der Oberflächenenergie. Zwar ist durch die Einwirkung von Säure eine Abnahme der Energie bekannt (Belgacem und Gandini, 1999), aber eine derart starke Streuung der Extremwerte (Eckpunkte des Flächenplots) ist doch sehr ungewöhnlich.

Spezifische Oberfläche

Die Ermittlung der spezifischen Oberflächen der einzelnen Chargen kann Aussagen zur Beladungskapazität mit einem Wirkstoff zulassen. Die einzelnen Oberflächen sind in Abbildung 5.1-6 zusammengefasst.

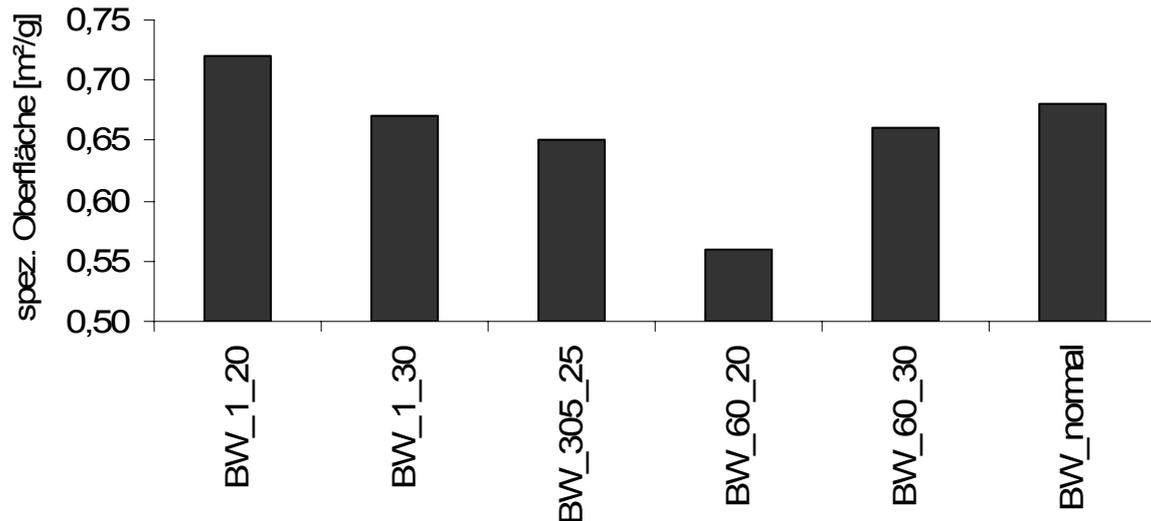


Abbildung 5.1-6 Darstellung der spezifischen Oberfläche [m²/g] ermittelt aus einem Isothermenplot des Probenmoleküls n-Hexan

Erneut ist kein signifikanter Einfluss der Säurekomponente auf die Veränderung der spezifischen Oberfläche [m²/g] zu erkennen. Die Veränderungen zum Ausgangsmaterial sind als eher zufällig einzuschätzen.

Energetische Oberflächenheterogenität

Durch die Bestimmung der energetischen Oberflächenheterogenitäten sind zusätzliche Aussagen zu Eigenschaften auf molekularer Ebene möglich. Die Messungen wurden mit einem polaren (Ethanol) und einem unpolaren (n-Hexan) Probenmolekül durchgeführt.

Obwohl bereits eine große Anzahl an Übersichtsartikeln zur Thematik der inversen Gaschromatographie existiert (Belgacem und Gandini, 1999; Voelkel,

2004), ist die Interpretation von Ergebnissen häufig schwierig. Für eine detaillierte Beschreibung dieser Methode wurden einige Messungen mit Wasser als Probenmolekül durchgeführt und diese mit Hilfe anderer Analytiken genauer diskutiert. Wie bereits im Kapitel Methoden beschrieben, kann man aus der Darstellung des Heterogenitätsplots die Fläche unter der Kurve ermitteln, die ein Maß für die Bindungskapazität zu einem Probenmolekül darstellt. Mit Hilfe des Maximums des Heterogenitätsplots kann eine Aussage zur Verteilung energetischer Zentren auf der Oberfläche getroffen werden. Zusätzlich ist es ein Maß für die Bindungsstärke für ein Probenmolekül. Diese Aussage soll mit Hilfe der folgenden Regressionsplots genauer veranschaulicht werden. Hierfür wurde die Messung der Oberflächenheterogenität der mit Säure behandelten Chargen aus Kapitel 5.1 mit dem Probenmolekül Wasser durchgeführt und die Oberflächenheterogenität bestimmt. Mit einem steigenden Peakmaximum für das Adsorptionspotential müsste auch die Bindungsstärke zum Wasser steigen. Dies spiegelt sich in einer erhöhten Wasserdampfaufnahme bei 90% relativer Luftfeuchte in der DVS wider, da auch hier das Wasser in einer Gasphase über die Oberfläche geleitet wird. Dieser Trend kann anhand des folgenden Regressionsplots in Abbildung 5.1-7 sehr gut dargestellt werden, zumal alle Werte innerhalb des Vertrauensbereichs von 95% (gestrichelte Linie) liegen.

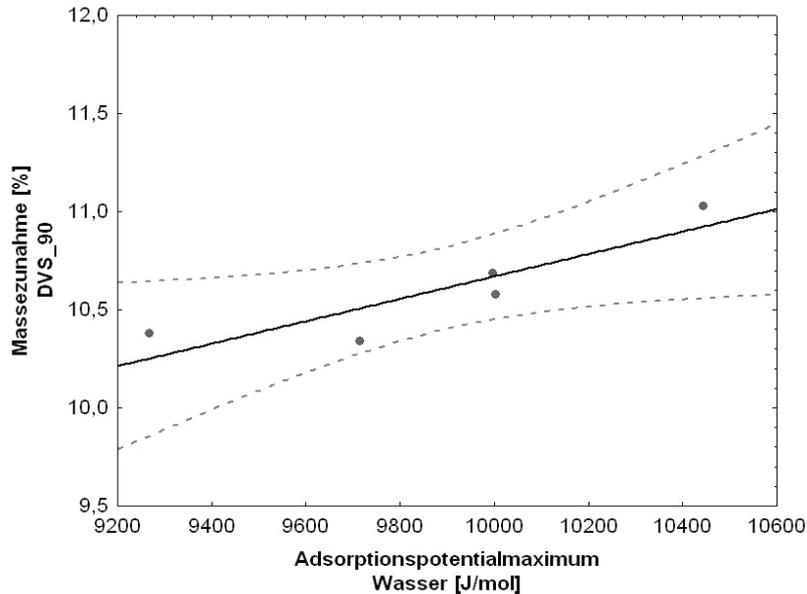


Abbildung 5.1-7 Regressionsplot Massezunahme in der Dynamischen Wasserdampfsorption bei 90% RH gegen das Adsorptionspotentialmaximum des Probenmoleküls Wasser

Die resultierende Fläche unter der Kurve des Heterogenitätsplots kann wie folgt interpretiert werden. Durch diesen Wert soll die Häufigkeit der energetischen Zentren quantifiziert und damit eine Aussage über die Bindungskapazität der Oberfläche eines Stoffes zu einem Probenmolekül ermöglicht werden. Demnach müsste es eine Korrelation zwischen den Flächen unter der Kurve der Heterogenität von Wasser und dem Wasserbindungsvermögen der einzelnen Fasern geben, das mit der Methode der Differential Scanning Calorimetry bestimmt wurde. Mit steigender Fläche des Heterogenitätsplots müsste demnach die gebundene Wassermenge zunehmen. Allerdings basiert das Prinzip der inversen Gaschromatographie bei einer Pulsmethode (3.4.2) auf der Bestimmung der Desorption und nicht der Adsorption. Bei einem sehr hydrophilen Probenmolekül wie Wasser kann es sehr leicht zu einer Chemisorption an der Oberfläche kommen. Dieser chemisorbierte Teil wird folglich nicht mehr desorbiert und die detektierbare Menge nimmt ab. Damit wird die Fläche unter dem resultierenden

Heterogenitätsplot kleiner, je ausgeprägter die Chemisorption an der Oberfläche ist. Bei der Bestimmung der Oberflächenheterogenität der Faser mit Wasser kommt es zur beschriebenen Chemisorption des Wassers an der Faser. Je stärker eine Faser das Wasser durch Chemisorption bindet, desto kleiner ist zum einen die korrespondierende Heterogenitätsplots-Fläche und das Wasserbindungsvermögen steigt an. Diese Beziehung wird in der Abbildung 5.1-8 dargestellt. Die Faser mit der kleinsten Fläche besitzt das höchste Wasserbindungsvermögen und folglich resultiert für die geringste Chemisorption (größte Fläche) auch der kleinste Wert für das Wasserbindungsvermögen.

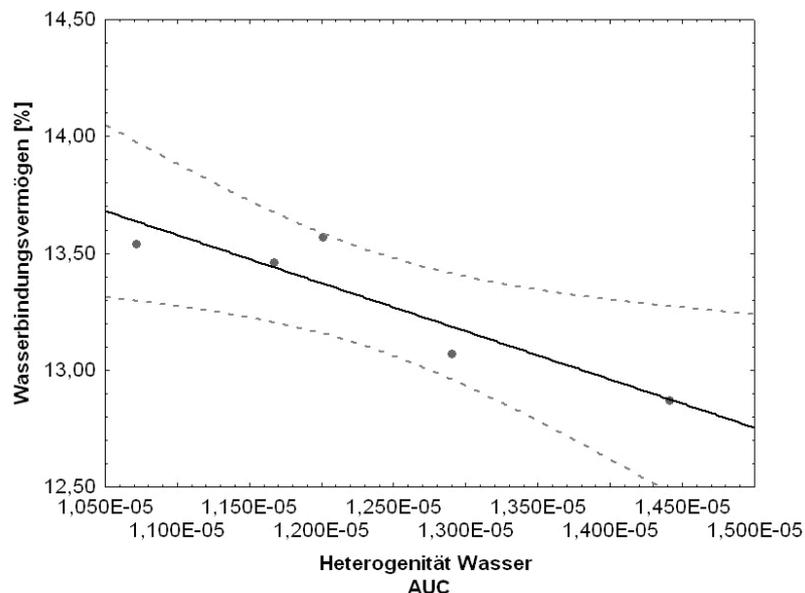


Abbildung 5.1-8 Regressionsplot Wasserbindungsvermögen (DSC) gegen die Fläche des Heterogenitätsplots von Wasser

Das Ergebnis ist jedoch sehr vorsichtig zu betrachten, da die gebundene Wassermenge nur unter Verwendung des etwas ungenaueren Wärmeleitfähigkeitsdetektors bestimmt werden kann und die Wechselwirkungen zwischen Faser und Wasser sehr stark sind. Dennoch zeigt es die extreme Sensibilität dieser Methode. Somit konnte erstmals eine

Korrelation zwischen der chemisorptiven Eigenschaft einer Faser und dem korrespondierenden Wasserbindungsvermögen gezeigt werden. Die eigentliche Adsorptionseigenschaft der Faser kann daher nicht mit einem derart hydrophilen Probenmolekül bestimmt werden. Idealerweise sollte die Interaktion mit der Oberfläche nur aufgrund dispersiver Kräfte erfolgen, um eine vollständige Desorption des Probenmoleküls zu erreichen. Diese Anforderung kann durch die Verwendung von n-Hexan erfüllt werden. Mit einer steigenden Fläche der Heterogenität für dieses Probenmolekül steigt auch das adsorptive Potential der Faseroberfläche. Demnach müsste hier eine positive Steigung zwischen den Flächen und des Wasserbindungsvermögens vorliegen, da hier nun die reine Physisorption berücksichtigt wird. Auch diese Tendenz lässt sich durch den folgenden Regressionsplot bestätigen (Abbildung 5.1-9). Je größer die Fläche der Heterogenität von n-Hexan ist, desto mehr kann die Faser adsorptiv binden.

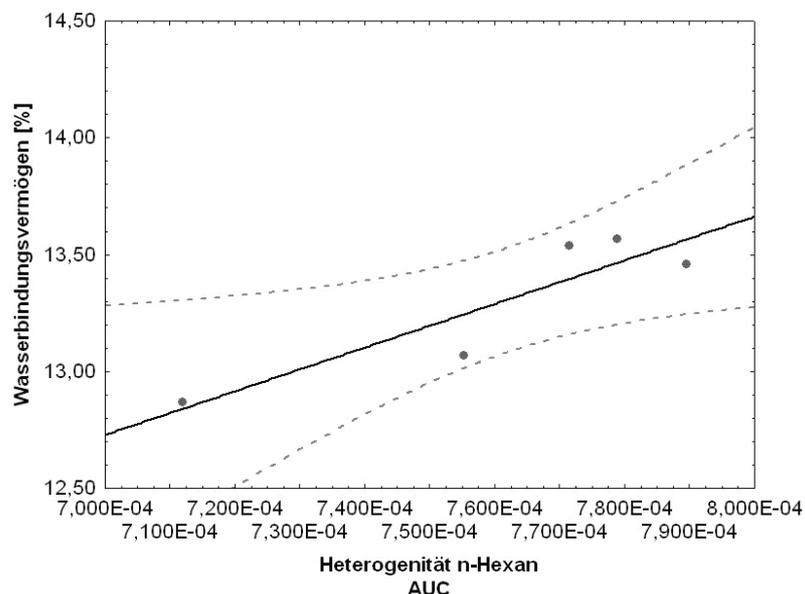


Abbildung 5.1-9 Regressionsplot Wasserbindungsvermögen (DSC) gegen die Fläche des Heterogenitätsplots von n-Hexan

Bei der Interpretation der Daten zur Heterogenität gilt es also zu beachten, dass die Fläche unter der Kurve sicherlich ein Maß für die Bindungskapazität eines Stoffes ist. Allerdings sind keine Differenzierungen zwischen verschiedenen Polaritäten möglich, da dazu die reine Desorption gemessen werden müsste. Je hydrophiler allerdings das Probenmolekül ist, umso mehr kommt es zur Chemisorption, so dass sich die Bindungskapazität nicht mehr ermitteln lässt.

Die Aussagen zur Lage des Peakmaximums sind allerdings sehr zuverlässig und gut reproduzierbar. Deshalb soll in den folgenden Betrachtungen zusätzlich ein Überblick über die Veränderungen bei den Resultaten der Peakmaxima gegeben werden, da somit auch Polaritätsunterschiede einen entscheidenden Einfluss haben.

Probenmolekül n-Hexan

Die Auswertung der Flächen (Tabelle 5.1-2) der einzelnen Chargen lässt keine quantitativen Aussagen zu. Damit ist es nicht möglich, die Adsorptionstendenzen der Fasern gezielt durch Säureeinwirkung zu steuern.

Tabelle 5.1-2 Heterogenitätsdaten des Probenmoleküls n-Hexan

Charge	BW_1_20	BW_1_30	BW_305_25	BW_60_20	BW_60_30
AUC	$7,8 \cdot 10^{-4}$	$7,9 \cdot 10^{-4}$	$7,1 \cdot 10^{-4}$	$7,6 \cdot 10^{-4}$	$7,7 \cdot 10^{-4}$
Adsorptionspotential- peakmaximum [J/mol]	5644,2	5720,6	5791,0	5848,6	5905,7

Die Auswertung der Peakmaxima der Adsorptionspotentiale dieser Versuchsreihe ermöglicht eine Vorhersage über die Bindungsstärke zu einem unpolaren Probenmolekül, wobei die Säurebehandlung diesen Parameter signifikant beeinflusst (Abbildung 5.1-10).

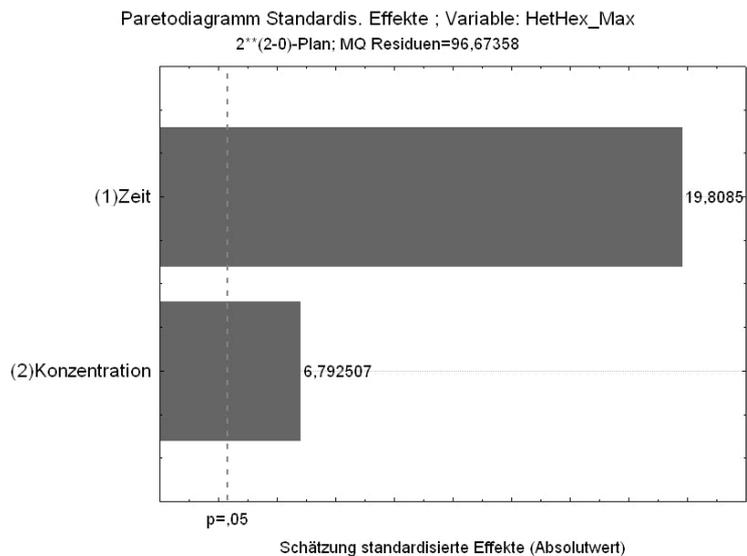
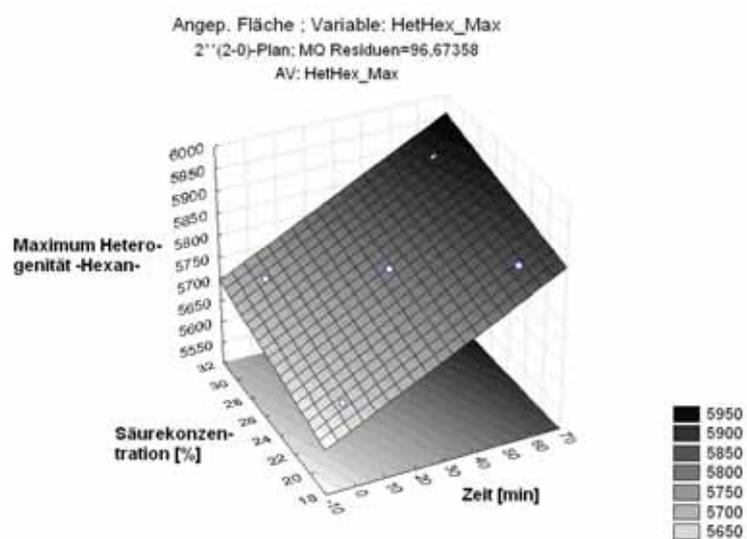


Abbildung 5.1-10 Adsorptionspotentialmaxima für das Probenmolekül n-Hexan in Abhängigkeit der Säurebehandlung (oben) mit korrespondierendem Paretodiagramm (unten) zur Prüfung auf Signifikanz

Je stärker die Säureeinwirkung sowohl im Hinblick auf die Konzentration der Säure als auch auf die Dauer ist, desto höher wird das Adsorptionspotentialmaximum. Das heißt, es kommt zu einer Rechtsverschiebung im Heterogenitätsplot, je länger die Dauer der Säureeinwirkung wird. Dementsprechend sinkt das Adsorptionspotentialmaximum bei der

Verwendung einer geringeren Säurekonzentration und minimaler Zeitdauer. Dieses Ergebnis lässt sich damit erklären, dass durch die Säureeinwirkung energetisch niedrige Bindungszentren einer unpolaren Substanz zerstört werden und damit nicht mehr für eine Anlagerung zur Verfügung stehen. Ein weiterer Ansatz kann auch in der Freilegung dieser energetisch hoch gelegenen Bindungszentren durch die Säure liegen.

Probenmolekül Ethanol

Zusätzlich zur Betrachtung der Bindungseigenschaften zu einem unpolaren Probenmolekül wurden gleiche Untersuchungen mit dem polaren Probenmolekül Ethanol durchgeführt. Die Werte sind in der folgenden Tabelle (Tabelle 5.1-3) abgebildet.

Tabelle 5.1-3 Heterogenitätsdaten des Probenmoleküls Ethanol

Charge	BW_1_20	BW_1_30	BW_305_25	BW_60_20	BW_60_30
AUC	$6,4 \cdot 10^{-4}$	$5,6 \cdot 10^{-4}$	$4,5 \cdot 10^{-4}$	$5,9 \cdot 10^{-4}$	$5,4 \cdot 10^{-4}$
Adsorptionspotential- peakmaximum [J/mol]	9000,0	9457,5	9501,0	9436,5	10114,3

Beim polaren Probenmolekül sind die Bindungsverhältnisse ähnlich zu denen des unpolaren Heterogenitätsplots. Die Einwirkung der Säure verändert das Maß der Bindungskapazität, das heißt die Fläche unter der Kurve, nicht. Zwar scheint die höchste Bindungskapazität zum Probenmolekül Ethanol bei der geringsten Säureeinwirkung stattzufinden, allerdings liegt der Minimalwert nicht bei der extremsten Säurebehandlung, sondern beim Zentralpunkt dieser statistischen Versuchsanalyse. Die Auswertung der Peakmaxima ist in Abbildung 5.1-11 zusammengefasst.

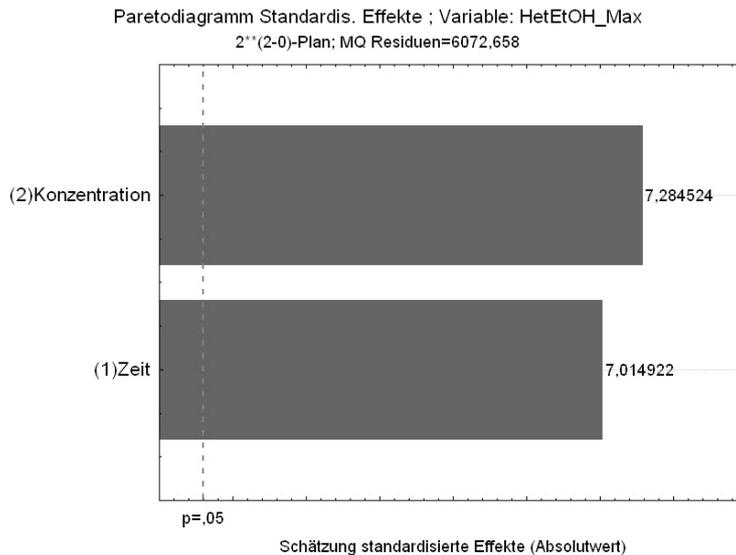
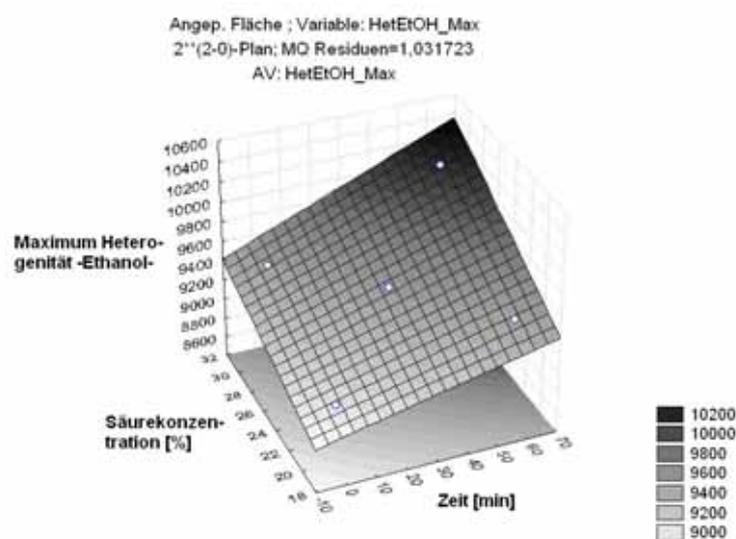


Abbildung 5.1-11 Adsorptionspotentialmaxima für das Probenmolekül Ethanol in Abhängigkeit der Säurebehandlung (oben) mit korrespondierendem Paretdiagramm (unten) zur Prüfung auf Signifikanz

Im Gegensatz zur Heterogenitätsplotfläche konnte die Säurebehandlung einen entscheidenden Einfluss auf die Verschiebung und Lage der Maxima ausüben. Dementsprechend ist davon auszugehen, dass eine extreme Säurebehandlung die Bindungsstärke zu Molekülen verschiedener Polarität erhöht, da energetisch niedrigere Bindungszentren nicht mehr zur Verfügung

stehen. Die Veränderung dieser Bindungseigenschaften kann für die Freisetzung eines Wirkstoffes sehr wichtig sein, da die Bindungsstärke natürlich auch die Desorption von der Faser beeinflussen kann.

Spezifische Interaktionen

Einen weiteren Parameter zur Bestimmung der Oberflächeneigenschaften stellt die spezifische Interaktion mit polaren Probenmolekülen dar. Wie in 3.4.2 detailliert beschrieben ist, lassen sich diese Interaktionen durch die Säurezahl K_A und die Basezahl K_B quantifizieren. Zur Ermittlung beider Zahlen werden die polaren Oberflächeneigenschaften (als Donor- und Akzeptorzahlen des Gutmann-Konzeptes (Gutmann, 1978)) mit der spezifischen Energie ΔG in einen linearen Zusammenhang gebracht. Aus dem Anstieg wird nun K_A und aus dem Achsenabschnitt K_B bestimmt. In der folgenden Abbildung 5.1-12 ist ein so genannter Acid Base Plot aufgeführt, wie er durch die iGC-Auswerte-Software automatisch errechnet wird.

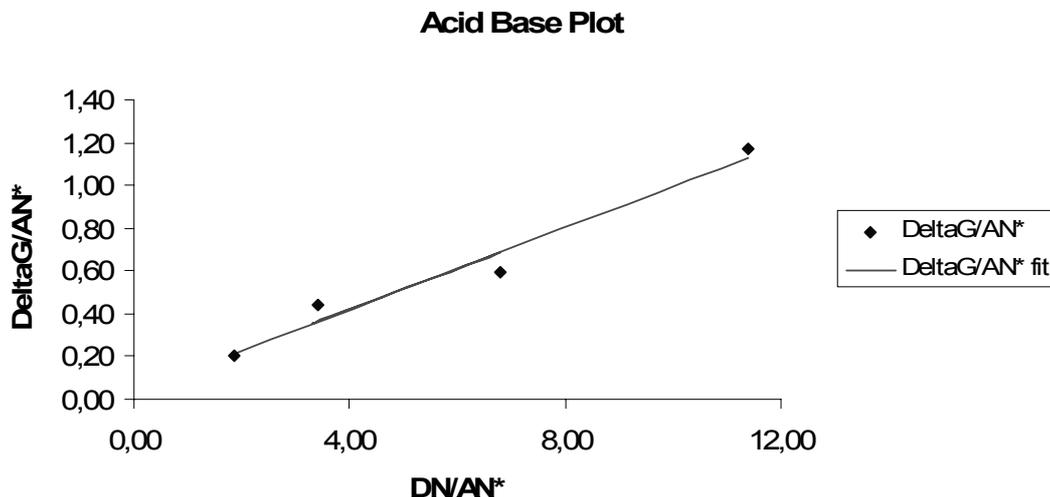


Abbildung 5.1-12 Linearer Zusammenhang zwischen der spezifischen Energie und den Donor- bzw. Akzeptorzahlen der polaren Probenmoleküle zur Ermittlung von K_A und K_B

Für die Ermittlung dieser Parameter ist eine Injektion von Probenmolekülen notwendig, die sowohl saure, basische als auch amphotere Eigenschaften haben. Dieser Anforderung wurde hier mit der Verwendung von Ethanol (sauer), Acetonitril (basisch), Ethylacetat und Aceton (beide amphoter) entsprochen (van Asten, van Veenendaal *et al.*, 2000). Um Aussagen über die Oberflächenbeschaffenheit machen zu können, sollte der Quotient aus der Säure- und der Basezahl ermittelt werden, da somit eine genaue Einordnung in „saure“ und „basische“ Oberflächen vorgenommen werden kann. Je größer dieser Quotient ist, desto „saurer“ ist dementsprechend die Oberfläche (Grenzwert sauer $KA/KB \geq 1,5$) (Belgacem und Gandini, 1999). Die Zusammenfassung der Werte der statistischen Versuchsauswertung ist in Abbildung 5.1-13 dargestellt.

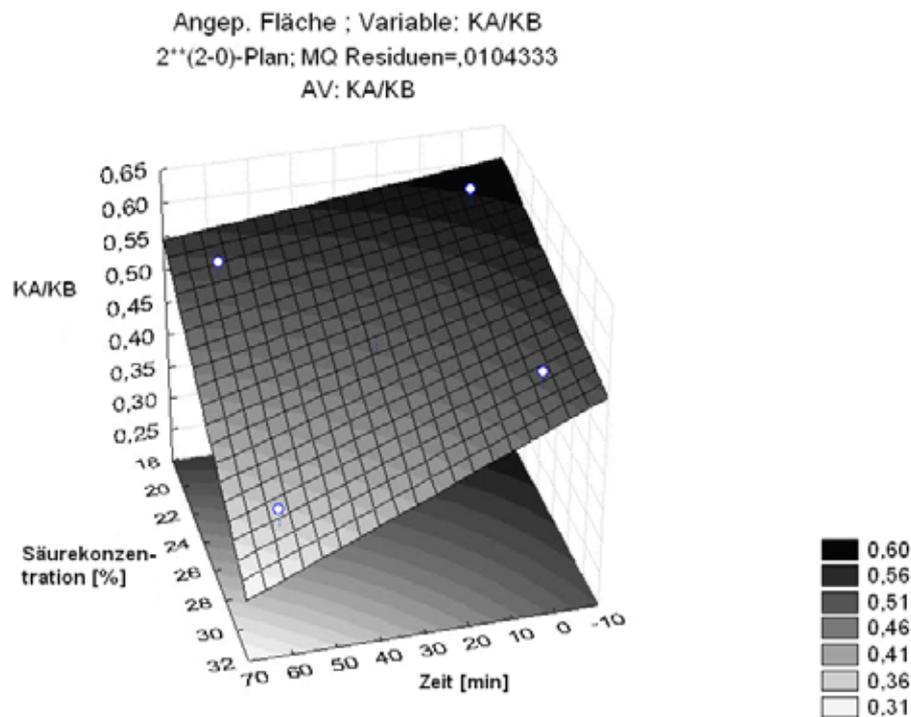


Abbildung 5.1-13 Einfluss der Säurekonzentration und Einwirkzeit auf die Oberflächenbeschaffenheit

Ähnlich wie bei den Daten der Adsorptionspotentialmaxima lassen sich die Werte bei den Extrema der Säureeinwirkung sehr gut voneinander

unterscheiden. So nimmt der Quotient für die intensivste Säurebehandlung den kleinsten Wert an. Dieser steigt dann auf sein Maximum bei der Behandlung mit der geringsten Säurekonzentration und der Minimaldauer. Das heißt, durch eine sehr starke Säureeinwirkung nimmt die Oberfläche eher einen basischen Charakter an. Die Ursache hierfür kann in einer Zerstörung der Hydroxylgruppen liegen, so dass weniger Akzeptor- (Säure-) eigenschaften zur Verfügung stehen (Felix und Gatenholm, 1993). Bei einer schwächeren Säureeinwirkung werden demzufolge weniger dieser funktionellen Gruppen zerstört, wodurch diese den sauren Charakter der Oberfläche bewahren. Der Erhalt der Akzeptoreigenschaften kann sehr wichtig für die Wechselwirkung mit Enzymen sein, um eine Stabilisierung durch Faseroberfläche während eines Gefriertrocknungsprozesses zu ermöglichen (Kapitel 6.4.4).

5.1.3 ZUSAMMENFASSUNG

Eine Säurebehandlung des Baumwollgewebes führte nur zu geringfügigen Veränderungen der physikochemischen Eigenschaften. Wichtige Parameter wie z.B. das Wasserbindungsvermögen, die spezifische Oberfläche oder die Oberflächenenergie haben zwar Änderungen erfahren, trotzdem waren tendenzielle Aussagen nur sehr schwierig oder gar nicht möglich. Die Veränderungen dieser Eigenschaften waren häufig zufällig verteilt, so dass eine gezielte Einstellung physikochemischer Parameter durch die Säure nicht möglich war. Eine im Verbundprojekt angestrebte primäre Depolymerisation der Materialien durch eine Säure kann aufgrund dieser Ergebnisse entfallen. Das beabsichtigte Ziel des schnelleren Abbaus durch eine darauf folgende Cellulaseeinwirkung sollte im nächsten Abschnitt dieser Arbeit genauer untersucht werden. Bei der detaillierten Analyse der aus der Säurebehandlung resultierenden Eigenschaften konnten allerdings auch signifikante Veränderungen der Oberflächeneigenschaften detektiert werden. Mit der

sensiblen Messanalytik der inversen Gaschromatographie wurden Heterogenitäten mit Probenmolekülen verschiedener Polaritäten gemessen. Hierbei konnte festgestellt werden, dass sich sowohl das Adsorptionspotentialmaximum des unpolaren n-Hexans, als auch das des polaren Ethanol durch eine Verstärkung der Säureeinwirkung (Zeit und Konzentration) zu höheren Werten verschiebt. Somit kann die Bindungsstärke zu Molekülen durch die Säureeinwirkung intensiviert werden. Dieser Parameter ist wichtig, da er die Freisetzung von der Faser beeinflussen kann. Zusätzlich konnten gezielt die spezifischen Interaktionen der Oberfläche dahingehend verändert werden, dass der Quotient aus der Säurezahl K_A und der Basezahl K_B bei starker Säurebehandlung ein Minimum annimmt und damit die Oberfläche tendenziell an Elektronenakzeptoreigenschaften verliert. Diese sind allerdings sehr wichtig, um eine Stabilisierung der Leucinaminopeptidase aus der Madensekretionslösung zu ermöglichen (Kapitel 6.4.4). Zusammenfassend sind diese Oberflächeneigenschaften jedoch für das Erreichen von Teilzielen dieser Arbeit nicht so relevant, wie die obigen Parameter, die eine eher zufällige Veränderung erfahren.

5.2 EINFLUSS EINER CELLULASEBEHANDLUNG AUF DIE FASER

5.2.1 EINLEITUNG

In den folgenden Ausführungen soll die Möglichkeit des Faserabbaus durch eine Cellulase untersucht werden. Hierbei wird ein Überblick über die Folgen des Cellulaseeinsatzes gegeben. Neben der Ermittlung von Reaktionsbedingungen wurde ein weiterer Fokus auf die Veränderung der Faserstrukturen gelegt. Dies könnte für weitere Studien ein Ansatz sein, Fasern mit konkret eingestellten physikochemischen Eigenschaften herzustellen. Die Kenntnis der Beschaffenheit von Fasern kann für viele Prozesse sehr nützlich sein, denn somit ist es möglich, die Beladungskapazität mit einem Wirkstoff zu bestimmen bzw. das Potential des

enzymatischen Abbaus zu beeinflussen. Auf diese beiden Parameter wird in einem späteren Teil dieser Arbeit noch detaillierter eingegangen.

Weiterhin war es wichtig, eine Aussage über den Abbau des säurebehandelten Materials zu treffen, da in der Vorbereitung des Projektes eine beschleunigte enzymatische Degradation von säurebehandelten Fasern vermutet wurde.

5.2.2 ABBAU DER FASERN

5.2.2.1 Allgemeines

Das Prinzip des enzymatischen Abbaus der Cellulose ist bereits in Kapitel 2.2.2 genau beschrieben worden. Für die folgenden Untersuchungen wurden zwei unterschiedliche Enzymsysteme verwendet. Zum einen eine feste Cellulase, Denimax, mit einem pH-Optimum von 7,4 und zum anderen ein flüssiges System, Cellusoft, mit einem pH-Optimum von 5 (beide Novozymes, Bagsvaerd, Dänemark). Beide Enzymsysteme arbeiten in einem Temperaturbereich von 37°C am effektivsten. Die Zusammensetzung dieser Enzyme kann nicht angegeben werden, da es sich bei den Herstellerangaben nicht um die tatsächlichen enzymatischen Aktivitäten, sondern um rein technische Qualitäten handelt. Ein möglicher Einsatz in der Wundheilung ist dementsprechend genau zu überprüfen.

Die meisten Versuche wurden mit der flüssigen Cellulase durchgeführt, da sich die zu verwendende Menge über das Volumen genauer quantifizieren ließ. Für den enzymatischen Abbau wurden die Materialien in Stücke mit einer Oberfläche von 1 cm² gestanzt, anschließend mit bidestilliertem Wasser gewaschen und getrocknet. Die Untersuchungen fanden in einem Gesamtvolumen von 2,25 ml (2 ml Puffer und 0,25 ml Cellulase) statt. Die Menge an Cellulase entsprach dem Volumen, das ohne Verluste an der Oberfläche der Materialien adsorbieren konnte. Das Ausmaß des enzymatischen Abbaus der Materialien wurde durch eine Bestimmung der

freiwerdenden Glukosekonzentration (3.6.4) festgestellt. Zudem erfolgte eine Ermittlung des Masseverlustes analog der Arbeit von Csiszar (Csiszar, Urbanszki *et al.*, 2001). Hierzu wurde das Material nach einem gründlichen Waschschrift mit bidestilliertem Wasser und anschließender Trocknung bei einer relativen Luftfeuchte von 65% eingelagert. Nach Ablauf von 24 h wurde die Masse des Materials bestimmt. Dieser Prozess wurde vor und nach der enzymatischen Behandlung durchgeführt und die Massedifferenz bestimmt. Weiterhin wurden nach der Trocknung erneut die physikochemischen Parameter der Materialien ermittelt, um eine Veränderung der Faserstruktur durch das enzymatische Einwirken genau beschreiben zu können.

Im Gegensatz zur Behandlung der Fasern mit Säure wurde beim enzymatischen Abbau das Zeitintervall sehr stark verlängert. Dadurch sollte der Abbau so stark wie möglich forciert werden, um die Grenzen der enzymatischen Cellulolyse aufzuzeigen. Da als ein Endziel die komplette Auflösung der Wundauflage angestrebt wurde, dehnte sich das Zeitintervall des enzymatischen Abbaus bis zu 168 h aus.

5.2.2.2 Einfluss auf die Fasereigenschaften

Die Untersuchungen zum enzymatischen Abbau der Materialien wurden sowohl mit der Viskose (CV_40) als auch mit unbehandelter Baumwolle (BW) durchgeführt.

Baumwolle

Wie oben bereits erwähnt, wurde bei diesen Untersuchungen zunächst das unbehandelte Material verwendet. Damit sollte sichergestellt werden, dass ausschließlich der enzymatische Einfluss auf die Fasern die erhobenen Resultate verursacht.

Röntgendiffraktometrie

Für einen möglichst kompletten Abbau der Fasern wurde die Dauer der Cellulasebehandlung auf eine Woche ausgedehnt. Hierbei wurde parallel zum Masseverlust (Abbildung 5.2-10) auch die Entwicklung der Kristallinität untersucht. In der Abbildung 5.2-1 sind die Diffraktogramme für das Ausgangsmaterial (BW_normal) und die Materialien nach einer bestimmten Stundenzahl (48 h; 96 h und 168 h) zusammengefasst.

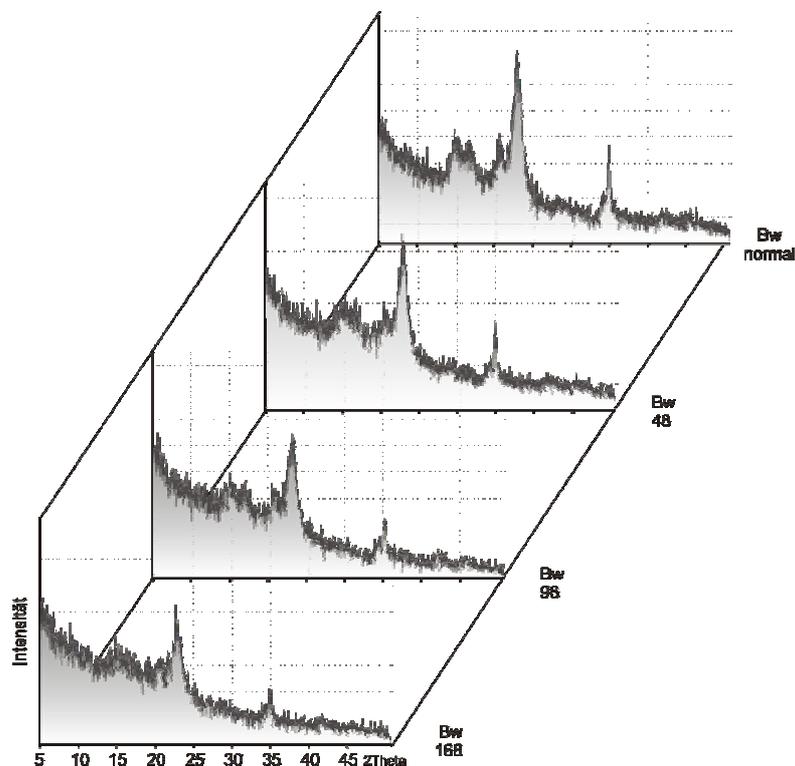


Abbildung 5.2-1 Röntgendiffraktogramme von Baumwollfasern in Abhängigkeit der Dauer einer Cellulaseeinwirkung

Die cellulolytischen Enzyme sind in der Lage kristalline Bereiche abzubauen (Lynd, Weimer *et al.*, 2002), wodurch der amorphe Charakter der Fasern steigt. Im hinteren Diffraktogramm der unbehandelten Baumwolle sind Peaks zu erkennen, die mit fortschreitendem Verlauf der Cellulaseeinwirkung kleiner werden. Besonders auffällig ist dies beim Peak bei 35° 2θ zu erkennen. Aber

auch die gesamte Kristallstruktur der Baumwollfasern wird minimiert. Hiermit konnte eine in der Literatur gängige Aussage widerlegt werden, in der von einem geringen Einfluss einer Cellulase auf die Kristallinität geschrieben wird (Pinto, Moreira *et al.*, 2004).

Physikochemische Parameter

Die Methode der inversen Gaschromatographie wurde in jüngster Zeit bereits eingesetzt, um Veränderungen in der dispersiven Oberflächenenergie von Fasern durch enzymatische Degradation zu bestimmen (Buschle-Diller, Inglesby *et al.*, 2005). Hierbei wurde allerdings nach einer 30minütigen Cellulasebehandlung abgebrochen und eine geringe Abnahme der Oberflächenenergie detektiert. Die Werte der einzelnen dispersiven Oberflächenenergien in Abhängigkeit von der Zeit sind in Abbildung 5.2-2 dargestellt.

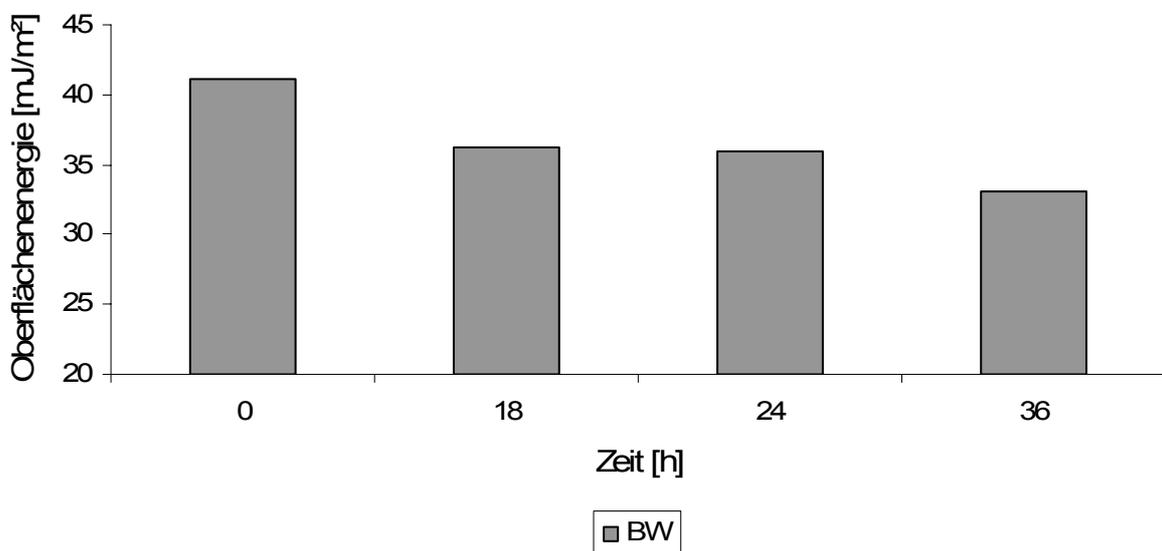


Abbildung 5.2-2 dispersive Oberflächenenergien von Baumwolle in Abhängigkeit der Zeitdauer einer Cellulaseeinwirkung

Für die obige Untersuchung mit der Baumwolle wurde das Zeitintervall auf 36 h angehoben und die Veränderung der Oberflächenenergie genauer untersucht. Die in der Abbildung 5.2-2 gezeigten Resultate konnten die Ergebnisse von Buschle-Diller (Buschle-Diller, Inglesby *et al.*, 2005) bestätigen, dass eine Cellulaseeinwirkung zu einer Abnahme der Energie führt. Zusätzlich konnte auch eine zeitabhängige Abnahme dieses Parameters aufgezeigt werden. Je länger die enzymatische Einwirkung stattfand, desto kleiner wurde der Wert der Oberflächenenergie. Das lässt sich dadurch erklären, dass der Abbau zunächst in den energetisch höher gelegenen Zentren der Oberfläche stattfindet und diese irreversibel zerstört werden. Hieraus resultiert eine stetige Abnahme der Oberflächenenergie. Ein Grenzwert konnte im Rahmen dieses Zeitintervalls nicht festgestellt werden. Weiterhin sollte mit Hilfe der inversen Gaschromatographie die Veränderung der spezifischen Oberfläche genauer untersucht werden. Hierfür wurde die Methode aus Kapitel 3.4.2.3 angewandt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.2-3 zusammengefasst.

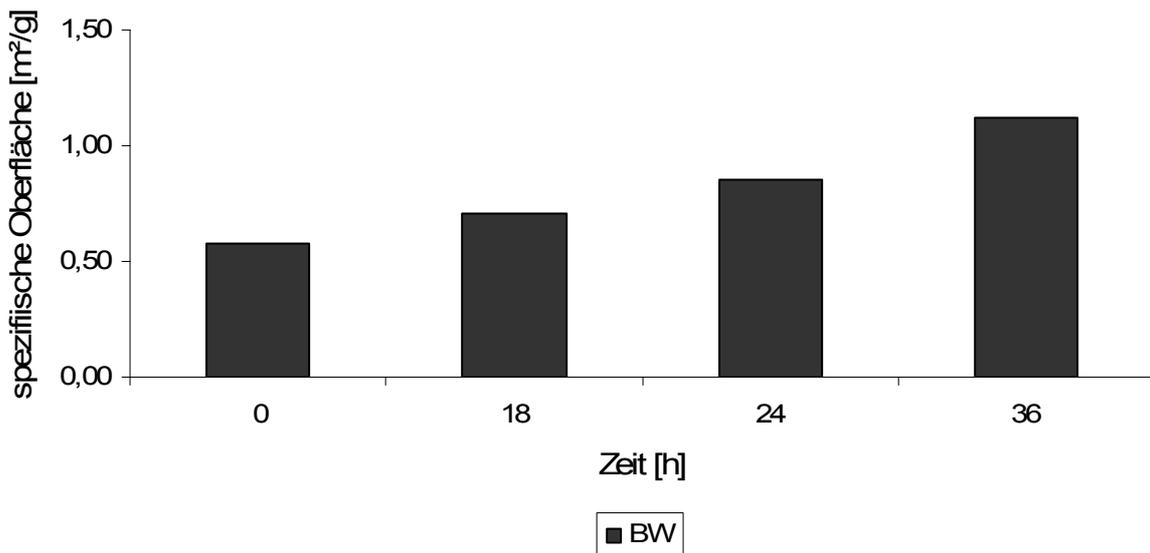


Abbildung 5.2-3 spezifische Oberflächen von Baumwolle in Abhängigkeit der Zeitdauer einer Cellulaseeinwirkung

Die obige Abbildung zeigt sehr deutlich die destruktive Wirkung der Cellulase auf die Faserstruktur der Baumwolle, denn die spezifische Oberfläche nimmt mit steigender Behandlungsdauer stetig zu. Diese Zunahme lässt sich dadurch erklären, dass der enzymatische Abbau der Fasern ständig neue Oberflächen freilegt, die dann durch die Isothermenbestimmung mit erfasst werden. Weiterhin ist es denkbar, dass Fasern komplett gespalten werden, was zu einer weiteren Zunahme der Oberfläche führt. Diese Aussage lässt sich durch weitere Untersuchungen unterstützen. So ist in den noch folgenden rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (siehe Abbildung 5.2-5) eine eindeutige Zerstörung zu erkennen. Zudem wird beim Vergleich des Wasserbindungsvermögens vor (13,1%) und nach (14,2%) der Enzymeinwirkung (Einwirkdauer: 36 h) eine deutliche Steigerung sichtbar. Der Anstieg des Wasserbindungsvermögens lag bei *circa* 8,4% (für $n = 2$ Messungen). In einer anderen Studie konnten bereits ähnliche Ergebnisse erzielt werden (Tereschenko und Shamolina, 1998). Die Zunahme dieses Parameters lässt sich durchaus mit der erhöhten Oberfläche des Materials erklären, denn nur somit kann mehr Wasser dauerhaft von der Faser gebunden werden. Zudem kommt es durch die cellulolytische Behandlung der Faseroberfläche zu einer Erhöhung der adsorptiven Eigenschaften. Dieses Ergebnis lässt sich zudem mit Hilfe der inversen Gaschromatographie bestätigen, indem die Flächen der Heterogenitätsmessungen für das Probenmolekül n-Hexan, dargestellt im Diagramm der Abbildung 5.2-4, als ein Maß für die Adsorptionseigenschaft einer Oberfläche ermittelt werden. Bei der Betrachtung der adsorptiven Eigenschaften der Fasern ist zunächst eine Minimierung nach 18 h auffällig. Bei weiterer Cellulaseeinwirkung steigt das Adsorptionspotential über den Ausgangswert an, wobei das Maximum der Adsorption bei 36 h liegt. Aufgrund dieser Tatsache ist das gesteigerte Wasserbindungsvermögen der Fasern sehr leicht nachvollziehbar.

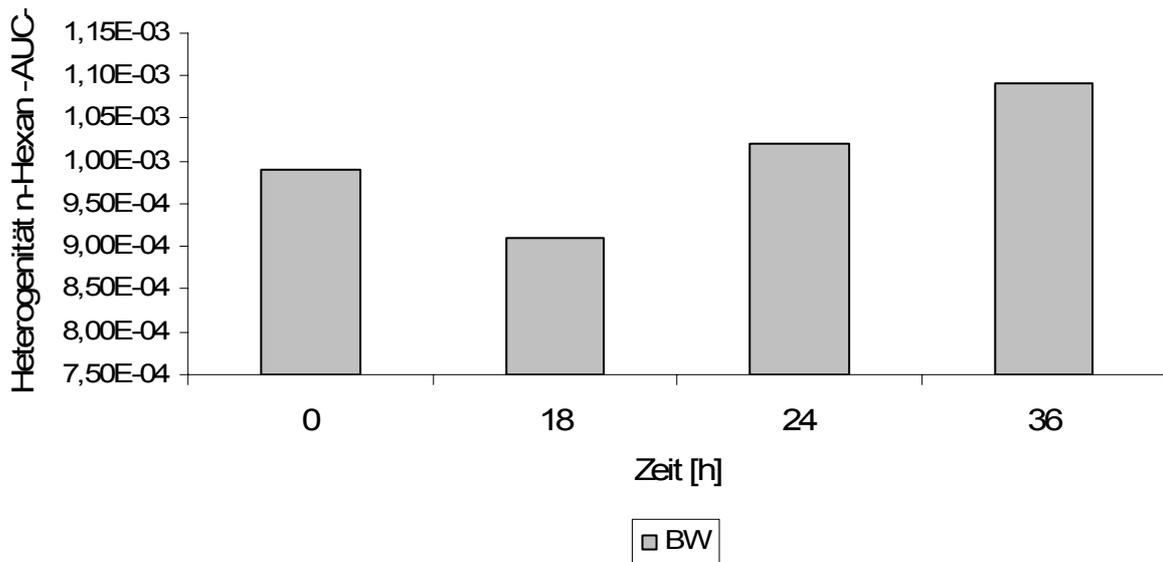


Abbildung 5.2-4 Flächen der Heterogenitäten des Probenmoleküls n-Hexan in Abhängigkeit der Zeitdauer einer Cellulaseeinwirkung

Die Erhöhung der adsorptiven Eigenschaften durch eine enzymatische Behandlung der Fasern könnte für eine Applikation auf Wunden sehr interessant sein, da das sezernierte Wundsekret gut aufgesogen werden kann. Zusätzlich ist es möglich, Angaben aus der Literatur über eine beobachtete Steigerung der Quellungseigenschaften von cellulasebehandelten Fasern (Bach und Schollmeyer, 1994) zu erklären. Im Gegensatz zur Säurebehandlung ist also festzustellen, dass sich durch das Einsetzen von Cellulase gezielt die Eigenschaften von Baumwollfasern steuern und beeinflussen lassen.

Rasterelektronenmikroskopie

Die in Abbildung 5.2-5 dargestellten Aufnahmen zeigen die cellulasebehandelten Baumwoll-Fasern. Die Dauer der Enzymeinwirkung betrug hierbei 36 h.

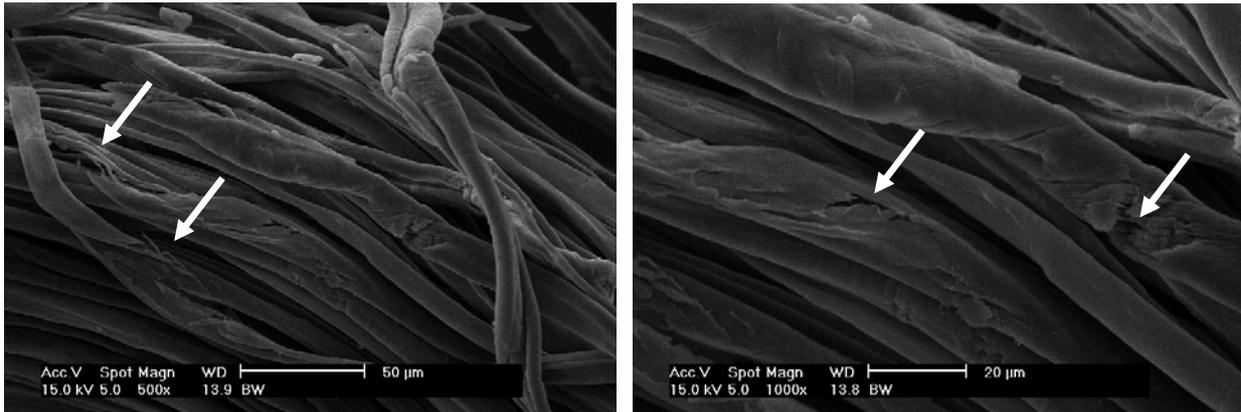


Abbildung 5.2-5 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von cellulasebehandelter Baumwolle (Dauer 36 h)

Anhand der obigen Abbildung ist sehr gut die destruktive Wirkung der Cellulase auf die Fasern zu erkennen. Im linken Bild zeigt sich deutlich eine Spaltung der Fasern, wodurch die Erhöhung der spezifischen Oberfläche und das vermehrte Wasserbindungsvermögen erklärbar sind. Die rechte Abbildung weist einen vergrößerten Ausschnitt der Faseroberfläche auf, woraus das erhöhte Adsorptionspotential der Fasern nach der Cellulasebehandlung resultiert. Neben entstandenen Löchern sind zusätzlich deutliche Risse zu sehen, durch die eine erhöhte Adsorption an die Faser möglich wird.

Viskose

Parallel zu den Abbauversuchen der Baumwolle wurden die gleichen Versuche mit Viskose durchgeführt. Hierbei gilt es zu bedenken, dass für diese Untersuchungen nur säurebehandeltes Material zur Verfügung stand. Alle folgenden Resultate wurden mit der Charge CV_40 ermittelt.

Röntgendiffraktometrie

In der Abbildung 5.2-6 sind zwei Röntgendiffraktogramme von Viskose zusammengefasst. Der enzymatische Abbau der Viskosefasern ist im

Vergleich zur Baumwolle stärker ausgeprägt. Dies kann zum einen auf den unterschiedlichen Herstellungsprozess der Fasern zurückzuführen sein. Zum anderen ist das Ausgangsmaterial der Viskose nicht so „kristallin“, so dass eine Cellulolyse effektiver ablaufen kann. In der Abbildung 5.2-10 zur Darstellung des Masseverlustes beider Materialien kann dies auch bestätigt werden. Nach einer Dauer von 168 h war das gesamte Gewebe aufgelöst und es wurde nur der filtrierte Rückstand vermessen. Die Abnahme der Kristallinität war ähnlich gering wie bei der Baumwolle. Erwähnenswert ist allerdings der extreme Unterschied zwischen dem Diffraktogramm des Ausgangswerts CV_40 (schwarz) und dem der aufgelösten Viskose (grau).

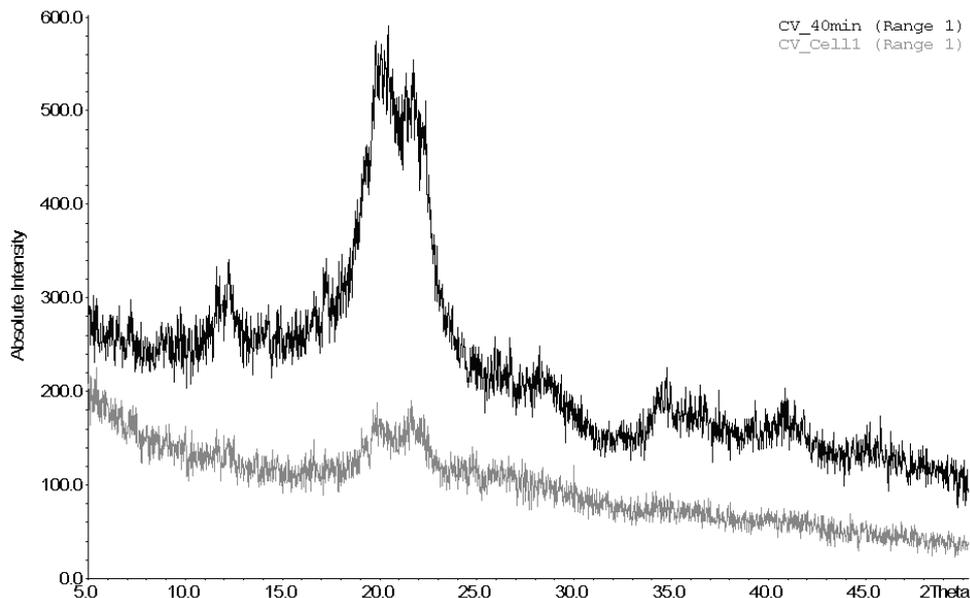


Abbildung 5.2-6 Röntgendiffraktogramme von Viskosefasern in Abhängigkeit der Dauer einer Cellulaseeinwirkung

Physikochemische Parameter

Bei den Versuchen zur Bestimmung der Oberflächenenergie mit Viskose unter Cellulaseeinwirkung konnten ähnliche Ergebnisse wie bei der Baumwolle erzielt werden. Allerdings war in diesem Fall keine kontinuierliche Abnahme im Verlauf der Zeit auffällig. Die Ergebnisse dieser Untersuchung sind in

Abbildung 5.2-7 zusammengefasst. Bis zu einer Dauer von 24 h nimmt die Oberflächenenergie stetig ab, um nach weiteren 12 h (Gesamtdauer 36 h) wieder anzusteigen. Der gezeigte Anstieg kann folgende Ursache haben. Zum einen war das Material bereits mit Säure vorbehandelt und zum anderen waren die Ausgangswerte sehr viel niedriger als bei der Baumwolle. Eventuell ist sogar ein möglicher Grenzwert überschritten und das Material so stark geschädigt, dass neue energetisch höher gelegene Zentren freigelegt werden. Damit müsste für das gesamte System der Wert für die Oberflächenenergie wieder ansteigen.

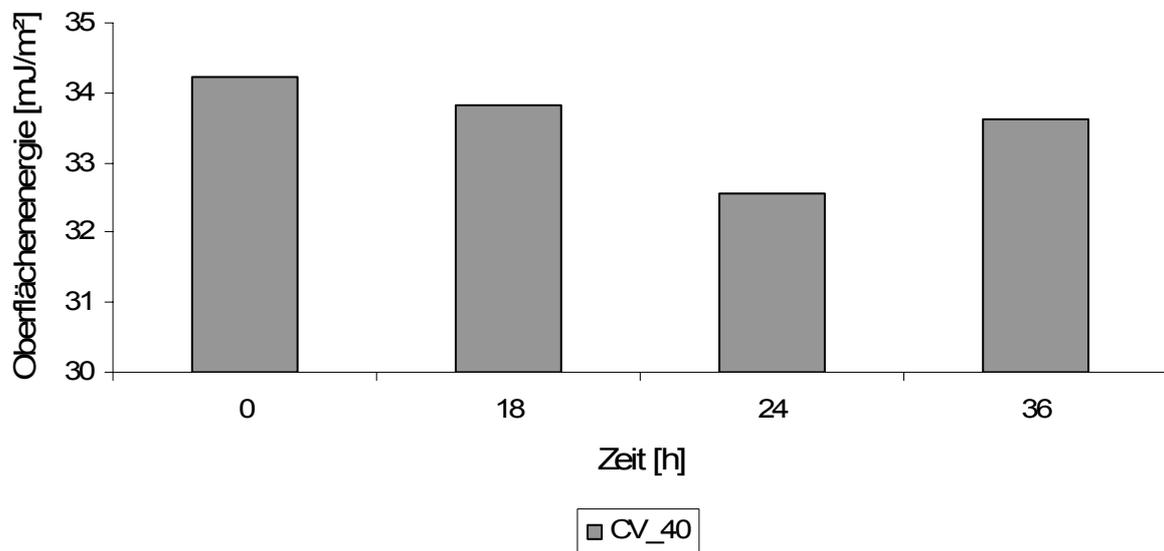


Abbildung 5.2-7 dispersive Oberflächenenergien von Viskose in Abhängigkeit der Zeitdauer einer Cellulaseeinwirkung

Zusätzlich zur dispersiven Oberflächenenergie wurden auch die beiden Parameter spezifische Oberfläche und Heterogenität für das Probenmolekül n-Hexan untersucht und die Resultate in Abbildung 5.2-8 zusammengefasst.

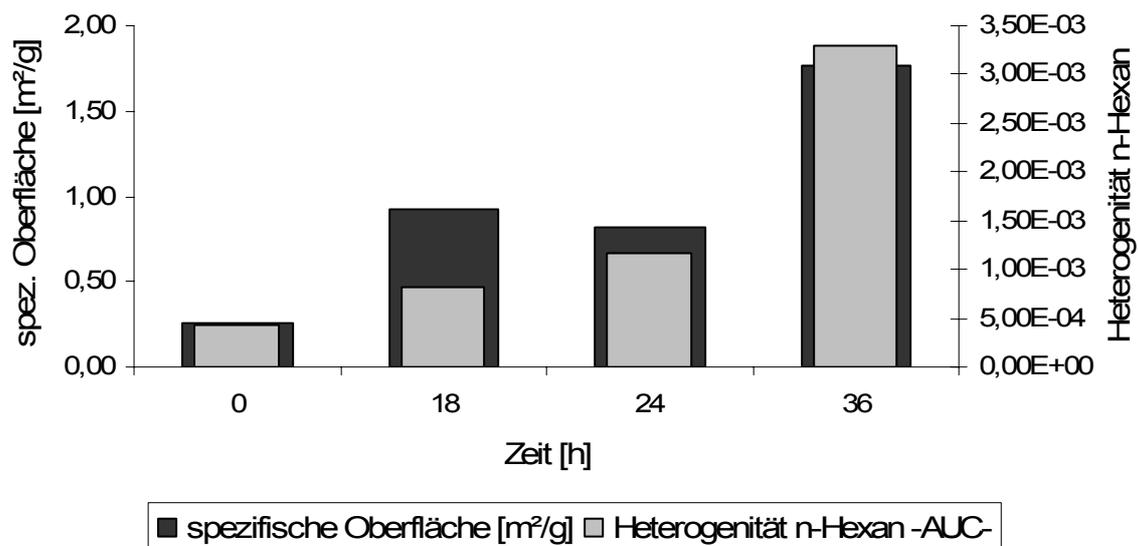


Abbildung 5.2-8 spezifische Oberfläche (dunkelgrau) und Flächen der Heterogenitäten des Probenmoleküls n-Hexan (hellgrau) in Abhängigkeit von der Zeitdauer einer Cellulaseeinwirkung

Die spezifische Oberfläche steigt mit zunehmender Dauer der Cellulasebehandlung an und erfährt bei 36 h ihr Maximum. Damit verhält sich die Viskose ähnlich wie die Baumwolle. Die enzymatische Degradation führt zu einer derart starken Destruktion der Fasern, dass viele neue Oberflächen geschaffen werden. Nach 36 h Cellulaseeinwirkung ist die Oberfläche bereits um das 6,5fache gegenüber dem Anfangswert ($t = 0$ h) erhöht. Besonders drastisch ist der Anstieg von 0 h auf 18 h bzw. von 24 h auf 36 h. Die geringe Reduktion im Intervall von 18 h auf 24 h unterbricht die Kontinuität der Abnahme. Bei der Bestimmung des Adsorptionspotentials der Faser mit Hilfe des Probenmoleküls n-Hexan konnte ein stetiger Anstieg der Flächen und damit der Adsorptionseigenschaft der Oberfläche ermittelt werden. Bei dieser Messreihe war die Steigerung kontinuierlich, und im Gegensatz zur Baumwolle lag das Minimum beim Ausgangswert. Ähnlich wie bei der spezifischen Oberfläche war der Sprung im letzten Zeitintervall (von 24 h auf 36 h) besonders drastisch. Einhergehend mit diesen Beobachtungen lässt sich auch das gesteigerte Wasserbindungsvermögen der Fasern sehr gut erklären. Die

Schaffung neuer Oberflächen, gepaart mit dem gesteigerten Adsorptionspotential der Fasern nach enzymatischer Destruktion, führt zu einer Erhöhung des Wasserbindungsvermögens von 17,9% auf 21%. Dies entspricht einer Steigerung von *circa* 14,8% (für n = 2 Messungen).

Rasterelektronenmikroskopie

Mit Hilfe der Rasterelektronenmikroskopie soll auch für das Material Viskose das Ausmaß des enzymatischen Abbaus veranschaulicht und die obigen Aussagen zu den physikochemischen Parametern belegt werden. Die Aufnahmen sind in der Abbildung 5.2-9 dargestellt und zeigen den fortgeschrittenen Abbau der Fasern. Die Fasern sind sehr fransig und nicht mehr so homogen wie das Ausgangsmaterial (Abbildung 4.2-8). Besonders auffällig bei beiden Aufnahmen ist die Entstehung vieler Spaltprodukte in Form kleiner Fasern, durch die die starke Erhöhung der spezifischen Oberfläche begründet werden kann.

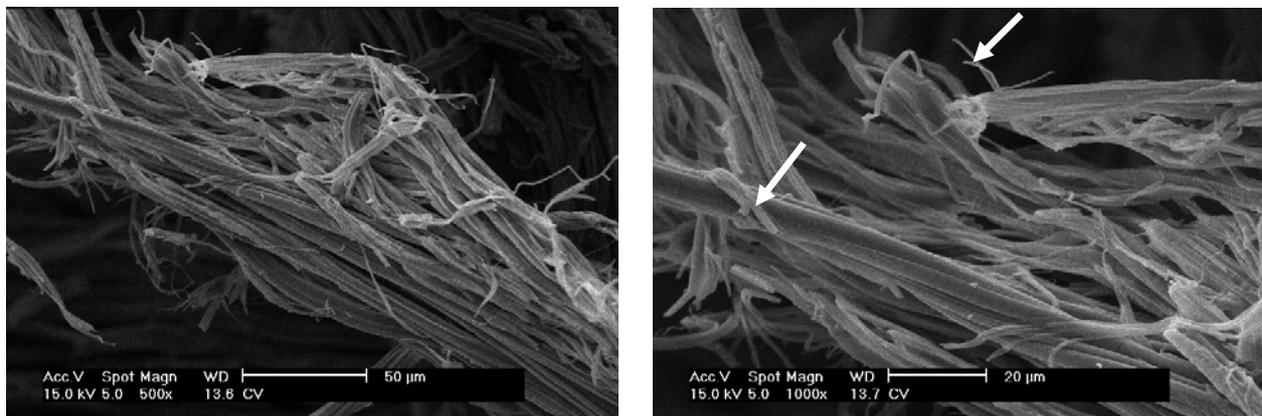


Abbildung 5.2-9 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme von cellulasebehandelter Viskose (Dauer 36 h)

5.2.2.3 Masseverlust

Für die Untersuchung des Masseverlustes wurden beide Materialien unter den oben angegebenen Bedingungen behandelt und der Verlauf des Masseverlustes in Abhängigkeit der Zeit dargestellt. Hiermit wird überprüft, ob der Einsatz der Cellulase eine komplette Auflösung des Materials hervorrufen kann. Im Rahmen dieses Versuches wurde kein Austausch des Mediums vorgenommen. Die Entwicklung des Masseverlustes in Abhängigkeit der Zeit ist in Abbildung 5.2-10 dargestellt. Hierbei wurde die Ausgangsmasse als 100% definiert und die ermittelte Massedifferenz nach dem Trocknen auf diesen Wert bezogen.

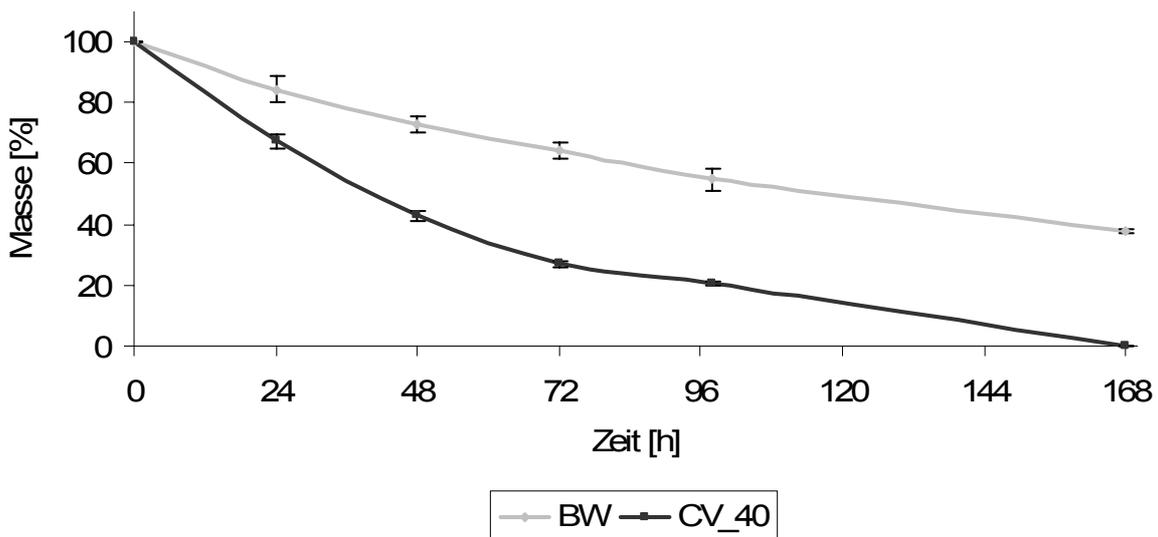


Abbildung 5.2-10 Darstellung des Masseverlustes von Baumwolle und Viskose in Abhängigkeit von der Zeitdauer einer Cellulaseeinwirkung

Der Masseverlust für das Material Viskose ist von Beginn der ersten Messung bis zum Ende viel größer als für die Baumwolle. Dies könnte an der Beschaffenheit der Fasern liegen, denn die Viskose als Regenerat der Cellulose ist reiner und damit scheinbar besser abbaubar. Zudem scheint auch die Kristallinität eine Rolle zu spielen, denn Lynd beschreibt einen schnelleren

enzymatischen Abbau von amorphen Fasern (Lynd, Weimer *et al.*, 2002). Da die Viskose im Vergleich zur Baumwolle amorpher ist (siehe Diffraktogramme im Kapitel Trägermaterialien), könnte dies eine weitere Ursache für den schnelleren Abbau sein. Nach 168 h Enzymbehandlung war für die Viskose nur noch eine zähflüssige Masse feststellbar und ließ eine Massebestimmung nicht mehr zu. Die Masse der Baumwolle nahm ebenfalls stetig ab, jedoch konnte nach einer Woche immer noch ein intaktes Gewebe entnommen und die Masse problemlos bestimmt werden. Damit kann von einem besseren bis vollständigen Abbau der Viskose ausgegangen werden. Dies ist umso bemerkenswerter, da dieses Material fast doppelt so schwer ist wie Baumwolle (CV_40: 27,6 mg/cm² im Vergleich zu BW: 13,6 mg/cm²). Eine Verlängerung der Zeitdauer für einen vollständigen Abbau der Baumwolle wurde nicht durchgeführt, da eine längere Kontaktzeit in der Wunde nicht sinnvoll erscheint. So ist bereits nach einer Woche mit einem Austausch von Sekretionsflüssigkeiten zu rechnen. Zudem sollte auch bei chronischen Wunden in diesem Zeitraum eine Erneuerung von Körperzellen stattgefunden haben.

5.2.2.4 Säurebehandeltes Material

Mit Hilfe einer vorherigen Behandlung der Fasern mit einer Mineralsäure sollte eine Art primäre Depolymerisation der Materialien stattfinden, um so einen schnelleren und effektiveren enzymatischen Abbau zu ermöglichen. Die zur Verfügung gestellten Materialien waren bereits alle mit Salzsäure vorbehandelt und unterschieden sich kaum in ihren physikochemischen Eigenschaften. Für eine genaue Differenzierung der Säurewirkungen auf die Fasereigenschaften wurden im Kapitel 5.1 Baumwollfasern basierend auf einer statistischen Grundlage gezielt mit Säure behandelt und auf ihre Eigenschaften hin untersucht. Diese Fasern wurden nun im Hinblick auf ihren enzymatischen Abbau genauer untersucht. Das folgende Diagramm in Abbildung 5.2-11 zeigt

den prozentualen Masseverlust der Materialien, die unterschiedlich mit Säure (Chargenbezeichnung entspricht dem Kapitel 5.1) vorbehandelt sind. Zum einen ist in diesem Diagramm der resultierende Masseverlust durch eine Säurebehandlung dargestellt und zum anderen zeigt es den Masseverlust der gleichen Materialien durch anschließenden Cellulaseeinfluss.

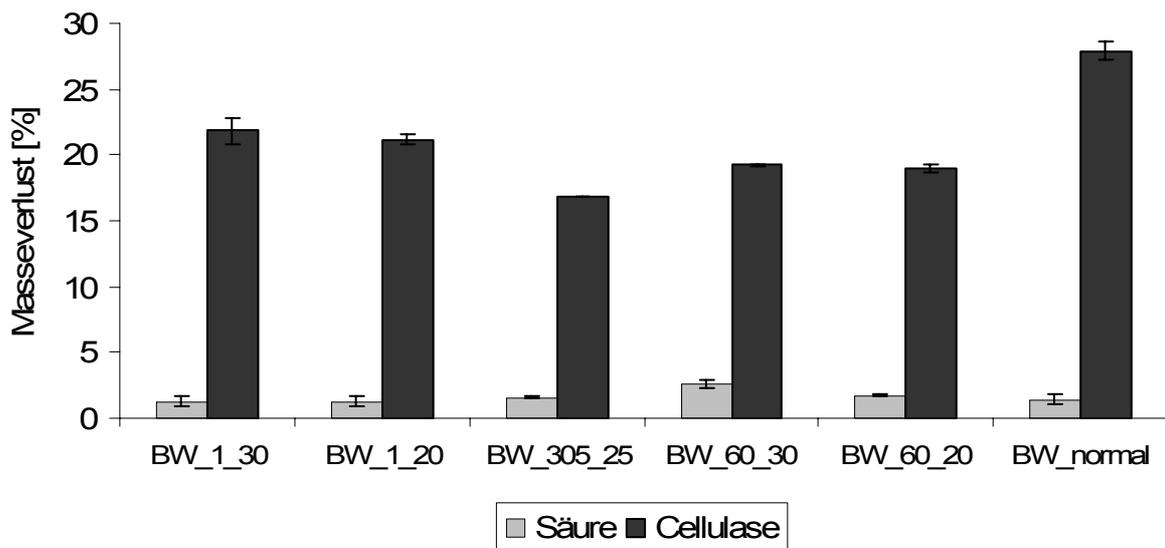


Abbildung 5.2-11 Masseverlust durch unterschiedliche Säureeinwirkung (hellgrau) und anschließendem Cellulaseeinfluss (dunkelgrau)

Der Einfluss der Säurebehandlung auf den Masseverlust ist ähnlich der Änderung der untersuchten anderen physikochemischen Parameter nur sehr gering. Die Werte liegen hier in dem Bereich eines normalen 30minütigen Waschschriffs mit bidestilliertem Wasser (BW_normal). Damit kann nicht davon ausgegangen werden, dass die Einwirkung von Säure auf die Fasern in diesem gewählten Zeitintervall eine starke Schädigung verursacht. Erwähnenswert sind allerdings die resultierenden Masseverluste durch die Cellulasebehandlung (Dauer: 36 h). Die mit Säure vorbehandelten Fasern hatten einen geringeren Masseverlust, als das unbehandelte Material. Je länger die Säure auf die Fasern einwirkte, desto geringer war der resultierende

Masseverlust. Dementsprechend scheinen sich die Eigenschaften der Fasern dahin gehend zu verändern, dass nach der Säureeinwirkung die Cellulase nicht mehr so aktiv arbeitet. Diese Tatsache könnte mit der Adsorption der Cellulase an die Faseroberfläche erklärt werden. Das Phänomen der adsorptionsabhängigen Aktivität von Cellulasen ist bereits genau untersucht (McCarter, Adney *et al.*, 2002). Zudem wurde versucht unter Verwendung der inversen Gaschromatographie eine Veränderung der Säure-Base-Parameter der Oberfläche durch Cellulaseeinfluss zu bestimmen (Pinto, Moreira *et al.*, 2004). Diese Aussagen beschreiben jedoch nicht den Zustand der Fasern vor der Behandlung und eine erreichbare Bindungskapazität und folglich Aktivität für die Cellulase. Da mit Hilfe der inversen Gaschromatographie eine Möglichkeit besteht, eine Aussage zum reinen Adsorptionspotential einer Oberfläche zu treffen, soll hier ein möglicher Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren untersucht werden. Hierfür wurden die Flächen unter dem Heterogenitätsplot des Probenmoleküls n-Hexan als Maß für die Adsorptionsfähigkeit gegen den resultierenden Masseverlust gesetzt. Diese Werte sind in einem Regressionsplot zusammengefasst (Abbildung 5.2-12).

Dieser zeigt einen eindeutigen Zusammenhang zwischen dem Adsorptionspotential und dem resultierenden Masseverlust. Je größer die adsorptive Eigenschaft der Faser, gleichbedeutend mit einer größeren Fläche unter der Kurve ist, desto höher wird der Masseverlust bei gleichen Bedingungen nach dem enzymatischen Abbau. Damit kann erstmals ein direkter Zusammenhang zwischen diesen Faktoren gezeigt werden. Das heißt, für einen effektiven enzymatischen Abbau einer Faser spielt eine gute Adsorptionsfähigkeit der Oberfläche eine große Rolle. Die zusätzliche Steigerung des Adsorptionspotentials durch die Cellulaseeinwirkung (Abbildung 5.2-4 und Abbildung 5.2-8) ist zudem sehr interessant bei der Verwendung als Wundmaterial. Somit kann während der Applikation die Sorptionsfähigkeit gesteigert und damit mehr Wundsekret aufgenommen werden.

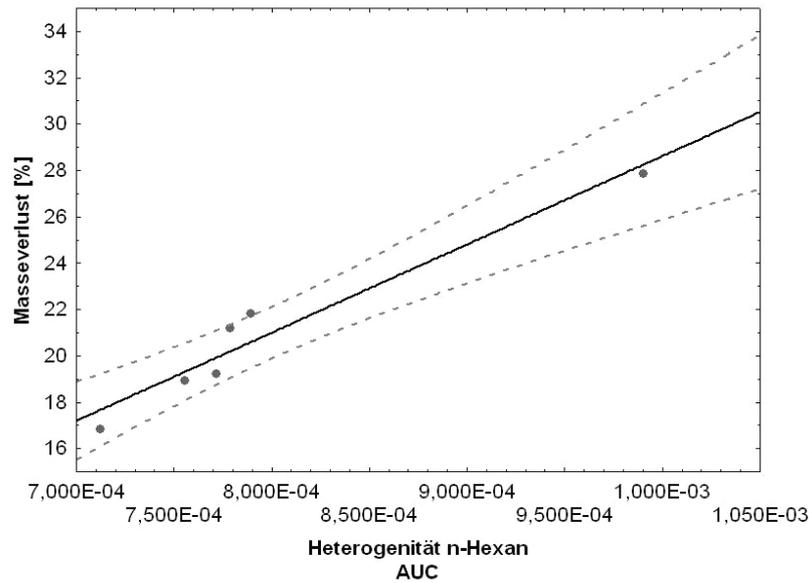


Abbildung 5.2-12 Regressionsplot Masseverlust gegen die Flächen der Heterogenität für das Probenmolekül n-Hexan (Vertrauensbereich 0,95)

Die Untersuchungen zur Einwirkung der Säure auf die Baumwolle haben gezeigt, dass das Adsorptionspotential so stark verändert wird, dass der enzymatische Abbau minimiert wird. Eine mögliche Schädigung des Depolymerisationsgrads durch die Säure scheint nicht entscheidend zu sein und ein Verzicht auf diesen, doch sehr zeitaufwendigen Schritt ist zu empfehlen. Neben dem Masseverlust wurde zusätzlich die entstandene Glukosekonzentration bestimmt, um einen genauen Überblick über den fortschreitenden Abbau der Fasern zu gewinnen. Die Bestimmung erfolgte enzymatisch mit der in Kapitel 3.6.4 beschriebenen Methode. Die ermittelten Glukosekonzentrationen sind in der folgenden Abbildung 5.2-13 zusammengefasst.

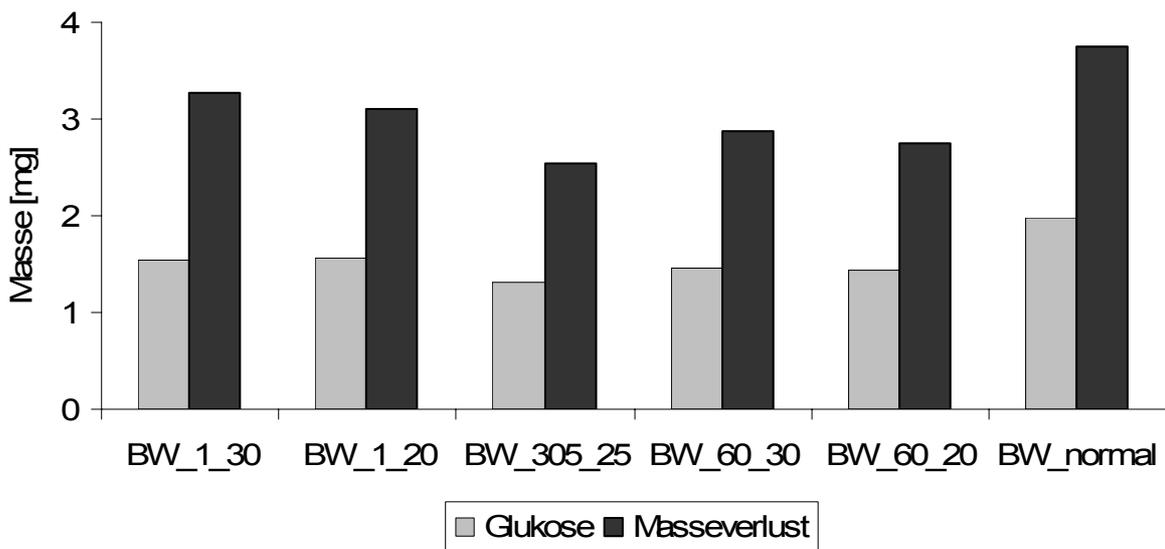


Abbildung 5.2-13 Darstellung der entstandenen Glukosemasse im Vergleich zum Masseverlust nach 36stündiger Cellulasebehandlung

Die ermittelten Glukosemengen korrelieren mit den resultierenden Masseverlusten (hier Angaben in [mg]). Dies kann auch mit einem Regressionsplot in Abbildung 5.2-14 bestätigt werden.

Je mehr Glukose in der Lösung nachgewiesen werden kann, desto höher ist auch der resultierende Masseverlust. Allerdings konnte festgestellt werden, dass der Masseverlust nicht nur auf abgespaltenen Glukosebausteinen basiert, sondern dass die Cellulase auch Bruchstücke bestehend aus mehreren Monomeren bildet, wodurch die Diskrepanz zwischen Glukosemenge und Masseverlust zu erklären ist. Diese kürzerkettigen Kohlenhydrate können nicht mehr genau quantifiziert werden, so dass eine Möglichkeit für deren Nachweis gesucht wurde. Ein Ansatz zum Nachweis dieser Fragmente liegt im Anfärben der Fasern mit dem Farbstoff Remazolblau (siehe Kapitel 5.2.3).

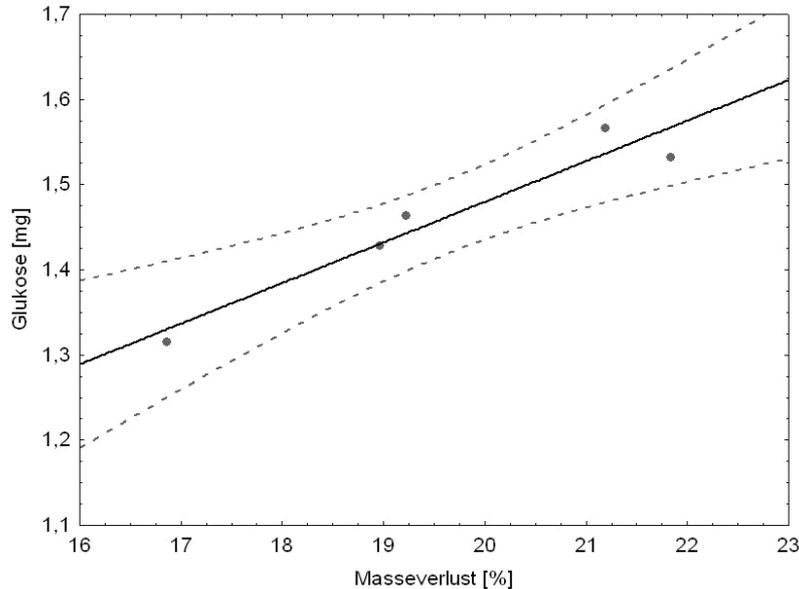


Abbildung 5.2-14 Regressionsplot Masse an Glukose [mg] gegen den resultierenden Masseverlust [%] einer Faser

5.2.3 VERWENDUNG VON REMAZOLBLAU

5.2.3.1 Einleitung

Der enzymatische Abbau von Cellulosefasern findet auf zwei Wegen statt. Zum einen werden die Celluloseketten vom Ende her gespalten. Zum anderen kommt es zum Herauslösen von löslichen Kohlenhydraten, die nicht genau quantifiziert werden können. Auf der Suche nach einem zusätzlichen Nachweis der Cellulolyse wurde der Farbstoff Remazol Brilliant Blau R (RBBR) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland) eingesetzt. Dieser wird normalerweise für das Anfärben von mikrokristalliner Cellulose benutzt, um das gefärbte Substrat zur Bestimmung von Cellulaseaktivitäten zu verwenden (Correia, De Sousa Pereira Junior *et al.*, 1998). Zudem werden andere Reaktivfarbstoffe zum Färben von Textilien benutzt. Da die verwendeten Materialien aus Cellulose bestehen, wurde versucht, die Fasern mit dem Farbstoff anzufärben. Für diesen Zweck wurde die Methode von Correia modifiziert und wie folgt durchgeführt. Das zu färbende Fasermaterial wurde in

1 cm² große Stücke gestanzt und in bidestilliertes Wasser mit einer Temperatur von 50°C gegeben. Anschließend wurden unter ständigem Rühren 100 ml einer 0,7%igen RBBR-Lösung hinzu gegeben. Diese Mixtur wurde für weitere 35 min gerührt und während dieses Intervalls 20 g Na₂SO₄ in kleinen Portionen hinzugefügt. Zum endgültigen Fixieren des Farbstoffes auf der Cellulosefaser wurde durch die Zugabe von 10 mg Na₃PO₄ der pH-Wert auf 12 eingestellt und die Suspension eine weitere Stunde gerührt. Nach dem Abfiltrieren des gefärbten Cellulose-Materials wurde dieses mit 60°C heißem bidestilliertem Wasser gewaschen, bis das Waschwasser eine Absorption von null, bei einer Wellenlänge von $\lambda = 590$ nm, aufwies.

5.2.3.2 Veränderung der Fasereigenschaften

Eine detaillierte Untersuchung aller physikochemischen Parameter der gefärbten Fasern war hier nicht Gegenstand der Untersuchungen. Allerdings hat die Kopplung von Remazol Brilliant Blau an die Celluloseketten geringfügige Änderungen der Fasereigenschaften zur Folge, die in einer kurzen Zusammenfassung erläutert werden sollen. Die Reaktion zwischen dem Farbstoff und den Celluloseketten hat keine Änderung der Kristallinität zur Folge (Daten hier nicht abgebildet). Weiterhin verändert sich das Wasserbindungsvermögen trotz der Kopplung mit Hydroxylgruppen nur geringfügig. Beim Material Viskose sinkt dieser Wert von 21,2% („farblos“) auf 20,9% (blau). Im Gegensatz dazu steigt bei der Baumwolle dieser Parameter von 12,8% („farblos“) leicht auf einen Wert von 13,2% (blau) an. Damit sind Aussagen über den Einfluss des Farbstoffes auf diesen Parameter schwer möglich.

Eine wichtige Veränderung erfährt das Material allerdings beim enzymatischen Abbau. Da mit dem Remazol ein relativ großes Molekül an die Celluloseketten gebunden wird, kommt es zu sterischen Hinderungen für den Cellulaseangriff. Ein Zugang zu den glykosidischen Bindungen ist erschwert und damit der

Abbau verlangsamt. Dieser Zusammenhang wurde mit beiden Materialien (Viskose und Baumwolle) näher untersucht und in den folgenden Diagrammen (Abbildung 5.2-15 und Abbildung 5.2-16) dargestellt. Hierin wird als Maß für den fortschreitenden Abbau der Fasern die Masse an entstehender Glukose gegen die Zeit abgebildet.

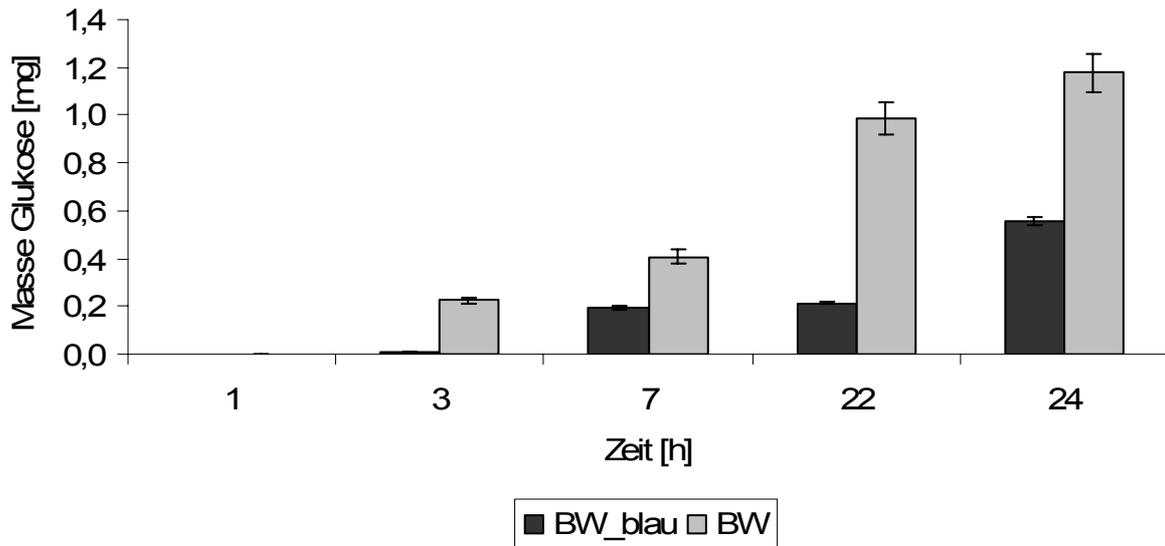


Abbildung 5.2-15 Vergleich des enzymatischen Abbaus von Baumwolle (BW) und Remazol-gefärbter Baumwolle (BW_blau)

In der Abbildung 5.2-15 ist sehr gut der verminderte Abbau der gefärbten Baumwolle zu erkennen. Der sterische Einfluss des Farbstoffes minimiert die Hydrolyse um *circa* 50%. Noch drastischer tritt dieser Effekt bei der gefärbten Viskose auf. Wie im Diagramm der Abbildung 5.2-16 zu erkennen, schränkt die Kopplung des Farbstoffes mit der Faser den enzymatischen Abbau bis 75% ein.

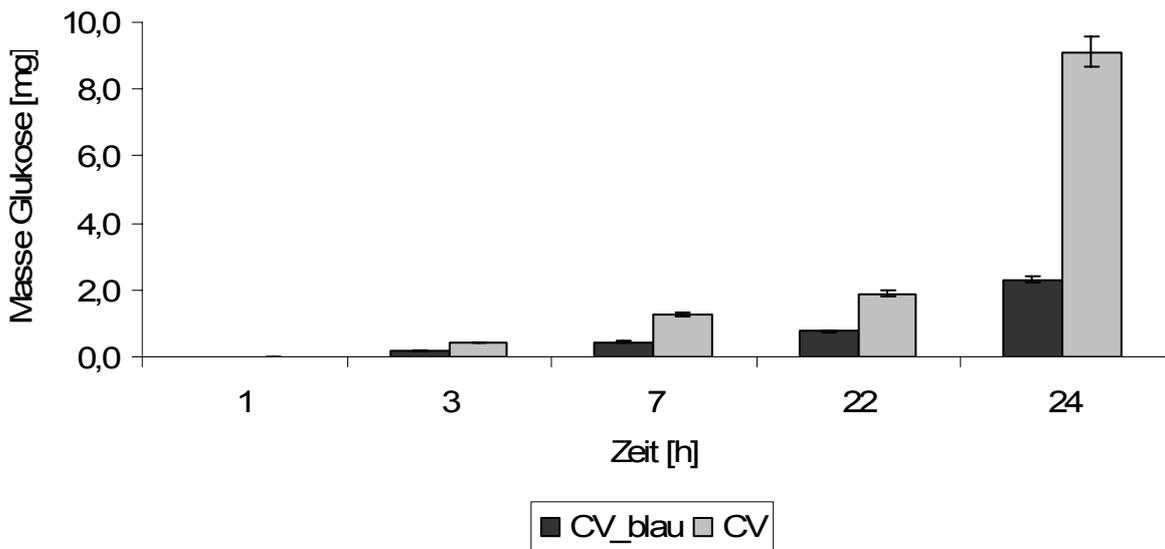


Abbildung 5.2-16 Vergleich des enzymatischen Abbaus von Viskose (CV) und Remazol-gefärbter Viskose (CV_blaue)

Die resultierenden Masseverluste bestätigen zusätzlich die abgebildeten Daten. Nach 24 h Cellulaseeinwirkung konnte für die Baumwolle ein Masseverlust von 12,2% und für das gefärbte Material von 5,7% bestimmt werden. Parallel zu den entstehenden Glukosemengen ist der verminderte Masseverlust bei der Viskose noch ausgeprägter. Die Reduzierung der Masse bei der „farblosen“ Viskose betrug 32,9%, während bei der gefärbten Viskose die Masse nur um 9,9% abnahm. Ähnliche Angaben zur Abnahme des Masseverlustes im Vergleich zwischen gefärbten und normalen Baumwollfasern konnten auch für andere Farbstoffe gezeigt werden (Buschle-Diller und Traore, 1998).

5.2.3.3 Remazolblau als Modellarzneistoff

Mit der Kopplung des Farbstoffes Remazolblau an die Cellulosefasern sollte neben der Messung der Glukosekonzentration ein weiterer Nachweis des enzymatischen Abbaus der Fasern ermöglicht werden. Durch die Spaltung der gefärbten Cellulose in kürzerkettige wasserlösliche Kohlenhydrate ist bereits eine Absorption (Wellenlänge $\lambda = 590 \text{ nm}$) messbar. Hierin liegt der Vorteil

dieser Methode, denn es ist keine Spaltung bis auf den Grundbaustein Glukose erforderlich, um das Fortschreiten des Abbaus zu verfolgen. Ein weiterer Vorteil liegt in der Einfachheit der Messungen, da keine Kopplung an ein Reagenz und keine lange Inkubationszeit notwendig sind.

Um die Eignung des Farbstoffes als Nachweis für den cellulolytischen Abbau der Fasern zu testen, wurde sowohl die Viskose als auch die Baumwolle wie in Abschnitt 5.2.3.1 beschrieben gefärbt. Anschließend erfolgte eine 24stündige Inkubation mit einer Cellulase. Während dieses Zeitintervalls wurde neben der Glukosekonzentration auch die Remazolabsorption bestimmt. Die ermittelten Wertepaare für die Materialien Viskose (CV) und Baumwolle (BW) sind in den Diagrammen der Abbildung 5.2-17 und Abbildung 5.2-18 zusammengefasst. Anhand der Bestimmtheitsmaße ist eindeutig eine Korrelation zwischen Remazolabsorption und der entstehenden Glukosekonzentration (dargestellt ist hier die Absorption des gebildeten Chinonimins) erkennbar.

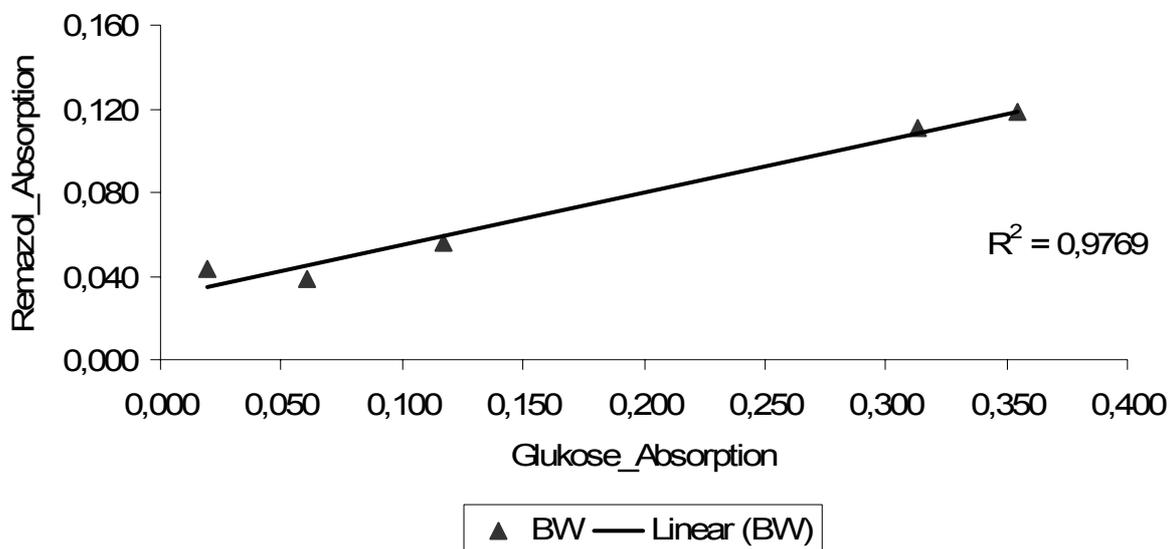


Abbildung 5.2-17 Vergleich der Remazolabsorption mit der Glukoseabsorption für den enzymatischen Abbau von Baumwolle

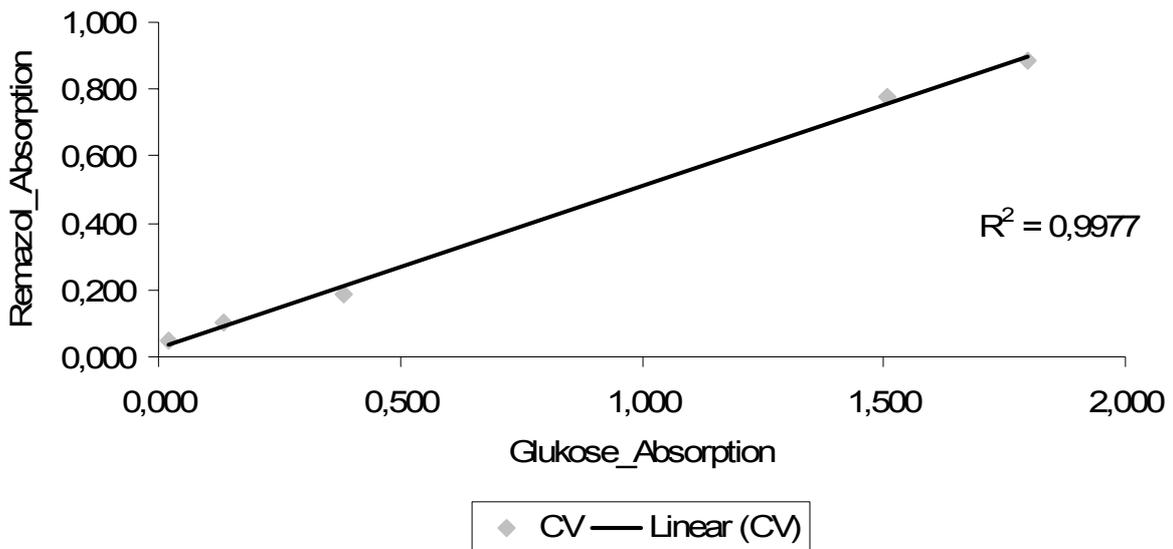


Abbildung 5.2-18 Vergleich der Remazolabsorption mit der Glukoseabsorption für den enzymatischen Abbau von und Viskose

Neben der Korrelation beider Parameter kann man zusätzlich aus den Wertepaaren die Sensibilität dieser Methode entnehmen. So sind die Absorptionen für das Remazol durchgehend niedriger, als die der Glukosekonzentrationen. Mit dem Nachweis der Korrelation zwischen dem Remazol und der Glukose ist auch der Bezug zum Masseverlust möglich, da in Abbildung 5.2-14 bereits der Zusammenhang zwischen entstehender Glukose und resultierendem Masseverlust gezeigt wurde. Damit ist es möglich, sehr viel schneller den Abbau der Fasern nachzuweisen und mögliche Reaktionsbedingungen festzulegen. Zudem kann jetzt eine Freisetzung einer Substanz aus der Faser parallel zu ihrem enzymatischen Abbau imitiert werden. Durch die schnelle und unkomplizierte Methode der Absorptionsmessung des freiwerdenden Remazols können die optimalen Reaktionsbedingungen gefunden. In dem folgenden Versuch wurden gefärbte Baumwollfasern für eine Dauer von 30 h mit Cellulase (Temperaturoptimum 37°C und ph-Wert-Optimum 5) behandelt. Hierbei sollte die entstandene Konzentration an Remazol verfolgt werden. Zusätzlich wurden die

Reaktionsbedingungen Temperatur (25°C und 37°C) und pH-Wert (5 und 7,4) variiert, um die besten Bedingungen festlegen zu können. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5.2-19 dargestellt.

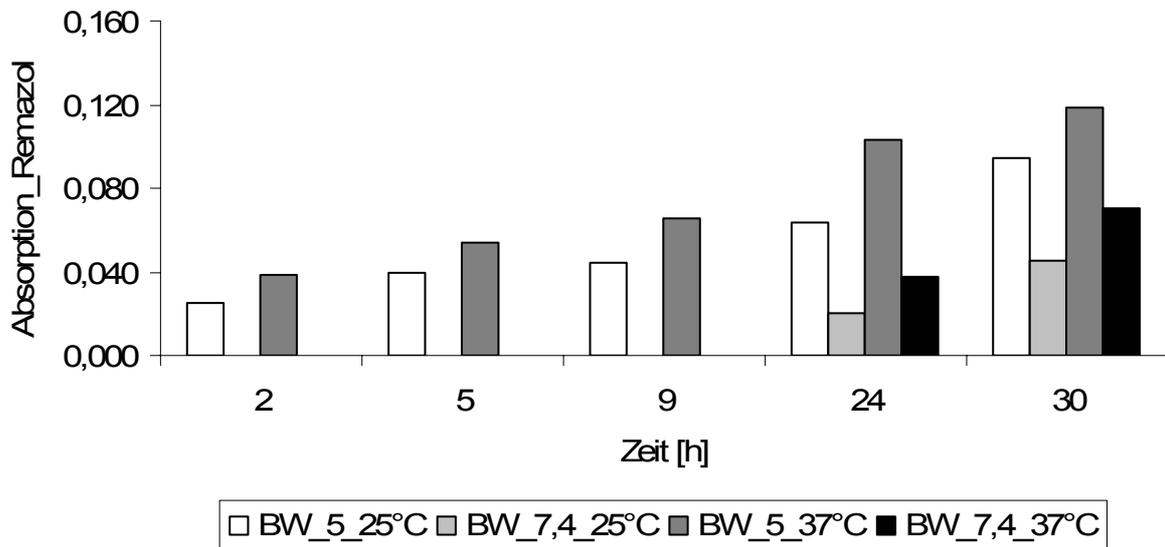


Abbildung 5.2-19 Darstellung der Freisetzung von Remazol aus Baumwolle unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

Mit Hilfe des obigen Diagramms lässt sich zum einen erkennen, dass eine Verwendung von Remazol durchaus ein Indikator für das Freisetzungverhalten einer Substanz aus der Faser parallel zu deren Abbau darstellen kann. Zum anderen ist es möglich, klar zwischen den Reaktionseinflüssen Temperatur und pH-Wert zu unterscheiden. So ist der Einfluss des pH-Wertes wichtiger für das Erreichen hoher Umsatzraten als die Wahl der Temperatur. Bei 37°C und dem „falschen“ pH-Wert (BW_7,4_37°C) konnte erst nach 24h eine messbare Zerstörung der Faser festgestellt werden. Zudem ist bei einer niedrigen Temperatur bei optimalem pH-Wert (BW_5_25°C) von Beginn an eine gute Aktivität messbar. Die Firmenangaben über die optimalen Reaktionsbedingungen für die Cellulase konnten mit 37°C und einem pH-Wert von 5 bestätigt werden. Eine gleiche Versuchsreihe mit dem Material Viskose ergab identische Reaktionsverläufe,

die in Abbildung 5.2-18 gezeigt werden. In diesem Diagramm ist zusätzlich anhand der Werte für die Remazolabsorption zu erkennen, dass der Abbau wesentlich stärker stattfindet, als bei der Baumwolle.

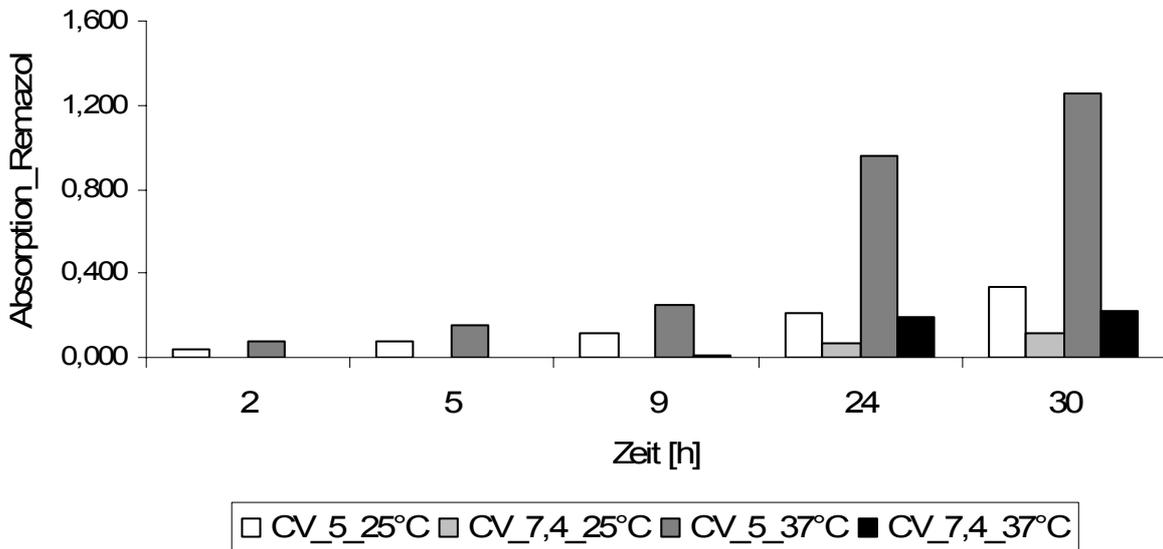


Abbildung 5.2-20 Darstellung der Freisetzung von Remazol aus Viskose unter verschiedenen Reaktionsbedingungen

5.2.4 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einfluss der Cellulase auf die Fasern geht mit großen Veränderungen in den physikochemischen Eigenschaften einher. Neben der Vergrößerung der spezifischen Oberfläche steigt auch das Wasserbindungsvermögen der Materialien, was sich bei einem Einsatz in der Wundheilung sehr positiv auswirken kann. Zusätzlich konnte ein starker Masseverlust der Fasern festgestellt werden, so dass das Erreichen des Teilziels, das Auflösen der Wundaufgabe, durchaus realistisch erscheint. In diesem Abschnitt konnte zudem festgestellt werden, dass eine geforderte Vorbehandlung der Materialien mit Säure nicht zu einem gesteigertem Masseverlust durch die Enzyme führt. Die Einwirkung der Säure zieht eine Senkung des Adsorptionspotentials der Fasern nach sich, was in einer nachweislich

reduzierten Cellulaseaktivität resultiert. Aufgrund der erzielten Ergebnisse scheint eine primäre Depolymerisation mit der Cellulase sinnvoller, zumal es bereits Arbeiten aus dem Textilbereich zu einem möglichen Recycling einer an Baumwolle adsorbierten Cellulase gibt (Azevedo, Bishop *et al.*, 2002). Dadurch würden sich die Materialeigenschaften in mehrfacher Hinsicht positiv verändern. Ein Anstieg in der spezifischen Oberfläche und im Wasserbindungsvermögen ließe mehr Beladung mit einem Wirkstoff zu. Das gesteigerte Adsorptionspotential könnte dann in einer zweiten Depolymerisation zu einer erhöhten Cellulolyse führen. Die primäre Depolymerisation sollte allerdings nicht zu einer zu starken Destruktion der Fasern führen, um noch eine ausreichende Verarbeitbarkeit des Gewebes zu gewährleisten. Mit dem Anfärben der Fasern mit Remazolblau konnte zum einen der cellulolytische Abbau sehr gut nachgewiesen werden und zum anderen stellte der Farbstoff eine Art Modellwirkstoff dar, der nur durch den enzymatischen Abbau der Fasern freigesetzt wird. Allerdings ist diese Art der Wirkstoff-Einbettung praktisch nicht möglich, da ständig neue Spaltprodukte entstehen (in diesem Fall: Wirkstoff und Kohlenhydrate), für die ein pharmakologischer Unbedenklichkeitsnachweis erbracht werden müsste.

5.3 EINFLUSS EINER CELLULASEBEHANDLUNG AUF DIE FILME

5.3.1 EINLEITUNG

Parallel zur Möglichkeit Cellulose-Fasern durch enzymatische Systeme abzubauen, sollte auch der Filmbildner Ethylcellulose unter diesem Gesichtspunkt untersucht werden. Die Möglichkeit Cellulosederivate enzymatisch abzubauen, ist bislang nur für wasserlösliche Arten, wie z.B. Hydroxypropylcellulose beschrieben (Kasulke, Dautzenberg *et al.*, 1983) worden. In dieser Arbeit soll für die Modifizierung der Freisetzung Ethylcellulose (Ethocel $\eta = 100$ cP, Dow Chemical, Midland, USA) eingesetzt werden, um über einen möglichst langen Zeitraum freisetzen zu können. Dies

ist nur mit einem wasserunlöslichen Cellulosederivat. Die Möglichkeit des enzymatischen Abbaus der Ethylcellulose ist zum einen wichtig für das Ziel der Auflösung der Wundauflage und zum anderen für die Beeinflussung und Steuerung der Freisetzung aus dem System. Bei der Untersuchung des enzymatischen Abbaus wurde die Cellulase sowohl dem Ethylcellulosefilm als auch dem Puffer (Phosphatpuffer pH 5) zugesetzt. Die Inkubation der Reaktionen erfolgte bei optimalen Reaktionsbedingungen für das jeweilige Enzymsystem.

5.3.2 INTEGRATION VON CELLULASE IN DEN FILM

Die Ergebnisse dieser Untersuchung erfolgten im Rahmen der Diplomarbeit von Rupp zur Thematik der Freisetzung eines Peptidarzneistoffes aus befilmten Baumwollmaterialien (Rupp, 2006). Hierin wurde eine Pulvercellulase in die Filmlösung suspendiert und die Filme inkubiert. Die Quantifizierung einer möglichen Degradation erfolgte durch die Bestimmung des Masseverlustes. Zur Ermittlung eines Vergleichswertes wurde eine denaturierte Cellulase in den Film integriert. Zwar war der Masseverlust bei der Verwendung dieser Cellulase etwas höher, jedoch waren keine signifikanten Unterschiede erkennbar.

5.3.3 INTEGRATION VON CELLULASE IN DAS PUFFERSYSTEM

Beim Einbau der Cellulase in den Ethylcellulosefilm trat sehr häufig das Problem des HerauslöSENS des Enzyms aus dem Film auf. Um dieses Problem auszuschließen, wurde die Cellulase (Cellusoft) in den Puffer gegeben, und so der Kontakt zum Substrat Ethylcellulose hergestellt werden. Als Trägermaterial wurde Baumwolle eingesetzt und diese mit verschiedenen Filmformulierungen beschichtet. Der Feststoffanteil der Filmlösungen betrug 7,5% (m/m) und das Lösungsmittel war Aceton (Applichem GmbH, Darmstadt, Deutschland). Die Filme wurden mit verschiedenen Konzentrationen an

Macrogol (PEG) (SigmaAldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland) bezogen auf die trockene Filmmasse und verschiedenen Molekulargewichten der Macrogole versetzt. Zusätzlich wurde die Anzahl der Filmschichten auf dem Träger variiert. Die Grundlage dieser Überlegungen bildete ein statistischer $2^{(3-0)}$ -Versuchsplan, in dem diese drei Faktoren mit eingeschlossen wurden. Die Konzentration an PEG variierte von 5% bis 25% bezogen auf den Film. Das PEG-Molekulargewicht lag in den Grenzen von 400 – 2000. Die Befilmung erfolgte einfach, dreifach oder vierfach. Das Befilmen der Träger erfolgte durch Eintauchen in die jeweilige Lösung, anschließendes Abstreifen und Trocknen im Vakuum. Die Einwirkdauer der Cellulase betrug von 24 h, wobei nach 2 h, 4 h, 6 h und nach 24 h die entstandene Menge an Glukose bestimmt wurde. Zudem wurden die Masseverluste der Materialien, analog der Bestimmung der Fasern, mit Cellulaseeinwirkung und reinem Pufferkontakt ermittelt. Der Einfluss der Filmkombinationen auf den resultierenden Masseverlust durch die Cellulase ist im Paretdiagramm der Abbildung 5.3-1 dargestellt. Diese Abbildung zeigt einen signifikanten Einfluss der Auftragshäufigkeit und der verwendeten PEG-Konzentration auf den enzymatisch bedingten Masseverlust. Je mehr Filmschichten aufgetragen sind, desto geringer ist der Masseverlust. Zudem steigt der Masseverlust mit einer steigenden Konzentration an PEG im Film. Das bedeutet, dass nach 24 h bei einer einfachen Befilmung der Träger mit abgebaut wurde. Denn nur so ist der signifikant geringere Masseverlust bei mehreren Filmschichten zu erklären. Der signifikante Einfluss der PEG-Konzentration ist nachvollziehbar, denn durch den Kontakt mit dem Medium werden die PEG-Moleküle aus dem Film gewaschen und es resultiert eine erhöhte Porosität.

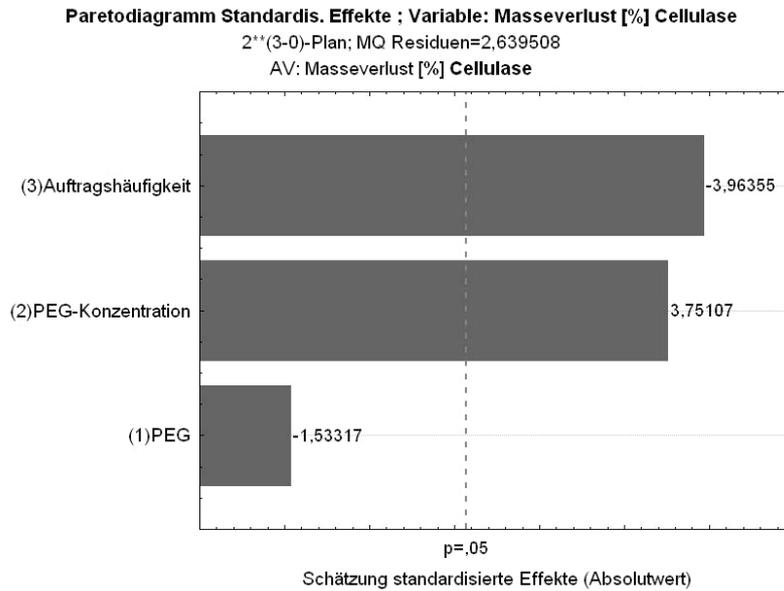


Abbildung 5.3-1 Paretdiagramm mit dem Einfluss verschiedener Filmkombinationen auf den Masseverlust nach 24stündiger Cellulasebehandlung

Diese Aussage lässt sich bei der Betrachtung des Paretdiagramms (Abbildung 5.3-2) für den Masseverlust bei der Verwendung von Puffer bestätigen.

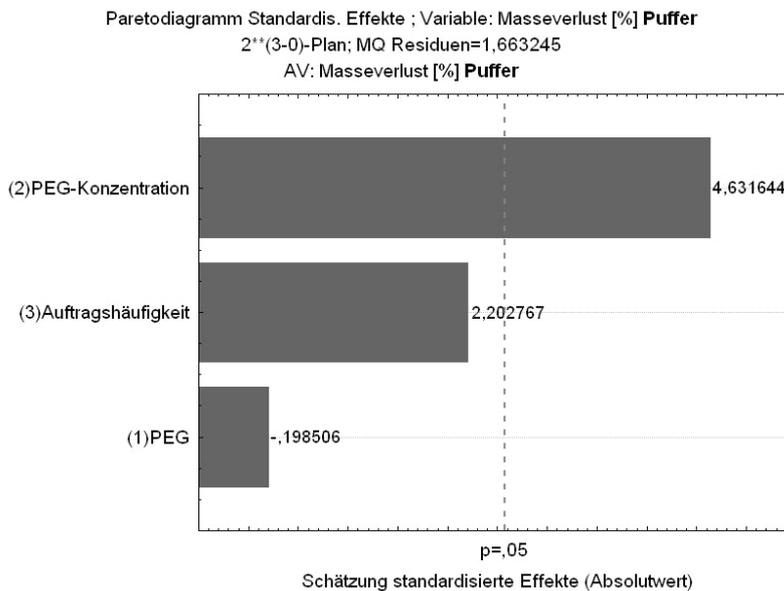


Abbildung 5.3-2 Paretdiagramm mit dem Einfluss verschiedener Filmkombinationen auf den Masseverlust nach 24stündiger Pufferbehandlung

In diesem Fall ist nur noch die PEG-Konzentration eine signifikante Einflussgröße im Bezug auf den Masseverlust. Zusätzlich ist der Abbildung zu entnehmen, dass mit einer erhöhten Auftragshäufikeit eine tendenzielle Erhöhung des Masseverlustes verknüpft ist. Dies wird allerdings mit dem erhöhten Anteil an auswaschbaren PEG-Molekülen zusammenhängen. Das Herauslösen der PEG-Moleküle aus dem Film lässt sich sehr gut mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen der mit Puffer behandelten Träger veranschaulichen. So ist in dem folgenden Bild (Abbildung 5.3-3) ein Träger mit einer vierfachen Befilmung (Ethylcellulose mit 5% PEG 2000) abgebildet, der 24 h dem Einfluss eines Puffers ausgesetzt wurde. Es sind eindeutig die Poren zu erkennen, die durch das Auswaschen des wasserlöslichen PEG entstanden sind.

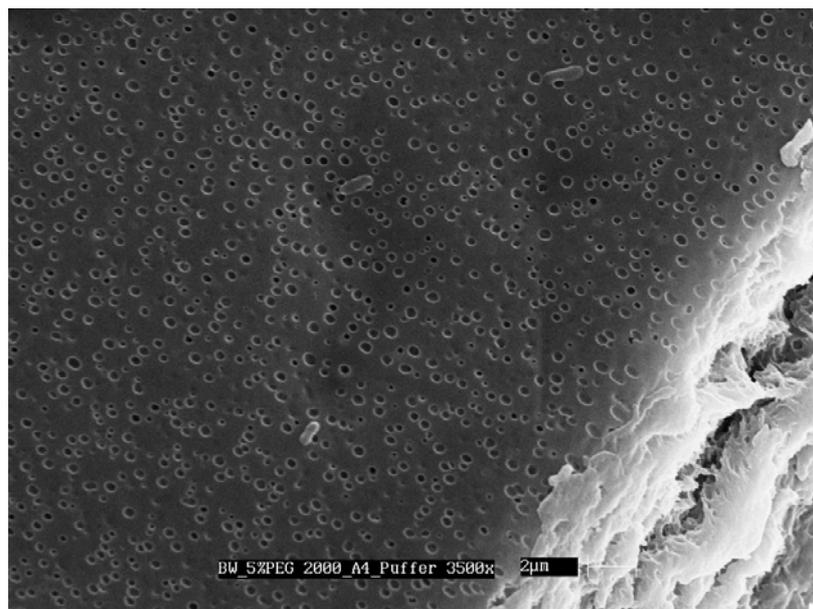


Abbildung 5.3-3 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme eines vierfach befilmten Baumwollträgers nach 24stündiger Pufferbehandlung

Aufgrund dieser Ergebnisse konnten allerdings noch keine Aussagen über die enzymatische Zersetzung des Films getroffen werden und eine genaue

Angabe der entstandenen Glukosemenge in Abhängigkeit der Filmkombination war erforderlich. Hierfür wurden, wie oben bereits erwähnt, die Glukosekonzentrationen nach 2 h, 4 h, 6 h und nach 24 h ermittelt. Diese sind im Diagramm der Abbildung 5.3-4 für jeden Film dargestellt. Die Bezeichnungen für die Filme sind zusätzlich abgebildet und sollen beispielhaft erläutert werden. Die Bezeichnung 400_5_1 steht für einen Ethylcellulosefilm mit 5% PEG des Molekulargewichts von 400, der einmal aufgetragen wurde. Nach diesem Schema sind auch die anderen Filme benannt.

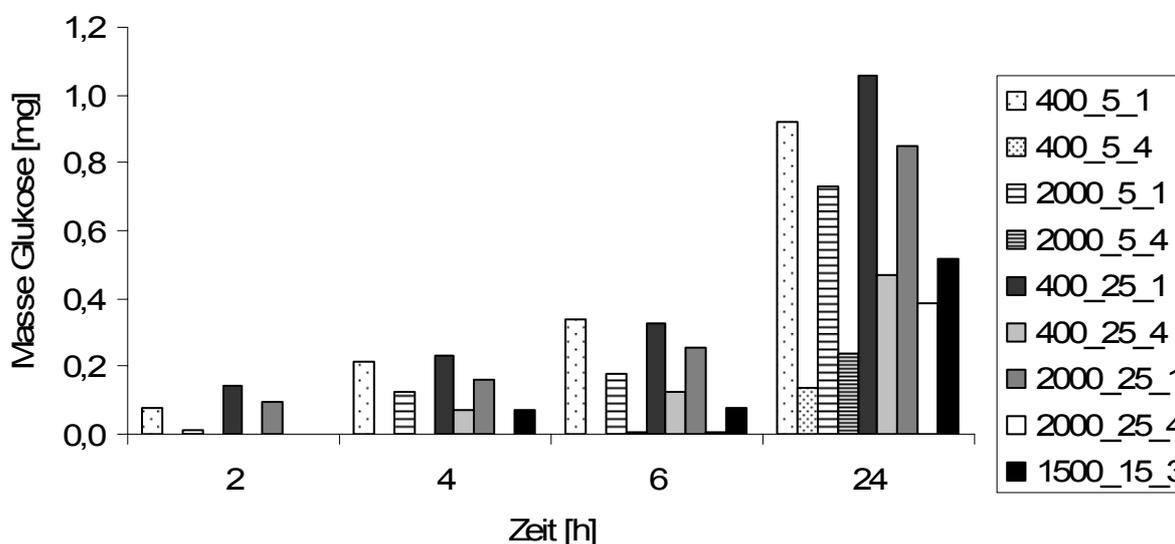


Abbildung 5.3-4 Darstellung der entstandenen Masse an Glukose über einen Zeitraum von 24 h in Abhängigkeit des Filmes

Eine Bestimmung der Glukosekonzentrationen war nach 2 h nur bei den einfach befilmten Materialien möglich. Zudem waren nach 24 h die Glukosemengen für die Träger mit einer Filmschicht am höchsten. Wenn man diesen Verlauf der entstandenen Glukosemenge betrachtet, ist deren Bestimmung nur dann sinnvoll, wenn die Sorption des Materials hoch ist. So kann bei der Charge 400_25_1 das PEG am schnellsten herausgelöst werden und das Enzym durch den Film zum Träger penetrieren. Wenn das Herauslösen des PEG, wie z.B. für die Charge 2000_5_1, schwieriger ist,

kann erst später (nach 4 h) ein Anstieg der Glukosekonzentration nachgewiesen werden. Eine nachweisbare cellulolytische Wirksamkeit ist dementsprechend eng an eine hohe Sorptionseigenschaft der Materialoberfläche gebunden. Dieser Zusammenhang soll mit dem folgenden Regressionsplot (Abbildung 5.3-5) veranschaulicht werden. Hierin wird die Massezunahme in der Dynamischen Wasserdampf Sorption bei einer Luftfeuchte von 90% gegen den entsprechenden Masseverlust der Charge aufgetragen. Zwar liegen einige Werte nicht in dem Vertrauensbereich von 95%, aber es ist eindeutig der Trend zu erkennen, dass mit einer erhöhten Sorptionseigenschaft des Materials auch ein verstärkter Masseverlust nach einer enzymatischen Degradation zu erkennen ist.

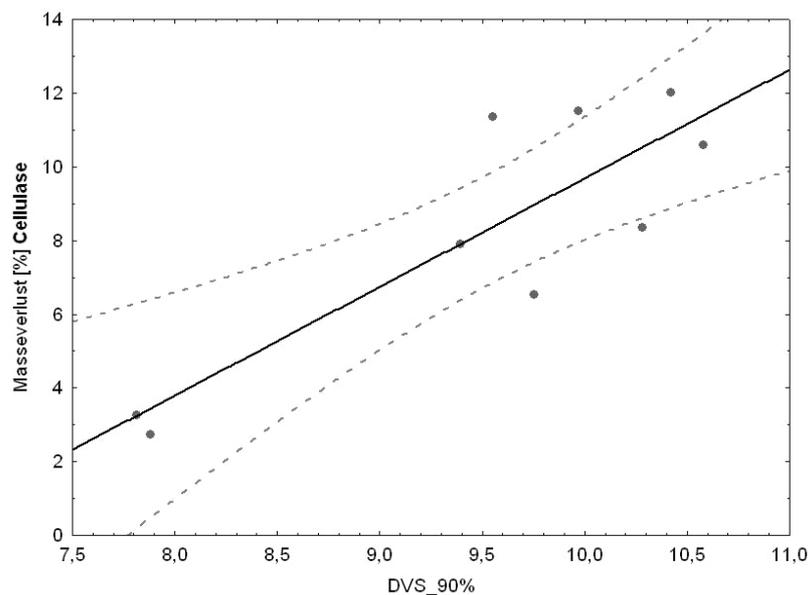


Abbildung 5.3-5 Regressionsplot Masseverlust des Trägers durch Cellulaseeinfluss gegen die Wasserdampfsorptionstendenz

Dementsprechend ist davon auszugehen, dass die Glukose nicht durch die Degradation des Filmes entsteht, sondern vom Trägermaterial Baumwolle abgespalten worden ist. Besonders auffällig wird dies beim ersten Wert (nach 2 h) dieser Messreihe. Die vierfach befilmten Träger bieten dem Enzym mehr

Substrat (in Form von Ethylcellulose), doch es ist keine Glukosekonzentration messbar. Erst nach 6 h können minimale Glukosekonzentrationen bestimmt werden, bei denen bereits der Abbau des Trägers vermutet werden kann. Damit ist davon auszugehen, dass der enzymatische Abbau nur auf die Fasermaterialien beschränkt ist. Ein Nachweis von Glukose, die ausschließlich vom abgebauten Film stammt, ist nicht möglich. Zumal die entstandenen Mengen an Glukose im Bereich von unbefilmter Baumwolle liegen (Abbildung 5.2-13), die ebenfalls 24 h mit Cellulase behandelt wurde. Der maximale Wert dieser Untersuchung (Charge 400_25_1) ist mit 1,06 mg sogar noch kleiner als beim unbefilmten Material ($m_{\text{Glukose}} = 1,18 \text{ mg}$). Eine Auswahl an rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 5.3-6) kann diese Aussagen bestätigen. Hierin ist zum einen einfach befilmte Baumwolle (2000_5_1) und zum anderen vierfach befilmte Baumwolle (2000_5_4) nach einer 24stündigen Cellulasebehandlung abgebildet.

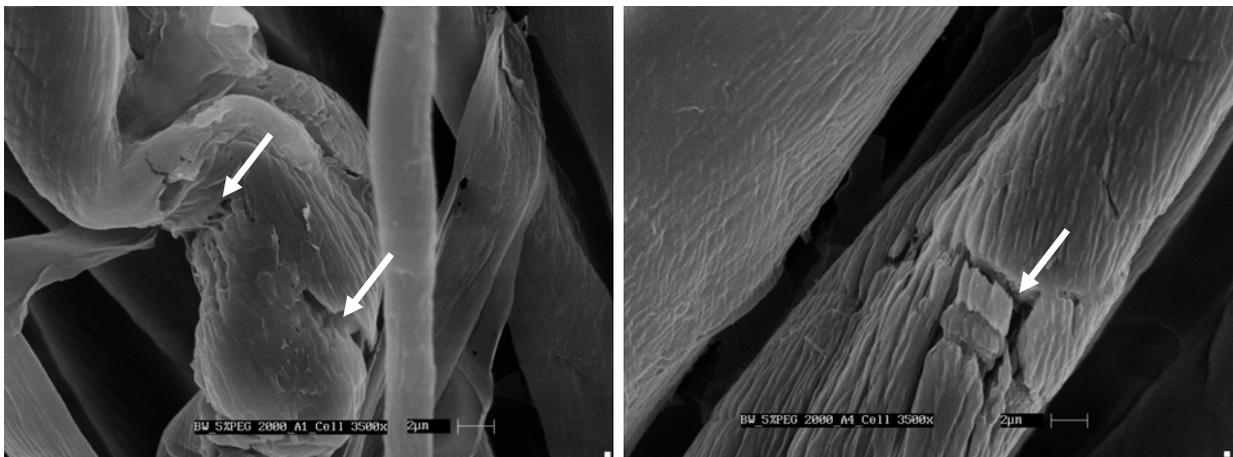


Abbildung 5.3-6 rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von einfach (links) und vierfach (rechts) befilmter Baumwolle nach 24stündiger Cellulasebehandlung

In den Aufnahmen ist eindeutig der fortgeschrittene enzymatische Abbau der Fasern zu erkennen. Sowohl bei der einfachen als auch bei der vierfachen Befilmung sind starke Destruktionen der Faserstruktur zu sehen. Damit lässt

sich die obige Aussage belegen, dass die nachweisbare Glukose von der Faser abgespalten wurde.

Abschließend sollen in der folgenden Tabelle die Masseverluste der verschieden befilmten Materialien zusammengefasst werden, um einen Vergleich untereinander und zur unbefilmten Baumwolle zu ermöglichen. Zusätzlich sind die Masseverluste durch den reinen Puffereinfluss mit abgebildet.

Tabelle 5.3-1 Zusammenfassung der Masseverluste der unterschiedlich befilmten Materialien nach 24stündiger Cellulase- und Pufferbehandlung

Chargenbezeichnung	Masseverlust [%] durch Cellulaseeinfluss	Masseverlust [%] durch Puffereinfluss
400_5_1	11,4	1,13
400_5_4	3,3	1,75
2000_5_1	7,9	1,04
2000_5_4	2,7	0,87
400_25_1	12,0	3,25
400_25_4	10,6	7,29
2000_25_1	11,5	3,68
2000_25_4	8,4	7,47
1500_15_3	6,5	2,55
unbefilmt	12,7	---

Der resultierende Masseverlust der Materialien nach der Cellulasebehandlung korreliert mit der entstandenen Glukosemenge. Allerdings konnte bei keinem der befilmten Materialien der Masseverlust der unbehandelten Baumwolle erreicht werden. Obwohl mit den Filmschichten theoretisch mehr Substrat zur Verfügung stand, kann man davon ausgehen, dass der enzymatische Abbau verlangsamt wird.

5.3.4 ZUSAMMENFASSUNG

Der enzymatische Abbau von befilmten Materialien ist möglich, allerdings konnten die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass nur das Trägermaterial und nicht der Film angegriffen wird. Weder die Einbettung der Cellulase in den Film noch deren Adsorption aus einem Puffer heraus, führten zu einem nachweislichen Filmabbau. Zusätzlich wurden Versuche mit der isolierten Ethylcellulose durchgeführt. So war es möglich diese mit Remazolblau anzufärben und blau gefärbte Filme zu produzieren, jedoch konnten keine Absorptionen bei $\lambda = 590$ nm gemessen werden. Eine Glukosebestimmung war ebenfalls nicht möglich. Die Bestimmung eines Masseverlustes der befilmten Materialien war jedoch durchführbar, womit der Einsatz von Ethylcellulose zur Beeinflussung der Freisetzung trotzdem denkbar ist.

6 STABILISIERUNG VON MADENSEKRET DER FLIEGENGATTUNG *LUCILIA SERICATA*

6.1 EINLEITUNG

In diesem Kapitel sollen die Ergebnisse zur Gewinnung und Stabilisierung des Therapeutikums, das Madensekret der Fliegengattung *Lucilia sericata*, zusammengefasst werden. Nach der Gewinnung der Madensekretionslösung und der Testung verschiedener Hilfsstoffe zur Stabilisierung der Lösung durch Gefriertrocknung sollten erste Versuche zur Einbindung des „Wirkstoffs“ in die Fasern gemacht werden. Für die Interpretation der erzielten Ergebnisse waren Erkenntnisse zu den physikochemischen Eigenschaften der Fasern sehr hilfreich.

6.2 GEWINNUNG VON MADENSEKRETIIONS-LÖSUNG

Zur Gewinnung von Madensekreten werden in der Literatur unterschiedliche Wege beschrieben. Prinzipiell können drei Möglichkeiten zur Sammlung der Madensekretionsprodukte unterschieden werden. In einer Arbeit von Thomas wurden die Maden mit einem geringen Anteil an sterilem Phosphatpuffer überschichtet, die Lösungen abgesaugt und gesammelt (Thomas, Andrews *et al.*, 1999). Für Studien zur enzymatischen Aktivität der Madensekrete verwendete Vistnes die Absonderungsprodukte der Maden in sterilem Wasser (Vistnes, Lee *et al.*, 1981). Schließlich kann das Sekret auch direkt mit einer Mikropipette abgesaugt werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst die Variante der direkten Sekretabsonderung näher untersucht, um eine möglichst hoch konzentrierte Lösung zu erhalten. Hierfür wurden die sterilen Larven der Fliegengattung *Lucilia sericata* (Polymedics, Peer, Belgien) in ein Reagenzglas gegeben. Außerdem wurde steriles Wasser (5% m/m bezogen auf das Gewicht der Maden) hinzugefügt und die Lösung nach einer Dauer von 2 h abgesaugt. Da die Maden durch den direkten Wundkontakt eine

Stimulation erfahren und dadurch mehr Sekret sezernieren, wurde ein gleicher Ansatz, um eine Stimulation zu fördern, zusätzlich mit einem Röhrchenschüttler (Vortex, Jahnke&Kunkel, Staufen, Deutschland) alle 5 min 20 s geschüttelt. Die erhaltenen Lösungen wurden über einen Zeitraum von 2 h kontinuierlich gesammelt und die Masse bestimmt. Die erhaltenen Ausbeuten an Sekretionslösung, bezogen auf die Madeneinwaage, sind in Abbildung 6.2-1 dargestellt. Hierbei wird die prozentuale Ausbeute an Sekretionslösung (bezogen auf die jeweils gleiche Einwaage) abgebildet. Besonders die Stimulation der Maden im Reagenzglas (Vortex) ermöglichte eine Erhöhung der Ausbeute an Sekretionslösung. Der Zusatz von sterilem Wasser konnte nicht zu einer Erhöhung an Ausbeute beitragen. Sowohl bei der Stimulation (Vortex+Wasser) als auch bei der unbehandelten Probe (Ruhe+Wasser) waren die resultierenden Massen jeweils geringer als bei den Ansätzen ohne Wasserzugabe.

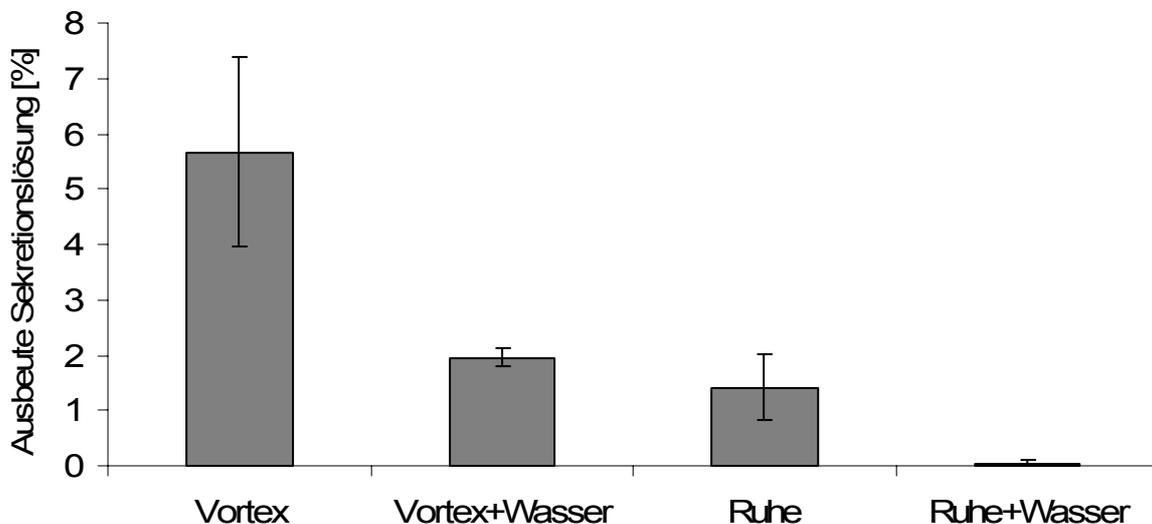


Abbildung 6.2-1 Darstellung der Ausbeute an Madensekretionslösung nach einer Dauer von 2 h

Eventuell kam es durch die geringe Zugabe an Wasser zu einem gegenteiligen Effekt, der die Sekretabsonderung der Maden erschwerte. Möglich ist sogar eine Wasseraufnahme durch die Maden, da die eingesetzte

Menge (5% m/m) nicht mehr abzupipettieren war. Insgesamt waren die Ausbeuten bei allen vier Ansätzen sehr gering (Maximalwert: *circa* 6 % bei Vortex), so dass durch diese Methode nicht genügend Sekretionslösung für die folgenden Studien gewonnen werden konnte. Deshalb wurde für die weiteren Untersuchungen die Methode von Thomas (1999) verwendet, bei der die Proben mit einer überschüssigen Menge an sterilem Phosphatpuffer pH 7,4 gewaschen wurden. Diese Waschlösung wurde gesammelt und für alle folgenden Arbeiten verwendet. Die Bereitstellung der Waschlösung erfolgte durch den Verbundprojektpartner Hohensteiner Institute (Bönningheim, Deutschland).

6.3 CHARAKTERISIERUNG DER MADENSEKRETIONS-LÖSUNG

Für die Evaluierung des Gefriertrocknungsprozesses wurde die Madensekretionslösung auf ihre Eigenschaften untersucht. Es sollten charakteristische Merkmale gefunden werden, die jeweils vor und nach der Gefriertrocknung miteinander verglichen werden konnten. Da die Zusammensetzung des Madensekretes sehr komplex und seine Wirkung nur selten auf das Vorhandensein einer einzelnen Komponente beschränkt ist, schien ein solcher Vergleich gut geeignet zu sein. Weiterhin existieren noch keine Tests (z.B. ELISA, ELLA), um die Aktivität bzw. den Gehalt der Madensekretionslösung spezifizieren zu können. Da laut Literatur der Wirkungsmechanismus auf mehrere Prinzipien, z.B. Antibiose (Thomas, Andrews *et al.*, 1999) und diverse Enzymaktivitäten (Vistnes, Lee *et al.*, 1981), zurückzuführen ist, wurden einige dieser Eigenschaften überprüft.

6.3.1 ANTIBIOTISCHE AKTIVITÄT

6.3.1.1 Madensekretionslösung

Für die Testung auf antibiotische Eigenschaften der isolierten Madensekretionslösung wurden typische Entzündungskeime (Gardner, Frantz *et al.*, 2004) wie z.B. *Staphylococcus aureus* (ATCC 6538) und *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 9027) (DSMZ, Braunschweig, Deutschland) verwendet. Hierfür wurden je 0,2 ml Keimsuspension (*circa* 10^3 KBE/ml) und 0,2 ml Madensekretionslösung zusammengegeben. Die Inkubation von 0,1 ml dieses Gemisches erfolgte in 0,9 ml CASO-Bouillon (Casein-, Soja-Pepton, Merck Microbiology, Darmstadt, Deutschland) über 18 h bei einer Temperatur von 34°C. Die nach dieser Zeit ermittelte Keimzahl für beide Testkeime ist in Abbildung 6.3-1 dargestellt.

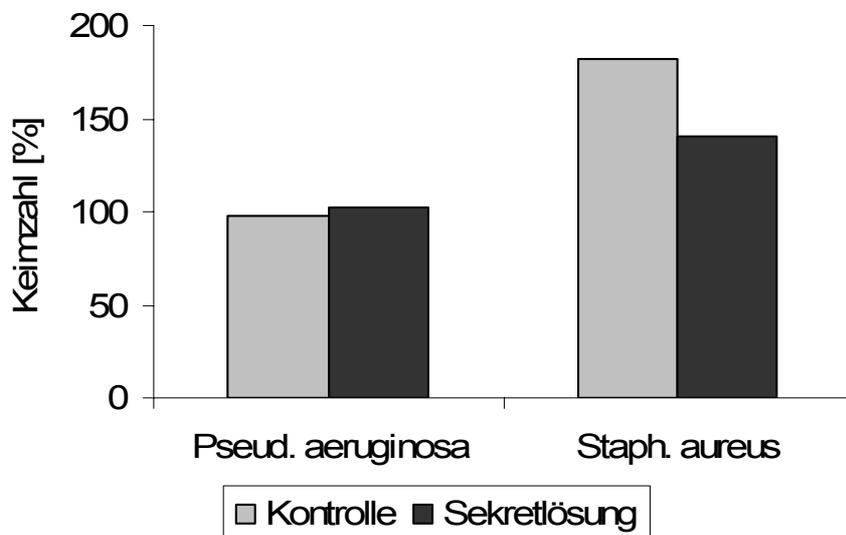


Abbildung 6.3-1 Darstellung der Keimzahl zur Bestimmung der antibiotischen Aktivität der isolierten Madensekretionslösung

In den Kontrollen wurde die Madensekretionslösung durch 0,2 ml sterile Kochsalzlösung ersetzt. Wie die obige Abbildung zeigt, konnte bei beiden Testkeimen keine antibiotische Wirkung *in vitro* nachgewiesen werden. Beim

Keim *Pseudomonas aeruginosa* war die Keimzahl nach Zugabe von Sekretionslösung genauso hoch wie beim Kontrollwert. Der Test mit *Staphylococcus aureus* ergab zwar bei der Sekretlösung eine geringere Keimzahl als beim Kontrollwert, aber der ermittelte Wert ist mit über 100% (Keimzahl zum Zeitpunkt $t = 0$) zu hoch, um eine Antibiose zu bestätigen. In der Wiederholung dieses Versuches konnte ebenfalls kein antibiotischer Effekt der Madensekretionslösung gefunden werden. Dieses Ergebnis widerspricht einer häufig in der Literatur beschriebenen bakteriziden Wirkung der isolierten Madensekretionslösung. Für eine Verifizierung dieser Aussage wurden ergänzend die isolierten Maden untersucht.

6.3.1.2 Isolierte Maden

Für die Untersuchung der antibiotischen Eigenschaften der isolierten Maden wurden verschiedene Methoden eingesetzt.

Krabbelversuch

Je 2 ml einer Suspension jedes Testkeimes wurden auf der Oberfläche von frischen CASO-Agarplatten (Merck Microbiology, Darmstadt, Deutschland) ausgespatelt. Anschließend wurden je 10 Maden für 10 min bei Raumtemperatur auf jeder der beiden Platten laufen gelassen. Nach Entfernen der Maden und einer Inkubation der Platten bei 34°C für die Dauer von 2 Tagen wurden diese auf ihre Laufspuren hin untersucht. Ein reduziertes Keimwachstum war auf keiner der inkubierten Agar-Platten zu erkennen. Demnach kann nicht von aktiv sezernierten antibiotisch wirksamen Stoffen ausgegangen werden.

Turbidimetrie

In einer Bakteriensuspension (*circa* 10^3 KBE/ml) wurden je 10 Maden bei einer Temperatur von 34°C für einen Zeitraum von 18 h inkubiert. Die Trübung dieser Suspension und einer entsprechenden Kontrolle ohne Maden wurde zu Beginn der Messung und nach der Inkubation bestimmt. Die Resultate dieser Messung sind in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Tabelle 6.3-1 Darstellung der Absorptionen der turbidimetrischen Messung einer Bakteriensuspension mit Maden

	Beginn	Nach 18 Stunden
<i>Pseud. aeruginosa</i> + Maden	0,06	0,11
<i>Staph. aureus</i> + Maden	0,06	0,12
Kontrolle (<i>Pseud. aeruginosa</i>)	0,06	0,07

Es kam zu einer Verdopplung der Absorptionen, was auf einen hohen Anstieg der Keimzahl schließen lässt. Bei einem bakteriziden Effekt der Sekretionsprodukte wäre nach 18 h eine Abnahme gegenüber dem Wert zu Beginn des Versuches zu erwarten gewesen. Beim Kontrollwert mit dem Testkeim *Pseudomonas aeruginosa* konnte ein derartiges Keimwachstum nicht festgestellt werden.

Exposition der Maden in einer Bakteriensuspension

Jeweils 10 Maden wurden in einer Bakteriensuspension (*circa* 10^3 KBE/ml; Medium: CASO-Bouillon) bei Raumtemperatur inkubiert. Über einen Zeitraum von 120 min wurde alle 30 min eine Probe entnommen und jeweils die Keimzahl bestimmt. Der Verlauf der Keimzahlentwicklung ist in Abbildung 6.3-2 dargestellt.

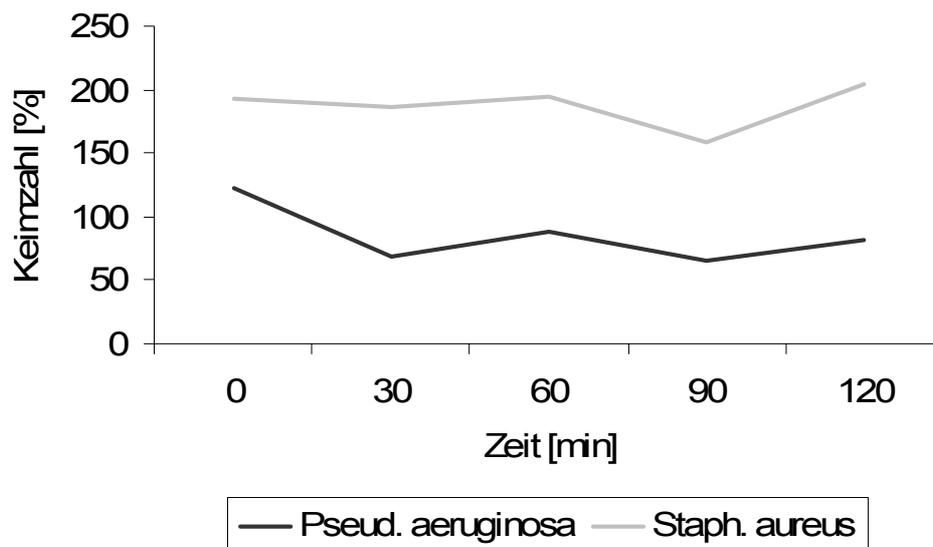


Abbildung 6.3-2 Darstellung der Keimzahlen der Bakteriensuspensionen über eine Dauer von 2 h

In dieser Versuchsreihe konnte erneut keine antibiotische Eigenschaft der Maden *in vitro* nachgewiesen werden. Wie in den beiden obigen Versuchen mit isolierten Maden wurde höchstens vereinzelt eine Bakteriostase ermittelt. Für einen antibiotischen Effekt hätte eine Reduktion um mindestens 2 log-Stufen, das heißt eine Verminderung der Keimzahl auf 1%, stattfinden müssen. Die Abbildung 6.3-2 zeigt sogar eine Erhöhung der Keimzahl beim Testkeim *Staphylococcus aureus*. Um diesen Anstieg genauer zu untersuchen, wurde eine Charakterisierung des Keimspektrums durchgeführt. Im Rahmen dieser Analyse konnte der Keim *Proteus mirabilis* identifiziert werden. Dies ist ein typischer Keim, welcher im Mitteldarm der Maden vorkommt und normalerweise bakterizid wirken soll (Greenberg, 1968).

Die obigen Versuche zur Untersuchung der Antibiose von isolierten Maden zeigten das gleiche Ergebnis wie die Tests mit der Madensekretionslösung. An den in dieser Studie verwendeten Maden und auch an deren isolierter Sekretionslösung konnten keine antibiotischen Eigenschaften festgestellt werden.

6.3.2 ENZYMATISCHE AKTIVITÄT

Die Messungen der enzymatischen Aktivitäten der Madensekretionslösung wurden nur für die tryptische und die Leucinaminopeptidase-Aktivität (LAP) durchgeführt, da hier die höchsten Werte erwartet wurden (Vistnes, Lee *et al.*, 1981).

Da es bei der Herstellung der Formulierungen zur Gefriertrocknung zu einer Halbierung der Konzentration der Sekretionslösung kommt (Verhältnis von Hilfsstofflösung und Sekretionslösung entspricht 1:1), wurde diese zunächst mit einem Trispuffer pH 7,4 in einem Verhältnis von 1:1 verdünnt. Die ermittelten Aktivitäten (Abbildung 6.3-3) lagen in einem Bereich, welcher auch in Studien von Vistnes (1981) für die Fliegengattung *Calliphora erythrocephala* nachgewiesen werden konnte. Auch das Verhältnis beider Aktivitäten zueinander ist ähnlich.

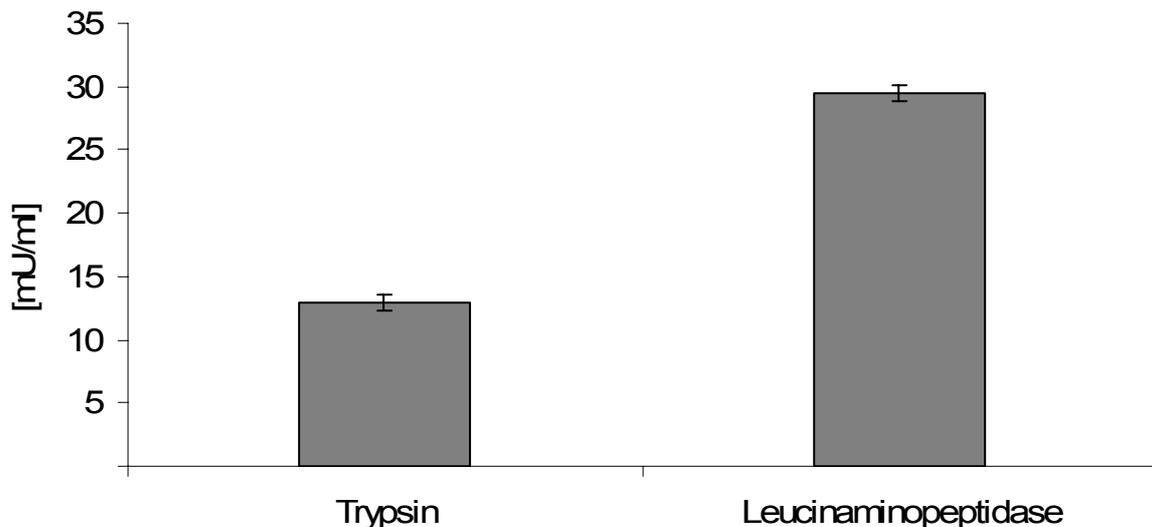


Abbildung 6.3-3 Enzymatische Aktivitäten der Madensekretionslösung (mit Trispuffer (pH 7,4) 1:1 verdünnt)

6.4 GEFRIERTROCKNUNG DER MADENSEKRETIONSLösUNG

6.4.1 EIGENSTABILISIERUNG UND EINSATZ EINER OBERFLÄCHENAKTIVEN SUBSTANZ

Zu Beginn der Entwicklung einer geeigneten Rezeptur für die Gefriertrocknung wurde zunächst die isolierte Madensekretionslösung (Enzym_0T) ohne Hilfsstoffe getrocknet. Hierfür wurde die Sekretionslösung mit Trispuffer pH 7,4 in einem Verhältnis von 1:1 gemischt. Zusätzlich wurde eine mögliche oberflächenprotektive Eigenschaft des Tensides Polysorbat 80 (Tween 80) untersucht. Zu diesem Zweck wurde das Tensid in Konzentrationen von 0,025% und 0,05% (Enzym_0,025T und Enzym_0,05T) eingesetzt. Die Ergebnisse der enzymatischen Aktivitäten nach der Rekonstitution dieser Proben sind in Abbildung 6.4-1 abgebildet.

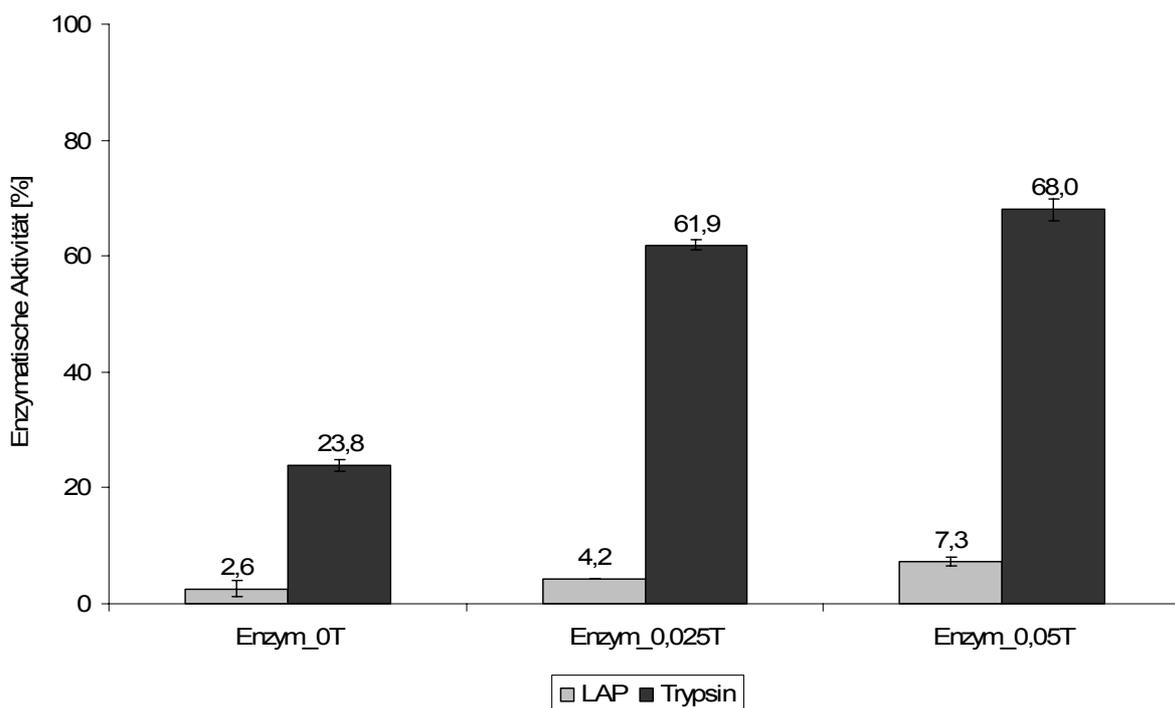


Abbildung 6.4-1 Enzymatische Aktivitäten der reinen lyophilisierten Madensekretionslösung und der Einfluss steigender Tensidkonzentrationen

Bekanntermaßen sind Proteine in Lösungen in der Lage, ihre Aktivität in einem bestimmten Maß selbst zu stabilisieren (Allison, Dong *et al.*, 1996). Allerdings ist eine Eigenstabilisierung der isolierten Madensekretionslösung nicht zu erkennen. Besonders drastisch ist das Absinken der Leucinaminopeptidase-Aktivität (LAP) auf *circa* 2% des Ausgangswertes. Es scheint, dass die hier vorliegende Proteinkonzentration von *circa* 33 µg/ml zu gering war, um eine Stabilisierung zu erzielen und die Proteine vor einer lyophilisationsinduzierten Denaturierung zu schützen. Allerdings konnte die Proteinkonzentration nicht variiert werden, da es sich um ein natürliches Produkt handelt. Die tryptische Aktivität konnte sich ohne weitere Zusätze mit einer Rekonstitutionsaktivität von 23,8% relativ gut stabilisieren.

Bei der Verwendung der oberflächenaktiven Substanz Tween 80 kam es zu einer Verbesserung der enzymatischen Aktivitäten der rekonstituierten Lyophilisate in Abhängigkeit von der Tensid-Konzentration. Der Einsatz von Tween 80 schützt die Enzyme vor Oberflächendenaturierung während des Trocknungsprozesses bereits ab Konzentrationen von $\geq 0,01\%$ (Chang, Kendrick *et al.*, 1996). Diese Ergebnisse ließen sich im Rahmen dieser Studie bestätigen. Besonders bei einer Konzentration ab 0,025% Tween 80 ließ sich die tryptische Aktivität bereits um mehr als die Hälfte erhalten. Obwohl bei der Bestimmung der tryptischen Aktivität durch den Zusatz des Tensides gute Ergebnisse erzielt werden konnten, ist der Einsatz weiterer Hilfsstoffe notwendig, um noch bessere Aktivitäten nach der Rekonstitution zu erzielen. Bei Versuchen zur Konservierung der LAP reduzierte sich die Aktivität trotz einer Konzentration von 0,05% Tensid um über 90% gegenüber dem Ausgangswert.

6.4.2 STABILISIERUNG DURCH EINSATZ VERSCHIEDENER HILFSSTOFFMATRICES

Für die Entwicklung einer optimalen Formulierung zur Stabilisierung der Madensekretionslösung wurden verschiedene Hilfsstoffmatrices verwendet. Um einen besseren Überblick über den Einfluss der Hilfsstoffe zu erhalten, wurde jeweils die Aktivität des reinen Lyophilisates (Enzym_0T) und die Aktivität bei einem Zusatz von 0,05% Tensid (Enzym_0,05T) mit abgebildet. Zusätzlich erfolgt eine Übersicht über den Feuchtegehalt der einzelnen Lyophilisate, da dieser als ein wichtiger Aspekt bei der Diskussion der Stabilisierung der Aktivitäten angesehen werden kann. Normalerweise sollte der Feuchtegehalt einer lyophilisierten Proteinformulierung 2% nicht überschreiten (Daukas und Trappler, 1998). Verbleibendes Wasser kann die Aktivität sowohl indirekt als Weichmacher oder Reaktionsmedium als auch direkt als Edukt oder Produkt negativ beeinflussen (Shalaev und Zografis, 1996). Eine zu niedrige Restfeuchte kann sich allerdings auch negativ auf die Stabilität auswirken, da die Proteine durch eine fehlende Hydrathülle Assoziate bilden können, was zu einer schlechten Rekonstituierbarkeit und verminderter Aktivität führen kann (Essig, Oschmann *et al.*, 1993).

6.4.2.1 Maltodextrin

Maltodextrin (MD), ein Hydrolyseprodukt der Stärke, ist ein Polymer, das aus Glukoseeinheiten zusammengesetzt ist. Der Hydrolysegrad der Stärke wird über das Dextroseäquivalent (DE) genauer charakterisiert. Ein DE von 0 entspricht hierbei reiner Stärke, wobei eine vollständige Hydrolyse bis zum Monomer Glukose einem DE von 100 entsprechen würde. Maltodextrine sind Polymere mit einem DE zwischen 0 und 20. Ein bestimmter DE definiert nicht nur den Grad der Hydrolyse, sondern erlaubt auch Aussagen über weitere für den Gefriertrocknungsprozess wichtige Eigenschaften des Maltodextrins. Mit steigendem DE sinkt zum einen die Viskosität und die Inhibition des

Kristallwachstums, zum anderen steigt die Löslichkeit. Ein wichtiger Grund für die gute Eignung des MD als Hilfsstoff für die Gefriertrocknung ist der relativ hohe Glasübergangspunkt ($T_g \sim 169^\circ\text{C}$; (Taylor und Zografis, 1998)). Der Glasübergangspunkt (T_g) eines Polymers kann zusammen mit Proteinen den Glasübergangspunkt einer Lösung (T'_g) erhöhen. Oberhalb dieser Temperatur bewegen sich die Polymerketten komplett, während unterhalb dieses Temperaturbereiches im festen Zustand nur atomare Bewegungen stattfinden und Proteinabbaureaktionen nur sehr langsam ablaufen können (Levine und Slade, 1988). Deshalb sollte bei der Rezepturfindung eine Formulierung angestrebt werden, die einen amorphen Glaszustand ausbildet und somit eine Erhöhung der Viskosität zur Folge hat. Dadurch sind Umwandlungen und Relaxationen der Proteine eingeschränkt und es kommt zur Steigerung der Stabilität. Costantino (Costantino, Carrasquillo *et al.*, 1998) diskutiert sogar eine erhöhte Proteinstabilität durch generelle Erhöhung der T'_g s. Diese Aussage ist allerdings differenziert zu betrachten, da große Moleküle mit hohem T_g aufgrund sterischer Anordnungen nur sehr schwer Wasserstoffbrücken mit dem zu stabilisierenden Molekül ausbilden. Dadurch ist der lyoprotektive Effekt dieser Polymere begrenzt. Für eine optimale Stabilisierung ist deshalb beides wichtig: die Erhöhung der Glasübergangstemperatur und die Ausbildung vieler Wasserstoffbrückenbindungen.

Für die folgenden Versuche wurde ein Maltodextrin mit einem DE von 18,5 (C*Dry MD 01915, Cerestar GmbH, Krefeld, Deutschland) in folgenden Formulierungen verwendet: 10% MD ohne Tensid-Zusatz (0T_10MD) und mit 0,05% Tensid (0,05T_10MD) bzw. 5% MD mit 0,025% Tensid (0,025T_5MD). Die Ergebnisse der Enzymaktivitäten sind in Abbildung 6.4-2 dargestellt.

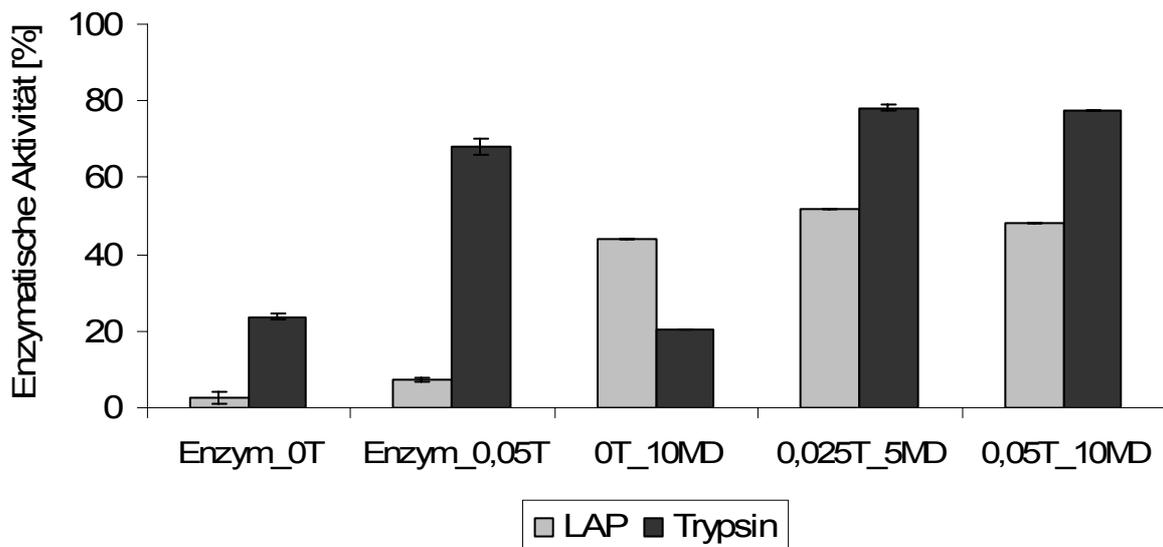


Abbildung 6.4-2 Darstellung der Enzymaktivitäten bei Verwendung des Hilfsstoffs Maltodextrin

Durch die Verwendung von MD und Tensid ließen sich beide Aktivitäten gut erhalten. Es fällt auf, dass sich für die Formulierungen mit 10% MD ohne Zusatz eines Tensids jeweils sehr schlechte Aktivitäten nach der Rekonstitution ergeben. Bei der tryptischen Aktivität ist dieser Wert sogar schlechter als der für die Lyophilisation des reinen Madensekrets (Enzym_0T). Die Eigenschaften des MD allein sind somit nicht geeignet, die Oberflächendenaturierung der Proteine für die tryptische Aktivität zu verhindern. Weiterhin könnten durch die Verwendung des relativ hohen DE von 18,5 das Kristallwachstum und die Viskositätsabnahme einen eher destabilisierenden Effekt im Rahmen der Lyophilisation zur Folge haben. Eine Kristallisation lässt sich bei Betrachtung des Röntgendiffraktogramms in Abbildung 6.4-3 allerdings nicht erkennen. Das dargestellte Röntgendiffraktogramm der Formulierung mit 0,05% Tensid und 10% Maltodextrin zeigt ein typisch amorphes Lyophilisat, das bei den meisten Rezepturen im Rahmen dieser Arbeit entstanden ist. Die Ausbildung einer amorphen Struktur spielt eine sehr wichtige Rolle, da diese unmittelbar mit der Proteinstabilität eines Produktes zusammenhängen kann (Gloger, Witthohn *et*

al., 2003; Izutsu, Yoshioka *et al.*, 1994). Dadurch lässt sich allerdings nur der Anstieg der LAP-Aktivität erklären, zumal die Lyophilisation der reinen Madensekretionslösung unter einer starken Ausbildung von kristallinen Bereichen durch die Salze der Pufferlösung erfolgte (Abbildung 6.4-3).

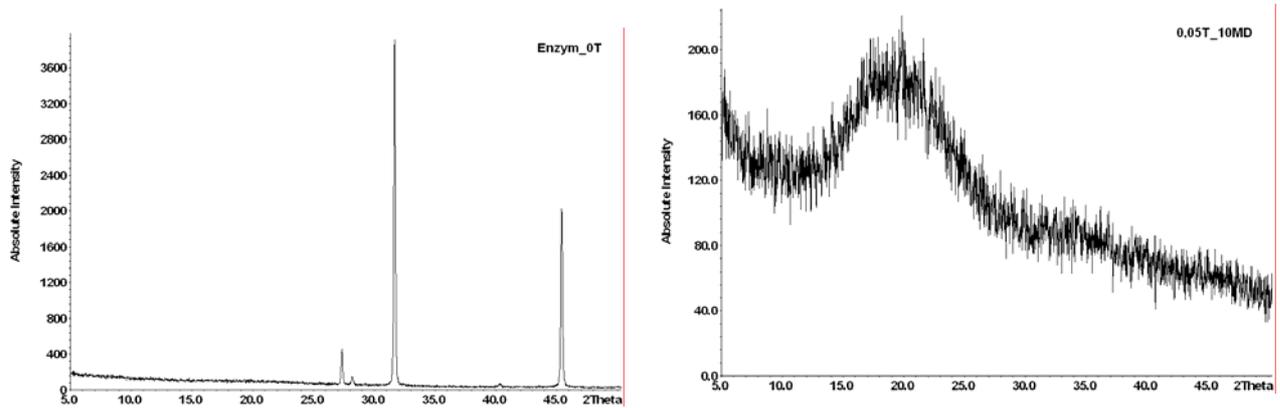


Abbildung 6.4-3 Röntgendiffraktogramme der Lyophilisate der reinen Madensekretionslösung (links) und einer Formulierung mit 0,05% Tensid und 10% Maltodextrin (rechts)

Bezüglich der Stabilisierung der LAP konnte durch den Zusatz des Hilfsstoffs eine enorme Steigerung der Rekonstitutionsaktivität erzielt werden. Dieser Wert war zwar nicht höher als *circa* 50% der Ausgangsaktivität, aber um das fünf bis sechsfache höher als die Aktivität der reinen lyophilisierten Madensekretionslösung.

Die Ausbildung der Amorphie ist für die tryptische Aktivität nicht so entscheidend, da nicht zwingend eine stetige Verbesserung der Aktivität durch einen erhöhten Hilfsstoffzusatz zu erzielen war.

Der unterschiedliche Feuchtegehalt der Formulierungen, angegeben in Tabelle 6.4-1, lässt keinerlei Rückschlüsse auf resultierende Aktivitäten zu.

Tabelle 6.4-1 Feuchtegehalt der Zubereitungen mit Maltodextrin

Enzym_0T	Enzym_0,05T	0T_10MD	0,025T_5MD	0,05T_10MD
0,34%	0,15%	2,99%	2,98%	3,92%

6.4.2.2 Hydroxypropylmethylcellulose

Das Polymer Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) ist ein Celluloseether, der aus Methylen- und Propylenchlorid sowie Alkalicellulose gewonnen wird (Kumar und Banker, 1993). Durch diese Modifikation der Cellulose erhält dieser Hilfsstoff Eigenschaften, die eine Verwendung als Kryoprotektor in der Gefriertrocknung ermöglichen (Nema und Avis, 1993). Als wasserlösliches Polymer wird zum einen die Viskosität einer Lösung erhöht, wodurch Abbaureaktionen und ein Zusammenfallen der Proteine reduziert werden können. Zum anderen können durch vorhandene Hydroxylgruppen ausreichend Wasserstoffbrückenbindungen mit dem Protein ausgebildet werden und der Hilfsstoff fungiert somit als „Wasserersatz“. Dadurch stabilisiert sich die Proteinstruktur und die Aktivität kann nach Rekonstitution aufrechterhalten werden. Diese Theorie wird als *water replacement theory* (Carpenter und Crowe, 1988) bezeichnet und dient als wesentliche Modellvorstellung für die Stabilisierung von Proteinen in getrocknetem Zustand.

Für die Versuche zur Stabilisierung der Madensekretionslösung wurde eine Hydroxypropylmethylcellulose (HPMC) der Firma ShinEtsu Chemicals (Metolose, Tokio, Japan) mit einer Viskosität $\eta = 50$ cP verwendet. Folgende Konzentrationen wurden eingesetzt: 1,5% und 3% Polymer (1,5HPMC und 3HPMC). Zusätzlich variierte der Tensideinsatz in den Konzentrationen 0%, 0,025% und 0,05% (0T, 0,025T und 0,05T). Die Rekonstitutionsaktivitäten sind in Abbildung 6.4-4 dargestellt.

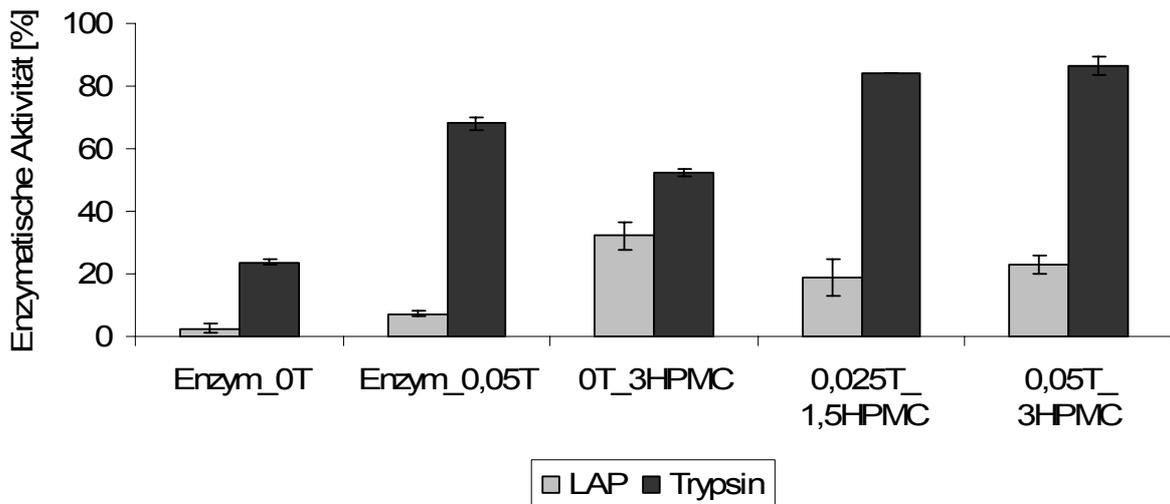


Abbildung 6.4-4 Darstellung der Enzymaktivitäten bei Verwendung des Hilfsstoffs Hydroxypropylmethylcellulose

Bei der Verwendung von HPMC ließen sich beide Aktivitäten grundlegend in den Resultaten unterscheiden. Während bei der Stabilisierung der LAP im Vergleich zu anderen Hilfsstoffen eher schlechte Aktivitäten erzielt werden konnten, ist besonders die Formulierung mit 0,05% Tensid und 3% Polymer mit *circa* 87% für die tryptische Aktivität als sehr positiv zu bewerten. Die Diskrepanz zwischen beiden Aktivitäten bei Verwendung dieses Hilfsstoffes ist besonders auffällig bei der Formulierung mit 0% Tensid und 3% HPMC. Während bei der LAP die beste Aktivität erzielt werden konnte, war die tryptische Aktivität schlechter als bei der Trocknung der reinen Sekretionslösung mit 0,05% Tensid-Zusatz. Durch Erhöhung der Tensidkonzentrationen wurden die LAP-Aktivitäten drastisch vermindert, wobei die tryptischen Aktivitäten auch im Vergleich zu anderen Polymeren sehr gut erhalten werden konnten.

Die hohe LAP-Aktivitätsabnahme kann wie folgt erklärt werden: Das Lyophilisat mit HPMC zeigte bei allen Formulierungen in der röntgendiffraktometrischen Untersuchung kristalline Bereiche (in Abbildung 6.4-5 ist dieses beispielhaft für die Rezeptur 0,05T_3HPMC abgebildet).

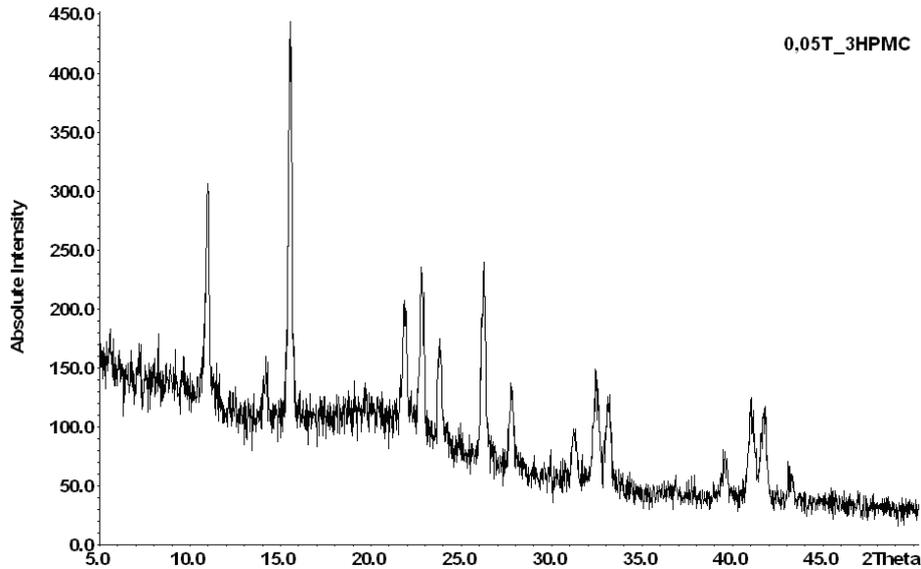


Abbildung 6.4-5 Röntgendiffraktogramm der lyophilisierten Formulierung 0,05T_3HPMC

Wie bereits erwähnt, sollten Hilfsstoffe idealerweise während der Gefriertrocknung einen amorphen Zustand erreichen, um ihren stabilisierenden Effekt ausüben zu können (Izutsu, Yoshioka *et al.*, 1994). Alle weiteren Hilfsstoffe dieser Studie erfüllten dieses Kriterium und die resultierenden LAP-Aktivitäten waren viel höher als bei der kristallin getrockneten Formulierung mit HPMC. Weiterhin ist der Feuchtegehalt (siehe Tabelle 6.4-2) der HPMC-Formulierungen im Gegensatz zu den anderen Hilfsstoffen auffällig gering. Dies ist normalerweise sehr erstrebenswert, kann sich aber auch negativ auf die Stabilität auswirken, da die Proteine durch eine fehlende Hydrathülle Assoziate bilden können, was zu einer schlechten Rekonstituierbarkeit und verminderter Aktivität führen kann (Essig, Oschmann *et al.*, 1993). Dieser Effekt, gepaart mit der entstandenen Kristallinität, könnte ein Grund für die auffällig niedrige Aktivität der Peptidase sein. Der Erhalt der tryptischen Aktivität mit Hilfe der HPMC ist dagegen gut möglich. Die entstandene Kristallinität scheint die Stabilität kaum zu beeinflussen. Der besonders niedrige Feuchtegehalt und eine erhöhte Viskosität im Verlauf der Trocknung sind entscheidend für die gute stabilisierende Wirkung.

Tabelle 6.4-2 Feuchtegehalt der Formulierungen mit Hydroxypropylmethylcellulose

Enzym_0T	Enzym_0,05T	0T_3HPMC	0,025T_1,5HPMC	0,05T_3HPMC
0,34%	0,15%	1,52%	0,73%	1,10%

6.4.2.3 Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Die Gewinnung des Hydroxypropyl- β -cyclodextrins (HP- β -CD) erfolgt biotechnologisch durch den Abbau von Stärken mit Cyclodextrin-Glycosyl-Transferasen. Die dadurch entstehenden Moleküle bestehen aus 7 cyclisch α -1,4-verknüpften Glukose-Einheiten. Das in dieser Arbeit verwendete HP- β -CD (Cavitron, Cerestar, Krefeld, Deutschland) konnte in einer Konzentration von 8% (m/m) (8HP- β -CD) noch vollständig gelöst werden. Die mittlere Konzentration betrug 4% (m/m) (4HP- β -CD). Wie bei den obigen Versuchen wurde ebenfalls mit Tensid-Zusätzen von 0,025% und 0,05% (0,025T/0,05T) gearbeitet.

Bei der Verwendung von HP- β -CD ist bei der LAP besonders auffällig, dass in der Kombination 0,025% Tensid und 4% HP- β -CD die höchste Stabilität erzielt werden konnte. Im Rahmen der tryptischen Aktivität konnte mit etwa 87% ebenfalls ein sehr guter Wert bestimmt werden (Abbildung 6.4-6).

HP- β -CD zeichnet sich durch gute lyoprotektive Eigenschaften aus (Izutsu, Yoshioka *et al.*, 1995). Der amphiphile Charakter des HP- β -CDs und die Fähigkeit zur Bildung amorpher Festkörper (Brewster, Hora *et al.*, 1991) scheinen wichtige Faktoren beim Erhalt der beiden Aktivitäten zu sein.

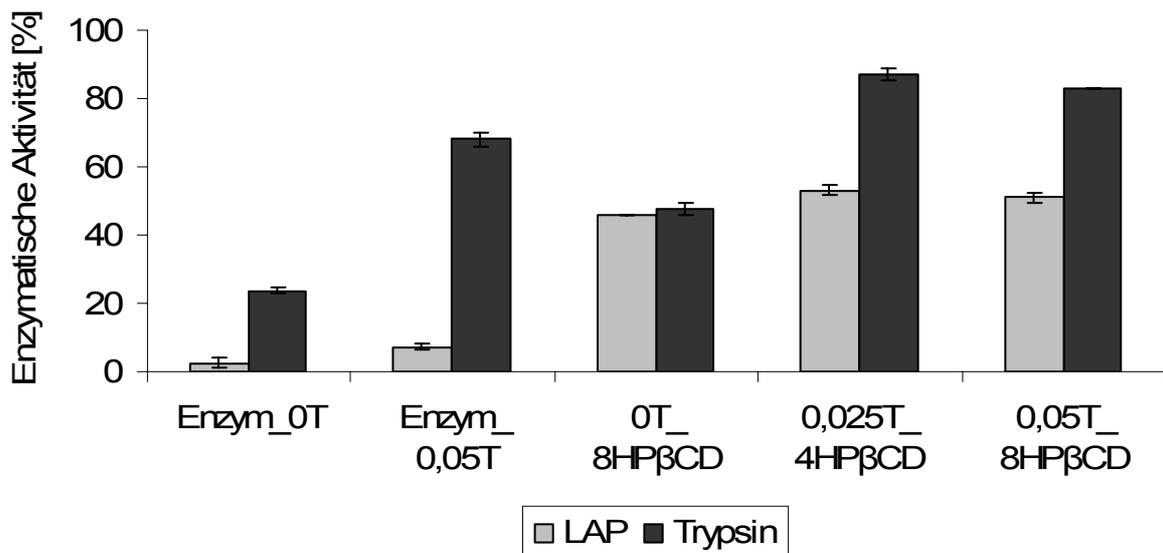


Abbildung 6.4-6 Darstellung der Enzymaktivitäten bei Verwendung des Hilfsstoffs Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Besonders auffällig sind die Ergebnisse bei reinem Hilfsstoff-Zusatz (OT_8 HP- β -CD), da hier beide Aktivitäten mit *circa* 45% im Gegensatz zu allen anderen Hilfsstoffen sehr ähnlich sind. Jedoch ließ sich bei Zusatz des Tensids erneut nur die tryptische Aktivität stark verbessern, wobei die LAP-Aktivität mit diesem Hilfsstoff den Maximalwert erzielen konnte.

Die in Tabelle 6.3-1 dargestellten Feuchtegehalte der Formulierungen liegen im Bereich der anderen Hilfsstoffe und sind daher nicht geeignet, entstandene Resultate bei den Aktivitäten zu erklären.

Tabelle 6.4-3 Feuchtegehalt der Formulierungen mit Hydroxypropyl- β -cyclodextrin

Enzym_OT	Enzym_0,05T	OT_8HP- β - CD	0,025T_4HP- β -CD	0,05T_8HP- β -CD
0,34%	0,15%	2,86%	3,64%	2,56%

6.4.2.4 Hydroxyethylstärke

In einer weiteren Versuchsreihe wurde der Einfluss des Hilfsstoffs Hydroxyethylstärke (HES) auf die Stabilisierung der enzymatischen Aktivitäten untersucht. Hydroxyethylstärke wird durch Hydroxyethylierung der freien Hydroxylgruppen des Stärkemoleküls mit Ethylenoxid gewonnen. Da es sich hier um einen Hilfsstoff handelt, der ähnlich wie Maltodextrin oder Dextran einen hohen Glasübergangspunkt von $> 110^{\circ}\text{C}$ (Crowe, Carpenter *et al.*, 1998) besitzt, sind auch hier gute Lyoprotektoreigenschaften zu erwarten. Neben der Erzeugung eines relativ hohen T_g der zu trocknenden Lösungen bildete sich ein vollständig amorpher Zustand (keine Abbildung des Röntgendiffraktogramms) aus, der für eine gute Proteinstabilität unentbehrlich ist (6.4.2.1). Die verwendete Hydroxyethylstärke der Firma Fresenius AG (HAES 450, Bad Homburg, Deutschland) wurde in den Konzentrationen 5% und 10% (5HES/10HES) eingesetzt. Zusätzlich wurde erneut der Einfluss eines Tensids in den Konzentrationen 0,025% und 0,05% (0,025T/0,05T) untersucht. Die Ergebnisse der Aktivitätsbestimmungen sind in Abbildung 6.4-7 dargestellt und zeigen eine gute Stabilisierung beider Aktivitäten.

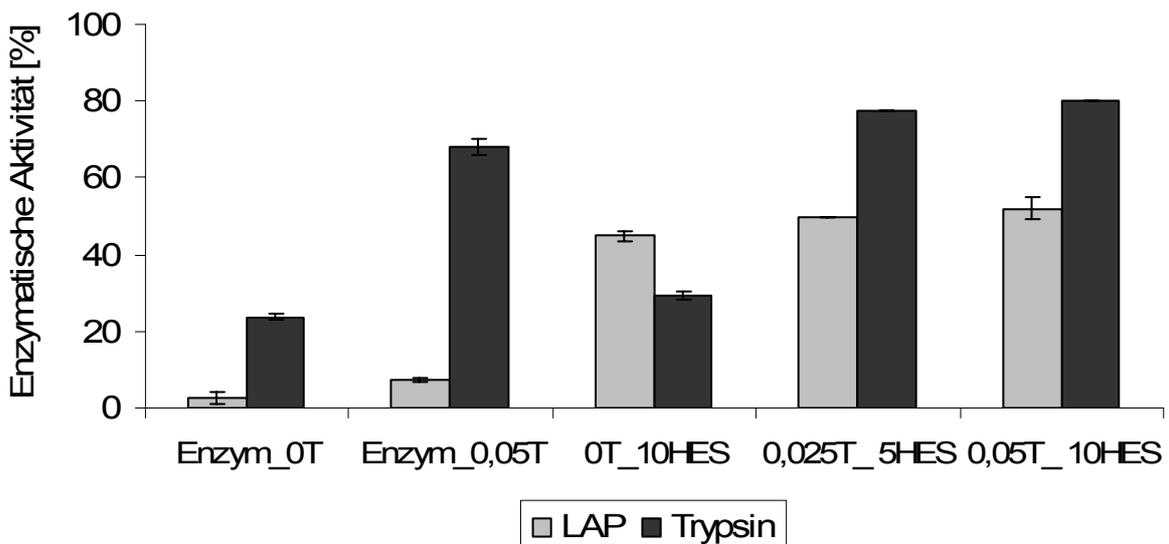


Abbildung 6.4-7 Darstellung der Enzymaktivitäten bei Verwendung des Hilfsstoffs Hydroxyethylstärke

Besonders die tryptische Aktivität konnte bei beiden Konzentrationen HES in Kombination mit dem Tensid gut stabilisiert werden. Auch hier wird erneut deutlich, dass eine Herabsetzung der Oberflächenspannung durch Zusatz eines Tensides besonders erforderlich ist. Nur durch den Einsatz der oberflächenaktiven Substanz konnte die tryptische Aktivität ausreichend erhalten werden (Enzym_0,05T; 0,025T_5HES; 0,05T_10HES). In der Stabilisierung der LAP sind wiederum keine Aktivitäten deutlich über 50% zu erzielen. Trotzdem konnten Ergebnisse anderer Studien zur Eignung des Hilfsstoffs Hydroxyethylstärke (Crowe, Carpenter *et al.*, 1998) für den Einsatz in der Lyophilisation bestätigt und gute Ergebnisse erzielt werden. In Tabelle 6.4-4 sind die Feuchtegehalte der HES-Formulierungen zusammengefasst.

Tabelle 6.4-4 Feuchtegehalt der Formulierungen mit Hydroxyethylstärke

Enzym_0T	Enzym_0,05T	0T_10HES	0,025T_5HES	0,05T_10HES
0,34%	0,15%	3,41%	3,16%	3,41%

6.4.2.5 Dextran, Trehalose und deren Kombination

In einer abschließenden Versuchsreihe wurde ein weiteres, häufig in der Gefriertrocknung verwendetes Polymer, das Dextran, untersucht. Dieser Hilfsstoff bildet amorphe Strukturen (Daten nicht abgebildet) aus und auch der hohe Glasübergangspunkt ist sehr wichtig für die Proteinstabilität während der Lyophilisation (6.4.2.1).

Allerdings kann sich die Größe des Moleküls auch negativ auf die Stabilisierung auswirken. Aufgrund sterischer Anordnungen könnten nur schwer Wasserstoffbrücken mit dem Protein ausgebildet werden. Dadurch ist der lyoprotektive Effekt dieser Polymere begrenzt. Es konnte gezeigt werden, dass ein Disaccharid wie z.B. Trehalose trotz signifikant niedrigerer Glasübergangstemperatur als Maltodextrin ein Enzym besser stabilisieren

kann (Rossi, Buera *et al.*, 1997). Um beide Effekte (Erhöhung der Glasübergangstemperatur und Ausbildung von Wasserstoffbrückenbindungen) miteinander zu verknüpfen, sind beide Hilfsstoffe bereits zusammen getestet und als sehr positiv bewertet worden (Allison, Manning *et al.*, 2000). Deshalb wurde auch in dieser Versuchsreihe eine Kombination aus Dextran T5 (Amersham Pharmacia Biotech AB, Upsala, Schweden) und Trehalose-Dihydrat (British Sugar, Peterborough, England) auf ihre Eignung getestet. Wie oben bereits erwähnt, wurden sowohl das Dextran und auch die Trehalose als Einzelkomponenten untersucht. Eine detaillierte Zusammensetzung der einzelnen Formulierungen gibt die Tabelle 6.4-5, in der zusätzlich die Feuchtegehalte mit angegeben sind.

Tabelle 6.4-5 Zusammensetzung und Feuchtegehalt der Formulierungen mit Dextran und Trehalose

	Dextran [%] (m/m)	Trehalose [%] (m/m)	Tween 80 [%] (m/m)	Feuchtegehalt [%]
Enzym_0T	---	---	---	0,34
Enzym_0,05T	---	---	0,05	0,15
0T_5Tre	---	5	---	4,29
0T_8Dex	8	---	---	5,58
0T_8Dex_5Tre		5	---	3,84
0,05T_5Tre	---	5	0,05	5,95
0,05T_8Dex	8	---	0,05	4,00
0,025T_4Dex_2,5Tre	4	2,5	0,025	4,89
0,05T_8Dex_5Tre	8	5	0,05	3,84

Für den Erhalt der LAP-Aktivität führte die Kombination aus Dextran und Trehalose zu einem vergleichsweise guten Ergebnis (Abbildung 6.4-8). Allerdings ist auch bei dieser Formulierung kein zufrieden stellendes Ergebnis erzielt worden. Die Verwendung der Einzelkomponenten ist schlechter zu bewerten als die Kombinationsformulierungen.

Bei der Konservierung der tryptischen Aktivität sind die Resultate genau gegensätzlich. Durch die Verwendung der Kombination war zwar eine gute Stabilisierung möglich, aber das Resultat liegt im Bereich der anderen verwendeten Polymere. Allerdings zeigte die Formulierung mit reiner Trehalose eine sehr gute Stabilität, denn nach der Rekonstitution konnte der Maximalwert aller Resultate in dieser Studie von 95% festgestellt werden. Eine mögliche Ursache könnte in der ausreichenden Ausbildung der Wasserstoffbrückenbindungen liegen, so dass eine Stabilisierung des Proteins durch ein flexibles Hilfsstoffmolekül gegeben ist.

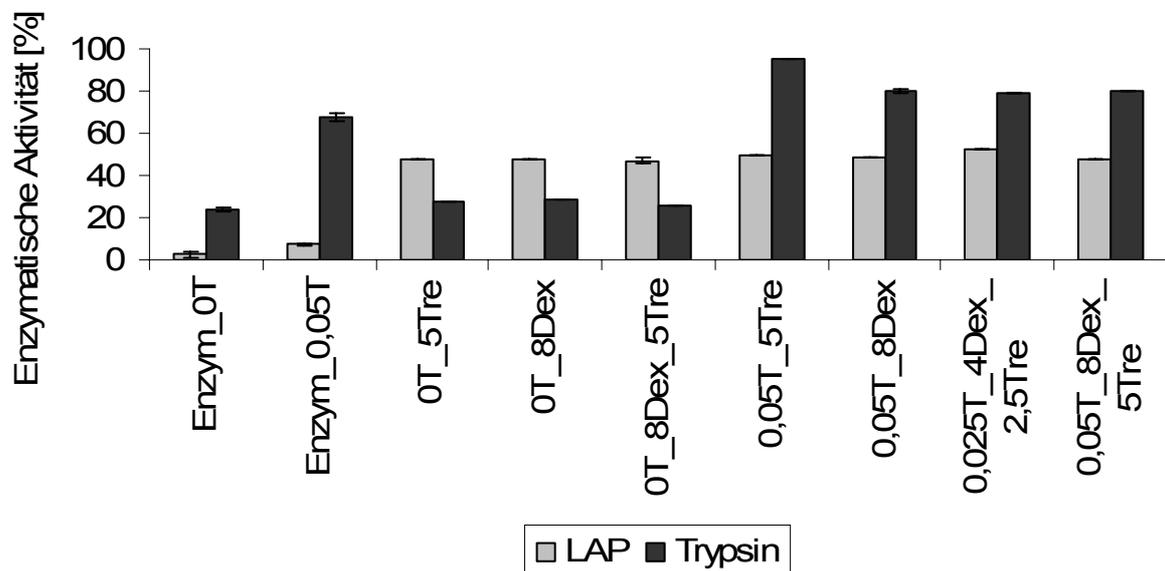


Abbildung 6.4-8 Darstellung der Enzymaktivitäten bei Verwendung der Hilfsstoffe Dextran und Trehalose und deren Kombination

6.4.2.6 Zusammenfassung

In den obigen Abschnitten konnte gezeigt werden, dass eine Stabilisierung von ausgewählten Komponenten der isolierten Madensekretionslösung der Fliegengattung *Lucilia sericata* durch eine Reihe von Hilfsstoffen möglich ist. Dabei wurden die beiden Enzymaktivitäten in einem sehr unterschiedlichen Maße konserviert. Deshalb ist es sehr schwierig eine Grundrezeptur festzulegen, die beide Aktivitäten in gleicher Weise stabilisieren kann.

Die Stabilisierung der LAP gestaltete sich als äußerst schwierig. In keiner der ausgewählten Formulierungen konnte ein Aktivitätsabfall um mindestens 50% verhindert werden. Wichtig für das Erzielen akzeptabler Ergebnisse war jedoch der Zusatz eines Lyo- bzw. Kryoprotektors, während auf den Einsatz eines Tensids durchaus verzichtet werden konnte. Die Abbildung 6.4-9 zeigt einen dreidimensionalen Flächenplot, in dem der Einfluss von Dextran und einem Tensid auf die Aktivität der LAP dargestellt ist.

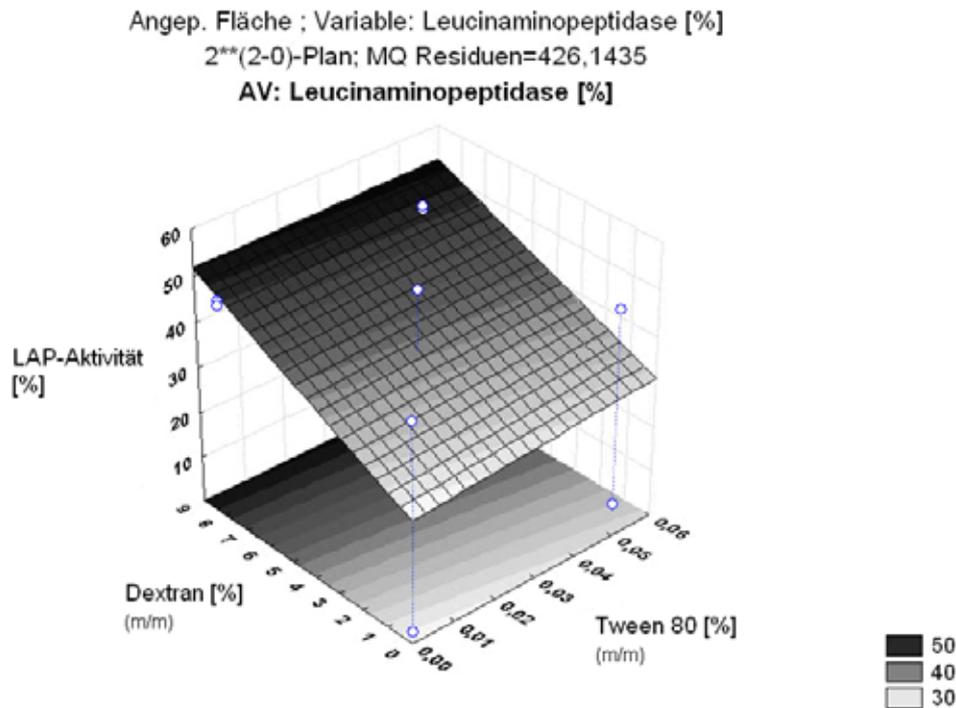


Abbildung 6.4-9 Einfluss von Dextran und Tween 80 auf die Leucinaminopeptidase-Aktivität

Ein Zusatz von Tensid bzw. eine Erhöhung dessen Konzentration erhöht nicht die Aktivität des Enzyms. Allerdings kommt es zu einer deutlichen Steigerung durch Zusatz des amorph getrockneten Polymers Dextran. Für eine effektive Erhöhung der Rekonstitutionsaktivität ist der Erhalt der Amorphie der Zubereitung von großer Bedeutung. In der Abbildung 6.4-10 sind zwei rasterelektronen-mikroskopische Aufnahmen dargestellt, in denen die Strukturen der Lyophilisate der reinen Madensekretionslösung und einer Dextranformulierung ersichtlich werden. Die Trocknung der reinen Sekretionslösung resultiert in einem sehr kristallinen Pulver durch die Salze der Pufferlösung. Diese Kristallinität konnte auch schon im Röntgen-diffraktogramm (siehe Abbildung 6.4-3) nachgewiesen werden. Aufgrund der stark ausgeprägten kristallinen Strukturen kommt es zu einer Denaturierung der Enzyme und zu einem drastischen Aktivitätsverlust nach Rekonstitution. Durch den Zusatz von Dextran entsteht eine amorphe, sehr homogene

Plättchenstruktur, wodurch die erhöhte Proteinstabilität begründet werden kann.

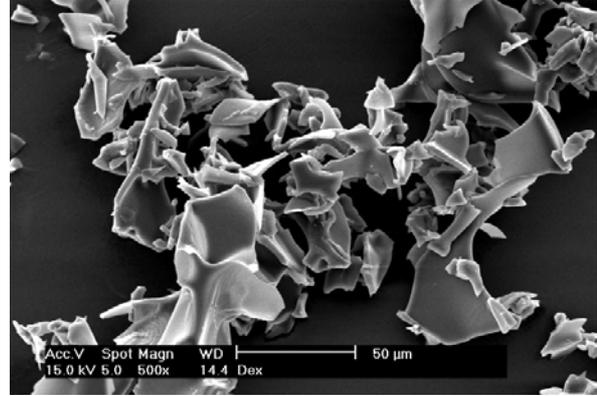
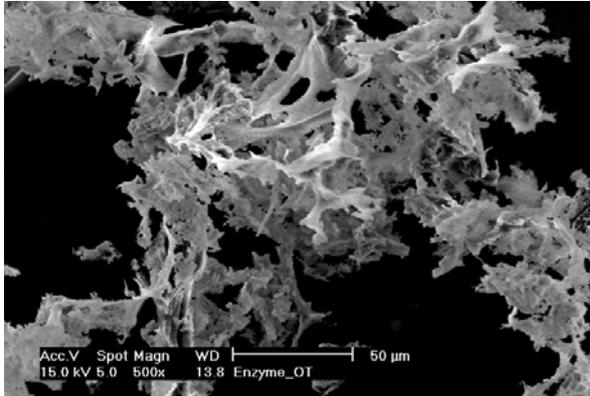


Abbildung 6.4-10 rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen der Lyophilisate der reinen Madensekretionslösung (links) und einer 8%igen Dextranformulierung (rechts)

Im Gegensatz zu den Ergebnissen der LAP-Stabilisierungsversuche wurden bei der tryptischen Aktivität sehr gute Stabilitäten mit bis zu 95% Rekonstitutionsaktivität erzielt. Mit allen eingesetzten Hilfsstoffgruppen konnten akzeptable Resultate ermittelt werden. Allerdings sind die Bedingungen abweichend von denen der Leucinaminopeptidase zu wählen. Die Abbildung 6.4-11 zeigt den Einfluss des Polymers Dextran und des Tensids Tween 80 auf die tryptische Aktivität. Der Zusatz bzw. die Erhöhung der Konzentration des Polymers ist in diesem Fall nicht der entscheidende Faktor für das Erzielen hoher Aktivitäten. Vielmehr ist für den Erhalt der tryptischen Aktivität der Schutz vor Oberflächendenaturierung durch den Einsatz eines Tensids der wesentlichste Aspekt, da gute Aktivitäten nur durch den Zusatz von Tensid zu erzielen sind.

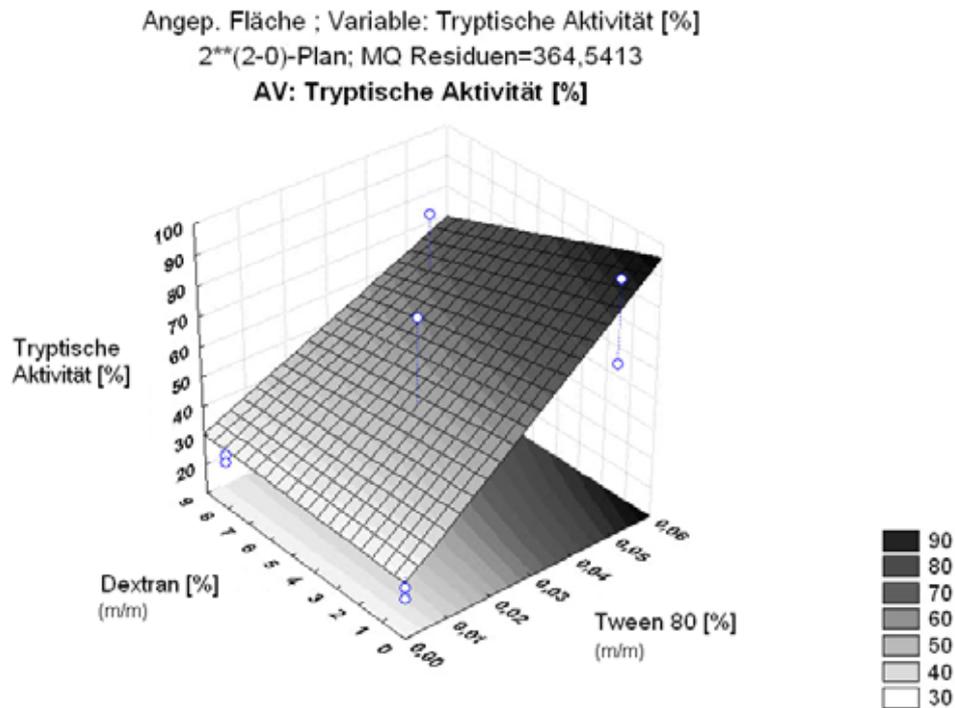


Abbildung 6.4-11 Einfluss von Dextran und Tween 80 auf die tryptische Aktivität

Der Einfluss des Tensids ist sogar signifikant, was sich anhand des in Abbildung 6.4-12 dargestellten Paretdiagramms zeigen lässt. Zusätzlich sind in dieser Abbildung die Bedingungen für die LAP dargestellt. Für die tryptische Aktivität spielt die Ausbildung amorpher Festkörper demnach nur eine untergeordnete Rolle, wenn ein ausreichender Zusatz an Tensid hinzugefügt wird. Eine Variation der Polymerkonzentration beeinflusst die Aktivität im hier gewählten Beispiel des Dextrans nur geringfügig, ist aber für alle weiteren verwendeten Polymere ähnlich.

Ein signifikanter Einfluss der Komponenten auf die Leucinaminopeptidase-Aktivität ist im abgebildeten Paretdiagramm (Abbildung 6.4-12) nicht zu erkennen, was erneut die Schwierigkeit im Rahmen der Stabilisierung widerspiegelt. Vielmehr wird nur der Trend aus Abbildung 6.4-9 bestätigt, dass durch eine Erhöhung der Hilfsstoffkonzentration entstehende amorphe Zubereitungen hohe Aktivitäten erzielen können.

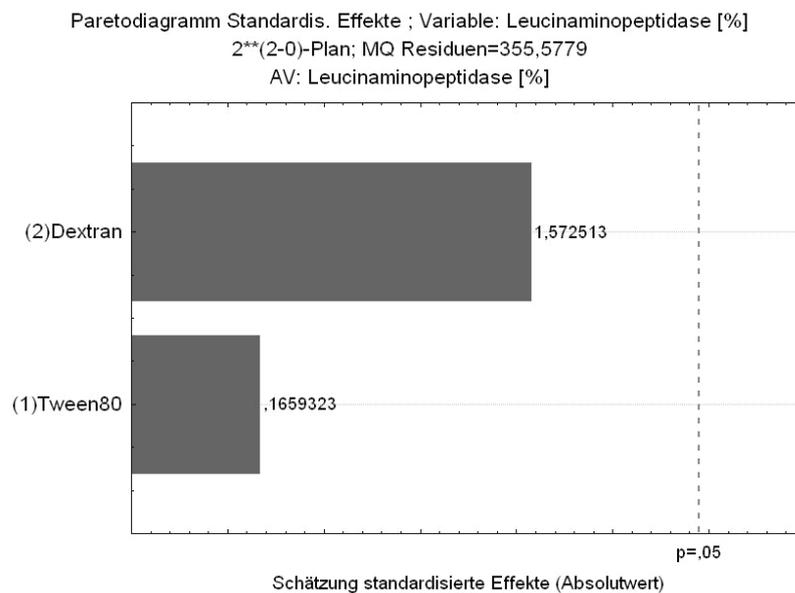
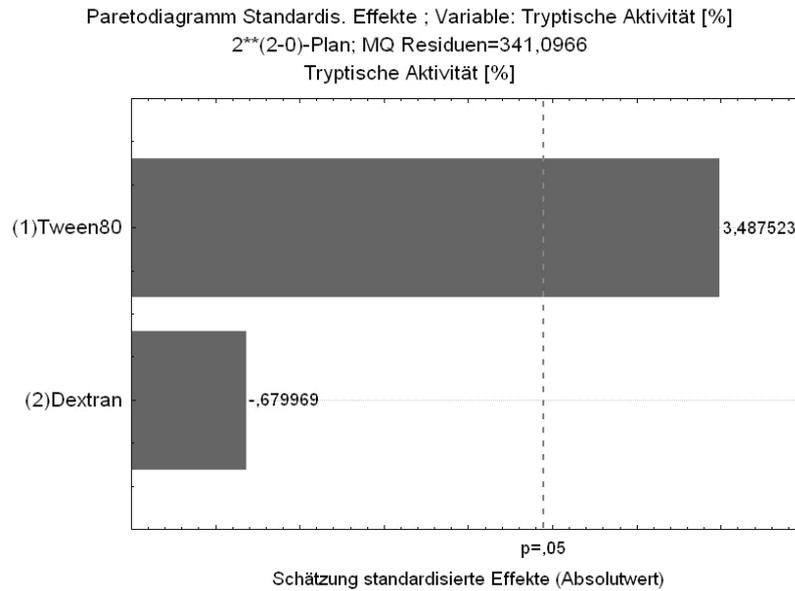


Abbildung 6.4-12 Paretdiagramme mit dem Einfluss eines Polymers und eines Tensids auf die tryptische Aktivität (oben) und die Leucinaminopeptidase-Aktivität (unten)

Für die weiteren Versuche wie das Aufbringen der Madensekretionslösung auf die Cellulose-Fasern wurden daher für die folgenden Versuche die neun effektivsten Formulierungen aus den Ergebnissen der tryptischen Aktivität verwendet. Diese sind mit Angabe der erzielten Aktivität in der folgenden Tabelle 6.4-6 nochmals zusammengestellt.

Tabelle 6.4-6 Zusammenfassung der effektivsten Formulierungen mit den jeweils erzielten Aktivitäten

Formulierung				Tryptische Aktivität [%]	LAP-Aktivität [%]
0,05%	Tween	+	5%	95,24	50,00
Trehalose					
0,025%	Tween	+	4%	87,07	53,13
Hydroxypropyl- β -cyclodextrin					
0,025%	Tween	+	1,5%	84,35	18,75
Hydroxypropylmethylcellulose					
0,05%	Tween	+	8%	82,99	51,04
Hydroxypropyl- β -cyclodextrin					
0,05%	Tween	+	10%	80,27	52,08
Hydroxyethylstärke					
0,025%	Tween	+	4% Dextran	78,91	52,08
+ 2,5% Trehalose					
0,025%	Tween	+	5%	78,23	52,15
Maltodextrin					
0,05%	Tween	+	10%	77,55	47,92
Maltodextrin					
0,025%	Tween	+	5%	77,45	46,95
Hydroxyethylstärke					

6.4.3 STABILISIERUNG DURCH HILFSSTOFFE UND FASER

Durchführung

Für das Herstellen einer Arzneistoff-beladenen Wundauflage wurden die Formulierungen bestehend aus Madensekretionslösung und Hilfsstoffen (siehe Tabelle 6.4-6) auf die Faser aufgebracht und unter Verwendung der Gefriertrocknung getrocknet. Hiermit sollte untersucht werden, ob es möglich ist, die Formulierungen auf der Faser dauerhaft zu fixieren. Weiterhin war es wichtig zu überprüfen, inwieweit verschiedene Fasermaterialien mit unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften einen zusätzlichen Einfluss auf die enzymatischen Aktivitäten ausüben. Für diese Untersuchungen wurden die beiden Materialien CV_50 und BW_1_30 (siehe Kapitel 5.1.1) eingesetzt. Die Gewirke wurden in Proben von je 1 cm² ausgestanzt. Um den reinen Einfluss der Faser und der Hilfsstoffmatrix zu untersuchen, wurde das Volumen an Lösung ermittelt, das vollständig von der Materialprobe aufgenommen werden konnte. Somit sollten Verluste und daraus resultierende geringere Aktivitäten vermieden werden. Als Volumen wurde 200 µl ermittelt. Die Fasermaterialien wurden mit den Madensekretions- und Hilfsstofflösungen beladen, in Vials gegeben und im Gefriertrockner getrocknet. Nach der Gefriertrocknung wurden die Vials mit Lyophilisationsstopfen und Aluminiumdeckel verschlossen. Für die Ermittlung der enzymatischen Aktivitäten wurden die Fasern in 200 µl Trispuffer gegeben und in einem Eppendorfgefäß 30 min kontinuierlich bewegt. Darauffolgend wurden die Gefäße mit einem Vortex eine Minute lang geschüttelt und anschließend zentrifugiert (5 min, 6000 U/min). Nach Entnahme des Fasermaterials erfolgte eine erneute Zentrifugation, wodurch ein Volumen von 100 µl für die Aktivitätsbestimmung gewonnen werden konnte. Die Bestimmung wurde analog den Messungen der reinen Lyophilisate durchgeführt.

Ergebnisse

Obwohl die Auswahl der Formulierungen aufgrund guter Ergebnisse bei der Bestimmung der tryptischen Aktivität erfolgte, wurden zusätzlich die Leucinaminopeptidase-Aktivitäten bestimmt. Die Abbildung 6.4-13 zeigt zunächst die Ergebnisse der tryptischen Aktivität mit den beiden Materialien. Für einen besseren Vergleich wurden die Ausgangsaktivitäten der Lyophilisate ohne Faser zusätzlich dargestellt.



Abbildung 6.4-13 Einfluss von verschiedenen Hilfsstoffmatrices und Fasermaterialien auf die tryptische Aktivität

Die Ergebnisse weisen Unterschiede zwischen den Aktivitäten der reinen Lyophilisate und der Kombination mit der Faser auf. Es ist ein eindeutiger Aktivitätsverlust beim Trocknen auf der Faser zu erkennen. Dies lässt sich dadurch erklären, dass nicht die gesamte aufgetrocknete Formulierung von der Faser entfernt werden konnte und somit ein Teil bei der Aktivitätsbestimmung fehlte. Diese Aussage soll anhand der beiden REM-Aufnahmen in Abbildung 6.4-14 genauer belegt werden. In der Abbildung 6.4-14 ist eindeutig zu erkennen, dass ein sehr geringer Anteil (siehe Pfeile) auf der Faser verbleibt und man nicht von einer quantitativ vollständigen

Extraktion ausgehen kann. Allerdings zeigt der Vergleich beider REM-Aufnahmen, dass der überwiegende Anteil der getrockneten Stoffe erfasst wird und damit der Aktivitätsabfall nicht in einem derart drastischen Maße ablaufen sollte.

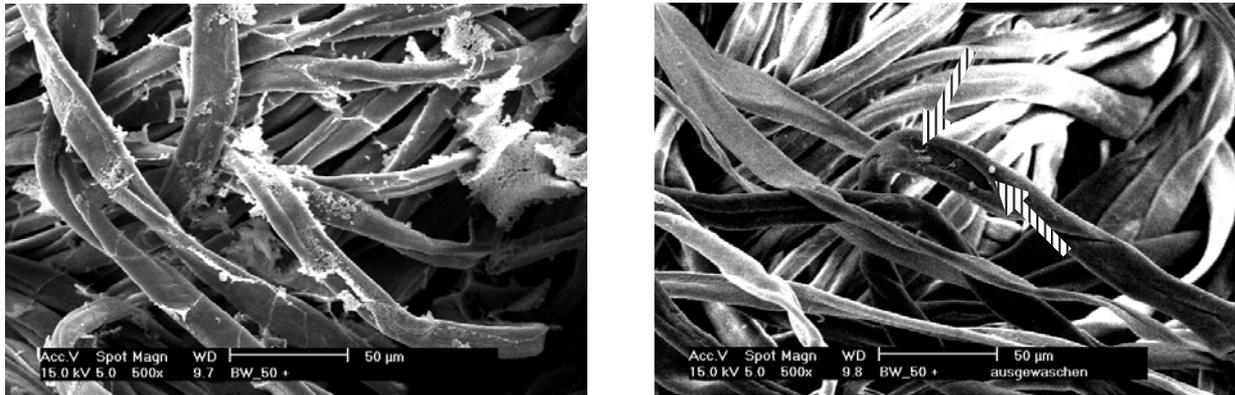


Abbildung 6.4-14 rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen eines Baumwollmaterials mit einer getrockneten Hydroxypropylmethylcellulose-Formulierung (0,025T_1,5HPMC) vor (links) und nach (rechts) dem Waschen mit Rekonstitutionspuffer

Mit einer Verlängerung der Extraktionsdauer konnten keine besseren Werte erzielt werden. Weiterhin wurde auf mehrere Waschschrirte verzichtet, da die resultierende Konzentration für eine genaue Aktivitätsbestimmung zu gering ist. Da durch die Anwendung der oben beschriebenen standardisierten Methode alle Proben gleich behandelt wurden, sind Vergleiche der Aktivitäten untereinander möglich und Unterschiede durchaus detektierbar.

Eventuell stört der Einsatz der Faser die Hilfsstoffmatrix beim Aufbau einer häufig geforderten (siehe Abschnitt 6.4.2.6) homogenen, amorphen Plättchenstruktur. Die rasterelektronenmikroskopische Aufnahme in Abbildung 6.4-15 zeigt eine Maltodextrinformulierung (0,025T_5MD), die auf das BW-Material getrocknet ist.

Das Lyophilisat ist heterogen auf der Faser verteilt. Dies könnte zwar die Aggregation der Proteine verringern, allerdings ist somit auch die Tendenz zur Ausbildung eines homogenen Lyophilisats verringert. Dadurch könnte sich der Einsatz von Fasermaterial in den Hilfsstoffmatrices negativ auf die Rekonstitutionsaktivität auswirken.

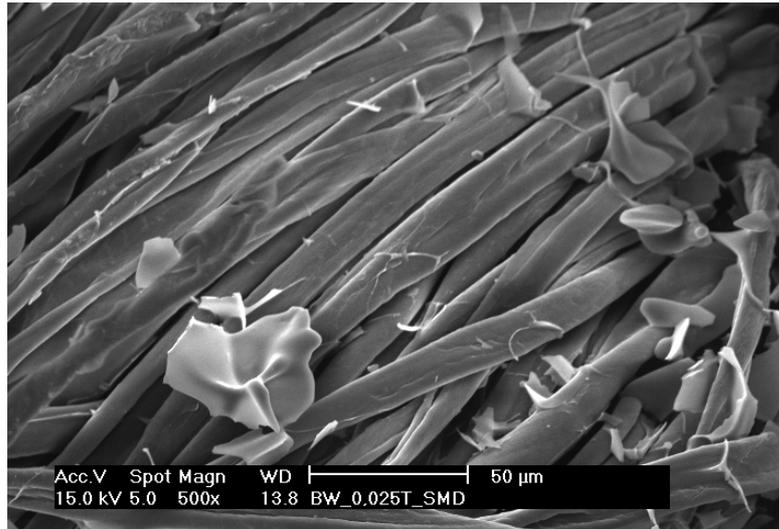


Abbildung 6.4-15 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer auf ein Baumwollmaterial getrockneten Maltodextrin-formulierung (0,025T_5MD)

Neben der starken Aktivitätsabnahme sind zwei weitere Aspekte auffällig. Zum einen kehren sich die Werte der bestimmten Aktivitäten im Bezug auf ihre Ausgangswerte um. Der Wert bei einem Einsatz von Trehalose hatte in Verbindung mit dem Fasermaterial in diesem Fall nicht mehr den höchsten Betrag und andere Formulierungen konnten im Rahmen dieses Versuchs bessere Resultate erzielen. Das Cellulosederivat Hydroxypropylmethylcellulose konnte mit beiden Materialien die höchsten Aktivitäten erzielen. Zum anderen ist kein Trend durch das eingesetzte Fasermaterial zu erkennen. Es liegen Formulierungen vor, bei denen die Verwendung von Baumwolle (BW) bessere Aktivitäten erzielt. Andererseits erlangt man teilweise durch den Einsatz von Viskose (CV) höhere Aktivitäten. Diese

Unterschiede zwischen den Materialien sind zufällig und lassen keinen Trend erkennen. Diese Ausführungen lassen sich auch bei der Auswertung der Ergebnisse zur Konservierung der LAP bestätigen, die in Abbildung 6.4-16 zusammengefasst sind.

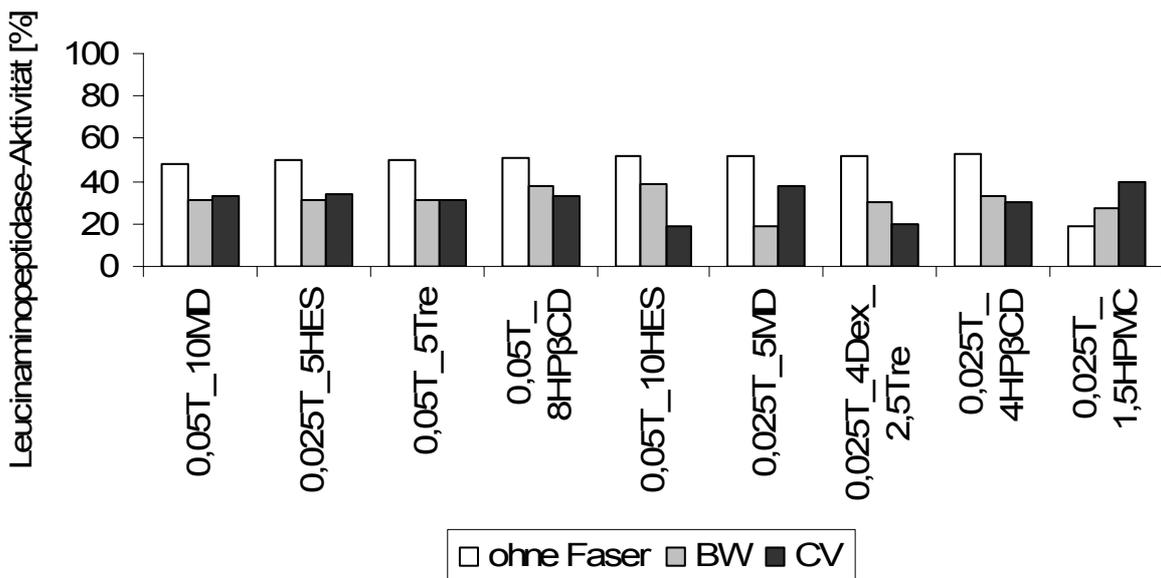


Abbildung 6.4-16 Einfluss von verschiedenen Hilfsstoffmatrices und Fasermaterialien auf die Leucinaminopeptidase-Aktivität

Erneut ist der kontinuierliche Wechsel der Aktivitäten bei den unterschiedlichen Materialien zu erkennen. Eine Aussage, die ein bestimmtes Material für diesen Zweck prädestinieren könnte, lässt sich daher auch bei den LAP-Resultaten nicht treffen. Die besten Resultate konnten erneut mit dem Hilfsstoff Hydroxypropylmethylcellulose ermittelt werden. Besonders auffällig ist hierbei, dass die ermittelten Werte bei Verwendung der Faser jeweils besser waren, als der Ausgangswert der reinen Formulierung. Dieses Ergebnis ist in allen untersuchten Rezepturen mit dem Einsatz von Fasermaterial einzigartig und unterstreicht zusammen mit den Werten der tryptischen Aktivität die gute Eignung des Cellulosederivates für das Erreichen der Zielstellung. Eine mögliche Ursache für die guten Resultate könnte in der

Strukturähnlichkeit mit dem Fasermaterial, das auf Cellulose basiert, begründet liegen. Allerdings wären hierfür auch Ähnlichkeiten in der Kettenlänge beider Faktoren (Derivat und Faser) erforderlich. Ein weiterer Grund könnte in der extrem hohen Viskosität der Hilfsstofflösung liegen, da somit ein starkes Anhaften an der Faser während des Gefriertrocknungsprozesses gewährleistet ist und mögliche Verluste äußerst gering ausfallen. Der einzige Unterschied beim Vergleich beider Aktivitäten liegt im Ausmaß der Aktivitätsverluste. Durch den Einsatz der Fasern waren bei der LAP-Aktivität die Unterschiede zwischen reiner Formulierung und Formulierung mit Faser nicht so drastisch wie die Abnahme bei der tryptischen Aktivität. Allerdings waren, wie oben bereits beschrieben, die Beträge der reinen Formulierungen der LAP nach der Lyophilisation sehr viel geringer als die der tryptischen Aktivität. Zusammenfassend kann man für beide Aktivitäten feststellen, dass sich beim Einsatz der Faser die Resultate sowohl für die tryptische als auch für die Leucinaminopeptidase-Rekonstitutionsaktivität angleichen und nur noch geringfügig voneinander unterscheiden.

6.4.4 STABILISIERUNG DURCH DIE FASER

Mit Hilfe der Ergebnisse des obigen Abschnittes sollte der Einfluss des Fasermaterials genauer untersucht werden. Da die Hilfsstoffe separat entlang der Faser ihre Strukturen ausbildeten, konnten nur wenige Erkenntnisse über die Beeinflussung durch die Cellulose erarbeitet werden. Deshalb wurden in diesem Teil der Untersuchungen die Fasern mit reiner Madensekretionslösung beladen und anschließend die Aktivitäten ermittelt. Somit sollte die Reduktion der Aktivität durch den Einsatz der Fasern genauer untersucht werden.

Durchführung

Als Fasergrundlage wurde das säurebehandelte Material aus Kapitel 5.1 verwendet. Hierdurch war es möglich, die erworbenen Kenntnisse über die unterschiedlichen physikochemischen Eigenschaften eines Materials unmittelbar mit den resultierenden Ergebnissen der Aktivitäten zu vergleichen. Da in den obigen Abschnitten ein Tensideinsatz obligat für das Erreichen einer akzeptablen Aktivität war, wurde die Lyophilisation der Lösung auf der Basis einer 0,05%igen Tensid-Trispufferlösung durchgeführt. Hiermit sollte sichergestellt werden, dass nicht die Oberflächendenaturierung der Proteine den ausschlaggebenden Faktor bei der Lyophilisation darstellt. Die Menge an aufgebener Lösung war wie im obigen Abschnitt 200 µl. Die Extraktion der Lösung und die Messung der Aktivitäten erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie in Abschnitt 6.4.3.

Ergebnisse

Um möglichst detaillierte Aussagen über die Veränderungen der enzymatischen Aktivitäten festlegen zu können, wurden erneut sowohl die Werte für die tryptische als auch für die LAP Aktivität ermittelt. Die Ergebnisse sind in Abbildung 6.4-17 zusammengefasst. Für die genauere Beurteilung der

Werte wurden die Ausgangsaktivitäten der reinen Madensekretionslösung mit 0,05% Tensid (Enzym_0,05T) zusätzlich dargestellt.

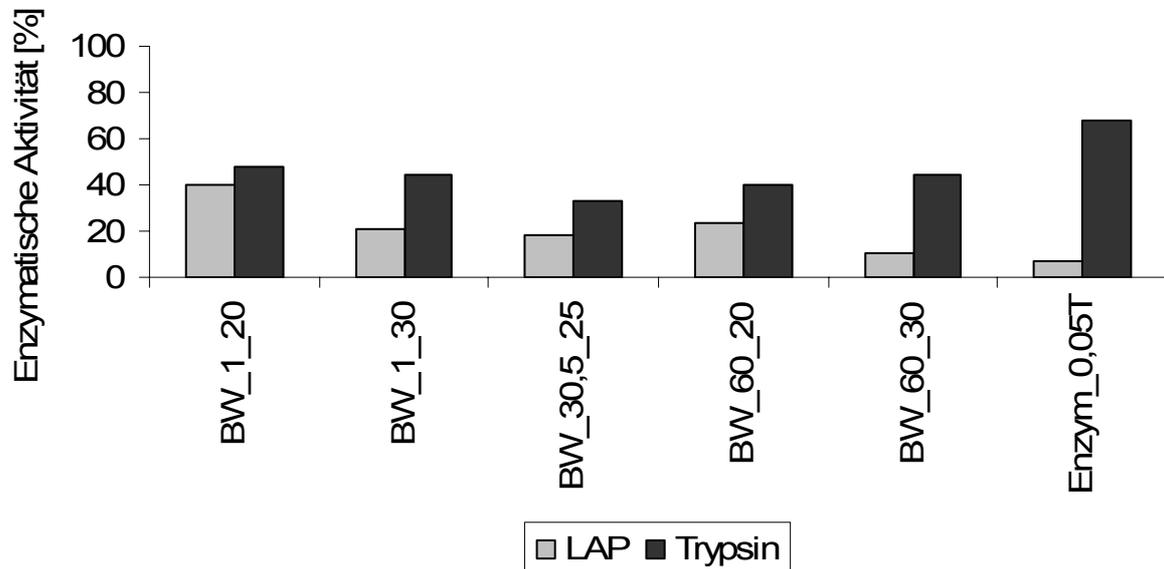


Abbildung 6.4-17 Darstellung der Enzymaktivitäten nach dem Trocknen einer 0,05%igen Tensid-Madensekretionslösung auf verschieden behandelte Baumwollmaterialien

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der LAP sind diese erneut geringer als die der tryptischen Aktivität. Allerdings lässt sich ein positiver Effekt durch das Einbringen der Faser in den Lyophilisationsprozess feststellen. So war es möglich, die resultierenden Aktivitäten in Verbindung mit dem Textil erheblich zu erhöhen. Bei der Verwendung des Materials BW_1_20 ist sogar eine Steigerung um den Faktor fünf festzustellen. Damit lässt sich erneut die Aussage aus dem Abschnitt 6.4.2.6 bestätigen, dass der Einsatz eines Polymers sehr wichtig ist, um eine gute Stabilität erzielen zu können. Bei der Verwendung der Fasern kann man sicherlich nicht von einem löslichen Polymer und einer damit verbundenen Hilfsstoff-Protein-Lösung ausgehen, aber durch das Textil und die sehr kleinen Fasern entsteht für die Madensekretionslösung eine Möglichkeit der Adsorption. Die Verteilung der Lösung entlang der Fasern ist deutlich in der rasterelektronen-

mikroskopischen Aufnahme in Abbildung 6.4-18 zu erkennen. Die Tendenz zu intramolekularen Kohäsionen ist verringert und eine dadurch bedingte Aggregation der Molekülketten minimiert. Die anschließend durchgeführte Rekonstitution der Proteine führt dann zu entsprechend erhöhten Aktivitäten.

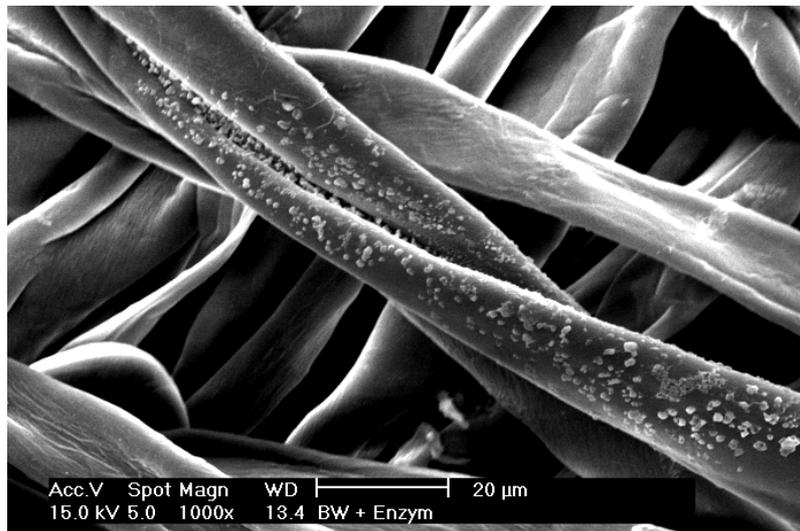


Abbildung 6.4-18 rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer 0,05%igen Tensid-Madensekretionslösung nach dem Trocknen auf ein Baumwollmaterial

Die höchste Aktivität konnte mit dem Fasermaterial, das mit der geringsten Säurekonzentration für die Dauer von einer Minute (BW_1_20) behandelt wurde, erreicht werden. Dementsprechend resultiert die geringste Aktivität für die LAP bei der Verwendung des Materials mit der extremsten Säurebehandlung (BW_60_30). Allerdings sind Tendenzen bezüglich der unterschiedlichen Vorbehandlungen des Materials und daraus resultierenden physikochemischen Eigenschaften nur schwer zu finden. Da die Stabilisierung der Leucinaminopeptidase auch durch den Einsatz von Hilfsstoffen generell schwierig ist, kann man die Aktivitätssteigerung durch den Faser-Einsatz als durchaus positiv bewerten. Wichtig für den Erhalt der LAP ist scheinbar eine Verhinderung der Aggregation der Proteine untereinander, da bereits der Einsatz von reinen hochmolekularen Hilfsstoffen ausreichend ist, um eine

höhere Aktivität zu erzielen. Im dreidimensionalen Flächenplot in Abbildung 6.4-19 ist die Abhängigkeit der LAP-Aktivität von zwei Oberflächeneigenschaften (die spezifische Oberfläche und der Quotient aus Säure- und Basezahl) der Faser dargestellt.

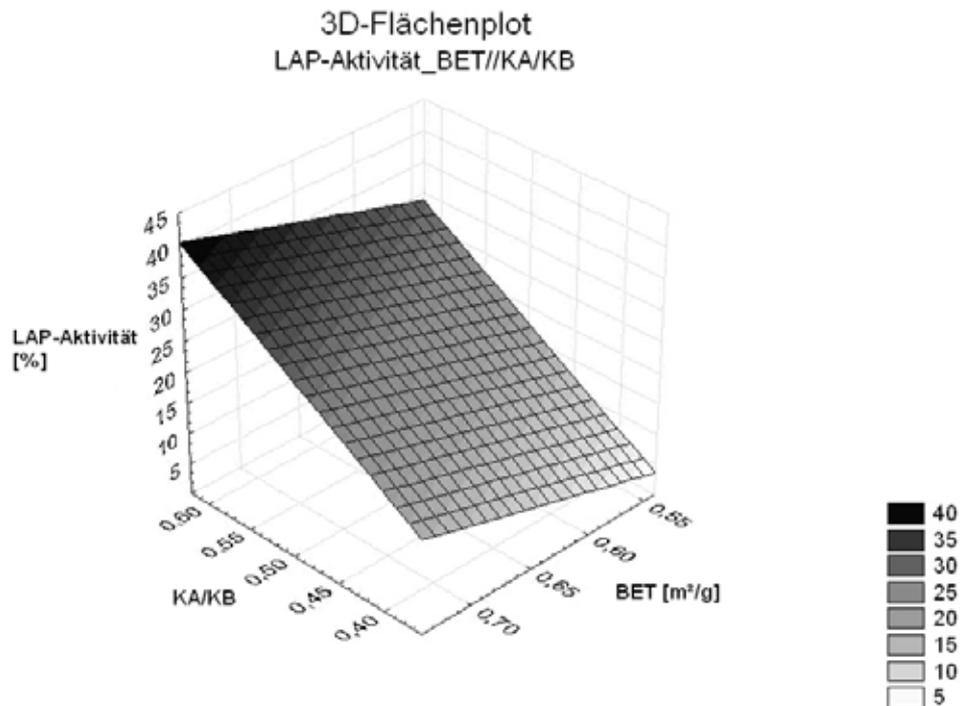


Abbildung 6.4-19 Einfluss der spezifischen Oberfläche der Fasern und des Säure-Basezahl-Quotienten auf die Leucinaminopeptidase-Aktivität

Hier ist nun eindeutig zu erkennen, dass mit einer größeren Oberfläche der Faser eine höhere Aktivität der LAP zu erzielen ist. Dieses Resultat basiert darauf, dass die Verteilung der Madensekretionslösung sehr viel weiträumiger ablaufen kann und somit die Aggregation minimiert wird. Zusätzlich ist in dem Plot der Quotient aus der Säurezahl KA und der Basezahl KB mit angegeben. Dieser Wert ermöglicht eine Aussage über die Eigenschaft der Faser als Elektronenpaarakzeptor. Mit einem höheren Wert von KA/KB steigt dementsprechend die Tendenz einer Oberfläche, Wechselwirkungen mit Elektronenpaaren einzugehen, die natürlich auch an jeder Oberfläche eines Enzyms zu finden sind. Bei der Betrachtung dieses Parameters kann auch hier

eine Steigerung der Aktivität parallel zur Steigerung des Quotienten aus KA/KB festgestellt werden. Damit kann die obige Aussage bestätigt werden, dass für den Erhalt der Aktivität der LAP eine geeignete Methode zur Verhinderung der intramolekularen Aggregation notwendig ist. Allerdings kann der Einsatz der Faser nicht als eine Alternative für die Verwendung der typischen Lyophilisationshilfsstoffe im Rahmen der Stabilisierung der Leucinaminopeptidase aus der Madensekretionslösung angesehen werden.

Bei den Ergebnissen der tryptischen Aktivität waren die Werte gegensätzlich. Bei keiner Formulierung mit einer Faser konnte der Betrag der reinen Formulierung (Enzym_0,05T) übertroffen werden (siehe Abbildung 6.4-17). Weiterhin scheint auch die Säurebehandlung die resultierende Aktivität nicht zu beeinflussen. Der stabilisierende Effekt des Fasermaterials konnte auch in diesem Fall nicht den Einsatz von Hilfsstoffen ersetzen. Trotzdem haben die physikochemischen Eigenschaften einen Einfluss auf die tryptische Aktivität. Wie bereits in Abbildung 6.4-18 gezeigt, kommt es zu einer sehr gleichmäßigen Verteilung des getrockneten Produktes entlang der Faser. Für eine hohe Aktivität nach der Rekonstitution ist folglich eine homogene Oberfläche ohne energetisch hohe Zentren vorteilhaft. Durch das Fehlen solcher Zentren erfolgt eine breitflächigere Adhäsion der Proteine an der Faser und die intramolekulare Aggregation ist verringert. Für eine erhöhte Aktivität müsste demnach eine Faser mit geringerer Oberflächenenergie eingesetzt werden. Dass zwischen diesen beiden Komponenten durchaus eine Korrelation besteht, zeigt der Regressionsplot zwischen der tryptischen Aktivität und der Oberflächenenergie in Abbildung 6.4-20.

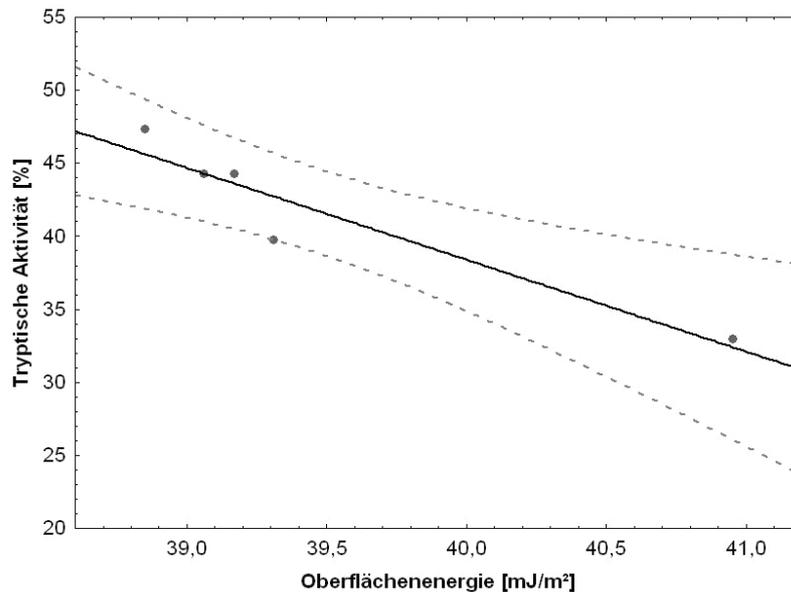


Abbildung 6.4-20 Regressionsplot tryptische Aktivität gegen Oberflächenenergie (Vertrauensbereich 0,95)

Eine homogenere Faseroberfläche (kleine Oberflächenenergie) ermöglicht höhere Aktivitäten. Mit steigender Oberflächenenergie nimmt auch stetig der Betrag für die tryptische Aktivität ab. Eine mögliche Erklärung liegt hier in der Verteilung der Proteine an der Oberfläche, denn durch eine homogene Oberfläche wird eine Zentralisierung der Moleküle auf die oben beschriebenen energetisch höher gelegenen Zentren minimiert und eine intramolekulare Aggregation verhindert. Dieser Trend wird auch durch die Kontinuität der Werte unterstrichen. Alle Punkte lagen innerhalb des 95%igen Vertrauensbereichs (gestrichelte Linie) und es konnte ein Bestimmtheitsmaß von 0,949 ermittelt werden. Der Wert ist durchaus positiv zu bewerten, da es sich bei der enzymatischen Aktivität um eine natürliche Prozessgröße handelt, die hohen Schwankungen unterliegen kann.

Ein weiterer wichtiger Stabilitätsfaktor des Fasermaterials im Rahmen der Lyophilisation stellt das Wasserbindungsvermögen dar. Hierbei handelt es sich um den Anteil des Wassers, der so stark von der Faseroberfläche gebunden wird, so dass dieser bei einer Temperaturenniedrigung unter den Gefrierpunkt

nicht kristallisiert. Die Bestimmung des Wasserbindungsvermögens erfolgte mit der in 3.3.2 beschriebenen DSC-Methode. Der Zusammenhang zwischen diesen beiden Faktoren ist in Abbildung 6.4-21 durch einen Regressionsplot dargestellt.

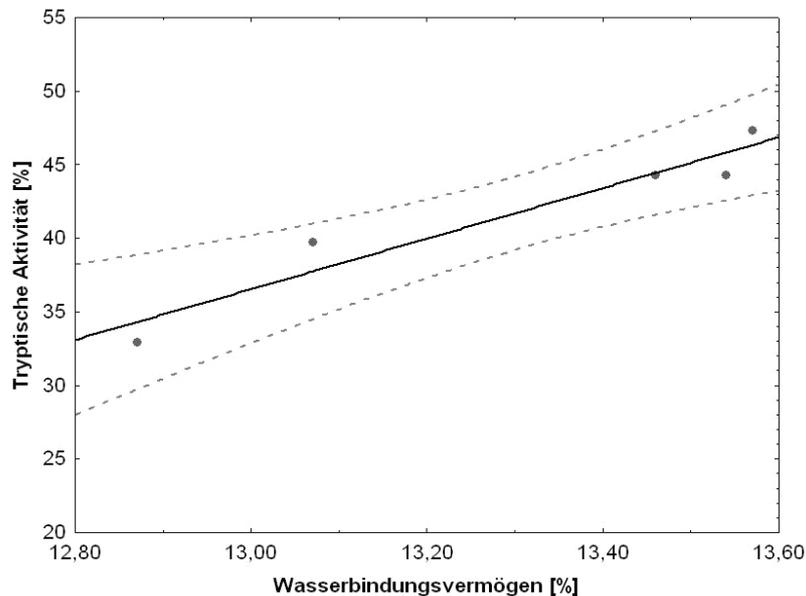


Abbildung 6.4-21 Regressionsplot tryptische Aktivität gegen Wasserbindungsvermögen (Vertrauensbereich 0,95)

Je mehr Wasser die Faser aufnehmen und dauerhaft binden kann, desto weniger kristallisiert während der Gefriertrocknung aus. Die Bildung von kristallinen Bereichen, insbesondere die Bildung von Eiskristallen, kann die Proteine denaturieren und dauerhaft zerstören. Durch eine erhöhte Wasserbindungskapazität müsste demzufolge eine höhere Aktivität nach der Rekonstitution messbar werden, da ein größerer Anteil der Proteinlösung vor der Kristallisation geschützt wird. Das Bestimmtheitsmaß für diesen Zusammenhang liegt bei 0,963. Damit ist von einem engen Zusammenhang beider Parameter auszugehen und das erhöhte Wasserbindungsvermögen eines Materials hat eine höhere Aktivität zur Folge. Die Faser kann somit einen protektiven Effekt auf die Madensekretionslösung während des

Gefriertrocknungsprozesses ausüben und die Enzyme vor der kristallisationsbedingten Denaturierung schützen.

Zusätzlich zum Wasserbindungsvermögen hat auch das Adsorptionspotential der verwendeten Faser einen entscheidenden Einfluss auf die Rekonstitutionsaktivität. Durch eine Erhöhung der Adsorptionseigenschaft können die Proteine besser an der Faser haften und somit vor Denaturierung geschützt werden. Die Adsorptionseigenschaften wurden mit Hilfe der inversen Gaschromatographie durch Verwendung des Probenmoleküls n-Hexan bestimmt. Die Verknüpfung zwischen diesem Parameter und der tryptischen Aktivität wird in Abbildung 6.4-22 dargestellt.

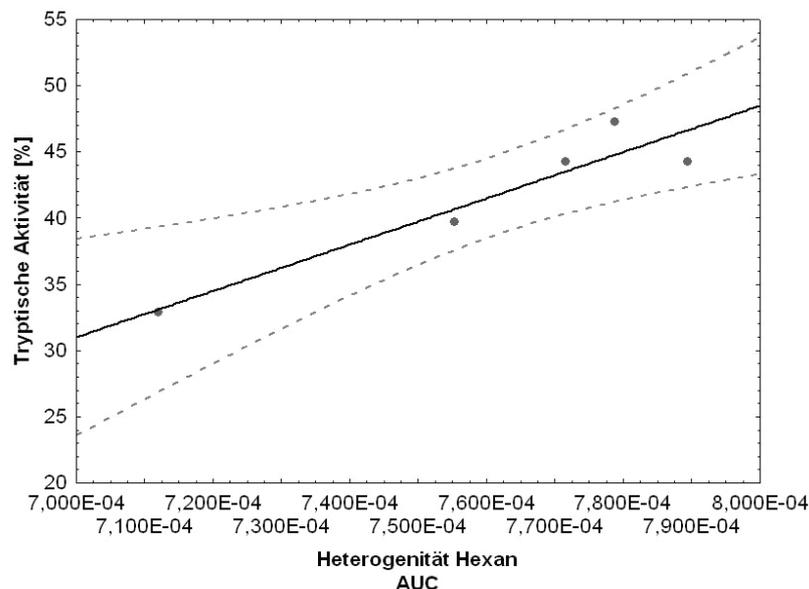


Abbildung 6.4-22 Regressionsplot tryptische Aktivität gegen die Fläche des Heterogenitätsplots von n-Hexan (Adsorptionseigenschaft der Faser) [Vertrauensbereich 0.95]

Je größer die adsorptive Eigenschaft der Faser ist (größere Fläche beim Heterogenitätsplot), desto höher ist auch die resultierende tryptische Aktivität. Durch die Verwendung des Probenmoleküls n-Hexan konnte sichergestellt werden, dass das reine Adsorptionspotential der Faser bestimmt wird. Eine Wechselwirkung zwischen diesem Probenmolekül und der Oberfläche basiert

nur auf dispersiven Kräften, womit eine sehr genaue Detektion der adsorbierten Gasmenge in der iGC möglich ist. Damit ist der gefundene Zusammenhang sehr genau, weil die reine Adsorptionseigenschaft der Faser die Aktivität beeinflusst und nicht durch mögliche Extraktionsschwierigkeiten eine ungenaue Bestimmung nach sich zieht.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass das Auftrocknen einer reinen Madensekretionslösung zwar nicht den Einsatz von Hilfsstoffen ersetzen kann, aber durchaus die enzymatische Aktivität beeinflusst. Bei der Leucinaminopeptidase kommt es zu einer Steigerung der Aktivität durch die Faser im Vergleich zum reinen Tensid-Zusatz (Abbildung 6.4-17). Allerdings sind diese Werte nicht vergleichbar mit denen der Lyophilisate unter Hilfsstoffzusatz, da durchgehend bei einem reinen Fasereinsatz geringere Aktivitäten bestimmt wurden. Ein noch höherer Verlust im Vergleich zu den Kryoprotektoren konnte bei der tryptischen Aktivität festgestellt werden. Trotzdem kommt es zu einer Beeinflussung der enzymatischen Aktivitäten durch den Einsatz von Fasermaterialien. Hierbei ist eine hohe adsorptive Eigenschaft der Faseroberfläche sehr vorteilhaft für das Erzielen guter enzymatischer Aktivitäten. Es konnten somit erstmals Zusammenhänge zwischen den physikochemischen Eigenschaften der Fasern und einer enzymatischen Aktivität eines darauf adsorbierten Enzymgemisches gezeigt werden.

Allerdings ist eine Steigerung der Aktivitäten nur durch die Trocknung aus einer Protein-Hilfsstofflösung möglich, da nur so die Ausbildung von typisch amorphen Zubereitungen (Johnson, Kirchhoff *et al.*, 2002) stattfindet. Bei der Verwendung der unlöslichen Cellulosefasern ist dies hingegen nicht möglich.

6.5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Stabilisierung von Madensekret in Form eines gefriergetrockneten Pulvers ist möglich. Eine Reihe von Kombinationen verschiedener Hilfsstoffe kann die

enzymatischen Aktivitäten der Madensekretionslösung konservieren. Allerdings konnte eine Adsorption des Sekretes an die Trägermaterialien nur unter deutlichem Aktivitätsverlust durchgeführt werden. Weder die Verwendung von protektiven Substanzen noch die alleinige Faser konnten die Reduktion der enzymatischen Aktivitäten verhindern. Für eine Untersuchung auf eine mögliche Freisetzung dieses „Wirkstoffs“ von der Faser würde die Bestimmung der Enzymaktivitäten zur Quantifizierung nicht ausreichen. Weitere Nachteile bei der Erstellung der Freisetzungsprofile unter Verwendung der Substanz Madensekret liegen in der hohen Empfindlichkeit gegenüber hydrolytischen Zersetzungen und der sehr zeitaufwendigen Analytik. Dementsprechend sollte für die folgenden Freisetzungsuntersuchungen eine alternative Modellsubstanz verwendet werden, um so reproduzierbare und zuverlässige Ergebnisse erzielen zu können.

7 FREISETZUNGSUNTERSUCHUNGEN AUS DER WUNDAUFLAGE

7.1 EINLEITUNG

Ein erklärtes Ziel dieser Arbeit war die gesteuerte Freisetzung des Therapeutikums, idealerweise das Sekret der Fliegengattung *Lucilia sericata*, aus der Wundauflage parallel zu deren enzymatischem Abbau. Dementsprechend müsste der Wirkstoff in die Faser eingebracht werden, da nur so sichergestellt werden kann, dass dieser freigesetzt wird, wenn der Abbau der Faser beginnt. Hierfür ist das Lösen des Trägers erforderlich. Anschließend könnte der Wirkstoff in diese Lösung eingebracht werden, um beide Komponenten dann gemeinsam zu regenerieren. Das Auflösen des Trägermaterials Cellulose ist aber nur unter sehr extremen Bedingungen und dem Zusatz von Chemikalien möglich (siehe Viskose-Herstellung), so dass diese Maßnahme nicht praktikabel ist. Um trotzdem die verzögerte Freisetzung zu ermöglichen, müsste der Arzneistoff an die Faser adsorbiert und diese dann mit einem Film überzogen werden. Zu diesem Zweck wurde in Kapitel 5.3 bereits der mögliche enzymatische Abbau des Filmbildners Ethylcellulose getestet. In diesem Kapitel sollen nun zunächst die Adsorption des Therapeutikums an die Faser, eine unterschiedliche Befilmung und schließlich der enzymatische Abbau des gesamten Systems im Hinblick auf die Freisetzung untersucht werden.

7.2 INSULIN ALS MODELLARZNEISTOFF

7.2.1 ALLGEMEINES

Aufgrund der geschilderten Sensibilität des Madensekrets und der Schwierigkeit der Quantifizierung wurde für die Untersuchungen der Freisetzung Humaninsulin eingesetzt. Dies lässt sich damit begründen, dass ein Großteil der Inhaltsstoffe des Madensekrets als Enzyme auf einer

Proteinstruktur basiert und mit der Verwendung des Insulins ein Eindruck der Freisetzung eines Makromoleküls aus der Wundauflage gewonnen werden konnte. Diese Erkenntnisse können somit Rückschlüsse auf das Freisetzungsverhalten von Madensekret-Komponenten zulassen. Der Aufbau des Humaninsulins soll kurz erläutert werden. Es besteht aus zwei Peptidketten mit unterschiedlicher Aminosäuresequenz, wobei die A-Kette aus 21 und die B-Kette aus 30 Aminosäuren besteht. Die Verknüpfung beider Ketten erfolgt durch zwei intermolekulare Disulfidbindungen zwischen verschiedenen Cystein-Bausteinen. Die detaillierte Aminosäuresequenz des Humaninsulins ist der schematischen Darstellung in Abbildung 7.2-1 zu entnehmen.

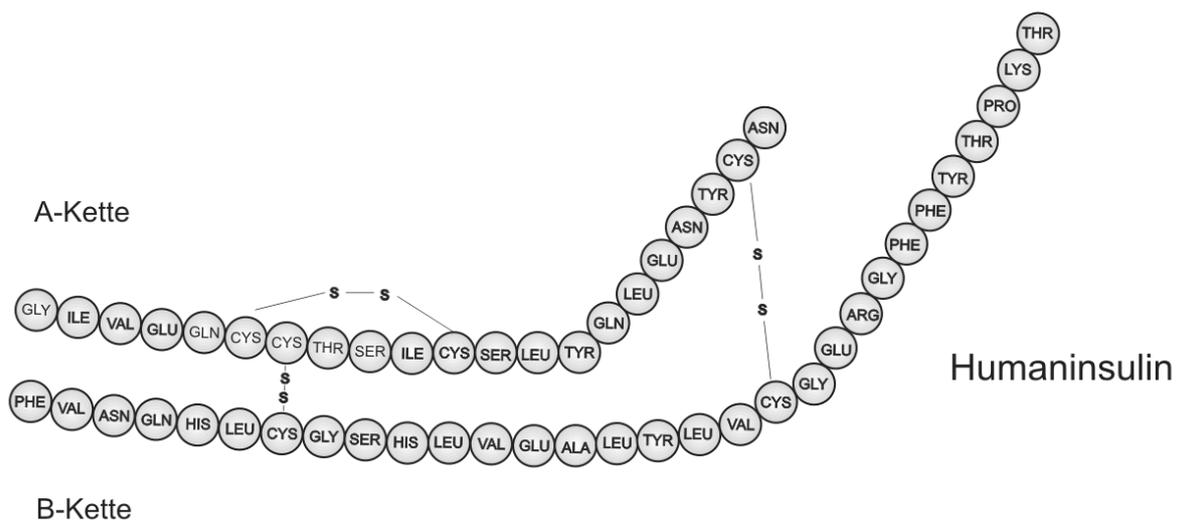


Abbildung 7.2-1 Aminosäuresequenz von Humaninsulin

Ein weiterer Grund zur Wahl dieses Modellarzneistoffes liegt in der sehr guten Stabilität in schwach saurer Lösung und bei einem pH-Bereich von 7 - 7,4 (Geiger, 1987) begründet. Damit konnten problemlos Freisetzungsuntersuchungen über ein sehr langes Zeitintervall (bis zu 24 h) durchgeführt werden, ohne auf hydrolytische Zersetzungseigenschaften der freizusetzenden Substanz achten zu müssen.

7.2.2 HERSTELLUNG VON INSULINLÖSUNGEN

Für das Beladen der Wundauflagen musste zunächst das Insulin gelöst werden, um dieses auf die Fasern aufzubringen. Allerdings ist Insulin in Wasser unlöslich. Für die Herstellung einer Insulinlösung wurden zunächst 400 mg Insulin in 5 ml Phosphatpuffer (pH 7,4) suspendiert, anschließend mit 500 µl 1N Salzsäure bis pH 3 angesäuert und nach Auflösen des Insulins (10 – 20 min) mit 500 µl 1N Natronlauge neutralisiert. Die erhaltene Lösung kann mit Puffer auf die angestrebte Konzentration eingestellt werden. Für die Beladung der Fasern mit Insulin wurde eine Konzentration von 20 mg Insulin pro ml Puffer verwendet.

7.3 FREISETZUNG AUS DER UNBEFILMTEN FASER

7.3.1 ADSORPTION VON INSULIN AN DIE FASER

Zur Testung der Adsorption von Insulin an die Faser und der anschließenden Freisetzung wurde das Gewebe wiederum in 1 cm² große Stücke gestanzt. Für die Beladung der Fasern mit der Modellschubstanz wurden unterschiedliche Möglichkeiten getestet. Zum einen erfolgte das Aufbringen des Arzneistoffes durch Eintauchen des Materials in eine Wirkstofflösung und Abstreifen von überschüssiger Lösung. Zum anderen wurde das Gewebe mit 500 µl Lösung überschichtet und im Vakuum getrocknet. Mit der Verwendung des ersten Verfahrens, dem Eintauchen in die Lösung, sollte sichergestellt werden, dass der Wirkstoff homogen an der Faser verteilt wird. Allerdings war diese Methode mit Nachteilen behaftet, die im Folgenden kurz erläutert werden. Das Einbringen der Faser in die Lösung führte zu einem recht hohen Verlust an Insulin, denn bei einer eingesetzten Konzentration von 20 mg Insulin pro ml Phosphatpuffer, konnten durchschnittlich nur 3,8% wieder von der Faser extrahiert werden. Ein weiteres Problem dieser Methode liegt in der Standardisierung, denn bei einem Einsatz von Materialien mit unterschiedlichem Wasserbindungsvermögen werden durch das

Eintauchverfahren variable Mengen an Arzneistoff aufgenommen. Dies kann mit dem Regressionsplot in Abbildung 7.3-1 veranschaulicht werden, in dem die extrahierbare Menge an Insulin in Abhängigkeit des Wasserbindungsvermögens der eingesetzten Faser gegenübergestellt ist.

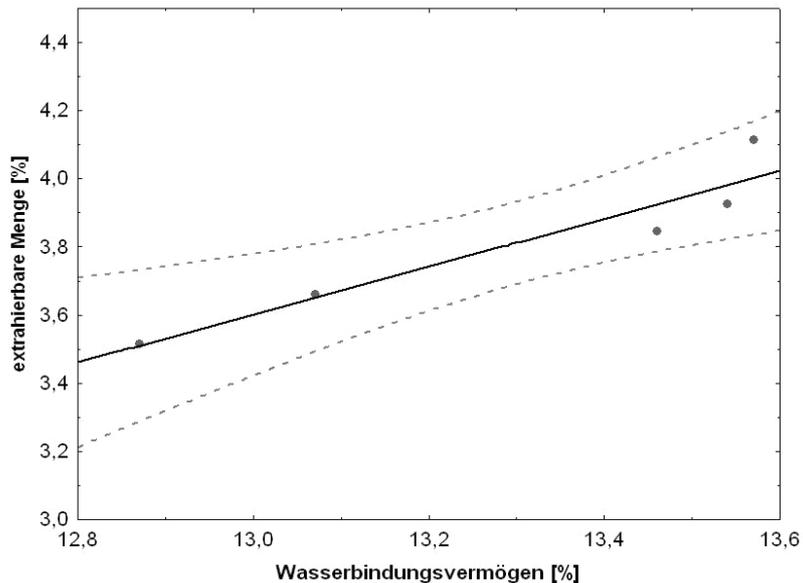


Abbildung 7.3-1 Regressionsplot adsorbierte Insulinmenge gegen das Wasserbindungsvermögen der Faser

Je stärker die Faser in der Lage ist Wasser zu binden, desto mehr Insulin verbleibt nach Eintauchen in eine Lösung an der Oberfläche. Dementsprechend ist bei der Verwendung dieses Verfahrens auf ein annähernd gleiches Wasserbindungsvermögen der Faser zu achten, um quantitativ gleiche Mengen des Wirkstoffs zu adsorbieren. Zudem sind die extrahierbaren Mengen durch den hohen Verlust dieser Methode nur noch sehr klein und lassen kaum differenzierte Aussagen bei der Erstellung von Freisetzungsprofilen zu. Um diese erwähnten Faktoren auszuschließen, wurde mit allen folgenden Untersuchungen eine Beladung der Fasern durch Überschichten mit der Insulinlösung durchgeführt. Hierzu wurden die Träger in einen Kunststoffblock mit definierten Bohrungen gelegt und mit 500 µl Lösung

überschichtet. Die Trocknung erfolgt im Vakuum bis zur Gewichtskonstanz. Der extrahierbare Anteil an Insulin beträgt bei dieser Methode etwa 31,4% im Bezug auf die eingesetzte Menge (Rupp, 2006), wodurch ausreichend Arzneistoff auf der Faser adsorbiert ist, um Unterschiede in der Freisetzung genau genug detektieren zu können.

7.3.2 FREISETZUNGSPROFILE

Die Bestimmung sämtlicher Freisetzungsp Profile in dieser Arbeit wurde unter gleichen Bedingungen durchgeführt. Die Freisetzungen erfolgten bei einer Temperatur von 37°C in einem Phosphatpuffer mit einem pH-Wert von 7,4. Dies entspricht dem durchschnittlichen pH-Wert von chronischen Wunden (Dissemond, Witthoff *et al.*, 2003). Das Medium wurde in Glaszylinder (Gesamtvolumen 30 ml) gegeben und diese mit einer Schüttelapparatur (25 Bewegungen pro Minute) leicht bewegt. Das Volumen betrug pro Ansatz 6 ml. Der Probenzug erfolgte je nach vorgegebenen Zeitschema mit einer Pipette (Volumen 600 µl).

Die Untersuchungen zur Freisetzung aus der unbefilmten Faser wurden mit den Materialien Viskose und Baumwolle durchgeführt. Alle Träger waren mit Säure vorbehandelt, wobei die Kontaktzeit bei der Viskose je 40 Minuten und 50 Minuten (CV_40 und CV_50) und bei der Baumwolle 50 Minuten betrug. Somit war es möglich, Unterschiede zwischen den Materialien und innerhalb eines Materials mit unterschiedlicher Säurebehandlung zu untersuchen. Die Freisetzungsp Profile (für n = 3 Messungen) von diesen drei Trägern ist in der Abbildung 7.3-2 dargestellt. Die Auswertung der Freisetzungskurven bestätigt die Vermutung, dass nach einem kurzen Zeitintervall bereits der Großteil des adsorbierten Insulins von der Faser gewaschen wird. Innerhalb von 30 min sind nahezu 100% Insulin freigesetzt. Damit basiert diese Freisetzung auf einem klassischen Bursteffekt, bei dem die gesamte adsorbierte Menge schlagartig in sehr kurzer Zeit freigesetzt wird. Eine Differenzierung zwischen

den Materialien ist kaum und innerhalb eines Materials (Viskose) nicht möglich.

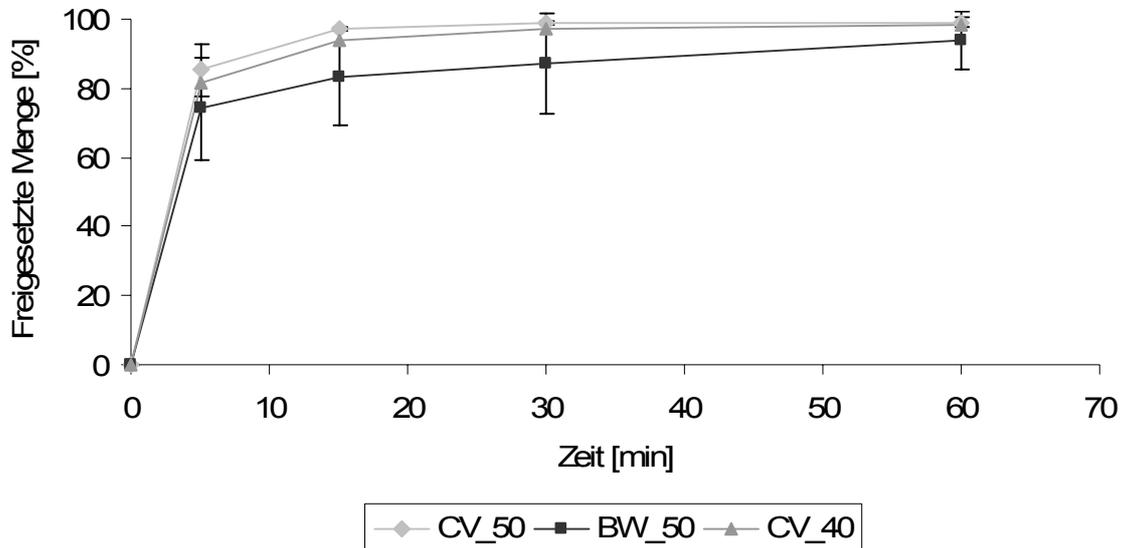


Abbildung 7.3-2 Freisetzung aus den unbefilmten Materialien Viskose und Baumwolle

7.3.3 ZUSAMMENFASSUNG

Der Einsatz von reinem Fasermaterial und einem adsorbierten Wirkstoff erlaubt keine Steuerung bzw. Verzögerung der Freisetzung. Wie zu erwarten war, wurde die gesamte Menge des eingesetzten Therapeutikums komplett innerhalb weniger Minuten freigesetzt. Damit ist bereits der gesamte Wirkstoff von der Faser entfernt, ohne dass eine enzymatische Zersetzung dieser begonnen hat. Eine Steuerung der Freisetzung durch den Einsatz des Enzyms ist damit nicht möglich. Zwar beginnt die enzymatische Degradation der Fasern bereits mit der Adsorption der Cellulase an der Oberfläche, aber die Glukosekonzentration ist erst nach 30 Minuten zuverlässig messbar. Aufgrund dieser Tatsache ist eine Befilmung der Fasern notwendig, die das Abfluten des Wirkstoffes verhindert und dementsprechend eine Verzögerung der Freisetzung hervorruft. Nur damit wäre es möglich, die Abgabe des

Wirkstoffes parallel zum enzymatischen Abbau der Trägermaterialien durchzuführen.

7.4 FREISETZUNG AUS DER BEFILMTEN FASER

7.4.1 EINLEITUNG

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, dass eine Freisetzung nicht allein durch eine Adsorption an die Faser beeinflusst werden kann. Zudem ist eine deutliche enzymatische Aktivität erst nach Stunden nachweisbar. Damit ist eine Modifizierung der Wirkstoffträger unentbehrlich. In den folgenden Ausführungen soll der Einfluss verschiedener Filme auf das Freisetzungsprofil der Fasern untersucht werden. Es sollen der Einfluss der Diffusion und der Einfluss von Cellulase auf die freigesetzte Menge untersucht werden. Alle Untersuchungen werden analog den oben genannten Bedingungen durchgeführt. Alle Angaben erfolgen in einem Freisetzungs-Zeit-Diagramm, wobei sich die Prozentangabe der freigesetzten Menge auf einen Standardwert bezieht. Hierunter soll ein unbefilmter Baumwollträger verstanden werden, der die gleiche Menge an Insulin trägt und über die gleiche Zeitdauer freisetzt wie die anderen Träger. Die ermittelte Insulinkonzentration dieses Trägers wird dann als 100%-Wert definiert und sämtliche ermittelte Konzentrationen auf diesen bezogen. Aufgrund einer einfacheren Befilmung wurden alle Untersuchungen mit Baumwolle durchgeführt.

7.4.2 DIFFUSIONSKONTROLLIERTE FREISETZUNG

Die Befilmung der Baumwollträger wurde analog den Versuchen in Abschnitt 5.3 mit verschiedenen Filmen und einer unterschiedlichen Anzahl von Filmschichten versehen. Als Filmbildner wurde Ethylcellulose verwendet, die in Aceton gelöst worden ist. Die einzusetzende Konzentration des PEG und das zu verwendende PEG-Molekulargewicht wurde durch die Vorgaben der

statistischen Versuchsanalyse bestimmt. Dieser Versuchsplan bildete erneut die Grundlage dieser Untersuchungen, so dass eine detaillierte Auswertung der Ergebnisse möglich war und Tendenzen mit Zahlenwerten belegt werden konnten. Die Ergebnisse der Freisetzungsuntersuchungen sind in Abbildung 7.4-1 zusammengefasst. Die angeführten Chargenbezeichnungen sind analog zu denen aus Kapitel 5.3 zu verstehen.

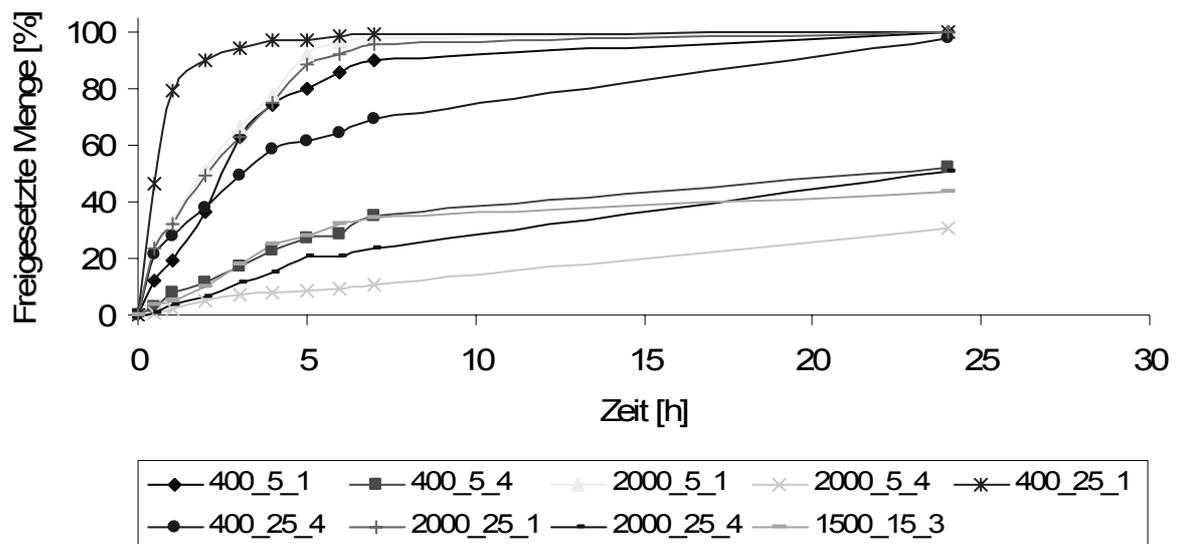


Abbildung 7.4-1 Freisetzungsprofile von unterschiedlich befilmten Baumwollträgern über einen Freisetzungszeitraum von 24 h (Rupp, 2006)

Durch die Befilmung der Baumwollträger ließ sich die Freisetzung des Insulins über einen Zeitraum von 24 h hinauszögern. Dabei ergaben sich je nach Zusammensetzung des Films und in Abhängigkeit der Anzahl der Filmschichten unterschiedliche Freisetzungsprofile. Der anfänglich beschriebene Effekt der Burstfreisetzung (Abbildung 7.3-2) konnte mit jeder Befilmung verhindert werden. Allerdings sind bei der Betrachtung der freigesetzten Mengen starke Unterschiede zu erkennen. Die Anzahl der Filmschichten beeinflusst die freigesetzte Menge nach 24 h signifikant (Rupp, 2006). Je mehr Filmschichten aufgetragen werden, desto weniger Insulin kann

freigesetzt werden. Besonders interessant ist die Wahl des PEG, da durch ein kurzkettiges PEG-Molekül (hier: 400) im Gegensatz zu einem längerkettigen PEG (hier: 1500 oder 2000) bei gleicher Konzentration (bezogen auf die Masse an Film) und Anzahl der Filmschichten eine schnellere Freisetzung zu beobachten ist. Ähnliche Ergebnisse konnten in einer Arbeit über die Wasserpermeabilität von Celluloseacetat-Filmen erzielt werden (Yuan, Shang *et al.*, 2001). Hier sinkt die Permeabilität von Wasser durch ein steigendes Molekulargewicht des PEG-Moleküls. Diese Aussage lässt sich auf die „eingebrachte“ Anzahl an endständigen Hydroxylgruppen zurückführen. So werden bei gleicher Masse an PEG 400 und PEG 2000 mit dem kürzerkettigen PEG mehr Hydroxylgruppen in den Film eingebracht. Dementsprechend steigt die Hydrophilie (messbar durch die Sorptionstendenz von Wasserdampf bei der Dynamischen Wasserdampf Sorption,) dieser Filme und durch den Kontakt mit dem Medium können schneller Poren in den Film gewaschen werden (Rupp, 2006). Hieraus resultiert die schnellere Freisetzung bei der Verwendung von PEG 400. Zusätzlich ist die Freisetzung durch die Wahl der PEG-Konzentration steuerbar. Obwohl dieser Effekt in der obigen Abbildung nur schwer zu erkennen ist, kann man durch eine Erhöhung der Konzentration eine schnellere Freisetzung erzielen. Mit Hilfe des Diagramms in Abbildung 7.4-2 sollen dieser Effekt und die oben genannten Resultate besser veranschaulicht werden. In dieser Darstellung werden die freigesetzten Mengen an Insulin nach 6 h und nach 24 h für die einzelnen Chargen zusammengefasst. Dadurch können zum einen Erkenntnisse über das erste Intervall und zum anderen über den Endpunkt der Freisetzung gewonnen werden.

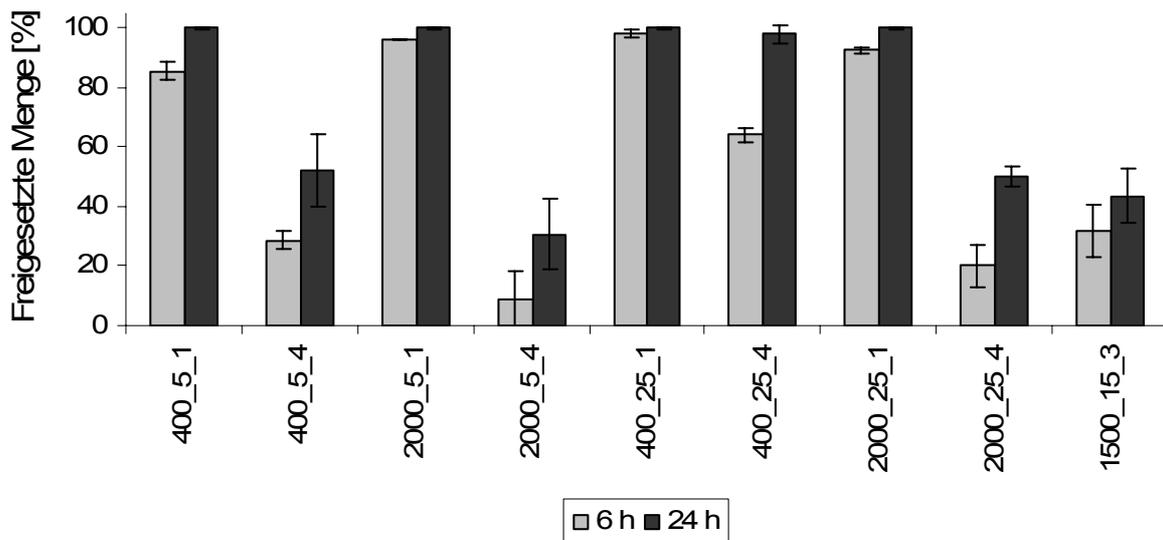


Abbildung 7.4-2 freigesetzte Menge an Insulin nach 6 h und 24 h in Abhängigkeit vom eingesetzten Film (Rupp, 2006)

Bei allen einfachen Befilmungen ist nach einer Zeitdauer von 24 h bereits die gesamte Insulinmenge freigesetzt. Zusätzlich kann man erkennen, dass durch eine Erhöhung der eingesetzten PEG-Konzentration in einem Zeitintervall mehr Wirkstoff freigesetzt wird.

Die durch die Filme hervorgerufenen Diffusionsbedingungen lassen sich, neben der Massezunahme mit der Dynamischen Wasserdampf Sorption, auch mit Hilfe der in Kapitel 5.3 erstellten Daten zum cellulolytischen Abbau untermauern. So ist es möglich, eine Korrelation zwischen der freigesetzten Menge an Insulin [%] und der Masse an Glukose [mg] zu zeigen. Der Regressionsplot dieses Zusammenhangs ist in Abbildung 7.4-3 dargestellt. Die Freisetzung des Insulins und der Glukose verläuft ähnlich. So penetriert eine Flüssigkeitsfront in den Film bis zur Faser. Beim insulinbeladenen Träger wird der Wirkstoff gelöst und diffundiert in das Medium. Bei der unbeladenen Faser dringt die Cellulase bis zur Trägeroberfläche vor, zerstört diese und die Glukose wird freigesetzt. Da bei beiden Prozessen die Diffusion der entscheidende Faktor ist, kann eine genaue Beschreibung der Diffusion in einen Film auf zwei unterschiedliche Arten erfolgen. Zudem lässt sich mit Hilfe

dieses Zusammenhangs die Aussage bestätigen, dass es nur zum Abbau des Trägers kommt. Aufgrund der im Verhältnis gleichen Mengen an freigesetztem Insulin und Glukose kann man davon ausgehen, dass nur die Faser einem enzymatischen Abbau unterliegt und Glukose abgibt und nicht der Film. Ein ähnlicher Zusammenhang konnte auch für die Werte nach 24 h gezeigt werden (Daten hier nicht abgebildet).

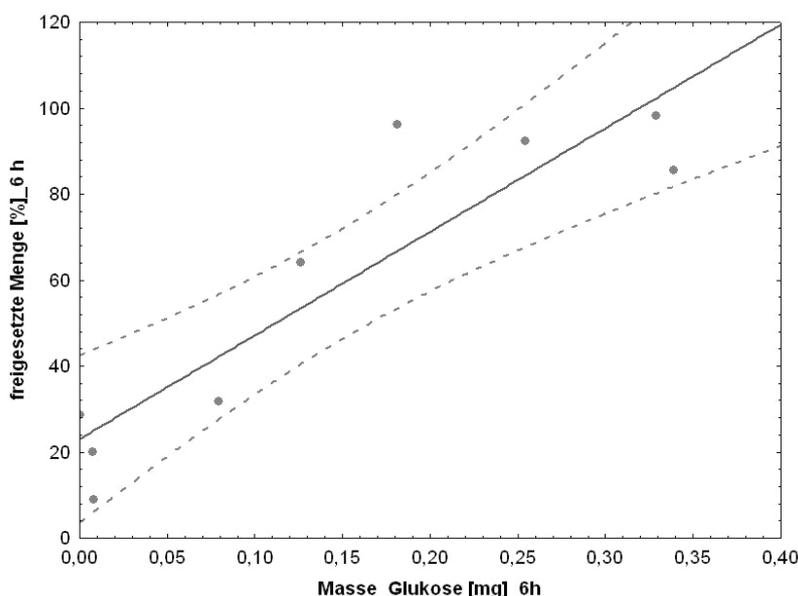


Abbildung 7.4-3 Regressionsplot freigesetzte Menge an Insulin gegen die Masse an Glukose nach 6 h

Eine Befilmung der Träger mit Ethylcellulose-Filmen mit verschiedenen PEG-Zusätzen (Variation der Konzentration und des Molekulargewichtes) ermöglichte eine verzögerte Freisetzung des Wirkstoffs aus dem System. Bei einigen Filmen konnten nach 24 h nur *circa* 30% der gesamten Insulinmenge freigesetzt werden. Jedoch basierte diese Art der Freisetzung nur auf dem Prinzip der Diffusion. Eine geforderte enzymatisch kontrollierte Freisetzung des Wirkstoffs soll im folgenden Abschnitt (7.4.3) genauer untersucht werden.

7.4.3 CELLULASEKONTROLLIERTE FREISETZUNG

Mit Hilfe einer Cellulase sollte die Freisetzung des Wirkstoffes aus dem Träger beeinflusst werden. Somit wäre parallel zum Abbau der Fasern und des Films durch das Enzym eine Modifizierung der Freisetzung gegenüber der diffusionskontrollierten Abgabe des Insulins denkbar. Die Freisetzungsbedingungen wurden analog zu den obigen Versuchen gewählt. Der Einsatz des Enzyms variierte zum einen in der Art der Cellulase (flüssig oder fest) und zum anderen in der Integration in das System (Einbringen von Cellulase in den Puffer, in den Film oder auf die Faser). In der Arbeit von Rupp (Rupp, 2006) wurden Versuche zur Integration von Cellulase in die Wundauflage und anschließender Freisetzung durchgeführt. Die wesentlichen Ergebnisse dieser Arbeit sollen kurz zusammengefasst werden. Bei der Integration von Cellulase in den Film wurde eine Filmlösung aus Ethylcellulose und 10% Pulvercellulase (bezogen auf die Filmmasse) hergestellt. Dieser Film wurde vierfach auf einen mit Wirkstoff beladenden Träger (EC_Cell_10%) aufgebracht. Parallel dazu erfolgte eine vierfache Befilmung des Trägers mit einem reinen Ethylcellulosefilm (EC_A4). Um den Einfluss eines Hilfsstoffeinsatzes im Film zu untersuchen, wurde in einem weiteren Versuch eine Befilmung mit PEG 2000-Zusatz durchgeführt. In dem ersten Ansatz wurden dem Film 25% PEG 2000 (ECP2000_25%) hinzu gegeben und in einem zweiten Ansatz 15% PEG 2000 und 10% Pulvercellulase (ECP2000_15%_Cell_10%). Beide Filme wurden jeweils viermal aufgetragen. Die Aufnahme der Freisetzungsprofile erfolgte über 24 h. Die Freisetzungskurven dieser vier Chargen wird in Abbildung 7.4-4 dargestellt. In den ersten 7 h sind die Kurvenverläufe der miteinander zu vergleichenden Chargen nahezu identisch. Das heißt, die eingesetzte Cellulase hatte keinen regulierenden Effekt auf die Freisetzung. Nach 24 h Freisetzungsdauer unterschieden sich die jeweils freigesetzten Mengen ebenfalls nur marginal voneinander, obwohl die Cellulase bereits aktiv sein müsste. Demnach kann nicht von einem entscheidenden enzymatischen Einfluss auf die Freisetzung ausgegangen werden.

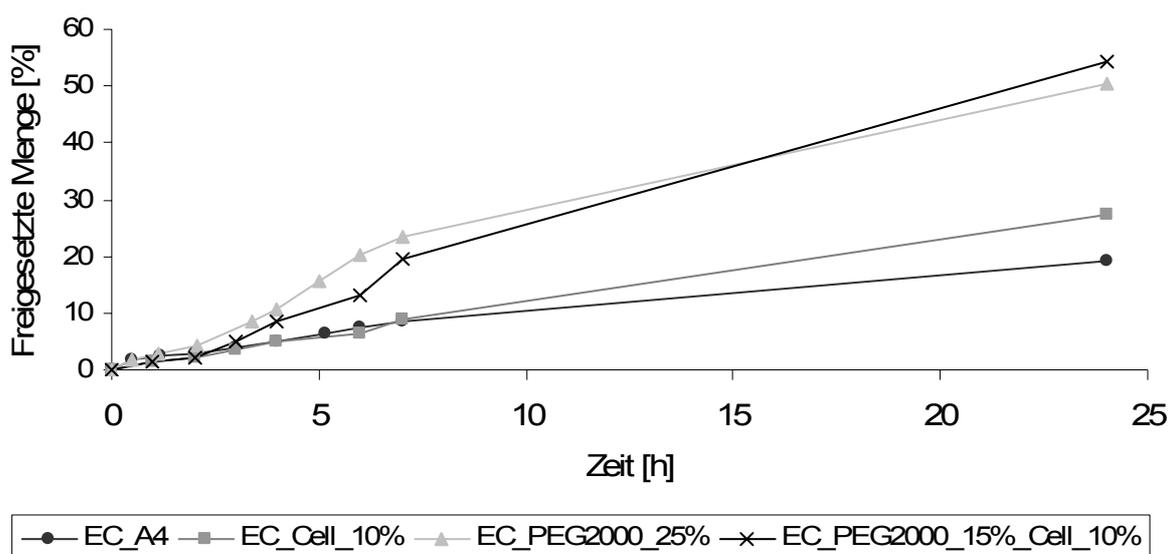


Abbildung 7.4-4 Freisetzungsprofile von cellulase- und hilfsstoffhaltigen Befilmungen einer Baumwolle über eine Zeitdauer von 24 h (Rupp, 2006)

Eine zweite Möglichkeit zur Integration der Cellulase in das System besteht in der Adsorption von Cellulase an die Faser. Hierfür wurden nach der Beladung des Trägers mit Insulin 30 µl der flüssigen Cellulase jeweils von beiden Seiten auf den Träger pipettiert. In den Film wurde erneut der Hilfsstoff PEG 2000 in einer Konzentration von 5% eingesetzt. Die Anzahl der Filmschichten betrug erneut vier, wobei jedoch nach dem Auftragen von zwei Schichten bei der cellulasehaltigen Probe nochmals je 30 µl Cellulase aufgetragen wurden, um zusätzlich das Enzym in den Film zu integrieren. Im Gegensatz zu den anderen Freisetzungen wurde für die Bestimmung des Standardwerts ein Baumwollträger mit der gleichen Menge an Cellulase versetzt und die Menge an freigesetztem Insulin untersucht. Die Zusammenfassung der freigesetzten Mengen erfolgt in Abbildung 7.4-5. Die Freisetzungskurven der befilmten Träger sind gut voneinander zu unterscheiden. So konnte durch einen Einsatz der Cellulase die freigesetzte Menge nahezu verdreifacht werden. Interessanterweise sind deutliche Unterschiede zwischen dem cellulasehaltigen Film und dem „reinen“ Film erst nach 5 h klar erkennbar, was

auf eine erforderliche Aktivierung der Cellulase schließen lässt. Durch die Integration des Enzyms unter den Film ist die Problematik des reinen Auswaschens aus dem Film minimiert.

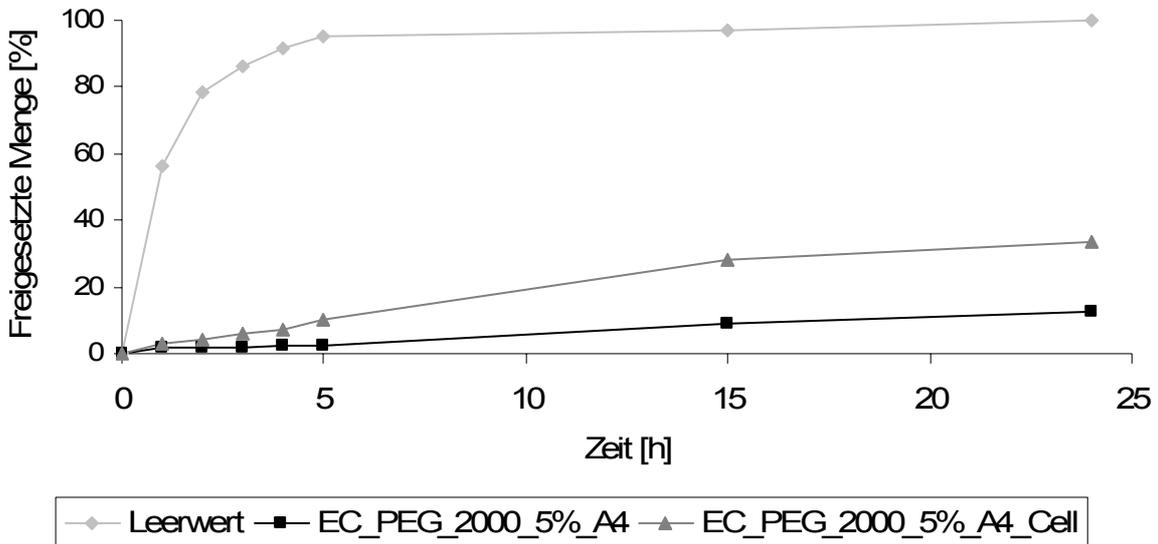


Abbildung 7.4-5 Freisetzungsprofile von cellulasehaltiger Baumwolle mit unterschiedlichen Filmen (Rupp, 2006)

Allerdings lassen sich diese Werte nicht mit den Abbaueversuchen von Filmen (Kapitel 5.3) vereinbaren, bei denen eine enzymatische Aktivität nur gegenüber dem Träger gezeigt werden konnte. Die Erhöhung der freigesetzten Mengen an Insulin unter Cellulaseeinfluss kann demnach nicht auf eine Degradation der Filme zurückzuführen sein. Eine Erklärung dieses Phänomens kann in der Ausbildung des Filmes liegen, da durch das Auftragen der Cellulase nicht alle vier Schichten homogen ineinander fließen können. Ein weiterer Grund kann in einer nachgewiesenen Zerstörung des Wirkstoffreservoirs gefunden werden. So kommt es beim cellulasehaltigen Träger zu einem sichtbaren Ablösen des Filmes vom Träger Baumwolle, womit eine veränderte Freisetzung erklärt werden könnte. Mit Hilfe von rasterelektronenmikroskopischen Aufnahmen (Abbildung 7.4-6) kann diese Aussage unterstützt werden. In beiden Fällen sind entladene Baumwollträger

gezeigt, wobei ein Träger mit Cellulase und der andere ohne Cellulase über 24 h Insulin freigesetzt hat.

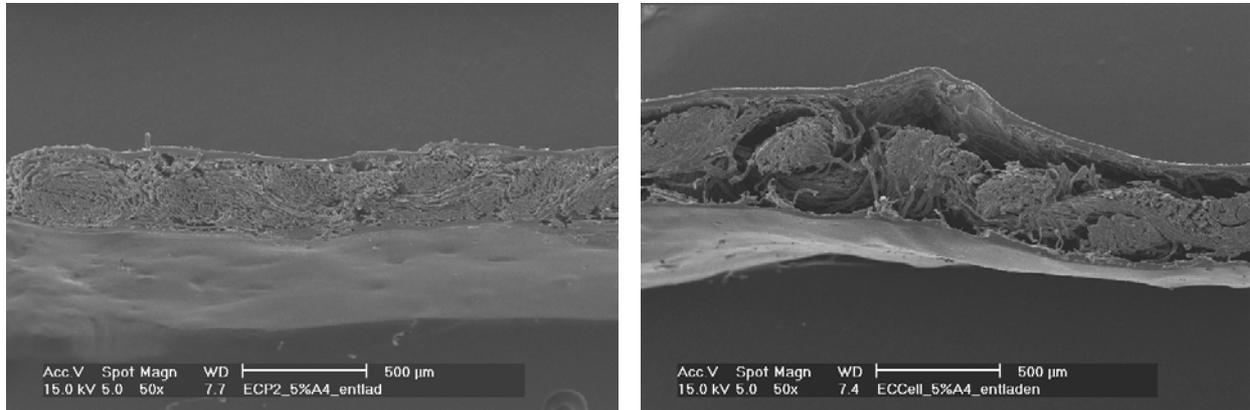


Abbildung 7.4-6 rasterelektronenmikroskopische Aufnahmen von entladenen Baumwollträgern nach einer Freisetzungsdauer von 24 h ohne (links) und mit (rechts) Cellulaseeinfluss (Rupp, 2006)

In der rechten Aufnahme ist deutlich der Einfluss der Cellulase auf das Trägersystem zu erkennen, allerdings sind keine Zerstörungen des Films auffällig. Die reine Betrachtung der Aufnahmen lässt keine Differenzierung der Filme zwischen reinem Puffer- und Cellulaseeinfluss zu, was mit den Ergebnissen zum enzymatischen Abbau von befilmten Trägern zu vereinbaren ist. Die bisherigen Untersuchungen bezüglich der cellulasekontrollierten Freisetzung konnten Veränderungen durch einen Enzymeinsatz aufzeigen: es sind jedoch einige Probleme zu erkennen. Zum einen besteht bei der Verwendung von Pulvercellulase die Tendenz des HerauslöSENS aus dem Film. Zum anderen kann durch den Zusatz der flüssigen Cellulase zwischen den Filmschichten die Bildung eines homogenen Filmes verhindert werden. Um beide Faktoren auszuschließen, wurde in einem neuen Ansatz die flüssige Cellulase in das Freisetzungsmittel gegeben und der Einfluss auf die freigesetzte Menge untersucht. Die Basis für die Auswahl der Befilmungen bildete die statistische Versuchsanalyse aus Kapitel 5.3 zur Untersuchung des

enzymatischen Abbaus von Filmmaterialien. Das Gesamtvolumen (Puffer und Cellulase) betrug 6 ml, um einen Vergleich mit der diffusionskontrollierten Freisetzung (7.4.2) zu ermöglichen. Die Festlegung des 100%-Werts erfolgte durch eine Freisetzung eines unbefilmten Trägers im cellulasehaltigen Puffer. Die Wahl dieser Freisetzungsbedingungen führte allerdings zu erheblichen messtechnischen Schwierigkeiten mit der HPLC. So konnten keine symmetrischen Peaks detektiert werden und eine Quantifizierung der Insulinmengen war nur durch eine Extrapolation der Basislinie möglich. Dies könnte mehrere Ursachen haben. Zum einen kann die Cellulase die gewählten Messbedingungen stören, jedoch war eine Bestimmung des Standardwertes unproblematisch. Zum anderen könnten Abbauprodukte der Cellulolyse die Analytik stören, zumal diese Probleme erst nach *circa* 7 h auftraten und eine Bestimmung ab diesem Zeitpunkt unmöglich machten. Demnach ist auf eine mögliche Interaktion zwischen Arzneistoff, Abbauprodukten und Cellulose zu prüfen. Diese sollte aber nicht Gegenstand der Untersuchungen sein. Trotz dieser genannten Probleme war eine quantitative Bestimmung der freigesetzten Mengen an Insulin nach einer Dauer von 6 h durchführbar. In der Abbildung 7.4-7 erfolgt ein Vergleich der freigesetzten Mengen an Insulin zwischen der diffusionskontrollierten Freisetzung und den Werten unter Cellulaseeinfluss. Aufgrund der beschriebenen Problematik war eine Bestimmung über diesen Zeitraum hinaus nicht zuverlässig möglich. Jedoch können mit Hilfe des Diagramms die obigen Tendenzen bestätigt werden, dass ein Zusatz von Cellulase keinen Einfluss auf die Filmbeschaffenheit ausübt und dementsprechend die Freisetzung nicht direkt beeinflussen kann. Trotz unterschiedlicher Filmzusammensetzungen ist kein signifikanter Cellulaseeinfluss zu erkennen. Die freigesetzten Mengen an Insulin sind ungefähr mit denen der diffusionskontrollierten Freisetzung zu vergleichen. Bei einigen Chargen (z.B. 400_5_4; 2000_5_4 oder 2000_25_1) konnte unter Cellulaseeinfluss mehr Wirkstoff freigesetzt werden, allerdings sind diese Werte zufällig verteilt. Trotz der hohen Standardabweichungen der „Cellulase-

messwerte“ und der problematischen Quantifizierung der freigesetzten Insulinmengen lässt sich darauf schließen, dass die Freisetzung aus diesem System nur diffusionskontrolliert ist und ein enzymatischer Einfluss demzufolge nicht besteht.

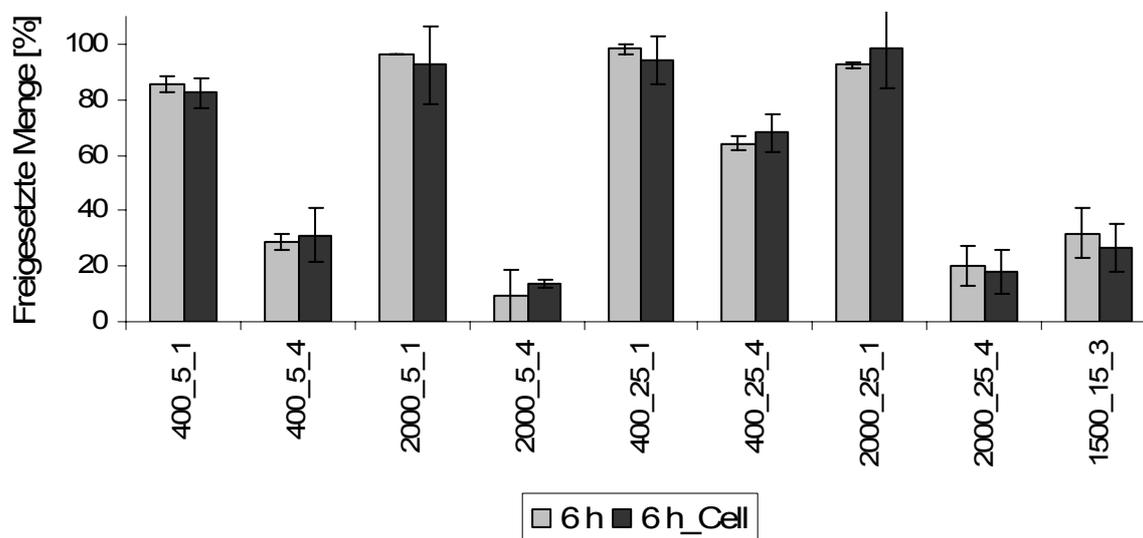


Abbildung 7.4-7 freigesetzte Mengen an Insulin nach 6 h unter Diffusions- und Cellulaseeinfluss

7.4.4 ZUSAMMENFASSUNG

Eine Befilmung der Fasern mit einem Ethylcellulosefilm und unterschiedlichen hydrophilen Zusätzen konnte zu einer Verzögerung der freigesetzten Menge an Insulin über 24 h hinaus führen. Der durch einfache Adsorption des Wirkstoffs an die Fasern verursachte Bursteffekt konnte damit verhindert werden. Mit Hilfe einer statistischen Versuchsanalyse bezüglich der Art der Befilmungen ist es nun möglich, die Freisetzung von der Faser sehr genau zu variieren. Allerdings basieren diese Vorgänge nur auf Diffusionsvorgängen und eine angestrebte Modifizierung der Freisetzung durch den Einfluss einer Cellulase konnte nicht erreicht werden. Weder die Ansätze von Rupp (Rupp, 2006) noch die Versuche dieser Arbeit bestätigen einen enzymatischen Einfluss auf die Freisetzung.

8 ZUSAMMENFASSUNG

Das Ziel der Arbeit war die Entwicklung einer enzymatisch abbaubaren Wundauflage mit dem isolierten Madensekret der Fliegengattung *Lucilia sericata* als Wirkstoff. Da das Einsatzgebiet vorwiegend auf dem Gebiet der chronischen Wunden liegen sollte, musste die Freisetzung des Wirkstoffs über einen möglichst langen Zeitraum verzögert werden und sollte gesteuert durch die enzymatische Degradation der Wundauflage stattfinden.

Als Träger wurden Materialien basierend auf dem natürlichen Rohstoff der Cellulose verwendet, um einen enzymatischen Abbau des Wirkstoffreservoirs durch den Einsatz einer Cellulase zu ermöglichen. Ein Großteil der Materialien wurde zuvor mit Salzsäure vorbehandelt, weil durch eine partielle Depolymerisation ein beschleunigter enzymatischer Abbau vermutet wurde.

Zunächst wurden Analytiken entwickelt, die eine umfangreiche Charakterisierung von potentiellen Trägern gestatten. Besonders aufschlussreich waren hierbei die mit einer inversen Gaschromatographie ermittelten Eigenschaften wie das Adsorptionspotential und die spezifische Oberfläche der Fasern und das mit Hilfe der Differential Scanning Calorimetry bestimmte Wasserbindungsvermögen der Cellulosematerialien. Aufgrund der durch diese Verfahren erlangten Kenntnisse war es möglich, eine Auswahl an Materialien für weitere Untersuchungen zu treffen. Da neben einer hohen Beladungskapazität mit einem Wirkstoff und einem guten Aufsaugvermögen für das Wundexsudat auch der enzymatische Abbau des Trägers entscheidend war, wurden alle Materialien vor der Untersuchung mit Salzsäure vorbehandelt. Ein signifikanter Einfluss unterschiedlicher Säureeinwirkungen auf die Fasereigenschaften konnte in den Versuchen nicht ermittelt werden. Allerdings wurde mit Hilfe einer statistischen Versuchsanalyse die Veränderung von Fasereigenschaften eines Baumwollmaterials unter Säureeinwirkung genauer untersucht. Mit diesem Versuch konnten erneut keine wesentlichen Veränderungen der

Fasereigenschaften bestimmt werden. Trotzdem kam es zu leichten Veränderungen der Parameter, und für folgende Versuche dieser Arbeit stand ein Baumwollmaterial mit geringfügig unterschiedlichen, genau charakterisierten, Eigenschaften zur Verfügung. Somit konnte ein Zusammenhang des Ausmaßes einer Cellulolyse direkt mit der adsorptiven Eigenschaft der abzubauenen Faser korreliert werden. Es zeigte sich, dass der Einsatz einer Säure das Adsorptionspotential senkt. Folglich sollte auf diesen Schritt in der Vorbehandlung der Fasern verzichtet werden. Sinnvoller zur Präparation der Fasern scheint der Einsatz einer Cellulase zu sein, denn neben der Steigerung des Wasserbindungsvermögens konnte auch das Adsorptionspotential der Fasern erhöht und die Kristallinität gesenkt werden. Diese Eigenschaften waren zum einen wichtig für eine gute Stabilität des adsorbierten Madensekrets und zum anderen könnte die enzymatische Degradation des Trägers in der Wunde effektiver ablaufen. Mit Hilfe cellulolytischer Enzyme ließen sich physikochemische Eigenschaften von Fasern gezielt und systematisch verändern. Für die Charakterisierung der Cellulolyse der Träger konnte mit dem Anfärben der Fasern mit Remazolblau eine Methode gefunden werden, um schnell und reproduzierbar den Fortgang des Abbaus zu bestimmen. Bei der Untersuchung von mit Ethylcellulose befilmten Baumwollträgern im Hinblick auf deren enzymatischen Abbau konnten allerdings keine Hinweise auf eine Degradation des Films gefunden werden.

Für die Entwicklung des Wirkstoffes wurde in dieser Arbeit das Sekret der Maden der Fliegengattung *Lucilia sericata* stabilisiert. Die Stabilisierung sollte durch eine Gefriertrocknung erreicht werden. Für eine Evaluierung des Gefriertrocknungsverfahrens wurde zunächst das isolierte Sekret der Maden bezüglich seiner Eigenschaften untersucht. Ein häufig beschriebenes antibiotisches Potential konnte hierbei nicht nachgewiesen werden. Jedoch war es möglich, mit der Angabe zweier verschiedener enzymatischer Aktivitäten das Sekret zu charakterisieren. Hierfür wurde die tryptische

Aktivität und die Leucinaminopeptidase-Aktivität des reinen Sekrets vor der Lyophilisation ermittelt. Zudem wurde eine Reihe von typischen Hilfsstoffen für die Gefriertrocknung getestet. Durch den Vergleich der Aktivitäten vor und nach der Gefriertrocknung konnte eine Auswahl an geeigneten Stabilisatoren getroffen werden. Besonders mit dem Hilfsstoff Trehalose konnte eine hohe Stabilität der tryptischen Aktivität erreicht werden. Generell war für das Erzielen hoher tryptischer Aktivitäten der Einsatz eines Tensids essentieller als die Verwendung eines höhermolekularen Hilfsstoffs. Für den Erhalt der Leucinaminopeptidase-Aktivität waren die Verhältnisse genau entgegengesetzt und es könnte eher auf ein Tensid verzichtet werden.

Für die Adsorption von Madensekret an die Faser wurde zum einen ein Gemisch mit den Hilfsstoffen aus der Lyophilisation verwendet und zum anderen nur das mit Tensid stabilisierte Sekret auf die Faser aufgetrocknet. Der alleinige Einsatz der Faser führte nicht zu zufriedenstellenden Aktivitäten. Jedoch konnten durch die Analyse der physikochemischen Eigenschaften mit Hilfe der inversen Gaschromatographie Erkenntnisse über den Einfluss der Faserbeschaffenheit auf die Aktivität gewonnen werden.

Die hohe Instabilität des Wirkstoffs Madensekret und eine fehlende Analytik zur genauen Quantifizierung ließen keine Freisetzungsuntersuchungen mit Madensekret zu. Da ein Großteil der Madensekretinhaltsstoffe Enzyme und damit Polypeptide sind, wurde zur Erstellung von Freisetzungsprofilen der Peptidarzneistoff Insulin als Modellsubstanz verwendet. Eine reine Adsorption des Insulins an verschiedene Träger führte zu einer schnellen Freisetzung mit typischem Bursteffekt. Deshalb wurden die wirkstoffbeladenen Träger mit Ethylcellulose und verschiedenen Zusätzen an PEG befilmt und so eine verzögerte Freisetzung über einen Zeitraum von mehr als 24 h erreicht. Die Steuerung der Freisetzung war damit allerdings nur diffusionskontrolliert möglich und nicht wie gefordert durch den gezielten Einsatz einer Cellulase abbaubedingt. Weder die Versuche zur Freisetzung noch zum enzymatischen

Abbau konnten eine Degradation der Ethylcellulose durch cellulolytische Enzyme bestätigen.

Als Resultat dieser Arbeit lässt sich feststellen, dass eine gesteuerte Freisetzung eines Wirkstoffes durch den enzymatischen Abbau eines Celluloseträgers nur dann möglich ist, wenn dieser in die Faser integriert oder irreversibel an die Oberfläche gebunden wird. Eine Stabilisierung zweier enzymatischer Aktivitäten des Madensekrets steriler Fliegenmaden ist zudem möglich und könnte bei detaillierten Kenntnissen über die Zusammensetzung weiter optimiert werden. Die anschließende Adsorption des Sekrets an eine Cellulose erfordert eine umfangreiche Charakterisierung der Oberfläche, damit stabilisierende Effekte auf die Enzym-Aktivitäten ausgeübt werden können.

Es konnte gezeigt werden, dass dies mit den in dieser Arbeit verwendeten analytischen Methoden und Herstellungsverfahren möglich ist.

9 ABSTRACT

The aim of this thesis was the development of an enzymatically degradable wound dressing with the isolated secretion of the fly genus *Lucilia sericata* as active ingredient. As in most cases the application is on chronic wounds, the release of the active ingredient should be delayed for an extended period and it also has to be controlled by an enzymatic degradation of the wound dressing.

As carrier, materials based on the natural raw material of cellulose were used, in order to enable an enzymatic degradation of the active ingredient caused by the cellulose. A large part of the materials were previously pretreated by hydrochloric acid, as it is thought that, an accelerated enzymatic degradation is caused by these partial degradation.

At first, the aim was to find analytical methods which make a large characterisation of potential carriers possible. The characteristics which were examined by means of the inverse gas chromatography, like the adsorption potential, the specific surface of the fibre and the capability of the cellulose materials to fix water by DSC-method were of special importance. The information delivered by these methods made the selection of materials for the following tests possible. As the wound dressing had to bind the active ingredient and adsorb wound fluid and also the enzymatic degradation of the carrier was very important, all of the materials were partly pretreated with hydrochloric acid before the examinations. A significant influence of the different effects of the acid on the characteristics of the fibre could not be found. With the aid of a statistical analysis of the experiments, the change of the characteristics of fibres of cotton caused by acid could be established. With this experiment, again no essential change in characteristic of the fibre could be detected. Nevertheless, slight changes in the parameters occurred and so for the following experiments of this study, a cotton material with slightly different, exactly characterized properties was available. Consequently,

a direct correlation between the strength of the cellulolyse and the adsorptive properties of the degradable fibre could be detected. It was clearly shown that the use of acid could reduce the adsorption potential. Thus, this step of preparation of the fibre should be cancelled. The preparation of the fibre by means of cellulose seems to make more sense, as besides the increase of the ability to fix the water, the adsorption potential of the fibres was heightened and the crystallinity decreased. Those characteristics were important for good stability of the adsorbed larval secretion and also a enzymatic degradation of the carrier in the wound could be more effective. By means of cellulolytic enzymes, the physicochemical properties of the fibres could be influenced and altered specifically. In order to characterise the cellulolyse of the carrier, the staining of the fibres with remazol brilliant blue was a good method to define the progress of degradation. The analysis of the cotton carrier, covered with a film did not show any indication for degradation of the film.

For the development of an active ingredient, in this study, the secretion of the fly genus *Lucilia sericata* was stabilised. The stabilisation of the secretion was to be obtained by freeze drying. For an evaluation of the process, first of all the isolated secretion of the maggots was examined for its characteristics. A commonly described antibiotic potential could not be proved in this connection. However, it was possible to characterise the secretion with two different enzymatic activities. For this purpose, the tryptic activity and also the leucine aminopeptidase activity of the pure secretion were detected before lyophilisation. Furthermore, a set of typical excipients was tested for the lyophilisation. By comparing the activities before and after freeze-drying a selection of suitable stabilizers could be made. Especially with the excipient trehalose, a high stability of the tryptic activity could be achieved. In general, for attaining high tryptic activities, the use of a surfactant was more important than the use of a high-molecular excipient. To conserve the leucine aminopeptidase, the proportions were exactly opposite and a surfactant was not necessary.

For the adsorption of the secretion on the fibre a mixture of the excipients of the lyophilisation was used and then only the secretion which was stabilised with surfactant was dried onto the fibre. The exclusive use of the fibre did not show satisfying activities. However, the analysis of the physicochemical characteristics by means of inverse gas chromatography showed the influence of the composition of the fibre on the activity.

The high instability of the active ingredient of the larval secretion and a missing chemical analysis for the exact quantification did not allow any examinations of release of the larval secrete. Because a large part of the ingredients of the larval secrete are enzymes and therefore polypeptides, the peptide-drug insulin was used as model substance in order to get profiles of release. A pure adsorption of insulin on different carriers led to a rapid release with the typical burst-effect. Therefore the carriers including the active ingredient were covered with ethyl cellulose and different additives of PEG and consequently the release was retarded for a period of more than 24 hours. Regulation of the release was therefore only controlled by diffusion, and not as required, by the specific use of a cellulase. Neither the tests of release, nor the tests of enzymatic decomposition, could confirm a degradation of the ethyl cellulose by cellulolytical enzymes.

As result of this thesis it can be seen, that a controlled release of the active ingredient caused by enzymatic degradation of a cellulose carrier is only possible, when the active ingredient is integrated into the fibre or fixed irreversibly at the surface. Furthermore, the stabilisation of two enzymatic activities of the larval secrete of sterile maggots is possible and could be optimized with more detailed knowledge about its composition. The following adsorption of the secretion on cellulose requires an extensive characterisation of the surface in order to have a stabilizing effect on the activity. It could be shown that this is possible by the analytical methods and manufacturing processes used in this study.

10 ANHANG

10.1 ABKÜRZUNGEN UND SYMBOLE

AUC	Fläche unter der Kurve
BW	Baumwolle
°C	Grad Celsius
CBH	Cellobiohydrolase
CV	Viskose
DE	Dextroseäquivalent
DSC	Differential Scanning Calorimetry
DVS	Dynamic Vapour Sorption
EG	Endoglucanase
h	Stunde
HPLC	High Pressure Liquid Chromatographie
IGC	Inverse Gaschromatographie
KBE	Koloniebildende Einheiten
LAP	Leucinaminopeptidase
m/m	Masseprozent
mg	Milligramm
min	Minute
MRSA	Methicillinresistenter Staphylococcus aureus
RBBR	Remazolbrilliantblau R
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RH	Relative Humidity
Spez.	Spezifisch
T _g	Glasübergangspunkt
TGA	Thermogravimetrie
Λ	Wellenlänge
Θ	Beugungswinkel
D	Viskosität

10.2 HPLC-ANALYTIK

10.2.1 APPARATIVER AUFBAU

Die Ermittlung der freigesetzten Insulinmengen erfolgte chromatographisch unter Verwendung einer Waters – HPLC – Mehrkomponentenanlage (Waters Corp., Milford, USA), die aus der Pumpeneinheit Waters 600E Multisolvent Delivery System, dem Entgaser Waters Inline Degasser AF, dem Waters 717 plus Autosampler und einem Waters 996 Photodioden Array Detektor bestand. Die Messungen erfolgten isotherm bei einer umgebenen Säulentemperatur von 25°C. Die Auswertung der Chromatogramme erfolgte mit der systemeigenen Software Waters Empower 1154. Die Analytik erfolgte unter isokratischen Bedingungen. Die Komponenten des Fließmittels hatten ausschließlich HPLC-Qualität und das verwendete Wasser war bidestilliert. Zur Herstellung des Fließmittels wurde dieses zunächst 20 min im Ultraschall entgast und anschließend mit Helium durchspült.

10.2.2 INSULINANALYTIK

Stationäre Phase:	Merck® Kartuschensystem
Säule:	LiChroChart® 125-4 LiChroSpher® 100 RP-18 (5µm)
Vorsäule:	LiChroChart® 4-4 LiChroSpher® 100 RP-18 (5µm)
Mobile Phase:	73% (V/V) Puffer 0,01 M KH ₂ PO ₄ und 0,1 M Na ₂ SO ₄ mit H ₃ PO ₄ auf pH 3 eingestellt
Flussrate:	0,9 ml/min
Injektionsvolumen:	100 µl
Retentionszeit:	6 – 8 min
Wellenlänge:	215 nm

11 LITERATURVERZEICHNIS

Allison, S. D., Dong, A. und Carpenter, J. F. (1996)

Counteracting effects of thiocyanate and sucrose on chymotrypsinogen secondary structure and aggregation during freezing, drying and rehydration. *Biophysical Journal* 71 2022-2032.

Allison, S. D., Manning, M. C., Randolph, T. W., Middleton, K., Davis, A. und Carpenter, J. F. (2000)

Optimization of storage stability of lyophilized actin using combinations of disaccharides and dextran. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 89 (2): 199-214.

Azevedo, H., Bishop, D. und Cavaco-Paulo, A. (2002)

Possibilities for recycling cellulases after use in cotton processing: part II: separation of cellulases from reaction products and released dyestuffs by ultrafiltration. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 101 (1): 77-91.

Bach, E. und Schollmeyer, E. (1994)

Studies on swelling kinetics by cellulases in cotton pretreatment. *Textilveredlung* 29 (10): 284-8.

Baer, W. S. (1931)

The treatment of chronic osteomyelitis with the maggot (larvae of the blowfly). *Journal of Bone Joint Surgery* 13 438-475.

Barham, D. und Trinder, P. (1972)

An improved colour reagent for the determination of blood glucose by the oxidase system. *Analyst* 97 142-145.

Barr, B. K., Hsieh, Y.-L., Ganem, B. und Wilson, D. B. (1996)

Identification of two functionally different classes of exocellulases. *Biochemistry* 35 (2): 586-92.

Behrend, D., Schmitz, K. P. und Haubold, A. (2000)

Bioresorbable polymer materials for implant technology. *Advanced Engineering Materials* 2 (3): 123-125.

Belgacem, M. N., Blayo, A. und Gandini, A. (1996)

Surface characterization of polysaccharides, lignins, printing ink pigments, and ink fillers by inverse gas chromatography. *Journal of Colloid and Interface Science* 182 (2): 431-436.

Belgacem, M. N., Czeremuskin, G., Sapiha, S. und Gandini, A. (1995)
Surface characterization of cellulose fibers by XPS and inverse gas chromatography. *Cellulose (London)* 2 (3): 145-157.

Belgacem, M. N. und Gandini, A. (1999)
Inverse gas chromatography as a tool to characterize dispersive and acid-base properties of the surface of fibers and powders. *Surfactant Science Series* 80 (Interfacial Phenomena in Chromatography): 41-124.

Bexfield, A., Nigam, Y., Thomas, S. und Ratcliffe, N. A. (2004)
Detection and partial characterisation of two antibacterial factors from the excretions/secretions of the medicinal maggot *Lucilia sericata* and their activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Microbes and Infection* 6 (14): 1297-1304.

Bonn, D. (2000)
Maggot therapy: an alternative for wound infection. *Lancet* 356 (9236): 1174.

Brewster, M. E., Hora, M. S., Simpkins, J. W. und Bodor, N. (1991)
Use of 2-hydroxypropyl β -cyclodextrin as a solubilizing and stabilizing excipient for protein drugs. *Pharmaceutical Research* 8 (6): 792-5.

Buschle-Diller, G., Inglesby, M. K. und Wu, Y. (2005)
Physicochemical properties of chemically and enzymatically modified cellulosic surfaces. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* 260 (1-3): 63-70.

Buschle-Diller, G. und Traore, M. K. (1998)
Influence of direct and reactive dyes on the enzymic hydrolysis of cotton. *Textile Research Journal* 68 (3): 185-192.

Carpenter, J. F. und Crowe, J. H. (1988)
The mechanism of cryoprotection of proteins by solutes. *Cryobiology* 25 244-255.

Cavaco-Paulo, A., Almeida, L. und Bishop, D. (1996)
Cellulase activities and finishing effects. *Textile Chemist and Colorist* 28 (6): 28-32.

Chambers, L., Woodrow, S., Brown, A. P., Harris, P. D., Phillips, D., Hall, M., Church, J. C. T. und Pritchard, D. I. (2003)
Degradation of extracellular matrix components by defined proteinases from the greenbottle larva *Lucilia sericata* used for the clinical debridement of non-healing wounds. *British Journal of Dermatology* 148 (1): 14-23.

- Chang, B. S., Kendrick, B. S. und Carpenter, J. F. (1996)**
Surface-Induced Denaturation of Proteins during Freezing and Its Inhibition by Surfactants. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (12): 1325-1330.
- Colsky, A. S., Kirsner, R. S. und Kerdel, F. A. (1998)**
Analysis of antibiotic susceptibilities of skin wound flora in hospitalized dermatology patients: the crisis of antibiotic resistance has come to the surface. *Archives of Dermatology* 134 (8): 1006-1009.
- Correia, M. J., De Sousa Pereira Junior, J. A., Dos Santos, J. C. und De Queiroz Cavalcanti, M. A. (1998)**
Use of remazol Blue dyed Avicel for the determination of cellulolytic activity in basidiomycetes. *Revista de Microbiologia* 29 (4): 286-288.
- Costantino, H. R., Carrasquillo, K. G., Cordero, R. A., Mumenthaler, M., Hsu, C. C. und Griebenow, K. (1998)**
Effect of Excipients on the Stability and Structure of Lyophilized Recombinant Human Growth Hormone. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87 (11): 1412-1420.
- Crowe, J. H., Carpenter, J. F. und Crowe, L. M. (1998)**
The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual Review of Physiology* 60 73-103.
- Csiszar, E., Urbanszki, K. und Szakacs, G. (2001)**
Biotreatment of desized cotton fabric by commercial cellulase and xylanase enzymes. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic* 11 (4-6): 1065-1072.
- Daukas, L. A. und Trappler, E. H. (1998)**
Assessing the quality of lyophilized parenterals. *Pharmaceutical and Cosmetic Quality* 2 21-25.
- Diehm, C. (2005)**
Modernes Wundmanagement Chronische und infizierte Wunden heilen ab. *Gefäßreport* 1 3.
- Dissemond, J., Koppermann, M., Esser, S., Schultewolter, T., Goos, M. und Wagner, S. N. (2002)**
Treatment of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) as part of biosurgical management of a chronic leg ulcer. Germany: Germany, Federal Republic of, Dermatologische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Essen, Germany. 608-12.

Dissemond, J., Witthoff, M., Brauns, T. C., Haberer, D. und Goos, M. (2003)

pH values in chronic wounds. Evaluation during modern wound therapy. *Der Hautarzt; Zeitschrift für Dermatologie, Venerologie, und verwandte Gebiete* 54 (10): 959-65.

Essig, D., Oschmann, R., Schwabe, W. und Editors (1993)

Lyophilization (A Seminar of the APV - Association for Pharmaceutical Process Engineering), 23-24 November 1992, Würzburg. [In: Paperback APV. 1993; 35].

Fekete, E., Moczo, J. und Pukanszky, B. (2004)

Determination of the surface characteristics of particulate fillers by inverse gas chromatography at infinite dilution: a critical approach. *Journal of Colloid and Interface Science* 269 (1): 143-152.

Felix, J. M. und Gatenholm, P. (1993)

Characterization of cellulose fibers using inverse gas chromatography. *Nordic Pulp & Paper Research Journal* 8 (1): 200-3.

Fleischmann, W. (2000)

Bandages containing Maggot secretions. Application: EP EP, (Germany). 8 pp.

Fleischmann, W. und Grassberger, M. (2002)

Erfolgreiche Wundheilung durch Madentherapie, Trias-Verlag.

Fleischmann, W., Russ, M., Moch, D. und Marquardt, C. (1999)

Biosurgery - maggots, are they really the better surgeons? *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 70 (11): 1340-6.

Fleischmann, W., Russ, M. K. und Moch, D. (1998)

Surgical wound treatment. *Der Chirurg; Zeitschrift für alle Gebiete der operativen Medizin* 69 (2): W222-32.

Fowkes, F. M. (1964)

Attractive forces at interfaces. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry (Washington, D. C.)* 56 (12): 40-52.

Frost, L. D. (2004)

Glucose assays revisited: Experimental determination of the glucose concentration in honey. *Chemical Educator* 9 (4): 239-241.

Gardner, S. E., Frantz, R. A., Saltzman, C. L. und Dodgson, K. J. (2004)
Staphylococcus aureus is associated with high microbial load in chronic wounds. *Wounds* 16 (8): 251-257.

Geiger, R. (1987)
Kommentar zur Insulin-Monographie. In: *Hartke, Mutschler (Hrsg.) DAB 9 Kommentar* Govi Verlag Frankfurt 1988-1994.

George, J., Ramana, K. V., Sabapathy, S. N. und Bawa, A. S. (2005)
Physico-Mechanical Properties of Chemically Treated Bacterial (*Acetobacter xylinum*) Cellulose Membrane. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 21 (8-9): 1323-1327.

Giese, C. (1999)
Langzeitkultur primärer Lutealzellen des bovinen Corpus luteum in einem kontinuierlichen Bioreaktor und Untersuchung der Progesteronproduktion in vitro. Institut für Biochemie und Endokrinologie. Gießen, Justus-Liebig-Universität. 123.

Gloger, O., Witthohn, K. und Muller, B. W. (2003)
Lyoprotection of aviscumine with low molecular weight dextrans. *International Journal of Pharmaceutics* 260 (1): 59-68.

Grassberger, M. und Fleischmann, W. (2002)
The biobag - a new device for the application of medicinal maggots. *Dermatology (Basel, Switzerland)* 204 (4): 306.

Grassberger, M. und Frank, C. (2003)
Wound healing by steril fly larvae: basic mechanical, biochemical and microbiological principles. *Wiener medizinische Wochenschrift (1946)* 153 (9-10): 198-201.

Greenberg, B. (1968)
Model for the destruction of bacteria in the midgut of blow fly maggots. *Journal of Medicinal Entomology* 5 31-38.

Gutmann, V. (1978)
The Donor-Acceptor Approach to Molecular Interactions.

Haga, T., Mori, R., Wakida, T. und Takagishi, T. (2000)
Hydrolysis of mercerized cotton fibers due to cellulase treatment. *Journal of Applied Polymer Science* 78 (2): 364-370.

Hamada, N., Ishikawa, K., Fuse, N., Kodaira, R., Shimosaka, M., Amano, Y., Kanda, T. und Okazaki, M. (1999)

Purification, characterization and gene analysis of exo-cellulase II (Ex-2) from the white rot basidiomycete *Irpex lacteus*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 87 (4): 442-451.

Hansson, C., Hoborn, J., Moller, A. und Swanbeck, G. (1995)

The microbial flora in venous leg ulcers without clinical signs of infection. Repeated culture using a validated standardised microbiological technique. *Acta dermato-venereologica* 75 (1): 24-30.

Hartzell, M. M. und Hsieh, Y.-L. (1998)

Enzymic scouring to improve cotton fabric wettability. *Textile Research Journal* 68 (4): 233-241.

Haußmann, W. (2000)

Biochirurgie mit Fliegenmaden. *PZ Prisma* 7 (4): 234-240.

Horobin, A. J., Shakesheff, K. M., Woodrow, S., Robinson, C. und Pritchard, D. I. (2003)

Maggots and wound healing: an investigation of the effects of secretions from *Lucilia sericata* larvae upon interactions between human dermal fibroblasts and extracellular matrix components. *British journal of dermatology* 148 (5): 923-33.

Hoshino, E., Kubota, Y., Okazaki, M., Nisizawa, K. und Kanda, T. (1994)

Hydrolysis of cotton cellulose by exo- and endo-type cellulases from *Irpex lacteus*: differential scanning calorimetric study. *Journal of Biochemistry (Tokyo, Japan)* 115 (5): 837-42.

Howell-Jones, R. S., Wilson, M. J., Hill, K. E., Howard, A. J., Price, P. E. und Thomas, D. W. (2005)

A review of the microbiology, antibiotic usage and resistance in chronic skin wounds. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 55 (2): 143-149.

Irwin, D. C., Spezio, M., Walker, L. P. und Wilson, D. B. (1993)

Activity studies of eight purified cellulases: specificity, synergism, and binding domain effects. *Biotechnology and Bioengineering* 42 (8): 1002-13.

Izutsu, K., Yoshioka, S. und Kojima, S. (1994)

Physical stability and protein stability of freeze-dried cakes during storage at elevated temperatures. *Pharmaceutical Research* 11 (7): 995-9.

Izutsu, K., Yoshioka, S. und Kojima, S. (1995)

Increased stabilizing effects of amphiphilic excipients on freeze-drying of lactate dehydrogenase (LDH) by dispersion into sugar matrices. *Pharmaceutical research* 12 (6): 838-43.

Jacob, P. N. und Berg, J. C. (1994)

Acid-Base Surface Energy Characterization of Microcrystalline Cellulose and Two Wood Pulp Fiber Types Using Inverse Gas Chromatography. *Langmuir* 10 (9): 3086-93.

Jaroniec, M., Gadkaree, K. P. und Choma, J. (1996)

Relation between adsorption potential distribution and pore volume distribution for microporous carbons. *Colloids and Surfaces, A: Physicochemical and Engineering Aspects* 118 (3): 203-210.

Johnson, R. E., Kirchhoff, C. F. und Gaud, H. T. (2002)

Mannitol-sucrose mixtures-versatile formulations for protein lyophilization. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 91 (4): 914-922.

Kasulke, U., Dautzenberg, H., Polter, E. und Philipp, B. (1983)

Enzymic degradation of some cellulose derivatives. *Cellulose Chemistry and Technology* 17 (5): 423-32.

Khoddami, A., Siavashi, M., Ravandi, S. A. H. und Morshed, M. (2002)

Enzymatic hydrolysis of cotton fabrics with weft yarns produced by different spinning systems. *Iranian Polymer Journal* 11 (2): 99-106.

Koessi, J., Peltonen, J., Ekfors, T., Niinikoski, J. und Laato, M. (1999)

Effects of hexose sugars. Glucose, fructose, galactose, and mannose on wound healing in the rat. *European Surgical Research* 31 (1): 74-82.

Kumar, V. und Banker, G. S. (1993)

Chemically-modified cellulosic polymers. *Drug Development and Industrial Pharmacy* 19 (1-2): 1-31.

Landendörfer, P. (2005)

Chronische Wunden im Alter. *Der Allgemeinarzt* 19 1-5.

Lerch, K., Linde, H.-J., Lehn, N. und Grifka, J. (2003)

Bacteria ingestion by blowfly larvae: an in vitro study. *Dermatology (Basel, Switzerland)* 207 (4): 362-6.

Leuenberger, H. (2002)

Martin Physikalische Chemie, Wissenschaftl. Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Levine, H. und Slade, L. (1988)

Thermomechanical properties of small-carbohydrate-water glasses and 'rubbers': kinetically metastable systems at sub-zero temperatures. *Journal of the Chemical Society, Faraday Transactions 1: Physical Chemistry in Condensed Phases* 84 (8): 2619-33.

Levoguer, C., Butler, D., Thielmann, F. und Williams, D. (2000)

Characterizing the physicochemical properties of pharmaceutical materials. *Pharmaceutical Technology Europe* 12 (11): 36,38,40,42.

Levoguer, C. L. und Williams, D. R. (1997)

The characterisation of pharmaceutical materials by dynamic vapour sorption. SMS Application Note. SMS.

Levy, I., Shani, Z. und Shoseyov, O. (2002)

Modification of polysaccharides and plant cell wall by endo-1,4-b-glucanase and cellulose-binding domains. *Biomolecular Engineering* 19 (1): 17-30.

Lynd, L., R., Weimer, P., J., van Zyl, W., H. und Pretorius, I., S. (2002)

Microbial cellulose utilization: fundamentals and biotechnology. *Microbiology and molecular biology reviews : MMBR* 66 (3): 506-77, table of contents.

Marsch, S., Udhardt, U., Klemm, D. und Schumann, D. (2000)

BASYC: Gefäßersatz für die Mikrochirurgie. *CHAZ* 2 (7-8): 312-315.

Mason, B. W., Howard, A. J. und Magee, J. T. (2003)

Fusidic acid resistance in community isolates of methicillin-susceptible *Staphylococcus aureus* and fusidic acid prescribing. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* 51 (4): 1033-1036.

McCarter, S. L., Adney, W. S., Vinzant, T. B., Jennings, E., Eddy, F. P., Decker, S. R., Baker, J. O., Sakon, J. und Himmel, M. E. (2002)

Exploration of cellulose surface-binding properties of *Acidothermus cellulolyticus* Cel5A by site-specific mutagenesis. *Applied Biochemistry and Biotechnology* 98-100 (Biotechnology for Fuels and Chemicals): 273-287.

Miller, G. L. (1959)

Dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* 31 426-8.

Mumcuoglu, K. Y., Ingber, A., Gilead, L., Stessman, J., Friedmann, R., Schulman, H., Bichucher, H., Ioffe-Uspensky, I., Miller, J., Galun, R. und Raz, I. (1999)

Maggot therapy for the treatment of intractable wounds. United States, Department of Parasitology, Hebrew University-Hadassah Medical School, Jerusalem, Israel. 623-7.

Mumcuoglu, K. Y., Miller, J., Mumcuoglu, M., Friger, M. und Tarshis, M. (2001)

Destruction of bacteria in the digestive tract of the maggot of *Lucilia sericata* (Diptera: Calliphoridae). *Journal of medical entomology* 38 (2): 161-6.

Nema, S. und Avis, K. E. (1993)

Freeze-thaw studies of a model protein, lactate dehydrogenase, in the presence of cryoprotectants. *Journal of Parenteral Science and Technology* 47 (2): 76-83.

Nevell, T. P. (1995)

Cellulose: Structure, properties and behavior in the dyeing process. *Cellulosics Dyeing* 1-80.

Pere, J., Puolakka, A., Nousiainen, P. und Buchert, J. (2001)

Action of purified *Trichoderma reesei* cellulases on cotton fibers and yarn. *Journal of Biotechnology* 89 (2,3): 247-255.

Pinto, R., Moreira, S., Mota, M. und Gama, M. (2004)

Studies on the Cellulose-Binding Domains Adsorption to Cellulose. *Langmuir* 20 (4): 1409-1413.

Prete, P. E. (1997)

Growth effects of *Phaenicia sericata* larval extracts on fibroblasts: mechanism for wound healing by maggot therapy. *Life Sciences* 60 (8): 505-510.

Rihm, R. (2003)

Röntgen-Strukturuntersuchungen an Celluloseregeneratfasern. Fakultät - Prozesswissenschaften-. Berlin, Technische Universität. 95.

Rossi, S., Buera, M. P., Moreno, S. und Chirife, J. (1997)

Stabilization of the Restriction Enzyme EcoRI Dried with Trehalose and Other Selected Glass-Forming Solutes. *Biotechnology Progress* 13 (5): 609-616.

Rupp, C. (2006)

Freisetungsverhalten eines Peptidarzneistoffes aus befilmten Baumwollmaterialien. Institut für Pharmazeutische Technologie und Biopharmazie. Kiel, Christian-Albrechts-Universität. 154.

Sander, S. (2000)

Experimentelle Bestimmung von Adsorptionsgleichgewichten und Evaluation von Adsorptionsgleichgewichtsmodellen. Fachbereich Chemie. Universität Oldenburg.

Sarkar, A. K. und Eters, J. N. (2004)

Enzymatic hydrolysis of cotton fibers: Modeling using an empirical equation. *Journal of Cotton Science* 8 (4): 254-260.

Scheithauer, M. und Riechelmann, H. (2003)

Review part I: basic mechanisms of cutaneous woundhealing. *Laryngo- rhino- otologie* 82 (1): 31-5.

Scheithauer, M. und Riechelmann, H. (2003)

Review part II: disorders in cutaneous woundhealing. *Laryngo- rhino- otologie* 82 (1): 36-9.

Schmidtchen, A., Wolff, H., Rydengard, V. und Hansson, C. (2003)

Detection of serine proteases secreted by *Lucilia sericata* in vitro and during treatment of a chronic leg ulcer. *Acta Dermato-Venereologica* 83 (4): 310-311.

Schuelein, M. (1997)

Enzymic properties of cellulases from *Humicola insolens*. *Journal of Biotechnology* 57 (1-3): 71-81.

Schurz, J. B., Hönel, A., Eigner, W. D., Jánosi, A., Hayn, M. und Esterbauer, H. (1985)

Reaktionsmechanismus und Strukturänderungen beim enzymatischen Abbau von Cellulose durch *Trichoderma reesei*-Cellulase. *Acta Polymerica* 36 (2): 76-80.

Shah, M. und Mohanraj, M. (2003)

High levels of fusidic acid-resistant *Staphylococcus aureus* in dermatology patients. *The British journal of dermatology* 148 (5): 1018-20.

Shalaev, E. Y. und Zograf, G. (1996)

How Does Residual Water Affect the Solid-State Degradation of Drugs in the Amorphous State? *Journal of Pharmaceutical Sciences* 85 (11): 1137-1141.

Sherman, R. A., Hall, M. J. R. und Thomas, S. (2000)

Medicinal maggots: an ancient remedy for some contemporary afflictions. *Annual Review of Entomology* 45 55-81.

Stamm, O. A. (1963)

Textile chemical investigations. IX. Reaction of reactive dyes with cellulose. 2. Nature of the linkage. *Helvetica Chimica Acta* 46 (7): 3008-19.

Stamm, O. A., Zollinger, H., Zaehner, H. und Gaeumann, E. (1961)

Textile-chemical investigations. VII. The bond between reactive dyes and cellulose. *Helvetica Chimica Acta* 44 1123-5.

Tammelin, A., Lindholm, C. und Hambreus, A. (1998)

Chronic ulcers and antibiotic treatment. *Journal of wound care* 7 (9): 435-7.

Taylor, L. S. und Zografi, G. (1998)

Sugar-Polymer Hydrogen Bond Interactions in Lyophilized Amorphous Mixtures. *Journal of Pharmaceutical Sciences* 87 (12): 1615-1621.

Tereschenko, L. Y. und Shamolina, I. I. (1998)

The use of cellulases to improve the sorption properties of cellulosic wound dressings. *Journal of the Textile Institute, Part 1: Fibre Science and Textile Technology* 89 (3): 570-578.

Thews, G., Mutschler, E. und Vaupel, P. (1999)

Anatomie, Physiologie und Pathophysiologie des Menschen, Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft mbH Stuttgart.

Thielmann, F. und Butler, D. (2001)

Determination of the dispersive surface energy of Paracetamol by pulse inverse gas chromatography at infinite dilution. SMS Application Note. SMS. 202: 1-5.

Thielmann, F. und Florian, I. (2001)

The Measurement of Isotherms by Pulse Inverse Gas Chromatography. SMS Application Note. SMS. 208: 1-8.

Thielmann, F. und Pearce, D. (2001)

The Determination of Surface Heterogeneity Profiles on Graphite by Inverse Gas Chromatography. SMS Application Note. SMS. 222: 1-8.

Thomas, S., Andrews, A. M., Hay, N. P. und Bourgoise, S. (1999)

The anti-microbial activity of maggot secretions: results of a preliminary study. *Journal of tissue viability* 9 (4): 127-32.

Thomas, S., Jones, M., Shutler, S. und Jones, S. (1996)

Using larvae in modern wound management. ENGLAND: United Kingdom, 60-9.

Tuomilehto, J., Lindstrom, J., Eriksson, J. G., Valle, T. T., Hamalainen, H., Ilanne-Parikka, P., Keinanen-Kiukaanniemi, S., Laakso, M., Louheranta, A., Rastas, M., Salminen, V. und Uusitupa, M. (2001)

Prevention of type 2 diabetes mellitus by changes in lifestyle among subjects with impaired glucose tolerance. *The New England journal of medicine* 344 (18): 1343-50.

van Asten, A., van Veenendaal, N. und Koster, S. (2000)

Surface characterization of industrial fibers with inverse gas chromatography. *Journal of chromatography. A* 888 (1-2): 175-96.

Vistnes, L. M., Lee, R. und Ksander, G. A. (1981)

Proteolytic activity of blowfly larvae secretions in experimental burns. *Surgery* 90 (5): 835-41.

Voelkel, A. (2004)

Inverse gas chromatography in characterization of surface. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* 72 (2): 205-207.

Wolf, E. (1998)

Die Zeit heilt nicht alle Wunden: Wundversorgung ernst nehmen. *Pharmazeutische Zeitung* 44

Wolff, H. und Hansson, C. (1999)

Larval therapy for a leg ulcer with methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Acta Dermato-Venereologica* 79 320-1.

Wood, T. M. (1988)

Preparation of crystalline, amorphous, and dyed cellulase substrates. *Methods in Enzymology* 160 (Biomass, Pt. A): 19-25.

Yuan, J., Shang, P. P. und Wu, S. H. (2001)

Effects of polyethylene glycol on morphology, thermomechanical properties, and water vapor permeability of cellulose acetate-free films. *Pharmaceutical Technology North America* 25 (10): 62, 64, 66, 68, 70, 72, 74.

Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Dr. B.W. Müller für die freundliche Aufnahme in seinen Arbeitskreis bedanken. Hierbei muss ich besonders seine Geduld und sein Durchhaltevermögen bewundern, die zu Beginn dieses Projektes erforderlich waren, um gegen die Windmühlen der Bürokratie anzukämpfen und das Anfertigen dieser Dissertation an seinem Institut durchführen zu dürfen. Dadurch konnte ich mich drei Jahre lang in einem wahren Forscherparadies ausleben.

Nicht weniger herzlich möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Hartwig Steckel bedanken. Hardy kennt sich super in unserem Fachgebiet aus und auch die Gespräche neben der Technologie haben mir stets sehr viel Spaß gebracht.

Weiterhin möchte ich mich auch beim Bundesministerium für Bildung und Forschung bedanken, die den finanziellen Rahmen dieser Arbeit geschaffen haben. Neben dem Geldgeber danke ich auch Herrn Dr. Marquardt, der mich besonders zu Beginn meiner Forscherzeit ungemein für diese Sache begeistern konnte und bei der Beschaffung von „biologischen“ Materialien äußerst engagiert geholfen hat.

Des Weiteren gilt ein großer Dank Herrn Dr. Furkert, der mir bei einem wichtigen Teil dieser Arbeit sehr geholfen hat. Auch Herrn HD Dr. Kunze bin ich zu großem Dank verpflichtet, da er mir die gesamte Promotionszeit immer wieder tolle und wichtige Ratschläge für diese Arbeit geben konnte.

Was wäre die Promotionszeit ohne die Kollegen? Ich denke unser Arbeitskreis bietet ein tolles Umfeld, in dem es sich mehr als gut aushalten und die Rückschläge des Forschens schnell vergessen lässt.

In diesem Sinne danke ich zunächst Günter, mit dem ich die ersten äußerst lehrreichen Tage meiner Promotionszeit verbringen durfte. Mit Peter habe ich dann die Praktikumsbetreuung gemacht und ich denke, wir waren nicht nur bei der Etablierung der inversen Gaschromatographie ein tolles Team.

Mit Dennis und Fadi habe ich die ersten konstruktiven Versuche des Forschens unternommen. Nebenher hatte ich mit den beiden auch so eine Menge Spaß.

Nicht vergessen möchte und werde ich auch nicht die anderen „Ehemaligen“, die jeder auf seine Weise für eine willkommene Abwechslung in unserem Team gesorgt haben.

Weiterhin möchte ich besonders unseren jetzigen Arbeitskreis hervorheben, der ohne Chef und sonstige Leitung sehr verantwortungsvoll jegliche Aufgaben des täglichen Hochschullebens meistert.

An erster Stelle kommen da natürlich Christina und Malte, mit denen ich unheimlich viel lachen konnte. Ohne Euch wäre diese Zeit nicht zu einer so unvergesslichen geworden, wie ich sie heute empfinde. Danke für alles!

Ganz wichtig sind mir da noch zwei mittlerweile drei weitere „Experten“. Als erstes Frank, der mir öfter mal die Augen fürs Wesentliche öffnete und mir so manch interessante Sehenswürdigkeit aus Kiel näher brachte. Weiterhin danke ich Totti für seine unverwechselbare Art und Weise, die Dinge entspannt anzugehen und gespannt zu beenden. Und als dritten Experten danke ich noch unserer „Jüngsten“ im Bunde, Susanne, mit der man wunderbar über Kiel und die Welt schnacken konnte.

Weiterhin möchte ich mich natürlich ganz herzlich bei all den anderen Kollegen bedanken, mit denen ich immer so wunderbar lachen konnte. Z.B. Lars und die lebenswichtige Erfahrung zweier Apotheker beim Möbelpacken. Holger und Regina danke ich für deren unbezahlbares Engagement für

unseren AK. Claudia, Katrin, Julia, Maren, Henrike und Alexandra für die vielen Gespräche am Rande.

Ein großer Dank geht noch an Kiko, der mir sehr viel geholfen hat und durch seinen Fleiß während und auch nach dem Diplom wichtige Einblicke in mein Forschungsthema ermöglichte.

Besonders bedanken möchte ich mich noch bei unseren Festangestellten für deren Hilfe. Frau Schütt für das ganze Rechnen beim Geld ausgeben. Nora und Regina für HPLC-Fehler-Suche. Dirk für die Konstruktion und Leihgabe diverser Werkzeuge und natürlich bei Rüdi für alle seine unzähligen Hilfen. Arne und Detlef danke ich für das sorgenfreie Arbeiten an unseren Computern.

Malte, Frank und Christina danke ich auch für das Korrekturlesen von Teilen meiner Arbeit. Jan, mein langjähriger Wegbegleiter, und Silke, wohl eine meiner besten „Freunde“ haben sich in diesem Bereich natürlich den größten Dank verdient.

Ganz wichtig in all den Jahren ist mir natürlich immer meine Familie gewesen. Ich danke Euch dafür, dass Ihr immer für mich da seid. Liebe Mutti und lieber Herbert ich danke Euch über alles!!! Besonders dafür das Ihr immer so stolz seid.

Von ganzem Herzen und voller Liebe danke ich einer wunderbaren Frau für ihre Liebe und den ungebrochenen Optimismus. Du hast mein Leben ungemein bereichert und wirst immer in meinem Herzen sein.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Vor- und Familienname: Steve Minde
Geburtsdatum: 22. Februar 1978
Geburtsort: Salzwedel
Staatsangehörigkeit: deutsch

Schulbildung

1984 - 1991 Polytechnische Oberschule Salzwedel
1989 - 1996 Albert-Schweitzer-Gymnasium Salzwedel
Juni 1996 Allgemeine Hochschulreife

Wehrdienst

September 1996 – Juni 1997 Grundwehrdienst in Munster

Studium und Ausbildung

1997-2001 Studium der Pharmazie an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel (acht Studiensemester)
August 1999 1. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
November 2001 2. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung
Dezember 2001 – Mai 2002 1. Hälfte des Praktischen Jahres in der Holthofapotheke, Hamburg
Juni 2002 – November 2002 2. Hälfte des Praktischen Jahres bei der Artesan Pharma GmbH, Lüchow
Dezember 2002 3. Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung und Approbation als Apotheker

Berufliche Tätigkeit

Seit April 2003 Wissenschaftlicher Angestellter am Pharmazeutischen Institut der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel und Anfertigung der Dissertation unter Leitung von Prof. Dr. Dr. h. c. B. W. Müller

Erklärung zu § 10 Abs. 2 Nr. 2 der Promotionsordnung

Hiermit erkläre ich gemäß § 10 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Weiterhin habe ich keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt und die den verwendeten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht. Die Arbeit wurde bisher keiner anderen Universität zur Begutachtung vorgelegt.

Steve Minde