Aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski

Untersuchung eines Vulkangestein-Präparates auf antibiotische Wirksamkeit (Calcium-Magnesium-Clinoptilolith TOXAPREVENT®)

Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universitätsmedizin Rostock

Vorgelegt von: Judith Hüttner

Rostock 2020

Verteidigt am 05.05.2021

https://doi.org/10.18453/rosdok_id00003060

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger, Universitätsmedizin Rostock

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Andreas Podbielski, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene, Universitätsmedizin Rostock

2. Gutachter: Univ.-Professor Dr. med. Mathias Herrmann, Institut für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Münster

3. Gutachter: Prof. Dr. med. habil. Robert Jaster, Klinik für Innere Medizin II, Abt. Gastroenterologie, Universitätsmedizin Rostock

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung 1

1.1 Wundheilung 1

1.2 Wundinfektionen und Sepsis 3

1.3 Antibiotika – Nutzen und Limitationen 3

1.3.1 Resistenzentwicklung 5

1.4 Neue Ansätze zur Prävention und Therapie von Wundinfektionen 6

1.4.1 Zeolithe 6

1.4.2 Struktur und Aufbau der Clinoptilolithe 7

1.4.3 Nutzung in der Industrie 8

1.4.4 TOXAPREVENT® 8

1.4.5 Einfluss auf die Wundheilung 9

1.5 Zielstellung 9

2 Material und Methoden 11

2.1 Material 11

2.1.1 TOXAPREVENT® -Produkte 11

2.1.2 Bakterien und Hefen 11

2.1.3 Laborgeräteausstattung und Software 12

2.1.4 Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Reagenzien 13

2.1.5 Nährmedien 14

2.2 Mikrobiologische Methoden 14

2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von *S. aureus* und *P. aeruginosa* 14

2.2.2 Kultivierung und Stammhaltung von *Candida albicans* 14

2.2.3 Messen der optischen Dichte und Erstellen einer Wachstumskurve 15

2.2.4 Ermittlung der Kolonie-Bildenden-Einheiten 15

2.2.5 Mikrobiologische Analyse des Vulkangestein-Präparates 16

2.2.6 MALDI-TOF 16
2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließende Sequenzierung 17
2.2.8 Testung auf antibiotische Wirksamkeit 17
2.2.8.1 Hemmwirkung des Ultrafiltrates 17
2.2.8.2 Kontakthemmung 17
2.3 Statistik 18
3 Ergebnisse 19
3.1 Mikrobiologische Testung des Clinoptilolith-Materials 20
3.2 Kultivierung der Bakterien und Hefen aus der Stammsammlung 22
3.3 Antibiotische Wirksamkeit 24
3.3.1 TOXAPREVENT®-SKIN zur kutanen Anwendung 25
3.3.1.1 Hemmwirkung des Ultrafiltrats 25
3.3.1.2 Kontakthemmung 29
3.3.2 TOXAPREVENT® zur oralen Anwendung 33
3.3.2.1 Ultrafiltrat 33
3.3.2.2 Kontakthemmung 37
3.3.2.3 LOG-Reduktion 39
4 Diskussion 43
4.1 Durch den Hersteller beschriebene Eigenschaften von TOXAPREVENT® SKIN Hautpuder 43
4.2 Mikrobiologische Testung des Vulkangesteins 44
4.3 Antibiotische Wirksamkeit 44
4.3.1 Ultrafiltrat – Hemmwirkung 45
4.3.1.1 Bacillus Spezies – Beeinflussung der Wundheilung 45
4.3.2 Kontakthemmung 47
4.3.2.1 Histamin 47
4.3.2.2 pH-Wert 49

4.3.2.3 Toxinbindung 49
4.3.2.4 Adsorption von Co-Faktoren 50
4.3.2.5 Antioxidative Wirkung 50
4.4 Immunmodulation 51
4.5 Andere Tonerde-Präparate 51
4.6 Ausblick 52
5 Zusammenfassung 53
6 Thesen 55
7 Abbildungsverzeichnis 56
8 Tabellenverzeichnis 58
9 Abkürzungsverzeichnis 60
10 Literaturverzeichnis 63
11 Danksagung 75
12 Appendix 76
13 Eidesstattliche Erklärung 79
14 Lebenslauf 80

1 Einleitung

Die vorliegende Arbeit untersucht die Wirkung von definierten Mineralien (Zeolithen) auf die Wundheilung im menschlichen Weichgewebe, insbesondere die Wirkung auf typische bakterielle Wundinfektionserreger. Deswegen werden im folgenden Informationen zur Wundheilung im Allgemeinen, zu Wundinfektionen sowie zu Verfahren zu deren Verhinderung respektive Therapie gegeben.

1.1 Wundheilung

Die physiologische Wundheilung gliedert sich in vier Phasen. Diese laufen nicht nacheinander ab, sondern gehen ineinander über (Vogt 2011). Je nach Größe und Beschaffenheit der Wunde sind sie von unterschiedlicher Dauer.

Exsudative Phase:

In der ersten Phase kommt es direkt nach Wundsetzung durch eine lokale Ausschüttung von Prostaglandinen und Thromboxanen durch die verletzten Zellen und die Reaktion des sympathischen Nervensystems zur vorrübergehenden Vasokonstriktion, abgelöst von einer Vasodilatation mit erhöhter Permeabilität der Gefäße (Pape et al. 2018). Die vermehrte Durchlässigkeit der Gefäße lässt die Einwanderung neutrophiler Granulozyten, Monozyten und T-Zellen zu. Es kommt zu einer Hyperämie, erkennbar an einer Rötung, und zu einem Wundödem. In dieser Phase werden meist große Exsudatmengen abgegeben, die die Selbstreinigung der Wunde unterstützen Hieraus resultiert eine Verlangsamung des Blutflusses im Wundbereich, das entstandene Wundsekret verschließt die Wunde provisorisch (Ott 2003).

Resorptive Phase:

In der resorptiven Phase erfolgt durch Phagozytose und Lyse die Entfernung von Zell-Débris geschädigter oder toter Zellen, Fremdkörpern und Bakterien (Lippert 2011). Durch Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine werden die Kollagensynthese, Angiogenese und Reepithelialisierung stimuliert. Es kommt zu einer lokalen Entzündung des Gewebes.

Proliferative Phase:

In der dritten Wundheilungsphase, der proliferativen Phase, wandern Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten vom Wundrand in das Wundareal ein. Dabei wird nekrotisches Gewebe abgebaut und mit der Neusynthese einer extrazellulären Matrix begonnen, Bindegewebe und Blutgefäße werden sichtbar und es bildet sich das zell- und gefäßreiche Granulationsgewebe (Lippert 2011). Die genaue Interaktion der Entzündungszellen und Mediatoren in der Granulationsphase ist bis heute nicht vollständig geklärt.

Reparative Phase:

Zu Beginn der vierten Wundheilungsphase, auch reparative Phase genannt, nehmen die Mengen an Fibroblasten und Makrophagen in der Wunde ab und die Gefäße bilden sich zurück. Die ausdifferenzierten Myofibroblasten bewirken eine Wundkontraktion und es kommt zum Abschluss der Epithelialisierung (Ott 2003). Von den Wundrändern aus lösen sich Epithelzellen und bewegen sich Richtung Wundmitte.
Am Ende des Heilungsprozesses entsteht eine dichte, relativ gefäßfreie Narbe aus Kollagenfasern (Suerbaum et al. 2016).
Gut adaptierte Wunden heilen mit geringer Granulationsgewebebildung (Restitutio ad intergrum), wohingegen ausgedehnte Defekte zu einer Vernarbung führen (Reparatio). Die reparativen Prozesse laufen in den ersten 4-7 Tagen nach der Verletzung ab (Kirchner et al. 2018). Die Neubildung der Gefäße ist dabei von mehreren Faktoren abhängig und kann durch das Alter des Patienten, die Art und Lokalisation der Wunde und die physiologischen Konditionen – Ernährungszustand, Grunderkrankungen wie Diabetes mellitus, Durchblutungsstörungen, Immunschwäche und Krebserkrankungen - beeinflusst werden. Ein niedriger pH- und ein hoher Laktatwert, zusammen mit einem reduzierten Sauerstoffgehalt im Wundgebiet, können die Wundheilung behindern (Deutsche Gesellschaft für Kinderchirurgie 2016).
Die narbenfreie epitheliale Regeneration sieht man bei keimfreien, oberflächlichen und primär heilenden Wunden. Ist die Wunde jedoch vollschichtig oder sekundär großflächig kontaminiert oder tief, erfolgt der Wundheilungsprozess durch Granulationsgewebebildung und hat im Gegensatz zur epithelialen Wunde eine Narbenbildung zur Folge (Krams et al. 2013).

1.2 Wundinfektionen und Sepsis

Die meisten Infektionen der Haut entstehen im Rahmen von Verletzungen, sogenannten Mikro- oder Makrotraumata, dann in aller Regel als akut verlaufende Infektion. Sofern die Wunde großflächig ist, besteht eine hohe Tendenz, dass diese auch sekundär durch Keime zunächst kontaminiert und im Weiteren dann ggf. chronisch infiziert wird. Eine gestörte Immunabwehr kann eine Ausbreitung von Keimen begünstigen und damit zu systemischen Komplikationen und Sepsis führen.

Häufig entspricht das Keimspektrum in der infizierten Wunde dem der körpereigenen Hautflora. Auch können Keime aus anderen Körperregionen, wie zum Beispiel Keime der Darmflora (Enterobacteriaceae, Enterokokken, Anaerobier) oder der oberen Luftwege, sowie Umweltkeime eine Infektion verursachen (Hof und Dörries 2017).

Die aus Wundinfektionen isolierten Mikroorganismen sind in absteigender Häufigkeit *S. aureus* (50% aller Fälle, davon sind je nach Beobachtungszeitraum und Geographie bis zu 10% Methicillin-resistent). Weiterhin konnten *P. aeruginosa* (30 %), *Enterobakterien* (26 %) und *Proteus mirabilis* (14%) als häufige kausale Wundinfektionserreger nachgewiesen werden (Dissemond 2014).

Es kommt bei Ausbreitung der Erreger zu einer Entzündung der Dermis und Subcutis, die – wenn sie nicht adäquat therapiert wird - eine Sepsis, eine systemische Reaktion des Organismus auf eine unkontrollierte Infektion, auslösen kann. Sie kann grundsätzlich als Komplikation jeder Infektion, wie zum Beispiel einer Lungenentzündung oder eben nach Verletzungen der Haut durch ein Trauma oder durch einen chirurgischen Eingriff entstehen (Vincent et al. 2009).

1.3 Antibiotika – Nutzen und Limitationen

In der Therapie bakterieller Infektionskrankheiten werden vor allem Antibiotika verwendet, so auch bei Wundinfektionen – neben einer ggf. vorgeschalteten chirurgischen Therapie im Sinne eines Debridements und einer topischen Therapie mit einem Wunddesinfektionsmittel.

Ihr häufiger Einsatz fördert die Verbreitung resistenter Erreger und führt schließlich zu einer verringerten Anzahl optimaler Behandlungsoptionen. Dies bedeutet für die Patienten oft längere Behandlungszeiten, teilweise verbunden mit einer verzögerten

oder ausbleibenden Heilung der Infektion (Baker et al. 2018). Laut Definition ist ein Bakterienstamm resistent gegenüber einem Antibiotikum, wenn die minimale Hemmkonzentration (MHK) - die niedrigste Konzentration eines Antibiotikums, welches das Bakterienwachstum *in vitro* verhindert - so hoch ist, dass auch bei zugelassener Höchstdosierung der therapeutische Erfolg ausbleibt (Suerbaum et al. 2016). Resistenzen entstehen durch die Entwicklung von Mechanismen eines Mikroorganismus, der Wirkung antimikrobieller Substanzen zu entgehen. Während dieser Prozess physiologisch und unausweichlich ist, wurde das Vorkommen und die Ausbreitung von Resistenzen durch die unsachgemäße häufige Anwendung von Antibiotika beschleunigt (Mutschler et al. 2017), so dass über 50% der für häufige Infektionskrankheiten genutzten Medikamente inzwischen wirkungslos sind (World Health Organization Regional Office for Europe).

Resistente Mikroorganismen finden sich in Menschen, Tieren, Lebensmitteln und der Umwelt; d.h. in der Erde, im Wasser und der Luft. Sie können von Mensch zu Mensch oder zwischen Tieren und Menschen übertragen werden. Mangelhafte Hygiene im zwischenmenschlichen Kontakt sowie im Umgang mit Lebensmitteln und Sanitäranlagen tragen so zu einer Verbreitung der Resistenzen bei (Track und Kreysa 2003).

In deutschen Krankenhäusern traten im Jahr 2013 schätzungsweise 500.000 Infektionen auf, die von Krankenhauskeimen verursacht wurden (Abb. 2); für etwa sechs Prozent der Krankenhausinfektionen sind multiresistente Erreger verantwortlich (Huggett et al. 2018). In den USA sterben Schätzungen zu Folge ungefähr 99.000 Patienten jährlich an Infektionen mit multiresistenten Keimen (Aslam et al. 2018). Weltweit schätzt man die Zahl auf über 700,000 (UN Interagency Coordination Group on AMR (IACG) 2019).

Die Entwicklung neuer Antibiotika kann mit der Resistenzentwicklung bei steigendem Gebrauch kaum mithalten. Die Anzahl der Patente für antimikrobielle Wirkstoffe sank zwischen 2007 und 2012 um 34,8 % (Renwick et al. 2016). Von 51 neuen Medikamenten, an denen laut WHO derzeit geforscht wird, können in den nächsten 5 Jahren bis zu 10 neue Medikamente auf den Markt gebracht werden (AMR Industrie Alliance 2018). Die Entwicklung eines wirksamen Antibiotikums dauert bis zu 10 Jahre - daher ist es für das globale Gesundheitssystem unverzichtbar, jetzt mit der Erforschung neuer Medikamente zu beginnen, weil sich die Resistenzsituation weiter verschärfen dürfte.

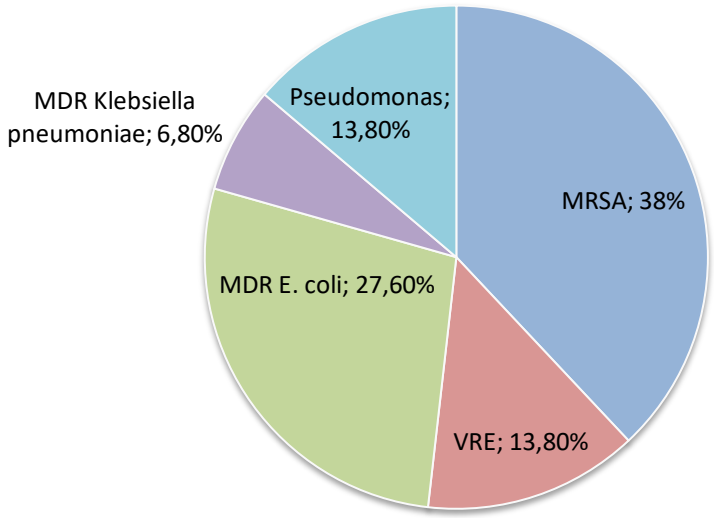


Abbildung 1: Nosokomiale Infektionen in Deutschland, Robert-Koch-Institut, Stand 2013
MDR: multi drug resistance; VRE: Vancomycin-resistente Enterokokken, MRSA: Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus

1.3.1 Resistenzentwicklung

Um eine Resistenzentwicklung im Rahmen der Therapie bakterieller Infektionen zu verhindern, sollten Antibiotika nur bei klarer Indikation und gegebenenfalls nach Antibiogramm in ausreichender Dosierung und Dauer verabreicht werden. Gegebenenfalls können auch mehrere Medikamente kombiniert werden. (Mutschler et al. 2017).

Resistenzen gegen bestimmte Antibiotika können natürlich vorhanden oder erworben sein.

Natürliche Resistenz liegt vor, wenn das Bakterium von vornherein resistent gegen ein Antibiotikum ist. Entweder ist die Zielstruktur für das Antibiotikum in der Zelle nicht bzw. nicht in der passenden Form vorhanden, oder die Zellwand ist so beschaffen, dass das Medikament nicht in die Bakterienzelle eindringen kann bzw. sie verfügt über Pumpen, die das Antibiotikum wieder ausschleusen.

Unter erworbener Resistenz fasst man verschiedene Anpassungsmechanismen eines Bakteriums zusammen. Dabei kann die Zielstruktur eines Antibiotikums entweder durch den Austausch von Plasmid-DNA (Konjugation), phagenvermittelt (Transduktion), horizontalen Gentransfer oder durch Punktmutationen verändert werden (Freissmuth et al. 2016). Mutationen ereignen sich bei Mikroorganismen besonders häufig, dies ist durch deren hohe Zellteilungsrate sowie eine große

genetische Variabilität bedingt (Fischer 2014). Resistente Bakterien haben in Gegenwart eines Antibiotikums einen Wachstumsvorteil gegenüber sensiblen Zellen (Nieslony 2017).

Tabelle 1: ESKAPE-Keime - (World Health Organisation 2017)

Enterococcus faecium	HWI, nosokom. Peritonitis und Sepsis, 10% Vancomycin-resistent = VRE
S. aureus	Hautkeim, v.a. Nase, 20-30% dauerhaft kolonisiert, 18% MRSA→ Pneumonie, Wundinfektion, Sepsis
Klebsiella pneumoniae	Phys. MDT und Mund, bei Immunsupp. Pneumonie, zunehmend Carbapenem-resistent
Acinetobacter baumanii	HWI, Wundinfektionen, Pneumonie, Sepsis, zunehmend multiresistent gegenüber Penicillin, Cephalosporine, Fluorchinolone, Carbapeneme
Pseudomonas aeruginosa	MDT, Umweltkeim, Pneumonie, Resistenz: Fluorchinolone, Carbapeneme, Aminoglykoside, Polymyxine
andere Enterobacteriaceae (E. coli, Enterobacter cloacae)	MDT, pathogene Spezies: EHEC, resistent: Penicilline, Cephalosporine, Carbapeneme

Tabelle 1 stellt die von der WHO 2017 gelisteten, meist multiresistenten Erreger nosokomialer Infektionen dar, für die nur noch begrenzte therapeutische Möglichkeiten bestehen. Ein Weg aus der Resistenzkrise könnte die Suche nach bislang unentdeckten Naturstoffen sein und nach Antibiotika, die sich davon ableiten (vfa. Die forschenden Pharmaunternehmen 2018).

1.4 Neue Ansätze zur Prävention und Therapie von Wundinfektionen

1.4.1 Zeolithe

Zeolithe sind meist farblose Mineralien mit niedriger Dichte und Härte, entstanden durch hydrothermale Umwandlung aus vulkanischen Gläsern bzw. aus Tuff-haltigen Ablagerungen (Mortimer und Müller 2015).

Erstmalig beschrieben wurden Zeolithe 1756 von dem schwedischen Mineralogen Axel Fredrick Cronstedt. Der Name leitet sich aus den altgriechischen Worten *zeein*

für „Sieden“ und *lithos* für „Stein“ ab (siedender Stein), da beim Erhitzen des Minerals gebundenes Wasser verdampft (Auerbach et al. 2003).
Die Einteilung erfolgt auf Grund der chemischen Struktur in Faser-, Blätter- und Würfel-Zeolithe.
Bis heute sind mehr als 40 natürliche und 150 synthetische Zeolithe bekannt. Clinoptilolith ist das häufigste Zeolithmineral und gehört zu den am meisten technisch genutzten natürlichen Zeolithen. Der wirtschaftliche Abbau erfolgt in Sediment-Lagerstätten vor allem in Bulgarien, Ungarn, Kuba, Mexiko, Russland, Italien, Jordanien und den USA (Jabs 2007).

1.4.2 Struktur und Aufbau der Clinoptilolithe

Clinoptilolith ist ein wasserhaltiges Aluminosilikat aus der Gruppe der Zeolithe und gehört strukturell zu den Gerüstsilikaten (Tektosilikate). Diese bestehen aus einer Verbindung von Silikaten, deren Anionen aus einem SiO_4- und AlO_4-Tetraeder bestehen. Ein Ladungsausgleich erfolgt durch Einbau von Kationen, wie einwertigem Natrium bzw. Kalium oder zweiwertigem Calcium (Heißmann 2014).

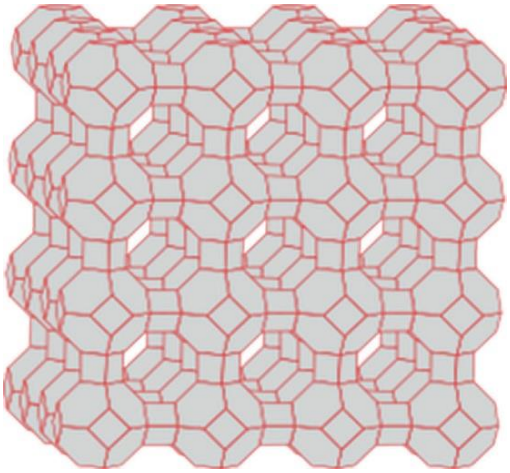


Abbildung 2: Tubuläre Mikrostruktur von Clinoptilolith-Zeolith (Scholtes 2014)

Die Kristallgitter der Zeolithe bauen sich aus anionisch geladenen Silicium-Aluminium-Tetraedern auf, die über Sauerstoffbrücken verknüpft sind. In diesem dreidimensionalen Gerüst liegen Kanäle und Hohlräume, in denen sich die Kationen und H_2O befinden. Die Größe der Poren liegt je nach Zeolith zwischen 400-700 pm (Binnewies et al. 2016).Die Kationen und das Wasser sind nicht fest gebunden, so dass sie reversibel gegen Ionen gleicher Wertigkeit ausgetauscht werden können.

1.4.3 Nutzung in der Industrie

Seit den 50er Jahren werden Zeolithe in der Industrie sowohl als Adsorbenzien – zum Beispiel in Katzenstreu (Heißmann 2014) und der Schweinemast – als auch als Ionenaustauscher genutzt. Mit der Produktion synthetischer Zeolithe begann man diese auch als Katalysatoren zu verwenden. Insbesondere in der Mineralölindustrie wurden sogenannten Pentasile verwendet, um Erdöldestillate für Benzinmotoren nutzbar zu machen (Thomas und Raja 2007).

Heutzutage werden jedes Jahr 600.000 Tonnen Zeolith synthetisiert und zur Wasserenthärtung Waschmitteln zugesetzt, anstatt der zuvor üblichen Polyphosphate (Binnewies et al. 2016).

Somit konnte die Eutrophierung der Gewässer vermindert werden (Mulligan et al. 2001). Vor allem in Asien wird daher der Ersatz von Phosphat durch Zeolith angestrebt. Zeolithe binden auch Schwermetall-Ionen und Organophosphate – sie werden daher auch bei der Wiederaufbereitung von Abwasser verwendet. Jedoch können sie somit zu einer Anreicherung in Flusssedimenten beitragen (Pandova et al. 2018; Dong et al. 2017) .

Durch die Kanäle im Zeolith-Mineral passen nur Moleküle bestimmter Größe. Der Durchmesser dieser Kanäle kann bei synthetisch hergestellten Zeolithen variiert werden. Dem Material wird bei der Verarbeitung im Vakuum Wasser entzogen, so dass ein zusätzlich hygroskopischer Effekt entsteht. Daher dienen Zeolithe sowohl als Molekularsieb als auch zum Trocknen und Reinigen von Gasen - wie O_2, CO_2, N_2, Edelgasen – und Lösungsmitteln – wie Ether, Alkohole, Kohlenwasserstoffe (Binnewies et al. 2016)

In geringem Umfang wurden Zeolithe auch nach Unfällen in Kernkraftwerken genutzt, um radioaktive Isotope zu binden (Misaelides 2011). So wurden diese zum Beispiel in der Trinkwasseraufbereitung und in der Tiermast verwendet (Auerbach et al. 2003), sogar einigen Lebensmitteln sollen Zeolithe in Bulgarien nach dem Reaktorunglück in Tschernobyl zugesetzt worden sein.

1.4.4 TOXAPREVENT®

Clinoptilolith wird von der FROXIMUN AG als Hauptwirkstoff aller TOXAPREVENT®-Produkte verwendet. Dabei handelt es sich um eine natürlich vorkommende Clinoptilolith-Calcium-Verbindung. Die Präparate sind durch TÜV Rheinland LGA gemäß der Richtlinie 93/42/EWG als Medizinprodukte zugelassen. Für die einzelnen

Produkte werden Zeolithe verschiedener Abbaugebiete gemischt, auf Schwermetallbelastung oder Verunreinigung mit radioaktiven Substanzen geprüft, mikrobiologisch untersucht und in einem speziellen Verfahren mikronisiert (MANC®), bevor sie als Medizinprodukt weiterverarbeitet werden. Die Abbaugebiete unterliegen hierbei dem Firmengeheimnis. Adsorbiert werden Kationen der Atome bzw. Moleküle wie Ammonium, Histamin, Blei, Quecksilber, Aluminium und Caesium (FROXIMUN AG).

1.4.5 Einfluss auf die Wundheilung

In einigen praxisdokumentierten Fällen, wie Ulcus cruris, Diabetisches Fußsyndrom, atopisches Ekzem, Neurodermitits, Psoriasis, Akne, Sonnenbrand, Verbrühungen, Verbrennungen, Schürfwunden und Insektenstichen führte die topische Wundbehandlung mit dem aufbereitetem Clinoptilolith MANC® zu einer verbesserten Heilung offener und chronischer Wunden (Weber, unveröffentlichte Daten). Dabei wurde insbesondere die verbesserte Heilung chronischer Wunden beobachtet. Das Produkt werde laut Hersteller dabei nicht vom Körper resorbiert, sondern verbleibt auf der Haut und solle lokal Histamin und Schadstoffe, die die Wundheilung behindern, binden und entfernen. Zudem soll laut Herstellerangaben durch TOXAPREVENT® SKIN Hautpuder die Blutstillung gefördert werden, da das im Blut vorliegende Natrium im Austausch gegen Calcium im Zeolith-Clinoptilolith gebunden wird. Calcium ist ein wesentlicher Faktor zur Förderung der Hämostase.

1.5 Zielstellung

Wundinfektionen und daraus resultierende Septitiden stellen ein zunehmendes Problem für die Patienten und unser Gesundheitssystem dar. Die durch Dr. Weber klinisch beobachteten Fälle verbesserter Wundheilung nach Anwendung von FROXIMUN®-Produkten bilden einen neuen möglichen Ansatz zur Prävention und Behandlung von akuten und chronischen Wunden und bilden die Grundlage dieser Promotion. Da die Ursache für die positive Beeinflussung der Wundheilung durch TOXAPREVENT® SKIN durch die bisherigen Ansätze noch nicht hinreichend erklärt werden konnte, sollte untersucht werden, ob entweder Clinoptilolith (MANC®) neben der Fähigkeit als Ionenaustauscher auch antibiotische Eigenschaften besitzt oder ob im Material potentiell enthaltene Bakterien im Sinne einer probiotischen Wirkung die Wundheilung fördern.

Das grundlegende Ziel der vorliegenden Arbeit war die *in vitro* Testung der TOXAPREVENT®-Produkte auf antimikrobielle Wirksamkeit.

1. Zunächst sollte der Keimgehalt verschiedener TOXAPREVENT®-Produkte qualitativ und quantitativ charakterisiert werden.
2. Im Anschluss sollte getestet werden, ob entweder im Material gelöste Stoffe oder Mikroorganismen einen Einfluss auf das Keimwachstum ausgewählter Referenzstämme haben oder ob das Material selbst antimikrobielle Eigenschaften aufweist.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 TOXAPREVENT® -Produkte

In Tabelle 2 sind die für diese Arbeit genutzten Produkte und Chargen aufgelistet.

Tabelle 2: TOXAPREVENT® - Produkte

Produktname	LOT (Charge)
FROXIMUN® TOXAPREVENT® Pure Kapsel	15AB071WI
	16AD111WI
	16AD056WI
FROXIMUN® TOXAPREVENT® Skin Suspension	15AA098FR
	14AA330FR
	16AA061FR
FROXIMUN® TOXAPREVENT® Skin Hautpuder	15AA257FR
	15AA240FR
	16AA300FR

2.1.2 Bakterien und Hefen

Die in dieser Arbeit verwendeten Bakterien- und Hefestämme sind Bestandteil der Stammsammlung des Institutes für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene der Uniklinik Rostock (IMIKRO).

Tabelle 3: Bakterien und Hefen

Bakterienstamm	Herkunft/Referenz
S. aureus Stamm 1	ATCL 29213
S. aureus Stamm 2	NCTC 12493
C. albicans Stamm 1	ATCL 900281
C. albicans Stamm 2	ATCL 102312
P. aeruginosa	ATCL 27853

2.1.3 Laborgeräteausstattung und Software

Die Tabellen 4 und 5 fassen alle Geräte und die verwendete Software sowie deren Hersteller bzw. Entwickler zusammen, die zusätzlich zur Laborgrundausstattung genutzt wurden. In den Tabellen 6 und 7 sind die verwendeten Verbrauchsmaterialien und Chemikalien aufgeführt.

Tabelle 4: Laborgeräte

Laborgeräte	Hersteller
Analysewaage Typ BP 4100S	Sartorius, Göttingen
Varifuge 3.OR	Heraeus, Hamburg
Brutschrank HeraCell	Heraeus, Hamburg
Brutschrank Typ B6060	Heraeus, Hamburg
Eddy Jet Spiral Plater 1.22	IUL Instruments GmbH, Königswinter
Gefrierschrank -80 °C Typ Hera freeze	Heraeus, Hamburg
Inkubationsschüttler Typ 3031	GFL, Wunstorf
Inkubationsschüttler Typ NB-205L	N-Biotek, Dunn Labortechnik GmbH, Asbach
Smart Spec™ 3000 Spectrophotometer	Bio-Rad, Hercules, CA
Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe accu jet® pro	Brand GmbH & Co KG, Wertheim
Reinstwasseranlage „Ultra Clear plus“	Systemische Gesellschaft, Berlin
Stepper „Multipette plus“	Eppendorf, Hamburg
Stepper-Spritzen CombiTips plus® (10 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilbank Herasafe KS18	Thermo Scientific, Langenselbold
Sterilfilter 430513, 430626 (0,22 µm)	Corning incorporated, Kaiserslautern
Vortex-Genie Touch Mixer	Scientific Industries, Bohemia, USA

Tabelle 5: Software

Software	Entwickler
GraphPad Prism 6.01	GraphPad Software Inc., La Jolla, USA
Microsoft Office Edition 2010	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Windows 7	Microsoft Corporation, Redmont, USA
Blast (Basic local alignment search tool)	(Altschul et al. 1990)

2.1.4 Verbrauchsmaterial, Chemikalien und Reagenzien

Tabelle 6: Verbrauchsmaterial

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Eppendorfgefäße (1,5 ml und 2 ml)	Eppendorf, Hamburg
Glasperlen (2,85 mm – 3,3 mm)	Carl-Roth GmbH + Co., Karlsruhe
Impfösen	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Küvetten (10 x 4 x 45 mm)	Sarstedt, Nürmbrecht
Parafilm	Pechiney Plastic Packaging, Chicago,IL, USA
Pipettenspitzen (10 µl 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Plastikpipetten (5 ml, 10 ml, 25 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich
Plastikröhrchen (10 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One, Kremsmünster, Österreich

Tabelle 7: Chemikalien, Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Agar (Agar technical No. 3)	Oxoid, Basingstoke, Hampshire, England
Columbia Blutagarplatten	BD, Franklin Lakes, NJ, USA
Ethanol (absolut)	Zentralapotheke UMR
Glycerol 99%	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Natriumchlorid	Carl-Roth GmbH & Co., Karlsruhe

2.1.5 Nährmedien

Die Zusammensetzung der Medien bezieht sich auf ein Gesamtvolumen von einem Liter. Die Medien wurden bei 121 °C für 20 min und 1 bar Überdruck autoklaviert. Für die Versuche mit *S. aureus* und *P. aeruginosa* wurde MHB-Medium verwendet. *Candida albicans* wurde in Sabouraud-Medium (SAB) angezüchtet. Für feste Medien wurden jeweils 15 g Agar (Oxoid) pro Liter zugegeben. Die Platten wurden ihrer Verwendung für maximal 7 Tage bei 4 °C aufbewahrt.

Die Sterilitäts- und Funktionsprüfung der Nährmedien erfolgte im Rahmen der betreffenden Standardprozeduren des nach DIN EN ISO 15183 und DIN EN ISO 17025 akkreditierten Diagnostikbereiches des Institutes.

2.2 Mikrobiologische Methoden

2.2.1 Kultivierung und Stammhaltung von *S. aureus* und *P. aeruginosa*

Die Anzucht von *S. aureus* und *P. aeruginosa* aus der Stammsammlung erfolgte als Übernachtkultur (ÜNK) bei 37°C in MHB-Medium und Raumluft im Inkubationsschüttler bei 180 UpM.
Mit der Kultur beimpfte Columbia-Blutagarplatten wurden 16-20 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend für maximal 7 Tage bei 4°C aufbewahrt.

Für die langfristige Lagerung wurde eine mit Glycerin thermostabilisierte Stammsuspension („Glycerolstock“) hergestellt. Aus einer Einzelkolonie wurde eine ÜNK in 5 ml MHB-Bouillon kultiviert. Anschließend wurden 700 µl der Kultur mit 300 µl Glycerin gründlich vermischt und in Cryo Reaktionsgefäßen (Thermo Scientific) bei -80°C eingefroren.

2.2.2 Kultivierung und Stammhaltung von *Candida albicans*

Candida albicans wurde als ÜNK bei 37°C in SAB-Medium unter Raumluft für 24 Stunden bei 180 UpM inkubiert. Die mit der Kultur beimpften SAB-Agarplatten wurden 16-20 Stunden bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert und anschließend für maximal 7 Tage bei 4°C aufbewahrt.
700 µl der über Nacht in SAB-Bouillon kultivierten Einzelkolonien wurden mit 300 µl Gycerin in CryoBank-Röhrchen bei -80°C archiviert.

2.2.3 Messen der optischen Dichte und Erstellen einer Wachstumskurve

Eine ÜNK der aus der Stammsammlung angezüchteten Bakterien und Hefen wurde 1:100 in 20 ml Medium verdünnt. Die Inkubation erfolgte bei 37 °C unter Raumluft bei 180 UpM. Anschließend erfolgte die halbstündliche Entnahme von 500 µl Kultur und die Messung der optischen Dichte (OD) bei 600 nm im Spektralphotometer gegen einen Blindwert. Die Extinktion über die Zeit wurde halblogarithmisch dargestellt.

Der lineare Anstieg der Kurve entspricht der exponentiellen Wachstumsphase, hieraus konnten Wachstumsrate (µ) und Verdopplungszeit (t_d) bestimmt und anhand folgender Formeln berechnet werden:

$$\mu = \frac{\log(x_2) - \log(x_1)}{\log(e) * (t_2 - t_1)}$$

$$t_d = \frac{\ln(2)}{\mu}$$

µ = Wachstumsrate [1/h]

x_1 , x_2 = Messwerte zum Zeitpunkt t_1 ; t_2

e = Eulersche Zahl = 2,718281828459

t_1 ; t_2 = Zeitpunkt der Messung

log = Logarithmus zur Basis 10

t_d = Verdopplungszeit [h]

ln = natürlicher Logarithmus zur Basis e

2.2.4 Ermittlung der Kolonie-Bildenden-Einheiten

Zur Bestimmung der Kolonie-Bildenden-Einheiten wurden während der exponentiellen Wachstumsphase (OD_{600nm} = 0,3 – 0,4) aus der Hauptkultur 100 µl entnommen und seriell verdünnt. Geeignete Verdünnungsstufen der Bakterien wurden auf Columbia-Blutagar, die der Hefen auf SAB-Agar ausplattiert. Die Platten wurden 24 h inkubiert und am Folgetag die Keimmengen anhand der gewachsenen Kolonien ermittelt. Daraus wurde das benötigte Volumen berechnet um die gewünschten Keimmengen von 100, 10.000 und 1.000.000 KBE zu erhalten.

Das Auszählen der Kolonien wurde unter visueller Inspektion der Columbia-Blutagar-Platten manuell durchgeführt; Ausplattieren und Auszählen der Hefen erfolgte mittels Eddy Jet und den entsprechenden Zählschablonen.

2.2.5 Mikrobiologische Analyse des Vulkangestein-Präparates

Direkter Keimnachweis: Auf Grundlage der Vorversuche von Frau Lisa Warning aus dem Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene (IMIKRO) wurden je 1 g verschiedener TOXAPREVENT®-Produkte eingewogen und mit je 5 ml steriler 0,9% Kochsalzlösung (NaCl) auf dem Laborschüttler vermischt. Nach einminütiger Zentrifugation mit 2000 x g wurden je 100 µl Überstand seriell mit steriler 0,9% NaCl-Lösung verdünnt und auf Columbia-Blutagarplatten ausplattiert. Diese wurden 2 Tage lang bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.
Keimnachweis nach Kultur: Je 1g TOXAPREVENT®-Produkt wurde in 20 ml MHB-Bouillon über Nacht bei 37°C und 180 UpM inkubiert, bei 2000 x g für 1 Minute zentrifugiert und mit dem Überstand eine Verdünnungsreihe hergestellt. Je 100 µl wurden auf Columbia-Schafblutagar ausplattiert und 20 - 24 h bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.
Es erfolgte die Ermittlung der Keimzahlen und die Platten wurden fotodokumentiert. Morphologisch unterschiedliche Kolonien wurden isoliert und mittels 16 S rDNA Sequenzierung bzw. Massenspektrometrie (MALDI-TOF) identifiziert. Die Stammhaltung erfolgte analog zu denen der Testkeime.

2.2.6 MALDI-TOF

Die Massenspektrometrie mittels MALDI-TOF MS-Gerät ist ein Verfahren zur Massenanalyse von Fragmenten ribosomaler Proteine, das zur schnellen Identifizierung von Hefen und Bakterien eingesetzt wird (Gantt et al. 1999, Seyfarth et al. 2012). Es basiert auf einer Kombination aus Matrix-unterstützter Laserdesorption / Ionisation (MALDI) und Flugzeitanalyse (time of flight, TOF). Die MALDI-TOF-Messungen und Auswertungen für diese Untersuchung wurden vom IMIKRO übernommen. Die Messungen erfolgten mit dem VITEK MS – Massenspektrometer (bioMérieux, Nürtingen, Germany).

2.2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließende Sequenzierung

Die DNA-Extraktion und Amplifizierung der 16S rDNA erfolgte durch das IMIKRO. Verwendet wurde der Thermocycler der Firma Biometra, die Sequenzierung erfolgte in den SEQLAB Sequence Laboren, Göttingen.

2.2.8 Testung auf antibiotische Wirksamkeit

2.2.8.1 Hemmwirkung des Ultrafiltrates

Zur Herstellung des Ultrafiltrates wurden je 1 g TOXAPREVENT®-Produkt in 5 ml steriler 0,9% NaCl-Lösung mittels Laborschüttler (Vortex) suspendiert und 1 Minute bei 2000 x g zentrifugiert.
Der Überstand wurde mittels Sterilfilter mit 200 nm Porengröße filtriert. Das Filtrat wurde 1:2 mit MHB-Medium zur Inkubation mit Test-Bakterien gemischt. Zur Inkubation mit Test-Hefen wurde SAB-Medium verwendet.
Als Wachstumskontrolle wurde anstelle des Filtrats 0,9% NaCl-Lösung zum Medium gegeben.
Je 100 KBE/10 µl MHB bzw. SAB der Referenzstämme wurden zu je 200 µl Ultrafiltrat-Gemisch bzw. Wachstumskontrollmedium gegeben und über 18 – 24 Stunden bei 37°C unter mikroaerophilen Bedingungen inkubiert. Nach Herstellen einer Verdünnungsreihe wurden je 100 µl der Proben auf Columbia-Blutagar/SAB-Agar ausplattiert und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.
Nach 18 – 24 Stunden Inkubation wurden nur die Kolonien mit einer für den Teststamm typischen Morphologie gezählt.

2.2.8.2 Kontakthemmung

Für die Testung der Kontakthemmung wurde eine Suspension mit 1 g TOXAPREVENT®-Produkt mit 5 ml NaCl 0,9% hergestellt.
Je 10^4 KBE / 10 µl MHB bzw. SAB der Referenzstämme in der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit 100 µl der TOXAPREVENT®-Produkt-Suspension vermischt und 1 Stunde bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert. Anschließend wurden die Kulturen seriell verdünnt, je 200 µl auf Columbia-Schafblut/SAB-Agar-Platten ausplattiert und bei 37°C und 5% CO_2 inkubiert.
In parallele wurde eine Wachstumskontrolle mit einem Gemisch aus 0,9% NaCl und

MHB- bzw. SAB-Medium im Verhältnis 1:2 mitgeführt. Nach 18 – 24 Stunden Inkubation wurden nur die Kolonien mit einer für den Teststamm typischen Morphologie gezählt. Pro TOXAPREVENT®-Produkt und LOT wurden die Versuche mit jedem Keim der verwendeten Teststämme insgesamt drei Mal an unterschiedlichen Tagen wiederholt (= biologische Replikate).

2.3 Statistik

Für die Auswertung und Darstellung der erhobenen Messwerte wurde das Programm GraphPad Prism 6.01 verwendet. Die Auswertung erfolgte, soweit nicht anders beschrieben, als Mittelwert ± S.E.M. (standard error of the mean). Die Signifikanzprüfung wurde mit einem ungepaarten t-Test durchgeführt, da es sich um unabhängige Messdaten handelt. Eine Normalverteilung wird angenommen. Dabei wurde $p < 0,05$ als signifikant angesehen und mit * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,01$) bzw. *** ($p < 0,001$) gekennzeichnet.

3 Ergebnisse

Unter Berücksichtigung der in der Praxis beobachteten positiven Beeinflussung der Wundheilung durch TOXAPREVENT®-Produkte, war das Ziel dieser Promotionsarbeit zu untersuchen, ob die Ursache hierfür die Adsorptionsfähigkeit des Clinoptilolith (MANC®) ist und/oder ob das Material antibiotische Eigenschaften aufweist. In einem *in vitro* Modell wurde der Einfluss des Clinoptilolith-Materials (MANC®) auf das Wachstumsverhalten verschiedener Wundinfektionen verursachender Bakterien und Hefen untersucht.

Da sowohl die im Material enthaltenen Bakterien als auch das Material selbst oder im Gestein enthaltene Stoffe Einfluss auf das Bakterienwachstum haben könnten, wurde in einem ersten Schritt zunächst das Vulkangestein-Präparat mikrobiologisch untersucht und die kultivierten Bakterien mittels PCR und MALDI-TOF detektiert. Anschließend wurde geprüft, ob das Ultrafiltrat oder das Material antibiotische Eigenschaften aufweisen.

Zur *in vitro* Testung des Vulkangestein-Materials auf antibiotische Eigenschaften benötigt man eine Versuchsanordnung, mit der sich die Beeinflussung des Bakterienwachstums durch TOXAPREVENT® reproduzierbar untersuchen lässt. Zu diesem Zweck wurden Bakterien und Hefen zur Überprüfung einer Hemmwirkung ausgewählt, die als Auslöser chronischer Wundinfektionen in Frage kommen. Für die Durchführung der Versuche wurden verschiedene Produkte der TOXAPREVENT®-Reihe verwendet. Zur Testung der antibiotischen Wirksamkeit wurden zwei Darreichungsformen zur dermalen Applikation ausgewählt, zum einen Hautpuder und zum anderen eine Suspension. Da es sich in den unterschiedlichen Produkten jedoch stets um identische Inhaltsstoffe handelt, wählten wir zudem noch ein Präparat in Kapselform aus, welches ebenso wie das Puder ohne jegliche Beimengungen auskommt. Auch die Suspension kommt abgesehen von Wasser ohne Zusatzstoffe aus.

Da in der Herstellung und Verarbeitung der MANC®-Produkte Clinoptilolith aus unterschiedlichen Abbaugebieten individuell gemischt wird, wurden zudem von jedem der drei Produkte drei verschiedene Chargen ausgewählt, um wegen ggf. unterschiedlicher Anteile von regionalen Clinoptilolithen veränderte Zusammensetzungen zu berücksichtigen.

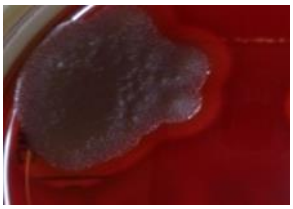
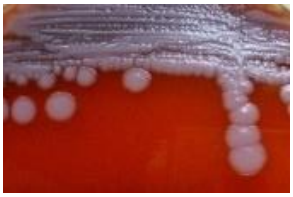
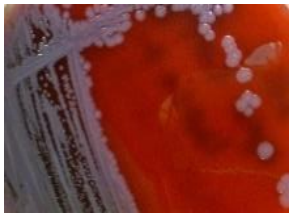
3.1 Mikrobiologische Testung des Clinoptilolith-Materials

Bevor eine Hemmwirkung auf das Bakterienwachstum untersucht werden konnte, wurde der Keimgehalt des Vulkangesteins überprüft. Zum einen um vorhandene Bakterien zu klassifizieren, zum anderen um eine Verunreinigung während der Testung auszuschließen.

Dabei wurden die Versuche zunächst auf Grundlage der Vorversuche aus dem IMIKRO durchgeführt (Liesa Warning, unveröffentlichte Daten). Das TOXAPREVENT®-Material wurde resuspendiert und direkt ausplattiert. Da anders als in den Vorversuchen kein Keimwachstum nachgewiesen werden konnte, wurde Rücksprache mit dem Hersteller, der FROXIMUN AG, gehalten. Diese ergab, dass kurz vor Beginn dieser Arbeit im Produktionsprozess zur Qualitätssicherung ein zusätzlicher Hitzeschritt eingeführt worden war, um die Keimmengen zu reduzieren. Die Versuchsanordnung wurde daraufhin angepasst, indem das Material in einer ÜNK inkubiert und dann ausplattiert wurde. Somit konnten die vorherrschenden Bakterien klassifiziert werden, aber keine Aussage über die im Material enthaltene Menge getroffen werden.

Je nach TOXAPREVENT®-Produkt wuchsen Kolonien unterschiedlicher Morphologie, welche daraufhin isoliert wurden. Dabei wurden sowohl makroskopisch unterschiedliche Kolonien ausgewählt als auch Kolonien gleicher Morphologie aus verschiedenen Chargen oder Produkten. Diese wurden mittels Sequenzierung der 16S rDNA und Massenspektrometrie analysiert. Es wurden hauptsächlich Bacillus-Spezies identifiziert (Tabelle 6).

Tabelle 8: Keimgehalt des Clinoptilolithes

Foto	Material	Identifizierung PCR	Identifizierung MALDI
	Suspension LOT 2, Kapsel LOT 1	Bacillus sp, Bacillus mobilis, Bacillus thuringensis	Bacillus cereus group
	Suspension LOT 1 & 2, Kapsel LOT 1,	Uncultured Proteobacterium, Uncultured Bacterium, Beta proteobacterium AquaspiA, Uncultured Curvibacter	Bacillus megaterium
	Suspension LOT 2	Brevibacillus brevis, Brevibacillus formosus, Brevibacillus sp.	Brevibacillus spp.
	Kapsel LOT 2	Bacillus aryabhattai	k.A.
	Kapsel LOT 3	Bacillus sp, Uncultured marine bacterium, Fictibacillus enclensis, Fictibacillus sp, Fictibacillus solisalsi	k.A.
	Suspension LOT 3	Bacillus sp, Bacillus simplex, Uncultured bacterium, Brevibacterium Frigoritolerans	Bacillus simplex

3.2 Kultivierung der Bakterien und Hefen aus der Stammsammlung

Für die Untersuchung einer potentiellen antibiotischen Wirksamkeit der TOXAPREVENT®-Produkte wurden drei Testkeimen ausgewählt, die Erreger typischer Hautinfektionen darstellen. Die Organismen wurden bis zu einer exponentiellen Wachstumsphase inkubiert (OD_{600} von 0,3 – 0,4). Während dieser Phase wurden Aliquots entnommen und seriell verdünnt, um die Lebendkeimzahl zu ermitteln.

In den Abbildungen 3 - 6 sind die Wachstumskurven der Testkeime dargestellt.

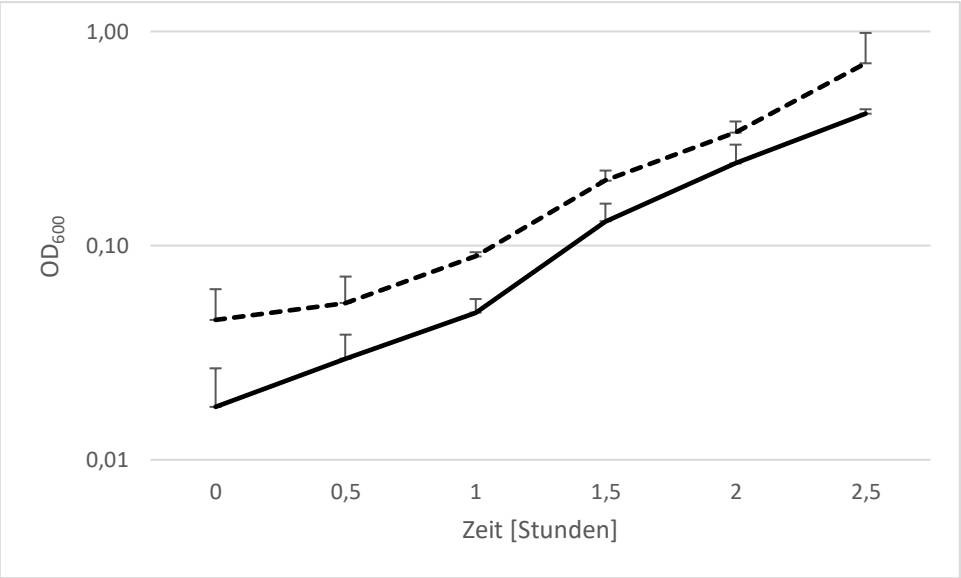


Abbildung 3: Wachstumskurve *S. aureus* Stamm 1 (durchgezogene Linie) und **Stamm 2** (gestrichelte Linie). Die Kurven basieren auf Mittelwerten, die einseitigen Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung zu den höheren Werten (n=3).

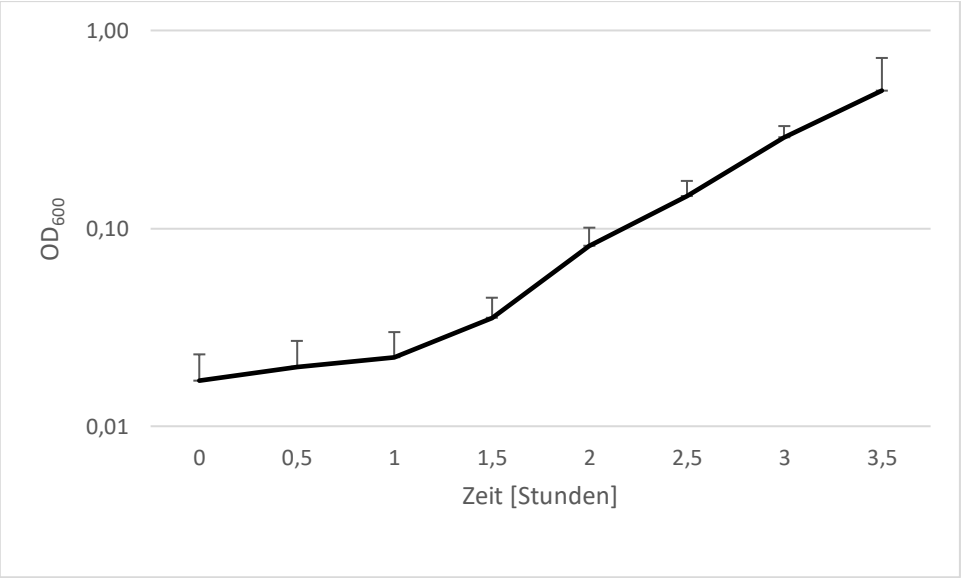


Abbildung 4: Wachstumskurve *P. aeruginosa.* Die Kurven basieren auf Mittelwerten, die einseitigen Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung zu den höheren Werten (n=3).

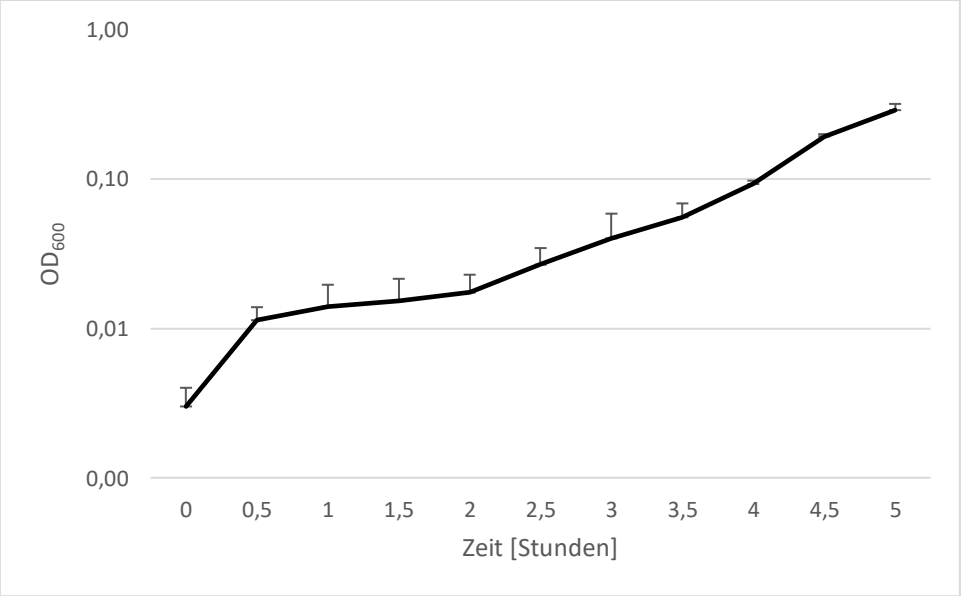


Abbildung 5: Wachstumskurve *C. albicans* Stamm 1. Die Kurven basieren auf Mittelwerten, die einseitigen Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung zu den höheren Werten (n=3).

Abbildung 6: Wachstumskurve *C. albicans* Stamm 2. Die Kurven basieren auf Mittelwerten, die einseitigen Fehlerbalken bezeichnen die Standardabweichung zu den höheren Werten (n=3).

In Tabelle 9 sind die Wachstumsraten und die Verdopplungszeiten der Bakterien und Hefen aufgelistet.

Tabelle 9: Wachstumsrate und Verdopplungszeit

Erreger	Wachstumsrate [pro Stunde]	Verdopplungszeit [h]
S. aureus Stamm 1	0,48	1,44
S. aureus Stamm 2	0,4	1,73
P. aeruginosa	0,427	1,62
C. albicans Stamm 1	0,35	1,99
C. albicans Stamm 2	0,42	1,65

3.3 Antibiotische Wirksamkeit

Zuerst sollte getestet werden, ob entweder im MANC® vorliegende Stoffe oder von den nachgewiesenen Bacilli sekretierte Substanzen antimikrobiell wirksam sind. Dazu wurde das Ultrafiltrat des Clinoptilolith-Präparates zur Testung verwendet. In einem zweiten Schritt wurde die Suspension gemeinsam mit den Bakterien der

Stammsammlung in definierter Konzentration inkubiert, um herauszufinden, ob das Material antibiotische Eigenschaften aufweist, für die ggf. direkte Kontakte zwischen Material und Mikroorganismen notwendig sind.
Es wurden Produkte der Applikationsformen dermal und oral untersucht.

3.3.1 TOXAPREVENT®-SKIN zur kutanen Anwendung

Zuerst wurde die antibiotische Wirksamkeit der TOXAPREVENT®-SKIN Produkte zur dermalen Applikation getestet.
Laut Herstellerangaben dienen die TOXAPREVENT®-SKIN Produkte der Behandlung von offenen und geschlossenen Wunden, von Verbrennungen und Hautirritationen. Zudem soll das Hautpuder die Blutstillung fördern und Exsudat binden. In den in der Praxis dokumentierten Fällen wurden ebenfalls ausschließlich Produkte zur dermalen Applikation betrachtet.

3.3.1.1 Hemmwirkung des Ultrafiltrats

Um zu prüfen, ob das Ultrafiltrat des Clinoptilolith-Präparates antibakterielle Eigenschaften besitzt, wurden die Präparate einzeln mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und sterilfiltriert. Die Teststämme wurden in einer Konzentration von 100 KBE/ml hinzugefügt. Nach 24 h Inkubation wurden die Aliquots seriell verdünnt, ausplattiert und inkubiert. Nach 24 h erfolgte die Auswertung.
Das Bakterienwachstum einiger Teststämme wies nach Inkubation mit den Clinoptilolith-Präparaten signifikante Unterschiede im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle auf.
Bei *S. aureus* Stamm 1 wurde eine signifikante Wachstumshemmung mit allen Chargen (Abb. 7A) nachgewiesen. Bei *S. aureus Stamm* 2 bewirkte Charge 1 der Hautpuder-Produkte eine signifikante Wachstumsminderung (Abb. 7B).

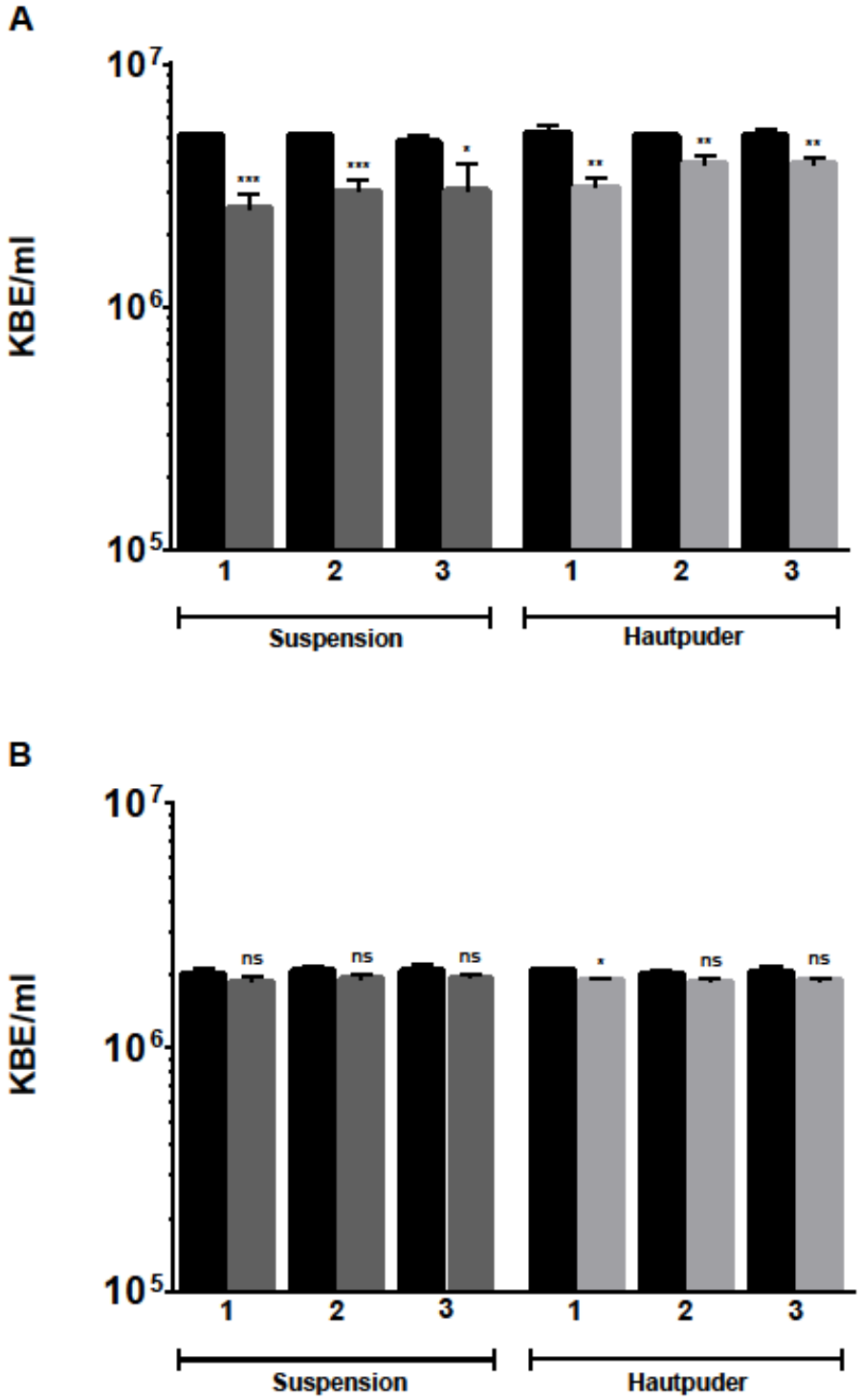


Abbildung 7: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *S. aureus* Stämmen und TOXAPREVENT®-Skin Produkten; A: *S. aureus* Stamm 1, B: *S. aureus* Stamm 2; schwarz: NaCl-Wachstumskontrolle, grau: Probe. Gezeigt werden die Mittelwerte mit einer eindimensionalen Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarter t-Tests (n=3) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant

Bei *P. aeruginosa* gab es keine signifikanten Wachstumsunterschiede nach Zugabe von TOXAPREVENT®-Produkten im Vergleich zur Wachstumskontrolle.

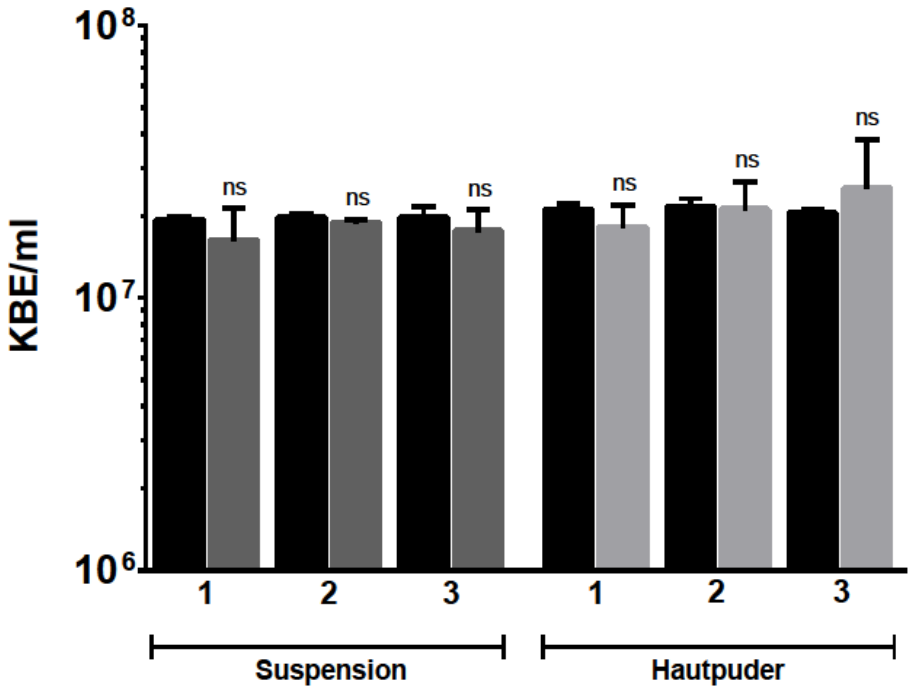


Abbildung 8: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *P. aeruginosa* und TOXAPREVENT®-Skin Produkten; schwarz: NaCl-Wachstumskontrolle, grau: Probe. Gezeigt werden die Mittelwerte mit einer eindimensionalen Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarter t-Tests (n=3) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant

Bei den *C. albicans* Teststämmen wurde sowohl eine Hemmung als auch eine Stimulierung des Wachstums nachgewiesen. Das Wachstum von *C. albicans* Stamm 1 wurde von Charge 3 der Suspension und den Chargen 1 und 2 des Hautpuders gehemmt (Abb. 9A).

Im Gegensatz dazu wurde das Wachstum von *C. albicans 2* durch die Chargen 2 und 3 der Suspension und die Charge 3 des Hautpuders stimuliert (Abb. 9B).

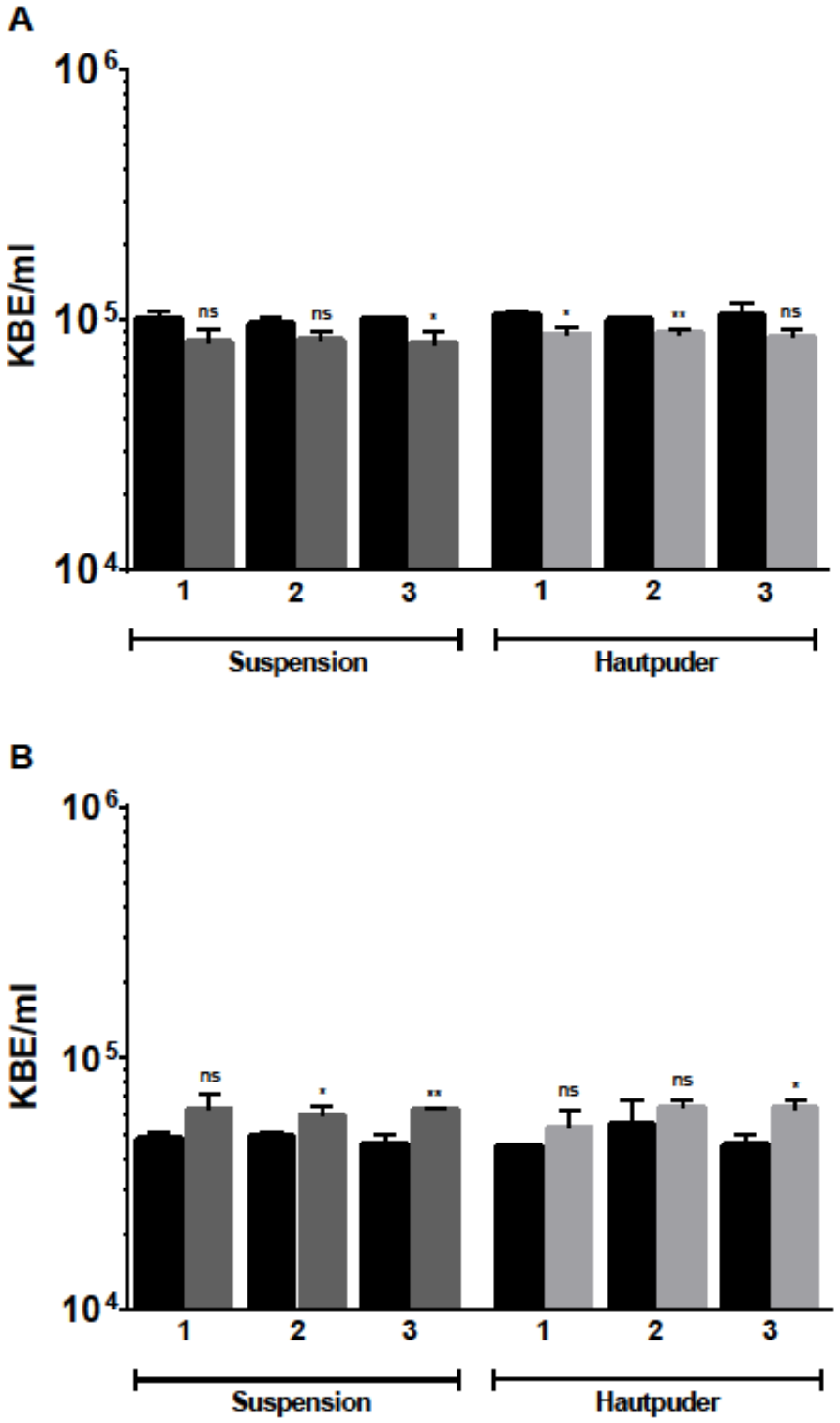


Abbildung 9: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *C. albicans* Stämmen und TOXAPREVENT®-Skin Produkten; A: *C. albicans* Stamm 1, B: *C. albicans* Stamm 2; schwarz: NaCl-Wachstumskontrolle, grau: Probe. Gezeigt werden die Mittelwerte mit einer eindimensionalen Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarter t-Tests (n=3) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant

3.3.1.2 Kontakthemmung

Ziel der Versuchsanordnung war es, festzustellen, ob das Vulkangestein eine direkte antimikrobielle Wirkung aufweist, für die ein zumindest zeitweiliger Kontakt zu den Mikroorganismen notwendig ist. Hierzu wurden die verschiedenen Präparate mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt. Danach erfolgte das Hinzufügen der Teststämme in einer Konzentration von 10^4 KBE/ml. Nach Inkubation über Nacht wurden die Aliquots seriell verdünnt, ausplattiert und inkubiert. Nach 24 h erfolgte die Auswertung.

Bei *S. aureus* Stamm 1 zeigte sich nach Inkubation mit Partikeln aus Charge 2 der Suspension eine geringe aber signifikante Stimulierung des Wachstums im Vergleich zum Kontrollmedium. Nach Inkubation mit dem Hautpuder waren keine signifikanten Unterschiede zu erkennen (Abb. 10A).

Nach Inkubation mit Partikeln der Charge 3 des Hautpuders zeigte *S. aureus* Stamm 2 ein signifikant reduziertes Wachstum (Abb. 10B).

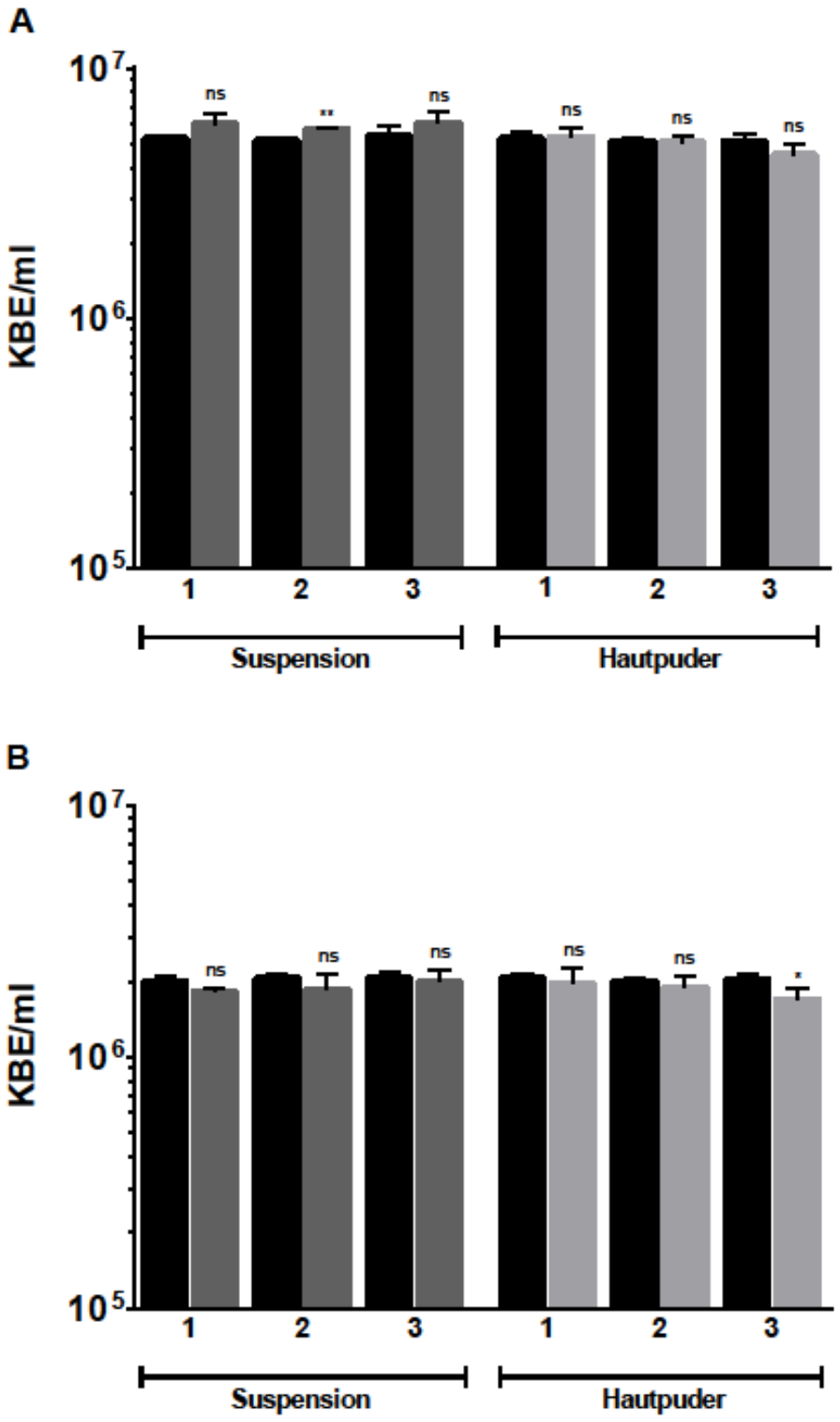


Abbildung 10: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit *S. aureus* Stämmen und TOXAPREVENT®-Skin Produkten; A: *S. aureus* Stamm 1, B: *S. aureus* Stamm 2; schwarz: NaCl-Wachstumskontrolle, grau: Probe. Gezeigt werden die Mittelwerte mit einer eindimensionalen Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarter t-Tests (n=3) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant

P. aeruginosa zeigte keine signifikanten Wachstumsunterschiede nach Inkubation mit den TOXAPREVENT®-Produkten im Vergleich mit der Kontrolle.

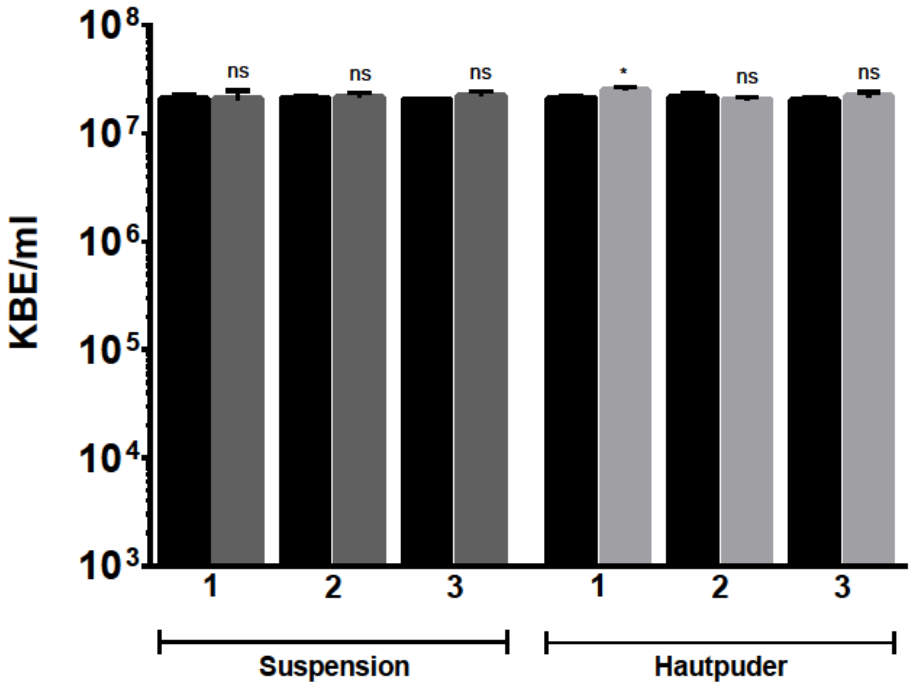


Abbildung 11: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit *P. aeruginosa* und TOXAPREVENT®-Skin Produkten; schwarz: NaCl-Wachstumskontrolle, grau: Probe. Gezeigt werden die Mittelwerte mit einer eindimensionalen Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarter t-Tests (n=3) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant

Das Wachstum von *C. albicans* Stamm 1 wurde durch die Partikel der Suspension nicht signifikant beeinflusst. Im Gegensatz dazu wurde es von Charge 2 des Hautpuders signifikant gehemmt.

C. albicans Stamm 2 wies im Kontakt mit den Partikeln der Suspension und dem Hautpuder ein signifikant reduziertes Wachstum auf.

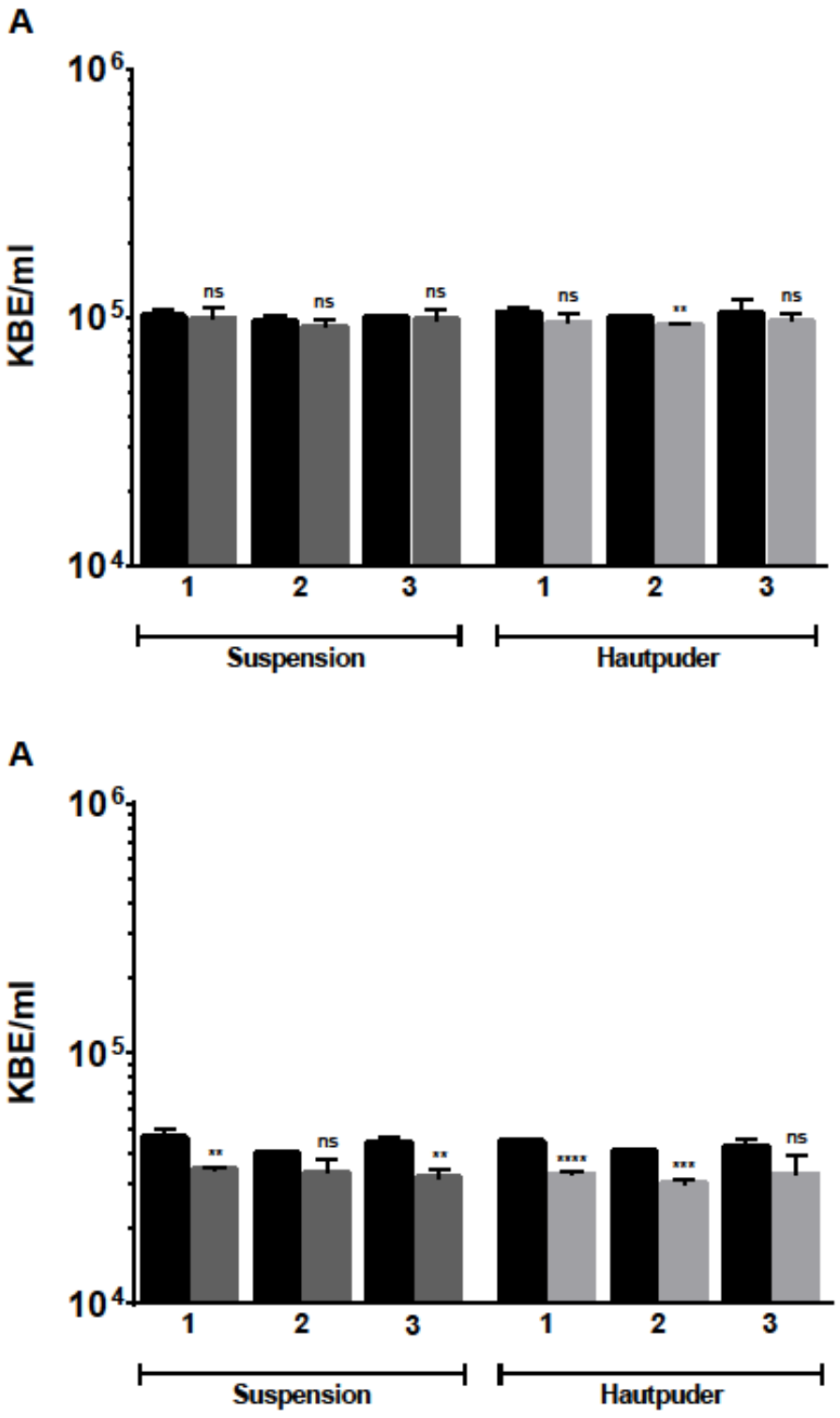


Abbildung 12: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit *C. albicans* Stämmen und TOXAPREVENT®-Skin Produkten; A: *C. albicans* Stamm 1, B: *C. albicans* Stamm 2; schwarz: NaCl-Wachstumskontrolle, grau: Probe. Gezeigt werden die Mittelwerte mit einer eindimensionalen Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarter t-Tests (n=3) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; **** $p < 0.0001$; ns: nicht signifikant

3.3.2 TOXAPREVENT® zur oralen Anwendung

TOXAPREVENT® gibt es in verschiedenen Darreichungsformen zur oralen Anwendung. Die Kapseln sind magensaftresistent und entwickeln ihre Wirkung somit erst im Dünn- und Dickdarm. Dort binden sie laut Hersteller hauptsächlich Histamin, Ammonium und Schwermetalle und dienen somit in erster Linie der Entgiftung. Abgesehen von der Kapselhülle enthält das Produkt reines Clinoptilolith-Gestein, welches in einem speziellen Verfahren der FROXIMUN AG zum Endprodukt MANC® verarbeitet wurde.

3.3.2.1 Ultrafiltrat

Für die Versuche wurde nur das Granulat in der Kapsel verwendet und nach der Verdünnung mit isotoner Kochsalzlösung sterilfiltriert. 100 KBE/ml der Teststämme wurden hinzugefügt und inkubiert. Die Aliquots wurden seriell verdünnt, ausplattiert und inkubiert. Nach 24 h erfolgte die Auswertung.

Das Wachstum von *S. aureus* Stamm 1 wurde durch die Charge 1, das von *S. aureus* Stamm 2 wurde durch die Charge 2 geringfügig gehemmt.

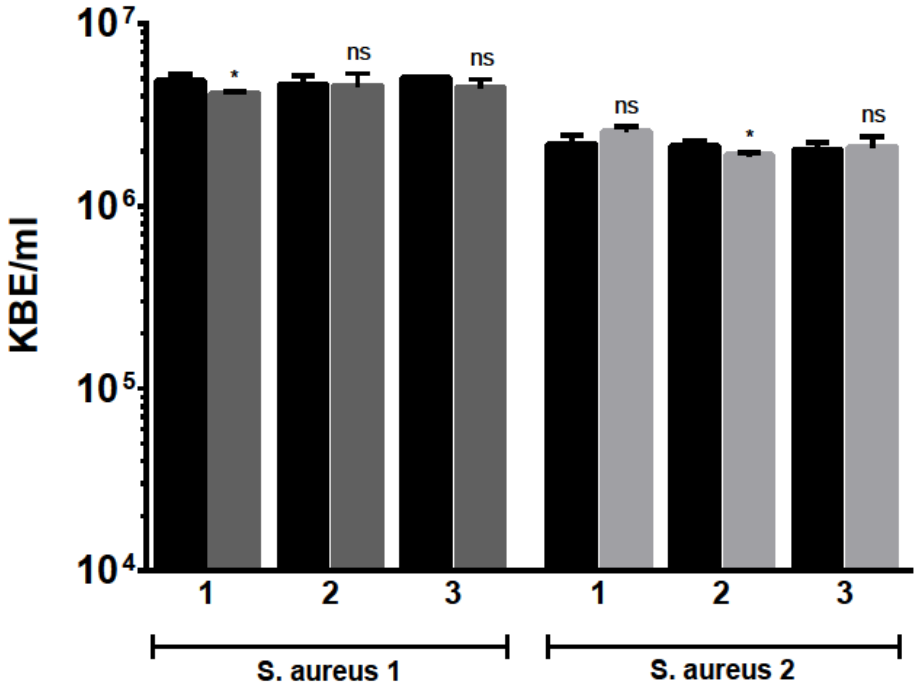


Abbildung 13: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *S. aureus* Stämmen 1 und 2 und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln; schwarz: NaCl-Wachstumskontrolle, grau: Probe. Gezeigt werden die Mittelwerte mit einer eindimensionalen Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarter t-Tests (n=3) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant

P. aeruginosa wurde im Vergleich mit dem Kontrollmedium durch das Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln in seinem Wachstum nicht signifikant beeinflusst.

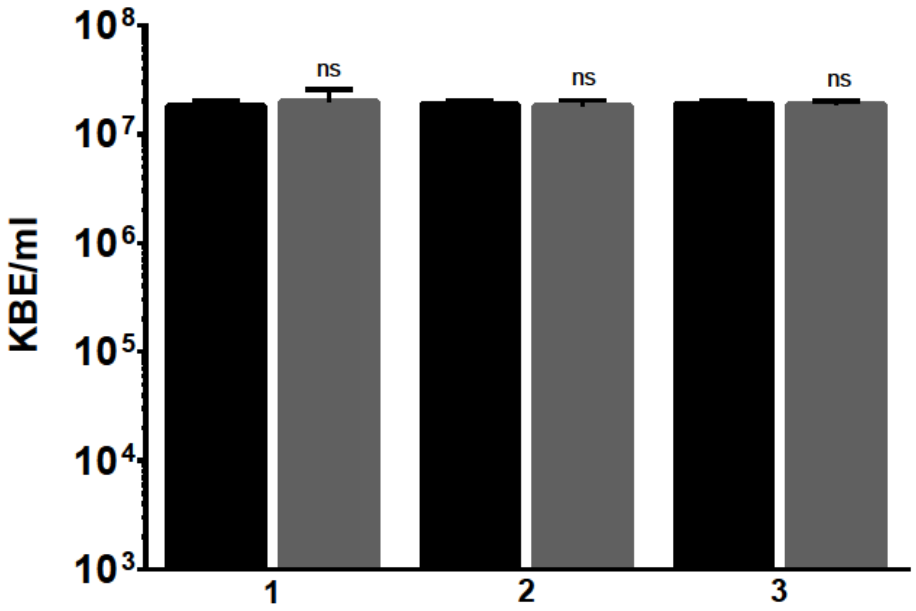


Abbildung 14: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *P. aeruginosa* und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln; schwarz: NaCl-Wachstumskontrolle, grau: Probe. Gezeigt werden die Mittelwerte mit einer eindimensionalen Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarter t-Tests (n=3) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant

C. albicans Stamm 1 wurde nach Inkubation mit den Charge 1 und 3 signifikant in ihrem Wachstum gehemmt.

Das Wachstum von *C. albicans* Stamm 2 wurde durch Zugabe von Charge 1 und 3 stimuliert.

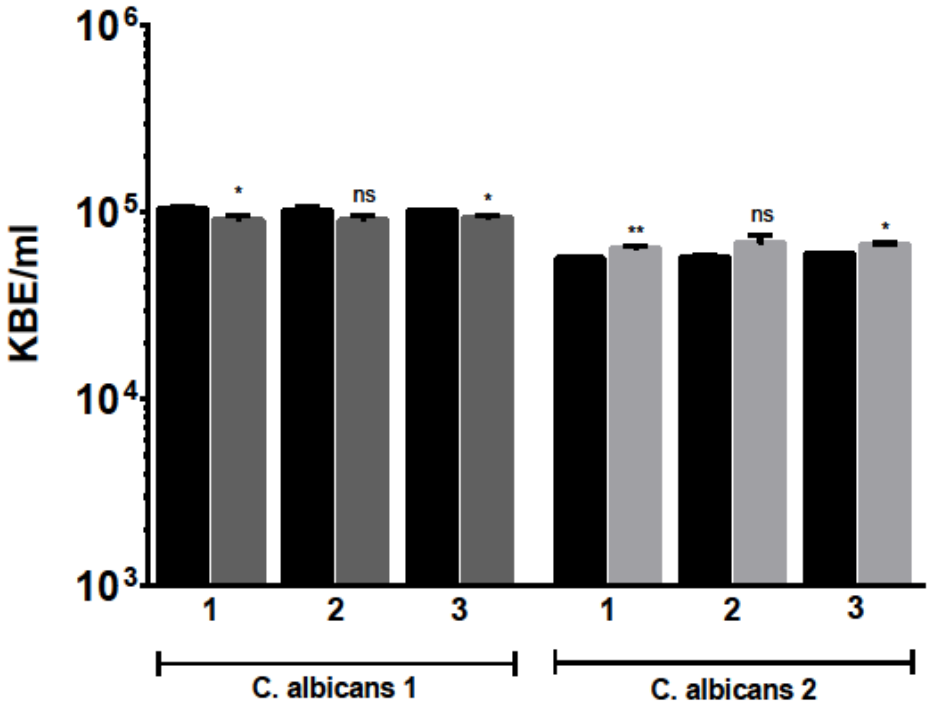


Abbildung 15: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *C. albicans* Stämmen 1 und 2 und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln; schwarz: NaCl-Wachstumskontrolle, grau: Probe. Gezeigt werden die Mittelwerte mit einer eindimensionalen Standardabweichung. Die Signifikanz wurde mittels ungepaarter t-Tests (n=3) ermittelt. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$; ns: nicht signifikant

3.3.2.2 Kontakthemmung

Hierzu wurden die verschiedenen Präparate mit isotoner Kochsalzlösung verdünnt und die Teststämme in einer Konzentration von 10^4 KBE/ml hinzugefügt. Die Aliquots wurden seriell verdünnt, ausplattiert und inkubiert. Nach 24 h erfolgte die makroskopische Auswertung. Die nachfolgenden Abbildungen 16 - 18 zeigen, dass das Wachstum der Referenzstämme keine signifikanten Unterschiede im Vergleich zur Kontrolle aufweist.

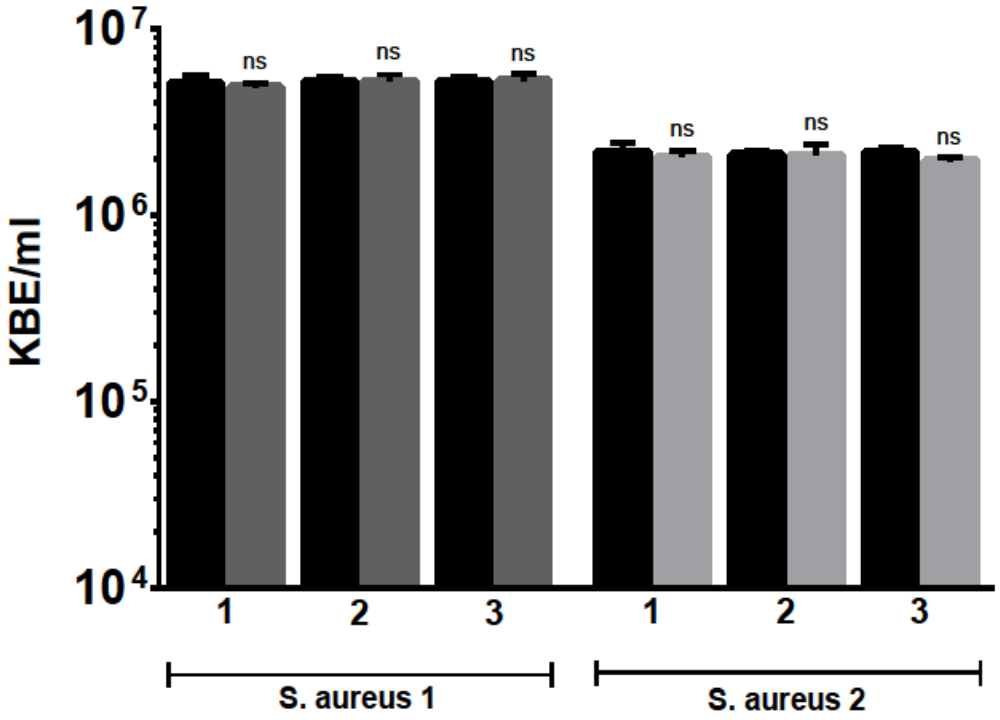


Abbildung 16: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2 und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln; schwarz: NaCl, grau: Probe. Mittelwerte ± Standardabweichung. ungepaarter t-Test (n=3). ns: nicht signifikant

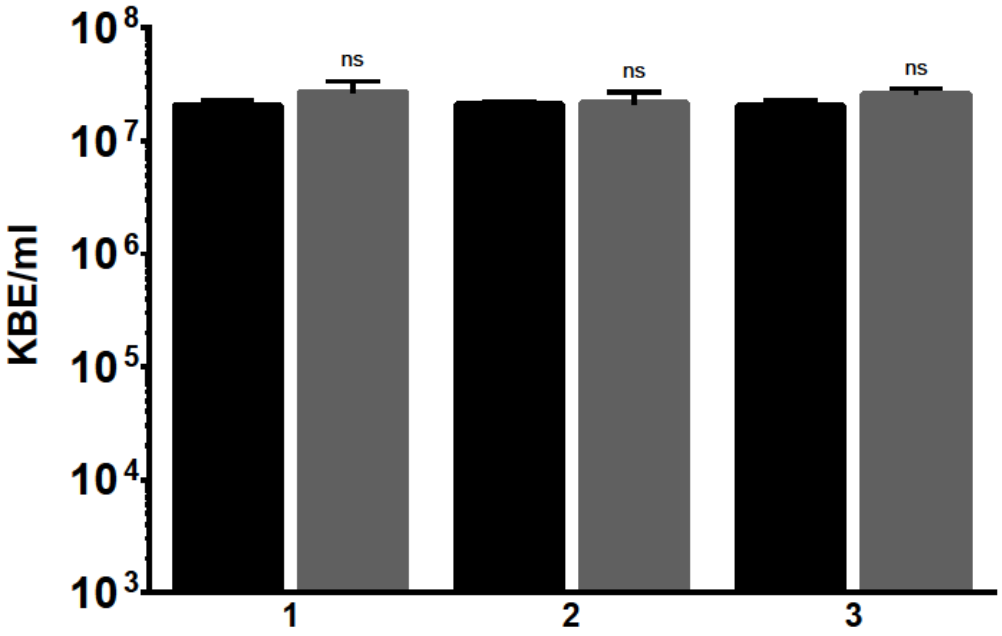


Abbildung 17: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit *P. aeruginosa* und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln; schwarz: NaCl, grau: Probe. Mittelwerte ± Standardabweichung. ungepaarter t-Test (n=3). ns: nicht signifikant

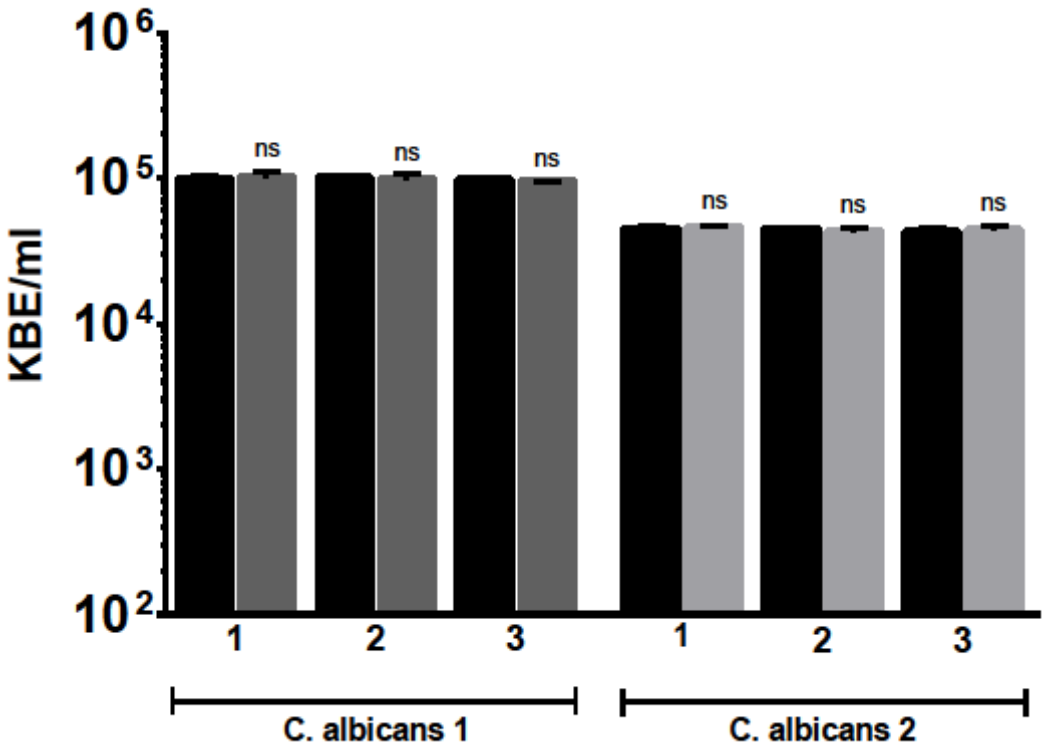


Abbildung 18: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2 und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln; schwarz: NaCl, grau: Probe. Mittelwerte ± Standardabweichung. ungepaarter t-Test (n=3). ns: nicht signifikant

Insgesamt fiel bei allen Versuchen auf, dass sowohl auf den Platten der Versuchsreihen als auch auf denen mit dem Kontrollmedium ausschließlich die Kolonien der verwendeten Testkeime wuchsen und keine der zuvor im Material nachgewiesenen *Bacillus*-Spezies.

3.3.2.3 LOG-Reduktion

Um die Keimreduktion zu messen, wurde die LOG-Reduktion ermittelt. Eine $\log_{10}$-Stufe ist eine Maßeinheit für eine Keimreduktion um jeweils eine Zehnerpotenz. Tabelle 11 stellt die Definition der LOG-Reduktion dar. Die Tabellen 12-20 stellen exemplarisch die LOG-Reduktion der Referenzkeime nach der Zugabe der TOXAPREVENT®-Ultrafiltrat-Produkte dar. Da bei der Kontakthemmung keine LOG-Reduktion vorlag, befinden sich die Tabellen im Anhang.

Tabelle 10: Definition LOG-Reduktion

LOG-	Reduktion in %
1	90
2	99
3	99,9
4	99,99
5	99,999
6	99.9999
7	99,99999
8	99,999999

Tabelle 11: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2

Teststamm	Charge	LOG-Reduktion	Teststamm	Charge	LOG-Reduktion
S. aureus Stamm 1	1	0,3	*S. aureus* Stamm 2	1	0,03
	2	0,23		2	0,03
	3	0,2		3	0,03

Tabelle 12: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
C. albicans Stamm 1	1	0,09	*C. albicans* Stamm 2	1	0
	2	0,07		2	0,08
	3	0,09		3	0

Tabelle 13: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
P. aeruginosa	1	0,08
	2	0,02
	3	0,05

Tabelle 14: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus dem TOXAPREVENT®-Hautpuder beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
S. aureus Stamm 1	1	0,23	*S. aureus* Stamm 2	1	0,04
	2	0,12		2	0,03
	3	0,12		3	0,04

Tabelle 15: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus dem TOXAPREVENT®-Hautpuder beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
C. albicans Stamm 1	1	0,08	*C. albicans* Stamm 2	1	0
	2	0,06		2	0
	3	0,09		3	0

Tabelle 16: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus dem TOXAPREVENT®-Hautpuder beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
P. aeruginosa	1	0,06
	2	0,01
	3	0

Tabelle 17: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus den TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
S. aureus Stamm 1	1	0,07	*S. aureus* Stamm 2	1	0
	2	0,01		2	0,05
	3	0,05		3	0

Tabelle 18: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus den TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
C. albicans Stamm 1	1	0,06	*C. albicans* Stamm 2	1	0
	2	0,06		2	0
	3	0,04		3	0

Tabelle 19: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus den TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
P. aeruginosa	1	0
	2	0,01
	3	0,01

4 Diskussion

Die topische Anwendung von TOXAPREVENT®-Clinoptilolith führte in der Praxis zu dokumentierten Fällen verbesserter Wundheilung (Weber, unveröffentlichte Daten). Ziel dieser Arbeit war es zu untersuchen, ob diese Beobachtungen durch eine antimikrobielle Wirkung der Präparate erklärt werden können. Nach Inkubation verschiedener Testkeime mit TOXAPREVENT®, konnten zum Teil signifikante Unterschiede im Keimwachstum nachgewiesen werden.
Da die Unterschiede sehr gering waren – mit Ausnahme der Hautprodukte in ihrer Wirkung auf das Wachstum von *S. aureus* - erklären sie nur unzureichend die verbesserte Wundheilung, so dass zusätzlich auch andere Faktoren in Betracht gezogen werden müssen.
In der Industrie wird Clinoptilolith seit langem schon als Ionenaustauscher und Adsorbens verwendet. Zunehmend werden nun auch die Eigenschaften auf molekularer und zellulärer Ebene Gegenstand der Forschung.

4.1 Durch den Hersteller beschriebene Eigenschaften von TOXAPREVENT® SKIN Hautpuder

Laut Angaben des Herstellers, der FROXIMUN AG, werden die TOXAPREVENT® SKIN Produkte angewendet bei:

- Ulcus cruris und diabetischem Fußsyndrom
- Störungen des lymphatischen Systems
- Atopischen Ekzemen, Neurodermitis, Psoriasis, Akne, Schuppenflechte
- Traumata (Sonnenbrand, Verbrühungen, Verbrennungen bis Grad II, Hautabschürfungen und Insektenstiche)

Die Produkte dienen der Behandlung offener, nässender und geschlossener Wunden, kritischer Hauterkrankungen und tiefsitzender Verletzungen. Durch Histamin-Aufnahme wird die Wundheilung unterstützt, die Blutstillung wird durch den Austausch von im MANC® eingelagerten Calcium gegen Natrium gefördert. Darüber hinaus bindet TOXAPREVENT® SKIN Hautpuder entstehendes Exsudat.
In der sich hier anschließenden Diskussion wird sich sowohl kritisch mit den Ergebnissen dieser Dissertation als auch mit möglichen Erklärungsansätzen für die beobachtete Wundheilungsförderung auseinandergesetzt.

4.2 Mikrobiologische Testung des Vulkangesteins

Durch Vorarbeiten aus dem IMIKRO (Liesa Warning, unveröffentlichte Daten) war bereits vor Beginn dieser Dissertation bekannt, dass unterschiedliche Bacillus Spezies im Gestein nachgewiesen werden konnten. Darauf aufbauend wurden erneut Versuche durchgeführt, um die Keime zu identifizieren. Sowohl mittels 16 S rDNA Sequenzierung als auch Massenspektrometrie konnten die Keime nicht eindeutig identifiziert, sondern lediglich auf wenige Bacillus Spezies eingegrenzt werden.

Sacchi et al. beschrieben die Schwierigkeiten, *Bacillus* Spezies mittels 16 S rDNA auf Grund der Ähnlichkeiten in der Basenabfolge zu differenzieren (Sacchi et al. 2002). So konnte in einigen Proben nur *Bacillus* sp., *B. brevis* und *B. aryabhattai* nachgewiesen werden, während in den restlichen Proben gar nicht zwischen den *Bacillus* Spezies unterschieden werden konnte.

Die unterschiedlichen Ergebnisse in dieser Arbeit bei der Sequenzierung mittels 16S rDNA und Massenspektrometrie können durch die enge genetische Verwandtschaft und der hohen Übereinstimmung von Genabschnitten der Bacilli erklärt werden (Sacchi et al. 2002; Hakovirta et al. 2016).

4.3 Antibiotische Wirksamkeit

Referenzstämme von *S. aureus, P. aeruginosa* und *C. albicans* wurden ausgewählt, da sie für chronische Wundinfektionen relevant sind. Sie wurden angezüchtet und anschließend mit den TOXAPREVENT®-Produkten behandelt.

Laut Herstellerangaben der FROXIMUN AG hat TOXAPREVENT® keine antimikrobielle Wirkung. In dieser Arbeit wurde eine geringe Wirkung bei *S. aureus* nachgewiesen.

Von einer für eine Infektionstherapie relevanten antimikrobiellen Wirksamkeit kann ab einer Reduzierung der Keimmengen um 3 log-Stufen gesprochen werden (Gomes et al. 2012). Nach EN 12740:1999 liegt eine gute Desinfektionswirkung im Bereich einer Keimzahlreduktion um 5-, die Wirkung einer Sterilisation einschließlich Sporeninaktivierung bei mindestens 7 log-Stufen. Da die aufgezeigten Unterschiede zwischen den getesteten Produkten bzw. deren Chargen und den Wachstumskontrollen in allen Fällen mit maximal 0,23 LOG-Stufen vergleichsweise gering, sofern sie überhaupt erkennbar waren, sind die Ergebnisse nicht biologisch relevant und daher nicht interessant für die Anwendung als antimikrobieller Wirkstoff.

Dennoch wurde sowohl in der Hühnermast als auch bei der Aufzucht von Legehennen durch Zufüttern von Zeolith eine Reduktion mikrobiologischer Aktivität in Hähnchen beobachtet. Mallek et al. beschreiben eine signifikante Reduktion der gesamten Darmflora, welche entweder durch direkte bakterizide Effekte des Zeoliths oder indirekt durch den verminderten Flüssigkeitsgehalt der Exkremente verursacht werden könne (Mallek et al. 2012).
Clinoptilolith scheint darüber hinaus auch selektiv bestimmte Bakterien zu binden. In einer *in vitro* Studie mit Hähnchen nahm die Besiedlung mit *E. coli* und *Salmonella typhi* im Zökum ab, während die Menge an *Lactobacillus acidophilus* zunahm (Wu et al. 2013; Ricke et al. 1995). Prasai et al. beschrieben darüber hinaus die Fähigkeiten von Clinoptilolith sämtliche Enterobacteriaceae zu binden, darunter *Klebsiella, Enterobacter, Yersinia, Proteus, Shigella, Serratia und Citrobacter.* Auch eine Abnahme von *Campylobacter jejuni* wurde nachgewiesen (Prasai et al. 2017).

Uchida et al. gelang der Nachweis einer antimikrobiellen Wirksamkeit bei der Anwendung von Zeolith in Ballon-Harnblasenkathetern (Uchida et al. 1992). Es zeigte sich ein antibakterieller Effekt gegen *P. aeruginosa, S. aureus* und *E. coli in vitro*. Sie verwendeten ebenfalls Clinoptilolith, jedoch kein TOXAPREVENT®-Produkt, so dass keine direkten Vergleiche über die Eigenschaften des verwendeten Gesteins getroffen werden können.

4.3.1 Ultrafiltrat – Hemmwirkung

Grundlage der Versuche war die Annahme, dass entweder der Zeolith selbst oder im Gestein gebundene Substanzen oder Mikroorganismen antimikrobielle Wirkung haben.

4.3.1.1 Bacillus Spezies – Beeinflussung der Wundheilung

Die Gattung der Bacilli umfasst bisher 268 Spezies und 7 Subspezies. Die gram-positiven Keime sind in Paaren oder Ketten angeordnet und durch Sporenbildung gegenüber verschiedenen Umweltkonditionen resistent. Hämolyse auf Blutagarplatten wird bei einigen Spezies beobachtet. Es werden zwei Gruppen unterschieden, die *Bacillus cereus* Gruppe – mit *B. anthracis, B. cereus, B. mycoides, B. pseudomycoides, B. thuringiensis* und *B. weihenstephanensis* – und die *Bacillus subtilis* Gruppe.

Zwei Spezies aus der erstgenannten Gruppe sind medizinisch relevant; *B. anthracis* als Erreger des Milzbrandes und *B. cereus* als Auslöser einer Lebensmittelvergiftung sowie von Wundinfektionen (Public Health England 2018; Huang et al. 2016).

Eine der initialen Hypothesen für die verbesserte Wundheilung chronischer Wunden nach Behandlung mit TOXAPREVENT® war, dass im Material enthaltenen Keime antibiotische Eigenschaften aufweisen. Die Versuche in dieser Arbeit zeigten keine antimikrobielle Wirkung der Präparate. Eine andere Möglichkeit wäre, dass die im Material enthaltenen Keime Stoffe sezernieren, die die Wundheilung beeinflussen. Es gibt Studien, in denen Exopolysaccharide (EPS) einiger Bacillus Arten *in-vitro* anti-Tumor- und wundheilungsfördernde Aktivitäten zeigten (Insulkar et al. 2018; Paynich et al. 2017).
Unter der Bezeichnung Exopolysacchride werden zwei Typen von durch Bakterien sekretierte Polysaccharide zusammengefasst. Zum einen gibt es an die Zelloberfläche gebundene EPS (c-EPS) und zum anderen EPS, welche an das angrenzende Medium abgegeben werden (r-EPS). Sie bestehen aus Homo- oder Heteropolysacchariden und sind strukturell sehr unterschiedlich aufgebaut. Insbesondere die r-EPS sind Gegenstand der aktuellen Forschung als Adjuvans in Medikamenten und in Nahrungsergänzungsmitteln auf Grund ihrer antioxidanten- und antitumor-Effekten (Li et al. 2015; Nwodo et al. 2012; Zhang et al. 2013).

Die Ergebnisse von Liu et al. und Fang et al. zeigen, dass einige EPS starke Scavenger-Funktionen gegenüber Hydroxylradikalen besitzen und eventuell Verletzungen verhindern, die durch Superoxid-Radikale in pathologischen Konditionen ausgelöst werden (Liu et al. 2014; Fang et al. 2013).
EPS reduzieren zusätzlich die Konzentration von Eisenionen. Durch die Bildung von Eisen-Chelat-Komplexen verringert sich die Konzentration von freiem Eisen, welches unter anderem die Lipidperoxidation katalysiert (Osińska-Jaroszuk et al. 2018; Xu et al. 2012). Somit führt die Reduktion von Eisenionen über eine verminderte Lipidperoxidation zu einer verringerten Bildung freier Radikale. Somit wäre es denkbar, dass die in der Praxis beobachtete verbesserte Heilung chronischer Wunden durch eine antioxidative Wirkung der im Clinoptilolith enthaltenen Bacilli verursacht werden könnte. Erwartungsgemäß könne dies in *in vitro* Versuchen nicht nachgewiesen werden und es müssten sich somit klinische Studien anschließen.

4.3.2 Kontakthemmung

In den in der Praxis beobachteten Fällen (Weber, unveröffentlichte Daten) wurde TOXAPREVENT® direkt auf die Wunden gegeben. In dieser Arbeit wurde geprüft, ob das Produkt selbst Einfluss auf das Keimwachstum hat. In den hierzu durchgeführten *in vitro* Versuchen konnte keine antimikrobielle Wirkung auf das Keimwachstum nachgewiesen werden.

Eine verbesserte Wundheilung *in vivo* könnte auf die Eigenschaft von Clinoptilolith als Ionenaustauscher zurückzuführen sein. Clinoptilolith wird in der Industrie schon lange als Adsorbens verwendet und firmeninterne *in vitro* Versuche der FROXIMUN AG in Kooperation mit der Hochschule Anhalt im Fachbereich angewandte Biowissenschaften und Prozesstechnik anderen Prüflaboratorien gezeigt haben, dass MANC® ein Histamin-Adsorptionsvermögen von über 80% hat (unveröffentlichte Daten).

4.3.2.1 Histamin

Histamin – (2-(4-imidazolyl)ethylamine) – ist ein biogenes vasoaktives Amin aus der Aminosäure Histidin, welches unter anderem in Mastzellen und Granulozyten produziert, allerdings auch über die Nahrung aufgenommen wird. Histamin ist sowohl ein Neurotransmitter als auch ein Gewebshormon, reguliert die ZNS Aktivität und den Schlaf-Wach-Rhythmus, ist beteiligt an allergischen Reaktionen und der Magensäureproduktion (Greaves und Sabroe 1996; Gutowska-Owsiak et al. 2014). Der Abbau erfolgt durch die Diaminoxidase im Dünndarm (Riccardi et al. 2018) und die Histamin N-methyltransferase (HNMT) in Nieren, Leber, Darm, Prostata und Ovarien (Peters et al. 2009; Maintz und Novak 2007).

Eine vermehrte Histamin-Ausschüttung führt zu lokalen oder auch allgemeinen Hautsymptomen. Dies sind Juckreiz, Urtikaria, Hautrötung und Schwellung (Hansen Selnø et al. 2018).

Bei der Wundheilung spielt Histamin eine besondere Rolle - insbesondere auch bei chronischen Wunden - wobei dieser Einfluss in der Literatur kontrovers diskutiert wird. Während Numata et al. in ihrer Studie den positiven Einfluss Histamins auf die Wundheilung konstatieren (Numata et al. 2006), haben Branco et al. festgestellt, dass der Effekt von Histamin rezeptorabhängig ist und die Expression der 4 Rezeptortypen (H1R-H4R) u.a. von Alter und Geschlecht abhängt (Branco et al. 2018). So führt die Wahrnehmung von Histamin über H1R und H4R zu einer pro-

inflammatorischen Reaktion und mag somit zur Chronifizierung von Wunden beitragen, während die Bindung an H2R antagonistische Effekte hat und eher regulatorisch auf die Entzündung wirkt (van der Pouw Kraan, T. C. et al. 1998; MacGlashan 2003).

2-8% der Zellen der gesunden Epidermis sind Mastzellen. Sie werden durch Gewebedestruktion aktiviert und schütten unter anderem Histamin aus (Douaiher et al. 2014). Histamin bewirkt die Sekretion und damit das Einwandern von pro-inflammatorischen Zellen, die die Wundheilung unterstützen (Komi et al. 2019). Bei chronischen Wunden verhindert diese Exsudation jedoch die Heilung und erhöht das Risiko für Infektionen. Die vermehrte Einwanderung von Neutrophilen verursacht einen zusätzlichen Epithelschaden durch die Produktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) (Freitas et al. 2009). Während ROS ein wichtiger Mediator zur Elimination von eindringenden Mikroorgansimen ist, führt die Überproduktion zu einer chronischen Entzündung. Neben Hypoxie, wiederholtem Trauma, bakterieller Besiedlung und der Immunantwort entsteht ein Teufelskreis, der die Entzündung weiterhin unterhält (Číž und Lojek 2013). Die hohe Stoffwechselaktivität akuter Wunden bleibt bei chronischen aus. Das Gleichgewicht aus proinflammatorischen Zytokinen und deren Inhibitoren ist gestört und die Wunde heilt somit nicht. Exzessive Einwanderung Neutrophiler ist ein kritischer Punkt und Marker chronischer Wunden (Zhao et al. 2016).
Bakterielle Proteine können die Ausschüttung von Mediatoren (Histamin, PGD_2, TNF-α, Leukotriene) aus Mastzellen induzieren (Genovese et al. 2003).
Diegelmann und Evans konstatieren, dass eine sich selbst unterhaltende chronische Entzündung effektiv geheilt werden kann, wenn der primäre schädigende Faktor eliminiert wird (Diegelmann und Evans 2004; Goldman 2004). Somit wäre die Heilung chronischer Wunden durch die Bindung von Histamin denkbar. Da TOXAPREVENT® SKIN nachweislich *in vitro* über ein hohes Adsorptionsvermögen für Histamin verfügt, wäre die durch Dr. Weber beobachtete verbesserte Wundheilung unter TOXAPREVENT® Gabe insbesondere für chronische Wunden zu erklären. Weiterführende klinische Studien müssten sich hier anschließen, um nachzuweisen, dass eine Verringerung der Histaminkonzentration in der Wunde tatsächlich einen positiven Einfluss auf die Reepithelialisierung hat.

4.3.2.2 pH-Wert

Es wäre denkbar, dass die Zugabe von Clinoptilolith den pH-Wert im Medium verändert und somit das Wachstum der Keime hemmt. Suspendiert man Zeolith in reinem Wasser steigt der pH-Wert, da H^+-Ionen aufgenommen und dafür Na^+-Ionen abgegeben werden (Rivera et al. 2000). Veränderungen des pH-Wertes haben Einfluss auf die ATP-Synthese, RNA- und Proteinbiosynthese und die Membranfunktionen von Zellen (Heinrich et al. 2014).
Da in durchgeführten Versuchen keine pH-Messung vorgenommen wurde, lässt sich hierzu jedoch keine Aussage treffen.

4.3.2.3 Toxinbindung

Einige Studien beschreiben die Fähigkeit des Clinoptilolith Toxine zu binden (Branislava und Gordana 2004). Insbesondere Mycotoxine wie Aflatoxin B1 und G2, und Schwermetalle (Arsen, Blei, Quecksilber, Cadmium und Radionukliden) werden von Clinoptilolith adsorbiert (Branislava und Gordana 2004; Daković et al. 2005; Goodarzi und Modiri 2011). Auch *Cholera*- und *E. coli*-Enterotoxine werden vom Material aufgenommen (Ramu et al. 1997).
Moyes et al. identifizierten erstmals auch zytolytische Toxine bei *C. albicans*, welche die Epithelbarriere zerstören und eine Signalkaskade durch erhöhten Calcium-Einstrom in die Zelle auslösen (Moyes et al. 2016). Sie sind ursächlich für die Apoptose der Monozyten nach Phagozytose von *C. albicans* (Kasper et al. 2018). Diese „*Candidalysine*“ sind charakteristisch für die im Mausmodell pathogenen Candida Spezies. Somit wäre auch bei Wundinfektionen mit Hefen eine verbesserte Wundheilung durch Adsorption der Toxine mittels Clinoptilolith denkbar.
Generell könnte dieser Ansatz eine mögliche Erklärung für die verbesserte Wundheilung sein, da eine Toxinbindung keinen Einfluss auf das Wachstum von Bakterien oder Hefen hat und in den Versuchen zur antibiotischen Wirksamkeit nicht nachgewiesen werden konnte. Die Adsorption der in einer Wunde enthaltenden Keime oder deren Toxine könnte zu einer schnelleren Heilung beitragen, da die sezernierten Toxine durch Vasodilatation und Aktivierung von Mediatoren zu einem Erhalt der Infektion führen.

4.3.2.4 Adsorption von Co-Faktoren

Eine weitere Erklärung für die verbesserte Wundheilung wäre ein Entzug von Nährstoffen und Co-Faktoren mit daraus resultierender Wachstumshemmung der Keime. Eisen ist ein wichtiger Co-Faktor vieler enzymatischer Reaktionen und essentiell für die Zellteilung von Bakterien und Hefen (Wandersman und Delepelaire 2004). So stellt Eisen beispielsweise als Hauptbestandteil der Cytochrome bei der Zellatmung eine wichtige Komponente dar (Somerville und Proctor 2009) und ist somit für das Wachstum von *S. aureus* essentiell (Böllner 2015). Auch *P. aeruginosa* benötigt neben Stickstoff und Phosphat Eisen für die Zellteilung (Hammer und Skaar 2011).
TOXAPREVENT® bindet als Ionenaustauscher Eisen und Phosphat und könnte somit den Bakterien und Hefen die für die Zellteilung essentiellen Substrate entziehen.
Während mögliche Co-Faktoren des Bakterienstoffwechsels entzogen werden, adsorbiert Clinoptilolith jedoch keine Vitamine und Mineralstoffe, welche für die Wundheilung essentiell sind (Kraljević Pavelić et al. 2018).

4.3.2.5 Antioxidative Wirkung

Des Weiteren gibt es Studien, in denen nachgewiesen wurde, dass Clinoptilolith Scavenger-Funktionen gegenüber freien Radikalen besitzt. So wurde beispielsweise die antioxidative Wirkung von Clinoptilolith an Ratten nachgewiesen (Saribeyoglu et al. 2011).
Es wurde gezeigt, dass die Überproduktion Reaktiver Sauerstoffspezies (ROS) und freier Radikale eine wichtige Rolle bei der Gewebedestruktion und dem Funktionsverlust vieler Gewebe und Organe spielt (Li et al. 2014). ROS greifen auch Zellmembranen und DNA an und sind somit verantwortlich für die Entstehung von Krankheiten, wie Diabetes, Arteriosklerose, Krebserkrankungen und vorzeitige Hautalterung (Di et al. 2017; Govindan et al. 2016; Chen et al. 2012)
Unter den ROS sind die Hydroxyl-Radikale die reaktivsten. Das Superoxid-Radikal-Anion ist sehr toxisch, da es mit Makromolekülen reagieren und somit Gewebezerstörung auslösen kann (Xiao et al. 2019; Mao et al. 2013). Es entsteht in postischämischen Geweben, bei der mitochondrialen Atmungskette und bei der Reaktion mit Membran-Phospholipiden. Auch die Abbauprodukte verursachen oxidativen Stress in DNA, Proteinen und Lipiden (Liu et al. 2014), so dass es notwendig ist Möglichkeiten für die Elimination der ROS zu finden.

4.4 Immunmodulation

Mäuse und Hunde mit verschiedenen Tumorentitäten zeigten bei adjuvanter Behandlung mit Clinoptilolith eine Verbesserung des allgemeinen Gesundheitsstatus, der Lebenserwartung und sogar in einigen Fällen eine Verringerung der Tumorgröße und Anzahl von Metastasen im Vergleich zur Kontrollgruppe. *In vitro* Zellkultur-Studien zeigten eine vermehrte Expression bestimmter Tumorsuppressorgene und eine gehemmte Zellproliferation in verschiedenen Tumor-Zelllinien (Pavelic et al. 2001).
In einer weiteren Studie wurde die Wirkung von Clinoptilolith auf immunsupprimierte Patienten untersucht. Hierbei zeigte sich nach oraler Applikation für 6-8 Wochen eine vermehrte Zahl von B- und T-Lymphozyten sowie T-Helferzellen. Dabei wird darauf hingewiesen, dass oral applizierter Clinoptilolith nicht absorbiert wird und die Wirkung nicht durch eine biochemische Interaktion erklärt werden kann (Ivkovic et al. 2004). Als Erklärung bleibt nur eine durch Zeolith induzierte immunologische Reaktion.

4.5 Andere Tonerde-Präparate

Neben Clinoptilolith gibt es andere Zeolithe und Aluminiumsilikate, denen eine Wirkung auf den Organismus zugeschrieben werden kann.
Unter dem Begriff Tonerde fasst man allgemein Silikate aus Bentonit zusammen. Neben den Gerüstsilikaten Zeolith und Kaolinit ist auch das Schichtsilikat Smectit Bestandteil von Bentonit. Aus Montmorillonit – einer Unterklasse des Smectites – besteht die klassische Heilerde (Christidis 1998).
Montmorillonit wird eine Vielzahl positiver Eigenschaften, ähnlich dem des Zeoliths, zugeschrieben. Hierzu zählen neben der Funktion als Ionenaustauscher auch die Adsorption von Toxinen (Wang et al. 2019a, 2019b; Moosavi 2017). Sowohl Montmorillonit als auch Kaolinit zeigen eine antibakterielle Wirkung gegenüber *E. coli* (Schiffenbauer und Stotzky 1982). In Kombination mit Silberionen zeigt Montmorillonit zusätzlich eine bakterizide Wirkung auf ESBL, *S. typhimurium*, *P. aeruginosa* und einen kombiniert bakteriostatischen/bakteriziden Effekt gegen *S. aureus*, inklusive MRSA (Haydel et al. 2008) und fördert die Wundheilung, insbesondere von chronischen und infizierten Wunden (Sandri et al. 2014).
Wie die Zeolithe bewirkt auch Montmorillonit eine Immunmodulation und verstärkt die Immunantwort (Hoffeld 1983). Während Clinoptilolith und Montmorillonit kein

toxikologisches Potential besitzen, stehen einige Silikate, darunter Erionit aus der Gruppe der Zeolithe, im Verdacht Autoimmunerkrankungen und Mesotheliome zu verursachen (Auerbach et al. 2003). Ob und in wie fern sich die Wirkung von Clinoptilolith und Montmorillonit und anderen Alumosilikaten unterscheidet, lässt sich zu diesem Zeitpunkt nicht sagen. Vergleichende Studien stehen noch aus. Darüber hinaus ist die Wirkweise beider Silikate auf molekularer Ebene noch nicht hinreichend verstanden.

4.6 Ausblick

In den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte keine antimikrobielle Wirkung der TOXAPREVENT®-Produkte nachgewiesen werden, obwohl in der Praxis eine verbesserte Wundheilung zu beobachten war.
Es müssten weitere Untersuchungen folgen, um nachvollziehen zu können, wie es zu den Wundheilungsprozessen kommt. Dazu müsste sich eine klinische Studie anschließen, in der die Dauer der Reepithelialisierung gemessen wird.

5 Zusammenfassung

Chronische Wunden werden maßgeblich durch eine Besiedlung der Wundoberfläche mit Bakterien unterhalten. Ausgehend von dieser lokalen entzündungsstimulierenden Besiedlung kann es zu lokalen und systemischen Infektionen kommen. Hauptauslöser der lokalen Wundinfektionen sind Bakterien, wie *S. aureus* oder *P. aeruginosa*. Ein Großteil der involvierten Stämme beider Spezies besitzt Resistenzmechanismen gegenüber Antibiotika. So führen sie häufig zu schweren Infektionsverläufen mit längeren Krankenhausaufenthalten. Techniken zur Unterbindung solcher Infektionen umfassen neben der chirurgisch korrekten Wundpflege, inklusive der Anwendung topischer Antiseptika, den Einsatz von Antibiotika, sowie ggf. alternativer Methoden zum Wundmanagement.

In diesem Zusammenhang wurde in der praktischen Anwendung eine verbesserte Wundheilung durch die dermale Applikation von TOXAPREVENT®-Clinoptilolith beobachtet. Diese kann sowohl an der Resorptionsfähigkeit des Materials für die Wundheilung schädlich beeinflussende Substanzen als auch an einer antibiotischen Wirkung liegen. Letztere sollte in der vorliegenden Arbeit geprüft werden.

Dazu wurde zunächst das Clinoptilolith-Material auf seinen Keimgehalt mikrobiologisch untersucht. Es stellte sich heraus, dass die Keimbelastung durch einen bei der Verarbeitung des Produktes eingeführten Hitzeschrittes gering ist. Dennoch wurden verschiedene *Bacillus* Spezies nachgewiesen. In weiterführenden Versuchen wurde das antimikrobielle Potential dreier TOXAPREVENT®-Produkte (äußerlich zu applizierendes Pulver und Suspension, per os zu applizierende Kapsel) auf Testkeime der Spezies *S. aureus, P. aeruginosa* und *C. albicans* untersucht. Hierzu wurden die Testkeime zusammen mit wässrigen Überständen der Clinoptilolith-Präparate sowie mit Suspensionen der Präparate inkubiert und das Wachstum mit der Kontrolle verglichen. So sollte zwischen der Wirkung durch von den Präparaten ausgehenden löslichen antibakteriellen Substanzen und durch direkte Kontakte zwischen Substanzen und Bakterien unterschieden werden. Die Ergebnisse zeigen lediglich für wässrige Überstände bei *S. aureus* eine signifikante Reduktion der Vitalität. Da es sich jedoch um eine Reduktion < 1 log-Stufe handelte, wird die Keimzahlreduktion als nicht therapeutisch relevant erachtet.

In der Literatur wird für das Material eine antimikrobielle Wirkung *in vivo* beschrieben. Die meisten Studien untersuchten dabei die Wirkung von Clinoptilolith nach oraler Applikation. Dabei wurde in Tierversuchen eine Abnahme der gesamten Darmflora

beobachtet. Andere Studien belegen eine antimikrobielle Wirkung gegenüber *P. aeruginosa, S. aureus* und *E. coli.* Dies konnte in den durchgeführten *in vitro* Versuchen nicht bestätigt werden. Um zu untersuchen, ob Clinoptilolith eine potentielle adjuvante Behandlungsmethode für chronische Wunden darstellt und um die Wirkmechanismen besser zu verstehen, müssen klinische Studien durchgeführt werden.

6 Thesen

1. Clinoptilolith fördert die Wundheilung.

2. Clinoptilolith wird vom Körper nicht resorbiert und wirkt somit ausschließlich lokal.

3. Clinoptilolith könnte antibiotisch wirksam sein.

4. Clinoptilolith bindet Mikroorganismen.

5. Clinoptilolith ist ein Ionenaustauscher und bindet als solcher Histamin, Toxine und andere Zytokine und beeinflusst damit die Wundheilung.

6. Toxine beeinflussen die Wundheilung in ungünstiger Weise.

7. Clinoptilolith fördert die Blutgerinnung durch Austausch von Calcium.

8. Sowohl EPS der im Clinoptilolith enthaltenen Bacilli, als auch Clinoptilolith selbst haben starke Scavenger-Funktionen gegenüber freien Radikalen.

9. Tatsächlich enthält Clinoptilolith nur eine geringe Keimmenge der Bacilli.

10. Zumindest in den hier gewählten Versuchsanordnungen entfaltet nur der wässrige Überstand einer Clinoptilolith-Suspension eine geringe Wachstumshemmende Wirkung auf *S. aureus*-Stämme, nicht aber auf *P. aeruginosa* oder *C. albicans*.

11. Der direkte Kontakt zwischen Clinoptilolith-Partikeln und Test-Mikroorganismen führt in keinem Fall zu einem veränderten Wachstum.

12. Eine Unterstützung der Wundheilung durch Clinoptilolith-Präparate muss in klinischen Studien erst noch dokumentiert werden. Erst danach lohnen weitere Studien für den möglichen molekularen Hintergrund der Effekte.

7 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Nosokomiale Infektionen in Deutschland, Robert-Koch-Institut, Stand 2013.....5

Abbildung 2: Tubuläre Mikrostruktur von Clinoptilolith-Zeolith (Scholtes 2014).....7

Abbildung 3: Wachstumskurve *S. aureus* Stamm 1 (durchgezogene Linie) und Stamm 2 (gestrichelte Linie).....22

Abbildung 4: Wachstumskurve *P. aeruginosa*.....23

Abbildung 5: Wachstumskurve *C. albicans* Stamm 1.....23

Abbildung 6: Wachstumskurve *C. albicans* Stamm 2.....24

Abbildung 7: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *S. aureus* Stämmen und TOXAPREVENT®-Skin Produkten.....26

Abbildung 8: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *P. aeruginosa* und TOXAPREVENT®-Skin Produkten.....27

Abbildung 9: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *C. albicans* Stämmen und TOXAPREVENT®-Skin Produkten.....28

Abbildung 10: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit *S. aureus* Stämmen und TOXAPREVENT®-Skin Produkten.....30

Abbildung 11: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit *P. aeruginosa* und TOXAPREVENT®-Skin Produkten.....31

Abbildung 12: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit *C. albicans* Stämmen und TOXAPREVENT®-Skin Produkten.....32

Abbildung 13: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *S. aureus* Stämmen 1 und 2 und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln.....34

Abbildung 14: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *P. aeruginosa* und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln.....35

Abbildung 15: Ermittlung einer möglichen Ultrafiltrat Hemmwirkung – in Wachstumsversuchen mit *C. albicans* Stämmen 1 und 2 und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln.....36

Abbildung 16: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2 und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln.....37

Abbildung 17: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit *P. aeruginosa* und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln.....38

Abbildung 18: Ermittlung einer möglichen Kontakthemmung – in Wachstumsversuchen mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2 und dem Material aus den TOXAPREVENT®-Kapseln.....39

8 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: ESKAPE-Keime - (World Health Organisation 2017).....6

Tabelle 2: TOXAPREVENT® - Produkte.....11

Tabelle 3: Bakterien und Hefen.....11

Tabelle 4: Laborgeräte.....12

Tabelle 5: Software.....13

Tabelle 6: Verbrauchsmaterial.....13

Tabelle 7: Chemikalien, Reagenzien.....13

Tabelle 8: Keimgehalt des Clinoptilolithes.....21

Tabelle 9: Wachstumsrate und Verdopplungszeit.....24

Tabelle 10: Definition LOG-Reduktion.....40

Tabelle 11: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2.....40

Tabelle 12: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2.....40

Tabelle 13: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*.....40

Tabelle 14: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus dem TOXAPREVENT®-Hautpuder beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2.....41

Tabelle 15: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus dem TOXAPREVENT®-Hautpuder beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2.....41

Tabelle 16: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus dem TOXAPREVENT®-Hautpuder beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*.....41

Tabelle 17: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus den TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2.....41

Tabelle 18: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus den TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2.....42

Tabelle 19: LOG-Reduktion des Ultrafiltrats aus den TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*.....42

Tabelle 20: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2.....76

Tabelle 21: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2.....76

Tabelle 22: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*.....76

Tabelle 23: LOG-Reduktion des Materials des TOXAPREVENT®-Hautpuders beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2.....76

Tabelle 24: LOG-Reduktion des Materials des TOXAPREVENT®-Hautpuders beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2.....77

Tabelle 25: LOG-Reduktion des Materials des TOXAPREVENT®-Hautpuders beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*.....77

Tabelle 26: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2.....77

Tabelle 27: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2.....77

Tabelle 28: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*.....78

9 Abkürzungsverzeichnis

ATP	Adenosintriphosphat
B.	Bacillus
C. albicans	Candida albicans
CO_2	Kohlenstoffdioxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EHEC	Enterohämorrhagische Escherichia coli
EPS	Exopolysacharide
ESBL	Extended-Spectrum Beta-Lactamase
h	Stunde
H^+	Wasserstoff-Ion
HNMT	Histamin N-methyltransferase
H_2O	Wasser
HWI	Harnwegsinfekt
IMIKRO	Institut für Medizinische Mikrobiologie, Virologie und Hygiene
KBE	Koloniebildene Einheit
kg	Kilogramm
log	Logarithmus zur Basis 10
MALDI-TOF	Matrix-assisted laser desorption time-of-flight-Massenspektrometrie
MANC®	modified and activated natural clinoptilolite
MDR	Multiple Drug Resistance

MDT	Magen-Darm-Trakt
MHB	Müller-Hinton-Boullion
MRSA	Methicillin-resistenter Staphylococcus aureus
MHK	minimale Hemmkonzentration
Min	Minute
ml	Milliliter
N_2	Stickstoff
Na^+	Natrium-Ion
NaCl	Natriumchlorid
ns	nicht signifikant
O_2	Sauerstoff
OD	Optische Dichte
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PGD_2	Prostaglandin E2
P. aeruginosa	Pseudomonas aeruginosa
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
S. aureus	Staphylokokkus aureus
SAB	Sabouraud
sp.	species
spp.	species pluralis
S. typhimurium	Salmonella typhimurium
TNF-α	Tumornekrosefaktor Alpha

v.a.	vor allem
VRE	Vancomycin resistente-Enterokokken
WHO	World Health Organisation
ZNS	Zentralnervensystem
ÜNK	Übernachtkultur

10 Literaturverzeichnis

1 Altschul, S. F.; Gish, W.; Miller, W.; Myers, E. W.; Lipman, D. J. (1990): Basic local alignment search tool. In: *Journal of Molecular Biology* 215 (3), S. 403–410.

2 AMR Industrie Alliance (2018): TRACKING PROGRESS TO ADDRESS AMR. Online verfügbar unter https://www.amrindustryalliance.org/wp-content/uploads/2018/01/AMR_Industry_Alliance_Progress_Report_January 2018.pdf.

3 Aslam, Bilal; Wang, Wei; Arshad, Muhammad Imran; Khurshid, Mohsin; Muzammil, Saima; Rasool, Muhammad Hidayat et al. (2018): Antibiotic resistance: a rundown of a global crisis. In: *Infection and Drug Resistance* (11), S. 1645–1658.

4 Auerbach, Scott M.; Carrado, Kathleen A.; Dutta, Prabir K. (2003): Handbook of Zeolite Science And Technology. 1. Aufl. New York: CRC Press, Taylor & Francis Group.

5 Baker, Stephen J.; Payne, David J.; Rappuoli, Rino; Gregorio, Ennio de (2018): Technologies to address antimicrobial resistance. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115 (51), S. 12887–12895.

6 Binnewies, Michael; Finze, Maik; Jäckel, Manfred; Schmidt, Peer; Willner, Helge; Rayner-Canham, Geoff (2016): Allgemeine und Anorganische Chemie. 3. Aufl.: Springer Spektrum.

7 Böllner, Stefanie Bernadette (2015): Charakterisierung von Methicillin-resistenten Staphylococcus aureus (MRSA) Referenzstämmen hinsichtlich β-Laktam-Antibiotika Resistenz, Pathogenitätsfaktoren und Wachstum im Kollagengel. Dissertation. Technische Universität München, München. Fakultät Wissenschaftszentrum Weihenstephan für Ernährung, Landnutzung und Umwelt.

8 Branco, ACCC; Yoshikawa, F. S.Y.; Pietrobon, A. J.; Sato, M. N. (2018): Role of Histamine in Modulating the Immune Response and Inflammation. In: *Mediators of inflammation*.

9 Branislava, Slavata; Gordana, Vitorovic (2004): The efficiency of the radiocesium binders-AFCF and clinoptilolite in broiler chickens exposed to alimentary contamination with 137Cs. In: *Acta vet. (Beogr.)* 54 (5-6), S. 437–446.

10 Chen, Jingjing; Zhang, Tao; Jiang, Bo; Mu, Wanmeng; Miao, Ming (2012): Characterization and antioxidant activity of Ginkgo biloba exocarp polysaccharides. In: *Carbohydrate polymers* 87 (1), S. 40–45.

11 Christidis, George E. (1998): Comparative Study of the Mobility of Major and Trace Elements During Alteration of an Andesite and a Rhyolite to Bentonite, in the Islands of Milos and Kimolos, Aegean, Greece. In: *Clays and Clay Minerals* 46 (4), S. 379–399.

12 Číž, M.; Lojek, A. (2013): Modulation of neutrophil oxidative burst via histamine receptors. In: *British Journal of Pharmacology* 170 (1), S. 17–22.

13 Daković, Aleksandra; Tomasević-Canović, Magdalena; Dondur, Vera; Rottinghaus, George E.; Medaković, Vesna; Zarić, Snezana (2005): Adsorption of mycotoxins by organozeolites. In: *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces* 46 (1), S. 20–25.

14 Deutsche Gesellschaft für Kinderchirurgie (2016): S1-Leitlinie: Wunden und Wundbehandlung. Online verfügbar unter https://www.awmf.org/uploads/tx_szleitlinien/006-129l_S1_Wunden_Wundbehandlung_2016-06-verlaengert.pdf.

15 Di, Wei; Zhang, Lanwei; Wang, Shumei; Yi, Huaxi; Han, Xue; Fan, Rongbo; Zhang, Yingchun (2017): Physicochemical characterization and antitumour activity of exopolysaccharides produced by Lactobacillus casei SB27 from yak milk. In: *Carbohydrate polymers* 171, S. 307–315.

16 Diegelmann, Robert F.; Evans, Melissa C. (2004): Wound healing: an overview of acute, fibrotic and delayed healing. In: *Frontiers in Bioscience* 9 (1), S. 283–289.

17 Dissemond, J. (2014): Chronische Wunden und Bakterien. Klinische Bedeutung, Nachweis und Therapie. In: *Hautarzt* 65 (1), S. 10–14.

18 Dong, Yingbo; Lin, Hai; He, Yinhai (2017): Correlation between physicochemical properties of modified clinoptilolite and its performance in the removal of ammonia-nitrogen. In: *Environmental monitoring and assessment* 189 (3), S. 107.

19 Douaiher, Jeffrey; Succar, Julien; Lancerotto, Luca; Gurish, Michael F.; Orgill, Dennis P.; Hamilton, Matthew J. et al. (2014): Development of mast cells and importance of their tryptase and chymase serine proteases in inflammation and wound healing. In: *Advances in Immunology* 122, S. 211–252.

20 Fang, Yaowei; Liu, Shu; Lu, Mingsheng; Jiao, Yuliang; Wang, Shujun (2013): A novel method for promoting antioxidant exopolysaccharidess production of Bacillus licheniformis. In: *Carbohydrate polymers* 92 (2), S. 1172–1176.

21 Fischer, Markus (Hg.) (2014): Neue und alte Infektionskrankheiten. Unter Mitarbeit von Peter Heisig. Pharmazeutische Biologie und Mikrobiologie, Institut für Biochemie und Molekularbiologie, Universität Hamburg. 1. Aufl. Wiesbaden: Springer Spektrum.

22 Freissmuth, Michael; Offermanns, Stefan; Böhm, Stefan (2016): Pharmakologie und Toxikologie. Von den molekularen Grundlagen zur Pharmakotherapie. 2., aktualisierte und erweiterte Auflage. Heidelberg: Springer.

23 Freitas, Marisa; Lima, José L. F. C.; Fernandes, Eduarda (2009): Optical probes for detection and quantification of neutrophils' oxidative burst. A review. In: *Analytica Chimica Acta* 649 (1), S. 8–23.

24 FROXIMUN AG: Auszug aus der Praxisinformation für Fachkreise. Modul 5 - Einsatz von Toxaprevent Skin zur kutanen Anwendung.

25 Genovese, Arturo; Borgia, Guglielmo; Björck, Lars; Petraroli, Angelica; Paulis, Amato de; Piazza, Marcello; Marone, Gianni (2003): Immunoglobulin Superantigen Protein L Induces IL-4 and IL-13 Secretion from Human FcεRI+ Cells Through Interaction with the κ Light Chains of IgE. In: *The Journal of Immunology* 170 (4), S. 1854–1861.

26 Goldman, Robert (2004): Growth Factors and Chronic Wound Healing: Past, Present, and Future. In: *Advances in Skin & Wound Care* 17 (1), S. 24–35.

27 Gomes, Fernanda; Teixeira, Pilar; Ceri, Howard; Oliveira, Rosário (2012): Evaluation of antimicrobial activity of certain combinations of antibiotics against in vitro Staphylococcus epidermidis biofilms. In: *Indian J Med Res* 135 (4), S. 542–547.

28 Goodarzi, Majid; Modiri, Davood (2011): The Use Clinoptilolite in Broiler Diet to Decrease of Aflatoxin Effects. In: *International Conference on Asia Agriculture and Animal* 13.

29 Govindan, Sudha; Johnson, Elizabeth Elcy Rani; Christopher, Jabapramila; Shanmugam, Jayasakthi; Thirumalairaj, Vinothkumar; Gopalan, Jayanthi (2016): Antioxidant and anti-aging activities of polysaccharides from Calocybe indica var. APK2. In: *Experimental and Toxicologic Pathology* 68 (6), S. 329–334.

30 Greaves, Malcom W.; Sabroe, R. A. (1996): Histamine: The Quintessential Mediator. In: *The Journal of Dermatology* 23 (11), S. 735–740.

31 Gutowska-Owsiak, D.; Selvakumar, T. A.; Salimi, M.; Taylor, S.; Ogg, G. S. (2014): Histamine enhances keratinocyte-mediated resolution of inflammation by promoting wound healing and response to infection. In: *Clinical and experimental dermatology* 39 (2), S. 187–195.

32 Hakovirta, Janetta R.; Prezioso, Samantha; Hodge, David; Pillai, Segaran P.; Weigel, Linda M. (2016): Identification and Analysis of Informative Single Nucleotide Polymorphisms in 16S rRNA Gene Sequences of the Bacillus cereus Group. In: *Journal of clinical microbiology* 54 (11), S. 2749–2756.

33 Hammer, Neal D.; Skaar, Eric P. (2011): Molecular mechanisms of Staphylococcus aureus iron acquisition. In: *Annual Review of Microbiology*.

34 Hansen Selnø, Anette T.; Sumbayev, Vadim V.; Raap, Ulrike; Gibbs, Bernhard F. (2018): Role of Histamine in Inflammatory Diseases. In: Carlo Riccardi, Francesca Levi-Schaffer und Ekaterini Tiligada (Hg.): Immunopharmacology and Inflammation. Cham: Springer International Publishing, S. 85–106.

35 Haydel, Shelley E.; Remenih, Christine M.; Williams, Lynda B. (2008): Broad-spectrum in vitro antibacterial activities of clay minerals against antibiotic-susceptible and antibiotic-resistant bacterial pathogens. In: *J Antimicrob Chemother* 61 (2), S. 353–361.

36 Heinrich, Peter C.; Müller, Matthias; Graeve, Lutz (2014): Löffler/Petrides Biochemie und Pathobiochemie. 9. Aufl. Berlin, Heidelberg: Springer.

37 Heißmann, Nicole (2014): Was Zeolithe zur Entgiftung taugen. Teure Mineralien. Hg. v. Stern.de. Online verfügbar unter https://www.stern.de/gesundheit/teure-mineralien-was-zeolithe-zur-entgiftung-taugen-3409632.html.

38 Hof, Herbert; Dörries, Rüdiger (2017): Medizinische Mikrobiologie (Duale Reihe). 6. Aufl. Stuttgart: Thieme.

39 Hoffeld, J. Terrell (1983): Inhibition of lymphocyte proliferation and antibody production in vitro by silica, talc, bentonite or Corynebacterium parvum: involvement of peroxidative processes. In: *Eur. J. Immunol.* 13 (5), S. 364–369.

40 Huang, Chien-Hsun; Huang, Lina; Chang, Mu-Tzu; Chen, Kuo-Lung (2016): Establishment and application of an analytical in-house database (IHDB) for rapid discrimination of Bacillus subtilis group (BSG) using whole-cell MALDI-TOF MS technology. In: *Molecular and Cellular Probes* 30 (5), S. 312–319.

41 Huggett, S.; Hauber, H.-P.; Braun, J.; Kreft, I.; Stoehr, A.; Wulffen, H. von (2018): Antibiotika-Fibel 2018/19. Rationale Antibiotikatherapie. 5. Aufl. Berlin: Medizinisch Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft.

42 Insulkar, P.; Kerkar, S.; Lele SS. (2018): Purification and structural-functional characterization of an exopolysaccharide from Bacillus licheniformis PASS26 with in-vitro antitumor and wound healing activities. In: *International Journal of Biological Macromolecules* (120), S. 1441–1450.

43 Ivkovic, Slavko; Deutsch, Ulrich; Silberbach, Angelika; Walraph, Erwin; Mannel, Marcus (2004): Dietary supplementation with the tribomechanically activated zeolite clinoptilolite in immunodeficiency: Effects on the immune system. In: *Advances in therapy* 21 (2), S. 135–147.

44 Jabs, Wolfgang (2007): Allgemeine und Anorganische Chemie. Ein Leitfaden für Studierende der Biologie, Biochemie und Pharmazie. 1. Aufl.: Elsevier.

45 Kasper, L.; König, PA.; Gresnigt, MS., Westman, J.; Drummond, RA.; Lionakis, MS.; Groß, O. et al. (2018): The fungal peptide toxin Candidalysin activates the NLRP3 inflammasome and causes cytolysis in mononuclear phagocytes. In: *Nature Communications* 9 (1), S. 4260.

46 Kirchner, TH.; Müller-Hermelinl, H. K.; Roessner, A. (2018): Kurzlehrbuch Pathologie. 13. Aufl. München: Urban & Fischer/Elsevier.

47 Komi, Daniel Elieh Ali; Khomtchouk, Kelly; Santa Maria, Peter Luke (2019): A Review of the Contribution of Mast Cells in Wound Healing: Involved Molecular and Cellular Mechanisms. In: *Clinical Reviews in Allergy & Immunology*, S. 1–15.

48 Kraljević Pavelić, Sandra; Simović Medica, Jasmina; Gumbarević, Darko; Filošević, Ana; Pržulj, Nataša; Pavelić, Krešimir (2018): Critical Review on Zeolite Clinoptilolite Safety and Medical Applications in vivo. In: *Front Pharmacol* 9, S. 1350.

49 Krams, Matthias; Frahm, Sven Olaf; Kellner, Udo; Mawrin, Christian (2013): Kurzlehrbuch Pathologie. 2. Aufl. Stuttgart: Thieme.

50 Li, Wei; Ji, Juan; Chen, Xiaohong; Jiang, Mei; Rui, Xin; Dong, Mingsheng (2014): Structural elucidation and antioxidant activities of exopolysaccharides from Lactobacillus helveticus MB2-1. In: *Carbohydrate polymers* 102, S. 351–359.

51 Li, Wei; Xia, Xiudong; Tang, Weizhi; Ji, Juan; Rui, Xin; Chen, Xiaohong et al. (2015): Structural characterization and anticancer activity of cell-bound exopolysaccharide from Lactobacillus helveticus MB2-1. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 63 (13), S. 3454–3463.

52 Lippert, Hans (2011): Wundatlas. Wunde, Wundbehandlung und Wundheilung. Unter Mitarbeit von A. Kramer, S. Piatek, H.-U. Schulz, J. Tautenhahn und W. Wagemann. 1. Aufl. Heidelberg: J. A. Barth.

53 Liu, Yong; Du, Yi-Qun; Wang, Jun-Hui; Zha, Xue-Qiang; Zhang, Jian-Bo (2014): Structural analysis and antioxidant activities of polysaccharide isolated from Jinqian mushroom. In: *International Journal of Biological Macromolecules* 64, S. 63–68.

54 MacGlashan, Donald [Jr] (2003): Histamine: A mediator of inflammation. Anti-Allergic Properties of Antihistamines. In: *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 112 (4).

55 Maintz, Laura; Novak, Natalija (2007): Histamine and histamine intolerance. In: *The American Journal of Clinical Nutrition* 85 (5), S. 1185–1196.

56 Mallek, Zouhir; Fendri, Imen; Khannous, Lamia; Hassena, Amal Ben; Traore, Al Ibrahim; Ayadi, Mohamed-Ali; Gdoura, Radhouane (2012): Effect of zeolite (clinoptilolite) as feed additive in Tunisian broilers on the total flora, meat texture and the production of omega 3 polyunsaturated fatty acid. In: *Lipids in health and disease* 11 (35).

57 Mao, Duo-Bin; Shi, Chao-Wen; Wu, Jianyong; Xu, Chunping (2013): Optimization of exopolysaccharide production in submerged culture of Daedalea dickinsii and its antioxidant activity. In: *Bioprocess Biosyst Eng* 37.

58 Misaelides, Panagiotis (2011): Application of natural zeolites in environmental remediation: A short review. In: *Microporous and Mesoporous Materials* 144 (1), S. 15–18.

59 Moosavi, Maryam (2017): Bentonite Clay as a Natural Remedy: A Brief Review. In: *Iran J Public Health* 46 (9), S. 1176–1183.

60 Mortimer, Charles E.; Müller, Ulrich (2015): Chemie. Das Basiswissen der Chemie. Unter Mitarbeit von Johannes Beck. 12. Aufl.: Thieme.

61 Moyes, David L.; Wilson, Duncan; Richardson, Jonathan P.; Mogavero, Selene; Tang, Shirley X.; Wernecke, Julia et al. (2016): Candidalysin is a fungal peptide toxin critical for mucosal infection. In: *Nature* 532 (7597), S. 64–68.

62 Mulligan, C. N.; Yong, R. N.; Gibbs, B. F. (2001): Remediation technologies for metal-contaminated soils and groundwater: an evaluation. In: *Engineering Geology* 60 (1-4), S. 193–207.

63 Mutschler, Ernst; Geisslinger, Gerd; Menzel, Sabine; Ruth, Peter; Schmidtko, Achim (2017): Pharmakologie kompakt. Allgemeine und Klinische Pharmakologie, Toxikologie. 1. Aufl.: Wissenschaftliche Verlagsgesellschaft Stuttgart.

64 Nieslony, Sabine (2017): Codex Alimentarius: Antibiotikaresistenzen und mikrobiologische Risikoabschätzung in der Lebensmittelkette. Internationale Richtlinien und Verfahrenskodizes. 1. Auflage. Hamburg: Behr's Verlag (Codex Alimentarius).

65 Numata, Y.; Terui, T.; Okuyama, R.; Hirasawa, N.; Sugiura, Y.; Miyoshi, I. et al. (2006): The accelerating effect of histamine on the cutaneous wound-healing process through the action of basic fibroblast growth factor. In: *Journal of Investigative Dermatology* 126 (6), S. 1403–1409.

66 Nwodo, Uchechukwu U.; Green, Ezekiel; Okoh, Anthony I. (2012): Bacterial exopolysaccharides: functionality and prospects. In: *International Journal of Molecular Sciences* 13 (11), S. 14002–14015.

67 Osińska-Jaroszuk, Monika; Jaszek, Magdalena; Starosielec, Magdalena; Sulej, Justyna; Matuszewska, Anna; Janczarek, Monika et al. (2018): Bacterial exopolysaccharides as a modern biotechnological tool for modification of fungal laccase properties and metal ion binding. In: *Bioprocess Biosyst Eng* 41 (7), S. 973–989.

68 Ott, Dorothee (2003): Wundheilung unter der Lupe. In: *Pharmazeutische Zeitung - die Zeitschrift der Deutschen Apotheker* (20).

69 Pandova, Iveta; Panda, Anton; Valicek, Jan; Harnicarova, Marta; Kusnerova, Milena; Palkova, Zuzana (2018): Use of Sorption of Copper Cations by Clinoptilolite for Wastewater Treatment. In: *International journal of environmental research and public health* 15 (7).

70 Pape, Hans-Christian; Kurtz, Armin; Silbernagel, Stefan (2018): Physiologie. 8. Aufl. Stuttgart: Thieme.

71 Pavelic, K.; Hadzija, M.; Bedrica, L.; Pavelic, J.; Dikic, I.; Katic, M. et al. (2001): Natural zeolite clinoptilolite. New adjuvant in anticancer therapy. In: *Journal of molecular medicine (Berlin, Germany)* 78 (12), S. 708–720.

72 Paynich, Mallory L.; Jones-Burrage, Sara E.; Knight, Katherine L. (2017): Exopolysaccharide from Bacillus subtilis Induces Anti-Inflammatory M2 Macrophages That Prevent T Cell-Mediated Disease. In: *J Immunol* 198 (7), S. 2689–2698.

73 Peters, Lisa J.; Dvm; Kovacic, Jan P. (2009): Histamine: metabolism, physiology, and pathophysiology with applications in veterinary medicine. In: *Journal of Veterinary Emergency and Critical Care* 19 (4), S. 311–328.

74 Prasai, Tanka P.; Walsh, Kerry B.; Bhattarai, Surya P.; Midmore, David J.; Van, Thi T. H.; Moore, Robert J.; Stanley, Dragana (2017): Zeolite food supplementation reduces abundance of enterobacteria. In: *Microbiological research* 195, S. 24–30.

75 Public Health England (Hg.) (2018): UK Standards for Microbiology Investigations. Identification of Bacillius species.

76 Ramu, J.; Clark, K.; Woode, G. N.; Sarr, A. B.; Phillips, Timothy (1997): Adsorption of Cholera and Heat-Labile Escherichia coli Enterotoxins by Various Adsorbents: an In Vitro Study. In: *Journal of Food Protection*® 60, S. 358–362.

77 Renwick, Matthew J.; Simpkin, Victoria; Mossialos, Elias (2016): Targeting innovation in antibiotic drug discovery and development. The need for a One Health – One Europe – One World Framework. In: *Health Policy Series* (45).

78 Riccardi, C.; Levi-Schaffer, F.; Tiligada, E. (Hg.) (2018): Immunopharmacology and Inflammation. Unter Mitarbeit von A. T. Hansen Selnø, V. V. Sumbayev, U. Raap und B. F. Gibbs: Springer.

79 Ricke, S. C.; Pillai, S. D.; Widmer, K. W.; Ha, S. D. (1995): Survival of Salmonella typhimurium in soil and liquid microcosms amended with clinoptilolite compounds. In: *Bioresource Technology* 53 (1), S. 1–6.

80 Rivera, A.; Rodríguez-Fuentes, G.; Altshuler, E. (2000): Time evolution of a natural clinoptilolite in aqueous medium: conductivity and pH experiments. In: *Microporous and Mesoporous Materials* 40 (1), S. 173–179.

81 Sacchi, Claudio T.; Whitney, Anne M.; Mayer, Leonard W.; Morey, Roger; Steigerwalt, Arnold; Boras, Arijana et al. (2002): Sequencing of 16S rRNA gene: a rapid tool for identification of Bacillus anthracis. In: *Emerging infectious diseases* 8 (10), S. 1117–1123.

82 Sandri, Giuseppina; Bonferoni, Maria Cristina; Ferrari, Franca; Rossi, Silvia; Aguzzi, Carola; Mori, Michela et al. (2014): Montmorillonite–chitosan–silver sulfadiazine nanocomposites for topical treatment of chronic skin lesions: In vitro biocompatibility, antibacterial efficacy and gap closure cell motility properties. In: *Carbohydrate polymers* 102, S. 970–977.

83 Saribeyoglu, Kaya; Aytac, Erman; Pekmezci, Salih; Saygili, Seha; Uzun, Hafize; Ozbay, Gulsen et al. (2011): Effects of clinoptilolite treatment on oxidative stress after partial hepatectomy in rats. In: *Asian Journal of Surgery* 34 (4), S. 153–157.

84 Schiffenbauer, M.; Stotzky, G. (1982): Adsorption of coliphages T1 and T7 to clay minerals. In: *Appl Environ Microbiol* 43 (3), S. 590–596.

85 Scholtes, Christoph (2014): Zeolith - Von der Entgiftung bis zum Feng Shui. In: *Akupunktur & Aurikulomedizin* (Vol. 40), S. 30–35.

86 Somerville, Greg A.; Proctor, Richard A. (2009): At the Crossroads of Bacterial Metabolism and Virulence Factor Synthesis in Staphylococci. In: *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 73 (2), S. 233–248.

87 Suerbaum, Sebastian; Burchard, Gerd-Dieter; Kaufmann, Stefan H. E.; Schulz, Thomas F. (2016): Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. 8. Aufl.: Springer.

88 Thomas, John Meurig; Raja, Robert (2007): Designed open-structure heterogeneous catalysts for the synthesis of fine chemicals and pharmaceuticals. In: Ruren Xu, Jiesheng Chen, Zi Gao und Wenfu Yan (Hg.): From zeolites to porous MOF materials-the 40th Anniversary of International Zeolite Conference. Proceedings of the 15th International Zeolite Conference, Beijing, P.R. China, 12-17th August 2007, Bd. 170. S.l.: Elsevier Science (Studies in Surface Science and Catalysis, 170), S. 19–40.

89 Track, Thomas; Kreysa, Gerhard (2003): Spurenstoffe in Gewässern. Pharmazeutische Reststoffe und endokrin wirksame Substanzen. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co.

90 Uchida, T.; Maru, N.; Furuhata, M.; Fujino, A.; Muramoto, S.; Ishibashi, A. et al. (1992): Anti-bacterial zeolite balloon catheter and its potential for urinary tract infection control. In: *Hinyokika Kiyo* 38 (8), S. 973–978.

91 UN Interagency Coordination Group on AMR (IACG) (2019): No Time to Wait: Securing the future from drug-resistant infections. Report to the Secretary-General of the United Nations. Hg. v. WHO.

92 van der Pouw Kraan, T. C.; Snijders, A.; Boeije, L. C., de Groot, E. R.; Alewijnse, A. E., Leurs,R.; Aarden, L. A. (1998): Histamine inhibits the production of interleukin-12 through interaction with H2 receptors. In: *The Journal of Clinical Investigation* 102 (10), S. 1866–1873.

93 vfa. Die forschenden Pharmaunternehmen (2018): Neue Antibiotika: Den Vorsprung gegenüber resistenten Bakterien wahren.

94 Vincent, Jean-Louis; Rello, Jordi; Marshall, John; Silva, Eliezer; Anzueto, Antonio; Martin, Claude D. et al. (2009): International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units. In: *JAMA* 302 (21), S. 2323–2329.

95 Vogt, Peter M. (2011): Praxis der Plastischen Chirurgie. Berlin-Heildelberg: Springer. Online verfügbar unter https://link.springer.com/content/pdf/10.1007%2F978-3-540-37573-9.pdf.

96 Wandersman, Cécile; Delepelaire, Philippe (2004): Bacterial Iron Sources: From Siderophores to Hemophores. In: *Annual Review of Microbiology* 58, S. 611–647,

97 Wang, Meichen; Hearon, Sara E.; Phillips, Timothy D. (2019a): A high capacity bentonite clay for the sorption of aflatoxins. In: *Food Additives & Contaminants: Part A*, S. 1–10.

98 Wang, Meichen; Hearon, Sara E.; Phillips, Timothy D. (2019b): Development of enterosorbents that can be added to food and water to reduce toxin exposures during disasters. In: *J Environ Sci Health B* 54 (6), S. 514–524.

99 Weber: unveröffentlichte Daten

100 World Health Organisation (2017): WHO publishes list of bacteria for which new antibiotics are urgently needed. Online verfügbar unter https://www.who.int/news-room/detail/27-02-2017-who-publishes-list-of-bacteria-for-which-new-antibiotics-are-urgently-needed, zuletzt aktualisiert am 27.02.2017.

101 World Health Organization Regional Office for Europe: About AMR [Internet]. Online verfügbar unter http://www.euro.who.int/en/health-topics/disease-prevention/antimicrobial-resistance/about-amr.

102 Wu, Q. J.; Wang, L. C.; Zhou, Y. M.; Zhang, J. F.; Wang, T. (2013): Effects of clinoptilolite and modified clinoptilolite on the growth performance, intestinal microflora, and gut parameters of broilers. In: *Poultry science* 92 (3), S. 684–692.

103 Xiao, Luyao; Han, Shuo; Zhou, Jianzhong; Xu, Qian; Dong, Mingsheng; Fan, Xia et al. (2019): Preparation, characterization and antioxidant activities of derivatives of exopolysaccharide from Lactobacillus helveticus MB2-1. In: *International Journal of Biological Macromolecules*.

104 Xu, Renjie; Ye, Hong; Sun, Yi; Tu, Youying; Zeng, Xiaoxiong (2012): Preparation, preliminary characterization, antioxidant, hepatoprotective and antitumor activities of polysaccharides from the flower of tea plant (Camellia sinensis). In: *Food and Chemical Toxicology* 50 (7), S. 2473–2480.

105 Zhang, Shenshen; Nie, Shaoping; Huang, Danfei; Huang, Jianqin; Wang, Yawei; Xie, Mingyong (2013): Polysaccharide from Ganoderma atrum Evokes Antitumor Activity via Toll-like Receptor 4-Mediated NF-κB and Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling Pathways. In: *Journal of agricultural and food chemistry* 61 (15), S. 3676–3682.

106 Zhao, Ruilong; Liang, Helena; Clarke, Elizabeth; Jackson, Christopher; Xue, Meilang (2016): Inflammation in Chronic Wounds. In: *International Journal of Molecular Sciences* 17 (12).

11 Danksagung

An erster Stelle möchte ich mich bei meiner Betreuerin Nadja Patenge bedanken, die mich vom ersten Tag an unterstützt und mir Mut gemacht hat. Nie werde ich den Tag bei Dr. Weber vergessen, an dem wir uns das erste Mal begegnet sind.

Ich danke Professor Podbielski, der mir die Durchführung meiner Dissertation am IMIKRO ermöglicht hat. Ebenso großer Dank geht an Dr. Weber und an die FROXIMUN AG, die mich mit solcher Herzlichkeit empfangen haben.

Zum Abschluss danke ich meiner Familie und allen, die an mich geglaubt und mich auf meinem Weg begleitet haben.

12 Appendix

Tabelle 20: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
S. aureus Stamm 1	1	0	*S. aureus* Stamm 2	1	0,04
	2	0		2	0,05
	3	0		3	0,01

Tabelle 21: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
C. albicans Stamm 1	1	0,01	*C. albicans* Stamm 2	1	0,13
	2	0,02		2	0,07
	3	0		3	0,14

Tabelle 22: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Suspension beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
P. aeruginosa	1	0,01
	2	0
	3	0

Tabelle 23: LOG-Reduktion des Materials des TOXAPREVENT®-Hautpuders beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
S. aureus Stamm 1	1	0	*S. aureus* Stamm 2	1	0,02
	2	0		2	0,02
	3	0,05		3	0,01

Tabelle 24: LOG-Reduktion des Materials des TOXAPREVENT®-Hautpuders beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
C. albicans Stamm 1	1	0,04	*C. albicans* Stamm 2	1	0,13
	2	0,03		2	0,13
	3	0,03		3	0,11

Tabelle 25: LOG-Reduktion des Materials des TOXAPREVENT®-Hautpuders beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
P. aeruginosa	1	0
	2	0,02
	3	0

Tabelle 26: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit den *S. aureus* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
S. aureus Stamm 1	1	0,02	*S. aureus* Stamm 2	1	0,03
	2	0		2	0
	3	0		3	0,04

Tabelle 27: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit den *C. albicans* Stämmen 1 und 2

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion	Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
C. albicans Stamm 1	1	0	*C. albicans* Stamm 2	1	0
	2	0,01		2	0,02
	3	0,01		3	0

Tabelle 28: LOG-Reduktion des Materials der TOXAPREVENT®-Kapseln beim Wachstumsversuch mit *P. aeruginosa*

Teststamm	LOT	LOG-Reduktion
P. aeruginosa	1	0
	2	0
	3	0

13 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation eigenständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe. Die wörtlichen als auch inhaltlichen verwendeten Quellen wurden von mir als solche gekennzeichnet. Die Dissertation wurde bisher weder im Ausland noch im Inland in gleicher oder ähnlicher Form einer Prüfungsbehörde vorgelegt.

Rostock, den 07.07.2020

Judith Hüttner

14 Lebenslauf

Persönliche Daten	
Name	Judith Hüttner
Geburtsdatum	29.10.1986
Geburtsort	Berlin – Wilmersdorf
Berufserfahrung	
seit 01.03.2020	Assistenzärztin, Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie und Intensivtherapie, Universitätsmedizin Rostock, Chefarzt Prof. Reuter
04/2019 – 02/2020	Ärztin bei Plasma Service Europe GmbH, Rostock
2009 – 2012	Abgeschlossene Berufsausbildung zur Gesundheits- und Kinderkrankenpflegerin
Hochschulausbildung	
2012 - 2018	Studium der Humanmedizin an der Universität Rostock
Schulausbildung	
1993 - 2006	Grundschule und Gymnasium in Berlin
Auslandsaufenthalt	
2006 - 2008	Au Pair in Boston, MA, USA