FILK Freiberg Institute

MIKRO- UND NANOPARTIKEL AUS MARINEN ORGANISMEN (MARESOME®) IN KOLLAGEN-WUNDAUFLAGEN ZUR VERHINDERUNG DER KOLONISATION MULTIRESISTENTER ERREGER (NANOMAR) TEILPROJEKT: IMPLEMENTIERUNG VON ANTIMIKROBIELL WIRKSAMEN MARESOMEN IN EINE KOLLAGENMATRIX

BMBF 13N13604 | Laufzeit: 05.2015 – 10.2018 | Michaela Schröpfer, Michael Meyer, FILK Freiberg

Categories: **Biomaterials**, **Collagen**

Forschungsstellen: 1 – Axel Kob (MBP Neustadt-Glewe), 2 – Michaela Schröpfer (FILK Freiberg), 3 – Gerold Lukowski (IMaB Greifswald), 4 – Sebastian Lippemeier (BlueBioTech Büsum), 5 – Volker Heitland (artefactum Rudolstadt). Inhalt dieses Berichtes sind nur die Ergebnisse der Forschungsstelle 2.

AUSGANGSSITUATION

Kollagen spielt eine besondere Rolle bei der Wundheilung. Das am häufigsten eingesetzte fibrilläre Typ I-Kollagen ist wegen seiner Biodegradibilität, geringer Immunogenität und Antigenizität prädestiniert als hervorragendes Biomaterial. Darüber hinaus interagiert Kollagen mit Biomolekülen, vermittelt eine sequenzspezifische Zellanhaftung, beeinflusst zelluläre Funktionen und unterstützt die Hämostase. Kollagen kann außerdem schädliche Proteasen, die zur Zerstörung von Gewebe führen, auffangen. Chronisch infizierte Wunden bleiben auch beim Einsatz von Kollagenwundauflagen problematisch. Durch die Einschränkung des Antibiotikaeinsatzes aufgrund von Resistenzen und Zytotoxizitäten beim Einsatz von Silber sind alternative Materialien dringend erforderlich. Neuartige Mikro- und Nanopartikel aus mikroverkapselten bioaktiven Algenextrakten (Maresome®) zeigten in ersten Studien (Lukowski u. a. 2008) hervorragende antimikrobielle Wirksamkeit gegen multiresistente Bakterien.

ZIELSTELLUNG

Ziel des Verbundvorhabens war die Entwicklung einer Wundauflage aus Kollagen und antibiotisch wirksamen mikroverkapselten Wirkstoffen aus biotechnologisch hergestellten Algen (Maresome®).

Abb. 1: Produktion von Algen im Gewächshaus unter stationären Bedingungen in Matratzen

Abb. 2: Produktion von Algen im Gewächshaus unter dynamischen Bedingungen in einer Schlauchanlage

LÖSUNGSWEG

- Algenscreening (ImaB)
- Biotechnologische Produktion der Algen mit verschiedenen Aufskalierungsschritten (BlueBioTech GmbH)
- Extraktion, Aufschluss und Mikroverkapselung der Wirkstoffe (artefactum GmbH)
- Entwicklung von Kollagensuspensionen aus porcinem Hautmaterial (FILK)
- Produktion von Kollagensuspensionen (mbp GmbH)
- Vermischung von Kollagensuspension mit Maresomen
- Herstellung von Kollagen-Maresome-Schwämmen durch Gefriertrocknung (FILK, mbp)
- Prüfung auf antibakterielle Aktivität (ImaB, FILK, mbp)
- Suche nach Wirkstoffen, Untersuchung des Freisetzungsverhaltens (FILK)

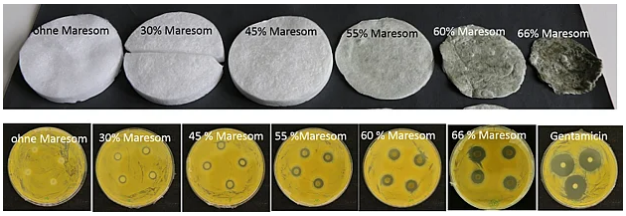

Abb. 3: Kollagenschwämme mit unterschiedlichen Gehalten an Maresomen (oben) Hemmhöfe der Kollagenschwämme mit unterschiedlichen Gehalten an Mareso men nach Agardiffusionstest Staphylococcus aureus ATC 6538 nach DIN 58940 (unten)

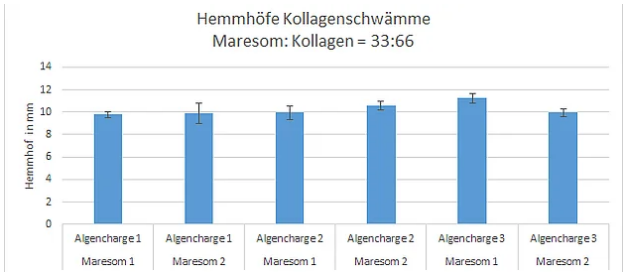

Abb. 4: Hemmhöfe von Kollagen-Maresome-Schwämmen über unterschiedliche Produktionschargen von Algen, Maresomen und Kollagen-Maresome-Schwämmen. Maresome-Gehalt 45 %

ERGEBNISSE

Am ImaB wurden verschiedene Algen im Labormaßstab gezüchtet, extrahiert, mikroverkapselt und auf antimikrobielle Wirksamkeit getestet. Die Alge mit der höchsten Wirksamkeit (Anabeana cylindrica) wurden bei Projektpartner BlueBioTech im Technikumsmaßstab kultiviert. In weiteren Schritten wurde die Algenzüchtung sowie Techniken zur Ernte und Anreicherung der Biomasse weiter aufskaliert (Abb. 1 + 2). Beim Pro-

jektpartner artefactum wurden die Algen aufgeschlossen, extrahiert und mikroverkapselt. Variationsparameter waren dabei Extraktionsmittel, Mengenverhältnisse und Verarbeitungszeiten. Die Mikroverkapselung dient zum einen der Stabilisierung der Wirkstoffe zum anderen wird die Wirkung erst durch die Mikroverkapselung initiiert. Der genaue Wirkmechanismus ist unbekannt. Am FILK wurde die Technologie zur Herstellung von Kollagensuspensionen optimiert. Die Herstellung der Suspensionen in vergrößertem Maßstab übernahm der Projektpartner mbp. Aus diesen Kollagensuspensionen und den Maresomen wurden Mischungen hergestellt. Die Mischungsverhältnisse wurden systematisch variiert, um eine gute antmikrobielle Aktivität zu gewährleisten ohne die wundheilungsfördernden Eigenschaften des Kollagens negativ zu beeinflussen. Die Verarbeitung der Mischungen zu Schwämmen wurde mittels Gefriertrocknung realisiert. Bei ImaB erfolgte die Prüfung der antimikrobiellen Aktivität mittels eines Agardiffusionstest mit Staphylococcus aureus (Norddt. Stamm, Methicillin-resistent). Am FILK wurde der Agardiffusionstest mit Staphylococcus aureus ATC 6538 nach DIN 58940 etabliert.

Die Kollagen-Maresome-Schwämme zeigten ebenso eine antimikrobielle Aktivität (Abb. 3) wie die Maresome selbst. Es wurde eine maximale Menge Maresome festgelegt, die im Kollagenschwamm enthalten sein kann, oberhalb derer die Schwammeigenschaften verloren gehen. Zur Identifizierung der antimikrobiell wirksamen Substanzen wurde anhand von Literaturhinweisen (Desbois und Smith 2010), (Kelsey u. a. 2006) (Lukowski u. a. 2008) nach freien Fettsäuren insbesondere nach ungesättigten freien Fettsäuren gesucht. Es wurden Methoden zur Extraktion der Fettsäuren aus den Kollagen-Maresome-Schwämmen und deren Identifizierung und Quantifizierung mittels HPLC entwickelt. Es konnte jedoch keine Korrelation zwischen dem Gehalt an ungesättigten Fettsäuren und der antimikrobiellen Wirkung festgestellt werden. Mit steigender Maresome-Konzentration im Schwamm steigt zwar die extrahierte Menge an gesättigten Fettsäuren parallel mit der Vergrößerung der Hemmhöfe, es konnte aber nicht geklärt werden, ob die Freisetzung von gesättigten Fettsäuren ursächlich mit der antibiotischen Wirkung zusammenhängt.

Die Reproduzierbarkeit der Hemmhöfe der Kollagen-Maresome-Schwämme im Agardiffusionstest zwischen den Aufskalierungsschritten und unterschiedlichen Produktionschargen von Algen, Maresomen und Kollagen-Maresome-Schwämmen zeigt Abb. 4. Der Mittelwert und die Streuung der Hemmhöfe über alle Produktionsprozesse und Chargen beträgt bei einem maximal möglichen Anteil von 45 % Maresomen 10,1 mm ± 0,75 mm. Durch Kombination aus mikroverkapselten Wirkstoffen aus Algen und Kollagen konnte eine gegen eine Antibiotika-resistente Bakterienart wirkende neuartige Wundauflage entwickelt werden.

Referenzen:

- Desbois, Andrew P., und Valerie J. Smith. 2010. „Antibacterial free fatty acids: activities, mechanisms of action and biotechnological potential“. Applied microbiology and biotechnology 85 (6): 1629–42.
- Kelsey, J., K. Bayles, B. Shafii, und M. McGuire. 2006. „Fatty acids and monoacylglycerols inhibit growth of Staphylococcus aureus“. Lipids 41 (10): 951–61.
- Lukowski, G., U. Lindequist, S. Mundt, A. Kramer, und W.-D. Jülich. 2008. „Inhibition of dermal MRSA colonization by microalgal micro-and nanoparticles“. Skin pharmacology and physiology 21 (2): 98–105.

Bericht anfragen

DANKSAGUNG

Das diesem Bericht zugrundeliegende Vorhaben wurde mit Mitteln des Bundesministeriums für Bildung und Forschung unter dem Förderkennzeichen 13N13604 gefördert. Die Verantwortung für den Inhalt dieser Veröffentlichung liegt beim Autor. Wir bedanken uns für die gewährte Unterstützung.