

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Beschleunigung der Thrombogenese nach thermischer Präkonditionierung
durch Steigerung der Expression des von Willebrand-Faktors

DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnheilkunde
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2005

vorgelegt von

Dr. med. Alexander Stamm
geboren am 13.01.70 in Dillingen/Saar

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1	ZUSAMMENFASSUNG 4
2	SUMMARY 6
3	EINLEITUNG 8
3.1.	Osteomyokutane Lappen 8
3.2.	Thrombogenese 10
3.3.	Präkonditionierung 13
3.4.	Fragestellung 15
4	MATERIAL UND METHODE 16
4.1.	Tiere 16
4.2.	Stresskonditionierung 16
4.2.1.	Hitzeschock 16
4.2.2.	Kälteschock 16
4.2.3.	Blockierung der Hitzeschockproteine mit Zinnprotoporphyrin IX 17
4.3.	Präparation 17
4.3.1.	Vorbereitung 17
4.3.2.	Lappenhebung 18
4.3.3.	Auslagerung zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie 20
4.3.4.	Lichtinduzierte Thrombogenese 21
4.4.	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie 22
4.4.1.	Equipment 22
4.4.2.	Aufnahmetechnik 23
4.5.	Histologie 23
4.5.1.	Immunhistochemie 24
4.5.2.	Elektronenmikroskopie 26
4.6.	Studiendesign 27
4.7.	Auswertung 30
4.7.1.	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie 30
4.7.2.	Immunhistochemie 31
4.8.	Statistik 31

5	ERGEBNISSE	32
5.1.	Systemische Parameter	32
5.2.	Mikrozirkulatorische Parameter vor Thromboseinduktion	32
5.3.	Einfluß von Stresskonditionierung auf die Thrombogenese	40
5.4.	Zeitverlauf der Hitzeschockantwort	43
5.5.	Einfluß von Antioxidantien auf die lichtinduzierte Thrombogenese	45
5.6	Immunhistochemie	48
5.7.	Elektronenmikroskopie	54
6	DISKUSSION	56
6.1.	Modell	56
6.2.	Thrombogenese nach Stresskonditionierung	57
7	LITERATURVERZEICHNIS	64
8	DANK	79
9	LEBENS LAUF	80

1. ZUSAMMENFASSUNG

Beschleunigung der Thrombogenese nach thermischer Präkonditionierung durch Steigerung der Expression des von Willebrand-Faktors.

Osteomyokutane Lappen bestehen aus muskulären, kutanen und knöchernen Anteilen. Klinische Anwendung finden sie vor allem bei großen Gewebedefekten infolge von Fehlbildungen, Verletzungen oder Tumorsektionen. Derartige Lappen sind durch eine Minderperfusion und eine über freie Sauerstoffradikale vermittelte Endothelzellschädigung gefährdet. Sowohl eine Minderperfusion als auch eine Endothelzellschädigung können das Gerinnungssystem aktivieren und damit die Entstehung von Thromben in der Mikrozirkulation auslösen. Seit kurzem ist bekannt, dass Stresskonditionierung die Expression des antioxidativ und vasodilatativ wirksamen Hitzschockproteins 32 induziert.

Daher ist das Ziel der vorliegenden Studie, ein geeignetes Modell zur lichtinduzierten Thrombogenese in Mehrgewebelappen an der Ratte zu etablieren, die Auswirkung einer Stresskonditionierung in Form von Hitze- und Kälteschock auf die Thrombogenese in Mehrgewebelappen zu untersuchen und die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu ermitteln.

Osteomyokutane Lappen wurden am Hinterlauf von Sprague-Dawley-Ratten gehoben. Für die Thrombogenese wurden die einzelnen Gewebe der osteomyokutanen Lappen nach Injektion des an Dextran gekoppelten Fluoreszenzfarbstoffes Fluorescein Isothiocyanat (5% FITC-Dextran, 0,5 ml/ 100g Körpergewicht, MW 150.000, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) kontinuierlich Licht exponiert (100W HG-Dampflampe; Wellenlänge 450-490 nm).

Die Tiere wurden auf insgesamt 7 Gruppen verteilt. Neben der kontinuierlichen Aufzeichnung von Herzfrequenz und Blutdruck wurden intravitalmikroskopisch die Parameter erste Plättchenanlagerung im Gefäß, 50%iger Gefäßverschluß und vollständiger Gefäßverschluß sowie der jeweilige Gefäßdurchmesser, die Blutflussgeschwindigkeit, der Blutfluß und die Wandscherrate bestimmt. Die Bestimmung der mikroirukulatorischen Parameter erfolgte mittels Video-Analyse und Computer assistiertem Bild-Analyse-System.

Signifikante Abweichungen im Vergleich des Hitzeschock- und Kälteschock-Kollektives mit dem Kontrollkollektiv zeigten die Zeitpunkte der ersten Plättchenanlagerung, des 50%igen Gefäßverschlusses und des vollständigen Gefäßverschlusses. Die Thrombogenese war bei allen stresskonditionierten Tieren nach 24 Stunden signifikant beschleunigt. Signifikante Unterschiede zwischen Hitzeschock- und Kälteschock-Vorbehandlung konnten nicht festgestellt werden. Die zusätzliche Applikation von Zinnprotoporphyrin IX zur kompetitiven Inhibition von Hitzeschockprotein 32 beeinflusste diese Beschleunigung der Thrombogenese nach Stresskonditionierung nicht.

Immunhistochemische Untersuchungen der Tiere des Hitzeschock- und des Kälteschockkollektives zeigten im Vergleich zu den Tieren des Kontrollkollektives zwar eine erhöhte Expression der antithrombotischen Faktoren Hitzeschockprotein 32, Thrombomodulin und Thrombospondin, aber auch des prothrombotischen von Willebrand Faktors im Gefäßendothel.

Eine thermische Präkonditionierung beschleunigt in osteomyokutanen Lappen signifikant die Thrombogenese trotz der verstärkten Expression des antioxidativ wirkenden Hitzeschockproteins 32 und der antithrombotischen Faktoren Thrombomodulin und Thrombospondin. Diese Beschleunigung der Thrombogenese ist wohl auf die Dominanz der prothrombotischen Wirkung des im Gefäßendothel nach Stresskonditionierung exzessiv exprimierten von Willebrand-Faktors zurückzuführen.

2. Summary

Acceleration of thrombus formation after thermal stress conditioning by increased expression of von Willebrand factor.

Osteomyocutaneous flaps consist of muscular, subcutaneous and osseous parts. In clinical treatment they are applied to large tissue defects resulting from malformations, injuries and tumor resections. These flaps are endangered by critical perfusion and endothelial cell injury induced by oxygen free radicals.

Both, critical perfusion and endothelial cell injury are able to activate the coagulation system and, thereby, to induce the formation of thrombus in microcirculation. Recently, it is known that stress conditioning induces expression of heat shock protein 32 which exerts antioxidative and vasodilatative properties. Therefore, the purpose of present study is first to establish a model allowing induction of thrombogenesis in distinct peripheral tissues of rats by light exposure, second to examine the effect of stress conditioning by heat-shock and cooling on thrombogenesis and third to determine the underlying pathophysiological mechanisms.

Osteomyocutaneous flaps were raised on the left hind limb of Sprague-Dawley-rats. After injection of 5% fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled dextran (0,5 ml/ 100g body weight, MW 150.000, Sigma Chemical Co., St. Louis) thrombogenesis was induced by continuous local light exposure (100W, HG-mercury lamp; excitation wave length 450-490 nm) on each tissue of the osteomyocutaneous flaps. This method was applied to 4 arterioles and 4 venules of muscle, subcutis and periosteum. The animals were distributed to 7 groups. Apart from the continuous hemodynamic monitoring of heart rate and arterial blood pressure, the parameters of first platelet deposition at the vessel wall, the reduction of the inner luminal vessel diameter to 50%, the complete vessel occlusion, the inner luminal vessel diameter, the red blood cell velocity and the blood flow were quantitatively assessed by intravital fluorescence microscopy. Additionally, the wall shear rate was calculated in arterioles and venules.

Microcirculatory parameters were quantified off-line using video analysis and a computer-assisted image analysis system (Capimage, Zeintl, Heidelberg, Germany; Capiflow, Capiflow AB, Kista, Schweden).

The entire thrombus formation including the first platelet deposition in vessel, the reduction of the inner luminal vessel diameter to 50% and the complete vessel occlusion was found significantly accelerated by thermal stress conditioning in both heat-shock and cooling group compared with controls.

Significant differences between heat shock and cooling preconditioning could not be observed. By additional application of tin protoporphyrin IX, known to inhibit the activity of heat shock protein 32, the lack of effect of radical scavengers on thrombogenesis could be demonstrated.

Immunohistochemical examinations showed significantly increased expression of heat shock protein 32, thrombomodulin, thrombospondin-1 and the endothelial von Willebrand factor after heat shock and cooling compared with controls.

In conclusion, we herein demonstrate that although stress conditioning by either heat shock or cooling exerts distinct vasodilative and antioxidative as well as some anticoagulant and antithrombotic properties by induction of heat shock protein 32, thrombomodulin and thrombospondin-1. Intravascular thrombus formation is accelerated in arterioles and venules after stress conditioning but only at sites of structurally damaged endothelial cells. This enhanced thrombogenesis of endothelium may be due to the prevailing upregulation of prothrombotic von Willebrand factor in endothelial cells of muscle, subcutis and periosteum after stress conditioning.

3. EINLEITUNG

3.1. Osteomyokutane Lappen

Osteomyokutane Lappen sind Mehrgewebelappen, die sich aus muskulären, kutanen und knöchernen Anteilen zusammensetzen. Sie kommen als axial gefäßgestielte Lappen oder mikrochirurgisch frei zu anastomosierende Lappen zur Anwendung.

Klinische Anwendung finden sie vor allem bei großen Gewebedefekten infolge von Fehlbildungen, Verletzungen oder Tumorresektionen.

Im ersatzschwachen Lager, bei chronischen Infektionen oder nach Strahlentherapie, werden vaskularisierte Lappen aufgrund ihrer autonomen Blutversorgung lokalen Rekonstruktionsmaßnahmen vorgezogen [KURBUL et al. 1997]. Osteomyokutane Lappen werden seit einigen Jahren zur primären und sekundären simultanen knöchernen und weichgewebigen Rekonstruktion verwandt [DIELERT und STOCK 1991], so auch bei Defekten im Gesichtsbereich [BENACQUISTA et al. 1996, URKEN et al. 1994]. Mikrochirurgisch anastomosierte Lappen können individueller angepasst werden als axial gefäßgestielte Lappen. So führen sie funktionell wie ästhetisch zu besseren Ergebnissen und zu einer schnelleren Rekonvaleszenz [MAYER et al. 1991].

Ein Lappenteil- oder Lappengesamtverlust wiegt besonders schwer, da nur wenige Entnahmestellen zur Verfügung stehen und jede Entnahme osteomyokutaner Lappen entsprechende Defekte hinterläßt. Somit muß nach einem Mißerfolg auf Rekonstruktionsmaßnahmen mit geringeren Entnahmedefekten ausgewichen werden. Diese Rekonstruktionsmaßnahmen der zweiten Wahl führen jedoch meist zu einem weniger befriedigenden Resultat [URKEN et al. 1994]. Der Transfer mikrochirurgischer Mehrgewebelappen ist in der postoperativen Phase nach wie vor mit einer hohen Komplikationsrate behaftet [URKEN et al. 1994].

Mögliche Gefahren für derartige Lappen können durch eine Restriktion des arteriellen Blutzufusses infolge einer extraluminalen Hämatombildung [TRUELSON und LEACH 1998], einer Abknickung des Gefäßstieles [STRAUSS et al. 1994], Spasmen der Gefäße [DINMAN und GIOVANNONE 1994] oder einer Gefäßobstruktion bei intraluminaler Thrombosierung [O'SHAUGHNESSY et al. 1994] entstehen.

Die Vitalität derartiger Lappen ist durch Kompromittierung des venösen Abflusses oder eine Endothelschädigung gefährdet. Diese kann verursacht sein durch Hypoxie bei Kompromittierung des arteriellen Zuflusses in axial gestielten Lappen oder infolge des Ischämie- und Reperfusionssyndroms [HAMILTON 1984, MENGER 1993] in mikrovaskulär transferierten Lappen. In der Ischämiephase kommt es zu einem hypoxiebedingten Verlust energiereicher Phosphate, einer Endothelzellschwellung und einer intravaskulären Hämokonzentration [HAMMERSEN et al. 1989]. Die Freisetzung von Vasodilatoren wird inhibiert [METHA et al. 1989] während die Freisetzung von Vasokonstriktoren stimuliert wird [LÜSCHER et al. 1992, MARZI et al. 1994]. Kapillare Perfusionsausfälle sind die Folge; diese werden in der anfänglichen Reperusionsphase durch die vermehrte Freisetzung von Vasokonstriktoren verstärkt. Zusätzlich wird in der Reperusionsphase Sauerstoff zugeführt. Das in der Ischämiephase angefallene Adenosintriphosphat-Abbauprodukt Hypoxanthin wird zu Harnsäure metabolisiert. Hierbei entstehen freie Sauerstoffradikale OH^\cdot [BALLA et al. 1993].

Diese sind in der Lage mit nahezu allen Biomolekülen zu reagieren (DNA, Membranlipide, Proteine und Kohlenhydrate). Um die Funktion und Fluidität von Membranen aufrechterhalten zu können, brauchen Membranen ungesättigte Fettsäuren. Diese sind vornehmliche Angriffspunkte bei der Schädigung der Membranen durch Sauerstoffradikale (Lipidperoxidation). Eine Kettenreaktion läuft ab, die über zwei Wege erfolgen kann. Eine Möglichkeit besteht in der direkten Strukturveränderung der Membranen, die andere über die durch indirekte Zerstörung von anderen Zellkomponenten entstehenden reaktiven Aldehyde. Ein unspezifischer Anstieg der Ionenpermeabilität, eine Beeinflussung membrangebundener Proteine, veränderte Membranstrukturen bis hin zur vollständigen Membrandestruktion können die Folgen sein. Es zeigt sich eine Endothelzellschädigung mit rupturierter Oberflächenmembran und freiliegendem Zytoplasma.

Die Verlangsamung des Blutflusses und die Endothelzellschädigung führen zur Bildung mikrovaskulärer Thromben. Die entstehenden Perfusionsausfälle im Lappen führen zu einer verminderten Toleranz des Lappens gegenüber nachfolgenden ischämischen Insulten mit dem erhöhten Risiko eines Lappenverlustes [MULHOLLAND et al. 1993].

3.2 Thrombogenese

Das in vorliegender Studie angewandte Modell der lichtinduzierten Thrombogenese ist ein geeignetes Modell, die durch Sauerstoffradikale verursachte Endothelschädigung und Thrombenentstehung nachzuahmen. Hierbei ermöglichen 2 lichtinduktive Oxidationswege die Entstehung von freien Sauerstoffradikalen. Beim Typ I Mechanismus, der die Wechselwirkung des angeregten Sensibilisators Fluorescein Isothiocyanat (FITC) im Triplettzustand mit dem zu oxidierenden Substrat beinhaltet, ist dabei durch einen Elektronen- bzw. Protonenübergang gekennzeichnet, wogegen ein Typ II Mechanismus im wesentlichen auf einen Energietransfer zwischen dem Sensibilisatormolekül FITC im angeregten Triplettzustand und Sauerstoff im Grundzustand (O_2) beruht.

Unabhängig vom Reaktionsmechanismus beginnt jede photodynamische Oxidationsreaktion mit einer Aktivierung des Photosensibilisators z.B. FITC, Methylenblau oder Rose-Bengale. Dabei wird der Sensibilisator aus seinem Grundzustand (0S) durch die Aufnahme von Lichtenergie in Form von Photonen in den angeregten, äußerst kurzlebigen Singulett-Zustand ($^1S^*$) überführt. Die Rückkehr in seinen Grundzustand ist auf verschiedene Weise möglich und erfolgt meist durch die Umwandlung der Elektronenenergie in Wärmeenergie (internal conversion) oder die Emission von Licht (Fluoreszenz). Der angeregte Singulettzustand des Sensibilisators kann jedoch auch durch strahlungslose Spinumkehr (intersystem crossing) in den etwas energieärmeren Triplettzustand ($^3S^*$) übergehen.

In Abhängigkeit von den Reaktionsbedingungen und den Eigenschaften des relativ langlebigen Triplettzustands des Photosensibilisators ($^3S^*$) erfolgt der weitere Reaktionsverlauf nach einem Typ I bzw. Typ II Mechanismus.

Bei einem Typ I Mechanismus, abstrahiert das angeregte Sensibilisatormolekül ($^3S^*$) ein Wasserstoff-Atom oder ein Elektron von einem Substratmolekül. Im weiteren Verlauf entstehen Superoxidanionenradikale (O_2^-); diese können zu Wasserstoffperoxid dismutieren bzw. über verschiedene Folgereaktionen (Haber-Weiss-Reaktion, Fenton-Reaktion) die Bildung der hochreaktiven Hydroxy-Radikale (OH^\cdot) induzieren.

Im Gegensatz zum Typ I Mechanismus überträgt der angeregte Sensibilisator ($^3S^*$) in einer Typ II Photooxidation seine Energie direkt auf den Triplettzustand (3O_2). Bei dieser Reaktion wird der Triplettzustand (3O_2) in seine physikalisch angeregte Form, den Singulett-Zustand (1O_2) überführt, wobei der Sensibilisator

selbst in seinen Singulett-Ausgangszustand (^0S) zurückkehrt. Der aus dieser Reaktion hervorgehende Singulett-Sauerstoff ist ein noch wirksameres Oxidationsmittel [SILVER 1977].

Sowohl die Hydroxyl-Radikale (OH^-), als auch der Singulett-Sauerstoff ($^1\text{O}_2$) reagieren als Oxidantien mit DNA- und Membranmolekülen. Veränderte Membranstrukturen oder sogar vollständige Membrandestruktion sind die Folgen. Weiterhin ist der intrazelluläre $\text{Ca}^{2+} / \text{Na}^+$ – Austausch aufgrund verminderter Aktivität von Na^+/K^+ -ATPase gestört [SILVER 1977]. Die oxidative Phosphorylierung und Glykolyse sind gehemmt. Zusätzlich tragen adhärente Leukozyten durch weitere Freisetzung von Sauerstoffradikalen zur Verstärkung des Gewebeschadens bei und führen zum Verlust der endothelialen Integrität mit der Folge einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität [SIFLINGER-BIRNBOIM et al. 1992]. Es zeigt sich eine Endothelzellschädigung mit rupturierter Oberflächenmembran und freiliegendem Zytoplasma [IKEDA H et al. 1994, ISCHIKAWA M et al. 2002, JOURDAN A et al. 1995, LAU CS et al. 1991, MIYASHITA H et al. 1998].

Insbesondere das Kollagen bildet eine thrombogene Struktur, welches die Thrombozyten aktiviert und bindet und die Gewebsthromboplastine (tissue factor) aktiviert, die die Gerinnung in Gang setzen.

Daraufhin wird das Extrinsic-System, auch extravasorisches System bezeichnet, aktiviert.

Hierbei wandeln die bei der Gefäßwandläsion freigesetzten Gewebsthromboplastine (tissue factor) Faktor VII in Faktor VIIa um. Die intrinsische Aktivierung erfolgt durch den Fremdoberflächenkontakt des Faktors XII, der mit hochmolekularen Kininogen und Präkalikrein eine Komplexbildung eingeht. In der Folge wird Faktor XII in XIIa und Faktor XI in XIa umgewandelt. Der extrinsische und der intrinsische Weg münden in einer gemeinsamen Endstrecke, die mit der Umwandlung des Faktors X in Xa beginnt und der Bildung von Thrombin und Fibrin endet [KLEIHAUER 1978].

Das zunächst lockere Maschenwerk umgibt die aggregierten Thrombozyten und wandelt den Plättchenthrombus in einen stabilen Gerinnungsthrombus um. Seine endgültige Verfestigung bekommt der Thrombus durch den Vorgang der Thrombusretraktion durch das Thrombasthenin, einem actomyosinähnlichen kontraktilen Protein der Thrombozyten.

Da im Vergleich zum Intrinsic-System bei dem Extrinsic-System weniger Aktivierungsschritte durchlaufen werden, ist eine Aktivierung in Sekundenschnelle möglich.

Weiterhin spielt bei der durch freie Sauerstoffradikale verursachten Thrombogenese der von Willebrand Faktor eine wichtige Rolle. Dieser dient als Prokoagulationsfaktor VIII; dieser wird vor Inaktivierung durch Protein C und Faktor Xa im zirkulierenden Blut geschützt. Der von Willebrand Faktor wird im Gefäßendothel und von Megakaryozyten synthetisiert und zirkuliert im Blut in Form vieler Multimere. Plasmatischer von Willebrand Faktor befindet sich überwiegend im Gefäßendothel und ist von einer geringeren durchschnittlichen Multimergröße als in der Subendothelmatrix.

Nur die langen Multimerformen des von Willebrand Faktors sind hämostatisch aktiv; diese haben eine beträchtlich höhere Ristocetin-Kofaktor Aktivität pro Einheit Antigen als kleinere Multimere. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der arteriellen Thrombose [PIRMANDA und HOOG 2002].

Für die gleichzeitig stattfindende antagonistisch wirkende Thrombolyse sind vor allem die Proteine Thrombomodulin und Thrombospondin-1 verantwortlich. Thrombomodulin ist ein Membran gebundenes Protein, welches mit Thrombin einen eins zu eins Komplex bildet [CONWAY et al. 1994]; dieser neutralisiert die prokoagulatorische Aktivität des Thrombins und aktiviert in weiterer Folge das Protein C. Aktiviertes Protein C (APC) inaktiviert in Gegenwart von Protein S (PS) die Faktoren VIIIa und Va, hemmt somit die Feedbackaktivierung von Thrombin und verzögert und vermindert dadurch die Thrombinbildung [ESMON 1987, GALLISTL 2001].

Thrombospondin-1 ist ein Plättchen alpha-Granula adhäsives Glykoprotein (M = 450,000) [GROSSFELD et al. 1996] und wird in großer Menge von aktivierten Plättchen und Teilen der Thrombusformation freigesetzt. Thrombospondin-1 reduziert die durchschnittliche Multimergröße des von Willebrand Faktor und inhibiert die Plättchenaggregation um 30-50% [RABHI-SABILE et al. 1996].

Allerdings scheint Thrombospondin-1 auch eine adhäsive Wechselwirkung zwischen Thrombin stimulierten Plättchen und U937 Zellen (Monozyten-ähnliche humane Zelllinie U937) und menschlichen Blutmonozyten zu vermitteln. Thrombospondin-1 kann auf diese Art als molekulare Brücke dienen, welche aktivierte Plättchen mit Monozyten am Ort der frühen Gefäßverletzung verbindet [SILVERSTEIN und NACHMANN 1987].

3.3 Präkonditionierung

Die Präkonditionierung durch Hitzeschock erfordert eine temporäre Temperaturerhöhung des zu konditionierenden Gewebes über die physiologischen Grenzen hinaus. Jedoch sollte sich die Temperaturerhöhung im subletalen Bereich bewegen [RUECKER et al. 1999].

Dies gilt auch für eine hypotherme Stresskonditionierung [KELTY and LEE 2001]. Die erwünschte Stresstoleranz beginnt einige Stunden nach dem Stressereignis [SALMI et al. 1999].

Da zur Stresskonditionierung eine lokale Kühlung genauso effektiv wie eine systemische ist, kann durch Anwendung lokaler Kältevorbehandlung die Komplikationen einer systemischen Hypothermie vermieden werden [YUNOKI et al. 2002].

Nach dem Stressereignis kommt es in der Zelle zur übersteigerten de novo Synthese von Hitzeschockproteinen. Hitzeschockproteine tragen zur korrekten Proteinsynthese und Proteinfaltung bei und nehmen regulatorisch Einfluss auf Transkriptionenzyme [WYNN et al. 1994]. Die gewünschte Stresstoleranz tritt 12 bis 24 Stunden später ein. Eine präkonditionierte Zelle ist für eine gewisse Zeit vor einem weiteren, unter nicht konditionierten Bedingungen eigentlich letalen Schaden geschützt [KOENIG et al., 1992; GARRAMONE et al., 1994, DE MAIO 1995]. Eine lokale Kälteschockvorbehandlung führt im Gegensatz zur Hitzeschockvorbehandlung sogar zu einer längeren Produktion von Hitzeschockproteinen [MOTOYOSHI et al. 2001].

Hitzeschockproteine werden gemäß ihrem Molekulargewicht eingeteilt.

In der vorliegenden Studie war insbesondere das Hitzeschockprotein 32 von besonderem Interesse, da dieses als Radikalfänger für freie Sauerstoffradikale dient. Hitzeschockprotein 32 ist bekannt als Hämoxygenase 1 (HO-1) [WOO J 1998]; es führt zur Gewebeprotektion bei Ischämie [ROESKEN et al. 1998, MAINES und PANAHIAN 2001].

Die Hämoxygenase 1 katalysiert den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt im Katabolismus von Häm zu Biliverin, freiem Eisen und Kohlenmonoxid [MAINES 1988].

Zytochrom P450 der Mitochondrien stellt in peripheren Geweben eine wesentliche hämoglobinunabhängige Quelle für Häm dar [MAINES 1988].

Im biologischen System ist die HO-Aktivität verantwortlich für die Produktion von gleichmolaren Anteilen von CO, Biliverdin und freiem Eisen. Die Biliverdin-Reduktase katalysiert die Reduktion von Biliverdin zu Bilirubin.

Sowohl Biliverdin als auch Bilirubin können als potente Antioxidantien die freien Sauerstoffradikale, die z.B. im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionssyndroms entstehen, effektiv neutralisieren [STOCKER et al. 1987, LLESUY und TOMARO 1994]. Das entstehende Kohlenmonoxid dient zusätzlich als Vasodilatator [GODA et al. 1998].

Somit kann durch eine Stresskonditionierung die Erfolgswahrscheinlichkeit für Hautlappen gesteigert werden [KÖNIG et al. 1992].

Die Stresskonditionierung führt insbesondere zu einer Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion in osteomyokutanen Lappen, bedingt durch die Sauerstoffradikalfängerfunktion im Rahmen der Freisetzung von HSP 32 [RUECKER et al. 2001]. Auch SALMIAM und Mitarbeiter [1999] wiesen auf die signifikant gesteigerte Erfolgswahrscheinlichkeit von Hautlappen sowohl bei hypothermer als auch hyperthermer präoperativer Konditionierung hin.

In einem in-vitro Ansatz konnte gezeigt werden, dass eine Hitzeschockvorbehandlung die Expression von Plasminogenaktivatoren verstärkt [FUKAO et al. 1996]; Plasminogenaktivatoren aktivieren Plasminogen zu Plasmin, welches Fibrinketten spalten kann; sie wirken somit fibrinolytisch und bewirken die Auflösung bestehender Thromben.

Hitzeschock führt zu einer Hochregulation des antikoagulatorisch wirksamen Thrombomodulin nach 12-18 Stunden [CONWAY et al. 1994].

KETIS und Mitarbeiter [1988 und 1990] beschrieben, dass nach in vitro durchgeführtem Hitzeschock erst ein Ansteigen der Synthese der klassischen Hitzeschockproteine (28,000; 71,000; 90,000; 100,000) und dann des antikoagulatorisch wirksamen Thrombospondin-1 erfolgte.

3.4 Fragestellung

In osteomyokutanen Lappen führen bei Hypoxie und im Rahmen eines Ischämie-/Reperfusionssyndroms freigesetzte Sauerstoffradikale zu Endothelzellschäden.

Sowohl diese Endothelzellschäden als auch eine Verlangsamung des Blutflusses können die Bildung mikrovaskulären Thromben bedingen und somit die Vitalität osteomyokutaner Lappen gefährden.

Präkonditionierung in Form von Hitzeschock oder Kälteschock verursacht einerseits eine Hochregulation von antioxidativ und vasodilatativ wirkendem HSP 32 und andererseits die Induktion von antithrombotischem Thrombomodulin und Thrombospondin-1.

Ziel ist es ein Modell zur lichtinduzierten Thrombose in Mehrgewebelappen an der Ratte zu etablieren, die Auswirkung von Stresskonditionierung durch Hitzeschock und Kälteschockvorbehandlung auf die Thrombogenese an Mehrgewebelappen zu untersuchen, festzustellen ob gewebespezifische Unterschiede bestehen und die zugrunde liegenden Pathomechanismen zu ermitteln.

4. MATERIAL UND METHODE

4.1. Tiere

Die Versuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz und nach Genehmigung durch die zuständige Kreispolizeibehörde an Sprague-Dawley-Ratten durchgeführt. Es zeigte sich keine allergische Reaktion auf Dextran. Die Tiere wurden unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit: etwa 60%) einzeln in Käfigen gehalten und hatten freien Zugang zu Wasser und Standard-Laborfutter (Altromin, Lage, Deutschland).

4.2 Stresskonditionierung

4.2.1. Hitzeschock

In Narkose (Diethylether für Narkose, Höchst, Frankfurt/ Main, Deutschland) wurde eine lokale Stress-Konditionierung entweder durch Hitzeschock oder Kälteschock durchgeführt. Jeweils das linke Hinterbein wurde über 30 Minuten in warmen Wasser gebadet (Lauda MS/2, Manfred Rink GmbH, Sulzbach/ Saar, Deutschland), so dass intramuskulär eine konstante Temperatur von 42,5°C erreicht und gehalten wurde. Die Temperaturmessung erfolgte durch eine im Vorfeld gelegte intramuskuläre Sonde (Licox-CMP, GMS Advanced Tissue Monitoring, Kiel-Mielkendorf, Deutschland). Diese Stresskonditionierung erfolgte je nach Untersuchungsgruppe 12 Stunden, 24 Stunden oder 36 Stunden vor der Lappenhebung. Anschließend wurden die Tiere wieder in ihren Stall zurückgesetzt und erhielten ihre gewohnte Nahrung.

4.2.2. Kälteschock

Die Vorgehensweise unterschied sich von der Stress-Konditionierung durch Hitzeschock nur in der Wasserbadtemperatur. Hier wurde das linke Hinterbein 30 min in Eiswasser (<3°C) gebadet. Die Muskeltemperatur des linken Hinterlaufes sank durchschnittlich auf ca. 4°C ab.

4.2.3 Blockierung der Hitzeschockproteine mit Zinnprotoporphyrin IX

Zur Hemmung der Expression von HSP-32 wurde im Rahmen der Hitzeschock Stress-Konditionierung Zinnprotoporphyrin-IX (SnPPIX) appliziert. Diese Lösung wurde im Vorfeld angemischt und bestand aus 13,5g SnPPIX, 0,3ml Natriumhydrogencarbonat und 3,3ml PBS-Puffer. 1ml dieser Lösung pro 100g Rattengewicht wurde zum Zeitpunkt der Stresskonditionierung intraperitoneal appliziert.

4.3. Präparation

4.3.1. Vorbereitung

In Pentobarbitalnarkose (50 mg/kg Körpergewicht, intraperitoneal, Abbott, Nord Chicago, IL) wurde der mediale Anteil des linken Hinterbeines epiliert (pilkamed, Hans Schwarzkopf GmbH, Hamburg, Deutschland: Einwirkzeit 5 Minuten). Durch Rückenlagerung der Tiere auf einer über rektale Temperaturmessung rückgekoppelten Wärmeplatte wurde die Körpertemperatur über die gesamte Versuchszeit zwischen 36°C und 37°C konstant gehalten.

Um ein Verlegen der Atemwege zu verhindern und eine suffiziente Spontanatmung zu ermöglichen, wurden die Tiere anschließend tracheotomiert. Die Implantation von Polyethylenkathetern (PE 50, Ø 0,58 mm, Portex, Lythe, England) in die rechte A. carotis communis ermöglichte neben der Erfassung der makrohämodynamischen Parameter - mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz - eine kontinuierliche Substitution der im Rahmen des chirurgischen Eingriffs auftretenden Flüssigkeitsverluste (NaCl 0,9 %, 3 ml/h), sowie die Applikation der für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erforderlichen Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (MG 150000) und Rhodamin-6G (MG 476).

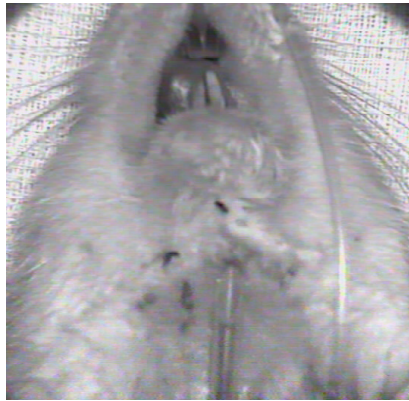


Abbildung 1: Tracheotomierte Ratte mit linksseitigem A. carotis communis Katheter.

4.3.2. Lappenhebung

Anteromedial am linken Hinterlauf wurde oberhalb der Aufzweigung der Femoralgefäße in eine anteriore und eine posteriore Gruppe von Endästen eine Hautinsel zirkulär umschnitten. Durch eine weitere Inzision von dieser Hautinsel ausgehend bis zum Leistenband, erfolgte die Darstellung der Femoral- und Saphenagefäße (Abbildung 2).

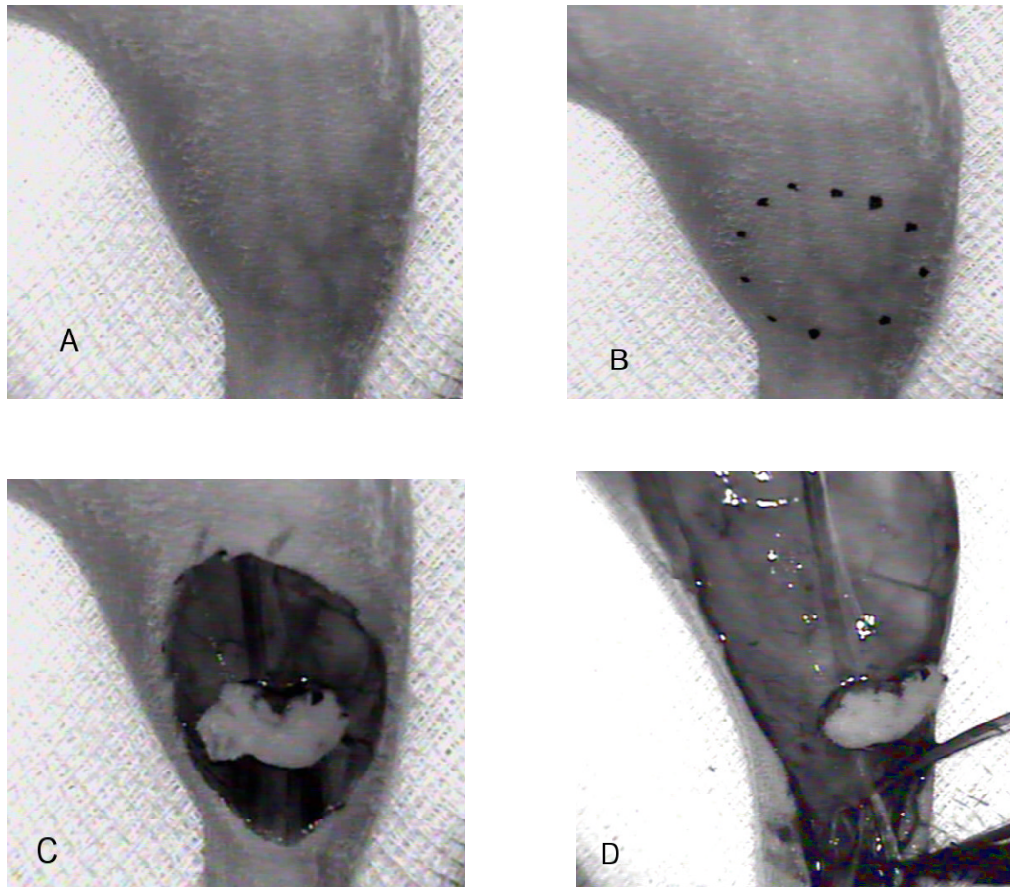


Abbildung 2: Hautinzision; Am linken Hinterlauf (A) wurde eine Hautinsel angezeichnet (B) und umschnitten (C). Darstellung des Gefäß-Nerven-Bündels bestehend aus V. saphena, A. saphena und N. saphenus von medial nach lateral (D).

Sowohl die beiden anterioren als auch die drei posterioren Endäste der Saphenagefäße der umschnittenen Hautinsel wurden ligiert und abgesetzt. Anschließend wurde die Tibia sowohl an ihrem distalen Ende unmittelbar proximal der tibiofibularen Synostose als auch am proximalen Ende unmittelbar distal der Tuberositas mit einer Knochensplitterzange nach McIndoe (FO 61 4R, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland) glatt durchtrennt. Von dem Tibiassegment wurden unter Schonung des Periosts sämtliche Muskelinsertionen mit Ausnahme der Insertionen des M. gracilis und des M. semitendinosus abgelöst. Diese wurden dann symphysennah durchtrennt. Abschließend wurden sämtliche der Femoralgefäße bis zum Leistenband einschließlich der A. und V. epigastrica superficialis ligiert und durchtrennt, so daß der gesamte Blutfluß der A. femoralis dem osteomyokutanen Lappen zur Verfügung stand.

Damit war die Präparation des axial gestielten osteomyokutanen Lappens, bestehend aus Tibiassegment, Periost, Muskulatur und Subkutis und Haut abgeschlossen (siehe Abbildung 3).

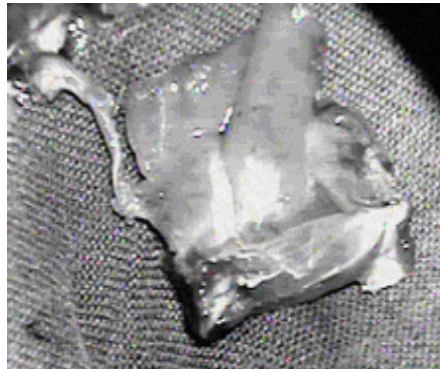


Abbildung 3: Gehobener axial an den Femoralgefäßen gestielter Osteomyokutanlappen.

4.3.3. Auslagerung zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie

Die Blutversorgung der Haut erfolgt neben wenigen Rami perforantes aus der Muskulatur vor allem über mehrere Hautäste, die von den beiden anterioren und den drei posterioren Endästen der Saphenagefäße abzweigen. Dadurch war es möglich, die Hautinsel von proximal her unter Schonung der an ihrem distalen Ende einstrahlenden Gefäße von den darunterliegenden Muskeln zu separieren.

Derartig an ihren versorgenden Gefäßen gestielt, konnte die Hautinsel nach distal umgeschlagen werden. Bei der anschließenden Auslagerung des Lappens auf einer in drei Ebenen verstellbaren Bühne kamen die Unterseite der Muskeln, der mediale Anteil des Periosts, die Oberseite der Haut, sowie ein Ausschnitt der Subkutis spannungsfrei in einer Ebene zu liegen. Die Präparation wurde mit einem Deckglas abgedeckt, um die zu mikroskopierenden Gewebe vor Austrocknung und dem Zutritt von Umgebungssauerstoff zu schützen (Abbildung 4).

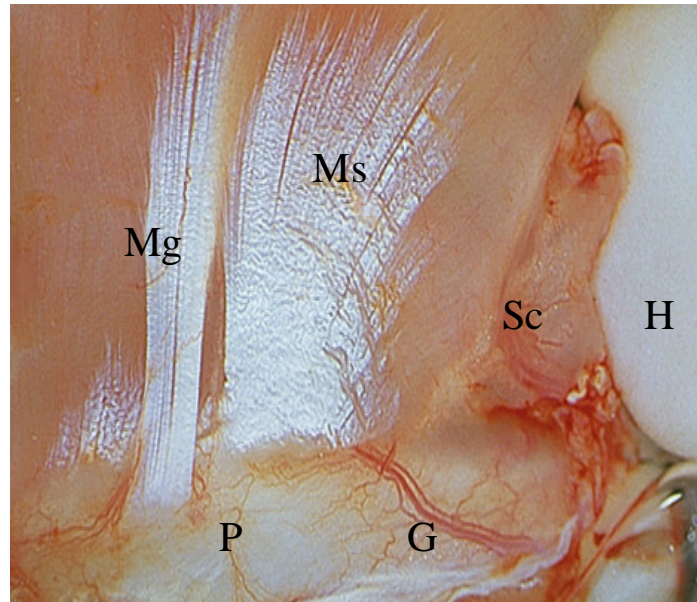


Abbildung 4: Auslagerung des osteomyokutanen Lappens zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. M. gracilis (Mg), M. semitendinosus (Ms), Haut (H), Subkutis (Sc) und Periost (P) mit den zu- und abfließenden Periostalgefäßen (G).

4.3.4. Lichtinduzierte Thrombogenese

Der Mechanismus einer lichtinduzierten Thrombogenese am haarlosen Mäuseohr wurde 1997 von ROESKEN et al. beschrieben. Dieses Verfahren wurde auf den ausgelagerten osteomyokutanen Lappen der untersuchten Ratten übertragen.

Die in vivo Mikroskopie wurde mit einem Leitz-Mikroskop (Orthoplan, Leica, Wetzlar, Deutschland) und einem Immersionsobjektiv (W 63x/0,5; Zeiss, Jena, Deutschland) durchgeführt. Nach Injektion von 5% Fluorescein Isothiocyanat (0,5 ml/ 100g Körpergewicht; FITC; MW 150.000; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) wurde die Thrombogenese photochemisch durch kontinuierliche lokale Lichtexposition (100 W Quecksilberdampfampe; Wellenlänge: 450-490 nm) ausgelöst.

4.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

4.4.1. Equipment

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde in Auflichttechnik durchgeführt. Verwendet wurde ein modifiziertes Leitz-Mikroskop (Orthoplan, Leica, Wetzlar, Deutschland) mit einer 100 W Quecksilberdampfampe, das mit einem Baufiltersystem (450 - 490 nm Exzitations- / > 520 nm Emissionswellenlänge), einem Grünfiltersystem (530 - 560 nm Exzitations- / > 580 nm Emissionswellenlänge) und drei verschiedenen Objektiven, einem mit langem Arbeitsabstand (Plan-Neofluar 10x/0,03; Zeiss, Jena, Deutschland) und drei für Wasserimmersion (W 20x/0,5; W 40x/0,75 und W 63x/0,5; Zeiss, Jena, Deutschland), ausgestattet war. Über eine Charge-coupled-device (CCD)-Videokamera (FK 6990, COHU, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA) wurde die Mikroskopie nach Einschleifen eines Timersignals (VTG-33, VOR A Company Ltd., Japan) mittels eines Videorekorders (S-VHS Panasonic AG 7350, Matsushita, Tokyo, Japan) auf Band (S-VHS PRO SE, Fuji Magnetics GmbH, Kleve, Deutschland) aufgezeichnet (Abbildung 4). Auf dem Videomonitor wurde dabei je nach verwendetem Objektiv eine optische Vergrößerung von 216-fach, 432-fach, 864-fach und 1361-fach erzielt.

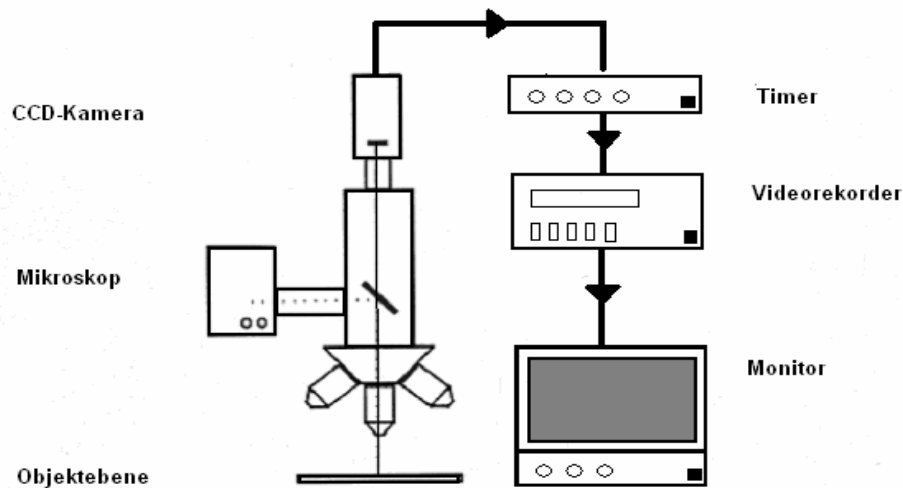


Abbildung 5: Equipment für die intravitale Fluoreszenzmikroskopie.

4.4.2. Aufnahmetechnik

Die intravitale Mikroskopie der Mikrozirkulation osteomyokutaner Lappen erfolgte nach Kontrastverstärkung durch intravenöse Injektion von Fluorescein-Isothiocyanat markiertem Dextran (FITC-Dextran 5%, MG 150000, Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA). Dieser makromolekulare Fluoreszenzmarker führt unter Exzitation zu einer Kontrastierung des Blutplasmas und ermöglicht dadurch Aufnahmen von hoher Auflösung (MENGER et al. 1992c). Die intravenöse Gabe von Rhodamin-6G (2 Mikromol/ kg Körpergewicht, MG 476, Merck, Darmstadt, Deutschland) ermöglichte dann die Visualisierung von Thrombozyten und Leukozyten (RÜCKER et al. 1997). Mit Hilfe dieser Technik wurden nach Lappenhebung in axial gefäßgestielten osteomyokutanen Lappen Areale mit einer Oberfläche von $0,14 \text{ mm}^2$ bis $0,90 \text{ mm}^2$ in Skelettmuskulatur, Subkutis und Periost sowie postkapillare Venolen und Arteriolen unterschiedlicher Ordnung in Skelettmuskulatur, Subkutis und Periost untersucht.

Unmittelbar nach Beendigung der Mikroskopie wurden die Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital getötet und die osteomyokutanen Lappen zur Histologie entnommen.

4.5. Histologie

Da das Anfertigen periostaler Schnitte nur unter sehr hohem technischem Aufwand möglich ist, wurden von jedem Versuchstier nur Gewebeproben aus der Subkutis und Muskulatur gewonnen. Die eine Hälfte dieser Präparate wurde in Formalin fixiert und sekundär in Paraffin eingebettet; die andere Hälfte wurde in flüssigem Stickstoff bei -196°C kryokonserviert und bei -85°C bis zur histologischen Aufbereitung gelagert.

4.5.1. Immunhistochemie

Um die Expression von Hitzeschockprotein 32, Thrombomodulin, Thrombospondin und von Willebrand-Faktor nachzuweisen, wurden immunhistochemische Färbungen angewandt.

Die Chemikalien wurden, falls nicht gesondert angegeben von Sigma-Aldrich Chemicals GmbH (Deishofen, Deutschland) in höchster käuflich erhältlicher Reinheitsstufe bezogen.

Alle Inkubationen wurden in einer feuchten Kammer durchgeführt. Die Schnitte wurden danach dreimal in PBS (phosphate buffered saline) gewaschen. Um die lichtmikroskopische Beurteilung zu erleichtern, wurden die Schnitte mit Hämalaunlösung nach Mayer gegengefärbt. Dann wurde eine aufsteigende Alkoholreihe von 70% bis 100% Ethanol für je 3 Minuten und eine dreimalige 3 minütige Xylol-Behandlung angewandt. Anschließend konnten die Schnitte eingebettet werden.

Hitzeschockproteine

An formalinfixierten und in Paraffin eingebetteten Gewebeproben erfolgte der immunhistochemische Nachweis von Hitzeschockprotein 32. Zuerst wurden die Paraffinschnitte in reinem Xylol 3 x 3 Minuten und mittels absteigender Alkoholreihe von 100% bis 70% Ethanol je 2 Minuten entparaffiniert und danach zur Antigendemaskierung einer Mikrowellenbestrahlung in Zitratpuffer unterzogen [EVERS und UYLINGS 1994]. Danach wurden die Schnitte nach Blockierung der endogenen Peroxidase-Aktivität und Beschichtung mit Ziegen Serum zur Verhinderung unspezifischer Proteinbindungen für eine Stunde bei 37°C mit dem primären Anti-Hitzeschockprotein-32-Antikörper (Verdünnung:

1:200; StressGen Biotechnologies Corp., Sidney, British Columbia, Kanada) inkubiert.

Ein Ziegen-anti-Kaninchen-Antikörper fand als Sekundärantikörper Verwendung. Ein Avidin-Biotin-Meerrettichperoxidase-Komplex wurde zur Färbung hinzu gegeben. Diaminobenzidin und Eisenchlorid (3%) dienten als Chromogene. Zur Negativkontrolle wurden die Präparate bis auf das Weglassen des jeweiligen Primärantikörpers gleich behandelt. Alle Schnitte, die ohne Primärantikörper behandelt wurden, zeigten keine Färbung.

Thrombomodulin

Um Thrombomodulin immunhistochemisch darstellen zu können, wurden formalinfixierte und in Paraffin eingebettete Präparate verwandt. Nach Entparaffinisierung wurden die Schnitte erst in destilliertem Wasser und dann in PBS (bestehend aus 8g NaCl/l, 0,2g KCl/l, 1,15g Na₂HPO₄ /l, Biochrom KG Berlin) gespült. Die Blockierungsreagenz bestand aus 1 ml PBS und 15 µl Normalserum; davon wurde 75 µl auf kleine Schnitte und 100 µl auf große Schnitte pipettiert und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Der Primärantikörper (clone 1009; DAKO corp., Carinteria, CA, USA) wurde 1:50 verdünnt und bestand aus 1 ml PBS und 20 µl Antikörper. Auch hiervon wurden 75 µl auf kleine Schnitte und 100 µl auf große Schnitte aufgebracht und 90 Minuten in einer feuchten Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden die Schnitte über insgesamt 8 Minuten mit PBS gespült, der Sekundärantikörper, der aus goat-anti-mouse oder donkey-anti-goat Antikörpern (1:200, DAKO Corp., Carinteria, CA, USA) bestand, aufgetragen und über 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert.

Anschließend wurde nochmals über insgesamt 8 Minuten mit PBS gespült. Der Avidin-Biotin-Komplex wurde aufgebracht, über 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend über 3 Minuten mit PBS gespült. Dann wurden 100 µl Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid 1:1000 mit H₂O₂ (30%ig) verdünnt aufgetragen und in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend mit destilliertem Wasser 5 Minuten gespült. Abschließend erfolgte die Färbung in Hämalaun (Merck 9249) nach Meyer und nach Behandlung der Schnitte mit Ethanol und Xylol die Einbettung der Schnitte.

Thrombospondin-1

Um Thrombospondin-1 immunhistochemisch darstellen zu können, wurden Gefrierschnitte verwandt. Nach Herstellung der Gefrierschnitte wurden diese direkt nach dem Schneiden 5 Sekunden in Aceton bei 4°C fixiert und bei Raumtemperatur für eine Stunde getrocknet; daraufhin wurden die Schnitte für 10 Minuten in Aceton bei -20°C fixiert und mit destilliertem Wasser ab gespült. Die endogenen Peroxidasen wurden in 0,3%igem H₂O₂ für 30 Minuten geblockt und anschließend wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser und PBS (bestehend aus 8g NaCl/l, 0,2g KCl/l, 1,15g Na₂HPO₄ /l, pH 7,4, Biochrom KG Berlin) ab gespült.

Die Primärantikörper von Thrombospondin-1 lagen in einer Verdünnung 1:50 vor (DAKO Corp., Carinteria, CA, USA); 1 ml PBS wurden mit 20 µl Antikörper vermischt. Davon wurden 75 µl auf kleine Schnitte und 100 µl auf große Schnitte aufgebracht. Die Schnitte wurden anschließend über Nacht in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden die Schnitte mit PBS über insgesamt 8 Minuten gespült.

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinylierter anti goat Antikörper (1:200, DAKO Corp., Carinteria, CA, USA) verwandt. Hiervon wurden 100 µl aufgetragen und 30 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Schnitte wiederum für insgesamt 8 Minuten mit PBS gespült. 100 µl Streptavidin Peroxidase-Reagenz wurden aufgetragen und 10 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend über insgesamt 8 Minuten mit PBS gespült. 100 µl Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid wurden 1:1000 mit H₂O₂ (30%) verdünnt, auf die Schnitte aufgetragen und 5 bis 10 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert und abschließend über 5 Minuten mit destilliertem Wasser gespült. Danach erfolgte die Färbung in Hämalaun (Merck 9249) n. Meyer. Die Schnitte wurden mit destilliertem Wasser gespült und mit Ehtanol und Xylol behandelt. Abschließend konnten die Schnitte eingedeckt werden.

Von Willebrand-Faktor

Für die immunhistochemischen Untersuchungen wurden formalinfixierte und in Paraffin gebettete Präparate verwandt. Zur Färbung wurde ein rattenspezifischer LSAB-Kit der Firma DAKO® (DAKO-Corp., Carinteria, CA, USA) verwandt.

Nach Entparaffinisierung mit Xylol und Ethanol wurden die Schnitte mit destilliertem Wasser ab gespült. Die endogene Peroxidase wurde mittels 10minütiger Behandlung mit 3%igem

Wasserstoffperoxid blockiert. Danach wurden die Schnitte mit Pronase angedaut. Hierzu wurden 25 mg Pronase E (4000000 PU/g, Merck 1.07433) und 10 ml Tris-Puffer 0,05 M (Sigma T-1503) auf 37°C vorgewärmt und vermischt. Hiervon wurden 100 µl Lösung auf die Schnitte pipettiert und 10 Minuten in feuchter Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert und mit destilliertem Wasser abgespült. Danach wurde der primäre Antikörper des von Willebrand Faktors (Verdünnung 1:100; DAKO Corp., Carinteria, CA, USA) aufgebracht. Die Schnitte wurden für 90 Minuten in feuchter Kammer bei 37°C im Brutschrank inkubiert und anschließend mit PBS (bestehend aus 8g NaCl/l, 0,2g KCl/l, 1,15g Na₂HPO₄ /l, pH 7,4, Biochrom KG Berlin) abgespült. Danach wurden 75 µl eines biotinylierten goat anti-rabbit Sekundärintikörpers (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen) aufgetragen. Daraufhin wurden die Schnitte nochmals mit PBS abgespült und 75 µl eines Avidin-Biotin-Komplexes aufgetragen und 10 Minuten in feuchter Kammer bei Raumtemperatur inkubiert. Nach PBS Spülung wurde Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid aktiviert, indem 100 µl des 1 zu 1000 verdünnten Diaminobenzidin Tetrahydrochlorid mit Wasserstoffperoxid vermischt, auf die Schnitte aufgetragen wurde und 5 bis 10 Minuten in einer feuchten Kammer bei Raumtemperatur inkubiert wurde. Nach Abspülen der Schnitte mit destilliertem Wasser konnten diese in Hämalaun (Merck 9249) nach Meyer gefärbt werden. Nach abschließender Behandlung mit destilliertem Wasser, Ethanol und Xylol konnten die Schnitte eingedeckt werden.

4.5.2. Elektronenmikroskopie

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung wurden die Präparate in kleine Blöcke (2x2 mm) geschnitten und in gepuffertem Glutaraldehyd (Cacodylat-Puffer, 0,2 M) für 4 Stunden bei 4°C fixiert. Die Präparate wurden drei mal mit 7,55% Saccharose in 0,1 M Cacodylat-Puffer gewaschen und mit Osmiumtetroxid für 4 Stunden bei 4°C nach der Methode nach CAULFIELD behandelt. Die Präparate wurden dehydriert in Aceton und in Araldite eingebettet. Die Präparate wurden mit einem OmU3-Mikrotom (Reichert, Wien, Österreich) geschnitten. Die Semi-Dünnschnitte (0,5 µm) wurden mit Methylen blau gefärbt und mit Uranyl-Acetat und Bleizitrat kontrastiert.

4.6. Studiendesign

Je nach Fragestellung wurden folgende Gruppen miteinander verglichen:

Untersuchung des Einflusses von Stresskonditionierung auf die lichtinduzierte Thromboneogenese in osteomyokutanen Lappen.

- Gruppe 1: Kontrolle; n=8.
- Gruppe 2: Hitzeschock, 24 Stunden vor Lappenhebung; n=8.
- Gruppe 3: Kälteschock, 24 Stunden vor Lappenhebung; n=8.

Untersuchung des Einflusses des Zeitverlaufs der Hitzeschockantwort auf die lichtinduzierte Thromboneogenese in osteomyokutanen Lappen.

- Gruppe 4: Kontrolle; n=3.
- Gruppe 5: Hitzeschock, 12 Stunden vor Lappenhebung; n=3.
- Gruppe 6: Hitzeschock, 24 Stunden vor Lappenhebung; n=3.
- Gruppe 7: Hitzeschock, 36 Stunden vor Lappenhebung; n=3.

Untersuchung des Einflusses von Antioxidantien auf die lichtinduzierte Thromboneogenese in osteomyokutanen Lappen.

- Gruppe 8: Kontrolle; n=3.
- Gruppe 9: Kontrolle, SnPP-IX-Gabe 24 Stunden vor Lappenhebung; n=3.
- Gruppe 10: Hitzeschock, 24 Stunden vor Lappenhebung; n=3.
- Gruppe 11: Hitzeschock und SnPP-IX-Gabe 24 Stunden vor Lappenhebung; n=3.

Nach Hebung der osteomyokutanen Lappen erfolgte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie von je 4 Arteriolen und 4 Venolen in Skelettmuskulatur, Subkutis und Periost im Rahmen einer Thrombogene bis zur vollständigen Okklusion des mikroskopierten Gefäßes; es

wurden Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung, Zeitpunkt des 50% Gefäßverschlusses und Zeitpunkt des vollständigen Gefäßverschlusses bestimmt. Folgende Abbildungen zeigen dies exemplarisch an einer Arteriole.

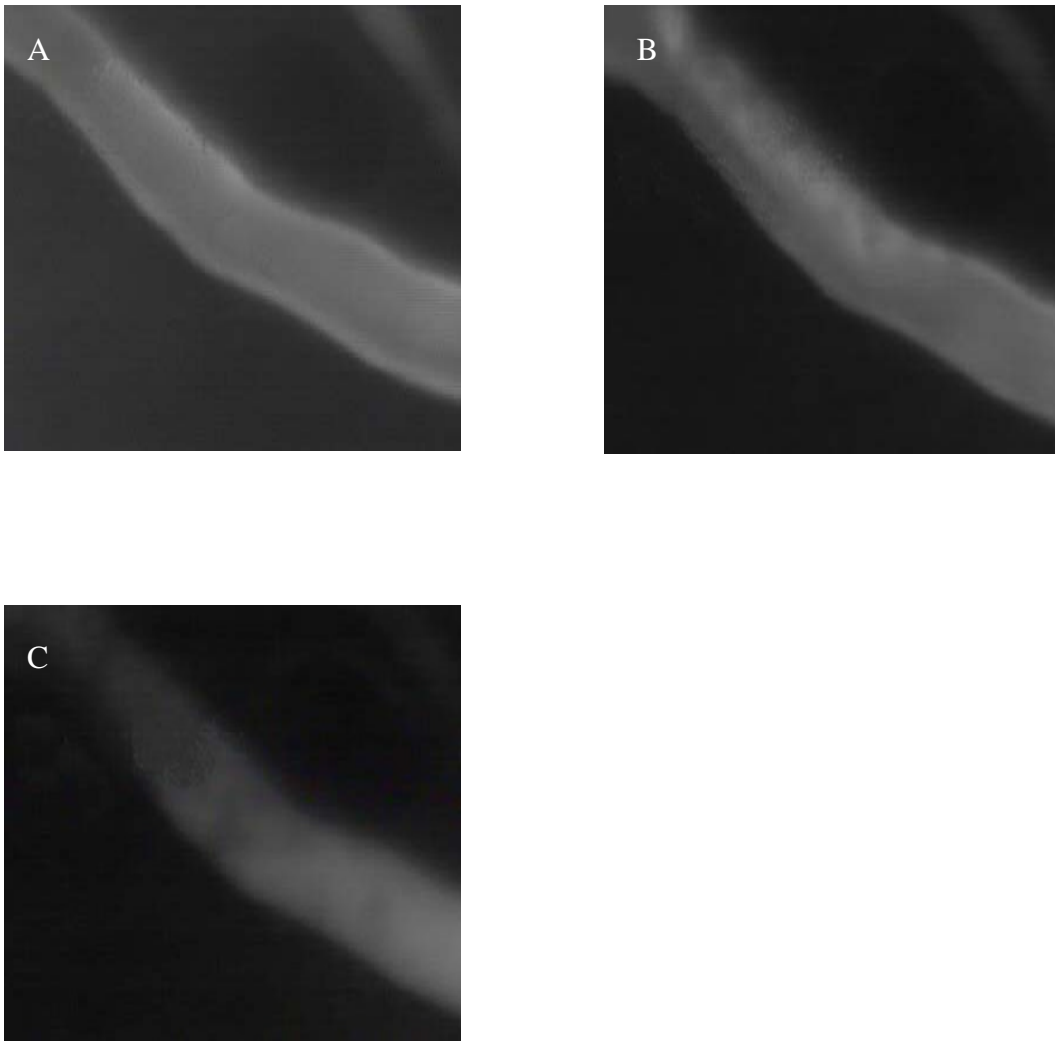


Abb. 6: Intravitalmikroskopie; Thrombogenese in einer Arteriole:
(A) Ausgangsbefund, (B) 50% Okklusion, (C) vollständige Okklusion;
Vergrößerung 1000 fach.

4.7. Auswertung

Die Quantifizierung der Mikrozirkulation erfolgte computergestützt (Capimage, Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) durch Bild-zu-Bild-Analyse anhand der Videobänder.

Die Analyse beinhaltete die Bestimmung folgender Parameter in Arteriolen und Venolen:

- Gefäßdurchmesser [μm]
- Dauer bis zur Anlagerung des ersten Thrombozyten an der Gefäßwand [s]
(EPA = erste Plättchenanlagerung)
- Dauer bis zur Okklusion der Hälfte des Gefäßlumens (50% Okklusion) [s]
- Dauer bis zur vollständigen Okklusion des Gefäßlumens (100% Okklusion) [s]
- Erythrozytenfließgeschwindigkeit [mm/s]
- Blutfluß [pl/s]
- Wandscherrate [1/s]

4.7.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Während der Versuchsdurchführung wurden folgende Parameter erhoben: Gewicht der Ratte, ständige Blutdruckmessung und Messung der Herzfrequenz.

Mikroskopisch wurde der Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung, der 50%igen Gefäßokklusion und der vollständigen Gefäßokklusion bestimmt.

Mittels Video-Analyse konnten später die mikrozirkulatorischen Parameter mittels Computer assistiertem Bild-Analyse-System (Capimage, Zeintl, Heidelberg, Deutschland; Capiflow, Capiflow AB, Kista, Schweden) bestimmt werden. Gemessen wurden der Gefäßdurchmesser und die anfängliche Blutflussgeschwindigkeit in mm/s, errechnet der anfängliche Blutfluß in pl/s und die Wandscherrate in 1/s (basierend auf der Newton'schen Definition $\gamma = 8 \times V/D$; V repräsentiert den Mittelwert der Flussgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen dividiert durch 1,6 entsprechend dem Baker-Wayland Faktor [BAKER 1974]).

4.7.2. Immunhistochemie

Die Auswertung der immunhistochemisch gefärbten Histologieschnitte erfolgte unter einem Mikroskop (BX 60, Olympus Optical Co., Japan) mit einem 20er und 40er Objektiv, verblindet und semiquantitativ.

Die Untersuchungen wurde an den Gruppen Kontrolle, 24 Stunden Hitzeschock, 24 Stunden Kältschock bei je 8 Tieren an den Geweben Muskulatur und Subkutis durchgeführt. Durchschnittlich wurden 2 Schnitte pro Tier angefertigt und pro Schnitt stellten sich 3 Arteriolen und 3 Venolen dar.

Intensität und Ausdehnung der Färbung, vor allem im Bereich der endothelialen Gefäßauskleidung, wurden entsprechend der von PAGE und Mitarbeitern [1992] angegebenen Methode analysiert. Die Quantifizierung erfolgte durch Zuordnung zu einer der Klassen von 0 bis 4. Dabei entsprach 0 einer negativen, mit der Kontrolle vergleichbaren Expression, 1 einer sehr schwach positiven, 2 einer schwach positiven, 3 einer positiven und 4 einer sehr stark positiven Expression des jeweiligen Proteins.

4.8. Statistik

Die statistische Aufarbeitung der Daten erfolgte mit Hilfe des Computerprogramms Sigma Stat (Version 1.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Die Ergebnisse sind als Mittelwerte (MW) mit Standardfehler des Mittelwerts (SEM) angegeben.

Zur Ermittlung von Unterschieden zwischen den Gruppen wurden die Daten zunächst einer Varianzanalyse für verbundene oder nicht verbundene Stichproben unterzogen und bei Signifikanz post hoc mit dem jeweiligen parametrischen oder nicht parametrischen Paarvergleichstest (nach Student-Newman-Keuls oder Dunn) differenziert. Bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ galten Unterschiede als signifikant.

5. ERGEBNISSE

5.1. Systemische Parameter

Das Gewicht der Ratten war zum Untersuchungszeitpunkt für alle Kollektive vergleichbar und betrug 300g bis 350g.

Die Herzfrequenz der Ratten lag während der Untersuchung für alle Gruppen zwischen 392 und 447 Schlägen/min. Der mittlere arterielle Blutdruck lag bei allen Tieren während der Lappenhebung und der intravitalen Mikroskopie innerhalb der physiologischen Grenzen (Min.: 85mmHg; Max.: 110mmHg). Im Gruppenvergleich zeigten sich keine signifikanten Unterschiede.

Die Körperkerntemperatur konnte bei allen Ratten während der Lappenhebung und intravitalen Mikroskopie mittels Heizplatte zwischen 36°C und 37°C konstant gehalten werden.

5.2. Mikrozirkulatorische Parameter vor Thromboseinduktion

Es zeigten sich für die Gruppen 12h HS, 24h HS, 36h HS, SnPPIX und 24h KS im Vergleich der mittleren Gefäßdurchmesser [μm] zum Kontrollkollektiv keine signifikanten Unterschiede. Auch bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Geweben: Muskulatur, Subkutis und Periost. In den folgenden Abbildungen werden die Durchmesser der Arteriolen (A) links und die Durchmesser der Venolen (B) rechts für die Gewebe Muskulatur (Abb.7), Subkutis (Abb.8) und Periost (Abb.9) abgebildet.

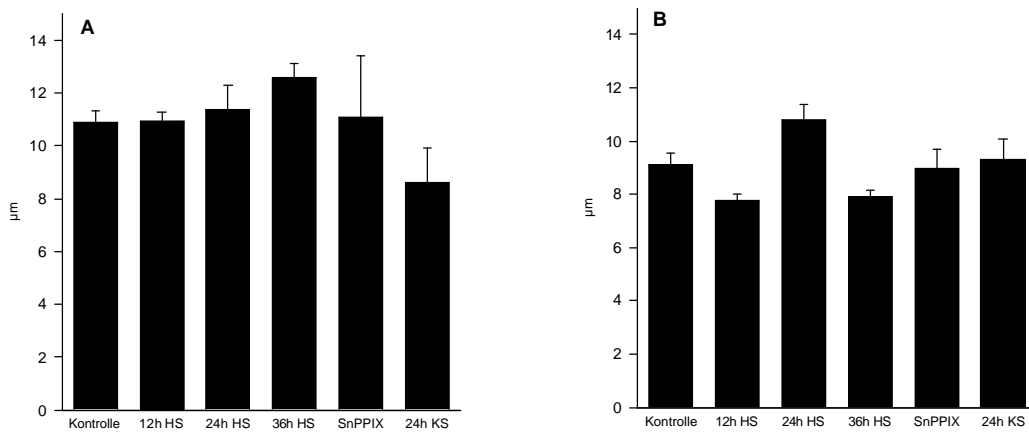


Abbildung 7: Durchmesser [μm] der Arteriolen A und Venolen B in der Muskulatur für alle Kollektive; MW \pm SEM.

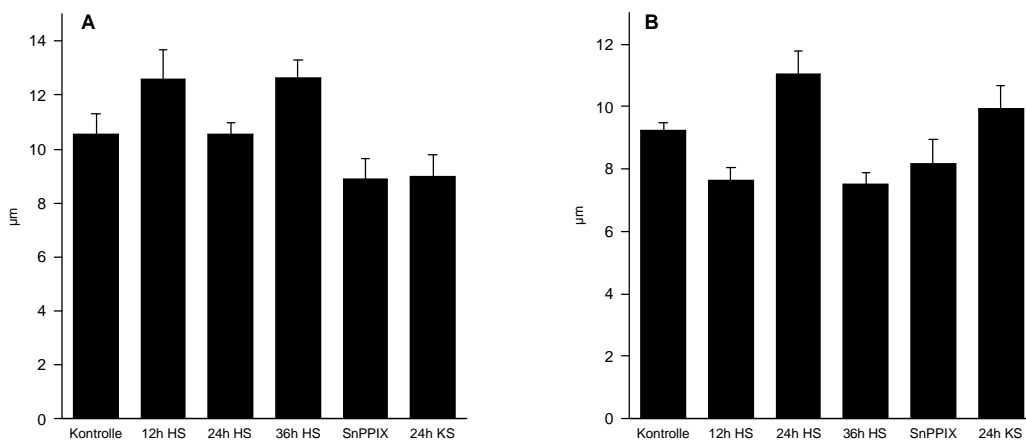


Abbildung 8: Durchmesser [μm] der Arteriolen A und Venolen B in der Subkutis für alle Kollektive; MW \pm SEM.

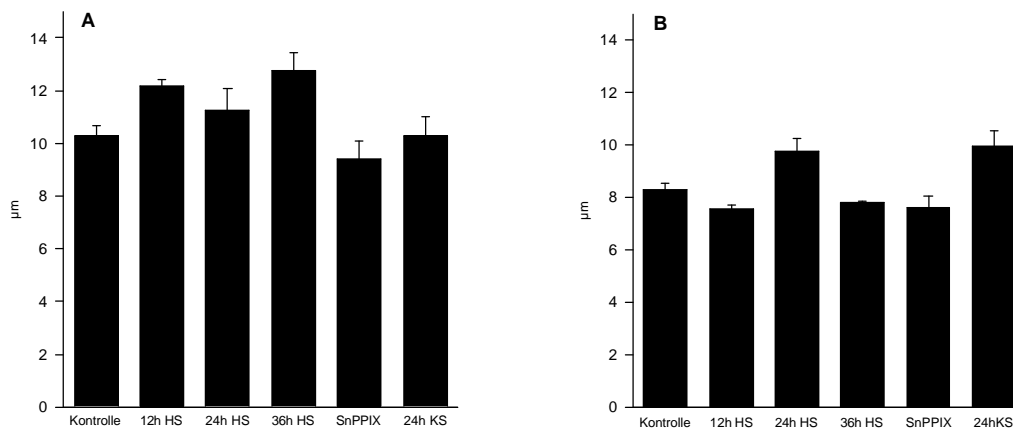


Abbildung 9: Durchmesser [µm] der Arteriolen A und Venolen B im Periost für alle Kollektive; MW ± SEM.

Somit waren die mittleren Gefäßdurchmesser für Arteriolen und Venolen in den Geweben: Muskulatur, Subkutis und Periost für alle untersuchten Kollektive vergleichbar.

Die Fließgeschwindigkeit [mm/s] wurde für alle Tiere unmittelbar vor der Thromboseinduktion für die Gewebe Muskulatur, Subkutis und Periost bestimmt. Gewebespezifisch wurde ein Vergleich der Gruppen 12h HS, 24h HS, 36h HS, SnPPIX und 24h KS zum Kontroll-Kollektiv durchgeführt. Erhöhungen der Fließgeschwindigkeit zeigten sich 24 Stunden nach Stresskonditionierung in den Arteriolen der 24 Stunden zuvor hitzegeschockten Kollektive 24h HS, SnPPIX und im KS-Kollektiv in allen Geweben.

In den Venolen war die Fließgeschwindigkeit im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv nie signifikant erhöht. In den folgenden Abbildungen werden die mittleren Fließgeschwindigkeiten der Arteriolen (A) links und die Fließgeschwindigkeiten der Venolen (B) rechts für die Gewebe Muskulatur (Abb.10), Subkutis (Abb.11) und Periost (Abb.12) abgebildet.

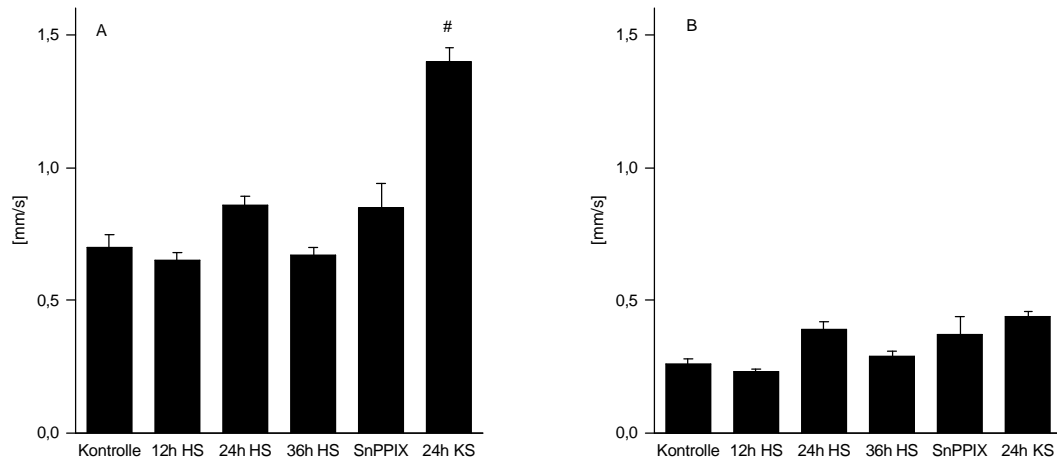


Abbildung 10: Blutflussgeschwindigkeit [mm/s] in Arteriolen (A) und Venolen (B) der Muskulatur vor Beginn der lichtinduzierten Thrombose für alle Kollektive. MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

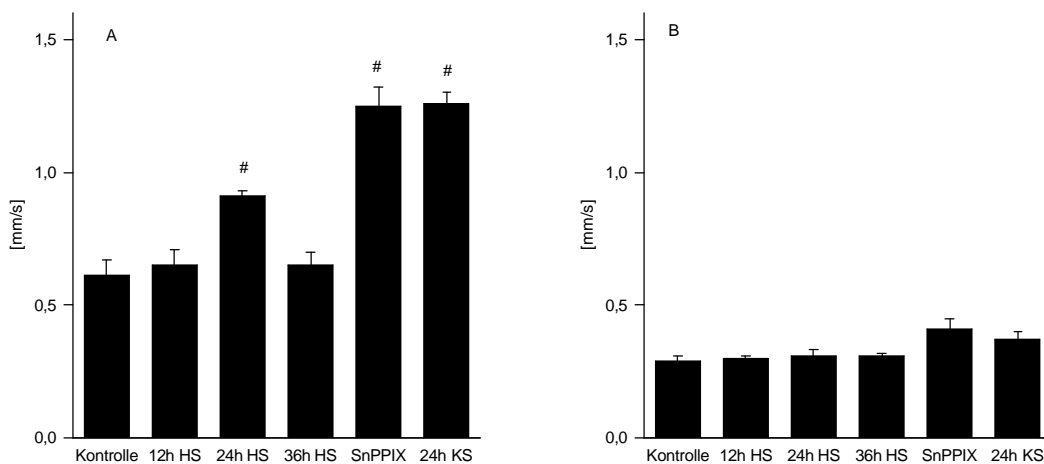


Abbildung 11: Blutflussgeschwindigkeit [mm/s] in Arteriolen (A) und Venolen (B) der Subkutis vor Beginn der lichtinduzierten Thrombose für alle Kollektive. MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle, Median-Test, Student-Newman-Keuls-Test und Mann-Whitney U-Test.

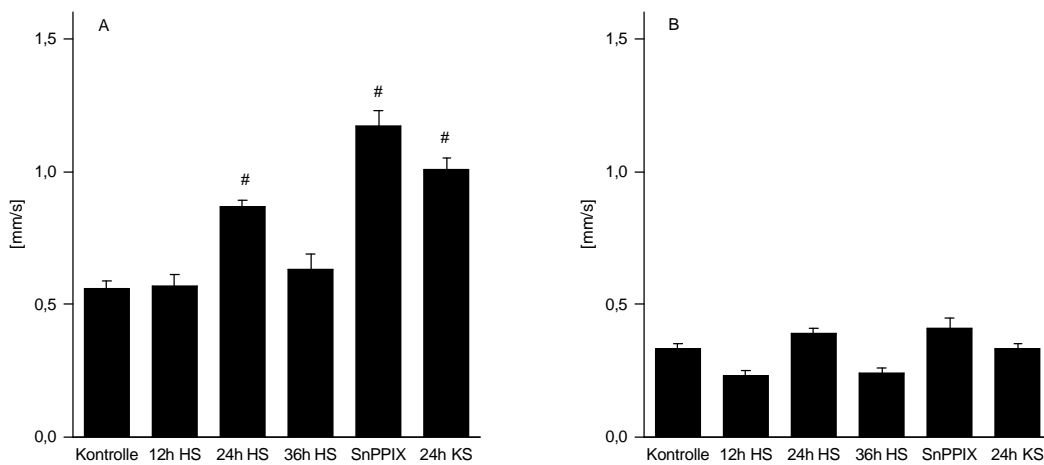


Abbildung 12: Blutflussgeschwindigkeit [mm/s] in Arteriolen (A) und Venolen (B) des Periostes vor Beginn der lichtinduzierten Thrombose für alle Kollektive. MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

Der Blutfluss [pl/s] unmittelbar vor Thromboseinduktion wurde für alle Tiere für die Gewebe Muskulatur, Subkutis und Periost errechnet. Auch hier wurde gewebespezifisch ein Vergleich der Gruppen 12h HS, 24h HS, 36h HS, SnPPIX und 24h KS zum Kontroll-Kollektiv durchgeführt. Der Blutfluß zeigte sich in den Arteriolen in allen Kollektiven, bei denen eine Hitzeschockvorbehandlung erfolgte in der Muskulatur, der Subkutis und im Periost gegenüber dem Kontrollkollektiv erhöht. Jedoch zeigte sich abhängig vom Gewebe eine unterschiedliche Ausprägung der Blutflusszunahme. In den Venolen konnte keine signifikante Erhöhung des Blutflusses nach Stresskonditionierung festgestellt werden.

In den folgenden Abbildungen wird der mittlere Blutfluss der Arteriolen (A) links und der mittlere Blutfluss der Venolen (B) rechts für die Gewebe Muskulatur (Abb.13), Subkutis (Abb.14) und Periost (Abb.15) abgebildet.

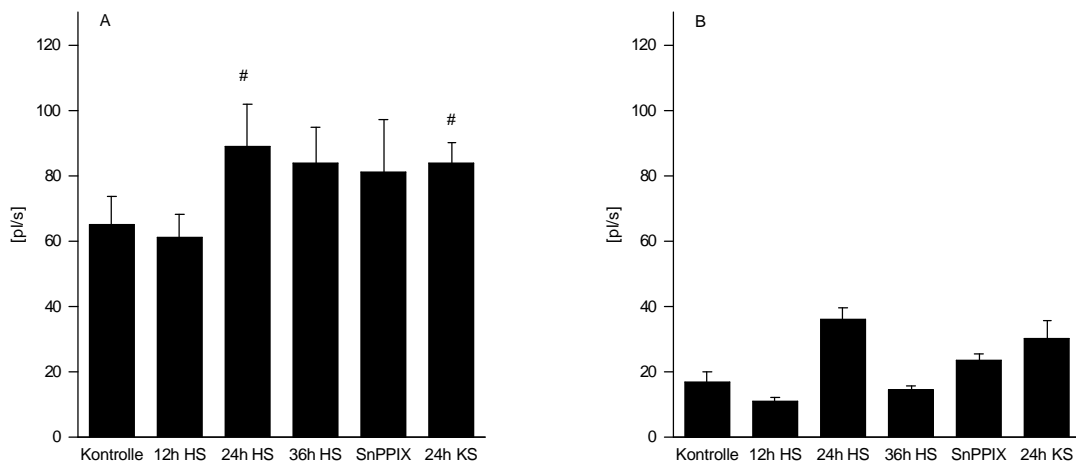


Abbildung 13: Blutfluß [pl/s] in Arteriolen (A) und Venolen (B) der Muskulatur vor Beginn der lichtinduzierten Thrombose für alle Kollektive. MW \pm SEM, #p < 0,05 vs. Kontrolle.

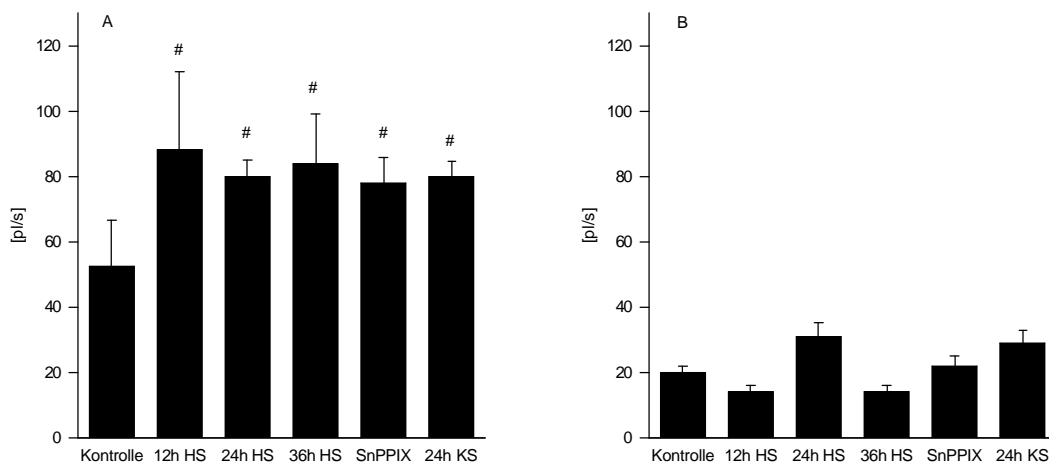


Abbildung 14: Blutfluß [pl/s] in Arteriolen (A) und Venolen (B) der Subkutis vor Beginn der lichtinduzierten Thrombose für alle Kollektive. MW \pm SEM, #p < 0,05 vs. Kontrolle.

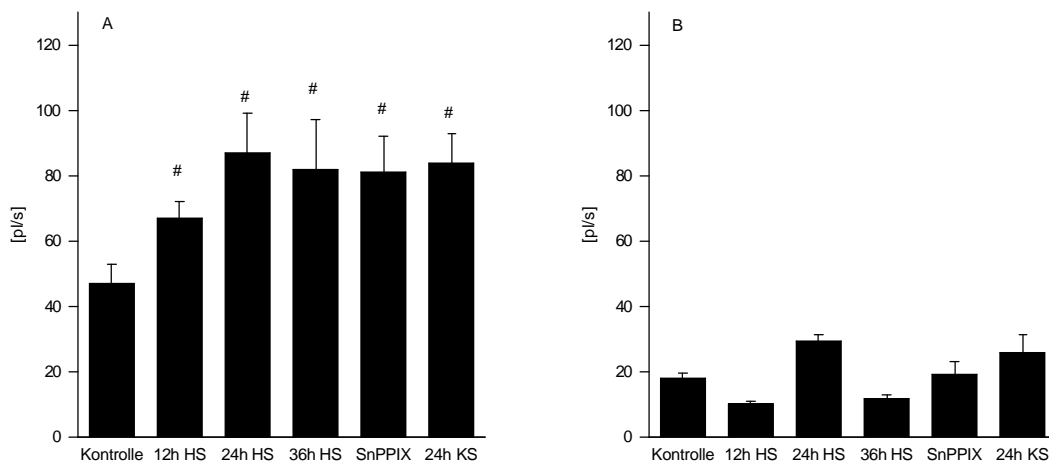


Abbildung 15: Blutfluß [pl/s] in Arteriolen (A) und Venolen (B) des Periostes vor Beginn der lichtinduzierten Thrombose für alle Kollektive. MW \pm SEM, #p < 0,05 vs. Kontrolle.

Weiterhin wurde die Wandscherrate [1/s] unmittelbar vor Thromboseinduktion für alle Tiere für die Gewebe Muskulatur, Subkutis und Periost berechnet. Gewebespezifisch wurde ein Vergleich der Gruppen 12h HS, 24h HS, 36h HS, SnPPIX und 24h KS zum Kontroll-Kollektiv durchgeführt. Die Wandscherrate zeigte sich in den Arteriolen in den Kollektiven 24 HS, SnPPIX und 24h KS erhöht, signifikant jedoch nur im 24h HS und 24h KS-Kollektiv. In den Venolen konnte dies nicht beobachtet werden.

In den folgenden Abbildungen werden die mittleren Wandscherraten der Arteriolen (A) links und die mittleren Wandscherraten der Venolen (B) rechts für die Gewebe Muskulatur (Abb.16), Subkutis (Abb.17) und Periost (Abb.18) abgebildet.

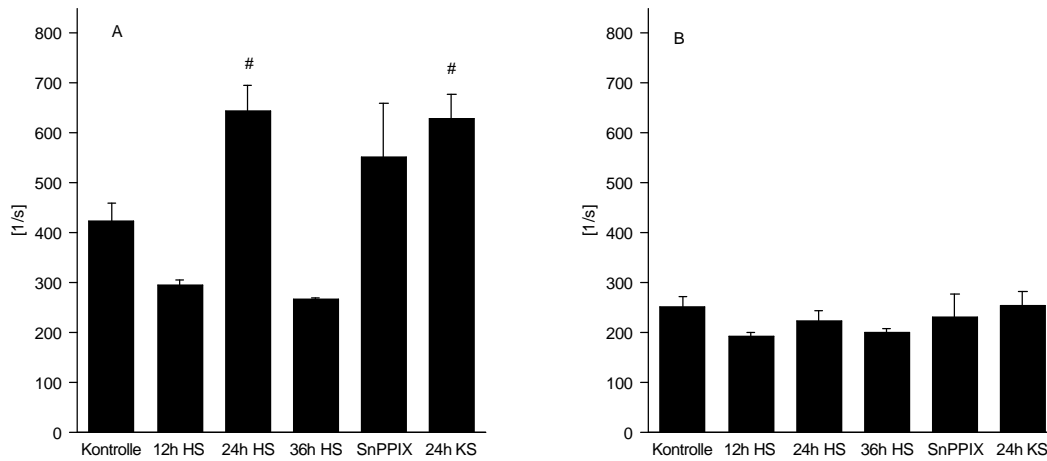


Abbildung 16: Wandcherrate [1/s] in Arteriolen (A) und Venolen (B) der Muskulatur vor Beginn der lichtinduzierten Thrombose für alle Kollektive. MW \pm SEM, #p < 0,05 vs. Kontrolle.

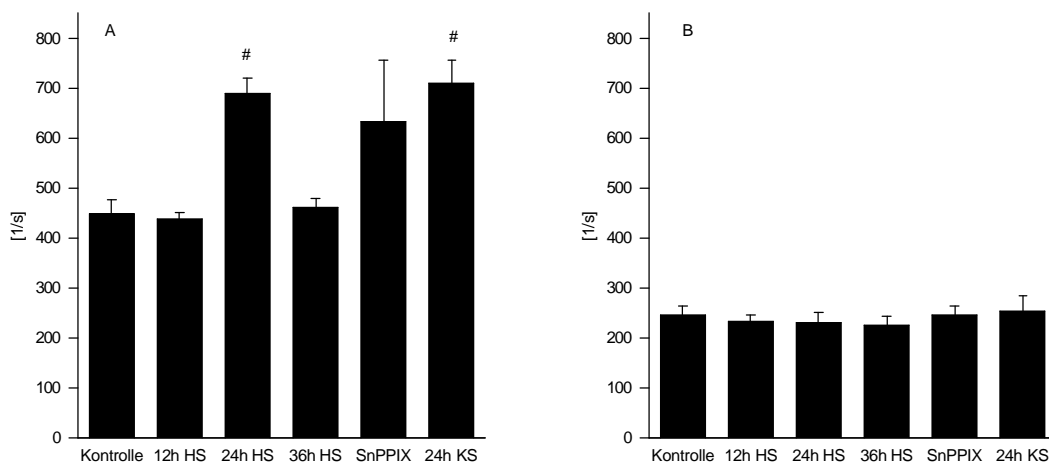


Abbildung 17: Wandcherrate [1/s] in Arteriolen (A) und Venolen (B) der Subkutis vor Beginn der lichtinduzierten Thrombose für alle Kollektive. MW \pm SEM, #p < 0,05 vs. Kontrolle.

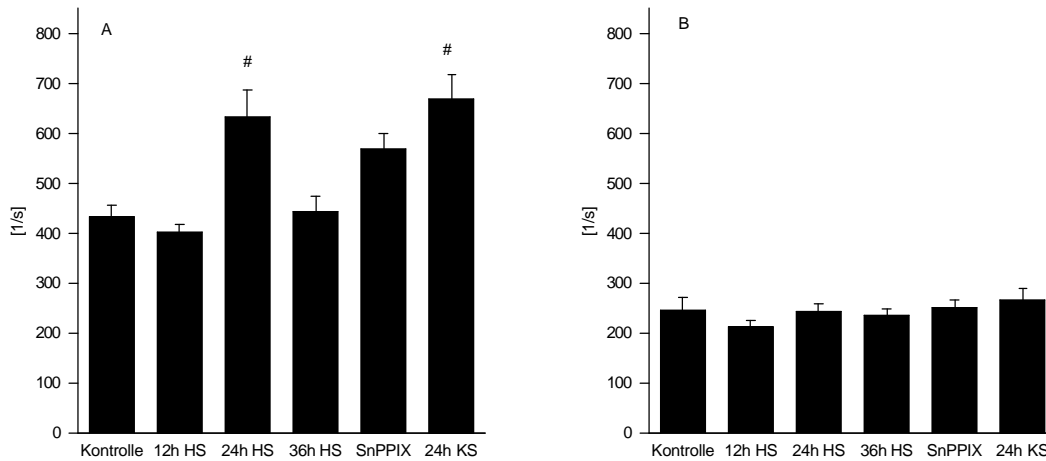


Abbildung 18: Wandscherrate [1/s] in Arteriolen (A) und Venolen (B) des Periostes vor Beginn der lichtinduzierten Thrombose für alle Kollektive. MW \pm SEM, #p < 0,05 vs. Kontrolle.

5.3. Einfluß von Stresskonditionierung auf die Thrombogenese

In den Arteriolen der Muskulatur war 42 Sekunden nach Beginn der Beobachtung unter Kontrollbedingungen die erste Anlagerung von Plättchen am Gefäßendothel feststellbar. Nach weiteren 10 Minuten hatte der entstehende Thrombus die Hälfte des Gefäßlumens verlegt und nach weiteren 6 Minuten das Gefäß vollständig verschlossen. Nach Hitzeschockvorbehandlung und nach Kälteschockvorbehandlung war der halbe und vollständige Gefäßverschluß noch schneller erreicht, im Vergleich zu den Kontrollbedingungen vierfach beschleunigt. Zusätzlich fand auch eine beschleunigte erste Plättchenanlagerung nach Hitzeschockvorbehandlung und Kälteschockvorbehandlung statt. Auch in den Venolen zeigte sich der Zeitverlauf im 24h HS-Kollektiv und im 24h KS-Kollektiv erheblich beschleunigt. Graphisch wird dies in Abbildung 19 ersichtlich, links für die Arteriolen und rechts für die Venolen.

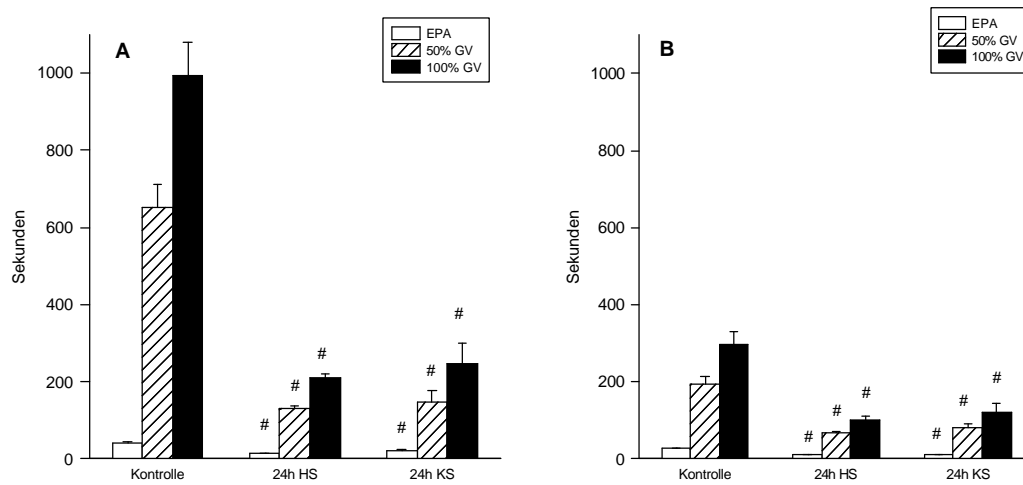


Abbildung 19: Zeitpunkte der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50% Gefäßverschlusses (50% GV) und des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für Arteriolen (A) und Venolen (B) in der Muskulatur.

MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

Auch in den anderen untersuchten Geweben Subkutis und Periost wurden vergleichbare Ergebnisse wie in der Muskulatur gefunden (Abbildungen 20 und 21).

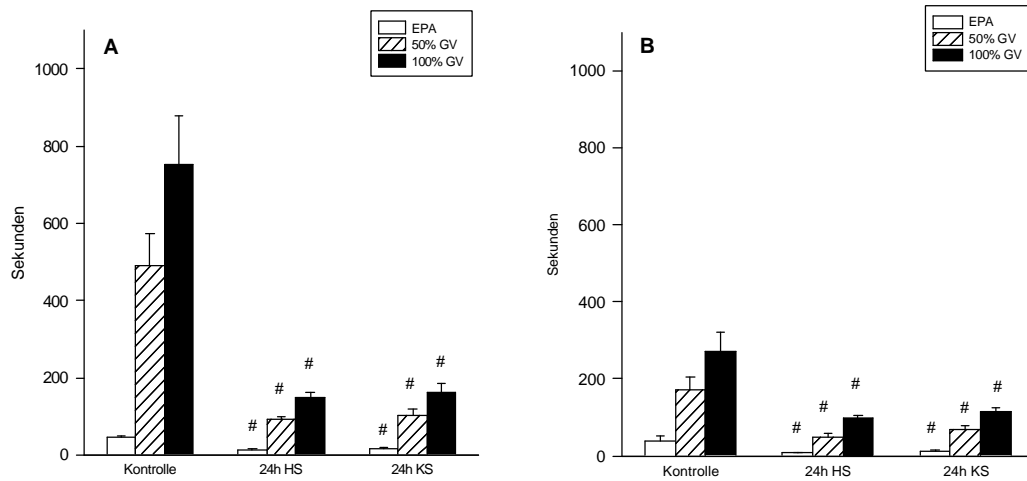


Abbildung 20: Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50% Gefäßverschlusses (50% GV) und des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für Arteriolen (A) und Venolen (B) in der Subkutis.

MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

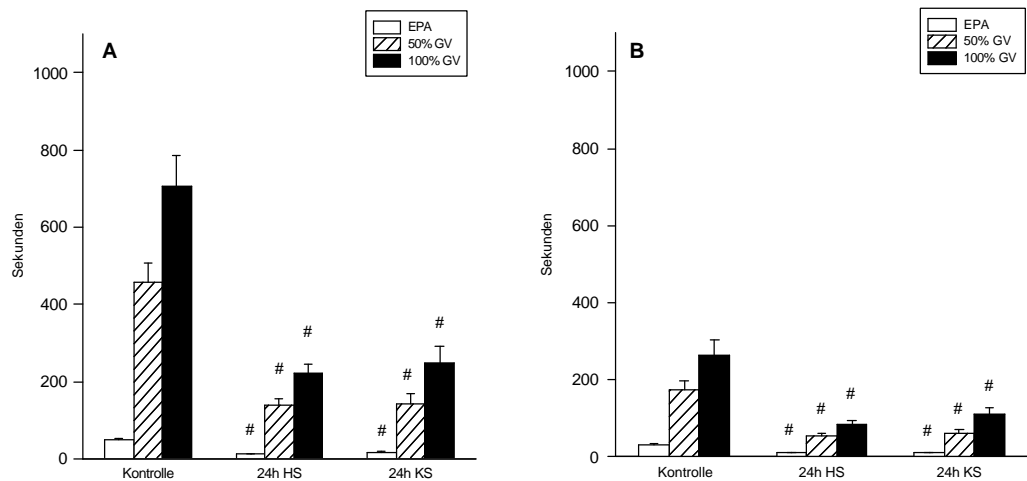


Abbildung 21: Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50% Gefäßverschlusses (50% GV) und des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für Arteriolen (A) und Venolen (V) im Periost.

MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

5.4. Zeitverlauf der Hitzeschockantwort

Um den Einfluß der Hitzeschockvorbehandlung auf die Thrombogenese zu untersuchen wurde dem Kontrollkollektiv die Hitzeschock-Gruppen: 12h HS, 24h HS und 36h HS gegenüber gestellt. Beurteilt und verglichen wurden folgende Zeitpunkte der lichtinduzierten Thrombogenese: Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung (EPA), Zeitpunkt des 50%igen Gefäßverschlusses (50% GV) und Zeitpunkt des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für o.g. Gruppen, getrennt nach Arteriolen und Venolen für die Gewebe: Muskulatur, Subkutis und Periost.

In den Arteriolen zeigten sich der Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung, der Zeitpunkt des 50%igen Gefäßverschlusses und der Zeitpunkt des vollständigen Gefäßverschlusses im Vergleich zum Kontrollkollektiv in allen Hitzeschock-Kollektiven frühzeitiger. Am stärksten ausgeprägt war dies im 24h-HS-Kollektiv; hier war eine Plättchenanlagerung 3mal früher, der Zeitpunkt der 50%igen Gefäßokklusion und der Zeitpunkt der vollständigen Gefäßokklusion 4mal so schnell zu beobachten.

Gleiches konnte in den Venolen beobachtet werden. Alle Zeitpunkte traten in den Hitzeschock-Kollektiven früher auf. Auch hier wurde die stärkste Ausprägung im 24h-HS-Kollektiv festgestellt. Generell wurden die untersuchten Zeitpunkte 3fach so schnell erreicht. Die nachfolgenden Abbildungen zeigen dies für die Gewebe Muskulatur (Abb. 22), Subkutis (Abb. 23) und Periost (Abb. 24). Die Arteriolen (A) werden links und die Venolen (B) rechts dargestellt. Es finden sich keine gewebespezifischen Unterschiede.

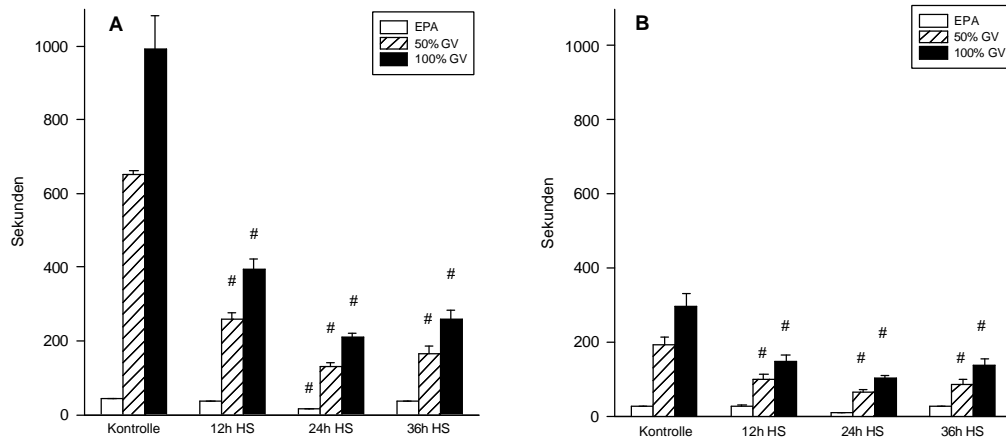


Abbildung 22: Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50% Gefäßverschlusses (50% GV) und des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für Arteriolen (A) und Venolen (B) in der Muskulatur.

MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

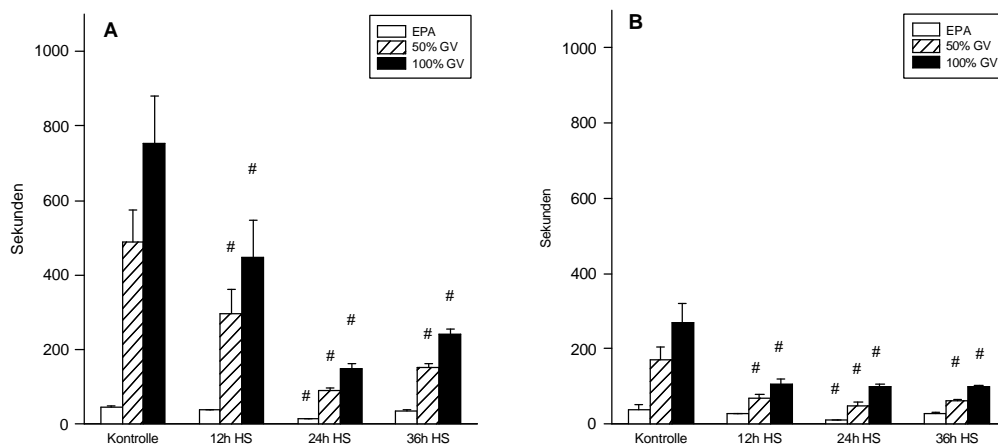


Abbildung 23: Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50% Gefäßverschlusses (50% GV) und des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für Arteriolen (A) und Venolen (B) in der Subkutis.

MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

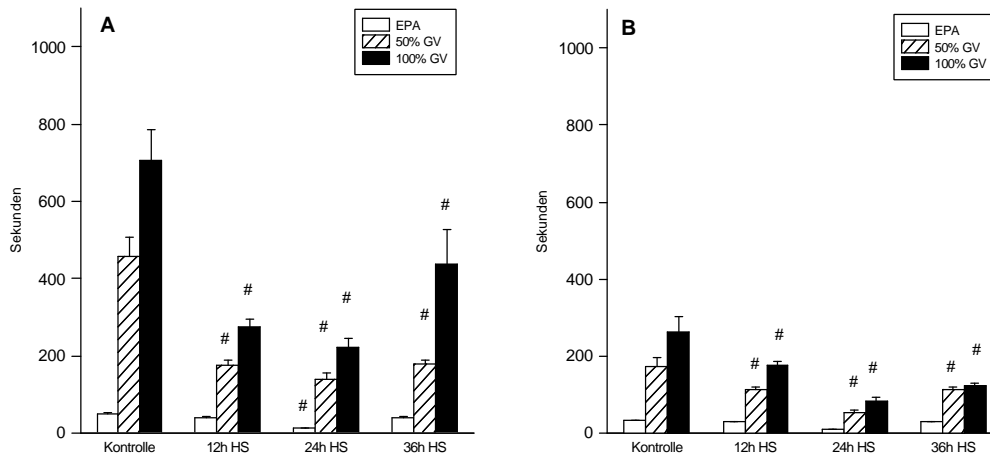


Abbildung 24: Zeitpunkte der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50% Gefäßverschlusses (50% GV) und des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für Arteriolen (A) und Venolen (B) im Periost.

MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

5.5. Einfluß von Antioxidantien auf die lichtinduzierte Thrombogenese

Um die Auswirkung von Sauerstoffradikalen auf die lichtinduzierte Thrombogenese zu untersuchen, wurde bei dieser Fragestellung dem Kontrollkollektiv die Gruppen SnPPIX kl, SnPPIX und 24h HS gegenüber gestellt. 24 Stunden vor Versuchsbeginn wurde den Tieren der Kollektive SnPPIX und SnPPIX kl als Antioxidans SnPPIX verabreicht.

Auch hier wurden die Zeitpunkte der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50%igen Gefäßverschlusses und des vollständigen Gefäßverschlusses für die Gruppen Kontrolle, SnPPIX, 24h HS und SnPPIX kl, getrennt nach Arteriolen und Venolen für die Gewebe: Muskulatur, Subkutis und Periost beurteilt.

In Abhängigkeit von den Geweben zeigten sich in den Arteriolen die Zeitpunkte der ersten Plättchenanlagerung, des 50%igen Gefäßverschlusses und des vollständigen Gefäßverschlusses in den Stress konditionierten Kollektiven 24h HS und SnPPIX deutlich früher. So waren im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv im 24h HS-Kollektiv der Zeitpunkt der

ersten Plättchenanlagerung in etwa $\frac{1}{3}$ der Zeit, der Zeitpunkt der 50%igen Gefäßokklusion in etwa $\frac{1}{4}$ der Zeit und der Zeitpunkt der vollständigen Gefäßokklusion in etwa $\frac{1}{4}$ der Zeit erreicht. Die Ergebnisse des SnPPIX-Kollektives waren mit denen des 24h HS-Kollektives und die Ergebnisse des SnPPIX kl-Kollektives waren mit denen des Kontroll-Kollektives vergleichbar.

In den Venolen zeigten sich im 24h HS-Kollektiv die Zeitpunkte der ersten Plättchenanlagerung, des 50%igen Gefäßverschlusses und des vollständigen Gefäßverschlusses im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv in etwa $\frac{1}{3}$ der Zeit. Auch hier waren die Ergebnisse des SnPPIX-Kollektives mit denen des 24h HS-Kollektives und die Ergebnisse des SnPPIX kl-Kollektives mit denen des Kontroll-Kollektives vergleichbar. Dies ist graphisch dargestellt in den nachfolgenden Abbildungen für die Muskulatur (Abb. 25), die Subkutis (Abb. 26) und das Periost (Abb. 27). Die Arteriolen (A) werden links und die Venolen (B) rechts dargestellt. Auch hier finden sich keine gewebespezifischen Unterschiede.

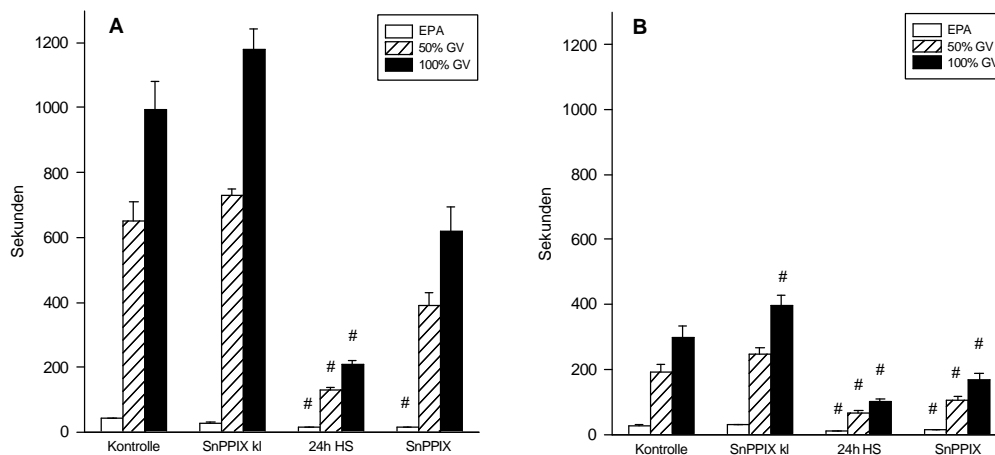


Abbildung 25: Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50% Gefäßverschlusses (50% GV) und des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für Arteriolen (A) und Venolen (B) in der Muskulatur. MW \pm SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

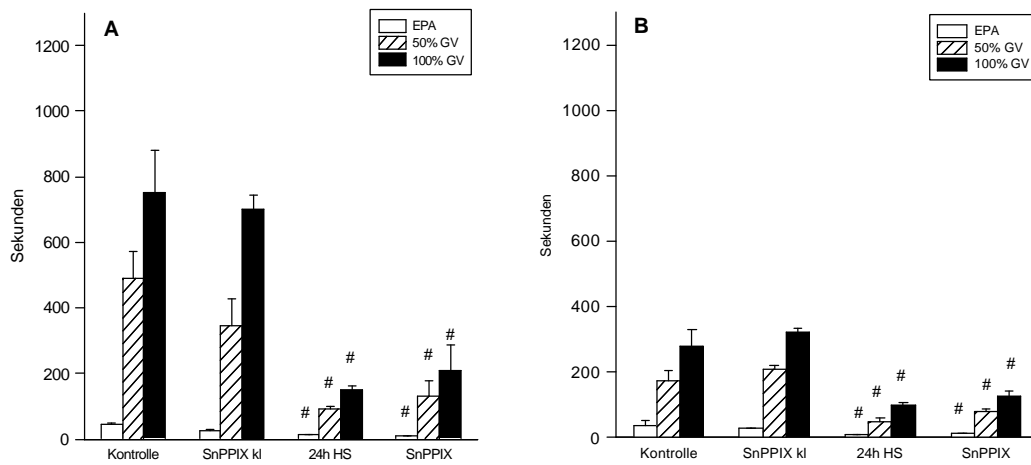


Abbildung 26: Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50% Gefäßverschlusses (50% GV) und des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für Arteriolen (A) und Venolen (B) in der Subcutis.

MW ± SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

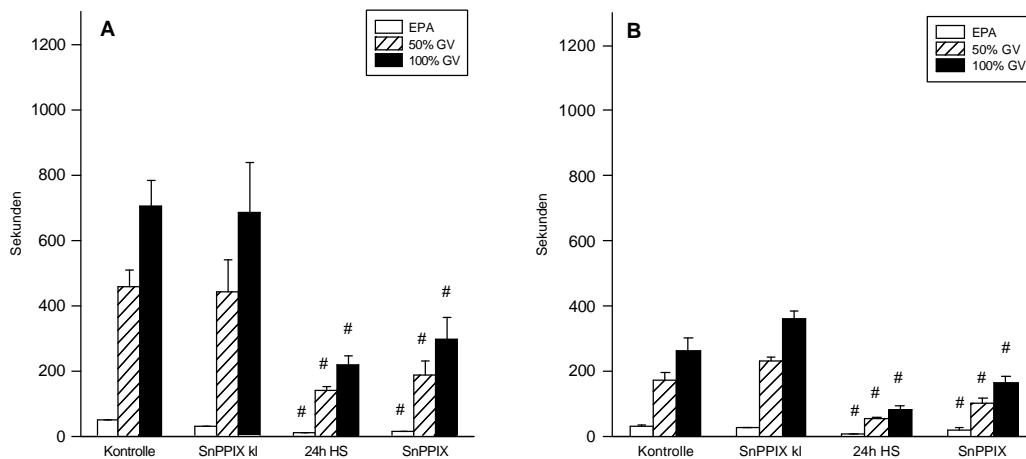


Abbildung 27: Zeitpunkt der ersten Plättchenanlagerung (EPA), des 50% Gefäßverschlusses (50% GV) und des vollständigen Gefäßverschlusses (100% GV) für Arteriolen (A) und Venolen (B) im Periost.

MW ± SEM; #p < 0,05 vs. Kontrolle.

5.6. Immunhistochemie

Der Nachweis der signifikant erhöhten Expression von Hitzeschockprotein 32 nach vorangegangener Stresskonditionierung war in den untersuchten Geweben Muskulatur, Subkutis und Periost eindeutig nachweisbar.

Die quantitative Auswertung der histologischen Hitzeschock-Protein-32-Anfärbung zeigte nur eine Expression im Hitzeschock-Kollektiv und im Kälteschock-Kollektiv. Die Ergebnisse der Auswertung zeigt Tabelle 1, links für Arteriolen und rechts für Venolen. In Klammern ist der Standardfehler des Mittelwertes angegeben (MW \pm SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle).

Tabelle 1: Histologische Auswertung der Hitzeschock-Protein-32-Anfärbung.

Gruppe	Muskulatur		Subkutis		Muskulatur		Subkutis	
	Arteriole		Arteriole		Venole		Venole	
Kontrolle	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)	0,0	(0,0)
24h HS	3,7*	(0,2)	3,6*	(0,2)	3,7*	(0,1)	3,6*	(0,2)
24h KS	3,8*	(0,1)	3,7*	(0,1)	3,6*	(0,2)	3,8*	(0,1)

Die folgenden Abbildungen zeigen histologisch die erhöhte Expression von HSP 32 im Endothel der Arteriolen und Venolen des Kontroll-Kollektives, des 24h HS-Kollektives und des 24h KS-Kollektives exemplarisch in die Muskulatur. In den Abbildungen sind links die Arteriolen und rechts die Venolen dargestellt.

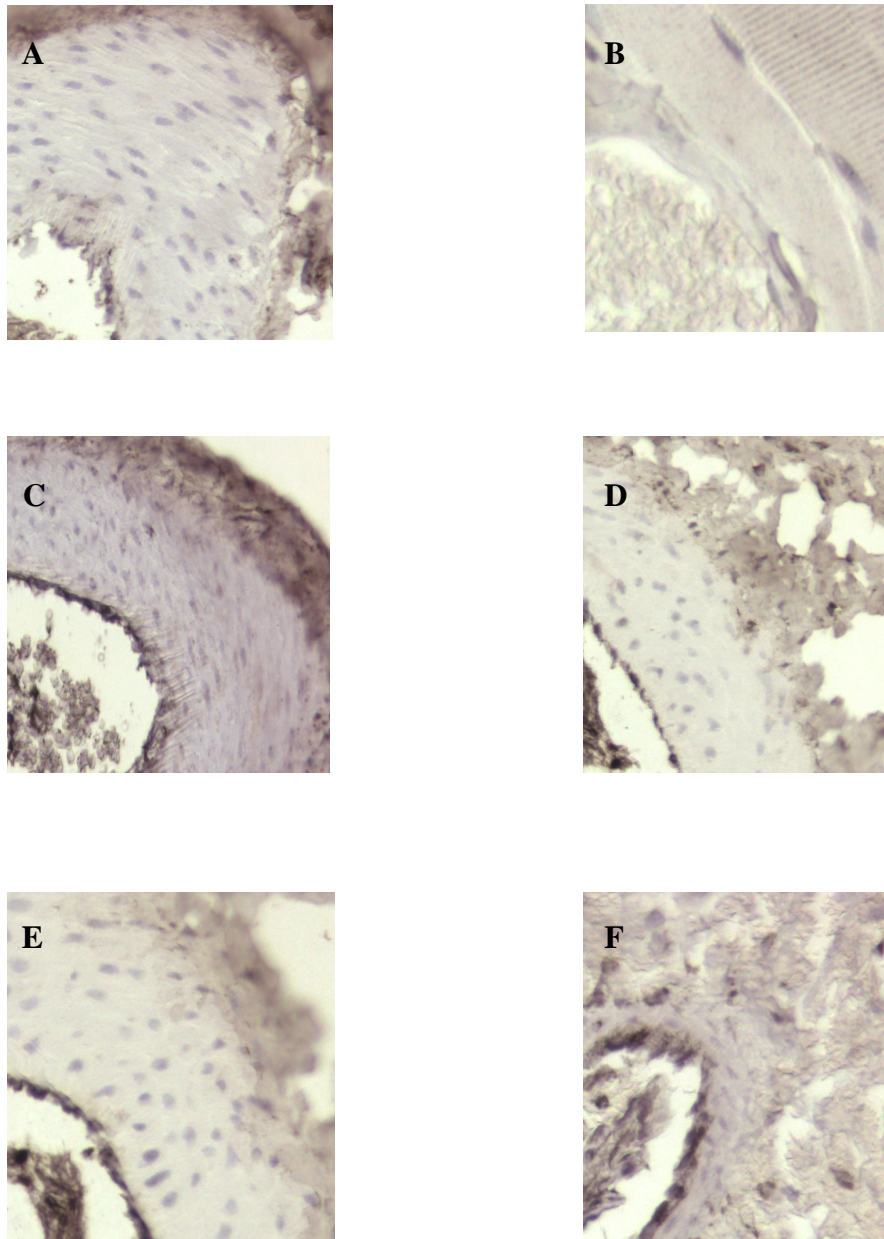


Abbildung 28: Immunhistochemische Anfärbung von Hitzeschockprotein 32 im Endothel des Kontrollkollektives (A,B), des 24h Hitzeschockkollektives (C,D) und des 24h Kälteschockkollektives (E,F).

Eine Expression von HSP 32 konnte nur im Hitzeschock-Kollektiv und Kälteschock-Kollektiv eindeutig nachwiesen werden.

Auch Thrombomodulin wurde für alle Gewebe für die Gruppen Kontrolle, 24h HS und 24h KS angefärbt. Hier zeigte sich im Gruppenvergleich eine signifikant erhöhte Expression von Thrombomodulin im 24h HS und 24h KS-Kollektiv. Links wurde eine Arteriole des Kontroll-Kollektives und rechts eine Arteriole des 24h Hitzeschockkollektives dargestellt.

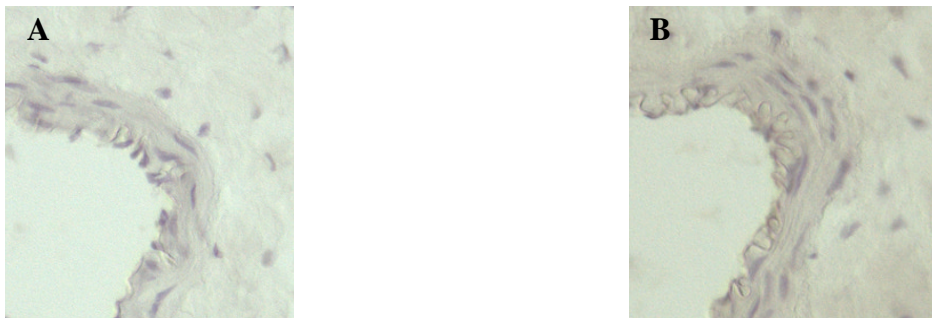


Abbildung 29: Immunhistochemische Anfärbung von Thrombomodulin des Endothels einer Arteriole des 24h Hitzeschockkollektives (A) und des Kontrollkollektives (B).

Die quantitative Auswertung der histologischen Thrombomodulinanfärbung wies im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv eine Mehrexpression von Thrombomodulin sowohl im Hitzeschock-Kollektiv als auch im Kälteschock-Kollektiv nach. Die Ergebnisse der Auswertung zeigt nachfolgende Tabelle, links für Arteriolen und rechts für Venolen. In Klammern ist der Standardfehler des Mittelwertes angegeben (MW \pm SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle).

Tabelle 2: Histologische Auswertung der Thrombomodulin-Anfärbung.

Gruppe	Muskulatur		Subkutis	
	Arteriole		Arteriole	
Kontrolle	1,9	(0,2)	1,4	(0,2)
24h HS	3,0*	(0,2)	2,8*	(0,2)
24h KS	3,1*	(0,1)	3,0*	(0,3)

Desweiteren wurde Thrombospondin-1 immunhistochemisch für die Gruppen Kontrolle, 24h Hitzeschock und 24h Kälteschock angefärbt. Tabelle 3 stellt die durchschnittliche Färbeintensität für die o.g. Gruppen dar, links für Arteriolen und rechts für Venolen dar. In Klammern ist der Standardfehler des Mittelwertes angegeben (MW \pm SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle).

Tabelle 3: Histologische Auswertung der Thrombospondin-1 Anfärbung.

Gruppe	Muskulatur	Subkutis	Muskulatur	Subkutis
	Arteriole	Arteriole	Venole	Venole
Kontrolle	0,92 (0,40)	1,17 (0,32)	1,41 (0,17)	1,72 (0,27)
24h HS	3,05* (0,30)	2,70* (0,20)	2,82* (0,32)	2,90* (0,39)
24h KS	2,67* (0,30)	2,80* (0,24)	3,00* (0,40)	2,70* (0,30)

Die nachfolgenden immunhistochemischen Bilder zeigen die Thrombospondin-1 Färbungen an Arteriolen und Venolen für die Kollektive 24h Hitzeschock, 24h Kälteschock und Kontrolle. Die Arteriolen werden links und die Venolen rechts abgebildet. Im Vergleich zum Kontroll-Kollektiv zeigen sich signifikant stärkere Anfärbungen von Thrombospondin-1 im 24h Hitzeschock-Kollektiv und im 24h Kälteschock-Kollektiv.

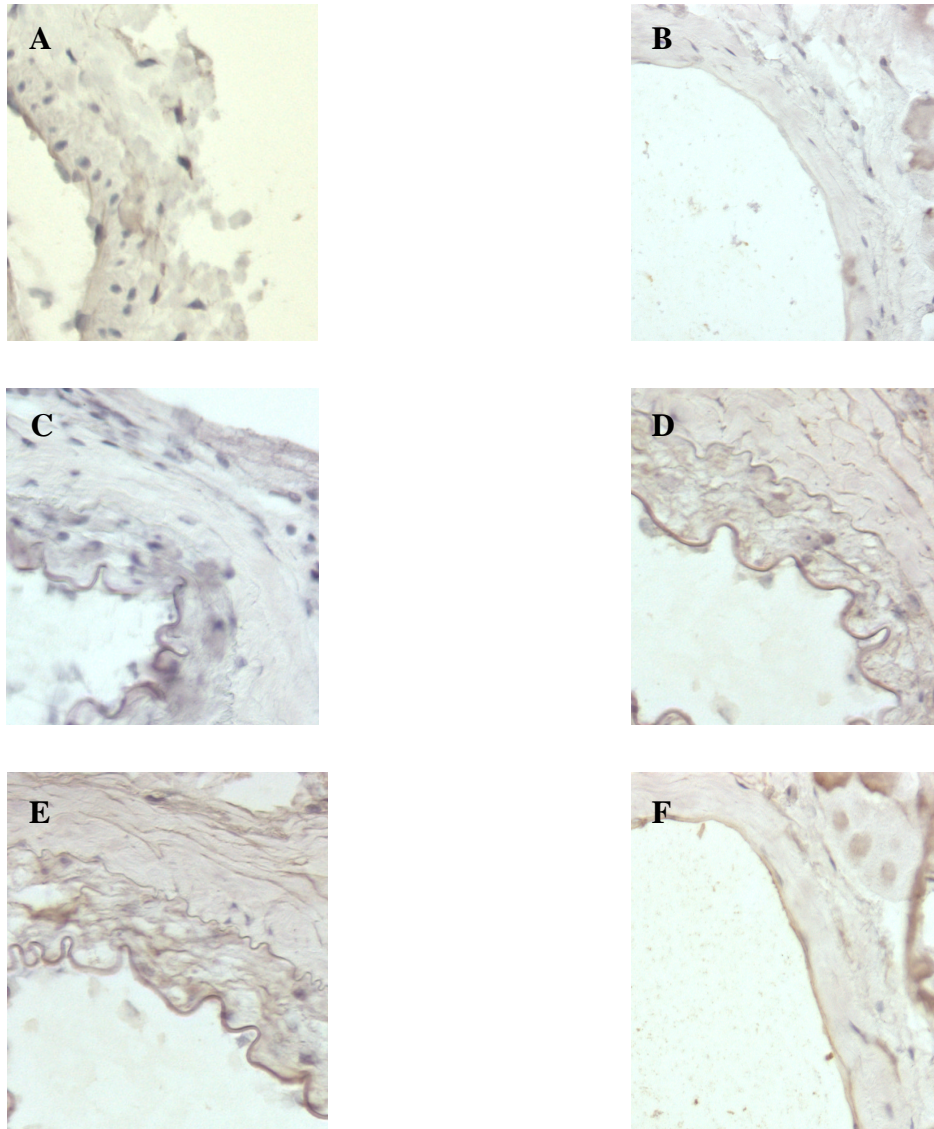


Abbildung 30: Immunhistochemische Anfärbung von Thrombospondin-1 im Endothel des Kontroll-Kollektives (A,B), des 24h Hitzeschock-Kollektives (C,D) und des Kälteschock-Kollektives (E,F).

Es konnte anhand der Auswertung der Thrombospondin-1-Färbung nachgewiesen werden, dass sowohl Kälteschock und als auch Hitzeschock zu einer nennenswerten Erhöhung der Thrombospondin-1 Expression führt.

Zuletzt wurde noch eine Von Willebrand Färbung an Formalin fixierten und in Paraffin eingebetteten Präparaten der Muskulatur und der Subkutis für die Gruppen Kontrolle, 24h HS und 24h KS durchgeführt; auch hier wurde der durchschnittliche Färbegrad des Endothels bestimmt. Dieser korreliert mit der Von Willebrand Faktor Konzentration im Endothel der untersuchten Arteriolen und Venolen. Diese Ergebnisse können der nächsten Tabelle entnommen werden. Die Standardabweichungen des Mittelwertes befinden sich in Klammern (MW \pm SEM; *p < 0,05 vs. Kontrolle).

Tabelle 4: Histologische Auswertung des von Willebrand Faktors.

Gruppe	Muskulatur Arteriole	Subkutis Arteriole	Muskulatur Venole	Subkutis Venole
Kontrolle	1,70 (0,19)	1,23 (0,15)	1,44 (0,18)	1,45 (0,15)
24h HS	3,38* (0,08)	3,51* (0,14)	3,50* (0,11)	3,31* (0,20)
24h KS	3,52* (0,18)	3,55* (0,22)	3,33* (0,21)	3,43* (0,23)

Sowohl im 24h HS Kollektiv als auch im 24h KS Kollektiv zeigt sich in allen Geweben eine signifikant stärkere von Willebrand Färbung des Endothels in Arteriolen und Venolen im Vergleich mit dem Kontrollkollektiv.

In der nachfolgenden Abbildung werden die histologischen Schnitte der von Willebrand Färbung für die Gruppen Kontrolle, 24h HS und 24h KS dargestellt. Die Arteriolen werden links und die Venolen rechts abgebildet.

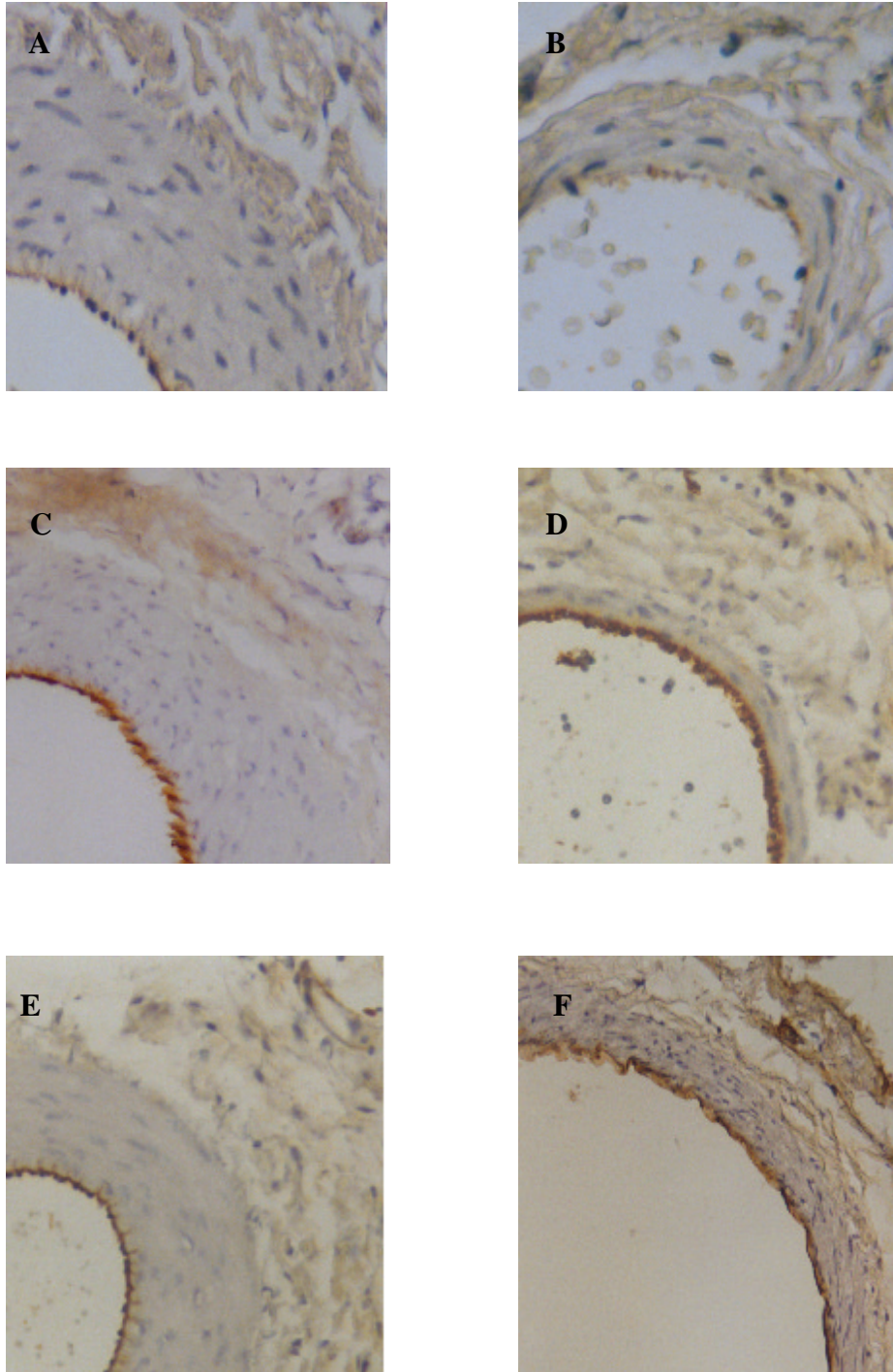


Abbildung 31: Immunhistochemische Anfärbung des Von Willebrand Faktors im Endothel des Kontroll-Kollektives (A,B), des 24h-Hitze-schock-Kollektives (C,D) und des Kälteschock-Kollektives (E,F).

5.7. Elektronenmikroskopie

Muskulatur, Subkutis und Periost der Gruppen Kontrolle und 24h HS wurden elektronenmikroskopisch untersucht. Hierbei zeigte sich in beiden Fällen ein unbeschädigtes Endothel; mikroskopische Veränderungen waren nicht erkennbar.

Die Anordnung der Endothelzellen, die Basalmembran und die Pericyten zeigten sich intakt. Die Endothelzellen waren an der Basalmembran adhären, die interzelluläre desmosomale Verbindung intakt. Es war kein Anhalt auf eine Zellschädigung erkennbar; somit waren auch Schwellungen oder Veränderungen der Mitochondrienmatrix nicht nachweisbar.

Dies zeigt die transmissionselektronenmikroskopische Abbildung 32.

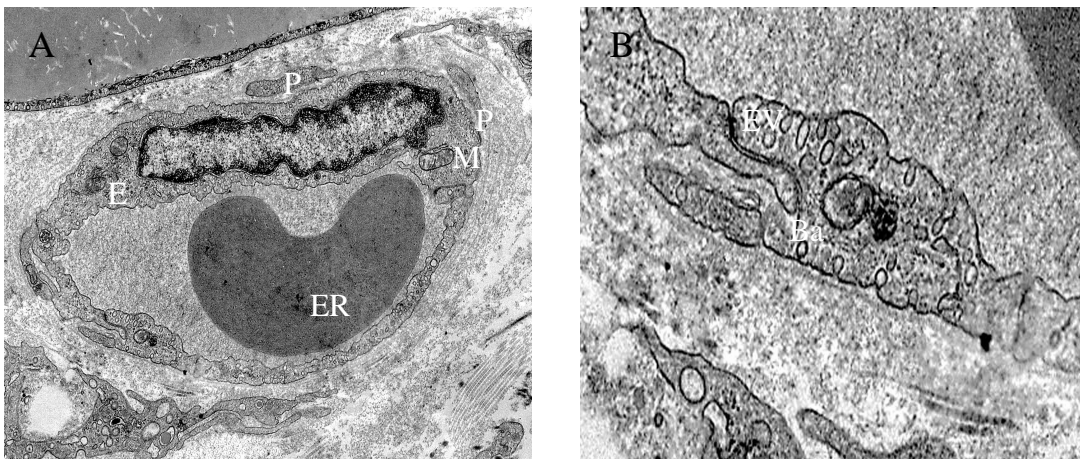


Abbildung 32: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer submukösen Kapillare nach Hitzeschock-Vorbehandlung. Es zeigen sich die Endothelzelle (E), die Endothelzellverbindung (EV), Pericyt (P), die Basalmembran (Ba), ein Erythrocyt (ER) und ein Mitochondrien (M). Vergrößerung x7500 (A), x15000 (B).

6. DISKUSSION

Die vorliegende Studie zeigt unter Verwendung der intravitalen Fluoreszenz-Mikroskopie, dass Stresskonditionierung durch Hitze und Kälte die Thrombusentstehung an der verletzten Endotheloberfläche bei verschiedenen peripheren Geweben beschleunigt.

Die stärkste Ausprägung zeigte sich nach vierundzwanzig Stunden. Auch die zusätzliche Ausschaltung der antioxidativen Wirkung von HSP 32 durch SnPPIX zeigte keine signifikante Beeinflussung der Geschwindigkeit der Thrombusentstehung.

Vierundzwanzig Stunden nach Hitzeschock und Kälteschock zeigte sich histologisch eine signifikant erhöhte Expression von Hitzeschockprotein 32, Thrombomodulin und Thrombospondin-1. Elektronenmikroskopisch konnte nach Stresskonditionierung keine Zellschädigung nachgewiesen werden. Die immunhistochemische Auswertung des von Willebrand Faktors erbrachte, dass sowohl im Endothel des 24h Hitzeschock-Kollektivs als auch des 24h Kälteschock-Kollektivs eine signifikant stärkere Expression des von Willebrand Faktors aufzufinden war.

6.1. Modell

Es wurde nur von wenigen Modellen berichtet, die eine direkte in vivo Visualisation der komplexen Pathogenese einer Thrombusbildung ermöglichen [JOURDAN 1995, LAUX 1993, ROESKEN 1997]. Die Limitation dieser Modelle besteht darin, dass sie nur auf ein Gewebe fokussiert sind. Jedoch gefährdet die Gefäßchirurgie und die rekonstruktive Chirurgie mehr als ein Gewebe. Aufgrund der Dimensionen der untersuchten Gewebe war die Anwendung der Durchlichttechnik nicht möglich; eine Auflichttechnik war erforderlich. Mit der Technik der intravitalen Mikroskopie konnten die Gewebe: Muskulatur, Subkutis und Periost im Rahmen derselben Präparation analysiert werden. Zum ersten Mal war es möglich, dass gleichzeitig an verschiedenen Geweben die Thrombogenese sowohl in arteriellen, als auch in venösen Mikrogefäßen quantifiziert wurde. Deshalb führten wir ein Modell ein, welches eine direkte Beobachtung des ganzen Prozesses der Thrombusbildung in verschiedenen peripheren Geweben mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie erlaubt. Diese erschien als direkte Untersuchungsmethode am besten geeignet [MENGER und LEHR 1993].

Da die Ratte für mikrochirurgische Eingriffe groß genug ist, zeigt sie sich besonders für intravital mikroskopische Untersuchungen geeignet.

Für die Gefäßthrombogenese sind die freien Sauerstoffradikale der pathophysikalische Schlüssel [AMBROSIO 1997]. Daher wurde für diese Untersuchung ein Modell gewählt, bei dem die Thrombusbildung durch eine photochemische Reaktion ausgelöst wird. Diese Reaktion wird durch transmurale kontinuierliche lokale Lichtexposition (100 W Quecksilberdampflampe; Wellenlänge: 450-490 nm) ausgelöst und intravenöse Gabe von 1,5 ml 5% Fluorescein Isothiocyanat (FITC; MW 150.000, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) ausgelöst. Die Phototoxizität von FITC führt über die Entstehung von freien Sauerstoffradikalen zu einer Endothelschädigung, welche zu einer Adhärenz von Plättchen an der Gefäßwand, Plättchenaggregation und schließlich zu einer Thrombusbildung führt. Somit ist unser Modell der Thrombogenese geeignet, als Antwort auf die Lichtexposition, einen Endothelschaden und im weiteren Zeitverlauf eine Thrombusbildung zu induzieren, die vergleichbar ist mit der Thrombenbildung in anderen Studien [LAUX 1993, ROESKEN et al. 1997, SIEGEL 1994].

6.2. Thrombogenese nach Stresskonditionierung

Nach WYNN und Mitarbeitern [1994] führt Hitzeschock zu einer schnellen Produktion einer speziellen Art von Stressproteinen, den Hitzeschockproteinen. Diese können bei Säugetieren durch Temperaturen $> 37^{\circ}\text{C}$ und oxidativen Stress entstehen. Aber auch durch Entzündungen (bakteriell oder viral) oder Sauerstoffmangel [Hall 1994], wie beispielweise bei Hemorrhagie oder Ischämie können Hitzeschockproteine als Stressantwort in jeder lebenden Zelle produziert werden.

Eine Hypothermie Vorbehandlung, auch als Kälteschock bezeichnet, induziert genau wie eine Hyperthermie Vorbehandlung eine Hitzeschockproteinproduktion [KELTY and LEE 2001] und führt zu einer Ischämie-Toleranz. Sie tritt einige Stunden nach Präkonditionierung auf und hält bis zu einigen Tagen an [KUMAR et al. 1995, LAIOS et al. 1997, MOTOYOSHI et al. 2001]. Eine Kälteschockvorbehandlung kann sogar zu einer verlängerten Produktion von Hitzeschockproteinen führen [MOTOYOSHI et al. 2001].

Da eine lokale Kühlung genauso effektiv zu sein scheint wie eine globale, können durch Anwendung einer lokalen Kältevorbehandlung mögliche Komplikationen einer systemischen Hypothermie vermieden werden [YUNOKI et al. 2002].

Daher wurden in der vorliegenden Studie sowohl die lokale Hypo- als auch Hyperthermie als Stressstimulus zur Induktion von Hitzeschockproteinen verwandt. Dies konnte immunhistochemisch nachgewiesen werden. Die Hitzeschockexpression war nach 24 Stunden am stärksten ausgeprägt.

Die durch Hitzeschock oder Kälteschock induzierte Stressantwort ist charakterisiert durch eine vorübergehende, verminderte Produktion der meisten zellulären Produkte und durch Hochregulation von Hitzeschockproteinen. Diese sorgen für einen Schutz von Zellen [FRANCELLA und RENSING 1995]; die Zellen zeigen eine erhöhte Stresstoleranz; zelluläre Prozesse wie die Proteinsynthese werden stabilisiert [DE MAIO 1995, RIBEIRO et al. 1995]. Hitzeschockproteine dienen als Protektionsproteine und helfen bei der Reparatur beschädigter Proteine; sie verhindern Fehlfaltungen bei der Proteinsynthese, fungieren als Modulations- und Regulationsproteine und sind in das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung involviert. Dadurch zeigen Zellen nach Expression von Hitzeschockproteinen eine erhöhte Stresstoleranz, insbesondere vor Läsionen, die mit einer anwachsenden Produktion von ROS (reactive oxygen species) und Cytokinen assoziiert sind [SARLIN et al. 1994].

Weiterhin fördert die Stresskonditionierung die Lebensfähigkeit von durch Ischämie und Reperfusion gefährdeten Geweben [KUBULUS 2004, RÜCKER 2001a, KINNUNEN 2002]. Auch in der vorliegenden Studie fand eine Hochregulation von Hitzeschockprotein 32 durch Hitzeschock und Kälteschock Vorbehandlung statt [RÜCKER 2001a,b, KUBULUS in press]. So ist Hitzeschockprotein 32, auch bekannt als Hämoxxygenase-1 [WOO 1998], die vor Gewebeschädigung bewahren kann [ROESKEN und Mitarbeiter 1998, MAINES und PANAHIAN 2001], von besonderem Interesse. Diese Fakten lassen eine gesteigerte Erfolgswahrscheinlichkeit für kutane Lappen bei präoperativer Hypothermie und Hyperthermie Konditionierung erwarten [SALMIAM und Mitarbeiter 1999].

Hämoxxygenase-1 spaltet Häm in gleichmolare Anteile von Biliverdin, Kohlenmonoxid und Eisen [MAINES 1988, KEYSE 1989]. Die Biliverdin-Reduktase katalysiert die Reduktion von Biliverdin zu Bilirubin [CHOI und ALAM 1996]. Sowohl Biliverdin als auch Bilirubin sind in vivo potente Antioxidantien, die freie Sauerstoffradikale eliminieren können [STOCKER et al. 1987, LLESUY und TOMARO 1994].

Kohlenmonoxid verursacht eine Vasodilatation durch Relaxation der Actinfilamente, die in Zellen der glatten Muskulatur enthalten sind [FURCHTGOTT 1991, SUEMATSU 1995]. Außerdem gibt es Beweise, dass Hitzeschockprotein 32 positiv den Blutfluß beeinflusst [BRÜNE 1987]. Folglich können die beobachteten höheren Blutflussraten in den Arteriolen des konditionierten Gewebes im Vergleich mit den Arteriolen des unbehandelten Gewebes gleichen Gefäßdurchmessers durch den Abfall des Kapillarflusswiderstandes verursacht sein. Jedoch, zeigte sich in vorliegender Untersuchung trotz dieser vasodilatativen, antioxidativen und anitkoagulatorischen Eigenschaften nach jedem Hitzeschock oder Kälteschock eine signifikante Beschleunigung der Thrombusbildung nach Stresskonditionierung.

In Arteriolen zeigte sich der Zeitverlauf einer Thrombusbildung im Vergleich zu den Venolen des entsprechenden Gewebes signifikant verzögert. Diese Tatsache wurde bereits in vorangegangenen Studien beschrieben [ROESKEN 1997, ROESKEN 1998] und scheint hauptsächlich durch die verschiedenen Reaktionen der Arteriolen und Venolen auf die Licht/Farbstoff Exposition verursacht zu sein [SATO und OHSHIM 1990]. Eine weitere Ursache könnte in einer unterschiedlichen Expression von anti-aggregatorischen und pro-aggregatorischen Substanzen im venösen und im arteriellen Endothel liegen [ROSENBLUM 1986]. Jedoch ist der endogene Mechanismus, der der Thrombusbildung entgegenwirkt, in Arteriolen noch nicht endgültig geklärt.

Nach Stresskonditionierung zeigte sich neben der erhöhten Expression von Hitzeschockproteinen auch eine erhöhte Expression von Thrombomodulin und Thrombospondin-1.

Thrombomodulin wird vor allem auf der Oberfläche von Gefäßendothelzellen exprimiert und bildet als vaskuläres Endothelzelltransmembran-Protein einen eins zu eins Komplex mit Thrombin. Dieses Interaktionsprodukt ist die Basis des physiologisch wichtigen natürlichen Antikoagulationssystems [CONWAY et al. 1994].

Die Bindung von Thrombin an das Thrombomodulin der Endothelzellen neutralisiert die prokoagulatorische Aktivität des Thrombins und aktiviert in weiterer Folge das Protein C [ESMOS 1995].

Aktiviertes Protein C (APC) inaktiviert in Gegenwart von Protein S (PS) die Faktoren VIIIa und Va, hemmt somit die Feedback-Aktivierung von Thrombin und verzögert und vermindert dadurch die Thrombinbildung [GALLISTL 2001].

Auch die Expression von Thrombospondin-1 zeigte sich nach Stresskonditionierung gesteigert [KETIS und Mitarbeiter 1988, 1990]. Thrombospondin-1 ist ein Plättchen alpha-Granula adhäsives Glykoprotein (M = 450,000), welches in großer Menge von aktivierten Plättchen und Teilen der Thrombusformation freigesetzt wird und die Plättchenaggregation um 30-50% inhibiert [RABHI-SABILE et al. 1996].

Jedoch besitzt Thrombospondin-1 nicht nur antiadhäsive Eigenschaften durch Hemmung der Plättchenaggregation unter geringen zweiwertigen Ionen Bedingungen, sondern auch adhäsive Eigenschaften durch Fördern der Plättchenadhäsion bei normalen zweiwertigen Ionenbedingungen.

Thrombospondin-1 bildet einen molekularen Komplex mit vielen Plättchen adhäsiven Proteinen, einschließlich Fibrinogen, Kollagen, Laminin, Glycoprotein, Plasminogen und von Willebrand Faktor [AGBANYO et al. 1993, SILVERSTEIN 1985].

Thrombospondin-1 vermittelt eine adhäsive Wechselwirkung zwischen Thrombin stimulierten Plättchen und U937 Zellen (Monozyten ähnliche menschliche Zell-Linie U937) und menschlichen Blutmonozyten. Thrombospondin-1 dient als molekulare Brücke, welche aktivierte Plättchen mit Monozyten zum Zeitpunkt der frühen Endothelzellschädigung verbindet [GROSSFELD et al. 1996, SILVERSTEIN und NACHMANN 1987]. Weiterhin dient Thrombospondin-1 dazu, die Fibrinogenbindung an aktivierter Plättchenoberfläche zu stabilisieren und somit die Zwischenplättcheninteraktion zu stärken.

Die Glykoprotein IIB/IIIa Fibrinogeninteraktion bestimmt über die Reversibilität der Plättchenaggregation [LEUNG 1984].

Die Plättchenadhäsion wird von Thrombospondin-1 bei mittleren Scherraten und von dem von Willebrand Faktor bei hohen Scherraten unterstützt [TSAI 2003]. Eine maximale Plättchenaggregation kann bei mittleren Scherraten durch das Vorliegen beider Proteine erzielt werden [AGBANYO et al. 1993].

In der vorliegenden Studie wurde Thrombospondin-1 nur nach Stresskonditionierung signifikant verstärkt exprimiert. Obwohl Thrombomodulin und Thrombospondin-1 die Thrombogenese eher verlangsamen, kam es in allen Stress konditionierten Kollektiven im Vergleich zum Kontrollkollektiv zu einer Beschleunigung der Thrombogenese.

Grund für die beschleunigte lichtinduzierte Thrombogenese scheint die signifikant erhöhte Expression insbesondere der stark koagulatorisch wirksamen langkettigen von Willebrand Faktor Multimere nach Stresskonditionierung zu sein.

Dies deckt sich mit den von ANG und DAWES 1994 veröffentlichten Daten, die eine gesteigerte Sekretion des von Willebrand Faktors und von Thrombospondin-1 in vitro bei Hitzeschockvorbehandlung belegen.

Der von Willebrand Faktor ist ein Träger für den Prokoagulationsfaktor VIII und schützt diesen vor Inaktivierung durch Protein C und Faktor Xa im zirkulierenden Blut. Von Willebrand Faktor wird im Gefäßendothel und von Megakaryozyten synthetisiert und zirkuliert im Blut in Form vieler Multimere. Plasmatischer von Willebrand Faktor befindet sich überwiegend im Gefäßendothel und ist von einer geringeren durchschnittlichen Multimergröße als der von Willebrand Faktor der Subendothelmatrix. Insbesondere die langen Multimerformen des von Willebrand Faktors sind hämostatisch aktiv; diese haben eine beträchtlich höhere Ristocetin Cofaktor Aktivität pro Einheit Antigen als kleinere Multimere. So spielen die großen von Willebrand Faktor Multimere eine zentrale Rolle bei der arteriellen Thrombose [PIRMANANDA und HOOG 2002].

Thrombospondin-1 reduziert die durchschnittliche Multimergröße des von Willebrand Faktors. Je höher das Verhältnis von Thrombospondin-1 zu von Willebrand Faktor, desto geringer ist die durchschnittliche von Willebrand Faktor Multimergröße [XIE et al. 2001].

Andererseits ist bekannt, dass nicht nur Thrombospondin-1 sondern auch eine in den Endothelzellen vorkommende Protease die durchschnittliche Multimergröße des von Willebrand Faktors reduziert. Diese proteolytische Aktivität kann durch Hitzeschock-Vorbehandlung vermindert werden [XIE et al. 2000].

Weiterhin spielt der von Willebrand Faktor und seine Interaktion mit Plättchenrezeptoren, einschließlich GP Iba und GP Iib/IIIa eine wesentliche Rolle nicht nur bei der Plättchenaggregation, sondern auch bei der Plättchenadhäsion und möglichen Plättchenkohäsion [GOTO 2004]. Über Interaktion des thrombozytären Rezeptors Glykoprotein (GP) Ib-V-IX mit immobilisiertem von Willebrand Faktors wird der erste Kontakt zirkulierender Thrombozyten mit der subendothelialen Matrix hergestellt (Kontaktphase). Die Interaktion des von Willebrand Faktors mit GP Ib-V-IX ist charakterisiert durch eine sehr hohe Affinität. So zeigte sich auch in vorliegender Studie eine frühere Plättchenanlagerung in den Stress konditionierten Kollektiven.

Es kann festgehalten werden, dass die Unterbrechung der Endothelschicht und die anschließende Exposition der prothrombotischen subendothelialen Strukturen nach Stresskonditionierung nicht für die beobachtete Beschleunigung der Thrombusbildung verantwortlich sein können. Die elektronenmikroskopische Untersuchung konnte keine strukturellen Schädigungen der Gefäßwand nach Stresskonditionierung weder nach Hitzeschock, noch nach Kälteschock nachweisen. Trotz der Zunahme der Wand-Scher-Raten, welche gut mit der stärkeren Thrombogenese korrelieren [SATO 1990, GOTO 1998], kann dies in vorliegender Studie nicht als Ursache für die beschleunigte Thrombogenese gesehen werden. Denn nach Stresskonditionierung wurde die beschleunigte Thrombusbildung sowohl in Arteriolen als auch bei Venolen in annähernd gleichem Ausmaße beobachtet, jedoch konnte ein Anwachsen der Wand-Scher-Raten nur bei den Arteriolen festgestellt werden. Dies könnte durch eine Dilatation der Venolen als Antwort auf die Erhöhung des Blutflusses bedingt sein [KOLLER 1998].

Der von Willebrand Faktor fördert die Plättchenadhäsion am beschädigten Endothel und die Plättchen-Plättchen-Aggregation wie auch die Koagulationskaskade durch Unterstützung des Faktors VIII [GOTO 1998, FEDERICI 2003]. Auf diese Art ist der von Willebrand Faktor von entscheidender Bedeutung nicht nur für die Einleitung der Thrombogenese, sondern auch für das anschließende Anwachsen des Thrombus.

Nach Stresskonditionierung verläuft der gesamte Thrombogenese-prozeß beginnend mit der anfänglichen Plättchenanlagerung, gefolgt von einer sehr starken Beschleunigung des Thrombuswachstums bis hin zum kompletten Gefäßverschluß trotz der Induktion von Thrombospondin-1 schneller.

Dies unterstützt die Tatsache, dass obwohl langkettige von Willebrand Faktor Multimere eine höhere Affinität zur Plättchenaktivierung aufzeigen als kurzkettige, sogar die kleinen Multimere und monometrischen Fragmente des von Willebrand Faktors eine Plättchenaggregation induzieren [FURLAN 1996]. Außerdem hat die Immunhistochemie zum ersten Mal nachgewiesen, dass nach Stresskonditionierung eine signifikante Induktion des von Willebrand Faktors in Endothelzellen vorliegt. Die photochemische Schädigung des Endothels verursacht die Freisetzung des von Willebrand Faktors, der intrazellulär gespeichert wird. Deshalb ist die durch Stresskonditionierung induzierte Produktion des von Willebrand Faktors wohl verantwortlich für die beobachtete Beschleunigung der Thrombusbildung.

Diese wurde jedoch nur bei strukturell geschädigten Endothelzellen und niemals spontan bei intaktem Endothel beobachtet. Daher wird das Prinzip der Gewebsprotektion generell nicht in Frage gestellt. Jedoch könnte der Einsatz von Hitzeschock und Kälteschock insbesondere bei Patienten mit Gefäßerkrankungen, bei denen es durch Ruptur vorbestehender arteriosklerotischer Plaques zur spontanen Lyse von Endothelzellen kommt unerwünschte Nebenwirkungen zeigen.

Zusammengefaßt zeigte die vorliegende Studie, dass obwohl die thermische Stresskonditionierung partiell vasodilatativ, antioxidativ, antikoagulatorisch und antithrombotisch wirkt durch die Induktion von Hitzeschockprotein 32, Thrombomodulin und Thrombospondin-1, die intravaskuläre Thrombogenese in Arteriolen und Venolen nach Stresskonditionierung dennoch beschleunigt ist.

Diese verstärkte Thrombogenität im Endothel nach Stresskonditionierung ist wohl bedingt durch die Dominanz des in Endothelzellen der Muskulatur, der Subkutis und des Periostes hochregulierten prothrombotischen von Willebrand Faktors.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. AGBANYO FR, SIXMA JJ, DE Thrombospondin-Platelet Interactions;. J. Clin. GROOT PG, LANGUINO LR, PLOW Invest., Volume 92, July 1993,288-296.
EF
2. AMBROSIO G, TRITTO I, GOLINO Reactive oxygen metabolites and arterial
P thrombosis. Cardiovasc Res. 1997; 34:445-52.
3. ANG C, DAWES J The effect of hyperthermia on human endothelial
monolayers: modulation of thrombotic potential
and permeability, Blood Coagul Fibrinolysis
1994 Apr; 5(2): 193-9.
4. BAKER M, WAYLAND H On-line volume flow rate and velocity profile
measurement for blood in microvessels.
Microvasc Res. 1974; 7:131-43.
5. BALLA J, JACOB HS, BALLA G, Endothelial-cell heme uptake from heme
NATH K, EATON JW, proteins: induction of sensitization and
VERCELLOTTI GM desensitization to oxidant damage.
Proc Natl Acad Sci U S A. 1993 Oct
15;90(20):9285-9.
6. BENACQUISTA T, KASABIAN AK, The fate of lower extremities with failed free
KARP NS flaps, Plast Reconstr Surg 98, 834-842, 1996.
7. BRÜNE B, ULLRICH V Inhibition of platelet aggregation by carbon
monoxide is mediated by activation of guanylate
cyclase. Mol Pharmacol. 1987; 32:497-504.

-
8. CHOI AM, ALAM J Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 1996 Jul;15(1):9-19.
 9. CONWAY E, LIU L, NOWAKOWSKI B, STEINER-MOSONYI M, JACKMAN RW Heat shock of vascular endothelial cells induces an up-regulatory transcriptional response of the thrombomodulin gene that is delayed in onset and does not attenuate, *J. Biol. Chem.* 269: 22804-22810, 1994.
 10. CONWAY EM, LIU L, NOWAKOWSKI B, STEINER-MOSONYI M, JACKMAN RW Heat shock of vascular endothelial cells induces an up-regulatory transcriptional response of the thrombomodulin gene that is delayed in onset and does not attenuate, *J of Biological Chemistry*, Vol. 269, No. 36, Issue of September 9, pp. 22804-22810, 1994.
 11. CONWAY EM, LIU L, NOWAKOWSKI B, STEINER-MOSONYI M, JACKMAN RW Heat shock of vascular endothelial cells induces an up-regulatory transcriptional response of the thrombomodulin gene that is delayed in onset and does not attenuate. *J Biol Chem.* 1994 Sep 9;269(36):22804-10.
 12. DE MAIO A The heat-shock response, *New Horizons*, May 1995, Vol. 3, No. 2, pp. 198-207.
 13. DIEBERT E, STOCK W Osteomyokutanlappen, *Dtsch Z Mund Kiefer Gesichtschir* 15, 94-100, 1991.

-
14. DINMAN S, GIOVANNE MK The care and feeding of microvascular flaps: how nurses can help prevent flap loss. *Plast Surg Nurs.* 1994 Fall;14(3):154-64.
15. ESMON CT The regulation of natural anticoagulant pathways, *Science* 1987 Mar 13;235(4794):1348-52.
16. ESMON CT Thrombomodulin as a model of molecular mechanisms that modulate protease specificity and function at the vessel surface. *FASEB J.* 1995; 9:946-955.
17. EVERS P, UYLINGS HB Microwave-stimulated antigen retrieval is pH and temperature dependent. *J Histochem Cytochem.* 1994 Dec;42(12):1555-63.
18. FEDERICI AB The factor VIII/von Willebrand factor complex: basic and clinical issues. *Haematologica.* 2003;88:EREPO2.
19. FRANCELLA F, RENSING L Streßproteine: ihre wachsende Bedeutung in der Medizin, *Naturwissenschaften* 82, 303-309 (1995).
20. FUKAO H, HAGIYA Y, UESHIIMA S, OKADA K, TAKAISHI T, IZAKI S, MATSUO O Effect of heat shock on the expression of urokinase-type plasminogen activator receptor in human umbilical vein endothelial cells, *Thromb Haemost* 75: 352-358, 1996.

-
21. FURCHGOTT RF, JOTHIANANDAN D Endothelium-dependent and -independent vasodilation involving cyclic GMP: relaxation induced by nitric oxide, carbon monoxide and light. *Blood Vessels*. 1991; 28:52-61.
 22. FURLAN M Von Willebrand factor: molecular size and functional activity. *Ann. Hematol.* 1996;72:341-348.
 23. GALLISTL S Das Thrombinpotential, *Die gelben Hefte* 41: 122 (2001).
 24. GARRAMONE RR, WINTERS RM, DAS DK, DECKERS PJ Reduction of skeletal muscle injury through stress conditioning using the heat-shock response, *Plast. Reconstr. Surg.* 93: 1242-1247, 1994.
 25. GODA N, SUZUKI K, NAITO M, TAKEOKA S, TSUCHIDA E, ISHIMURA Y, TAMATANI T, SUEMATSU M Distribution of heme oxygenase isoforms in rat liver. Topographic basis for carbon monoxide-mediated microvascular relaxation. *J Clin Invest.* 1998 Feb 1;101(3):604-12.
 26. GOTO S, IKEDA Y, SALDIVAR E, RUGGERI ZM Distinct mechanisms of platelet aggregation as a consequence of different shearing flow conditions. *J Clin Invest.* 1998;101:479-486.
 27. GOTO S Understanding the mechanism of platelet thrombus formation under flow conditions and the effect of new antiplatelet agents. *Curr Vasc Pharmacol.* 2004 Jan; 2(1):23-32.

-
28. GROSSFELD GD, SHI SR, Immunohistochemical detection of
GINSBERG DA, RICH KA, thrombospondin-1 in formalin-fixed, paraffin-
SKINNER DG, TAYLOR CR, COTE embedded tissue, J of Histochemistry and
RJ Cytochemistry, Vol. 44, No. 7, pp. 761-766,
1996.
29. HALL TJ Role of hsp 70 in cytokine production,
Birkhäuser Verlag, Experientia 50 (1994), pp.
1048-1053.
30. HAMMERSEN F, HAMMERSEN E Some structural aspects of precapillary vessels.
J Cardiovasc Pharmacol. 1984;6 Suppl 2:S289-
303.
31. HAMILTON RB, O'Brien BMcC, Survival factors in replantation and revasculari-
MORRISON WA, McLEOD AM zation of the amputated thumb: 10 years experi-
ence, Scand J Plast Surg 18, 163-172, 1984.
32. HERMANN KS Platelet aggregation induced in the hamster
cheek pouch by a photochemical process with
excited fluorescein isothiocyanate-dextran.
Microvasc Res. 1983; 26:238-249.
33. IKEDA H, KOGA Y, ODA T, Free oxygen radicals contribute to platelet
KUWANO K, NAKAYAMA H, aggregation and cyclic flow variations in
UENO T, TOSHIMA H, MICHAEL stenosed and endothelium-injured canine
LH, ENTMAN MK coronary arteries, J Am Coll Cardiol. 1994
Dec;24(7):1749-56.

-
34. ISCHIKAWA M, SEKIZUKA E, Platelet adhesion and arteriolar dilation in the
OSHIO C, SATO S, YAMAGUCHI photothrombosis: observation with the rat closed
N, TERAO S, TSUKADA K, cranial and spinal windows, J Neurol Sci. 2002
MINAMITANI H, KAWASE T Feb 15;194(1):59-69.
35. JOURDAN A, AGUEJOUF O, Experimental thrombosis model induced by free
IMBAULT P, DOUTRMEPUICH F, radicals. Application to aspirin and other
INAMO J, DOUTRMEPUICH C different substances, Thromb Res. 1995 Jul
1;79(1):109-23.
36. KELTY JD, LEE RE Jr. Rapid cold-hardening of *Drosophila*
melanogaster (Diptera: Drosophilidae) during
ecologically based thermoperiodic cycles, J Exp
Biol 2001 May; 204(Pt9): 1659-66.
37. KETIS NV, LAWLER J Effects of thrombospondin antibody on the
recovery of endothelial cells from hyperthermia,
J Cell Sci 1990; 96 (Pt 2). 263-70.
38. KETIS NV, LAWLER J, HOOVER Effects of heat shock on the expression of
RL, KARNOVAKY MJ thrombospondin by endothelial cells in culture.
J Cell Biol. 1988 Mar;106(3):893-904.
39. KETIS NV, LAWLER J, HOOVER Effects of heat shock on the expression of
RL, KARNOVSKY MJ thrombospondin by endothelial cells in culture, J
Cell Biol 1988 Mar, 106(3):893-904.

-
40. KEYSE SM, TYRRELL RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1989; 86:99-103.
41. KINNUNEN I, LAURIKAINEN E, SCHREY A, LAIPPALA P, AITASALO K Effect of acute ischemic preconditioning on blood-flow response in the epigastric pedicled rat flap. *J Reconstr Microsurg.* 2002;18:61-68.
42. KLEIHAUER E *Hämatologie*, Berlin, Heidelberg, New York: Springer 1978.
43. KOENIG WJ, LOHNER RA, PERDRIZET GA, LOHNER ME, SCHWEITZER RT, LEWIS VLJ Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery, *Plast. Reconst. Surg.* 90: 659-664, 1992.
44. KOENIG WJ, LOHNER RA, PERDRIZET GA, LOHNER ME, SCHWEITZER RT, LEWIS VL Improving acute skin-flap survival through stress conditioning using heat shock and recovery, *Plastic and Reconstructive Surgery*, October 1992, pp. 659-664.
45. KUBULUS D, ROESKEN F, AMON M, RUCKER M, BAUER M, BAUER I, MENGER MD Mechanism of the delay phenomenon: tissue protection is mediated by heme oxygenase-1. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2004; 287:H2332-2340.

-
46. KUBULUS D, AMON M, ROESKEN F, RÜCKER M, BAUER I, MENGER MD
Cooling-induced preconditioning in skin flap failure: HO-1 expression is associated with capillary dilation and improved tissue survival. BJS submitted
47. KUMAR K, WU X, EVANS AT, MARCOUX F.
The effect of hypothermia on induction of heat shock protein (HSP)-72 in ischemic brain. Metab Brin Dis. 1995;10:283-91.
48. KURBUL S, DINCER M, KIZIR A, UZUNISMAIL A, DARENDELILER E
Plastic surgery in irradiated areas: analysis of 200 consecutive cases, Eur J Surg Oncol 23, 48-53, 1997.
49. LAIOS E, REBEYKA IM, PRODY CA
Charakterization of cold-induced heat shock protein expression in neonatal rat cardiomyocytes. Mol Cell Biochem. 1997 Aug;173(1-2):153-9.
50. LAU CS, SCOTT N, SHAW JW, BELCH JJ
Increased activity of oxygen free radicals during reperfusion in patients with peripheral arterial disease undergoing percutaneous peripheral artery balloon angioplasty, Int Angiol. 1991 Oct-Dec;10(4):244-6.
51. LAUX V, SEIFFGE D
Platelet function in the dorsal skin fold chamber of the rat. In Vivo. 1993; 7:45-51.
52. LEUNG L.L.K.
Role of Thrombospondin in Platelet Aggregation; J. Clin. Invest., Volume 74, November 1984,1764-1772.

-
53. LLESUY SF, TOMARO ML Heme oxygenase and oxidative stress. Evidence of involvement of bilirubin as physiological protector against oxidative damage. *Biochim Biophys Acta*. 1994 Aug 11;1223(1):9-14.
54. MAINES MD Heme oxygenase: function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J*. 1988 Jul;2(10):2557-68.
55. MAINES MD, PANAHIAN N The heme oxygenase system and cellular defense mechanisms. Do HO-1 and HO-2 have different functions?, *Adv Exp Biol* 2001, 502:249-72.
56. MARZI I, TAKEI Y, RUCKER M, Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal KAWANO S, FUSAMATO H, vasoconstriction after ischemia and reperfusion. WALCHER F, KAMADA T *Transpl Int*. 1994;7 Suppl 1:S503-6.
57. MAYER B, STEFFEN R, DRAF W, Systematische Indikation verschiedener freier NASSIF TM Transferlappen im Kopf- und Halsbereich, *HNO* 39, 129-133, 1991.
58. MENGER MD, BARKER JH, Capillary blood perfusion during postischemic MESSMER K reperfusion in striated muscle, *Plast Reconstr Surg* 89, 1104-1114, 1992a.
59. MENGER MD, LEHR HA Scope and perspectives of intravital microscopy – bridge over from in vitro to in vivo., *Immunol Today* 14, 519-522, 1993.

-
60. MENGER MD, PELIKAN S, Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „reflow-paradox“, *Am J Physiol* 263, H1901-H1906, 1992b.
61. MIYASHITA H, IWASAKI S, Photochemically induced focal cochlear lesions in the guinea pig: II.A transmission electron microscope study, *Microsc Res Tech.* 1998 May 15;41(4):334-40.
62. MOTOYOSHI N, SAKURAI M, Establishment of a local cooling model against spinal cord ischemia representing prolonged induction of heat shock protein, *J Thorac Cardiovasc Surg* 2001 Aug;122(2):351-7.
63. MULHOLLAND CW, STRAIN JJ Total radical-trapping antioxidant potential (TRAP) of plasma: effects of supplementation of young healthy volunteers with large doses of alpha-tocopherol and ascorbic acid. *Int J Vitam Nutr Res.* 1993;63(1):27-30.
64. O'SHAUGHNESSY M, GU JM, Microcirculatory consequences of microvascular surgery, *Microsurgery* 15, 405-412, 1994.
65. PEARSON JD Endothelial cell function and thrombosis, *Baillieres Clin Haematol* 1994 Sep;7(3):441-52.
66. PIRMANDA J, HOOG P Control of von Willebrand factor multimer size and implications for disease, *Blood Rev* 2002 Sep; 16(3):185.

-
67. RABHI-SABILE S, THIBERT V, Thrombospondin peptides inhibit the secretion-
LEGRAND C dependent phase of platelet aggregation, Blood
Coagul Fibrinolysis 1996 Mar; 7(2):237-40.
68. RIBEIRO SP, VILLAR J, SLUTSKY AS Induction of the stress response to prevent organ
injury, New Horizons, May 1995, Vol. 3, No.2,
pp. 301-311.
69. ROESKEN F, RUECKER M, BAUER I, AMON M, BAUER M, MENGER MD „Hitzeschock-Priming“ reduziert das
mikrovaskuläre Perfusionsversagen kritisch
perfundierter Hautlappen – Ein möglicher
Mechanismus der Gewebeprotektion bei akuter
Ischämie, Langenbecks Arch. Chir. Forum. 97:
527-530, 1997.
70. ROESKEN F, RUECKER M, A new model for quantitative in vivo
VOLLMAR B, BOECKEL N, microscopic analysis of thrombus formation and
MORGENSTERN E, MENGER MD vascular recanalisation: the ear of the hairless
(hr/hr) mouse, Thromb Haemost 1997; 78: 1408-
14.
71. ROESKEN F, KUBULUS D, AMON M, RUECKER M, BAUER I, MENGER MD Tissue protection by ischemic preconditioning
depends mainly on expression of heat shock
protein 32.
Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.
1998;115(Suppl I):251-3.
72. ROESKEN F, VOLLMAR B, In vivo analysis of antithrombotic effectiveness
RUECKER M, SEIFFGE D, MENGER MD of recombinant hirudin on microvascular
thrombus formation and recanalization. J Vasc
Surg. 1998;28:498-505.

-
73. RÜCKER M, FINCKH B, Dietary vitamin E does not protect from endo-
KOHLSCHÜTTER A, MENGER MD, toxin-induced hepatic microvascular
VOLLMAR B dysfunction, *Cell Mol Life Sci* 53, 294-302,
1997.
74. RUECKER M, ROESKEN F, In vivo analysis of the microcirculation of
SCHAEFER T, SPITZER WJ, osteomyocutaneous flaps using fluorescence
VOLLMAR B, MENGER MD microscopy, *Br J Plast Surg* 1999 Dec;
52(8):644-52.
75. RUECKER M, ROESKEN F, A novel approach for comparative study of
VOLLMAR B, MENGER MD perosteum, muscle, subcutis, and skin
microcirculation by intravital fluorescence
microscopy, *Microvascular Research* 56, 30-42
(1998), Article No. MR982077.
76. RUECKER M, SCHAEFER T, Local heat-shock priming-induced improvement
ROESKEN F, SPITZER WJ, BAUER in microvascular perfusion in
M, MENGER MD osteomyocutaneous flaps is mediated by heat-
shock protein 32, *Br J Surg* 2001 Mar;
88(3):450-7.a.
77. RUECKER M, SCHAEFER T, Reduction of inflammatory response in
ROESKEN F, SPITZER WJ, BAUER composite flap transfer by local stress
MB, MENGER MD conditioning-induced heat-shock protein 32,
Surgery. 2001;129:292-301.b.
78. RUECKER M, STROBEL O, Vasomotion in critically perfused muscle
VOLLMAR B, ROESKEN F, protects adjacent tissues from capillary perfusion
MENGER MD failure, *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000
Aug; 279(2):H550-8.

-
79. SALMI AM, HONG C, FUTRELL JW Preoperative cooling and warming of the donor site increase survival of skin flaps by the mechanism of ischaemic preconditioning: an experimental study in rats, *Scand J Plast Reconstr Surg Hand Surg* 1999 Jun;33(2):163-7.
80. SARLIN MRJ, FULLER K, DINH-XUAN AT, RICHARD MJ, POLLA BS Protective effects of hsp70 in inflammation, Birkhäuser Verlag, CH-4010 Basel/Switzerland, pp. 1031-1038, 1994.
81. SATO M, OHSHIMA N Effect of wall shear rate on thrombogenesis in microvessels of the rat mesentery. *Circ Res.* 1990;66: 941-949.
82. SCHAEFER T, RUCKER M, ROSKEN F, BAUER M, MENGER MD Reduction of inflammatory response after flap transfer by pre-treatment with local heta shock, *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd.* 1998;115(Suppl I):203-4.
83. SIEGEL JM, MARKOU CP, KU DN, HANSON SR A scaling law for wall shear rate through an arterial stenosis. *J Biomech Eng.* 1994;116:446-451.
84. SIFLINGER-BIRNBOIM A, GOLIGORSKY MS, DEL VECCHIO PJ, MALIK AB Activation of protein kinase C pathway contributes to hydrogen peroxide-induced increase in endothelial permeability. *Lab Invest.* 1992 Jul;67(1):24-30.
85. SILVER IA. Ion fluxes in hypoxic tissues. *Microvasc Res.* 1977 May; 13(3):409-20.

-
86. SILVERSTEIN R.L., LEUNG L.L.K., HARPEL P.C., NACHMAN R.L. Platelet Thrombospondin Forms a Trimolecular Complex with Plasminogen and Histidine-rich Glycoprotein, *J. Clin Invest.*, Volume 75, June 1985, 2065-2073.
87. SILVERSTEIN RL, NACHMANN RL Thrombospondin binds to monocytes-macrophages and mediates platelet-monocyte adhesion, *J Clin Invest* 1987 Mar, 79(3):867-74.
88. STOCKER R, GLAZER AN, AMES BN Antioxidant activity of albumin-bound bilirubin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 84: 5918-5922, 1987a.
89. STOCKER R, YAMAMOTO Y, MCDONAGH AF, GLAZER AN, AMES BN Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance, *Science* 235: 1043-1046, 1987b.
90. STRAUSS JM, NEUKAM FW, KROHN S, SCHMELZEISEN R, BORCHARD F Postoperative monitoring of microvascular flap repair with pulse oximetry--initial experience. *Handchir Mikrochir Plast Chir.* 1994 Mar;26(2):80-3.
91. SUEMATSU M, GODA N, SANO T, KASHIWAGI S, EGAWA T, SHINODA Y, ISHIMURA Y Carbon monoxide: an endogenous modulator of sinusoidal tone in the perfused rat liver. *J Clin Invest.* 1995; 96:2431-2437.
92. TRUELSON JM, LEACH JL Lateral thigh flap reconstruction in the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1998 Feb;118(2):203-10.

-
93. TSAI HM Shear stress and von Willebrand factor in health and disease
Semin Thromb Hemost. 2003 Oct; 29(5):479-88.
94. URKEN ML, WEINBERG H, Microvascular free flap in head and neck
BUCHBINDER D, MOSCOSO JF, reconstruction, Arch Otolaryngol Head Neck
LAWSON W, CATALANO PJ, Surg 120, 633-640, 1994.
BILLER HF
95. VOLLMAR B, CONZEN PF, Blood flow and tissue oxygen pressures of liver
KERNER T, HABAZETTEL H, and pancreas in rats: effects of volatile anesthe-
VIERL M, WALDNER H, PETER K tics and of hemorrhage, Anesth Analg 75, 421-
430, 1992.
96. VOLLMAR B, GLASZ J, POST S, Role of microcirculatory derangements in mani-
MENGER MD festation of portal-triad cross clamping-induced
hepatic reperfusion injury, J Surg Res 60, 49-54,
1996.
97. WOO J, IYER S, CORNEJO MC, Stress protein-induced immunosuppression:
MORI N, GAO L, SIPOS I, MAINES inhibition of cellular immune effector functions
M, BUELOW R following overexpression of haem oxygenase
(HSP 32).
Transpl Immunol. 1998 Jun;6(2):84-93.
98. WYNN RM, DAVIE JR, COX RP, Molecular chaperones: heat shock proteins,
CHUANG DT foldases, and matchmakers, J Lab Clin Med,
July 1994, pp 31-36.

99. XIE L, CHESTERMAN CN, HOGG PJ Control of von Willebrand factor multimer size by thrombospondin-1, J Exp Med, Vol. 193, No. 12, June 18, 2001, 1341-1349
100. XIE L, CHESTERMAN CN, HOGG PJ Reduction of von Willebrand factor by endothelial cells, Thromb Haemost 2000 Sep; 84(3): 506-13
101. YUNOKI M, NISHIO S, UKITA N, ANZIVINO MJ, LEE KS Characteristics of hypothermic preconditioning influencing the induction of delayed ischemic tolerance, J Neurosurg 2002 Sep;97(3):650-7
102. ZAKHARY R, GAINES SP, DINERMAN JL, RUAT M, FLAVAHAN NA, SYNDER SH Heme oxygenase 2: endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 93: 795-798, 1996

8. Dank

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD. Dr. Dr. Martin Rücker, der mir dieses Thema zur Verfügung stellte. Jederzeit stand er mit bereitwillig nicht nur für wissenschaftliche Belange als Ansprechpartner zur Verfügung.

Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger, Direktor des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes möchte ich für seine wertvollen Ratschläge und Unterstützung der Arbeit danken.

Weiterhin möchte ich an dieser Stelle allen Mitarbeitern des Institutes für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes für Ihre mir entgegengebrachte Hilfsbereitschaft danken.

9. Lebenslauf

Name	Dr. med. Alexander Gregor Stamm	
Geburtsort	Dillingen/ Saar	
Geburtsdatum	13.01.1970	
Eltern	Dipl. Kfm. Peter Stamm und Dorothea Stamm, geb. Förster	
Familienstand	verheiratet	
Schulbildung	1976-80	Grund- und Hauptschule Beckingen
	1980-90	Staatliches Gymnasium Dillingen/ Saar
	1990	Abitur
Bundeswehr	1990-91	Fernmeldebataillon 920/ Kastellaun
Oktober 1991	Beginn des Studiums der Medizin in Homburg/ Saar	
Prüfungen:	28.09.1993	Ärztliche Vorprüfung
	16.09.1994	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	19.09.1997	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
	04.11.1998	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Praktisches Jahr:	Chirurgie:	Allgemeinchirurgie der Universitätskliniken Homburg/ Saar Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie
	Innere:	Universitätskliniken Homburg/ Saar
	Wahlfach:	Gynäkologie
Oktober 1992	Beginn des Studiums der Zahnmedizin in Homburg/ Saar	
Prüfungen:	07.03.1995	Zahnärztliche Vorprüfung
	19.09.2001	Zahnärztliche Prüfung

01. Juli 1999	Arzt im Praktikum in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Spitzer).
01.01.2001 - 31.03.2005	Assistenzarzt in der Abteilung für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/ Saar (Direktor: Prof. Dr. Dr. W. Spitzer).
10. Januar 2001	Approbation als Arzt
02. Oktober 2001	Approbation als Zahnarzt
14. Juli 2003	Promotion zum „Dr. med“ mit dem Thema: „Perinatale Auffälligkeiten und neuromotorische Entwicklung von Kindern im 2. – 3. Lebensjahr in Abhängigkeit vom Doppler-Flow-Befund während der Schwangerschaft“.
01. Juni 2004	Alois Lauer Förderpreis 2003.
20. Januar 2005	Facharztprüfung zum Zahnarzt für Oralchirurgie.
01.04.2005 - 30.09.2005	Assistenzarzt in der Praxis für Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie Dr. Dr. M. Beyer/ Saarbrücken.
seit 01.10.2005	selbständig in eigener Praxis für Mund-, Kiefer-, Gesichtschirurgie.