

Aus dem Institut für
Klinisch - Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes
Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger

**Bedeutung der Häm-Oxygenase-1 bei kritisch perfundierten
Hautmuskellappen**

– Intravitalmikroskopische Studie am Tiermodell –

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes

2009

vorgelegt von

Anne Jeanine Matzen
geboren am 16. Juli 1981 in Ludwigshafen am Rhein

Für meine Familie

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung	5
2	Abstract	7
3	Einleitung	9
4	Material und Methodik	13
4.1	Versuchstiere	13
4.2	Modell	13
4.2.1	Anästhesie	13
4.2.2	Präkonditionierung	14
4.2.3	Chemikalien	14
4.2.4	Fluoreszenzfarbstoffe	15
4.2.5	„random pattern flap“	15
4.2.6	Lappenpräparation	15
4.2.7	Experimentelles Protokoll	18
4.2.8	Ausschlusskriterien	19
4.3	Untersuchungsmethoden	19
4.3.1	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	19
4.4	Datenauswertung, Datenerfassung und Statistik	23
5	Ergebnisse	24
5.1	SnPP-IX vorbehandelter random pattern flap	24
5.1.1	Lappennekrose	24
5.1.2	Arteriöler Durchmesser	25
5.1.3	Arteriöle Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)	26
5.1.4	Individueller volumetrischer Blutfluss in Arteriolen	29
5.1.5	Venulärer Durchmesser	30
5.1.6	Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)	30
5.1.7	Individueller volumetrischer Blutfluss in Venulen	32

Inhaltsverzeichnis

5.1.8	Funktionelle Kapillardichte (FKD)	34
5.1.9	Kapillardurchmesser	34
5.1.10	Kapillare Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)	36
5.1.11	Individueller volumetrischer Blutfluss in Kapillaren	36
5.1.12	Apoptotischer Zelltod	39
5.2	Hitzevorbehandelter random pattern flap	40
5.2.1	Lappennekrose	40
5.2.2	Arteriöler Durchmesser	42
5.2.3	Arteriöle Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)	42
5.2.4	Individueller volumetrischer Blutfluss in Arteriolen	44
5.2.5	Venulärer Durchmesser	46
5.2.6	Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)	48
5.2.7	Individueller volumetrischer Blutfluss in Venulen	48
5.2.8	Funktionelle Kapillardichte (FKD)	50
5.2.9	Kapillardurchmesser	51
5.2.10	Kapillare Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)	51
5.2.11	Individueller volumetrischer Blutfluss in Kapillaren	54
5.2.12	Apoptotischer Zelltod	56
6	Diskussion	59
6.1	Anhaltende Ischämie und endogene HO-1-Stimulation	60
6.2	Anhaltende Ischämie, lokale Hitze und exogene HO-1-Stimulation	64
7	Therapeutische Relevanz und Schlussfolgerung	68
8	Verzeichnis der Abkürzungen	69
9	Abbildungsverzeichnis	71
10	Tabellenverzeichnis	73
11	Literaturverzeichnis	74
12	Danksagung	82
13	Lebenslauf	84

1 Zusammenfassung

Die Lappenchirurgie, das heißt der Transfer von vaskularisiertem Gewebe, etablierte sich in den letzten Jahren zunehmend als Methode der Wahl der Defektdeckung in der rekonstruktiven Chirurgie, sei es an den Weichteilen oder am Knochen. Dennoch können diese Lappen anhaltender Ischämie und Reoxygenation ausgesetzt sein, was im kritischsten Fall zum totalen Versagen beziehungsweise zur Lappennekrose und somit zu schwerwiegenden Folgen für den Patienten führen kann. Hierbei ist die Sauerstoff-Versorgung der ausschlaggebende Faktor, der über das Überleben von Lappen oder über die Gewebenekrose entscheidet.

Um ischämischen Einflüssen entgegenzuwirken und um Nekrosen möglichst zu minimieren, ist das körpereigene mikrovaskuläre System mit einer Auswahl an endogenen Schutzmechanismen ausgestattet. Besonderes Augenmerk gilt der endogenen Expression von Hitzeschockproteinen (HSP). Von besonderem Interesse ist hierbei die Häm-Oxygenase (HO-1), auch bekannt als Hitze-Schock-Protein-32. Diese katalysiert die Oxidation von Hämoglobin in ihre biologisch aktiven Metaboliten Eisen, Biliverdin und Kohlenstoffmonoxid. Letzteres übt eine potentielle vasodilatorische Funktion aus. Die Expression von Häm-Oxygenase kann aber auch durch exogene, lokale und systemische Stimuli gesteigert werden. Hitze scheint dabei ein sehr attraktiver Ansatz zu sein.

Aus diesen Gründen ist es von relevanter Bedeutung die Mechanismen der Lappen-Perfusionsminderung zu verstehen sowie potentielle körpereigene Schutzmechanismen zu untersuchen und klinisch anwendbare exogene Schutzstrategien zu erproben, um eine Reduktion oder gar Verhinderung der ischämischen Komplikationen zu erreichen.

Um dies wissenschaftlich zu untersuchen, verwendeten wir ein chronisches Ischämie-Modell an der Maus über einen Zeitraum von 10 Tagen nach Induktion der Ischämie. Dieses Modell ermöglicht eine wiederholte in vivo Untersuchung mittels Intravitalmikroskopie zur Beurteilung mikrovaskulärer, zellulärer und geweblicher Mechanismen, die zur Lappennekrose führen.

In dieser Studie wurde den Funktions- und Wirkmechanismen sowohl der endogenen ischämieinduzierten Protektion wie auch der exogenen hitzeinduzierten Protektion nachgegangen.

Dabei war von Interesse, ob:

1. ein Häm-Oxygenase-1-vermittelter endogener Schutz nach Induktion kritischer Ischämie vorliegt
2. das lokale Anbringen eines supraphysiologischen Stressors wie lokale Hitze eine Häm-Oxygenase-vermittelte Verminderung der Gewebenekrose induzieren kann
3. der vermeintliche ischämie- oder hitzeinduzierte Gewebeschutz auf einer Erhaltung der mikrovaskulären Perfusion basiert oder aber auf dem Boden einer erhöhten Ischämietoleranz zu begründen ist.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, dass die wiederholte Anwendung lokaler Hitze vor Lappenhebung (Präkonditionierung) zu einer Induktion von Häm-Oxygenase-1 führt, welche mit einem signifikant verbessertem Lappenüberleben einhergeht. Dabei wird sowohl die Lappennekrose als auch der apoptotische Zelltod reduziert. Die Protektion vor ischämischem Gewebeverlust resultiert aus dem Häm-Oxygenase-1-vermittelten vasoaktiven Einfluss von Kohlenstoffmonoxid, der eher auf eine Verbesserung des mikrovaskulären Blutflusses in Arteriolen und Kapillaren zurückzuführen ist als auf eine Zunahme der ischämischen Gewebetoleranz.

Weiterhin können wir zeigen, dass chronisch kritische Ischämie in muskulokutanen Lappengewebe zu einer vermehrten Häm-Oxygenase-1-Expression von endogener Häm-Oxygenase führt, da deren funktionelle Blockade die Gewebenekrose verstärkt.

Die vorliegenden Untersuchungen lassen erkennen, dass die Induktion der Hämoxigenase-1 einen kritisch perfundierten Lappen vor Nekrose schützen kann. Die Induktion von HO-1 könnte daher einen vielversprechenden neuen Therapieansatz in der rekonstruktiven Chirurgie darstellen.

2 Abstract

In the last couple of years flap surgery, i.e. the transfer of vascularized tissue, has been established as an important method in reconstructive surgery. However, flaps can be exposed to prolonged ischemia and reperfusion, which - in the worst case - can result in flap failure and, consequently, in serious consequences for the patient. In this case, oxygen supply is the most decisive factor in determining flap survival or necrosis.

To counteract ischemic influences and to reduce necrosis, the endogenous microvascular system is equipped with a variety of protective mechanisms. Of particular interest is the endogenous expression of heat-shock-proteins, especially heme-oxygenase-1, also known as heat-shock-protein 32. Heme-oxygenase-1 catalyzes the oxidation of heme in its biologically active metabolites free iron, biliverdine and carbon monoxide, the latter exerting a potential vasodilatory function. The expression of heme-oxygenase-1 can also be increased by exogenous (local) stimulation, such as heat.

For this reason, it is of particular importance to understand the mechanisms of decreasing perfusion, as well as to study the endogenous mechanisms of protection and finally to find endogenous protection strategies in order to reduce or even avoid ischemic injury.

In the present study, we used an *in vivo* murine model of chronic ischemia over a 10-day observation period. This model allows repetitive intravital fluorescence microscopy to evaluate microvascular perfusion, apoptotic cell death, tissue necrosis and, therefore, specific analysis of the mechanisms of flap failure in random pattern flaps.

We explored specific mechanisms of endogenous protection as well as exogenous (heat-induced) protection. Here, we analyzed whether chronic ischemia induces endogenous heme-oxygenase-1 (HO-1), and whether this HO-1 induction is protective for tissue survival. In addition, we studied the effect of exogenously applied supraphysiological stressors, like heat, on flap survival. Furthermore we elucidated, if the protection from ischemic necrosis is mediated by improvement of the microcirculation or by an increase of ischemic tolerance.

The results of our study indicate that the induction of heme-oxygenase-1 in randomly perfused ischemic tissue by repetitive local heat application significantly reduces flap

2 Abstract

necrosis and protects against apoptotic cell death. The protection against ischemic tissue loss seems to be the result of the heme-oxygenase mediated vasoactive action of carbon monoxide. This is caused by improvement of microvascular blood flow in arteriols and capillaries rather than by increasing the ischemic tolerance of the tissue.

Furthermore we could show that chronic ischemia in musculocutaneous flap tissue induces endogenous heme-oxygenase-1 expression and that functional inhibition of heme-oxygenase-1 causes an aggravation of tissue necrosis.

Thus, heme-oxygenase-1 acts protective in critically perfused flaps, and may represent a novel promising therapy in flap surgery.

3 Einleitung

Gewebedefekte, insbesondere der Weichteile wie zum Beispiel nach Trauma, Verbrennung oder nach ablativen chirurgischen Maßnahmen, erfordern häufig rekonstruktive Eingriffe zur Deckung des Gewebeverlustes. In den letzten Jahren etablierte sich die Lappenchirurgie, d. h. der Transfer von vaskularisiertem Gewebe, als Defektdeckung in der rekonstruktiven Chirurgie. Dennoch können diese Lappen anhaltender Ischämie und Reoxygenierungen ausgesetzt sein, was in Einzelfällen zum vollständigen Versagen des Lappens, das heißt zur Nekrose führt und damit schwerwiegende Folgen für den Patienten hat. Die distalen Lappenareale sind hierbei am ehesten gefährdet. Im Perfusionsgebiet der so genannten „letzten Wiese“ kann es gehäuft zu Mangelperfusion kommen und somit zur Teilnekrose dieses Lappenareals [12]. Dies führt zu einer Zunahme der Patientenmorbidity. Nicht außer Acht zu lassen ist die oft damit verbundene längere Hospitalisierung der Patienten und sozioökonomische Belastung des Gesundheitswesens. Die Wichtigkeit dieser Thematik wird nochmals hervorgehoben durch das immer älter werdende Patientengut mit erhöhtem Risiko für ischämische Nekrosen, sowie Komorbiditäten aus dem vaskulären Krankheitsspektrum.

Das Ausmaß der Sauerstoff-Versorgung ist der ausschlaggebende Faktor, der über das Überleben des Lappens entscheidet. Mikrozirkulatorische Insuffizienz kann durch anhaltende Ischämie zu Hypoxämie und somit zu Gewebeschaden führen. Um ischämischen Einflüssen entgegenzuwirken und das Ausmaß der Nekrosen einzuschränken bzw. bestenfalls zu verhindern, ist das körpereigene mikrovaskuläre System mit einer Reihe von Schutzmechanismen ausgestattet. Besonderes Augenmerk gilt den Hitzeschockproteinen (HSP). HSP fungieren als Chaperone (Anstandsdamen), die die Proteine und deren Bewegungen über die Zellmembran regulieren [19]. HSP-32 bzw. Häm-Oxygenase-1 (HO-1) ist unter diesen HSP von besonderem Interesse.

Die HO-1 ist ein Hitzeschockprotein mit einem Molekulargewicht von 32 kDa, wodurch es auch unter dem Namen HSP-32 bekannt ist. Hitzeschockproteine werden bei einer Hitzeschockantwort exprimiert. Dieser Mechanismus ist in allen eukaryontischen Zellen zu finden. Nicht nur Hitze sondern auch Stress-Faktoren, wie Kälte, mechanischer Stress oder Hypoxie sind in der Lage eine Stress- oder „Hitzeschockantwort“ auszulösen. Diese

3 Einleitung

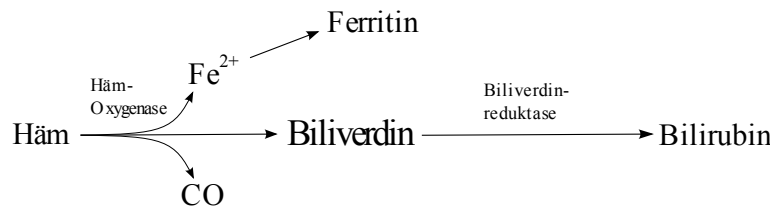


Abb. 1: Umwandlungsschritte von Häm zu seinen Abbauprodukten mittels der Häm-Oxygenase

sehr unterschiedlichen Stimuli und die damit verbundene Enzyminduktion machen das Häm-Oxygensasesystem zu etwas sehr Besonderem. Bereits Maines hat schon darauf hingewiesen, dass kein anderes Enzym so ausgeprägte und besondere Eigenschaft zeigt, wie das HO-1-System [30].

Die Häm-Oxygenase wurde erstmals 1968 identifiziert. 1974 beschrieb Maines, dass HO-1 den ersten und geschwindigkeitsbestimmenden Schritt des Hämoglobinabbaus katalysiert [31]. Durch Oxidation wird die α -meso-Brückenbindung des Häm-Moleküls gespalten und es entstehen gleiche Anteile an Biliverdin, Kohlenstoffmonoxid (CO) und zweiwertige Eisen (Fe^{2+}). Das entstandene Biliverdin wird direkt durch die Biliverdin-reduktase in Bilirubin umgewandelt, welches mit der Galle ausgeschieden wird (siehe Abbildung 1). Bis dato sind drei HO-Isoformen identifiziert worden, die induzierbare HO-1 und die Isoformen HO-2 und HO-3 [36]. Unter physiologischen Bedingungen überwiegt die Aktivität der Isoform HO-2. Durch bestimmte Stimulation bzw. Induktion der HO-1 kann jedoch erreicht werden, dass die HO-1-Aktivität im Organismus um ein mehrfaches höher liegt als die von HO-2.

Sowohl die Häm-Oxygenase-1, als auch die Isoformen HO-2 und HO-3, sind durch Oxidation in der Lage Hämoglobin in ihre biologisch aktiven Metabolite Biliverdin, Eisen und CO zu katalysieren (siehe Abbildung 1). Während Biliverdin als antioxidative Substanz [59] bekannt ist und Eisen als Genregulator fungiert, übt CO eine vasodilatorische Funktion aus [30].

CO ist ein Hämoglobinligand und wird als „second messenger“ angesehen [30]. Dieser Stoff ist in der Lage mit den Eisengruppen verschiedener Enzyme zu reagieren [32, 33]. Es wird vermutet, dass CO als „second messenger“ die Guanylatzyklase aktiviert und damit zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP) freisetzt [13, 42, 46], welches über eine cGMP-abhängige Proteinkinase vermittelt wird. Diese Proteinkinase findet sich in erhöhter Konzentration vor allem in Thrombozyten, glatten Muskelzellen, das heißt Gefäßen, und im Kleinhirn. Sie lässt die intrazelluläre Menge an cGMP in glatten Muskelzellen ansteigen, was eine Erschlaffung der Gefäßmuskulatur bewirkt [15]. So konnte eine durch CO bedingte Relaxation von Arterienringen in verschiedenen *in vitro* Experimenten gezeigt werden [47, 66]. Der genaue Wirkmechanismus der Proteinkinase ist

3 Einleitung

noch nicht bekannt. Es wird jedoch vermutet, dass sie eine in der Plasmamembran lokalisierte Calcium-ATPase phosphoryliert und damit induziert. Dies führt zu einer Abnahme der Calcium-Konzentration in den glatten Muskelzellen, mit der Folge der Vasodilation, der Abnahme des vaskulären Widerstandes und damit der Hypotension. Auch Thrombozyten stehen unter dem Einfluss der aktivierten cGMP-abhängigen Proteinkinase. Diese bewirkt auch dort eine Abnahme der zellulären Calcium-Konzentration, was den aggregationshemmenden Effekt von CO erklären könnte.

Weiterhin ist CO unabhängig von cGMP in der Lage in glatten Muskelzellen eine Vasodilation hervorzurufen. Dies geschieht durch Calcium-aktivierte Kaliumkanäle. Neben dieser direkten vasodilatatorischen Wirkung konnten Morita et al. an glatten Muskelzellen zeigen, dass CO-vermittelte Hemmung die Freisetzung des potenten Vasokonstriktors Endothelin-1 reduziert [42] und beweisen damit, dass die Regulation des Gefäßtonus einem komplexen Zusammenspiel verschiedener Moleküle unterliegt.

Die Expression von HO-1 hat eine Protektion in verschiedenen pathophysiologischen Situationen gezeigt, wie zum Beispiel bei inflammatorisch-bedingter Leberschädigung [54], Endotoxin-induzierter kontraktiler Muskelzelldysfunktion [62] und Reperfusionsschaden bei wiederbelebungspflichtigen Verletzungen [51, 55, 64].

Häm ist Substrat der HO, welches überwiegend aus dem Abbau von Hämoglobin stammt. Häm besteht aus einem Porphyrinring und einem zentral gebundenen Eisenmolekül. HO-1 hat eine gewisse Spezifität bezüglich der Konstitution des Porphyrinrings, aber nur eine geringe Spezifität gegenüber dem zentral gebundenen Eisen. Folglich kann HO auch andere Metallporphyrine binden. Es existieren synthetische Metallporphyrine, die als kompetitive Hemmer der HO fungieren. Kappas und Drummond entdeckten das Zinn(Sn)-Mesoporphyrin (SnPP) als einen der am stärksten wirkenden Inhibitoren, welches eine postnatale Hyperbilirubinämie in neugeborenen Tieren hemmen konnte [23, 22]. Sn-Protoporphyrin (SnPP) führt zu einer Reduktion der Vinylgruppen an C2 und C4 zu Ethylgruppen. Diese Reduktion hat die Hemmung des Hämabbaus in vivo zur Folge [10]. Demzufolge kann diese Substanz zur Bestätigung der HO-vermittelten Effekte herangezogen werden.

HO-1 kann durch zwei Mechanismen induziert werden. Einerseits führt anhaltende Ischämie zu einer Induktion der endogenen HO-1 [2]. Andererseits können exogene Stressoren ebenfalls zu einer Induktion von HO-1 führen [2]. Diese Stressantwort ist unspezifisch und kann entsprechend durch Hitze, Kälte, Hypoxie und andere Mechanismen induziert werden.

Aktuelle Studien haben gezeigt, dass die Induktion von HO-1 in der Lage ist, eine Verringerung der ischämischen Gewebenekrose am Herzen [27, 29], im Gehirn [25] und in

3 Einleitung

der Niere [55] hervorzurufen. Weiterhin zeigten Rücker et al. [48], dass HO-1 die mikrovaskuläre Perfusion von axial durchbluteten osteomyokutanen Lappen verbessert und damit auch deren Sauerstoffversorgung. Zur Zeit ist wenig bekannt über den protektiven Effekt von HO-1 in randomisiert durchblutetem Hautmuskelgewebe und dessen Einfluss auf die Mikrozirkulation.

Aus diesen Gründen ist es von relevanter Bedeutung mögliche Mechanismen der Perfusionsminderung sowie körpereigene Schutzstrategien zu untersuchen, verstehen zu lernen und klinisch anwendbare exogene Strategien zu erproben. Nur so kann eine Verminderung oder gar Verhinderung der Gewebenekrose erreicht werden. Um dies wissenschaftlich zu untersuchen, verwendeten wir ein chronisches Ischämie-Modell an der Maus über einen Untersuchungszeitraum von 10 Tagen. Dieses Modell ermöglicht eine wiederholte in vivo Mikroskopie am Fluoreszenzmikroskop zur Beurteilung der mikrovaskulären Perfusion, der Apoptose, der Gewebenekrose und somit der gezielten Analyse von zugrunde liegenden zellulären Mechanismen, die zum Lappenversagen führen können [16].

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, die folgenden Fragen zu klären:

1. Können endogene Mechanismen, die durch die Lappenpräparation per se, d. h. Ischämie-Induktion, alleine die HO-1 hochregulieren und dadurch ein verbessertes Lappenüberleben erzielen?
2. Wie beeinflussen exogen angewandte lokale Stressoren, wie beispielsweise Hitze, das Lappenüberleben? Wird hierbei die HO-1 induziert und führt deren Induktion zu einem verbesserten Lappenüberleben? Beruht ein verbessertes Lappenüberleben auf einer erhaltenen Gewebepfusion oder auf einer Erhöhung der Ischämietoleranz?

4 Material und Methodik

4.1 Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt. Die Experimente waren von der saarländischen Tierschutzkommission geprüft und genehmigt. Während der gesamten Versuchszeit dienten 46 C57BL/6 Mäuse als Versuchstiere, die aus der Zucht des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie (Universität des Saarlandes, Homburg) stammten. Das Körpergewicht der Tiere lag zwischen 20 g–24 g, was einem Alter von 8 bis 10 Wochen entspricht.

Die Mäuse befanden sich bis um Versuchsbeginn in der Versuchstierhaltung des Instituts unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten Frau Dr. med. vet. Frings.

Bis zu ihrem Versuchseinsatz wurden die Tiere in Einzelkäfigen bei einer Raumtemperatur von 22–24 °C und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60–65 % gehalten. Ein 12 Stunden Tag- und Nachtzyklus war gewährleistet.

Die Mäuse hatten während der gesamten Versuchsperiode freien Zugang zu Standardlaborfutter (Firma Altromin, Lage, Deutschland) und Trinkwasser ad libitum.

4.2 Modell

4.2.1 Anästhesie

Sowohl die Präparation der Rückenhautkammer und des Lappens, als auch die intravitale Fluoreszenzmikroskopie wurde am narkotisierten Tier durchgeführt. Die Anästhesie erfolgte durch die intraperitoneale Injektion von einem 0.1 ml Bolus pro 10 g Körpergewicht, bestehend aus 90 mg/kg KG Ketamin-Hydrochlorid (Ketavet®, Park Davis,

Freiburg, Deutschland) und 25 mg/kg KG Dihydroxylidinothiazine-Hydrochlorid (Rompun®; Bayer, Leverkusen, Deutschland). Die Narkose dauerte im Durchschnitt 30 Minuten und wirkte muskelrelaxierend, analgetisch und anästhetisch. Die Tiere tolerierten die wiederholten Anästhesien ohne Probleme.

4.2.2 Präkonditionierung

Während der Versuchsreihe wurden insgesamt drei Versuchsgruppen auf unterschiedliche Weise vorbereitet.

Die präkonditionierten Tiere wurden 24 Stunden vor geplanter Lappenpräparation mit Hitze vorbehandelt.

Nach Entfernung des Fells mit Plica®-Enthaarungscreme unter intraperitonealer Anästhesie wurden die Tiere in lateraler, dekubitaler Lage auf einer Heizplatte positioniert. Die rechte Flanke der Tiere wurde 3 mal 30 Minuten auf eine oberflächliche Hauttemperatur von 43.0 °C thermostatisch kontrolliert erhitzt. Die Zyklen wurden unterbrochen durch jeweils 30-minütige Erholungsphasen. Die Versuchstiere wurden von der Wärmeplatte entfernt, damit die Haut auf Raumtemperatur (23 °C) abkühlen konnte. Nach der Hitzepräkonditionierung erhielt jedes Tier 1 ml NaCl 0.9 % intraperitoneal injiziert, um den Flüssigkeitsverlust während der Vorbereitungszeit auszugleichen.

Zwei Versuchsgruppen erhielten den Wirkstoff SnPP-IX, eine davon wurde zusätzlich Hitzepräkonditioniert. 24 Stunden vor der geplanten Operation injizierten wir 50 µmol SnPP-IX/kg KG intraperitoneal. Um eine adäquate Aktivitätshemmung der Häm-Oxygenase-1 während der Nekroseprogression zu gewährleisten, wurde eine gleiche Menge des kompetitiven Antagonisten SnPP-IX zusätzlich am Operationstag sowie an den ersten drei Tagen nach Lappenhebung verabreicht. Auch diese Tiere bekamen zusätzlich jeweils eine intraperitoneale Injektion von 1 ml NaCl 0.9 %.

4.2.3 Chemikalien

Zinn-Protoporphyrin-IX (SnPP-IX; Frontier Scientific; Lancaster; UK), ein kompetitiver Hemmer der Häm-Oxygenase-1 (HO-1), wurde in Natrium-Bikarbonat 8.4 % und Phosphat-gepuffertem Kochsalz gelöst, um als Endresultat eine Konzentration von 5 µmol/ml herzustellen. Diese Lösung war bei einer maximalen Temperatur von 8 °C in einem lichtgeschützten Behälter für die Verwendung am selben Tag aufbewahrt worden.

4.2.4 Fluoreszenzfarbstoffe

Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)-Dextran 150000

Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC; Molekulargewicht 150 000 Da; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) ist ein Kolloid-gekoppelter Fluoreszenzfarbstoff. Dieser wird über Thiocarbamid an Proteine gebunden. Bei der intravitalen Mikroskopie dient er im Plasma gelöst zur Kontrastverstärkung von Blutgefäßen. Das Exzitationsmaximum dieses Fluorochroms liegt bei 490 nm. Die Emissionswellenlänge liegt bei 520 nm. FITC-Dextran wird renal und hepatisch metabolisiert und ausgeschieden.

Bisbenzimid H 33342 (Hoechst®)

Bisbenzimid H 33342 (Hoechst®) ist ein DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff mit dessen Hilfe Zellkerne und Chromatin direkt an lebenden Zellen markiert werden können. Im Zuge des apoptotischen Zelltodes kommt es zu Kondensierung, Fragmentierung und Marginierung der DNA. So kann eine Ansammlung des Farbstoffs eine hohe Fluoreszenz auslösen und lässt sich von unversehrter DNA gut unterscheiden. Durch die spezifische Bindung an zellulärer DNA kann H 33342 als Marker für die Analyse der Zellzahl apoptotischer Zellen in prozentualer Relation zur Anzahl unversehrter Zellen verwendet werden.

4.2.5 „random pattern flap“

Ein „random pattern flap“ ist ein willkürlich durchbluteter Lappen ohne definierten Gefäßstiel, der vorwiegend über Kapillaren der subdermal und dermal vorkommenden Gefäßplexus gespeist wird. Diese sind willkürlich verteilt und erlauben daher lediglich die Bildung von Hautlappen limitierter Größe. Diese Größe hängt von einer angemessenen Durchblutung über die Lappenbasis ab. Ein angestrebtes Verhältnis zwischen Breite und Länge des Lappens ist 1:1.5 bis maximal 1:2. Werden diese Richtwerte nicht beachtet, kann es je nach Körperregion im Verlauf zu Teilnekrosen oder vollständigen Lappennekrosen kommen.

4.2.6 Lappenpräparation

Während der gesamten Studie waren zwei Präparationstechniken erforderlich. Bei der Kontrollgruppe wurde eine Rückenhautkammer ohne Lappenhebung präpariert. Bei

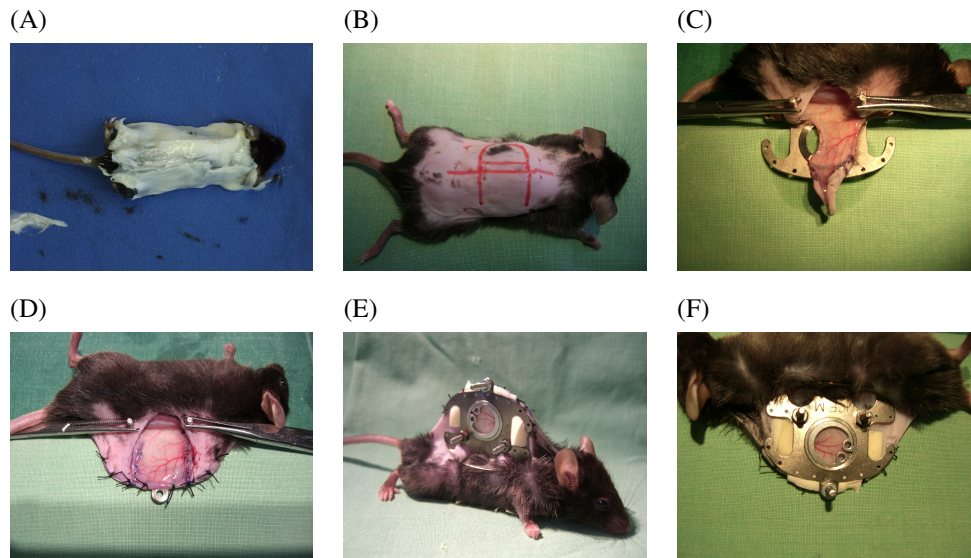


Abb. 2: Präparationsschritte des „random pattern flaps“. (A) Enthaarung der Maus. (B) Markierung des zu hebenden Lappenareals im Bereich der Versorgungsgefäße. (C) Präparation des markierten Areals bis zum Panniculus carnosus der Gegenseite unter Durchtrennung der zuführenden Gefäße. (D) Naht des durchtrennten Lappens in die umliegende Hautfalte und Befestigung am Titaniumrahmen. (E) Fixierung des Kammergegenstücks mit Deckglas und Sprengring. (F) Darstellung des Beobachtungsfensters der Rückenhautkammer.

der Vergleichsgruppe wurde der „random pattern flap“ gehoben. Nach intraperitonealer Anästhesie und Fellentfernung wurde präoperativ das Operationsareal mit Softasept desinfiziert.

Zur Präparation der Rückenhautkammer wurden den Kontrolltieren zwei symmetrische Titaniumrahmen auf den Rücken implantiert. Zwischen den beiden Rahmenteilen war mit Hilfe von Haltenähten eine Rückenhautfalte in „Sandwichtechnik“ angehoben und aufgespannt worden. Durch zwei kleine Inzisionen für die Schrauben der hinteren Kammerhälfte konnte diese durch Einzelknopfnähte fixiert werden.

Mit einem wasserfesten Stift wurde nun unter Gegenlichtkontrolle ein Kreis auf einer der Hautschichten markiert, der dem runden Beobachtungsfenster der Kammer entsprach. In diesen Hautschichten verliefen die Versorgungsgefäße. In einem zweiten Operationsschritt wurde das Tier umgelagert und das markierte Areal von ca. 20 mm Durchmesser bis zum Panniculus carnosus der Gegenseite abpräpariert. Die persistierende Hautschicht, bestehend aus Epidermis, subkutanem Fettgewebe und Muskelschicht, wurde weiterhin von kaudal und kranial durch beide Äste der tiefen A. circumflexa iliaca (deep circumflex iliac artery, DCIA) und der A. thoracica lateralis (lateral thoracic artery, LTA) adäquat durchblutet.

Unter mikroskopischer Aufsicht konnte der Operateur bei 16-facher Vergrößerung die

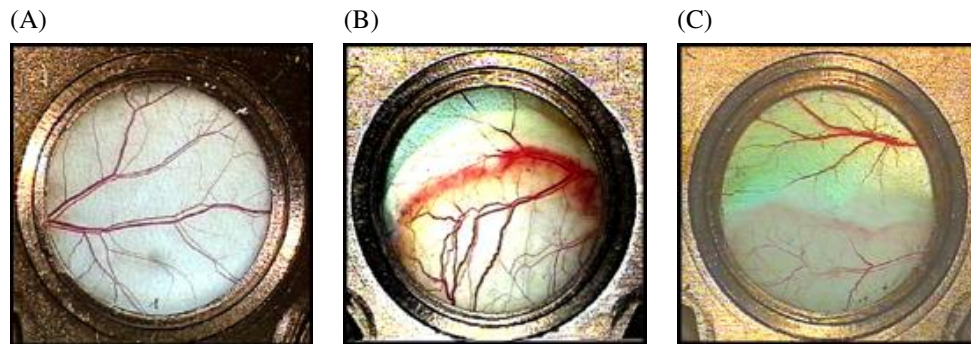


Abb. 3: Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer. (A) Kontrolltiere. (B) unbehandelte „Sham“-Tiere mit sichtbarer Demarkationszone der Nekrose. (C) SnPP-IX-Tiere mit ausgedehnter Gewebenekrose.

auf der Gefäßschicht befindliche „Gallertschicht“ (loose areolar tissue) bei ständiger Befeuchtung des Operationsgebietes mikrochirurgisch abpräparieren. Daraufhin befestigten wir die entfernte Kammerhälfte wieder auf dem Tier. Mit Hilfe eines Tropfens NaCl 0.9 % schlossen wir die Kammer durch ein Deckglas und einen von außen aufliegenden Kupfersprengring luftdicht ab (siehe Abbildung 2). Diese gesamte Operation dauerte im Durchschnitt 20 Minuten.

Um eine postoperative Unterkühlung der Tiere zu vermeiden, platzierten wir nach Abschluss des Eingriffs alle Versuchstiere bis zu ihrem Erwachen aus der Vollnarkose unter einer Rotlichtlampe, die eine Temperatur von circa 26–28 °C im Käfig garantierte.

Bei den „Lappentieren“ wurde das Kammermodell ein wenig modifiziert. Die Operation hatte das Ziel, einen senkrecht und seitlich zur Wirbelsäule liegenden „random pattern flap“ zu heben. Der Lappen beinhaltete den *Musculus panniculus carnosus* und maß in der Länge 11 mm und in der Breite 15 mm.

Nach der intraperitonealen Anästhesie und Enthaarung wurde bei diesen Tieren der hintere Teil des Titanrahmens der Rückenhautkammer vorübergehend an der doppellagigen Hautfalte platziert und mit Haltnähten fixiert. Nach Markierung des Lappenausmaßes von 15×11 mm mit einem Hautstift wurde die Kammerhälfte wieder entfernt. Der eingezeichnete Lappen konnte mit einer Mikroschere präpariert werden. Diese Lappenpräparation, das heißt das Einschneiden der seitlichen Lappenschenkel, hatte zur Folge, dass die kaudale bzw. kraniale Blutversorgung durch die zuführende DCIA (deep circumflex iliac artery, Arteria circumflexa iliaca) bzw. die LTA (lateral thoracic artery, Arteria thoracica lateralis) unterbrochen wurde und die Durchblutung des Lappens ausschließlich durch zuführende Gefäße über die Lappenbasis (proximal) gewährleistet werden musste. Die Umschlagsfalte der Haut, wiederum bestehend aus Epidermis, subkutanem Fettgewebe und einer Muskelschicht (*Musculus panniculus carnosus*), wurde nun erneut

an einer Hälfte des Titaniumrahmens fixiert. Die laterale Seite des Lappens wurden im Anschluss unter mikroskopischer Sicht (16-fache Vergrößerung) und bei ständiger Befeuchtung mit NaCl 0.9 % mit ca. 6 Einzelknopfnähten mit der umgebenden Haut vernäht, um eine Adhäsion der Haut an das Deckglas und den Verschluss der Kammer zu gewährleisten. Daraufhin wurde das auf der Gefäßschicht liegende „loose areolar tissue“ (Gallertschicht) mikrochirurgisch entfernt, damit im Versuchsverlauf möglichst eine Ödembildung vermieden und somit eine direkte Sicht auf das zu untersuchende Gewebe ermöglicht wurde.

Der zweite Kammerteil wurde als Gegenstück wieder am ersten Titaniumrahmen verankert. Durch das noch offene Beobachtungsfenster wurde ein Tropfen Bisbenzimid H 33342 (Hoechst®; Sigma Chemical Co.) auf die freiliegende Innenfläche des Lappens zur Darstellung apoptotischer Zellkerne appliziert.

Nach einer kurzen Einwirkzeit von ca. 1–2 Minuten wurde das überschüssige, nicht angelagerte H 33342 abgespült und das Kammerfenster durch ein Deckglas und einen Sprengling luftdicht versiegelt. Dieser Eingriff dauerte in der Regel 30 bis 40 Minuten.

Die Tiere wurden auch nach diesem Eingriff bis zum Erwachen mittels Rotlicht erwärmt.

Beide Operationstechniken sowie das Tragen des Titaniumrahmens wurden von den Versuchstieren gut toleriert, was sich in einem normalen Verhalten und erhaltener Ess- und Trinkgewohnheiten äußerte.

4.2.7 Experimentelles Protokoll

Insgesamt wurden während des gesamten Versuchszeitraumes 46 C57Bl/6 Mäuse operiert und mikroskopiert, die fünf Gruppen zugeteilt wurden:

1. **Kontrollgruppe:** Rückenhautkammer ohne Lappen ($n = 11$)
2. **Sham-Gruppe:** unbehandelter Lappen ($n = 15$)
3. **SnPP-IX-Gruppe:** 24 Stunden präoperativ, am OP-Tag, am 1., 2. und 3. Tag nach Hebung mit SnPP-IX vorbehandelte Lappen ($n = 7$)
4. **Hitze-PK-Gruppe:** Hitze-vorbehandelte Lappen (Präkonditionierung- PK) ($n = 9$)
5. **Hitze-PK + SnPP-IX:** mit Hitze und SnPP-IX vorbehandelte Lappen ($n = 4$)

Hierbei unterteilten wir die einzelnen Gruppen in zwei Versuchsprojekte.

1. Versuchsprojekt beinhaltete Gruppe 1, 2 und 3 (SnPP-IX vorbehandelter random pattern flap).
2. Versuchsprojekt beinhaltete Gruppe 2, 4 und 5 (Hitzevorbehandelter random pattern flap).

Die wiederholte mikroskopische Untersuchung der Kammern erfolgte 24 Stunden nach der Operation sowie am 3., 5., 7. und 10. Tag postoperativ mittels eines intravitalem Fluoreszenzmikroskops (IVM).

Alle Tiere wurden im Anschluss an die Mikroskopie 10 Tage nach Kammerpräparation mit einer Überdosis Ketavet® und Rompun® eingeschläfert.

4.2.8 Ausschlusskriterien

Vor jeder Mikroskopie wurde der Zustand des Versuchstiers beurteilt. Ausschlusskriterien waren ein reduzierter Allgemeinzustand des Tieres, eine Gewichtsreduktion, die mehr als 15 % des Ausgangsgewichtes betrug, Zeichen von Entzündung oder Infektion, Einblutungen in das Beobachtungsfeld der Rückenhautkammer sowie fehlendes adäquates Trink- bzw. Fressverhalten.

4.3 Untersuchungsmethoden

4.3.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Intravitale Fluoreszenzmikroskopie und Farbstoffe

Zur intravitalem fluoreszenzmikroskopischen Analyse der Versuchstiere diente ein Zeiss-Axiotech-Mikroskop (Zeiss®, Oberkochen, Deutschland), ausgestattet mit einer 100 Watt HBO-Quecksilberdampf-Lampe, die mittels eines Filters zur Auflichtbeleuchtung installiert war.

Verschiedene Filterblöcke konnten entsprechend der nachfolgenden Farbstoffe in das Strahlengangsystem eingebracht werden. Die Filterblöcke beinhalteten einen Filter für blaues Licht (Anregungswellenlänge: 450 nm–490 nm, Emissionswellenlänge: >520 nm), grünes Licht (Anregungswellenlänge: 530 nm–560 nm; Emissionswellenlänge: >580 nm) und für ultraviolettes Licht (Anregungswellenlänge: 330 nm–390 nm, Emissionswellenlänge >430 nm). Als Fluoreszenzfarbstoffe verwendeten wir 5 % Fluoreszein-Isotiozyanat

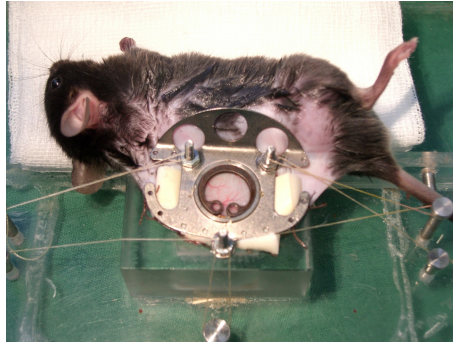


Abb. 4: Immobilisierung des Versuchstieres auf einer Plexiglasplatte zur Intravitalmikroskopie

(FITC)-Dextran (Molekulargewicht 150 000 Da; Sigma Chemical Co.). Die mikroskopischen Aufnahmen wurden von einer hochempfindlichen charged coupled device (CCD)-Videokamera (FK 6990; Pieper, Schwerte, Deutschland) aufgenommen und über einen Bildschirm (PVM 1371-QM, Sony Corp., Tokio, Japan) an einen VHS-Videorekorder (Panasonic, AG-7350-SVHS; Mitsushita, Tokio, Japan) übermittelt. Ein Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokyo, Japan), der zwischen Videokamera und Bildschirm geschaltet war, ermöglichte eine Paralleleinblendung und Aufnahme der Gruppenzugehörigkeitsnummer, der Tiernummer sowie der Zeit in Minuten und Sekunden.

Für Übersichtsaufnahmen und zur systematischen Aufnahme der Nekrosefläche wurde ein 4× Objektiv (Zeiss®) und für detailliertere nachfolgende Aufnahmen ein 20× Objektiv (Zeiss®) und ein 40× Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss®) verwendet. Für die Auswertung des apoptotischen Zelltods verwendeten wir ein 63× Wasser-Immersionsobjektiv (Zeiss®).

Zu Beginn der Mikroskopie wurden unter Vollnarkose 0.05 ml FITC-Dextran zur Kontrastverstärkung in den retrobulbär liegenden Venenplexus injiziert. Das narkotisierte Versuchstier wurde in Seitenlage auf einer Plexiglasplatte fixiert, um die nun plan liegende Kammer unter dem Mikroskop untersuchen zu können (siehe Abbildung 4). Die Mikroskopie eines Versuchstieres dauerte, je nach Perfusion des Gewebes, zwischen 10 und 20 Minuten.

Mikrozirkulatorische Analyse

Die Untersuchung der Intravitalmikroskopie zur Analyse der Mikrozirkulation wurde bei allen Versuchstieren bei einer konstanten Raumtemperatur von 23 °C durchgeführt. Zu Beginn jeder Aufnahmereihe wurde das in der Beobachtungsöffnung der Kammer sichtbare Gewebe systematisch mit dem 4× Objektiv abgefahren und aufgenommen.

4 Material und Methodik

Hierbei konnte das Ausmaß des nicht-perfundierten und nekrotischen Gewebeanteils in Bezug auf das gesamte Beobachtungsfenster erfasst werden.

Nachfolgend wurden Arteriolen und begleitende Venulen der 2.–3. Generation mit leicht wieder zu erkennenden Verzweigungsmuster jeweils im proximalen, mittleren und distalen Anteil der Kammer aufgesucht. Unter Verwendung des 20× Objektivs wurden die oben beschriebenen Gefäßbündel fotografiert und per Videoausdruck festgehalten, damit diese Areale auch im Versuchsverlauf über 10 Tage eindeutig wieder zu erkennen waren. Diese Gefäßbündel dienten im Verlauf zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers und der Flussgeschwindigkeit.

Mit dem 40× Wasser-Immersionsobjektiv gelangen uns detaillierte Aufnahmen von Leukozyten und von deren Adhäsionsverhalten an der Gefäßwand. Hierzu wurde jeweils eine Gefäßaufzweigung, des oben eingestellten Gefäßbündels fokussiert eingestellt und über mindestens 30 Sekunden auf Video festgehalten.

Anschließend wurden jeweils 3 Kapillarfelder mittels des 20× Objektivs im proximalen, mittleren und distalen Abschnitt des Beobachtungsfensters identifiziert und jedes Feld für ca. 30 Sekunden auf Video aufgenommen. Mit Hilfe dieser Kapillarfelder wurden im Verlauf die Kapillardichte, der Kapillardurchmesser und die Fließgeschwindigkeit bestimmt und daraus der volumetrische Blutfluss errechnet.

Unter Verwendung des DNA-bindenden Bisbenzimid konnten im ultravioletten Filter mit Hilfe des 63× Wasser-Immersionsobjektivs die charakteristischen apoptotischen Zelltodzeichen mit Kondensierung, Fragmentierung und Marginierung der DNA sichtbar gemacht werden. Dazu haben wir wiederum 3 zufällig ausgewählte Areale im proximalen, mittleren und distalen Teil des Beobachtungsfensters durchfokussiert und aufgenommen.

Alle Aufnahmeparameter wurden unter Zuhilfenahme eines computergestützten Analyse-Systems (CapImage; Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland) analysiert.

Dies beinhaltete die Nekrose des Lappenareals in Prozent der Gesamtfläche, indem bei diesem Verfahren das noch perfundierte Gewebe durch Umrandung markiert wurde. Im Anschluss konnte die Summe der perfundierten Areale von der Gesamtfläche des Beobachtungsfensters subtrahiert werden, um eine Fläche des Perfusionsausfalls (Tag 1–3) bzw. der Gewebenekrose (Tag 5–10) zu erhalten.

Für den Gefäßdurchmesser der Arteriolen, der Kapillaren und der Venolen wurden zwei einander gegenüber liegende Punkte innerhalb einer Gefäßwand markiert, um eine Strecke zu definieren, die senkrecht zum Gefäßverlauf war. Nach 5–7-facher Messung

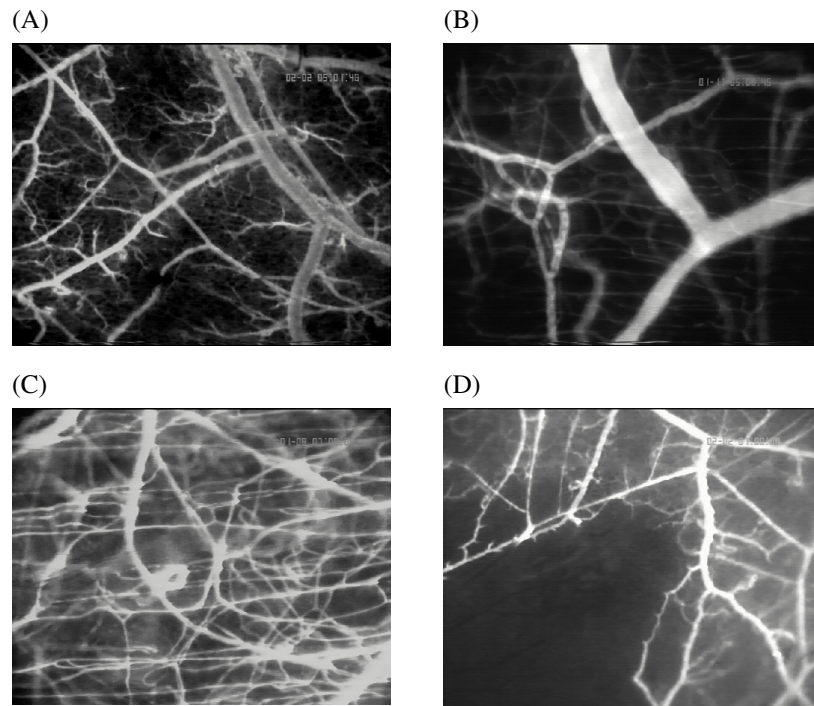


Abb. 5: Bildbeispiele aus der Intravitalmikroskopie. (A) Übersichtsbild (4× Objektiv). (B) Arteriolen und Venulen der 2.-3. Generation (20× Objektiv). (C) Kapillarfeld (20× Objektiv). (D) Übersichtsbild Grenze perfundiertes (Kontrastmittel) – nicht-perfundiertes (kein Kontrastmittel) Gewebe (4× Objektiv).

errechnete das Computerprogramm einen Mittelwert in μm , um den Gefäßdurchmesser anzugeben.

Zur Erfassung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (RBCV-red blood cell velocity) nahmen wir die „line shift“-Methode zu Hilfe und gaben diese in mm/s an. Hierzu nutzt der Computer die Helligkeitsunterschiede (verschiedene Grauwerte) die während des Aufnahmezeitraums in dem Gefäß zu beobachten sind. Es entstehen so Linien unterschiedlicher Helligkeit, deren Steigung für die Berechnung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit entscheidend sind.

Der individuelle volumetrische Blutfluss in pl/s wurde in Arteriolen, Kapillaren und Venulen errechnet. Dabei werden Fließgeschwindigkeit (V) und Querschnittsfläche des Gefäßes ($\pi \cdot r^2$) in der Gleichung nach Gross und Aroesty $Q = V \cdot \pi \cdot r^2$ integriert und davon ausgegangen, dass die Gefäßform zylindrisch ist.

Die funktionelle Kapillardichte wurde als die Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfeld definiert und in cm/cm^2 angegeben. Hierbei wurden 5 Kapillarfelder zufällig eingestellt und die durchbluteten Kapillaren während einer Aufnahmesequenz im jeweiligen Feld markiert. Der Computer errechnete aus dieser

Messparameter	Einheit
Nekrose	% der Lappen-Gesamtfläche
Erythrozytenfließgeschwindigkeit (RBCV)	mm/s
Durchmesser	µm
Individueller volumetrischer Blutfluss	pl/s
Funktionelle Kapillardichte (FKD)	cm/cm ²
Apoptose	Zellen/mm ²

Tab. 1: Messparameter und deren Einheit

Gesamtlänge der markierten Kapillaren pro Gesichtsfeld die funktionelle Dichte der Kapillaren.

Apoptotische Zellen wurden in einem definierten Beobachtungsfeld gezählt und erfasst und als Zellen/mm² angegeben.

4.4 Datenauswertung, Datenerfassung und Statistik

Zur Datenauswertung verwendeten wir ein computergestütztes Auswertungssystem mit dem Programm CapImage (Dr. Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland). Die aufgenommenen Daten wurden über einen analogen und digitalen Framegrabber (zu Deutsch Bildfangschaltung) eingelesen und mit Hilfe der CapImage Software ausgewertet. Dies ermöglichte eine von der Mikroskopie zeitlich unabhängige Auswertung der Daten.

Die Datenerfassung erfolgte nach der Videoauswertung des Bildmaterials auf angefertigten Bögen, um die Daten in eine Excel-Tabelle einzugeben und zu speichern.

Für die weitere statistische Bearbeitung und die graphische Darstellung der Daten wurden die Programme SigmaStat bzw. SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) zur Hilfe genommen. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm Standardfehler (SEM) angegeben.

Zum Vergleich zwischen verschiedenen Zeitpunkten innerhalb jeder Versuchsgruppe kam die „One Way Analysis of Variance“ (ANOVA) for repeated measurements (abhängige Stichprobe) bei normal verteilten Daten zur Anwendung. Für den Vergleich zwischen den Gruppen erfolgte eine ANOVA for multiple comparisons (unabhängige Stichprobe).

Mit Hilfe der Students-Newman-Keul (SNK-Test) post hoc-Tests wurden Einzelgruppenvergleiche bzw. Vergleiche zwischen einzelnen Zeitpunkten durchgeführt. Ein Signifikanzniveau von $p < 0.05$ wurde als signifikant bewertet.

5 Ergebnisse

Die Fixierung der Rückenhautkammer sowie die Hebung des „random pattern flap“ konnte bei allen Versuchstieren problemlos durchgeführt werden.

Eine wiederholte mikroskopische Evaluation erlaubte die Beobachtung einer klaren und eindeutigen Demarkations- oder Abgrenzungslinie zwischen vitalen und nicht durchbluteten Gewebeanteilen. Die wiederholte Mikroskopie über 10 Tage konnte in allen Fällen problemlos durchgeführt werden und wurde bei jedem Tier analog 4.3.1. vorgenommen.

Die Fluoreszenzmikroskopie erlaubte uns eine Darstellung von Arteriolen, Kapillaren und Venolen in den durchbluteten, als auch in den nicht-durchbluteten Arealen des zu untersuchenden Gewebes.

5.1 SnPP-IX vorbehandelter random pattern flap

5.1.1 Lappennekrose

Unbehandelte Tiere mit Lappen (Sham) zeigten im Vergleich zu den Kontrolltieren einen initialen Perfusionsausfall von rund $37 \pm 3 \%$ am 1. Tag nach Lappenhebung. Ein

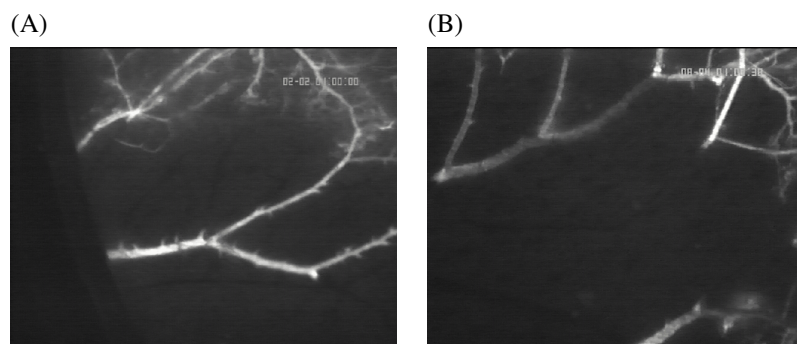


Abb. 6: Demarkationszone bei Sham und SnPP-IX-Vorbehandlung. (A) Sham-Versuchstier. (B) SnPP-IX-Versuchstier.

5 Ergebnisse

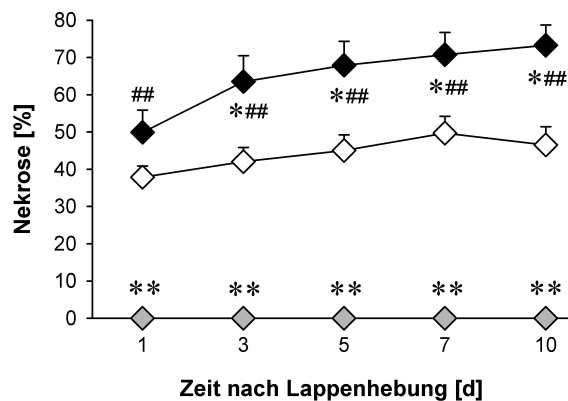


Abb. 7: Lappennekrose in % über 10 Versuchstage; weiße Raute (Sham); graue Raute (Kontrolle); schwarze Raute (SnPP-IX); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs Kontrolle.

noch weiter zunehmender Perfusionsausfall führte schließlich am 10. Tag zu einer Lappennekrose von 40 ± 5 %.

Die mit SnPP-IX vorbehandelten Tiere zeigten am 1. Tag nach Lappenhebung einen zusätzlichen Perfusionsausfall von 14 % auf 49 ± 6 %. Dieser führte am 10. Tag zu einer Nekrose von 73 ± 5 % führte. Die Kontrollgruppe zeigte über 10 Tage keinen Perfusionsausfall (siehe Abbildungen 7 und 6).

5.1.2 Arteriöler Durchmesser

Der Gefäßdurchmesser der Arteriolen war im proximalen Anteil des Kammergewebes bei allen 3 Gruppen während des gesamten Untersuchungszeitraum vergleichbar (Sham: Tag 1: 34.1 ± 3.6 μm , Tag 10: 49.5 ± 9.5 μm ; Kontrollgruppe: Tag 1: 40.7 ± 4.3 μm , Tag 10: 44.6 ± 6.2 μm ; SnPP-IX: Tag 1: 49.6 ± 4.9 μm , Tag 10: 38.9 ± 6.2 μm (siehe Abbildung 8 Bild (A)).

Im zentralen Anteil zeigte die Sham-Gruppe im Verlauf von 10 Tagen einen leichten Anstieg des Gefäßdurchmessers von 41.1 ± 5.3 μm am ersten Tag auf 63.8 ± 15.8 μm an Tag 10 (50%). Dies zeigt die Hypoxie-induzierte Vasodilatation. Bei der Kontrollgruppe konnten konstante Werte um rund 45 μm beobachtet werden. Der Gefäßdurchmesser der mittels SnPP-IX vorbehandelten Tiere nahm im Vergleich zur Kontrollgruppe über die gesamte Versuchszeit hinweg um rund 10 μm auf 35.0 ± 7.0 μm ab (25 %) (siehe Abbildung 8 Bild (B)).

Im distalen Gewebsanteil zeigte die Sham-Gruppe während der 10-tägigen Beobachtungszeit im Vergleich zu den Kontrolltieren einen geringeren arteriolen Durchmesser bei Werten um 25 μm und auch eine Abnahme des Durchmessers vom zentralen zum distalen Teil von Maximalwerten zentral von $63.8 \pm 15.8 \mu\text{m}$ und Maximalwerten distal von 34.4 μm . Der distale Lappenanteil der SnPP-IX-vorbehandelten Tiere war im distalen Anteil nicht mehr perfundiert. Entsprechend liegen keine Werte vor (siehe Abbildung 8 Bild (C)).

5.1.3 Arteriolen Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)

Im proximalen Gewebeanteil blieb die arteriolen Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit innerhalb der einzelnen Gruppen über die Dauer von 10 Tagen relativ konstant. Lediglich konnte eine leichte Abnahme der Geschwindigkeit ab Tag 5 bei der Kontrollgruppe von $1.90 \pm 0.13 \text{ mm/s}$ auf $1.42 \pm 0.23 \text{ mm/s}$ am 10. Tag und bei der Sham-Gruppe von $1.43 \pm 0.15 \text{ mm/s}$ am Tag 5 auf $0.93 \pm 0.15 \text{ mm/s}$ an Tag 10 verzeichnet werden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sowohl die Sham-Tiere als auch die mit SnPP-IX vorbehandelten Tiere eine geringere Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (siehe Abbildung 9 Bild (A)).

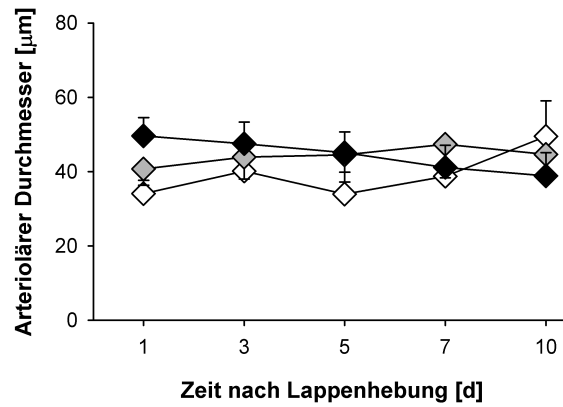
Im zentralen Lappenareal kam es bei den Sham-Tieren zu einer signifikanten Verringerung der Fließgeschwindigkeit (Tag 1: $0.98 \pm 0.12 \text{ mm/s}$; Tag 10: $0.37 \pm 0.19 \text{ mm/s}$). Die Kontrollgruppe zeigte weiterhin eine hohe Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit. Die SnPP-IX-Gruppe zeigte bereits ab Tag 1 nach Lappenhebung eine signifikante Abnahme der Fließgeschwindigkeit, die über den gesamten Versuchsablauf erniedrigt blieb (Tag 1: $0.49 \pm 0.17 \text{ mm/s}$; Tag 10: $0.43 \pm 0.28 \text{ mm/s}$) (siehe Abbildung 9 Bild (B)).

Im distalen Anteil des Lappens zeigten sowohl die Sham-Versuchstiere als auch die mit SnPP-IX vorbehandelten Tiere von Beginn an eine schlechte Fließgeschwindigkeit mit Werten unterhalb $0.19 \pm 0.19 \text{ mm/s}$ (80 %ige Reduktion gegenüber der Kontrollgruppe). Die Kontrollgruppe hingegen wies weiterhin konstant hohe Werte auf (siehe Abbildung 9 Bild (C)).

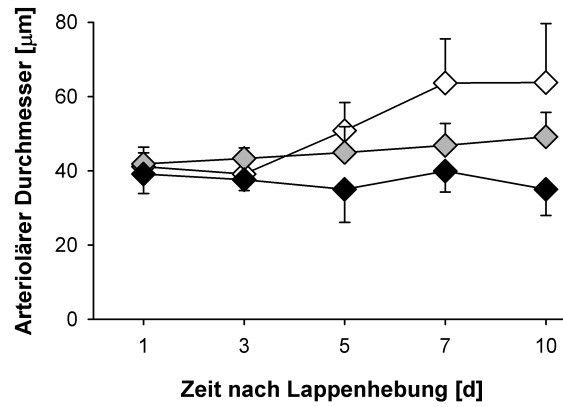
Insgesamt beobachteten wir im Lappen von proximal nach distal eine Reduktion der arteriolen Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in den einzelnen Gruppen. Im Verlauf der 10-tägigen Beobachtungszeit war auch eine Abnahme in dem jeweiligen Lappenanteil zu erkennen (siehe Abbildung 9).

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

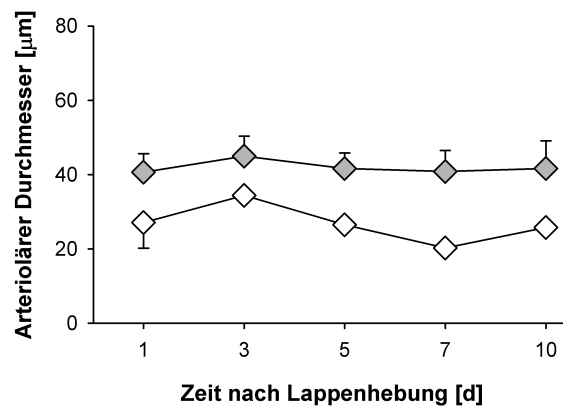
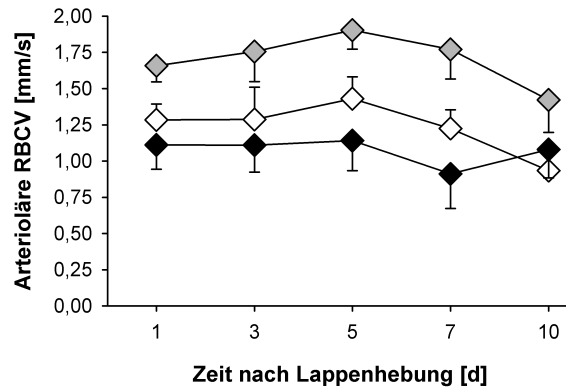


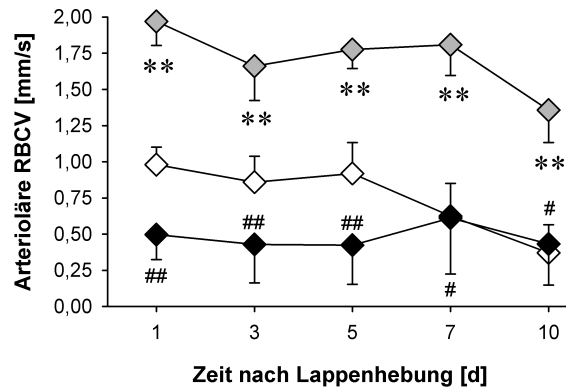
Abb. 8: Arteriöler Durchmesser in μm nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weiße Raute (Sham-Gruppe); graue Raute (Kontrollgruppe); schwarze Raute (SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM.

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

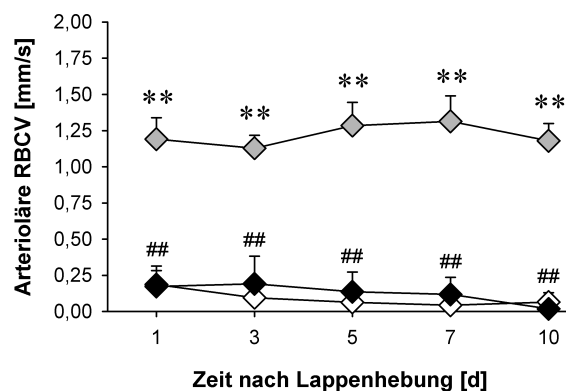


Abb. 9: Arteriöläre Erythrozyten Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weiße Raute (Sham-Gruppe); graue Raute (Kontrollgruppe); schwarze Raute (SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ vs Kontrolle.

5 Ergebnisse

Gruppe	Lappenareal	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
Sham	proximal	1307±310	1460±458	1749±677	2210±1179	2307±1330
Kontrolle		2431±479	2971±699	4185±944	4287±1454	2424±728
SnPP-IX		2201±427	2880±480	1698±592	1261±631	2419±768
Sham	zentral	1332±290	1305±500	2535±1044	2837±1351	1971±1779
Kontrolle		2760±419	2521±504	3754±1711	3827±1122	2736±1013
SnPP-IX		809±190	519±340	661±437	1193±769	1033±719
Sham	distal	156±116	88±88	34±34	14±14	34±34
Kontrolle		1871±538*	1982±474*	1822±404*	2124±713*	1659±564*
SnPP-IX		470±358#	14±14#	0±0#	0±0#	0±0#

Tab. 2: Individueller volumetrischer Blutfluss der Arteriolen in pl/s; proximal, zentral und distal; Sham-Gruppe, Kontrollgruppe, SnPP-IX-Gruppe; Mittelwert ±SEM; * $p < 0.05$ vs Sham; # $p < 0.05$ vs Kontrolle.

5.1.4 Individueller volumetrischer Blutfluss in Arteriolen

Während der 10-tägigen Beobachtungszeit stieg bei den unbehandelten Sham-Tieren der individuelle volumetrische Blutfluss in den proximalen Lappenanteilen von 1307 ± 310 pl/s am 1. Tag auf 2307 ± 1330 pl/s am 10. Tag an. Ebenso konnte im zentralen Anteil der Kammer ein Anstieg des Blutflusses von initial 1332 ± 290 pl/s am 1. Tag auf maximal 2837 ± 1351 pl/s am 7. Tag verzeichnet werden. Im distalen Bereich der Kammer beobachteten wir Werte zwischen 14 ± 14 pl/s und 156 ± 116 pl/s, die mit kritischer Ischämie einhergingen.

Bei den Kontrolltieren war im gleichen Beobachtungszeitraum im proximalen Kammeranteil eine Zunahme des individuellen volumetrischen Blutflusses von 2431 ± 479 pl/s am 1. Tag auf Maximalwerte von 4287 ± 1454 pl/s am 7. Tag zu erkennen. Zentral beobachteten wir einen arteriolen Blutfluss zwischen 2521 ± 504 pl/s und 3827 ± 1122 pl/s. Distal konnten wir erhaltene Blutflüsse an allen 10 Versuchstagen beobachten mit Werten zwischen 1659 ± 564 pl/s und 2124 ± 713 pl/s im Vergleich zu der Sham-Gruppe, die damit signifikant höher waren als bei den Kontrolltieren.

Die Gruppe, die mit SnPP-IX vorbehandelt wurde, zeigte während der Versuchslaufzeit von 10 Tagen proximal mit Werten zwischen 1261 ± 631 pl/s und 2880 ± 480 pl/s eine erhaltene Perfusion. Der arteriolen Blutfluss der zentralen Lappenanteile hielt sich relativ konstant mit Werten zwischen 519 ± 340 pl/s und 1193 ± 769 pl/s. Im distalen Areal des Lappens konnten wir, aufgrund mangelnder Perfusion, nur noch am 1. und am 3. Tag Werte die auf 470 ± 358 pl/s beziehungsweise 14 ± 14 pl/s gesunken waren beobachten. Ab Tag 5 war der Blutfluss aufgrund fehlender Perfusion in den Arteriolen vollständig aufgehoben (siehe Tabelle 2).

5.1.5 Venulärer Durchmesser

Der Gefäßdurchmesser der Venolen zeigte im proximalen Kammeranteil in der Sham-Gruppe, der Kontrollgruppe und der SnPP-IX-Gruppe eine Tendenz zur Zunahme im Verlauf des Versuchszeitraums von 10 Tagen (siehe Abbildung 10 Bild (A)).

Der zentrale Anteil des Lappens ließ ebenfalls eine Zunahme des venulären Durchmessers während des Versuchsverlaufs erkennen. Dabei war es zu einer Zunahme des Durchmessers in allen Versuchsgruppen von durchschnittlich 5 μm –15 μm gekommen. Auch hier beobachteten wir keine signifikante Veränderung des Durchmessers in Venolen (siehe Abbildung 10 Bild (B)).

Signifikante Veränderungen waren jedoch in den distalen Kammeranteilen ersichtlich. Die Sham-Gruppe zeigte eine Zunahme des venulären Durchmessers im Verlauf der Untersuchungszeit, wobei sich von Tag 7 bis Tag 10 signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe ergaben. An diesen Tagen stieg der Gefäßdurchmesser bei der Sham-Gruppe auf Werte von 157.0 μm im Vergleich zur Kontrollgruppe mit 30.6 \pm 4.2 μm . Die Kontrollgruppe hielt während der gesamten Versuchszeit ihre Werte um 40 μm . Die mit SnPP-IX vorbehandelten Tiere zeigten anfangs die größten Gefäßdurchmesser. Auffallend waren Tag 1 bis Tag 5, an denen folgende ansteigende Werte gemessen wurden: Tag 1: 89.9 \pm 24.5 μm und Tag 5 : 115.6 \pm 45.0 μm . Ab dem fünften Versuchstag war jedoch eine Abnahme des Durchmessers der Venolen zu beobachten, am 7. Tag mit signifikanten Unterschieden zur Sham-Gruppe (siehe Abbildung 10 Bild (C)).

Die SnPP-IX Gruppe zeigte über den gesamten Versuchsverlauf und in allen Kammerarealen hohe venuläre Durchmesser. Die Sham-Gruppe hatte hohe Werte, die über die 10 Tage einen Anstieg der Durchmesser vor allem jeweils von proximal nach distal erkennen ließ. Lediglich bei der Kontrollgruppe reduzierte sich der Gefäßdurchmesser distal auffallend (siehe Abbildung 10).

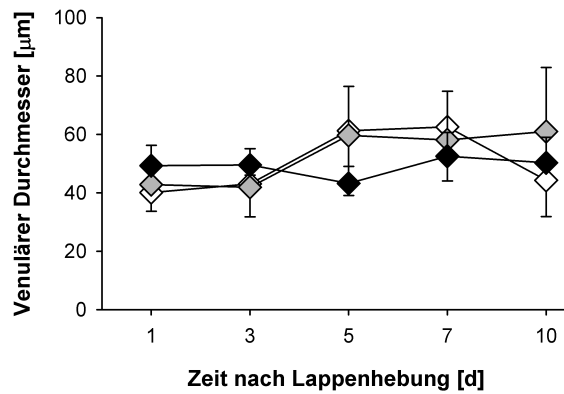
5.1.6 Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)

Die proximalen Anteile der Rückenhautkammer ließen innerhalb der einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede bei der venulären Fließgeschwindigkeit erkennen. Wir verzeichneten jedoch eine etwas höhere Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in Venulen in der Kontrollgruppe im Verlauf des Versuches (siehe Abbildung 11 Bild (A)).

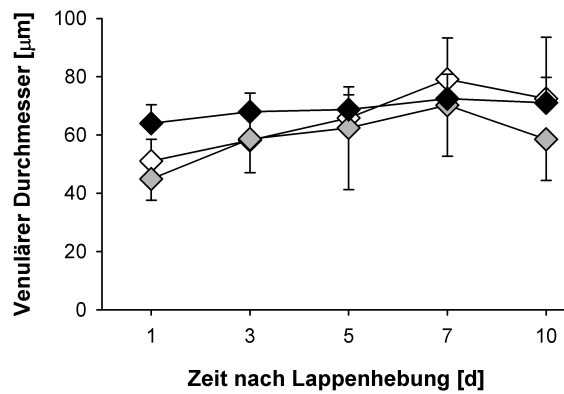
In den zentralen Lappenabschnitten zeigten die Sham-Tiere innerhalb der 10 Tage eine Verlangsamung der venulären Fließgeschwindigkeit. Die Tiere der Kontrollgruppe behielten weiterhin hohe Werte, die im Verlauf sogar einen leichten Anstieg erkennen

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

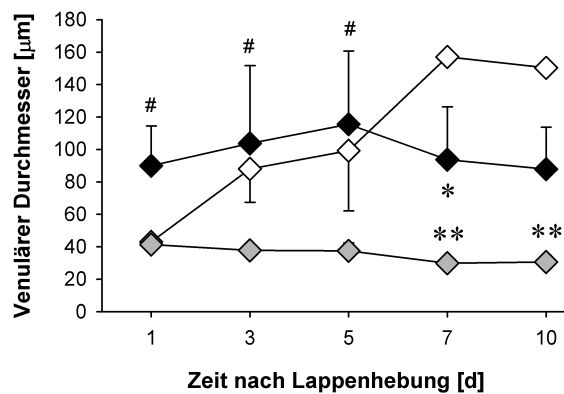


Abb. 10: Venulärer Durchmesser in μm nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weiße Raute (Sham-Gruppe); graue Raute (Kontrollgruppe); schwarze Raute (SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$ vs Kontrolle.

5 Ergebnisse

Gruppe	Lappenareal	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
Sham	proximal	934±325	525±136	2503±1918	1427±653	878±596
Kontrolle		1350±801	1186±436	4170±3166	4215±3216	5827±4926
SnPP-IX		1392±414	1014±524	929±465	1542±647	1391±629
Sham	zentral	973±336	1014±255	871±262	977±510	1265±869
Kontrolle		1498±686	2983±1236	5887±3959	5783±2732	2402±1318
SnPP-IX		595±161	246±142	1114±783	1501±921	1561±1244
Sham	distal	148±72	1137±844	968±968	1379±1379	66±66
Kontrolle		1008±284	974±471	899±361	488±158	445±121
SnPP-IX		267±181	88±88	100±100	3±3	0±0

Tab. 3: Individueller volumetrischer Blutfluss der Venulen in pl/s; proximal, zentral und distal; Sham-Gruppe, Kontrollgruppe, SnPP-IX-Gruppe.

ließen. Interessanterweise verzeichneten die mit SnPP-IX vorbehandelten Tiere bereits an Tag 1 eine signifikante Verringerung der venulären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (Tag 1: 0.20 ± 0.06 mm/s), die über die 10 Tage erniedrigt blieb (Tag 10: 0.24 ± 0.19 mm/s; $p < 0,05$ versus Kontrolle und Sham)(siehe Abbildung 11 Bild (B)).

Im distalen Lappenareal war vor allem die Verschlechterung der Fließgeschwindigkeit der unbehandelten Sham-Tiere, die Maximalwerte von 0.13 ± 0.09 mm/s nicht übertraf, auffällig. Die Kontrolltiere hatten weiterhin konstant hohe Werte um durchschnittlich 0.6 mm/s. Eine praktisch auf 0 reduzierte Fließgeschwindigkeit beobachteten wir in den mit SnPP-IX vorbehandelten Tieren (siehe Abbildung 11 Bild (C)).

5.1.7 Individueller volumetrischer Blutfluss in Venulen

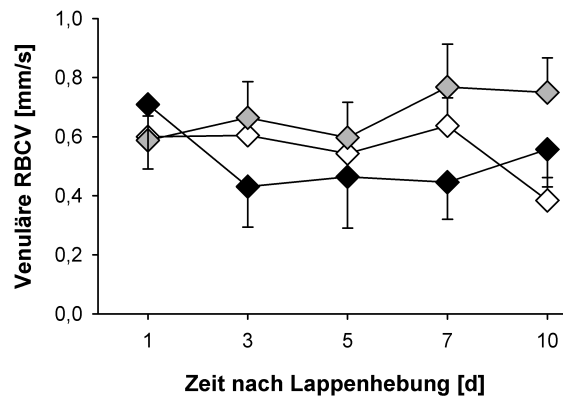
Die Sham-Gruppe wies während der 10-tägigen Beobachtungszeit im proximalen und zentralen Lappenareal Werte zwischen 525 ± 136 pl/s und 2503 ± 1918 pl/s auf, die mit einer angemessenen Perfusion einhergingen. In den distalen Bereichen lagen die Werte zwischen 66 ± 66 pl/s und 1379 ± 1379 pl/s.

Bei den Kontrolltieren stieg der volumetrische Blutfluss innerhalb der 10 Tage proximal von 1350 ± 801 pl/s an Tag 1 auf 5827 ± 4926 pl/s an Tag 10 um das 4–5 fache. Desgleichen konnte im zentralen Lappenanteil Werte von 1498 ± 686 pl/s an Tag 1 bis 5783 ± 2732 pl/s an Tag 7 beobachtet werden. Distal mit Werten zwischen 445 ± 121 pl/s und 1008 ± 284 pl/s war der Blutfluss jedoch deutlich reduziert.

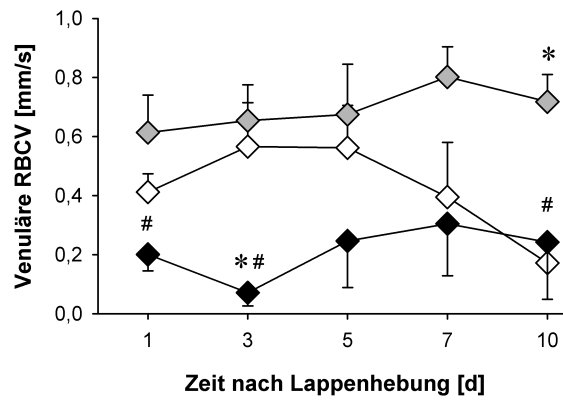
Bei den mit SnPP-IX vorbehandelten Tieren beobachteten wir proximal Minimalwerte von 929 ± 465 pl/s und Maximalwerte von 1542 ± 647 pl/s, bzw. zentral Minimalwerte von 246 ± 142 pl/s und Maximalwerten von 1561 ± 1244 pl/s. Distal konnten wir einen venulären Blutfluss von 267 ± 181 pl/s messen, der im Verlauf des Versuchs ab Tag 7 nahezu auf 0 pl/s reduziert war (siehe Tabelle 3).

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

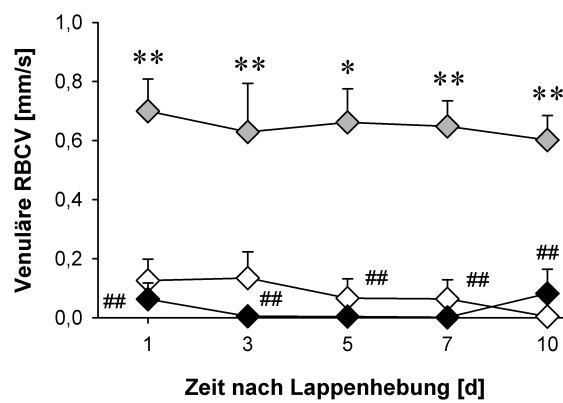


Abb. 11: Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weiße Raute (Sham-Gruppe); graue Raute (Kontrollgruppe); schwarze Raute (SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$ vs Kontrolle.

5.1.8 Funktionelle Kapillardichte (FKD)

Die funktionelle Kapillardichte reduzierte sich im proximalen Lappenanteil bei den Behandlungsgruppen im Verlauf der Versuchsperiode. Interessanterweise beobachteten wir bei den mit SnPP-IX vorbehandelten Tieren ab Tag 3 signifikant verminderte funktionelle Kapillardichten gegenüber der Kontroll- und der Sham-Gruppe. Innerhalb der 10 Tage kam es zu einem Abfall der Kapillardichte von rund 50 % (Sham: Tag 1: $193.06 \pm 13.51 \text{ cm/cm}^2$; Tag 10: $154.20 \pm 19.20 \text{ cm/cm}^2$; Kontrolle: Tag 1: $220.59 \pm 9.81 \text{ cm/cm}^2$; Tag 10: $210.98 \pm 16.63 \text{ cm/cm}^2$; SnPP-IX: Tag 1: $140.52 \pm 23.51 \text{ cm/cm}^2$; Tag 10: $70.49 \pm 23.12 \text{ cm/cm}^2$, $p < 0.05$ versus Kontrolle und Sham)(siehe Abbildung 12 Bild (A)).

Im zentralen Anteil des Lappens wurde im Untersuchungsverlauf bei der Sham-Gruppe eine Kapillardichte mit Werten um 160 cm/cm^2 beobachtet. Die Kontrollgruppe wies im Vergleich dazu eine signifikant höhere Kapillardichte auf. Die Werte hielten sich innerhalb der 10 Tage konstant bei mittleren Werten um 260 cm/cm^2 . Die Blockade von HO-1 durch SnPP-IX führte zu einem erkennbaren Abfall der funktionellen Kapillardichte im zentralen Anteil des Lappens und zeigte im Vergleich zur Kontrollgruppe an allen Versuchstagen signifikant niedrigere Werte. Insgesamt sank die funktionelle Kapillardichte über die 10 Tage um rund 75 % gegenüber Tag 1. Es blieb jedoch eine minimale Perfusion erhalten (siehe Abbildung 12 Bild (B)).

Der distale Lappenteil ließ erkennen, dass sowohl die Sham-Gruppe als auch die SnPP-IX-Gruppe von Beginn an schlechte funktionelle Kapillardichten vorzuweisen hatten, die ab dem 5. Tag auf 0 gesunken waren und somit mit einer ungenügenden Gewebepfusion einhergingen (siehe Abbildung 12 Bild (C)).

Die Statistik zeigt, dass sich die Kapillardichte von proximal nach distal bei den Versuchsgruppen stark reduzierte, wobei die Gruppe der SnPP-IX-behandelten Tiere die geringsten Werten aufwies. In der Kontrollgruppe konnte man von proximal nach distal keine Abnahme der funktionellen Kapillardichte verzeichnen (siehe Abbildung 12).

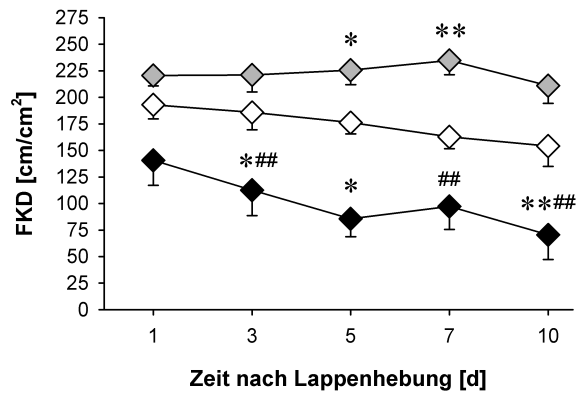
5.1.9 Kapillardurchmesser

Der Kapillardurchmesser blieb im proximalen Anteil der Rückenhautkammer innerhalb aller drei Gruppen während der 10 Tage Untersuchungszeit konstant. Die Werte lagen bei $4.5 \mu\text{m}$ (Tag 1) bis $4.4 \mu\text{m}$ (Tag 10) (siehe Abbildung 13 Bild (A)).

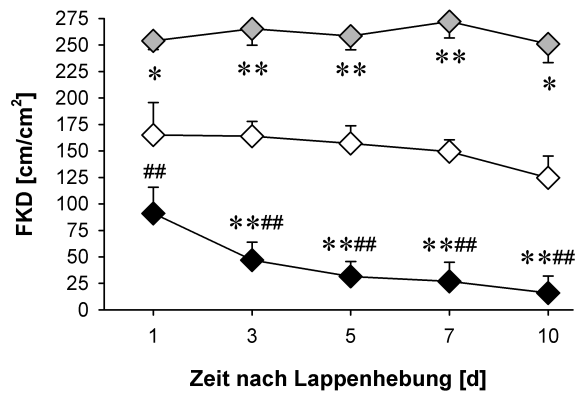
Interessanterweise beobachteten wir in der Sham-Gruppe einen kontinuierlichen Anstieg des Kapillardurchmessers im zentralen Lappenareal (Tag 1: $4.7 \pm 0.2 \mu\text{m}$; Tag 10:

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

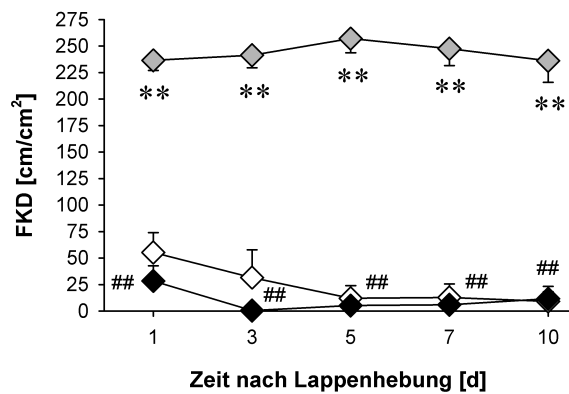


Abb. 12: Funktionelle Kapillardichte in cm/cm² nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weiße Raute (Sham-Gruppe); graue Raute (Kontrollgruppe); schwarze Raute (SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; ## $p < 0.001$ vs Kontrolle.

$6.2 \pm 0.9 \mu\text{m}$) im Vergleich zur Kontrollgruppe und den mit SnPP-IX vorbehandelten Tieren. Die letztgenannte Gruppe zeigte einen konstant erniedrigten Kapillardurchmesser ($p < 0.05$ versus Kontrolle) (siehe Abbildung 13 Bild (B)).

Distal zeigte sich in den mit SnPP-IX-vorbehandelten Tieren lediglich eine kontinuierliche Abnahme der Kapillardurchmesser. In der Sham- und Kontrollgruppe war der Verlauf der Kapillardurchmesser vergleichbar (siehe Abbildung 13 Bild (C)).

5.1.10 Kapillare Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)

Im proximalen Lappenanteil aller 3 Gruppen zeigte die kapillare RBCV eine leichte aber konstante Zunahme über die 10 Versuchstage, ohne jedoch signifikante Veränderungen vorzuweisen (siehe Abbildung 14 Bild (A)).

Die gleiche Tendenz wurde im zentralen Lappenanteil beobachtet. Am ersten Tag war bei der Sham-Gruppe ein signifikanter Geschwindigkeitsunterschied zur Kontrollgruppe von 0.13 ± 0.02 mm/s gegenüber 0.19 ± 0.02 mm/s zu beobachten. Die SnPP-IX-Gruppe hatte auch in diesem Lappenanteil konstant hohe Blutzell-Geschwindigkeiten (siehe Abbildung 14 Bild (B)).

Im distalen Teil der Rückenhautkammer verzeichnete sowohl die Sham-Gruppe als auch die SnPP-IX-Gruppe an den 10 Versuchstagen eine signifikante Abnahme der Fließgeschwindigkeit bereits am 1. Tag im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die noch perfundierten Kapillaren zeigten jedoch eine sehr geringe RBCV über die 10 Tage. In der Kontrollgruppe dagegen beobachteten wir entsprechend Geschwindigkeiten zwischen 0.20 ± 0.01 mm/s und 0.24 ± 0.02 mm/s (siehe Abbildung 14 Bild (C)).

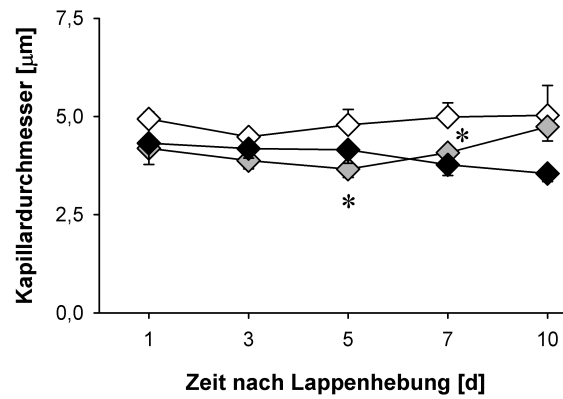
5.1.11 Individueller volumetrischer Blutfluss in Kapillaren

Als Folge der geringfügigen, aber kontinuierlichen Zunahme der Kapillardurchmesser zeigten die Sham-Tiere in proximalen und zentralen Lappenbereichen während der 10 Versuchstage eine leichte Zunahme des individuellen volumetrischen Blutflusses von 2.6 ± 0.3 pl/s auf 5.3 ± 2.1 pl/s proximal und von 1.4 ± 0.2 pl/s auf 3.5 ± 1.9 pl/s zentral. In den distalen Anteilen reduzierte sich der Blutfluss auf Werte von 0.6 ± 0.2 pl/s um schließlich am 10. Versuchstag kaum noch Blutfluss vorzuweisen.

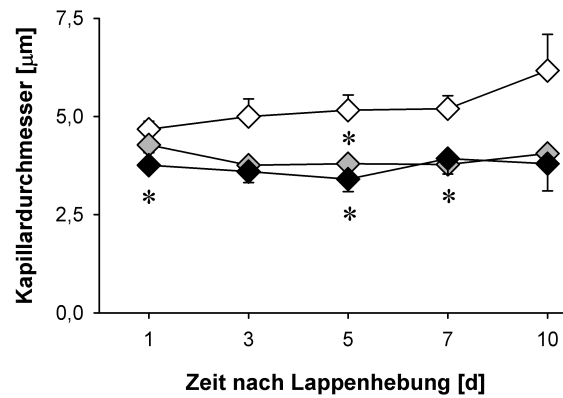
Auch die Kontrollgruppe zeigte über die 10 Tage proximal und zentral vergleichbare, zunehmend ansteigende Werte von 2.5 ± 0.4 pl/s auf 4.6 ± 1.0 pl/s proximal und von 3.2 ± 0.3 pl/s auf 3.7 ± 0.3 pl/s zentral. Distal zeigte sich im Vergleich zur Sham-Gruppe

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

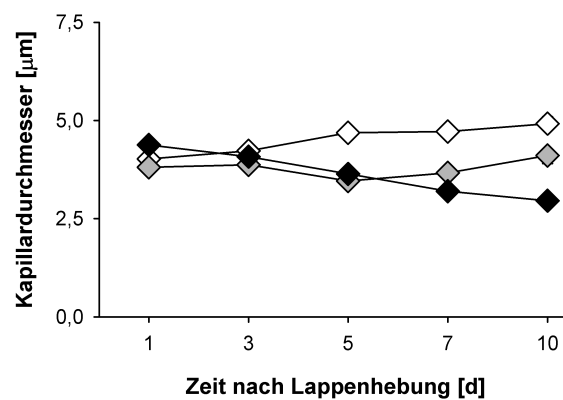


Abb. 13: Kapillardurchmesser in μm nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weiße Raute (Sham-Gruppe); graue Raute (Kontrollgruppe); schwarze Raute (SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs Sham.

5 Ergebnisse

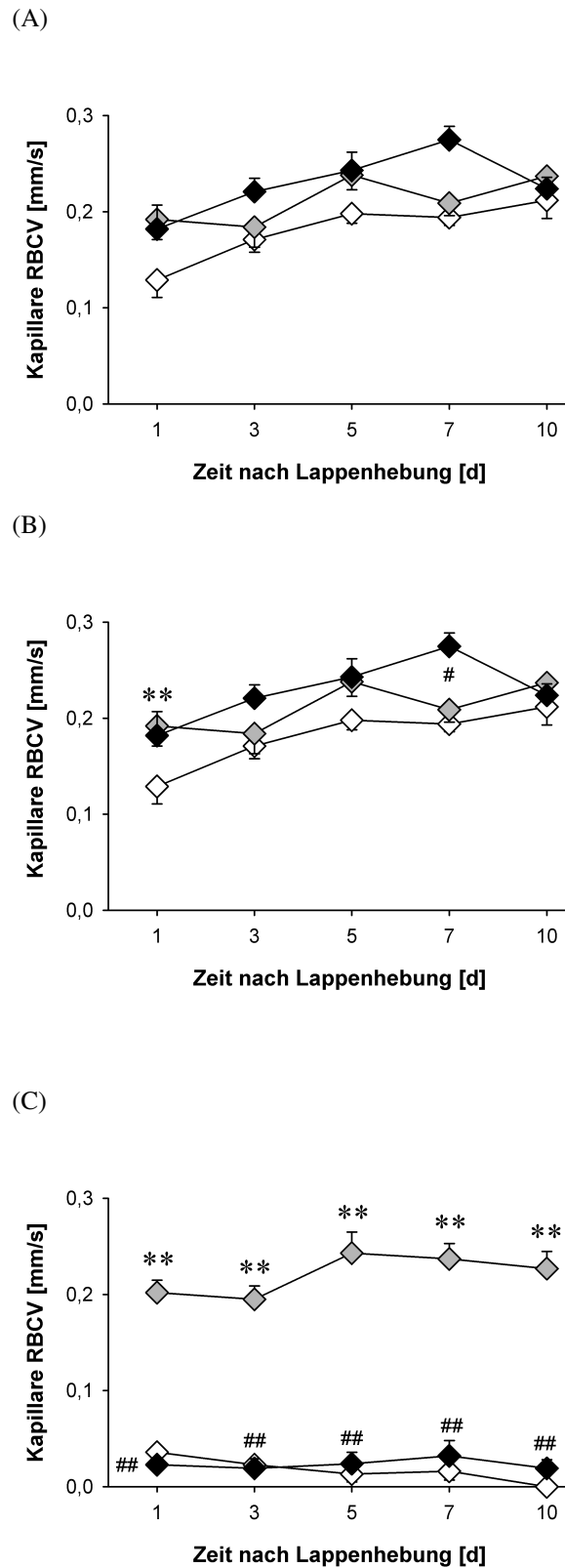


Abb. 14: Kapillare Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weiße Raute (Sham-Gruppe); graue Raute (Kontrollgruppe); schwarze Raute (SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ vs Kontrolle.

5 Ergebnisse

Gruppe	Lappenareal	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
Sham	proximal	2.57±0.27	2.94±0.28	2.97±0.38	3.62±0.47	5.30±2.11
Kontrolle		2.53±0.38	2.31±0.60	2.83±0.38	2.50±0.13	4.58±1.03
SnPP-IX		2.85±0.70	4.62±1.13	2.97±0.64	3.92±1.23	1.93±0.39
Sham	zentral	1.37±0.15	2.02±0.39	3.02±0.44	3.65±0.95	3.52±1.88
Kontrolle		3.16±0.30	2.29±0.55	2.47±0.10	2.47±0.25	3.69±0.33
SnPP-IX		1.04±0.27	3.29±1.17	1.17±0.52	0.88±0.47*	0.49±0.39
Sham	distal	0.55±0.20	0.32±0.22	0.22±0.22	0.22±0.22	0.00±0.00
Kontrolle		2.17±0.22*	2.28±0.33**	2.80±0.29**	2.66±0.32**	3.04±0.23*
SnPP-IX		0.24±0.20#	0.00±0.00##	0.00±0.00##	0.00±0.00##	0.00±0.00#

Tab. 4: Individueller volumetrischer Blutfluss in Kapillaren in pl/s; proximal, zentral und distal; Sham Gruppe, Kontrollgruppe, SnPP-IX Gruppe; Mittelwert ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ vs Kontrolle.

während der gesamten Versuchsdauer signifikant höhere Werte von 2.2 ± 0.2 pl/s an Tag 1, die im Verlauf auf 3.0 ± 0.2 pl/s anstiegen.

Die Versuchsgruppe, die mit SnPP-IX vorbehandelt wurde, ließ proximal Maximalwerte von 4.6 ± 1.1 pl/s am 3. Tag erkennen, die innerhalb der 10 Tage auf 1.9 ± 0.4 pl/s absank. Im zentralen Lappenanteil schwankten die Blutflüsse zwischen 3.3 ± 1.2 pl/s und 0.5 ± 0.4 pl/s, ohne jedoch ein vollständiges Sistieren des Blutflusses vorzuweisen. Im Gegensatz dazu beobachteten wir distal im Lappen nach SnPP-IX Gabe ab Tag 3 einen kaum noch messbaren Blutfluss.

Zusammenfassend konnte im Verlauf des Versuchs eine Zunahme des volumetrischen Blutflusses in den proximalen und zentralen Lappenabschnitten der Kontroll- und Sham-Tiere beobachtet werden. Distal kam es außer bei den Kontrolltieren zu einer starken Reduktion bzw. zum Sistieren des Blutflusses (siehe Tabelle 4).

5.1.12 Apoptotischer Zelltod

Am ersten Tag war zu erkennen, dass die Sham-Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant höhere Ausgangswerte an apoptotischem Zelltod hatte und zwar proximal 196 ± 32 Zellen/mm², zentral 268 ± 17 Zellen/mm² und distal 315 ± 40 Zellen/mm². Diese Tiere zeigten auch einen kontinuierlichen Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen von proximal nach distal. In der Kontrollgruppe waren die Werte an Tag 1 konstant. Die Gabe von SnPP-IX führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer signifikanten Zunahme des apoptotischen Zelltodes, unabhängig vom Lappenareal (Tag 1: proximal: Kontrolle 84 ± 18 Zellen/mm²; SnPP-IX 217 ± 25 Zellen/mm²; Tag 1: distal: Kontrolle 127 ± 10 Zellen/mm²; SnPP-IX 237 ± 18 Zellen/mm², $p < 0.05$ versus Kontrolle) (siehe Abbildung 15 Bild (A)).

Am 3. Tag der Studie konnten signifikante Unterschiede zwischen der Sham-Gruppe und der Kontrollgruppe festgestellt werden (Tag 3: proximal: Kontrolle 71 ± 10 Zellen/ mm^2 ; Sham 181 ± 31 Zellen/ mm^2 ; Tag 3: distal: Kontrolle 84 ± 13 Zellen/ mm^2 ; Sham 191 ± 2 Zellen/ mm^2 ; $p < 0.001$ versus Kontrolle). Die Tiere, die mit SnPP-IX vorbehandelt wurden, zeigten insbesondere im distalen Lappenanteil einen signifikanten Anstieg des apoptotischen Zelltodes von 294 ± 45 Zellen/ mm^2 gegenüber 84 ± 13 Zellen/ mm^2 (Kontrolle) beziehungsweise 191 ± 22 Zellen/ mm^2 (Sham)(siehe Abbildung 15 Bild (B)).

Am 5. Tag nach Lappenhebung fielen zwei Dinge auf. Die kontinuierliche Abnahme der Anzahl apoptotischer Zellen von proximal nach distal in der Kontrollgruppe ($p < 0.001$ versus Sham) und die signifikante Zunahme der Apoptosen in den mit SnPP-IX vorbehandelten Tieren ($p < 0.05$ versus Sham, $p < 0.001$ versus Kontrolle) (siehe Abbildung 15 Bild (C)).

Insgesamt zeigte die mit SnPP-IX-vorbehandelte Gruppe die meisten Apoptosen und gleichzeitig eine Zunahme derselben sowohl von proximal nach distal wie auch im zeitlichen Verlauf der Studie. Im Gegensatz dazu war in der Kontrollgruppe eine Abnahme des apoptotischen Zelltodes zu beobachten, ebenso in der Sham-Gruppe (siehe Abbildung 15).

5.2 Hitzevorbehandelter random pattern flap

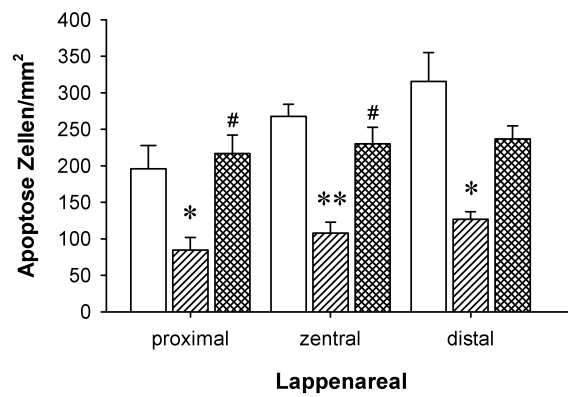
5.2.1 Lappennekrose

Die Vorbehandlung mit wiederholter Hitzeapplikation zeigte im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ($p < 0.001$ versus Sham) und den mit SnPP-IX und Hitze vorbehandelten Tieren ($p < 0.001$ versus SnPP-IX+Hitze) eine signifikante Reduktion der Lappennekrose.

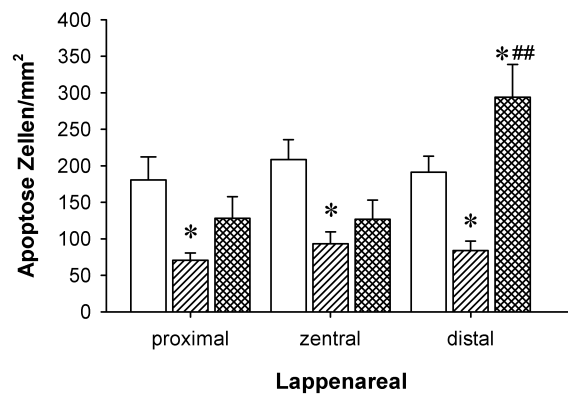
Erwähnenswert ist, dass die hitzevorbehandelten Tiere bereits am 1. Tag nach Lappenhebung eine signifikant verbesserte Mikrozirkulation im Lappen aufwiesen (Tag 1: Hitze-PK: 5 ± 1 % ; Sham: 38 ± 3 %). Des Weiteren beobachteten wir nach SnPP-IX-Gabe bereits an Tag 1 eine signifikante Verschlechterung der mikrozirkulatorischen Perfusion (Tag 1: Hitze-PK-SnPP-IX: 53 ± 5 % ; Sham: 38 ± 3 %), welche über die 10 Tage um weitere 15 % anstieg. Dies weist darauf hin, dass SnPP-IX in der Lage ist, die endogene hitzevermittelte Protektion zu antagonisieren und somit aufzuheben (siehe Abbildung 16).

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

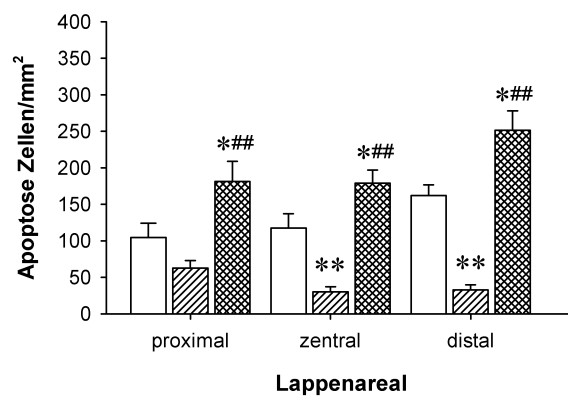


Abb. 15: Apoptotischer Zelltod in Zellen/mm² an Tag 1 (A), Tag 3 (B) und Tag 5 (C); weiße Säule (Sham-Gruppe); gestreifte Säule (Kontrollgruppe); karierte Säule (SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ vs Kontrolle.

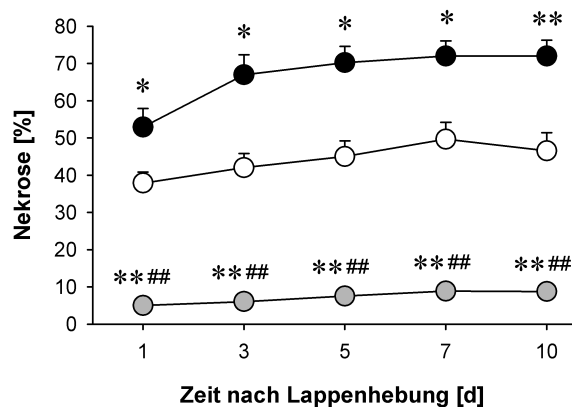


Abb. 16: Lappennekrose in % über 10 Versuchstage; weißer Kreis (Sham-Gruppe); grauer Kreis (Hitze-PK-Gruppe); schwarzer Kreis (Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; ### $p < 0.001$ vs Hitze & SnPP-IX.

5.2.2 Arteriöler Durchmesser

Die Hitze-, Sham-, und Hitze/SnPP-IX-Gruppen wiesen im Verlauf des Versuchs relativ konstante arterielle Durchmesser innerhalb ihrer jeweiligen Gruppe auf. Eine leichte Zunahme des arteriellen Durchmessers war im Verlauf der Studie bei den Hitze-behandelten Tieren zu verzeichnen. Es zeigten sich jedoch kaum Durchmesserunterschiede in den verschiedenen Lappenanteilen in dieser Gruppe. Von proximalen Lappenanteilen zu zentralen war eine leichte Abnahme des Durchmessers bei der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe zu erkennen. Der distale Anteil konnte auf Grund mangelnder Perfusion nicht mehr gemessen werden (siehe Abbildung 17).

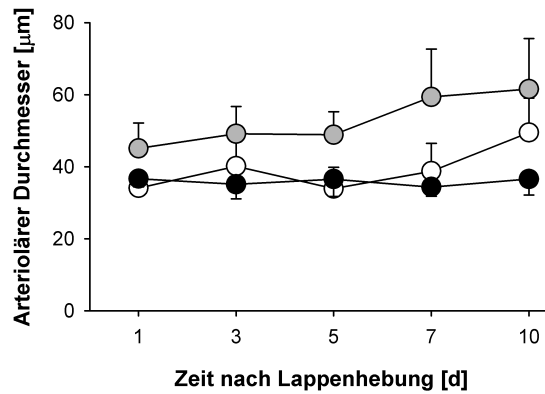
5.2.3 Arteriöle Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)

Im proximalen Lappenanteil war bei den Hitze-PK-Tieren und auch bei den Sham-Tieren eine Abnahme der arteriölen RBCV während der 10 Tage Beobachtungszeit festzustellen (Tag 10: Hitze-PK 1.26 ± 0.22 mm/s; Sham: Tag 10: 0.93 ± 0.15 mm/s). Die Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe zeigte während der 10 Beobachtungstage eine tendenzielle Zunahme der arteriölen Fließgeschwindigkeit (Tag 1: 1.28 ± 0.24 mm/s; Tag 10: 1.56 ± 0.15 mm/s) (siehe Abbildung 18 Bild (A)).

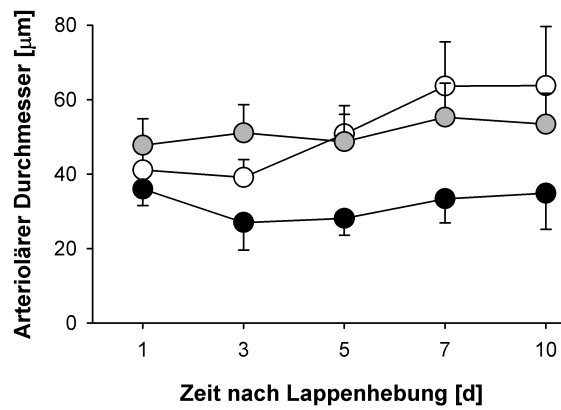
Beachtliche Unterschiede zu den anderen Gruppen konnten bei der arteriölen Fließgeschwindigkeit der Hitze-PK-Versuchstiere im zentralen Lappenanteil festgestellt werden. Es zeigten sich kontinuierlich ansteigende Werte (Tag 3: 1.39 ± 0.08 mm/s; Tag 7:

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

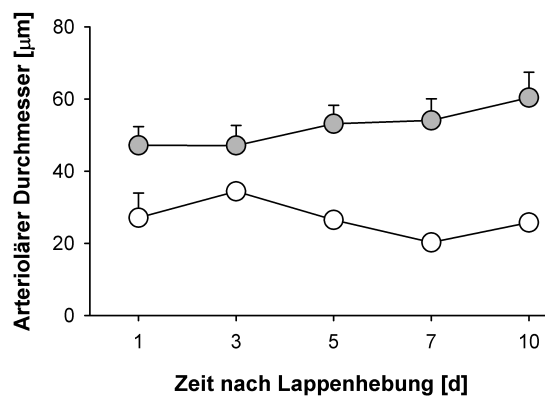


Abb. 17: Arteriöler Durchmesser in μm nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weißer Kreis (Sham-Gruppe); grauer Kreis (Hitze-PK-Gruppe); schwarzer Kreis (Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM.

1.77±0.08 mm/s). Hiermit bestätigte sich während der Versuchsreihe eine signifikante Zunahme der Blutzell-Geschwindigkeit in den Arteriolen. Die Sham-Gruppe zeigte eine Abnahme der Fließgeschwindigkeit von ca. 0.6 mm/s innerhalb der 10 Versuchstage. Im zentralen Anteil des gehobenen Lappens fielen bei der Hitze-PK-SnPP-IX vorbehandelten Gruppe vor allem an den Tagen 3 und 5 die signifikante Reduktion der erythrozytären Fließgeschwindigkeit in den Arteriolen auf (Hitze-PK-SnPP-IX: Tag 3: 0.10±0.09 mm/s; Tag 5: gegen 0,02±0.02 mm/s) (siehe Abbildung 18 Bild (B)).

Auch in den distalen Anteilen des Lappens wurde eine signifikante Geschwindigkeitsdifferenz zwischen Hitze-PK-Gruppe und Sham – sowie Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe deutlich. Die Fließgeschwindigkeit der Hitze-PK-Tiere war im Verlauf durchweg über 1.20±0.17 mm/s, wogegen die beiden anderen Versuchsgruppen Werte von 0.04±0.04 mm/s und nahezu 0 mm/s zeigten (siehe Abbildung 18 Bild (C)).

Die Hitze-vorbehandelte Gruppe zeigte von proximal nach distal konstant hohe Geschwindigkeiten. Im Verlauf von proximal nach distal wurde in der Sham-Gruppe, sowie der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe eine tendenzielle Abnahme der Fließgeschwindigkeit beobachtet (siehe Abbildung 18).

5.2.4 Individueller volumetrischer Blutfluss in Arteriolen

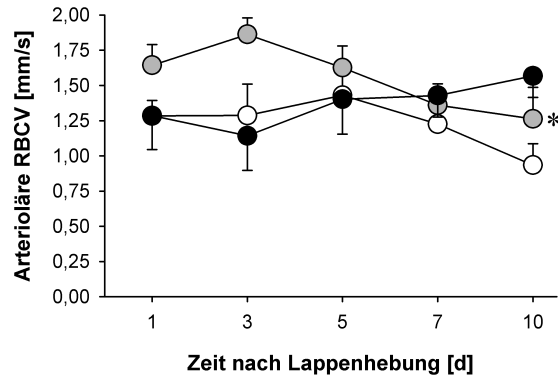
Bei den Hitze-PK-Versuchstieren wurde am 3. und am 10. Versuchstag signifikant höhere Blutflüsse gegenüber den beiden Vergleichsgruppen festgestellt (Hitze-PK: Tag 3: 4109±1042 pl/s, Tag 10: 7091±2906 pl/s). Im Verlauf der 10-tägigen Untersuchung war bei den Sham-Tieren im proximalen Lappenteil eine Zunahme des volumetrischen Blutflusses um rund 100 % zu erkennen (Sham: Tag 1: 1307±310 pl/s; Tag 10: 2307±1330 pl/s). Die Auswertung der Hitze-PK-SnPP-IX-Versuchsmäuse ergab Messergebnisse zwischen 393±300 pl/s und 1927±611 pl/s.

Die Statistik des mittleren Anteils der Rückenhautkammer zeigte signifikant höhere Werte bei den Hitze-PK-Tieren an Tag 3 bis Tag 10 gegenüber den Hitze-PK-SnPP-IX -Vergleichstieren (Hitze-PK: Tag 3: 3245±950 pl/s; Tag 10: 5056±1552 pl/s). Bei den Sham-Tieren beobachteten wir durchschnittliche Werte um 1996 pl/s innerhalb der 10 Versuchstage. Die Hitze-PK-SnPP-IX-Mäuse zeigten eine Reduktion des Blutflusses bei Werten zwischen 11±11 pl/s und 814±324 pl/s.

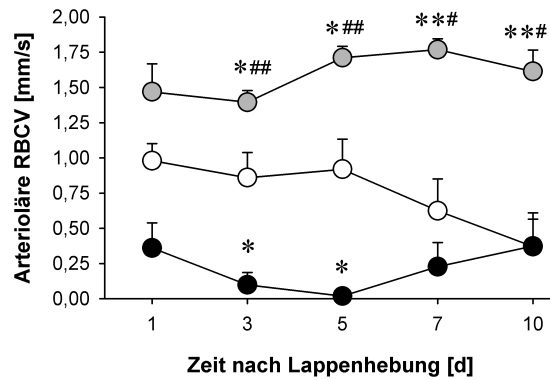
Die mit Hitze präkonditionierten Versuchstiere konnten ihre hohen Blutflüsse auch im distalen Lappenanteil aufrechterhalten, mit Zunahme innerhalb der 10 Beobachtungstage (Hitze-PK: Tag 1: 2158±442 pl/s; Tag 10: 4772±973 pl/s). Distal reduzierte sich der Blutfluss der Sham-Gruppe auf Werte unter 160 pl/s am ersten Tag, mit Tendenz

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

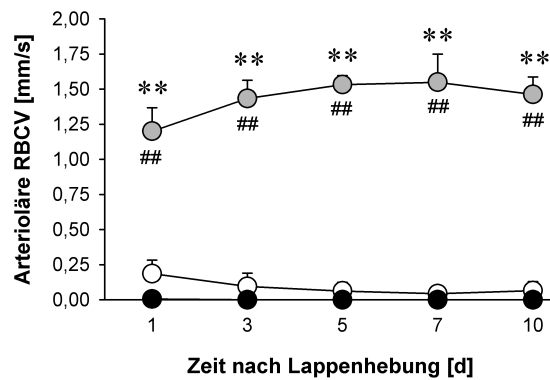


Abb. 18: Arteriöläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in $\mu\text{m/s}$ nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weißer Kreis (Sham-Gruppe); grauer Kreis (Hitze-PK-Gruppe); schwarzer Kreis (Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ vs Hitze & SnPP-IX.

5 Ergebnisse

Gruppe	Lappenareal	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
Sham		1307±310	1460±458	1749±677	2210±1179	2307±1330
Hitze-PK	proximal	2188±499	4109±1042 ^{*#}	2896±890	4584±2148	7091±2906 [#]
Hitze-PK-SnPP-IX		1437±292	1133±400	1927±611	1390±394	393±300
Sham		1332±290	1305±500	2535±1044	2837±1351	1971±1779
Hitze-PK	zentral	2759±1123	3245±950 [#]	3961±1263 [#]	5209±1506 [#]	5056±1552 [#]
Hitze-PK-SnPP-IX		814±324	53±53	11±11	514±479	393±300
Sham		156±116	88±88	34±34	14±14	34±34
Hitze-PK	distal	2158±442 ^{*##}	2570±538 ^{*#}	3745±734 ^{***}	3789±663 ^{***}	4772±973 ^{***}
Hitze-PK-SnPP-IX		19±19	0±0	0±0	0±0	0±0

Tab. 5: Individueller volumetrischer Blutfluss der Arteriolen in pl/s; proximal, zentral und distal; Sham-Gruppe, Hitze-PK-Gruppe, Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe; Mittelwert ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ vs Hitze & SnPP-IX.

zur weiteren Abnahme innerhalb der folgenden 10 Tage. Die mit SnPP-IX und Hitze behandelten Tiere ließen nur noch am 1. Tag einen geringen Blutfluss von 19 ± 19 pl/s erkennen. An den darauf folgenden Tagen konnte auf Grund mangelnder Perfusion kein volumetrischer Blutfluss in den Ateriolen gemessen werden.

Erkennbar war eine Abnahme des volumetrischen Blutflusses von proximal nach distal in der Sham-Gruppe sowie der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe. Die mit Hitze behandelten Tiere besaßen innerhalb des gesamten Lappens einen sehr guten volumetrischen Blutfluss (siehe Tabelle 5).

5.2.5 Venulärer Durchmesser

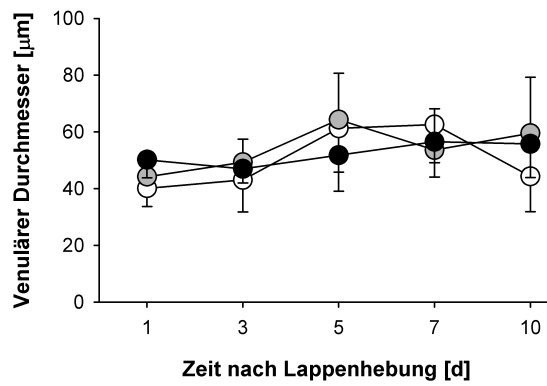
Im proximalen Anteil des Lappens zeigten alle drei Vergleichsgruppen konstante Durchmesser der Venulen zwischen $40.1 \pm 6.4 \mu\text{m}$ und $64.3 \pm 16.4 \mu\text{m}$ (siehe Abbildung 19 Bild (A)).

Zentral ließen die Hitze-PK-Gruppe sowie die Sham-Gruppe eine Zunahme des Durchmessers im Verlauf erkennen. Bei der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe zeigte sich im Verlauf von 10 Tagen eine Abnahme des venösen Durchmessers (Hitze-PK-SnPP-IX: Tag 1: $72.1 \pm 9.7 \mu\text{m}$; Tag 10: $53.9 \pm 10.9 \mu\text{m}$) (siehe Abbildung 19 Bild (B)).

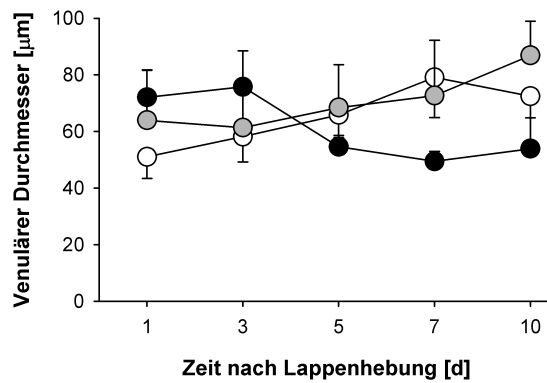
Distal zeigten die Hitze-PK-Lappentiere einen signifikanten Unterschied im Durchmesser (Hitze-PK: Tag 7: $69.9 \pm 10.2 \mu\text{m}$; Tag 10: $57.5 \pm 8.4 \mu\text{m}$). Im Versuchsverlauf blieb dieser Wert konstant. Im distalen Lappenteil nahm der Durchmesser der Venulen der Sham-Gruppe tendenziell im Verlauf über 10 Tage auf über $100 \mu\text{m}$ zu. Bei den Hitze-PK-SnPP-IX-Tieren war im distalen Lappenteil eine Messung der venulären Durchmesser nicht mehr möglich. (siehe Abbildung 19 Bild (C)).

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

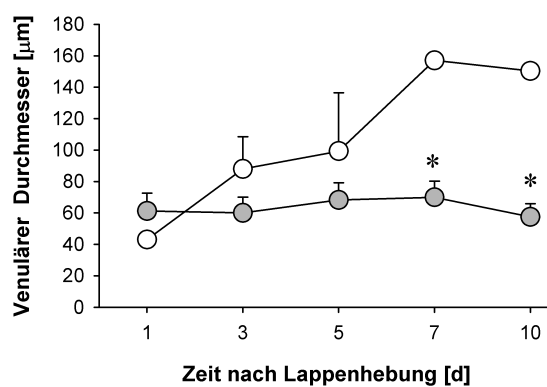


Abb. 19: Venulärer Durchmesser in μm nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weißer Kreis (Sham-Gruppe); grauer Kreis (Hitze-PK-Gruppe); schwarzer Kreis (Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$ vs Sham.

5.2.6 Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)

Die venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit im proximalen Kammeranteil zeigte bei den Hitze-PK-Tieren, der Sham-Gruppe sowie der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe konstante, hohe Werte über 0.6 mm/s (siehe Abbildung 20 Bild (A)).

In den zentralen Lappenanteilen beobachteten wir bei den Hitze-PK-Tieren durchweg signifikante Werteunterschiede gegenüber der Hitze-PK-SnPP-IX -Gruppe (Hitze-PK: Tag 3: 0.52 ± 0.08 mm/s; Tag 5: 0.75 ± 0.13 mm/s). Zentral reduzierte sich die Geschwindigkeit bei den Hitze-PK-SnPP-IX -Tieren vom 1. bis zum 7. Tag signifikant im Vergleich zu den Sham-Tieren mit Werten unter 0.22 ± 0.12 mm/s (siehe Abbildung 20 Bild (B)).

Die Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit der Venulen verzeichnete im distalen Anteil der Rückenhautkammer signifikante Unterschiede zwischen den Hitze-PK-Tieren und den beiden Vergleichsgruppen. Bei Werten im Verlauf zwischen 0.40 ± 0.08 mm/s und 0.67 ± 0.09 mm/s hob sich diese Gruppe deutlich von den Ergebnissen der beiden anderen Gruppen ab, die Geschwindigkeiten unter 0.2 mm/s aufwiesen (siehe Abbildung 20 Bild (C)).

Von den proximalen bis zu den distalen Anteilen des Lappens war eine tendenzielle Abnahme der Geschwindigkeit zu beobachten (siehe Abbildung 20).

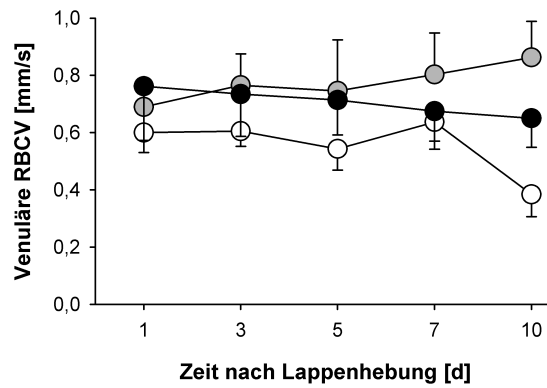
5.2.7 Individueller volumetrischer Blutfluss in Venulen

Im proximalen Lappenareal konnten bei den Hitze-PK-Tiere im Vergleich zu der Sham-Gruppe und der Hitze-PK-SnPP-IX-Versuchsgruppe wesentlich höhere Blutflüsse gemessen werden (Hitze-PK: Tag 1: 1167 ± 347 pl/s; Tag 10: 4489 ± 3283 pl/s). Im proximalen Lappenanteil schwankte der volumetrische Blutfluss der Sham-Gruppe innerhalb der 10 Versuchstage (Sham-Gruppe: Tag 3: 525 ± 136 pl/s; Tag 5: 2503 ± 1918 pl/s). Die Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe wies einen relativ konstanten volumetrischen Blutfluss innerhalb der Versuchstage auf (Hitze-PK-SnPP-IX: Tag 1: 1264 ± 314 pl/s; Tag 10: 1889 ± 818 pl/s).

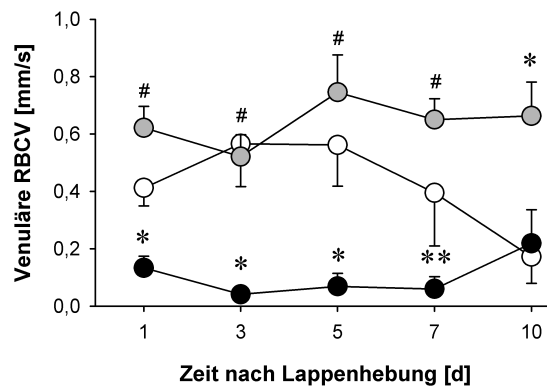
Bei den Hitze-PK-Tieren stellten wir im Verlauf der 10 Versuchstage innerhalb des zentralen Lappenanteils sehr hohe Blutflüsse fest (Hitze-PK: Tag 1: 2515 ± 1047 pl/s; Tag 10: 6203 ± 2803 pl/s). Im zentralen Anteil der Kammer zeigte die Sham-Gruppe mit Blutflüssen von maximal 1265 ± 869 pl/s relativ konstante Messdaten. Im zentralen Lappenteil der Hitze-PK-SnPP-IX-Tiere fielen die Blutflüsse auf Werte unter 650 pl/s.

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

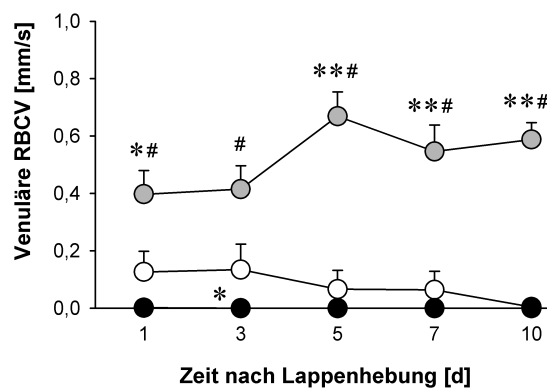


Abb. 20: Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weißer Kreis (Sham-Gruppe); grauer Kreis (Hitze-PK-Gruppe); schwarzer Kreis (Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$ vs Hitze & SnPP-IX.

5 Ergebnisse

Gruppe	Lappenareal	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
Sham		934±325	525±136	2503±1918	1427±653	878±596
Hitze-PK	proximal	1167±347	2200±822	5039±3477	2984±1558	4489±3283
Hitze-PK-SnPP-IX		1264±314	1397±600	1315±602	1808±613	1889±818
Sham		973±336	1014±255	871±262	977±510	1265±869
Hitze-PK	zentral	2515±1047	3187±1902	4043±1411	4348±1995	6203±2803
Hitze-PK-SnPP-IX		586±194	211±130	169±120	123±94	651±404
Sham		148±72	1137±844	968±968	1379±1379	66±66
Hitze-PK	distal	1093±432 [*]	1368±452 [#]	3253±1202 [#]	2261±767 [#]	2427±897 ^{**#}
Hitze-PK-SnPP-IX		14±14	0±0	0±0	0±0	0±0

Tab. 6: Individueller volumetrischer Blutfluss der Venulen in pl/s; proximal, zentral und distal; Sham-Gruppe, Hitze-PK-Gruppe, Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe; Mittelwert ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ vs Hitze & SnPP-IX.

Signifikante Ergebnisse lieferte die Auswertung der Hitze-PK-Versuchstiere im distalen Bereich des Lappens, die an allen Versuchstagen im Vergleich zu den Hitze/SnPP-IX-Tieren und der Sham-Gruppe sehr hohe volumetrische Blutflüsse aufwiesen (Hitze-PK: Tag 1: 1093±432 pl/s; Tag 5: 3253±1202 pl/s). Im weiteren Verlauf bis Tag 10 reduzierte sich der Blutfluss dann wieder auf 2427±897 pl/s. Distal schwankten die Blutflüsse der Sham-Gruppe während der Versuchsreihe zwischen 66±66 pl/s und 1379±1379 pl/s. In der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe waren auf Grund mangelnder Perfusion nur noch am ersten Tag sehr niedrige Flüsse von 14±14 pl/s messbar.

Insgesamt zeigten die Hitze-PK-Tiere die höchsten Blutflüsse, die sich auch im gesamten Lappen nachweisen ließen. Die Werte der Hitze-PK-SnPP-IX-Tiere fielen von proximal nach distal deutlich (siehe Tabelle 6).

5.2.8 Funktionelle Kapillardichte (FKD)

Bei den mit Hitze vorbehandelten Versuchstieren konnte in den proximalen Lappenanteilen ab dem 3. Tag signifikant hohe Kapillardichten beobachtet werden mit einem durchschnittlichen Wert von 214 cm/cm². Die funktionelle Kapillardichte der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe zeigte im proximalen Lappenteil eine deutliche Reduktion. Vor allem an Tag 7 und Tag 10 war eine signifikante Abnahme gegenüber der Sham-Gruppe zu verzeichnen (Hitze-PK-SnPP-IX: Tag 7: 77.60±12.05 cm/cm²; Tag 10: 67.93±15.90 cm/cm²) (siehe Abbildung 21 Bild (A)).

In der Hitze-PK-Gruppe dominierten im zentralen Lappenareal signifikant hohe Kapillardichten von über 197.3±19.3 cm/cm² an den 10 Versuchstagen. Die Sham-Gruppe zeigte zentral relativ konstante Werte. Zentral reduzierte sich die Kapillardichte der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe signifikant im Verlauf von

10 Tagen (Hitze-PK-SnPP-IX: Tag 3: 44.5 ± 19.9 cm/cm²; Tag 10: 13.2 ± 8.5 cm/cm²) (siehe Abbildung 21 Bild (B)).

Die ausschließlich mit Hitze behandelten Versuchstiere wiesen gegenüber den anderen beiden Gruppen distal signifikant hohe Kapillardichten von über 177.1 ± 24.5 cm/cm² im gesamten Versuchsverlauf auf. Die Sham-Gruppe reduzierte ihre funktionelle Kapillardichte vom zentralen zum distalen Anteil des Lappens um 100 cm/cm² auf Maximalwerte unter 55.2 ± 18.9 cm/cm² am 1. Tag. Im distalen Anteil konnte auf Grund mangelnder Perfusion die Kapillardichte der Hitze-PK-SnPP-IX-Tiere nicht mehr ausgewertet werden (siehe Abbildung 21 Bild (C)).

Insgesamt konnte bei den mit Hitze präkonditionierten Tieren eine Aufrechterhaltung der funktionellen Kapillardichten gesehen werden. (siehe Abbildung 21).

5.2.9 Kapillardurchmesser

Der proximale Kapillardurchmesser war in der Hitze-PK-Gruppe und auch in der Sham-Gruppe im Laufe der Studie konstant mit Werten um 4.7 µm. Die Hitze-PK-SnPP-IX-Versuchsreihe zeigte an Tag 5 und Tag 7 signifikant niedrigere Werte als die Sham-Gruppe (Hitze-PK-SnPP-IX: Tag 5: 3.5 ± 0.2 µm; Tag 7: 3.5 ± 0.2 µm) (siehe Abbildung 22 Bild (A)).

Zentral kam es bei der Hitze-PK-Gruppe und der Sham-Gruppe am 10. Tag zu einer leichten Zunahme des Durchmessers auf 5.6 ± 0.7 µm und 6.2 ± 0.9 µm. Die Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe zeigte im Verlauf Werte unter 4.3 ± 0.8 µm. Der 1. Tag dieser Gruppe wies den signifikant reduzierten Wert 3.6 ± 0.2 µm auf (siehe Abbildung 22 Bild (B)).

Im distalen Lappenteil waren nur die Daten der Hitze-PK- und der Sham-Gruppe auswertbar. Diese ließen konstante Werte im Verlauf von 10 Tagen mit Werten über 4.0 µm erkennen (siehe Abbildung 22 Bild (C)).

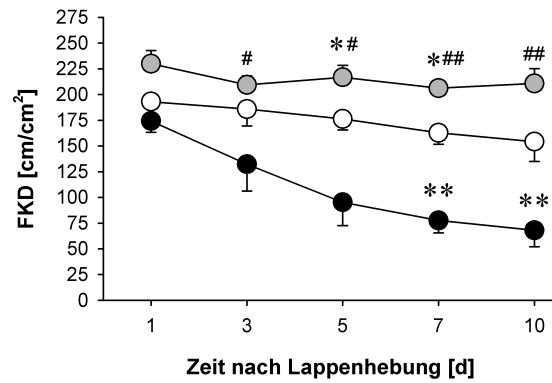
5.2.10 Kapillare Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV)

Innerhalb der drei Gruppen gab es im proximalen Anteil der Lappen kaum Unterschiede bezüglich der Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (siehe Abbildung 23 Bild (A)).

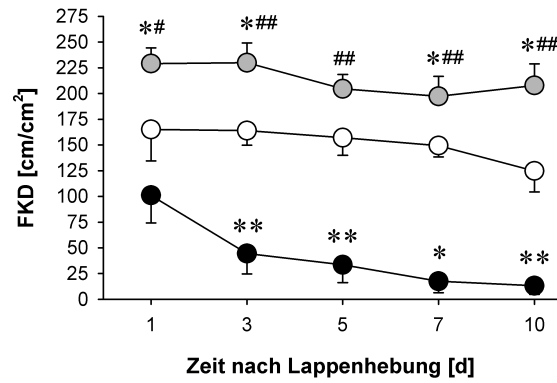
Die Hitze-PK-Versuchstiere wiesen gegenüber der Sham-Gruppe im zentralen Lappenbereich signifikant hohe kapillare Fließgeschwindigkeiten von bis zu $0,21$ mm/s auf. Die Fließgeschwindigkeit der Sham-Gruppe verzeichnete zentral eine leichte Abnahme der Geschwindigkeit in den Kapillaren (Sham: Tag 1: 0.08 ± 9.00 mm/s; Tag 10:

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

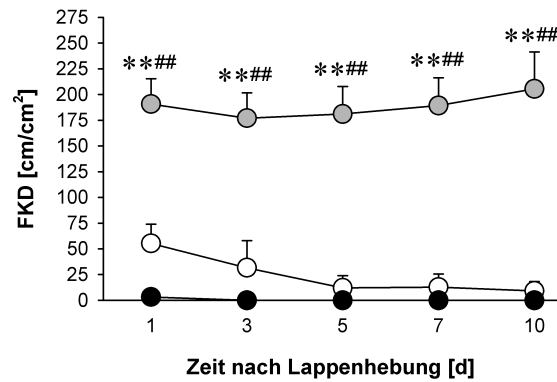
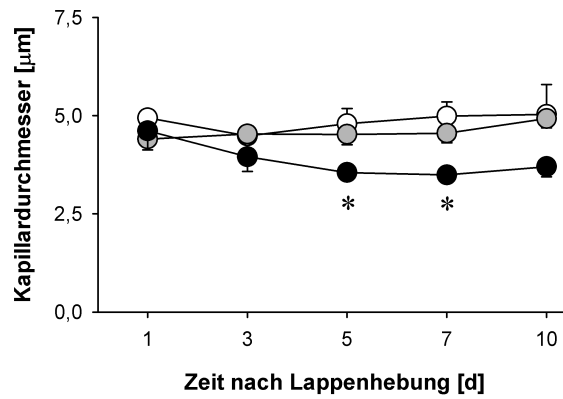


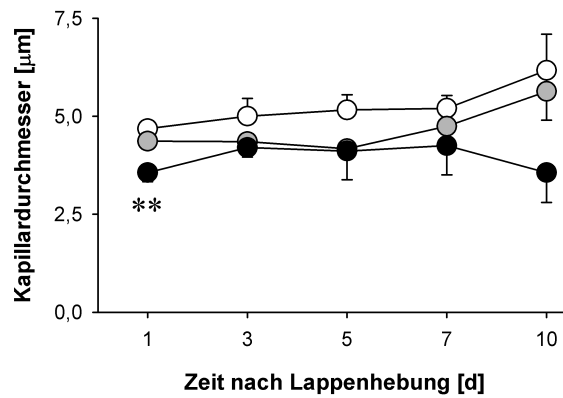
Abb. 21: Funktionelle Kapillardichte in cm/cm^2 nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weißer Kreis (Sham-Gruppe); grauer Kreis (Hitze-PK-Gruppe); schwarzer Kreis (Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ## $p < 0.001$ vs Hitze & SnPP-IX.

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

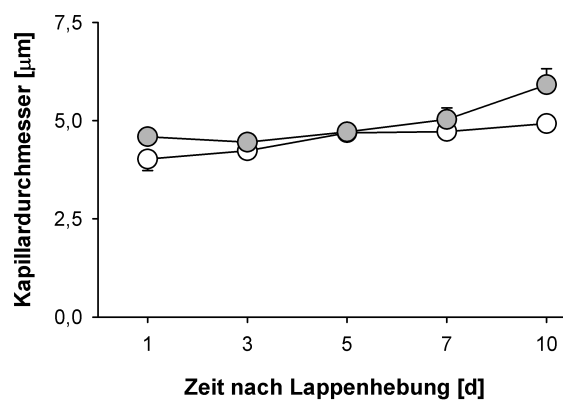


Abb. 22: Kapillardurchmesser in μm nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tage nach Hebung; weißer Kreis (Sham-Gruppe); grauer Kreis (Hitze-PK-Gruppe); schwarzer Kreis (Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham.

0.09±0.02 mm/s). Zentral war bei der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe im Vergleich zu proximalen Teilen die Fließgeschwindigkeit reduziert mit Werten zwischen 0.12±0.03 mm/s und 0.04±0.01 mm/s (siehe Abbildung 23 Bild (B)).

Im distalen Lappenareal verzeichneten die Hitze-PK-Versuchstiere signifikant höhere Fließgeschwindigkeiten gegenüber den Vergleichs-Gruppen (Hitze-PK: Tag 1: 0.12±0.02 mm/s; Tag 10: 0.19±0.01 mm/s). Im distalen Anteil der Rückenhautkammer konnte bei der Sham-Gruppe und der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe niedrige Fließgeschwindigkeiten unter 0.04± mit Tendenz zur Abnahme beobachtet werden (siehe Abbildung 23 Bild (C)).

Zusammengenommen sanken die Fließgeschwindigkeiten von proximalen zu distalen Anteilen der Lappen in allen 3 Gruppen (siehe Abbildung 23).

5.2.11 Individueller volumetrischer Blutfluss in Kapillaren

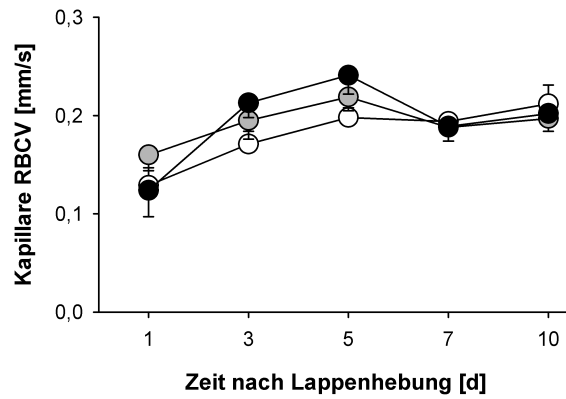
Die Hitze-PK-Mäuse wiesen am 1. Beobachtungstag im proximalen Lappenbereich einen signifikant höheren Blutfluss von 2.6±0.3 pl/s gegenüber den Hitze-PK-SnPP-IX-Tieren auf. Im Verlauf der 10 Versuchstage hielten sich die Blutflüsse dieser Gruppe zwischen 3.0±0.2 pl/s und 4.2±0.8 pl/s. Der kapillare Blutfluss stieg im proximalen Lappenteil in der Sham-Gruppe stetig an (Sham: Tag 1: 2.6±0.3 pl/s; Tag 10: 5.3±2.1 pl/s). Die Tiere, die mit Hitze und SnPP-IX vorbehandelt worden waren, ließen lediglich Maximalwerte von 3.3±0.3 pl/s erkennen.

Die Hitze-PK-Tiere hatten am 1. und am 10. Versuchstag im zentralen Lappenareal signifikant höhere Blutflüsse als die Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe (Hitze-PK: Tag 1: 2.0±0.3 pl/s; Tag 10: 5.7±1.2 pl/s). Im zentralen Anteil der Rückenhautkammer wurden in der Sham-Gruppe Werte zwischen 1.4±0.2 pl/s und 3.7±1.0 pl/s gemessen. Der volumetrische Blutfluss der Hitze-PK-SnPP-IX-Mäuse sank im zentralen Lappenteil auf Werte zwischen 0.4±0.2 pl/s und 1.8±1.1 pl/s.

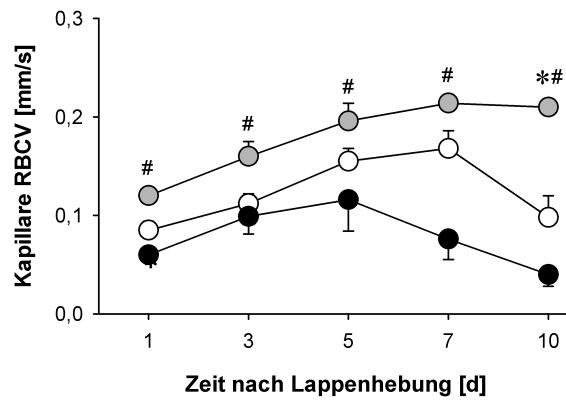
Signifikante Ergebnisse zeigten im distalen Bereich des Lappens die Hitze-PK-Versuchstiere, die im Vergleich zu den anderen beiden Versuchsreihen sehr hohe volumetrische Blutflusswerte aufwiesen (Hitze-PK: Tag 1: 2.0±0.6 pl/s; Tag 10: 5.7±1.2 pl/s). Distal war zu erkennen, dass sich der volumetrische Blutfluss der Sham-Tiere auf Maximalwerte von 0.6±0.2 pl/s reduzierte. Am 10. Versuchstag war im Lappen keine Perfusion mehr zu ermitteln. In der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe konnte nur noch am ersten Tag ein Blutfluss von 0.1±0.1 pl/s gemessen werden. Während der folgenden Tage war keine Perfusion des Lappenanteils mehr vorhanden.

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

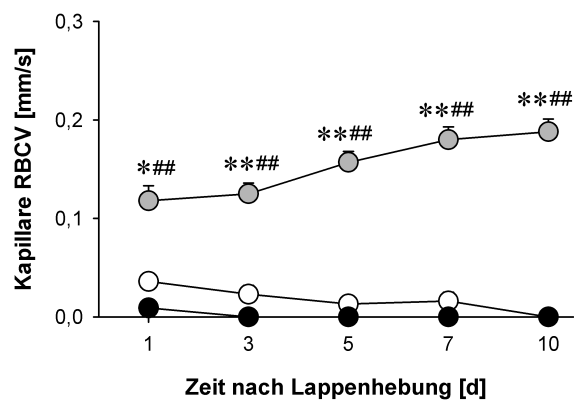


Abb. 23: Kapilläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in mm/s nach Lappenhebung im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Anteil des Lappens über 10 Tagen nach Hebung; weißer Kreis (Sham-Gruppe); grauer Kreis (Hitze-PK-Gruppe); schwarzer Kreis (Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$, ### $p < 0.001$ vs Hitze & SnPP-IX.

5 Ergebnisse

Gruppe	Lappenareal	Tag 1	Tag 3	Tag 5	Tag 7	Tag 10
Sham		2.57±0.27	2.94±0.28	2.97±0.38	3.62±0.47	5.30±2.11
Hitze-PK	proximal	2.62±0.27 [#]	4.15±1.02	4.22±0.83	2.98±0.24	3.97±0.60
Hitze-PK-SnPP-IX		1.29±0.23	3.30±0.34	3.08±0.40	1.99±0.46	2.23±0.43
Sham		1.37±0.15	2.02±0.39	3.02±0.44	3.65±0.95	3.52±1.88
Hitze-PK	zentral	1.95±0.29 [#]	3.18±0.98	2.81±0.61	3.69±0.39	5.65±1.21 [#]
Hitze-PK-SnPP-IX		0.64±0.18	1.23±0.48	1.77±1.11	1.56±1.17	0.37±0.23
Sham		0.55±0.20	0.32±0.22	0.22±0.22	0.22±0.22	0±0
Hitze-PK	distal	1.97±0.64 ^{*#}	2.13±0.47 ^{**#}	3.04±0.54 ^{**#}	3.37±0.59 ^{**#}	5.70±1.20 ^{**#}
Hitze-PK-SnPP-IX		0.05±0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00

Tab. 7: Individueller volumetrischer Blutfluss der Kapillaren in pl/s; proximal, zentral und distal; Sham-Gruppe, Hitze-PK-Gruppe, Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe; Mittelwert ± SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$ vs Hitze & SnPP-IX.

Zusammenfassend konnte lediglich die Hitze-vorbehandelte Gruppe innerhalb des Lappens einen ausreichenden Blutfluss aufrechterhalten. In den übrigen Gruppen nahm der Blutfluss innerhalb des Lappens von proximal nach distal stark ab (siehe Tabelle 7).

5.2.12 Apoptotischer Zelltod

Die Gruppe der Hitze-vorbehandelten Tiere zeigte im gesamten Lappen Werte von durchschnittlich 232 Zellen/mm² am 1. Tag. Zu Beginn der Versuchsreihe zeigten die Sham-Versuchstiere im Verlauf von proximal nach distal einen leichten Anstieg der Anzahl apoptotischer Zellen (Sham: proximal: 196±32 Zellen/mm²; distal: 315±40 Zellen/mm²). Bei der Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe konnte ähnliches wie bei der Sham-Gruppe beobachtet werden, bei der sich die Zahl der apoptotischen Zellen erhöhte (Hitze-PK-SnPP-IX: proximal: 192±33 Zellen/mm²; distal: 294±51 Zellen/mm²) (siehe Abbildung 24 Bild (A)).

Der dritte Tag der Studie ließ in allen Gruppen eine Abnahme der Apoptosen erkennen. Die Tiere, die mit Hitze vorbehandelt worden waren, zeigten eine signifikante Verminderung der Apoptosen gegenüber den beiden Vergleichsgruppen (Hitze-PK: proximal: 68±13 Zellen/mm²; distal: 93±16 Zellen/mm²). Die Sham-Gruppe hielt konstante Werte in allen Lappenanteilen von 193 Zellen/mm². Die Hitze-PK-SnPP-IX -Tiere reduzierten ebenfalls die Anzahl der apoptotischen Zellen, diese stiegen jedoch von proximal nach distal an (Hitze-PK-SnPP-IX: proximal: 131±39 Zellen/mm²; distal: 209±33 Zellen/mm².) (siehe Abbildung 24 Bild (B)).

Eine weitere tendenzielle Abnahme der Zahl der apoptotischen Zellen konnte am 5. Tag der Versuchsreihe in allen drei Gruppen verzeichnet werden. Die Hitze-PK-Tiere ließen signifikante Unterschiede zu den vorgenannten Ergebnissen erkennen und behielten eine niedrige Apoptoserate von unter 65±14 Zellen/mm² in der gesamten Rückenhautkammer.

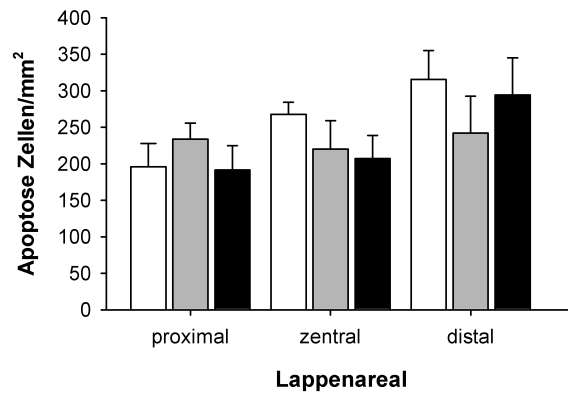
5 Ergebnisse

Die Sham-Gruppe erhöhte die Anzahl der Apoptosen von proximalen Lappenanteilen zu distalen Teilen (Sham: proximal: 104 ± 20 Zellen/ mm^2 ; distal: 162 ± 15 Zellen/ mm^2). Die Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe zeigte am 5. Tag die höchsten Werte aller Gruppen um rund 155 Zellen/ mm^2 in allen Lappenanteilen (siehe Abbildung 24 Bild (C)).

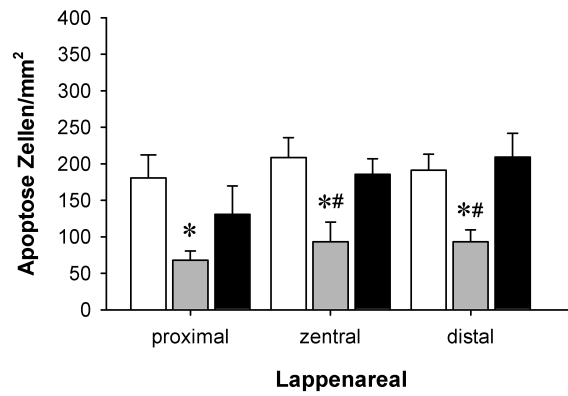
Im Verlauf der Versuchsreihe war allgemein eine Tendenz zur Reduktion der apoptotischen Zellen in dem Gewebeareal zu erkennen, wobei die Hitze-vorbehandelten Mäuse die niedrigsten Apoptosezahlen aufwiesen (siehe Abbildung 24).

5 Ergebnisse

(A)



(B)



(C)

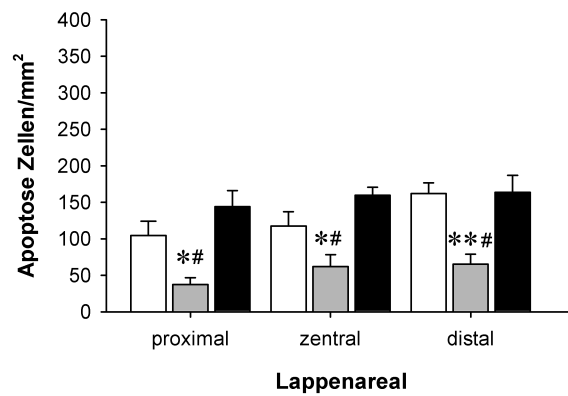


Abb. 24: Apoptose in Zellen/mm²; Tag 1 (A), Tag 3 (B), Tag 5 (C); weiße Säule (Sham-Gruppe); graue Säule (Hitze-PK-Gruppe); schwarze Säule (Hitze-PK-SnPP-IX-Gruppe); Mittelwert \pm SEM; * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs Sham; # $p < 0.05$ vs Hitze & SnPP-IX.

6 Diskussion

Die Lappenchirurgie ist heutzutage eine etablierte Methode, Weichteildefekte effektiv chirurgisch behandeln zu können. Dennoch stellen Wundheilungsstörungen, partielle oder gar totale Lappennekrosen, durch anhaltende Ischämie mit mikrovaskulärer Dysfunktion, die Chirurgen immer wieder vor ein großes medizinisches Problem. Diese ischämiebedingten Komplikationen können zu vermehrten Eingriffen und längeren Hospitalisierungszeiten führen, was eine sozioökonomische Belastung des Gesundheitswesens darstellt. Entsprechend wird der Stellenwert der Ursachenforschung bezüglich der ischämischen Lappenkomplikationen, Lappenversagen inklusive, ersichtlich. Das Verstehen von Mechanismen und klinisch anwendbare Therapieansätze sind deshalb von großem medizinischem Interesse, um die Patienten in Zukunft noch besser versorgen zu können. Die Erfahrung im klinischen Alltag zeigt, dass chronische Ischämie die Organfunktion gefährdet und in der Folge das Gewebeüberleben mindern kann. Dies konnte an einer Vielzahl von verschiedenen pathologischen Zuständen nachgewiesen werden, wie beispielsweise bei chronischen kardialen Erkrankungen [67], chronischer Ischämie der Extremitäten [21] sowie Wundheilungsstörungen in der rekonstruktiven Lappenchirurgie [9].

Diese Arbeit beschäftigte sich mit zwei wesentlichen Fragestellungen:

1. Können endogene Mechanismen, die durch die Lappenpräparation per se, d. h. Ischämie-Induktion, die HO-1 hochregulieren und dadurch ein verbessertes Lappenüberleben erzielen?
2. Wie beeinflussen exogen angewandte lokale Stressoren, wie beispielsweise Hitze, das Lappenüberleben? Wird hierbei die HO-1 exogen induziert und führt somit zu einem verbesserten Lappenüberleben? Beruht ein verbessertes Lappenüberleben auf einer erhaltenen Gewebepfusion oder auf einer Erhöhung der Ischämietoleranz?

Die vorliegende Studie ergab im Wesentlichen zwei bedeutende Ergebnisse, die im Nachfolgenden erörtert werden.

6.1 Anhaltende Ischämie und endogene HO-1-Stimulation

Bis dato ist über die endogene Expression von HO-1 in anhaltend akuter Ischämie der Haut und des Muskels wenig bekannt. Kürzlich konnte gezeigt werden, dass eine Präkonditionierung über 7 Tage die HO-1 induziert und somit zu einer Reduzierung des Gewebeschadens in Ischämie-geschädigtem Gewebe führt [18].

In unserer Studie zeigen wir, dass es in muskulokutanem Gewebe, welches Ischämie unterliegt, zu einer Induktion der endogenen HO-1 kommt. Die Tatsache, dass die kompetitive Hemmung der HO-1 in diesem Modell zu einem beachtlichen Anstieg des apoptotischen Zelltodes und der Gewebenekrose führt, weist auf die bedeutende Rolle der endogen induzierten HO-1 in Bezug auf den Schutz von ischämieinduzierter Gewebenekrose hin. Dies kann auch mit der Arbeit von Yet und Mitarbeitern bestätigt werden, die zeigen konnten, dass chronische Hypoxie zu schwerwiegender ventrikulärer Dilatation und zu Infarkten in HO-1-defizienten Mäusen führen kann [73]. Interessanterweise erkannten die Autoren Areale von infarziertem Myokard, umgeben von apoptotischen Kardiomyozyten, als Hinweis, dass Apoptose eine Art des Zelltods darstellt [73].

Um aufzuklären, ob HO-1 in chronisch ischämischem Gewebe den Schutz vor Nekrose durch Verminderung der mikrovaskulären Dysfunktion bewirkt, untersuchten wir die Mikrozirkulation über einen Zeitraum von 10 Tagen. Wir konnten zeigen, dass die Lappenhebung mit einer Vergrößerung des volumetrischen Blutflusses in verschiedenen Arteriolen der kritisch perfundierten zentralen Gewebeareale verbunden war. Die Sham-Gruppe zeigte signifikant höhere volumetrische Blutflüsse in Arteriolen im Vergleich zur Kontrollgruppe im Verlauf des Beobachtungszeitraums. Diese Zunahme der Perfusion resultierte eher aus einer Dilatation der Arteriolen, als aus einer Steigerung der Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit. Die Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit in Arteriolen zeigte im Lappen von proximal nach distal konstante bis leicht fallende Werte. Der arterioläre Durchmesser hingegen stieg bei den Sham-Versuchstieren um 33 %. Die Dilatation der Arteriolen ist durch HO-1 vermittelt, da deren Inhibierung durch SnPP-IX zu einer kompletten Aufhebung der Dilatation der Arteriolen und damit auch der Erhöhung des volumetrischen Blutflusses führte. Der endogene Schutz war dadurch aufgehoben.

Das erste wesentliche Ergebnis unserer Arbeit veranschaulicht, dass die Lappenhebung mit kritischer Perfusion des distalen Lappenanteils eine Induktion von HO-1 zur Folge hatte, die mit einer signifikanten Verbesserung des Lappenüberlebens einhergeht. Des Weiteren verstärkt die funktionelle Blockade dieser HO-1 die Gewebenekrose. Der Schutz durch die HO-1 ist vermittelt durch die Verminderung der mikrovaskulären

Dysfunktion. Letzteres ist höchstwahrscheinlich auf die vasodilatorische Wirkung des HO-1-assoziierten CO zurückzuführen, da sich die Verbesserung der kapillaren Perfusion durch die arterioläre Dilatation und Hyperperfusion erklären lässt.

Organe reagieren auf eine Reihe von unspezifischen proinflammatorischen (endogenen) Stimuli, die pathologischen Einflüssen entgegenwirken, indem sie eine systemischen Antwort induzieren, die zum Ziel hat, die Produktion und Freisetzung von protektiven endogenen Mediatoren wie Prostaglandinen, Stickstoffmonoxid (NO) oder Kohlenstoffmonoxid (CO), zu fördern.

Prostaglandine wirken auf verschiedene Art und Weise auf die Mikrozirkulation [44]. In muskulokutanem Gewebe agieren Prostaglandin E2 sowie Prostaglandin I2 als Vasodilatoren, während Prostaglandin D2 und Prostaglandin F2a hauptsächlich vasokonstriktorisches wirken.

TxA₂ ist ein bedeutender Metabolit der Arachnoidonsäure in Blutplättchen. Es stellt einen potenten Vasokonstriktor dar, der an der Plättchenaggregation beteiligt ist. Aufgrund der Tatsache, dass die TxA₂ Ausschüttung während chronischer Ischämie hochreguliert wird, kann angenommen werden, dass es wesentlich an der ischämiebedingten Gewebenekrose beteiligt ist [40]. Auf der anderen Seite ist NO ein potenter Vasodilator, der aus Endothelzellen freigesetzt wird. Es wird aus L-Arginin durch die endotheliale NO-Synthetase synthetisiert [40]. NO übt seine biologische Wirkung sowohl über cGMP-abhängige als auch über cGMP-unabhängige Mechanismen aus [34]. Es wurde bereits beschrieben, dass der NO-Spiegel unter chronisch ischämischen Bedingungen ansteigt. Seine vasodilatierende Wirkung könnte allerdings permanent durch Endothelin-1 ausgeglichen werden, welches ebenfalls nachweislich in chronisch ischämischen Arealen ansteigt [35].

Vorherige Studien deuten bereits darauf hin, dass CO, welches aus dem Abbau von Häm als Antwort auf lokale und exogene Stimuli entsteht, Einfluss auf Gewebeschutz in einer Mehrzahl von Organen hat, einschließlich Lunge [38], Leber [51], Niere [28] sowie Herz [3]. Zahlreiche Autoren konnten zeigen, dass die im Rahmen einer Stress-Antwort ausgeschüttete HO-1 und ihr katalytisches Abbauprodukt CO einen suffizienten Zellschutz gewährleisten. Die Induktion von HO-1 durch lokal und systemisch applizierten Hitzeschock (exogener Stimulus) ergab eine Reduktion der mikrovaskulären Dysfunktion sowie Inflammation durch Leukozyten in muskulokutanen und osteomyokutanen Lappen [48, 49].

Ferner zeigten Sass und Mitarbeiter, dass es durch CO Gabe bzw. eine Behandlung mit CO freisetzendem Methylenchlorid möglich ist, den protektiven Effekt der HO-1 durch Minderung der Zytokine und CD95-vermittelten apoptotischen Leberschädigung

zu imitieren [54]. Akamatsu und Mitarbeiter wiesen auf die Verminderung des apoptotischen Zelltodes in reperfundierten und reoxygenierten kardialen Transplantaten durch Protoporphyrin-IX hin [1]. Der Effekt wird vermutlich durch endogenes CO induziert, was darauf hinweisen könnte, dass das gasförmige Monoxid für diesen Schutz verantwortlich ist [1].

Eine Studie von Brouard und Mitarbeiter untersuchte das antiapoptotische Potential der HO-1 in endothelialen Zellkulturen. Sie kamen zu dem Schluss, dass CO Zellen vor dem apoptotischen Zelltod schützt durch Aktivierung des p38 mitogen-aktivierenden Proteinkinase Stoffwechsels [5]. Die Annahme, dass CO vor apoptotischem Zelltod schützt konnte durch unsere Ergebnisse bestätigt werden. Eine CO-Induktion durch Lappenhebung konnte eine Abnahme des apoptotischen Zelltodes zeigen. Hingegen ließ die Inhibierung der HO-1 durch SnPP-IX die Anzahl apoptotischer Zellen signifikant ansteigen.

Weiterhin deuten klinisch experimentelle Untersuchungen nach renaler und myokardialer Reperfusion und Reoxygenierung darauf hin, dass die HO-1 den apoptotischen Zelltod mindert [24, 57]. Hierbei konnten wir nachweisen, dass in chronisch ischämischem Gewebe eine Hitze-Schock-Präkonditionierung eine Reduktion des Gewebeschadens bewirkt. Die SnPP-IX-Versuchsgruppe zeigte hierbei signifikant hohe Apoptosen. Die mit hitzevorbehandelten Tiere wiesen dagegen die signifikant niedrigsten Apoptosezahlen auf. Hitze-Präkonditionierung reduziert dementsprechend den apoptotischen Zelltod. Dies wird wohl durch HO-1 bewirkt, da die spezifische Hemmung der HO-1 durch SnPP-IX die Reduktion des apoptotischen Zelltods komplett aufhebt.

Das endogen ausgeschüttete HO-1-Enzym vermag zusätzlich den Schaden während verschiedener pathologischer Zustände zu limitieren. Hierzu zählen Endotoxämie [62], Transplantatabstoßung [56], Reperfusion und Reoxygenation [55, 64].

Die Funktion von CO als potenter Vasodilator [60] zeigt eine Wirkung analog des NO [30]. Die Studie von Druckers et al. gibt Hinweise darauf, dass CO unabhängig von NO wirkt, was einen signifikanten Abfall kontraktiler Aktivität in HO-1-transfizierten Arterien zur Folge hat [11]. Aus Endothel abgeleitetes CO diffundiert zu angrenzenden glatten Muskelzellen, wodurch eine Aktivierung der löslichen Guanylylzyklase zu einem Anstieg der intrazellulären cGMP Konzentration führt. Dies wiederum bewirkt eine Relaxierung der glatten Muskulatur [41, 53]. In diesem Zusammenhang konnten Clark und seine Mitarbeiter nachweisen, dass die Kontraktilität von Koronararterien in postischämischem kardialem Gewebe durch die vermehrte Expression von HO-1 reduziert war [8]. Die Autoren nahmen aufgrund ihre Ergebnisse an, dass der Anstieg von endogenem CO eine mögliche Rolle in der Verminderung der Gefäßkontraktilität im Anschluss

an die Reperfusion eines ischämischen Herzens spielt. Das vasodilatierende Potential von CO wurde weiterhin an neugeborenen Schweinen durch Carratu und Mitarbeiter untersucht [6]. Die Autoren konnten nachweisen, dass eine hohe Konzentration von CO während eines Krampfanfalls mit einer zeitabhängigen zerebralen arteriolen und venulären Vasodilatation korreliert ist. Dieses bot einen Schutz vor krampfinduzierten vaskulären Schäden. Darüber hinaus zeigte sich, dass die Applikation von SnPP-IX in hohem Maße die CO Antwort gegenüber Krampfanfällen und somit auch die Vasodilatation der Zerebralgefäße reduzierte, was die zerebrale vaskuläre Reaktivierung während der Erholungszeit ebenfalls sichtbar minderte [6].

Wie nach Ischämie-induzierter HO-1-Expression erkennbar, bewirkt lokaler Hitzeschock arteriolen Dilatation, was in einer Zunahme des arteriolen Blutflusses resultiert, welcher eine Aufrechterhaltung der kapillaren Perfusion in der kritischen Demarkationszone garantiert. Vergleichbar mit der arteriolen Antwort in diesem Lappenareal, zeigten die Kapillaren in unserer Versuchsreihe ebenfalls eine ausgeprägte Dilatation. Eine CO vermittelte Dilatation der Mikrogefäße wurde jedoch fast ausschließlich in Arteriolen beschrieben, die mit einer Vielzahl von glatten Muskelzellen ausgestattet sind [14, 43]. Da ein Mangel an glatten Muskelzellen in Kapillaren zu finden ist, könnte die dilatatorische Antwort in Kapillaren, welche überwiegend in der Demarkationszone anzutreffen war, ein passives Phänomen darstellen, d.h. eine passive Antwort auf den gesamten Anstieg des arteriolen Blutflusses darstellen. Diese Veränderung des Kapillardurchmessers, der im kritisch perfundierten Gewebe der Demarkationszone beobachtet werden kann, kann am besten mit der Zunahme des Kapillardurchmessers im Gehirn verglichen werden, der ebenfalls durch anhaltende Hypoxie induziert wird [4]. Diese Hypoxie-induzierte morphologische Veränderung in Kapillaren des Gehirns erhöht die Sauerstoff-Abgabe ins neurale Gewebe signifikant [4]. Die vergleichbare Beobachtung im kritisch perfundierten myokutanen Lappen lässt darauf schließen, dass das Überleben des Gewebes eine Folge dieses mikrovaskulären Remodelings ist [17].

Suematsu und Mitarbeiter konnten zeigen, dass CO als endogener Modulator des Gefäßtonus in Sinusoiden fungiert, welche die kapillare Struktur der Leber repräsentieren [61]. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass Sinusoid-assoziierte Perizyten, welche kontraktile Elemente besitzen, für die CO-vermittelte Regulierung des Blutflusses verantwortlich sind, denn eine Inhibierung des CO resultierte in einer perizytenvermittelten sinusoidalen Konstriktion [61]. Demnach kann die dilatierende Antwort der Kapillaren in unserer Studie ebenso das Resultat einer CO-vermittelten aktiven Kapillardilatation sein.

Zusammenfassend zeigt unsere Studie, dass schwere chronische Ischämiezustände endogene HO-1 in muskulokutanem Lappengewebe induzieren.

Wissenschaftler sehen CO als ein toxisches Abfallprodukt des metabolischen Stoffwechsels an. Die Tatsache, dass das Enzym HO-1, welches Häm-Moleküle in Biliverdin, zweiwertiges Eisen und CO katabolisiert, in Geweben höherer Lebewesen ausgeschüttet wird, kann CO die Rolle eines der zentralen Signalmoleküle in diesem Schutzmechanismus zuteil werden lassen.

6.2 Anhaltende Ischämie, lokale Hitze und exogene HO-1-Stimulation

Wir konnten weiterhin zeigen, dass die Induktion des Hitze-Schock-Proteins HO-1 in randomisiert durchblutetem ischämischem Gewebe signifikant die Lappennekrose reduziert. Nach initialem Perfusionsausfall von ca. 35 % der Gesamtlappenfläche entwickelten unbehandelte Lappen rund 40 % Nekrose. Die lokale Vorbehandlung mit wiederholter Hitzeapplikation konnte die Nekrose auf rund 5 % signifikant reduzieren. Die Verabreichung von SnPP-IX führte zu einer vermehrten Nekrosebildung (rund 70 %) im Vergleich zu den unbehandelten Kontrollen (rund 50 %), was darauf hinweist, dass nicht nur die Hitzeinduzierte, HO-1-vermittelte exogene Protektion, sondern auch der Ischämie-induzierte endogene Schutz aufgehoben wird. Dabei ist der Schutz eher durch Aufrechterhaltung der mikrovaskulären Perfusion, als durch verbesserte Ischämietoleranz zu erklären. Eine lokale Hitze-Präkonditionierung und damit die Induktion von HO-1 ermöglicht somit ein Lappenüberleben um beinahe 58 %.

Bisherige Studien haben gezeigt, dass die Präkonditionierung mittels Hitze im supraphysiologischen Bereich nicht nur einen HO-1-vermittelten effektiven Schutz vor Organ-Dysfunktion [45, 39] bietet, sondern auch vor Organversagen in einer Vielzahl von Krankheitszuständen wie Entzündung [20, 70], Sepsis [37], Ischämie-Reperfusion [65, 71] und Transplantatabstoßung [50] schützt.

Obgleich die genauen Wirkmechanismen dieser Protektion noch nicht vollständig geklärt sind, zeigten Untersuchungen an ischämischem Gewebe nach Reperfusion, dass CO, ein Zwischenprodukt aus dem Abbau von Häm durch die HO-1, einen Beitrag zur Reduktion des Schadens leisten kann [48]. Rücker und Mitarbeiter konnten in osteomyokutanen Lappen zeigen, dass Hitze-Präkonditionierung zu einer verbesserten Perfusion durch kapilläre Dilatation führt. Dies war auf die vasodilatierende Eigenschaften der HO-1 zurückzuführen.

Die Tatsache, dass die Konditionierung mit kontrollierter Hitze die Ausschüttung von HO-1 induziert und die Inhibition von HO-1 durch SnPP-IX den Schutz vor Nekrose

komplett aufhebt, unterstreicht die bedeutende Rolle dieses Moleküls in der Prävention von chronisch ischämischen Gewebeschäden. Dies konnten wir sowohl bei dem exogen induzierten hitzevermittelten Schutz, als auch bei dem endogen und dem Ischämie vermittelten Schutz zeigen.

In reperfundiertem und reoxygeniertem Gewebe mutmaßten Yang et al., dass der renale Schutz das Resultat des mit Hitze-Schock-Protein-70 assoziierten Anstiegs der ischämischen Toleranz sei [72]. Dahingegen konnte in reperfundiertem hepatischem Gewebe eine Hyperthermie-induzierte Verbesserung der mit Hitze-Schock-Protein-70 sowie Hitze-Schock-Protein-32 assoziierten Mikrozirkulation gezeigt werden [63].

Im Skelettmuskel deckte eine detaillierte Untersuchung auf, dass die Verbesserung der Mikrozirkulation auf die Funktion des Hitze-Schock-Proteins-32 zurückzuführen ist. Die Annahme liegt nahe, dass dies ausgelöst wird durch das aus der HO-1 abgeleitete Kohlenstoffmonoxid [48].

Um herauszufinden, ob in chronisch ischämischem Gewebe die HO-1 einen Schutz vor Nekrose entweder durch Anstieg der ischämischen Toleranz oder durch Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion vermittelt, untersuchten wir die Mikrozirkulation über einen Beobachtungszeitraum von 10 Tagen. Die Daten dieser Studie zeigten einen signifikanten Anstieg des volumetrischen Blutflusses in verschiedenen Abschnitten von Arteriolen. Hierbei konnten bei den mit Hitze vorbehandelten Versuchstieren volumetrische Blutflüsse von über 5000 pl/s gemessen werden. Die Inhibierung der HO-1 durch SnPP-IX führte zu 50 % geringeren Blutflüssen zu Beginn des Beobachtungszeitraums und zu einer mangelnden bzw. nicht mehr messbaren Perfusion über den weiteren Verlauf. Die Verbesserung der Durchblutung durch HO-1 ist eher auf die arterioläre Dilatation, als auf den Anstieg der intravaskulären arteriolären Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit zurückzuführen. Die arterioläre Dilatation ist durch die HO-1 induziert, da eine funktionelle Inhibierung der HO-1 durch SnPP-IX zu einer kompletten Aufhebung der durch das Hitze-Schock-Protein vermittelten arteriolären Dilatation geführt hat. Bei den mit Hitze präkonditionierten Versuchstieren konnten wir weiterhin im Verlauf der Beobachtungszeit von 10 Tagen eine Aufrechterhaltung der funktionellen Kapillardichte nachweisen. Dies gewährleistet ein besseres Lappenüberleben.

Die HO-1 katalysiert wie bereits beschrieben die Oxidation von Hämoglobin unter anderem in CO [7]. Kohlenstoffmonoxid ist bekanntermaßen ein potenter endogener Vasodilatator [60], der analog zum Stickstoffmonoxid (NO) agiert [69].

In Anbetracht der Tatsache, dass die Expression von HO-1 bei unserer Versuchsreihe nicht nur nach Ischämie alleine (endogen), sondern auch nach lokaler Hitzepräkonditionierung

zu finden war, ist anzunehmen, dass die HO-1 mit ihrem Abbauprodukt Kohlenstoffmonoxid entscheidend an der durch chronische Ischämie induzierten arteriolären Dilatation beteiligt ist.

Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den Ergebnissen von Kozma et al., die die Inhibierung von HO-1 durch Metall-Porphyrine und die damit verbundene Vasokonstriktion in Muskelarteriolen aufzeigten [26].

Hypoxie, Abscherung und Dehnung induzieren, vor allem in glatten Muskelzellen, die Ausschüttung von HO-1, welches zum Anstieg der Kohlenstoffmonoxid Produktion führt [68]. Kohlenstoffmonoxid wiederum reguliert – so ist anzunehmen – den Gefäßtonus durch Stimulation des intrazellulären cGMP [42]. Darüber hinaus führt es zu einer Suppression von mRNA für Endothelin-1 und plättchenaktivierenden Wachstumsfaktoren in Endothelzellen [41].

Stanford et al. konnten zeigen, dass in glatten Muskelzellen von Pulmonalarterien ein Kohlenstoffmonoxid-freisetzendes Molekül aus dem Häm-Abbau die Endothelin-1 Ausschüttung inhibiert [58]. Diese Autoren folgerten aus ihren in vitro Studien, dass unter bestimmten pathophysiologischen Gegebenheiten, wie chronische Hypoxie, Kohlenstoffmonoxid eine endogene Suppression von Endothelin-1 bewirkt [58].

Das funktionelle Gleichgewicht zwischen Kohlenstoffmonoxid und Endothelin-1 wurde von Zhang et al. in pulmonalen Interlobararterien untersucht [74]. Diese Studie impliziert, dass das aus dem Häm-Abbau entstandene Kohlenstoffmonoxid die Hypoxie-induzierte pulmonale Vasokonstriktion durch eine Reduktion des absoluten Endothelin-1 Spiegels sowie seine Sensitivität gegenüber Endothelzellen inhibiert [74]. Folglich könnte die in dieser Studie untersuchte Hitze-Schock-induzierte arterioläre Vasodilatation in ischämischem Gewebe durch die Kohlenstoffmonoxid-liberierende HO-1 entstehen. In diesem Mechanismus spielt das direkte vasodilatierende Potential sowie die Endothelin-1-inhibierende Funktion eine wichtige Rolle.

Die Hitze-Schock-vermittelte arterioläre Dilatation war in unserer Studie mit einer gleich bleibenden kapillaren Dichte und einer drastischen Steigerung des volumetrischen Blutflusses in individuellen Kapillaren verbunden. Vergleichbar mit der arteriolären Hämodynamik ist der Anstieg des volumetrischen Blutflusses in Kapillaren eher durch die mikrovaskuläre Dilatation als durch die Steigerung der Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit zu erklären. Diese kapillare Dilatation repräsentiert höchst wahrscheinlich eine passive Antwort auf den generellen Anstieg des arteriolären Blutflusses, d.h. die arterioläre Hyperperfusion.

Darüber hinaus vermag Kohlenstoffmonoxid eine Dilatation der nutritiven Kapillaren durch Stimulation der Perizytenfunktion zu bewirken. Dies wurde in hämorrhagischen

Schock-Lebern untersucht, die eine Hitze-Schock-induzierte sinusoidale Dilatation zeigten [52]. Folglich garantiert die Dilatation der Kapillaren die Aufrechterhaltung einer adäquaten funktionellen Kapillardichte, welche als Grundvoraussetzung zur Prävention von – durch chronische Ischämie entstandene – Gewebenekrosen gesehen werden kann.

Dennoch bleibt weiterhin zu klären, ob die Verbesserung des Gewebe-Überlebens durch einen Anstieg der ischämischen Toleranz bedingt ist. Eine Steigerung der ischämischen Toleranz – so die gängige Erfahrung – würde eine Reduktion der Lappennekrose und einen signifikanten Ausfall der mikrovaskulären Perfusion bewirken. Obgleich wir nicht ausschließen konnten, dass die Hitze-Schock-Präkonditionierung einen zusätzlichen Effekt auf die ischämische Toleranz hat, zeigten die Untersuchungen, dass der Erhalt der nutritiven Perfusion ausreichend war, um das Überleben des Gewebes zu gewährleisten.

Die Blockade der HO-1 durch SnPP-IX hob die protektive Wirkung der Hitze-Schock-Präkonditionierung auf und erhöhte darüber hinaus den Gewebeschaden und das Nekroseausmaß im Vergleich zu der unbehandelten Kontrollgruppe. Die Verschlechterung des Gewebeschadens tritt vermutlich ein, wenn SnPP-IX nicht nur die HO-1 blockiert, die durch die Hitzepräkonditionierung induziert wird, sondern auch die HO-1, die durch die operative Lappenhebung, d. h. die Ischämie, endogen aktiviert wurde.

In der unbehandelten Kontrollgruppe ist das mikrovaskuläre Remodelling der Kapillaren in den zentralen Anteilen des Lappens, d. h. der Demarkationszone, ein Versuch die Gefäßoberfläche bzw. den Gefäßquerschnitt zu steigern. Dies ermöglicht in kritisch perfundiertem bzw. hypoxischem Gewebe einen vermehrten Sauerstoff-Austausch, ohne dass wir in diesem Modell eindeutig Anzeichen von Angiogenese beobachten konnten.

Das Fehlen des mikrovaskulären Remodellings in der Demarkationszone des zentralen Lappenanteils nach SnPP-IX Behandlung kann in der Inhibition der ischämie-induzierten HO-1-Antwort gesehen werden. Dies erklärt gewissermaßen die Vergrößerung der Nekrosefläche im Vergleich zu den Beobachtungen an der unbehandelten Kontrollgruppe.

Die vorliegende Studie demonstriert in einem Lappenmodell an der Maus welches anhaltender Ischämie ausgesetzt ist, dass die Induktion von HO-1 nach repetitiver lokaler Hitze-Präkonditionierung der Haut signifikant ischämiebedrohtes Lappengewebe vor apoptotischem und nekrotischem Zelltod schützt. Der Schutz vor ischämischem Gewebeverlust resultiert aus dem HO-1-vermittelten vasoaktiven Einfluss von Kohlenstoffmonoxid. Dies ist folglich eher auf eine Verbesserung des mikrovaskulären Blutflusses in Arteriolen und Kapillaren, als auf eine Zunahme der ischämischen Gewebetoleranz zurückzuführen.

7 Therapeutische Relevanz und Schlussfolgerung

Zur Beurteilung der Ergebnisse dieser Studie ist zu berücksichtigen, dass die Versuche in einem Mausmodell durchgeführt worden sind. Eine Übertragung auf den Menschen ist demnach nicht ohne weiteres möglich.

Nichtsdestotrotz führen unsere Ergebnisse zu der Annahme, dass endogene (Ischämie) und exogene (lokale Hitze) Stressoren die Häm-Oxygenase-1-Konzentration erhöhen, und dadurch das Lappenüberleben verbessern. Zum einen stellen sie eine endogene Protektion zur Verhinderung einer ischämischen Nekrose dar, zum anderen können sie zu einer Verbesserung des Lappenüberlebens führen, insbesondere wenn die Hitzeinduktion vor Ischämieinduktion im Sinne einer Präkonditionierung angewendet wird. Dieser Schutzmechanismus ist eng mit der HO-1 und deren vasoaktivem Zwischenprodukt CO gekoppelt. Es wäre nun in weiteren Studien zu untersuchen, inwieweit man diese Erkenntnisse im Bereich der plastischen und rekonstruktiven Lappenchirurgie auf den Menschen übertragen kann. Eine Vorbehandlung mit kontrollierter Wärme wäre eine einfach durchzuführende Maßnahme, die sich auch im Klinikalltag anwenden ließe.

Weiterhin wäre von großem Interesse, inwieweit man durch Vasodilatation und Neoangiogenese das Lappenüberleben verbessern könnte. Hierbei wären Substanzen relevant, die das Sauerstoffangebot in dem ischämischen Areal verbessern, beispielsweise durch Vasodilatation oder Gefäßneubildungen.

8 Verzeichnis der Abkürzungen

Abb	Abbildung
Tab	Tabelle
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
HSP	Hitzeschockprotein
HO-1	Häm-Oxygenase-1
HSP-32	Hitze-Schock-Protein-32 (Häm-Oxygenase)
NO	Stickstoffmonoxid
mRNA	mitochondriale Ribonukleinsäure
CO	Kohlenmonoxid
d. h.	dass heißt
kD	Kilodalton
HO-2	Häm-Oxygenase-2
HO-3	Häm-Oxygenase-3
ATPase	Adenosintriphosphatase
SnPP-IX	Zinn(Sn)-Protoporphyrin
etc.	Et cetera
bzw.	beziehungsweise
g	Gramm
°C	Grad Celsius
ml	Milliliter
mg	Milligramm
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
min	Minuten
µmol	Mikromol
NaCl	Natriumchlorid
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
Da	Dalton
nm	Nanometer
DNA	Desoxyribonukleinsäure

8 Verzeichnis der Abkürzungen

mm	Millimeter
A.	Arteria
DCIA	deep circumflex iliac artery, Arteria circumflexa iliaca
LTA	lateral thoracic artery, Arteria thoracica lateralis
ca.	circa
n	Number, Anzahl
IVM	Intravitale-Fluoreszenzmikroskopie
CCD-Videokamera	charged-coupled-device-Videokamera
RBCV	red-blood-cell-velocity, Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit
mm/s	Millimeter pro Sekunde
FKD	Funktionelle Kapillardichte
i.e.	id est — that is

9 Abbildungsverzeichnis

1	Umwandlungsschritte von Häm zu seinen Abbauprodukten mittels der Häm-Oxygenase	10
2	Präparationsschritte des „random pattern flaps“	16
3	Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer	17
4	Immobilisierung des Versuchstieres auf einer Plexiglasplatte zur Intravitalmikroskopie	20
5	Bildbeispiele aus der Intravitalmikroskopie	22
6	Demarkationszone bei Sham und SnPP-IX-Vorbehandlung	24
7	Lappennekrose SnPP-IX vorbehandelter Tiere	25
8	Arteriöler Durchmesser SnPP-IX vorbehandelter Tiere	27
9	Arteriöle Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit SnPP-IX vorbehandelter Tiere	28
10	Venulärer Durchmesser SnPP-IX vorbehandelter Tiere	31
11	Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit SnPP-IX vorbehandelter Tiere	33
12	Funktionelle Kapillardichte SnPP-IX vorbehandelter Tiere	35
13	Kapillardurchmesser SnPP-IX vorbehandelter Tiere	37
14	Kapillare Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit SnPP-IX vorbehandelter Tiere	38
15	Apoptotischer Zelltod SnPP-IX vorbehandelter Tiere	41
16	Lappennekrose SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	42
17	Arteriöler Durchmesser SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	43
18	Arteriöle Erythrozyten Fließgeschwindigkeit SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	45
19	Venulärer Durchmesser SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	47
20	Venuläre Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	49
21	Funktionelle Kapillardichte SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	52
22	Kapillardurchmesser SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	53

9 *Abbildungsverzeichnis*

23	Kapillare Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	55
24	Apoptotischer Zelltod SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	58

10 Tabellenverzeichnis

1	Messparameter und deren Einheit	23
2	Individueller volumetrischer Blutfluss in Arteriolen SnPP-IX vorbehandelter Tiere	29
3	Individueller volumetrischer Blutfluss in Venulen SnPP-IX vorbehandelter Tiere	32
4	Individueller volumetrischer Blutfluss in Kapillaren SnPP-IX vorbehandelter Tiere	39
5	Individueller volumetrischer Blutfluss in Arteriolen SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	46
6	Individueller volumetrischer Blutfluss in Venulen SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	50
7	Individueller volumetrischer Blutfluss in Kapillaren SnPP-IX und hitzevorbehandelter Tiere	56

11 Literaturverzeichnis

- [1] Y Akamatsu, M Haga, S Tyagi, K Yamashita, AV Graça-Souza, R Ollinger, E Czismadia, GA May, E Ifedigbo, LE Otterbein, FH Bach, and MP Soares. Heme oxygenase-1-derived carbon monoxide protects hearts from transplant associated ischemia reperfusion injury. *FASEB J.*, 18(6):771–772, Apr 2004.
- [2] M Amon, MD Menger, and B Vollmar. Heme oxygenase and nitric oxide synthase mediate cooling-associated protection against tnf-alpha-induced microcirculatory dysfunction and apoptotic cell death. *FASEB J.*, 17:175–185, 2003.
- [3] I Bak, L Szendrei, T Turoczi, G Papp, F Joo, DK Das, J de Leiris, P Der, B Juhasz, E Varga, I Bacskay, J Balla, P Kovacs, and A Tosaki. Heme oxygenase-1-related carbon monoxide production and ventricular fibrillation in isolated ischemic/reperfused mouse myocardium. *FASEB J.*, 17(14):2133–2135, Nov 2003.
- [4] JA Boero, J Ascher, A Arregui, C Rovainen, and TA Woolsey. Increased brain capillaries in chronic hypoxia. *J Appl Physiol.*, 86(4):1211–1219, Apr 1999.
- [5] S Brouard, LE Otterbein, J Anrather, E Tobiasch, FH Bach, AM Choi, and MP Soares. Carbon monoxide generated by heme oxygenase 1 suppresses endothelial cell apoptosis. *J Exp Med.*, 192(7):1015–1026, Oct 2000.
- [6] P Carratu, M Pourcyrous, A Fedinec, CW Leffler, and H Parfenova. Endogenous heme oxygenase prevents impairment of cerebral vascular functions caused by seizures. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 285(3):H1148–1157, Sep 2003.
- [7] AM Choi, S Sylvester, L Otterbein, and NJ Holbrook. Molecular responses to hyperoxia in vivo: relationship to increased tolerance in aged rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.*, 13(1):74–82, Jul 1995.
- [8] JE Clark, R Foresti, P Sarathchandra, H Kaur, CJ Green, and R Motterlini. Heme oxygenase-1-derived bilirubin ameliorates postischemic myocardial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 278(2):H643–651, Feb 2000.
- [9] MA Clark, LD Plank, and GL Hill. Wound healing associated with severe surgical illness. *World J Surg*, 24(6):648–654, Jun 2000.

- [10] GS Drummond, RA Galbraith, MK Sardana, and A Kappas. Reduction of the c2 and c4 vinyl groups of sn-protoporphyrin to from sn-mesoporphyrin markedly enhances the ability of the metalloporphyrin to inhibit in vivo hehe catabolism. *Arch Biochem Biophys.*, 255:64–74, 1987.
- [11] HJ Duckers, M Boehm, AL True, SF Yet, H San, JL Park, R Clinton Webb, ME Lee, GJ Nabel, and EG Nabel. Duckers hj, boehm m, true al, yet sf, san h, park jl, clinton webb r, lee me, nabel gj, nabel eg. *Nat Med.*, 7(6):693–698, Jun 2001.
- [12] D Erni and YD Harder. The dissection of the rectus abdominis myocutaneous flap with complete preservation of the anterior rectus sheath. *Br J Plast Surg.*, 56:395–400, 2003.
- [13] JF Erwing, VS Raju, and MD Maines. Induction of heart heme oxygenase-1 (hsp-32) by hyperthermia in rats: possible role in stress-mediated elevation of cyclic 3':5'-guanosine monophosphat. *J Pharmacol Exp Ther.*, 271:408–414, 1994.
- [14] E Fiumana, H Parfenova, JH Jaggar, and CW Leffler. Carbon monoxide mediates vasodilator effects of glutamate in isolated pressurized cerebral arterioles of newborn pigs. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 284(4):H1073–1079, Apr 2003.
- [15] T Gräser, YP Vedernikov, and DS Li. Study on the mechanism of carbon monoxide induced endothelium-independent relaxation in porcine coronary artery and vein. *Biomed Biochim Act.*, 49:293–296, 1990.
- [16] Y Harder, M Amon, D Erni, and MD Menger. Evolution of ischemic tissue injury in a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy. *J Surg Res.*, 121(2):197–205, 2004.
- [17] Y Harder, M Amon, M Georgi, A Banic, D Erni, and MD Menger. Evolution of a "falx lunaticain demarcation of critically ischemic myocutaneous tissue. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 288(3):1224–32, 2005.
- [18] Y Harder, M Amon, R Schramm, M Georgi, A Banic, D Erni, and M Menger. Heat shock preconditioning reduces ischemic tissue necrosis by heat shock protein (hsp)-32 mediated improvement of the microcirculation rather than induction of ischemic tolerance. *Ann Surg.*, 242:869–879, 2005.
- [19] FU Hartl. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature*, 381(6583):571–579, 1996.

- [20] C Healy, KJ Mulhall, M Nelligan, P Murray, and D Bouchier-Hayes. Postoperative stiffness and adhesion formation around repaired and immobilized achilles tenotomies are prevented using a model of heat shock protein induction. *J Surg Res.*, 120(2):225–229, Aug 2004.
- [21] NR Hertzler. The natural history of peripheral vascular disease. implications for its management. *Circulation*, 83(2 Suppl):I12–19, Feb 1991.
- [22] A Kappas and GS Drummond. Synthetic metallporphyrins: a class of compounds of pharmacological interest. *Bio-Essays.*, 3:256–259, 1985.
- [23] A Kappas, GS Drummond, CS Simionatto, and KE Anderson. Control of heme oxygenase and plasma levels of bilirubin by synthetic heme analogue, tin-protoporphyrin. *Hepatology*, 4(2):336–341, 1984.
- [24] M Katori, R Buelow, B Ke, J Ma, AJ Coito, S Iyer and D Southard, RW Busuttil, and JW Kupiec-Weglinski. Heme oxygenase-1 overexpression protects rat hearts from cold ischemia/reperfusion injury via an antiapoptotic pathway. *Transplantation*, 73(2):287–292, Jan 2002.
- [25] T Kirino. Ischemic tolerance. *J Cereb Blood Flow Metab.*, 22:1283–1296, 2002.
- [26] F Kozma, RA Johnson, F Zhang, C Yu, X Tong, and A Nasjletti. Contribution of endogenous carbon monoxide to regulation of diameter in resistance vessels. *Am J Physiol.*, 276(4 Pt 2):R1087–1094, Apr 1999.
- [27] DS Latchman. Heat shock proteins and cardiac protection. *Cardiovasc Res.*, 51:637–646, 2001.
- [28] FB Lemos, JN Ijzermans, PE Zondervan, AM Peeters, S van den Engel, WM Mol, W Weimar, and CC Baan. Differential expression of heme oxygenase-1 and vascular endothelial growth factor in cadaveric and living donor kidneys after ischemia-reperfusion. *J Am Soc Nephrol.*, 14(12):3278–3287, Dec 2003.
- [29] DA Lepore, KR Knight, and RL Anderson et al. Role of priming stresses and hsp 70 in protection from ischemia-reperfusion injury in cardiac and skeletal muscle. *Cell Stress Chaperons*, 6:93–96, 2001.
- [30] MD Maines. The heme oxygenase system: a regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.*, 37:517–554, 1997.
- [31] MD Maines, GM Trakshel, and RK Kutty. Characterization of two constitutive forms of rat liver microsomal hemeoxygenase: Only one molecular species of the enzyme is inducible. *J.Biol. Chem.*, 257:14116–14121, 1986.

- [32] GS Marks. Heme oxygenase: the physiological role of one of its metabolites, carbon monoxide and interactions with zinc protoporphyrin, cobalt protoporphyrin and other metalloporphyrins. *Cell Mol Noisy le grand.*, 40:863–870, 1994.
- [33] E Martin, I Sharina, A Kots, and F Murad. A constitutively activated mutant of human soluble guanylyl cyclase (sgc): implication for the mechanism of cgc activation. *Proc Natl Acad Sci USA.*, 100(16):9208–9213, Aug 2003.
- [34] N Maulik, DT Engelman, M Watanabe, RM Engelman, JA Rousou, JE Flack 3rd, DW Deaton, NV Gorbunov, NM Elsayed, VE Kagan, and DK Das. Nitric oxide/carbon monoxide. a molecular switch for myocardial preservation during ischemia. *Circulation*, 94(9 Suppl):II398–406, Nov 1996.
- [35] A Mazzone, C Cusa, L Bucci, M Vezzoli, S Ghio, I Buggiaand MB Regazzi, G Fossati, I Mazzucchelli, and D Gritti. The effects of iloprost infusion on micro-circulation is independent of nitric oxide metabolites and endothelin-1 in chronic peripheral ischaemia. *Eur J Clin Invest.*, 29(1):1–5, Jan 1999.
- [36] WK McCoubrey, TJ Huang, and MD Maines. Heme oxygenase-2 is a hemoprotein and binds heme through heme regulatory motifs that are not involved in heme catalysis. *J Biol Chem.*, 272:12568–12574, 1997.
- [37] K Mikami, M Otaka, T Goto, K Miura, S Ohshima, K Yoneyama, JG Lin, D Watanabe, D Segawa, E Kataoka, M Odashima, and S Watanabe. Inductioiun of a 72-kda heat shock protein and protection against lipopolysaccharide-induced liver injury in cirrhotic rats. *J Gastroenterol Hepatol*, 19(8):884–890, Aug 2004.
- [38] T Minamino, H Christou, CM Hsieh, Y Liu, V Dhawanand NG Abraham, MA Perrella, SA Mitsialis, and S Kourembanas. Targeted expression of heme oxygenase-1 prevents the pulmonary inflammatory and vascular responses to hypoxia. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 98(15):8798–803, Jul 2001.
- [39] Y Mokuno, F Berthiaume, RG Tompkins, UJ Balis, and ML Yarmush. Technique for expanding the donor liver pool: heat shock preconditioning in a rat fatty liver model. *Liver Transpl.*, 10(2):264–272, Feb 2004.
- [40] S Moncada, RM Palmer, and EA Higgs. Nitric oxide: physiology, pathophysiology, and pharmacology. *Pharmacol Rev.*, 43(2):109–142, Jun 1991.
- [41] T Morita and S Kourembanas. Endothelial cell expression of vasoconstrictors and growth factors is regulated by smooth muscle cell-derived carbon monoxide. *J Clin Invest.*, 96(6):2676–2682, Dec 1995.

- [42] T Morita, MA Perrella, ME Lee, and S Kourembanas. Smooth muscle cell-derived carbon monoxide is a regulator of vascular cgmp. *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 92(5):1475–1479, Feb 1995.
- [43] M Pourcyrus, HS Bada, H Parfenova, ML Daley, SB Korones, and CW Leffler. Cerebrovasodilatory contribution of endogenous carbon monoxide during seizures in newborn pigs. *Pediatr Res.*, 51(5):579–585, May 2002.
- [44] KG Proctor and S Shatkin Jr. Arachidonic acid metabolites: basic concepts relevant to plastic surgery. *J Reconstr Microsurg.*, 4(5):421–426, Oct 1988.
- [45] YP Raeburn, JC Cleveland JC, MA Zimmerman, and AH Harken. Organ preconditioning. *Arch Surg*, 136(11):1263–1266, Nov 2001.
- [46] VS Raju and MD Maines. Renal ischemia/perfusion in rats upregulates ho-1 (hsp-32) expression and increases cgmp in rat heart. *J.Pharmacol.Exp.Ther.*, 277:1841–1922, 1996.
- [47] KS Ramos, H Lin, and J McGrath. Modulation on the cyclic guanosine monophosphat leels in cultured aortic smooth muscel cells by carbon monoxide. *Biochem Pharmacol*, 38:1368–1370, 1989.
- [48] M Rücker, T Schäfer, F Roesken, WJ Spitzer, M Bauer, and MD Menger. Local heat-shock priming-induced improvement in microvascular perfusion in osteomyocutaneous flaps is mediated by heat-shock protein 32. *Br J Surg*, 88(3):450–457, Mar 2001.
- [49] M Rücker, T Schäfer, F Roesken, WJ Spitzer, M Bauer, and MD Menger. Reduction of inflammatory response in composite flap transfer by local stress conditioning-induced heat-shock protein 32. *Surgery*, 129(3):292–301, Mar 2001.
- [50] CA Redaelli, M Wagner, C Kulli, YH Tian, D Kubulus, L Mazzucchelliand AC Wagner, and MK Schilling. Hyperthermia-induced hsp expression correlates with improved rat renal isograft viability and survival in kidneys harvested from non-heart-beating donors. *Transpl Int.*, 14(6):351–360, Dec 2001.
- [51] H Rensing, I Bauer, V Datene, C Pätäu, BH Pannen, and M Bauer. Differential expression pattern of heme oxygenase-1/heat shock protein 32 and nitric oxide synthase-ii and their impact on liver injury in a rat model of hemorrhage and resuscitation. *Crit Care Med*, 27(12):2766–2775, Dec 1999.
- [52] H Rensing, I Bauer, JX Zhang, M Paxian, BH Pannen, Y Yokoyama, MG Clemens, and M Bauer. Endothelin-1 and heme oxygenase-1 as modulators of sinusoidal tone in the stress-exposed rat liver. *Hepatology*, 36(6):1453–1465, Dec 2002.

- [53] IA Sammut, R Foresti, JE Clark, DJ Exon, MJ Vesely, P Sarathchandra, CJ Green, and R Motterlini. Carbon monoxide is a major contributor to the regulation of vascular tone in aortas expressing high levels of haeme oxygenase-1. *Br J Pharmacol.*, 125(7):1437–1444, Dec 1998.
- [54] G Sass, MC Soares, K Yamashita, S Seyfried, WH Zimmermann, T Eschenhagen, E Kaczmarek, T Ritter, HD Volk, and G Tiegs. Heme oxygenase-1 and its reaction product, carbon monoxide, prevent inflammation-related apoptotic liver damage in mice. *Hepatology*, 38(4):909–918, Oct 2003.
- [55] H Shimizu, T Takahashi, T Suzuki, A Yamasaki, T Fujiwara, Y Odaka, M Hirakawa, H Fujita, and R Akagi. Protective effect of heme oxygenase induction in ischemic acute renal failure. *Crit Care Med.*, 28(3):809–817, Mar 2000.
- [56] MP Soares, Y Lin, J Anrather, E Csizmadia, K Takigami, K Sato, ST Grey, RB Colvin, AM Choi, KD Poss, and FH Bach. Expression of heme oxygenase-1 can determine cardiac xenograft survival. *Nat Med.*, 4(9):1073–1077, Sep 1998.
- [57] SR Vulapalli, Z Chen, BH Chua, T Wang, and CS Liang. Cardioselective overexpression of ho-1 prevents i/r-induced cardiac dysfunction and apoptosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 283(2):H688–694, Aug 2002.
- [58] SJ Stanford, MJ Walters, and JA Mitchell. Carbon monoxide inhibits endothelin-1 release by human pulmonary artery smooth muscle cells. *Eur J Pharmacol.*, 486(3):349–352, Feb 2004.
- [59] R Stocker, Y Yamamoto, AF McDonagh, AN Glazer, and BN Ames. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science*, 235:1043–1046, 1987.
- [60] JR Stone and MA Marletta. Soluble guanylate cyclase from bovine lung: activation with nitric oxide and carbon monoxide and spectral characterization of the ferrous and ferric states. *Biochemistry*, 33(18):5636–5640, May 1994.
- [61] M Suematsu, Y Wakabayashi, and Y Ishimura. Gaseous monoxides: a new class of microvascular regulator in the liver. *Cardiovasc Res.*, 32(4):679–686., Oct 1996.
- [62] C Taillé, R Foresti, S Lanone, C Zedda, C Green, M Aubier, R Motterlini, and J Boczkowski. Protective role of heme oxygenases against endotoxin-induced diaphragmatic dysfunction in rats. *Am J Respir Crit Care Med.*, 163(3 Pt 1):753–761, Mar 2001.

- [63] H Terajima, T Kondo, G Enders, C Hammer, J Thiery, Y Yamamoto, Y Yamaoka, and K Messmer. Reduction of hepatic microcirculatory failure caused by normothermic ischemia/reperfusion-induced injury by means of heat shock preconditioning. *Shock*, 12(5):329–334, Nov 1999.
- [64] S Tsuchihashi, C Fondevila, and JW Kupiec-Weglinski. Heme oxygenase system in ischemia and reperfusion injury. *Ann Transplant.*, 9(1):84–87, 2004.
- [65] H Uchinami, Y Yamamoto, M Kume, K Yonezawa, Y Ishikawa, K Taura, A Nakajima, K Hata, and Y Yamaoka. Effect of heat shock preconditioning on nf-kappab/i-kappab pathway during i/r injury of the rat liver. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 282(6):G962–G971, Jun 2002.
- [66] YP Vederniov, T Gräser, and AF Vanin. Similar endothelium-independent arterial relaxation by carbon monoxide and nitric oxide. *Biomed Biochim Act.*, 48:601–603, 1989.
- [67] JI Virag and CE Murry. Myofibroblast and endothelial cell proliferation during murine myocardial infarct repair. *Am J Pathol.*, 163(6):2433–2440, Dec 2003.
- [68] CT Wagner, W Durante, N Christodoulides, JD Hellums, and AI Schafer. Hemodynamic forces induce the expression of heme oxygenase in cultured vascular smooth muscle cells. *J Clin Invest.*, 100(3):589–596, Aug 1997.
- [69] R Wang. Resurgence of carbon monoxide: an endogenous gaseous vasorelaxing factor. *Can J Physiol Pharmacol.*, 76(1):1–15, Jan 1998.
- [70] D Willis, AR Moore, R Frederick, and DA Willoughby. Heme oxygenase: a novel target for the modulation of the inflammatory response. *Nat Med*, 120(2):87–90, Jan 1996.
- [71] K Yamagami, G Enders, RJ Schauer, R Leidererand J Hutter, Y Yamamoto, Y Yamaoka, C Hammer, and K Messmer. Heat-shock preconditioning protects fatty livers in genetically obese zucker rats from microvascular perfusion failure after ischemia reperfusion. *Transpl Int.*, 16(8):456–463, Aug 2003.
- [72] CW Yang, BS Kim, J Kim, HJ Ahn, JH Park, DC Jin, YS Kim, and BK Bang. Preconditioning with sodium arsenite inhibits apoptotic cell death in rat kidney with ischemia/reperfusion or cyclosporine-induced injuries. the possible role of heat-shock protein 70 as a mediator of ischemic tolerance. *Exp Nephrol.*, 9(4):284–294, 2001.
- [73] SF Yet, MA Perrella, MD Layne, CM Hsieh, K Maemura, L Kobzik, P Wiesel, H Christou, S Kourembanas, and ME Lee. Hypoxia induces severe right ventricular

11 Literaturverzeichnis

dilatation and infarction in heme oxygenase-1 null mice. *J Clin Invest.*, 103(8):R23–29, Apr 1999.

- [74] F Zhang, JI Kaide, L Yang, H Jiang, S Quanand R Kemp, W Gong M Balazy, and NG Abraham A Nasjletti. Co modulates pulmonary vascular response to acute hypoxia: relation to endothelin. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.*, 286(1):H137–144, Jan 2004.

12 Danksagung

Das Erlangen eines medizinischen Doktorgrades ist ein langer, steiniger Weg, der nicht nur mit viel Arbeit verbunden ist, sondern auch viel Geduld und strapazierfähige Nerven voraussetzt. Alleine ist dies kaum zu bewältigen. Im Folgenden möchte ich mich bei einer Vielzahl von Menschen bedanken, die mich während meiner klinisch-experimentellen Untersuchungen und während der gesamten Entstehungszeit meiner Dissertation unterstützt haben.

An erster Stelle gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger für die Möglichkeit der Dissertation. Besonders möchte ich Herrn PD Dr. med. Y. Harder danken, der mir als Betreuer meiner Arbeit zu jeder Zeit zur Seite stand und mich bei meiner schriftlichen Ausführung in hohem Maße unterstützte. Seine Betreuung war weit genug gefasst, mir nicht die Freiheit bei der Ausgestaltung der Arbeit zu nehmen. Danke für die vielfältige Unterstützung durch immerwährende Diskussionsbereitschaft, Anregungen und, soweit notwendig, Diplomatie.

Bei Frau Dr. med. M. Amon, die für Fragen allzeit zur Verfügung stand, möchte ich mich ebenfalls herzlich bedanken.

Meiner Doktorandenkollegin Frau Eva Metzkow danke ich für die gute Zusammenarbeit und die vielen gemeinsamen Stunden während unserer „Mäuse-Zeit“. Die schier endlosen Tage im Institut waren nur gemeinsam und mit viel Humor durchzustehen. Für diese anstrengende, aber doch sehr schöne Zeit danke ich Dir sehr.

Weiterhin herzlichen Dank an meinen Bruder, Marc Matzen, der mich in jeglicher Art von Computer-Fragen sehr unterstützte. Meiner Mutter, Frau Sigrid Steinbach-Matzen, danke ich für ihr Korrekturlesen mit hilfreichen Anmerkungen. Für Eure nie-endende Geduld bin ich Euch sehr dankbar.

Die gesamten tierexperimentellen Untersuchungen und computergestützten Auswertungen fanden in den Räumlichkeiten des Institutes für klinische und experimentelle Chirurgie der Universitätsklinik des Saarlandes unter Leitung von Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger statt. Ihm und seinen hilfsbereiten Mitarbeitern, insbesondere den medizinisch-technischen Assistentinnen und Tierpflegern, gilt besonderer Dank.

12 Danksagung

Ein sehr herzlicher Dank gilt meinen Eltern, meinen Geschwistern und meinem Freund, die alle auf ihre Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Saarbrücken, im September 2009

13 Lebenslauf

Name: Matzen
Vorname: Anne
Geburtsdatum: 16.07.1981
Geburtsort: Ludwigshafen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: katholisch
Adresse: Kieselstr. 53, 66125 Saarbrücken, Tel. 06897/9144126

Bildungsweg

Schule:

1987–1991 Astrid-Lindgren-Grundschule, Ludwigshafen
1991–1997 Max-Planck-Gymnasium, Ludwigshafen
1997–1998 Robertsdale-High-School, AL, USA,
High-School-Abschluss
1998–2001 Max-Planck-Gymnasium, Ludwigshafen, Abitur

Universität:

2001–2008 Studium an der Universität des Saarlandes,
Medizinische Fakultät, Homburg/Saar
03/2004 Physikum
06/2008 Abschluss mit der ärztlichen Prüfung

Famulaturen:

- 09/2004 Klinik für Hand-, Plastische u. Rekonstruktive Chirurgie, Schwerbrandverletzententrum, BG- Unfallklinik, Ludwigshafen
Chefarzt: Prof. Dr. med. G. Germann
- 09/2005 Herz-Thorax-Chirurgie, Universitätskliniken des Saarlandes, Homburg/Saar
Chefarzt: Prof. Dr. med. H.-J. Schäfers
- 08/2006 Orthopädische Gemeinschaftspraxis, Ludwigshafen
Dr. med. S. Pfrengle und Dr. med. A. Kuhn
- 09/2006 Kreiskrankenhaus St. Ingbert, Medizinische Klinik, Saarland
Chefarzt: Dr. med. B. Hammer

Praktisches Jahr

1. Tertial Innere Medizin, Knappschaftskrankenhaus Sulzbach,
Chefarzt: Prof. Dr. med. Rettig-Stürmer
2. Tertial Chirurgische Klinik, Knappschaftskrankenhaus Sulzbach,
Chefarzt: PD Dr. med. Gebhardt
3. Tertial Anästhesiologische Klinik, Knappschaftskrankenhaus Sulzbach,
Chefarzt: Dr. med. Schmitt

Forschung:

- 2004–2009 Experimentelle Arbeit am Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. M. D. Menger), Dissertationsarbeit: „Bedeutung der Häm-Oxygenase-1 bei kritisch perfundierten Hautmuskellappen“

Publikation und Kongreßteilnahme:

- 2004 First Homburg Surgical Research Meeting. Angiogenesis and Microcirculation in Flap Surgery. November 2004.
- 2009 Harder Y, Amon M, Schramm R, Contaldo C, Metzkow E, Matzen A, Rücker M, Vollmar B, Menger MD.
Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-dependent manner. *Surgery*. 2009 Apr;145(4):372-83.

Saarbrücken, den 08. September 2009