

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie

der Universität des Saarlandes

Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. M. D. Menger

Bedeutung von Hämoxygenase-1, Serinproteasen und Gewebetemperatur für den mikrovaskulären Schaden bei Weichteiltrauma

Eine intravitalmikroskopische Untersuchung am Rückenhautkammermodell der Maus

*Dissertation zur Erlangung des Grades einer Doktorin der Medizin an der
Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*

2016

vorgelegt von

Caroline Victoria Heinen-Vees

geboren am 21. November 1982 in Datteln

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Summary	4
3. Einleitung	6
3.1 Weichteiltrauma	6
3.2 Immunreaktion nach Trauma.....	7
3.2.1 Immunologie der Wundheilung.....	8
3.3 Neue Strategien für die Therapie des Weichteiltraumas	10
3.3.1 Aprotinin.....	10
3.3.2 Cooling.....	12
3.3.3 Zinnmetalloporphyrin [SnMP]	14
3.4 Experimentelle Modelle zur Analyse des Weichteiltraumas	16
3.5 Modell der Rückenhautkammer.....	16
4. Ziel der Studie	17
5. Material und Methoden	18
5.1 Modellaufbau.....	18
5.1.1 Mikrozirkulationsmodell	18
5.1.2 Versuchstiere	18
5.1.3 Versuchsablauf	19
5.1.4 Versuchsgruppen	20
5.1.5 Anästhesie	21
5.1.6 Implantationstechnik der Rückenhautkammer	21
5.1.7 Ausschlusskriterien	24
5.1.8 Weichteiltrauma	24
5.2 Therapieansätze	26
5.2.1 Aprotinin.....	26
5.2.2 Cooling.....	26
5.2.3 SnMP	26
5.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	27
5.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe.....	27
5.3.2 Mikroskopie.....	28
5.4 Analyse der Mikrozirkulation.....	29
5.4.1 Funktionelle Kapillardichte.....	30
5.4.2 Kapillärer Durchmesser.....	31
5.4.3 Kapilläre Blutzellgeschwindigkeit.....	31
5.4.4 Kapillärer volumetrischer Blutfluss.....	31
5.4.5 Arteriöler und venulärer Durchmesser.....	32
5.4.6 Arteriöle und venuläre Blutzellgeschwindigkeit.....	32
5.4.7 Arteriöler und venulärer volumetrischer Blutfluss	33
5.4.8 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	33
5.5 Immunhistologie und Histochemie.....	34
5.5.1 Immunhistologie	34
5.5.2 Histochemie	34
5.6 Statistik	35

6. Ergebnisse	37
6.1 Trauma.....	37
6.1.1 Kapilläre Perfusion	37
6.1.2 Arteriöläre Mikrohämodynamik.....	40
6.1.3 Venuläre Mikrohämodynamik.....	41
6.1.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	43
6.1.5 Histologie	45
6.2 Trauma und Aprotinin.....	46
6.2.1 Kapilläre Perfusion	46
6.2.2 Arteriöläre Mikrohämodynamik.....	48
6.2.3 Venuläre Mikrohämodynamik.....	50
6.2.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	51
6.2.5 Histologie	53
6.3 Trauma, Cooling und SnMP	54
6.3.1 Kapilläre Perfusion	54
6.3.2 Arteriöläre Mikrohämodynamik.....	56
6.3.3 Venuläre Mikrohämodynamik.....	58
6.3.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion.....	60
6.3.5 Histologie	62
7. Diskussion	64
7.1 Modell	64
7.2 Untersuchungsmethoden	65
7.3 Diskussion der Ergebnisse	66
7.3.1 Trauma.....	66
7.3.2 Trauma und Aprotinin.....	69
7.3.3 Trauma, Cooling und SnMP	72
8. Schlussfolgerung	79
8.1.1 Trauma.....	79
8.1.2 Trauma und Aprotinin.....	79
8.1.3 Trauma, Cooling und SnMP	79
9. Verzeichnis der Abkürzungen	81
10. Literaturverzeichnis	83
11. Publikationen	93
12. Danksagung	94

1. Zusammenfassung

Einleitung: Bisher gibt es nur wenige Arbeiten, die einen mikrovaskulären Schaden nach Weichteiltrauma über einen längeren Zeitraum untersuchen. Grundlage dieser Studie war ein chronisches Maus-Modell von Amon und Laschke, welche als Erste mit Hilfe einer Rückenhautkammer die Auswirkung des Schweregrades eines Weichteiltraumas auf die mikrovaskuläre Dysfunktion darstellten. Ziel der vorliegenden Studie war es, nach Applikation eines schweren Weichteiltraumas innovative Ansätze zu finden, um das nutritive Perfusionsversagen und die entzündliche Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zu vermindern. Dazu setzten wir den Proteinase-Inhibitor Aprotinin, Gewebekühlung [Cooling] sowie Cooling in Kombination mit dem Hämoxygenase-1-Hemmer Zinnmetalloporphyrin [SnMP] als therapeutische Ansätze ein.

Material und Methode: Wir verwendeten C57BL/6 Mäuse, denen nach etabliertem Verfahren Rückenhautkammern aus Titan implantiert wurden. Es folgte die Erzeugung eines schweren Weichteilschadens (450J/m^2) mit Hilfe eines 25g schweren Edelstahlzylinders im Gebiet des Musculus retractor der Rückenhautkammer. 5 Gruppen wurden untersucht: eine Kontrollgruppe [Sham] ($n=7$), eine Trauma-Gruppe ($n=10$), eine Trauma+Aprotinin-Gruppe ($n=8$), eine Trauma+Cooling-Gruppe ($n=7$) sowie eine Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe ($n=7$). Folgende Gruppen wurden miteinander verglichen:

- Trauma vs. Sham;
- Trauma vs. Trauma+Aprotinin;
- Trauma vs. Trauma+Cooling sowie vs. Trauma+Cooling+SnMP.

Wir wollten untersuchen, ob Aprotinin und Cooling den Mikrozirkulationsschaden und die Entzündungsreaktion nach Trauma vermindern können. Zudem wollten wir testen, ob eine durch Cooling gegebenenfalls erzielte Verbesserung der Mikrozirkulation durch Hemmung der Hämoxygenase-1 [HO-1] wieder aufgehoben wird.

Um den Verlauf der mikrovaskulären Dysfunktion zu ermitteln, wurden pro Tier mit Hilfe eines intravitalen Fluoreszenzmikroskops in Narkose folgende Parameter erhoben: funktionelle Kapillardichte; kapillärer, arteriolärer und venulärer Gefäßdurchmesser; kapilläre, arterioläre und venuläre Blutzellgeschwindigkeit; kapillärer, arteriolärer und venulärer volumetrischer Blutfluss. Um die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zu untersuchen, wurde das Fließverhalten der Leukozyten in Arteriolen und Venolen anhand folgender Parameter ermittelt: arterioläres und venuläres Leukozyten-Rolling sowie venuläre Leukozyten-Adhärenz. Die Analyse erfolgte unmittelbar vor Trauma [Baseline] sowie 8h, 24h, 72h und

120h nach Trauma. Anschließend führten wir die Auswertung an einem computerassistierten Bildverarbeitungssystem durch.

Ergebnisse:

Trauma: Trauma führte zu einer bis zu 72h lang anhaltenden, zum Teil signifikanten Verminderung der kapillären, arteriolären und venulären Mikrozirkulation. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion war bis zu 24h nach Trauma signifikant erhöht. Bei der histologischen Untersuchung der Apoptose und Leukozyteninfiltration zeigte sich ein Anstieg nach Trauma, ohne dass Signifikanzen ermittelt werden konnten.

Trauma und Aprotinin: Aprotinin konnte das initiale Perfusionsversagen nicht verhindern, führte jedoch zu einer schnelleren Regeneration der kapillären Mikrozirkulation. Die arterioläre Mikrohämodynamik zeigte außer einer signifikanten, bis 24h nach Trauma anhaltenden Vasokonstriktion eine zur Trauma-Gruppe vergleichbare Reaktion. Das initiale Perfusionsversagen der venulären Mikrozirkulation war signifikant erhöht. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion war nach Aprotinin-Gabe weniger stark ausgeprägt.

Trauma, Cooling und SnMP: Cooling konnte den initialen kapillären Perfusionsschaden nicht verhindern, bewirkte allerdings eine beschleunigte Wiederherstellung der physiologischen Verhältnisse. Die arterioläre Mikrohämodynamik zeigte einen gegenüber der Trauma-Gruppe signifikant verlängerten, bis 72h anhaltenden Mikrozirkulationsschaden. Die venuläre Mikrohämodynamik reagierte mit einer überschießenden Reaktion 120h nach Trauma. Die initiale Entzündungsreaktion nach Trauma konnte durch die Cooling-Behandlung teilweise vermindert werden.

Die zusätzliche Zinnmetalloporphyrin-Behandlung hatte auf die kapilläre Perfusion wenig Einfluss, verminderte aber die Erholung der Kapillardichte auch noch nach 120h. Die SnMP-Gabe verstärkte den arteriolären und venulären Mikrozirkulationsschaden zum Teil bis 120h nach Trauma deutlich. Die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurde bis 24h nach Trauma teilweise signifikant verstärkt.

Schlußfolgerung: Trauma führt zu einem Mikrozirkulationsschaden und einer Entzündungsreaktion.

Aprotinin bietet einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz, um sowohl das Perfusionsversagen als auch die Entzündungsreaktion zu vermindern.

Die Cooling-Behandlung konnte den initialen Perfusionsschaden und die initiale Entzündungsreaktion nach Trauma nicht verhindern, bewirkte allerdings eine beschleunigte Wiederherstellung der physiologischen Verhältnisse.

Da die Blockierung von HO-1 nicht nur die durch Cooling bewirkte Protektion aufhob, sondern sowohl die Mikrozirkulation als auch die Entzündung gegenüber der alleinigen Trauma-Gruppe verschlechterte, muss man von einer endogenen HO-1-Produktion zur Reduktion der Trauma-assoziierten Mikrozirkulationsstörung und Entzündungsreaktion ausgehen.

2. Summary

Role of heme oxygenase-1, serin proteases and tissue temperature for the development of microvascular damage after soft tissue trauma

Background: There are only few studies which have examined the microvascular damage after soft tissue trauma over an extended period of time. The present study is based on a previous study analyzing the impact of the severity of local soft-tissue trauma on microcirculatory dysfunction by means of a dorsal skinfold chamber. The present study aimed at preventing the trauma-induced failure of nutritive perfusion and leukocyte-endothelial cell interaction by distinct approaches. Therefore, we analyzed the effect of the proteinase-inhibitor Aprotinin, cooling and cooling in combination with the heme oxygenase-1-inhibitor tin-metalloporphyrin [SnMP].

Material and methods: Titanium skinfold chambers were implanted onto the dorsum of C57BL/6 mice. A standardized mechanical soft-tissue trauma (450J/m²) was induced to the chamber in the area of the retractor muscle using a 25g stainless steel cylinder. 5 groups were analyzed: a control-group [sham] (n=7), a trauma-group (n=10), a trauma+Aprotinin-group (n=8), a trauma+cooling-group (n=7) as well as a trauma+cooling+SnMP-group (n=7). The following groups were compared:

- trauma vs. sham;
- trauma vs. trauma+Aprotinin;
- trauma vs. trauma+cooling vs. trauma+cooling+SnMP

We wanted to investigate whether Aprotinin and cooling can reduce the microcirculatory dysfunction and the inflammatory reaction after trauma. Furthermore, we wanted to examine whether potential protection by cooling is achieved by upregulation of heme-oxygenase-1 [HO-1], thus whether additional inhibition of HO-1 by SnMP blunts the cooling-induced protection on microcirculation and inflammation.

Intravital fluorescence microscopy was performed in general anesthesia before [baseline] as well as 8h, 24h, 72h and 120h after induction of trauma, and included the analysis of the microcirculation and leukocyte-endothelial cell interaction. The following parameters were analyzed: functional capillary density; capillary, arteriolar and venular diameter; capillary, arteriolar and venular blood cell velocity; capillary, arteriolar and venular volumetric blood flow as well as arteriolar and venular leukocyte rolling and venular leukocyte adherence. Analyses were performed with the use of a computer-assisted image processing system.

Results:

Trauma: Trauma resulted in an up to 72h lasting significant reduction of capillary, arteriolar and venular microcirculation. The leukocyte-endothelial cell interaction was significantly increased up to 24h after trauma. An increase of apoptosis and leukocyte infiltration was also shown by histological examination. However, this increase did not prove to be statistically significant.

Trauma and Aprotinin: Treatment with Aprotinin could not avoid the initial perfusion failure but resulted in faster regeneration of capillary microcirculation. The arteriolar microcirculation showed a comparable reaction to the trauma-group, except for a significant initial vasoconstriction. The initial perfusion failure of the venular microcirculation was significantly increased. Aprotinin reduced the leukocyte-endothelial cell interaction.

Trauma, cooling and SnMP: Cooling could not prevent the initial capillary perfusion failure, but accelerated the recovery to physiological conditions. The arteriolar microcirculation showed a significantly prolonged reduction in contrast to the trauma-group. The venular microcirculation presented an excessive hyperperfusion 120h after trauma. Cooling reduced the initial leukocyte-endothelial cell interaction.

Additional application of tin-metalloporphyrin had almost no influence on capillary perfusion, but prevented the recovery of capillary density until 120h after trauma. SnMP increased the arteriolar and venular microcirculatory dysfunction until 120h after trauma. Leukocyte-endothelial cell interaction was increased up to 24h after trauma.

Conclusion: Trauma induces microcirculatory dysfunction and leukocytic inflammation.

Aprotinin represents a promising therapeutic substance to reduce both microcirculatory dysfunction and leukocytic inflammation.

Cooling could not prevent the initial microvascular perfusion damage nor the initial endothelial cell interaction, but accelerated the recovery to physiological conditions.

The blockade of HO-1 not only blunted the cooling-induced protection, but aggravated the microcirculatory dysfunction and inflammation compared to the non-treated trauma-group. Thus, the present study indicates that endogenous HO-1 production contributes to the reduction of trauma-induced microcirculatory dysfunction and inflammation.

3. Einleitung

3.1 Weichteiltrauma

Das Wort Trauma kommt aus dem Griechischen [τραύμα] und bedeutet Wunde, Verletzung oder Schädigung sowie Gewalteinwirkung in körperlicher und psychischer Hinsicht (Kahnt, 1994).

Bei körperlichen Traumata kommen ursächlich mechanische, thermische, chemische oder strahlenbedingte Noxen in Frage (Trott, 1988). Das mögliche Spektrum der Traumamodi reicht von Mikro- bis zu Polytraumata (Kahnt, 1994) und kann mit oder ohne Substanzverlust einhergehen. Dabei können Weichteile und knöcherne Anteile betroffen sein. Die Auswirkungen von Weichteilverletzungen können großen Schaden auf zellulärer und vaskulärer Ebene sowie durch die potentielle Triggerung des Immunsystems hervorrufen (s. Abb. 1-3) (Gustilo und Anderson, 1976; Kalicke et al., 2003; Pape et al., 2005).

Trotz aller Sorgfalt bei der Behandlung von jeglichen Verletzungen sind Komplikationen oft unvermeidbar (Gierer et al., 2008). Sekundäre Infektionen, Nachblutungen, Schock und Fehlregulationen innerhalb der Immunantwort sind hierbei besonders gefürchtet (Blankenship und Baker, 2007).

So unterschiedlich die Verletzungsursachen sein können, so vielseitig sind auch die Therapieansätze bei einem Trauma (Hirner und Weise, 2004; DeBoard et al., 2007; Lloyd et al., 2007).

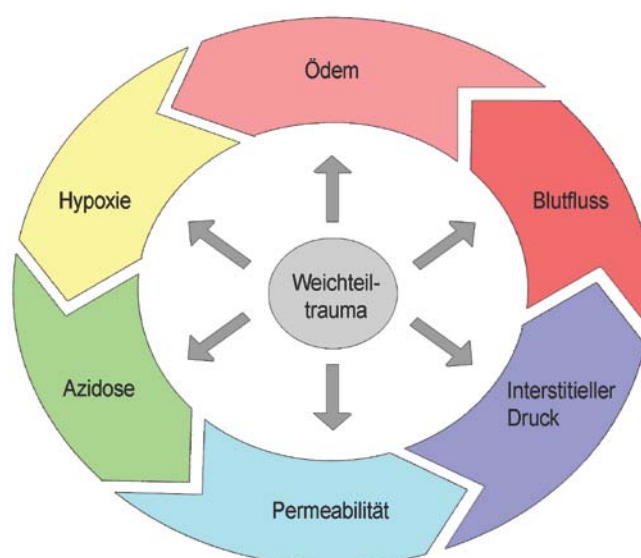


Abbildung 1: Schematische Darstellung möglicher Komplikationen nach Weichteiltrauma.

3.2 Immunreaktion nach Trauma

Sowohl bei akzidentiellen als auch bei operativen Gewebeläsionen wird - unabhängig von der Größe und Entstehungsart des Traumas - eine Kaskade von zahlreichen immunologischen Vorgängen induziert (Toft et al., 2003). Je nach Ausprägung der Schädigung kann die resultierende Entzündungsreaktion in erster Linie lokal oder aber auch systemisch ablaufen.

Die Wundheilung setzt bereits in den ersten Sekunden nach der Verletzung ein (s. Abb. 2). Morphologisch handelt es sich um eine Entzündung mit exsudativer und proliferativer Beteiligung (Broughton et al., 2006); dabei werden - je nach Literatur - 3 bzw. 4 Stadien unterschieden, die nacheinander, aber auch überlappend ablaufen (Johnstone und Farley, 2005; Kondo, 2007):

- *Exsudationsphase* und *Resorptionsphase* (Latenz- oder katabole Phase, 1.-6. Tag post Trauma), die der *Entzündungsphase* entsprechen
- *Proliferationsphase* (anabole Phase, 4.-14. Tag p.T.)
- *Reparations- bzw. Modulationsphase* (ab 7. Tag p.T.) (Hadfield, 1963; Bühling et al., 2004; Hirner und Weise, 2004)

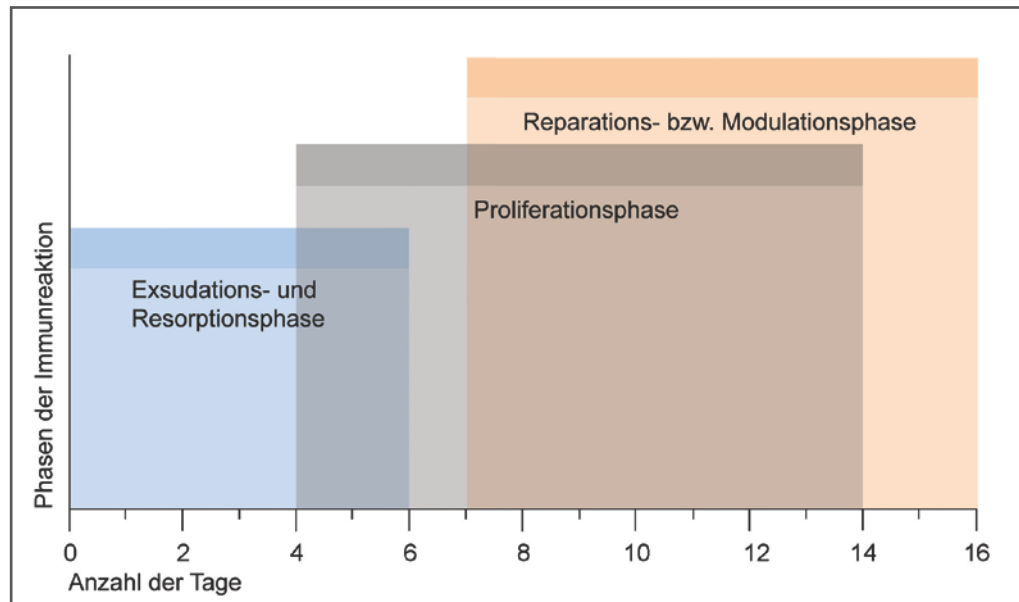


Abbildung 2: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufes der verschiedenen Phasen der Wundheilung, beginnend unmittelbar nach Trauma und endend am 16. Tag nach der Verletzung. x: Anzahl der Tage; y: Phasen der Immunreaktion.

3.2.1 Immunologie der Wundheilung

Für die vorliegende Studie sind die *Exsudations-* und die *Resorptionsphase* primär von Bedeutung (s. *Abb. 2*). Unmittelbar nach dem Trauma werden dabei lokal von den zerstörten Zellen proinflammatorische Faktoren sezerniert (Kimura et al., 2002): die Eicosanoide, Chemokine und Zytokine (Andersen und Pedersen, 2008) sind in der Lage, chemotaktisch die im Blut oder in der Lymphe zirkulierenden Granulozyten und Monozyten anzulocken (Menth-Chiari et al., 1998; Soehnlein et al., 2008). Sie sind auf zellulärer Ebene die ersten, die aktiviert werden und produzieren ihrerseits proinflammatorische Mediatoren, um miteinander zu kommunizieren (Loppnow et al., 2008). Gleichzeitig stimulieren sie so die Immunantwort (s. *Abb. 3*).

Einer der wichtigen Aspekte der systemischen Reaktion der Wundheilung ist die Aktivierung des neuroendokrinen Systems. Das kann sowohl durch alle oben erwähnten proinflammatorischen Effektoren erfolgen, als auch durch afferente Nervenbahnen (Calogero et al., 1992; Borghetti et al., 2009). Über Hypothalamus (Sternberg et al., 1992), Hypophyse und Nebenniere (Chida et al., 2005) kann der Organismus die zelluläre, humorale und systemische Immunantwort sowohl verstärken als auch abschwächen. Dadurch erlangt das Eingreifen in diese Regelkreise am Beginn der Kaskade eine zentrale Bedeutung, welche mit den in dieser Studie vorgestellten Versuchsreihen beeinflusst werden sollten.

Bei allen Vorgängen auf zellulärer Ebene entstehen reaktive Sauerstoffspezies, proteolytische Enzyme sowie Stickstoffmonoxide [NO] (Bauerova und Bezek, 1999; Manukhina et al., 2006). Letztere werden nicht nur durch die geschädigten Endothelzellen [eNOS] sezerniert, sondern auch durch die induzierbare Stickstoff-Synthase [iNOS] produziert. Vergleichbar mit den multifunktionalen Eicosanoiden ist NO gefäßaktiv (Boger, 2003), was sich zunächst positiv auf die hydrodynamische Margination, die Adhäsion und die Diapedese der Leukozyten auswirkt (Abbassi et al., 1993). Eine überschießende Freisetzung der zytotoxischen Enzyme, Sauerstoffradikale und Stickoxide resultiert letztendlich in einer Durchblutungsstörung mit mikrozirkulatorischer Minderperfusion (Menger et al., 1997; Gierer, Hoffmann et al., 2008). Die Folge ist eine initial ortsständig begrenzte Hypoxie, der auf lokalem Niveau u.a. mittels Hämoxygenasen [HO] entgegengewirkt wird (Kadl und Leitinger, 2005). Dies bot einen Ansatzpunkt für die vorliegende Versuchsreihe.

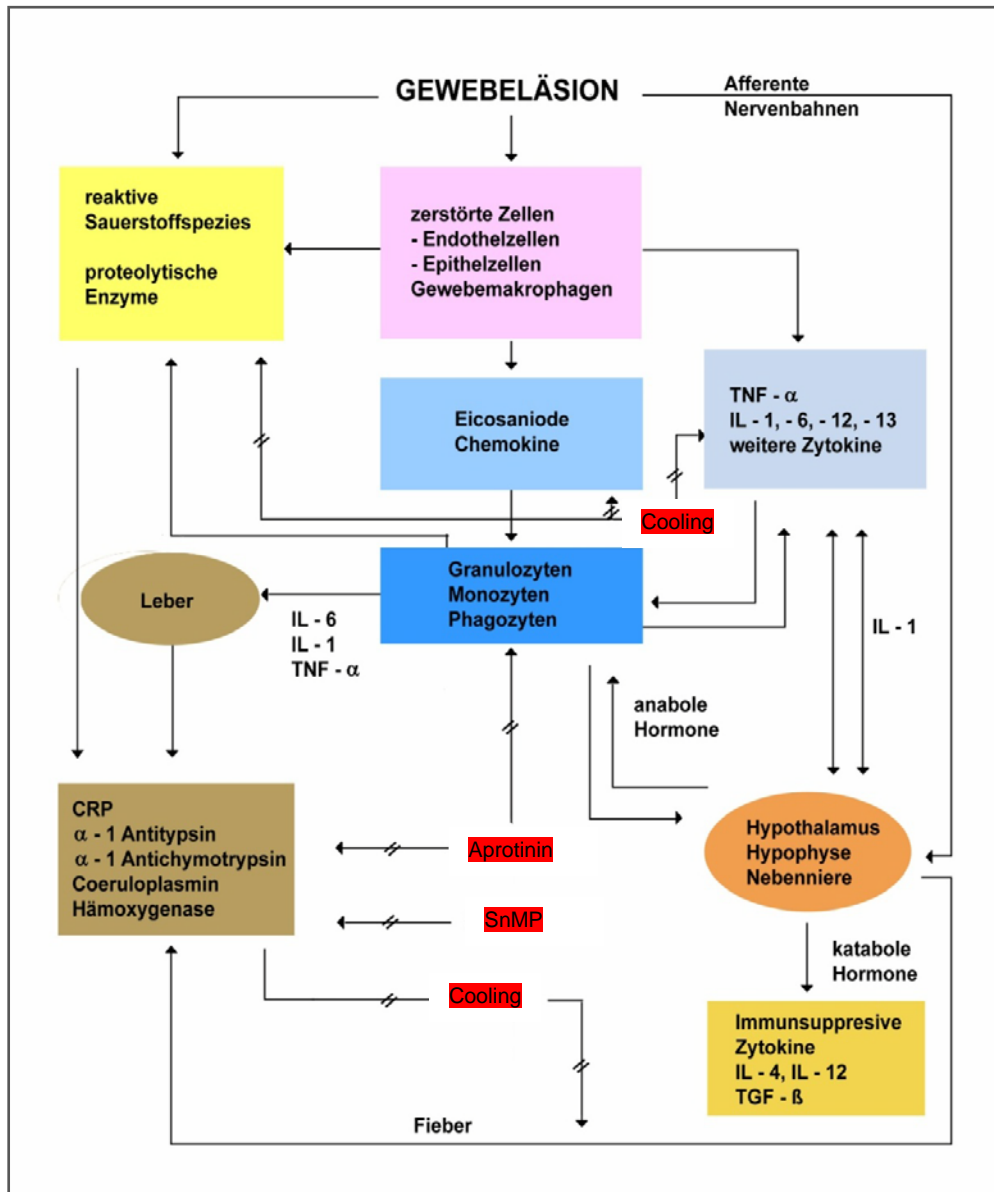


Abbildung 3: Kaskade der Immunreaktion nach Trauma. Schematische Darstellung der Hochregulierung von lokaler zu systemischer Immunantwort und den therapeutischen Ansatzpunkten der vorliegenden Studie: Cooling, Zinnmetalloporphyrin [SnMP] und Aprotinin. [IL = Interleukin, CRP = C-reaktives Protein, TNF = Tumornekrosefaktor, TGF = ‚transforming growth factor‘ = Transformierender Wachstumsfaktor].

Systemisch werden u.a. über das neuroendokrine System Kompensationsmechanismen induziert (Borghetti et al., 2009), die die Versorgung lebenswichtiger Organe sicherstellen sollen. Dieser Vorgang senkt wiederum die Durchblutung hauptsächlich in der Peripherie; der beginnende Circulus vitiosus kann in deletären Krankheitsbildern münden, wozu u.a. das ‚Multiple organ dysfunction syndrome‘ [MODS] und das Multiorganversagen [MOV] gehören (Hirner und Weise, 2004; Keel und Trentz, 2005; Brown et al., 2006). Zudem erschwert der

Mechanismus des ‚no-reflow‘ die vollständige Wiederherstellung der nutritiven Gewebepfusion und unterhält so die Ischämie (Menger et al., 1997; Nanobashvili et al., 2003).

Auch bei anderen Prozessen innerhalb der Wundheilung können Entgleisungen zu Problemen führen: ist die Aktivierung der systemischen Immunantwort überschießend, kann sie zum ‚Systemic inflammatory response syndrome‘ [SIRS] führen (Hirota et al., 2000). Ist sie nicht ausgeprägt genug oder überwiegen die immunsuppressiven Zytokine (Vaday et al., 2001; Hamilton et al., 2002) und die über das neuroendokrine System freigesetzten katabolen Glucocorticoide der Nebennierenrinde (Deetjen et al., 2005), die für die Regulierung und schlussendliche Terminierung der Immunantwort verantwortlich sind, entsteht das ‚Compensatory anti-inflammatory response syndrome‘ [CARS] und nachfolgend eine Immunsuppression (Keel und Trentz, 2005; Okazaki und Matsukawa, 2009). Dies sind allesamt lebensbedrohliche Krankheitsbilder, die im klinischen Alltag zu finden sind: etwa 10% aller chirurgischen Intensivpatienten haben mit mindestens einer dieser Komplikationen zu kämpfen (Hirner und Weise, 2004). Hinzu kommen Wundheilungsstörungen, die zusätzlich durch eine Schwächung des Immunsystems auftreten können (Gierer et al., 2008).

Das Ziel der vorliegenden Studie war es daher, bei einem ausgeprägten Weichteiltrauma nach einem effektiven therapeutischen Ansatz zu forschen, um den oben beschriebenen Ablauf einer Entzündungsreaktion zu einem möglichst frühen Zeitpunkt positiv beeinflussen zu können.

3.3 Neue Strategien für die Therapie des Weichteiltraumas

Um die Komplikationsrate nach akzidentiellen und elektiven Weichteiltraumata zu senken, werden kontinuierlich Verbesserungen der bereits etablierten und Innovationen neuer Behandlungsmöglichkeiten angestrebt. In der vorliegenden Studie wurden daher mehrere Therapieoptionen untersucht.

3.3.1 Aprotinin

Aprotinin ist ein aus Rinderlungen gewonnenes Polypeptid mit 58 Aminosäuren, das 1930 entdeckt wurde (Royston, 1990). Zunächst erfolgte ab den 60iger Jahren der Einsatz als relativ unspezifischer Protease-Inhibitor. 1987 erkannte man, dass Aprotinin ein potentes

Medikament zur intraoperativen Blutstillung ist. 1993 wurde es von der ‚Food and Drug Administration‘ [FDA] genehmigt: „administration to cardiac surgical patients considered at high risk for post-cardiopulmonary bypass coagulopathies“ (Whitten et al., 1994). Das Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte [BfArM] ließ es daraufhin für die „prophylaktische Anwendung zur Verminderung des perioperativen Blutverlusts bei aortokoronarer Bypass-Operation mit extrakorporaler Zirkulation“ unter dem Handelsnamen Trasylo[®] (Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) zu. Die Rate der Bluttransfusionen in den entsprechenden Einsatzbereichen sank darunter um 30%.

Aufgrund der häufigen Überempfindlichkeitsreaktionen nach Gabe des Polypeptids waren vom BfArM strikte Sicherheitsbestimmungen für die Anwendungsbereiche erlassen worden. Zudem bestand der Verdacht auf ein erhöhtes Mortalitätsrisiko u.a. durch die vermehrte Rate an arteriellen thrombotischen Ereignissen, die Nierenversagen, Herzinfarkt oder Schlaganfall zur Folge haben können (Karkouti und Beattie, 2006; Mangano et al., 2006). 2007 erschien eine weitere Studie, die vom kanadischen Gesundheitsministerium geförderte BART-Studie (Blood conservation using Antifibrinolytics: A randomized trial in High-Risk Cardiac surgery Patients). In dieser waren seit 2001 randomisierte, kontrollierte, klinische Untersuchungen an 2331 Hochrisikopatienten durchgeführt worden. Sie bestätigte die Ergebnisse der vorangegangenen epidemiologischen Studien hinsichtlich der Risiken, weswegen Trasylo[®] (Bayer HealthCare, Leverkusen, Deutschland) aktuell weiterhin ausschließlich bei herz- und gefäßchirurgischen Eingriffen mit extrakorporalem Kreislauf verwendet wird.

Aprotinin ist ebenfalls in sogenannten Gewebeklebern enthalten, die bei chirurgischen Eingriffen verwendet werden. Die Mengen sind viel geringer als bei den Infusionen der oben genannten Anwendungsgebiete, weswegen keine Sicherheitsmaßnahmen für den Gebrauch dieser Arzneimittel ausgesprochen wurden.

Auf molekularbiologischer Ebene wirkt Aprotinin durch die Bildung reversibler Enzym-Inhibitor-Komplexe (s. *Abb. 3*). Diese hemmen menschliches Trypsin, Chymotrypsin, Plasmin sowie Plasma- und Gewebe-Kallikrein (Davis und Whittington, 1995). Letzteres z.B. gehört zu den Serin-Proteasen und ist u.a. bei der Modulation von Entzündungsreaktionen beteiligt (Yousef und Diamandis, 2001).

Aprotinin unterdrückt zudem die Fähigkeit von Leukozyten, durch die vaskuläre Endothelmembran zu wandern, indem es mit einer Vielzahl von Adhäsionsmolekülen interagiert (Vaporciyan et al., 2004). Darüber hinaus kann es die Leukozytenausschüttung der einzelnen Organe bei Entzündungen reduzieren (Asimakopoulos et al., 2000) und verkürzt so die inflammatorische Reaktion bei der Wundheilung (s. *Abb. 3*) (Jeong et al., 2008).

Da der künftige Einsatz von Aprotinin ungeklärt bleibt (Henry et al., 2009; Murkin, 2009) - die Wirkung jedoch vielversprechend ist - werden weiterhin eine Vielzahl experimenteller Untersuchungen zur modifizierten Anwendung dieses Medikaments durchgeführt. Ein Diskussionspunkt ist insbesondere die Gabe bei orthotopen Lebertransplantationen (Findlay und Kufner, 2003; Warnaar et al., 2009), u.a. auch bei der Entfernung maligner Tumore (Vaporciyan et al., 2004), bei der Behandlung ösophagealer Perforationen (Erdogan et al., 2007), bei aortokoronarem Bypass in der Pädiatrie (Backer et al., 2007), bei Lungentransplantationen (Balsara et al., 2008) und bei Tendinopathien (Orchard et al., 2008).

Aufgrund der vielfältigen Einsatzmöglichkeiten von Aprotinin wurde dieses Medikament in der vorliegenden Studie unter dem Gesichtspunkt Heilung nach Weichteiltrauma untersucht.

3.3.2 Cooling

Das Cooling entspricht dem Vorgang des Herabsenkens der Körperkerntemperatur [KKT] (Brux et al., 2005). Mittels Cooling kann also eine Hypothermie induziert werden, bei der die Wärmeproduktion über bestimmte Zeit geringer als die Wärmeabgabe ist. Unter den Einteilungen der Hypothermie wird die Klassifizierung der angloamerikanischen und angelsächsischen Literatur am häufigsten verwendet (Abb. 4).

Hypothermie	Akzidentiell	Kontrolliert therapeutisch
<i>Mild</i>	32-35,9°C	34-35,9°C
<i>Moderat</i>	28-31,9°C	32-33,9°C
<i>Tief</i>	<28°C	<32°C

Abbildung 4: Einteilung der Hypothermie nach der gebräuchlichsten Klassifizierung.

Die therapeutische Verwendung der Hypothermie ist schon seit etwa 2000 a.Chr.n. bekannt (Hippocrates, 460–375 a.Chr.n.). Es existieren Aufzeichnungen von Hippokrates, Galen (Galaneus, 129-199) sowie Berichte des obersten Truppenarztes Napoleons (Larrey, 1814) über die positiven Auswirkungen von Unterkühlung. Gegenstand der modernen Forschung wurde der Einsatz des Coolings in den 30iger, 40iger und 50iger Jahren des letzten Jahrhunderts. Aufgrund nicht kontrollierbarer Nebenwirkungen des Ganzkörpercoolings wurde diese Therapieart zunächst wieder gestoppt (Brux et al., 2005).

Die *unerwünschten Effekte* resultieren aus zellulären Funktionsstörungen, die sich auf alle Organsysteme auswirken und sich mit zunehmender Abnahme der Körperkerntemperatur potenzieren: der Zellstoffwechsel wird verlangsamt. Sobald die Kompensationsmechanismen des Organismus mittels Aktivierung des sympathischen vegetativen Nervensystems und der zunächst reaktiven Steigerung des Stoffwechsels durch das unwillkürliche Muskelzittern nicht mehr ausreichen, überwiegen die katabolen Auswirkungen der Hypothermie. Sie treten ab einer KKT von 35°C auf und führen unbehandelt auf Zellebene zu Apoptose und systemisch zum Herz-Kreislauf-Stillstand (Polderman, 2004).

In den 80iger Jahren erkannte man die Effektivität der milden Hypothermie, bei der die unerwünschten Wirkungen deutlich geringer ausfallen (Brux et al., 2005). Heute nutzt man den positiven Einfluss des Kühlens in vielen Bereichen der Medizin. Bei der Fiebersenkung (Axelrod, 2000; Mackowiak, 2000), bei Sportverletzungen (Meeusen und Lievens, 1986) sowie bei Verbrennungen (Davies, 1982; Wassermann, 2002) wird das Cooling als Therapieoption eingesetzt. Spezifischere Anwendungen milder bis moderater Hypothermie findet man im klinischen Alltag bei ischämischem Hirninfarkt (Schwab et al., 2001; MacLellan et al., 2009) sowie bei fetaler Asphyxie (Greisen, 2001). Für die Anwendung des Coolings nach Herzkreislaufstillstand gibt es positive Ergebnisse bei der Therapie des Kammerflimmerns (Bernard et al., 2002; Sterz et al., 2003; Bernard, 2005; Bernard, 2009). Das ‚International Liaison Committee on Resuscitation‘ [ILCOR] sowie die ‚American Heart Association‘ [AHA] haben hierzu eine Empfehlung ausgesprochen.

Die bei den jeweiligen Verfahren angewendeten Kühlmethoden sind heutzutage sehr vielseitig (Polderman, 2004): von peripher nichtinvasiv bis zu zentral, meist invasiv. Eispakete, Wasser- und Alkoholsprays, nasale oder gastrale Lavagen mit Eiswasser, Infusionen von eiskalten (4°C) Flüssigkeiten (Bernard et al., 2003) oder Kühlung mithilfe einer extrakorporalen Zirkulation und intravaskulären Kühlkathetern (Georgiadis et al., 2001) werden in der Klinik ebenso verwendet wie luft- oder wassergekühlte Matten und Decken (Brux et al., 2005). Bei der Wahl der passenden Methode kommt es auf die Art und Ausprägung der zu behandelnden Wunde oder Erkrankung an sowie auf die erforderliche Geschwindigkeit bis zum Erreichen der gewünschten Zieltemperatur.

Verschiedene Studien belegen die positive Auswirkung einer induzierten Hypothermie auf die Entzündungsreaktion zusätzlich zu den neuroprotektiven Mechanismen (s. *Abb. 3*) (Westermann et al., 1999; Kimura et al., 2002; Diestel et al., 2008; Zhang et al., 2008). Die Freisetzung der proinflammatorischen Zytokine wird supprimiert und die Entzündungsreaktion dadurch verzögert bzw. vermindert (Polderman, 2004). Die Sezernierung von freien Radikalen, Stickstoffmonoxiden und Sauerstoffspezies verlangsamt

sich, so dass die Zelle mehr Zeit hat, Schutzmechanismen wie die HO-1 zu exprimieren (Gundersen et al., 2001; Polderman, 2004).

Trotz dieser Erkenntnisse über die Abläufe bei der Verwendung des Coolings sind die Wirkmechanismen nicht vollständig verstanden. Die hier vorgelegte Studie hatte das Ziel, die Wirksamkeit der durch Cooling induzierten Hypothermie bei Weichteiltrauma genauer zu untersuchen.

3.3.3 Zinnmetalloporphyrin [SnMP]

Zinn-Metalloporphyrin [SnMP], Zinn-Protoporphyrin [SnPP], Zink-Metalloporphyrin [ZnMP] und Zink-Protoporphyrin [ZnPP] gehören zu der Gruppe der Porphyrine (Hintz et al., 1990). Seit den 80iger Jahren des letzten Jahrhunderts wird insbesondere SnPP, aber auch SnMP, bei der Behandlung der Hyperbilirubinämie von Früh- und Neugeborenen angewendet (Valaes et al., 1994; Reddy et al., 2003). Darüber hinaus gibt es vielversprechende Ansätze, diese Substanzen zur Neuroprotektion bei hämorrhagischem Insult einzusetzen (Wagner et al., 2000). Sie können in ausreichend therapeutischer Menge die normalerweise undurchlässige (Bundock et al., 1996) und erst durch das pathologische Geschehen penetrierbare Blut-Hirn-Schranke überwinden (Koeppen et al., 2004). Zudem existieren positive Belege für die therapeutische Wirksamkeit bei portaler Hypertension (Angermayr et al., 2006), renovaskulärer Hypertension (Botros et al., 2007) und Diabetes (Di Noia et al., 2006; Li et al., 2008).

In der vorliegenden Studie wurde Zinn-Metalloporphyrin verwendet. SnMP inhibiert wie alle Metalloporphyrine maßgeblich die Hämoxygenasen (s. *Abb. 3*) (Cannon et al., 1993), ohne mit weiteren Akute-Phase-Proteinen zu interagieren (Berglund et al., 1999).

Identifiziert wurden die *Hämoxygenasen* erstmals 1960. Es existieren 2 Isoformen, die HO-1 und die HO-2. Die Enzyme sind Produkte unterschiedlicher Gene mit einer Aminosäure-Sequenzhomologie von 40%. Ihre Induzierbarkeit wurde erstmals 1972 beschrieben (Bakken et al., 1972). Sie kommen in allen Geweben vor; in besonders hohen Konzentrationen findet man sie in der Leber, der Milz und den Nieren (Bundock et al., 1996). Die HO-1 ist, anders als die HO-2, durch eine Reihe von Faktoren stimulierbar (s. *Abb. 3*). Dazu gehören der zu spaltende Häm-Komplex, Mediatoren der Entzündungsreaktion (Korthuis et al., 1994; Kushida et al., 2002) - insbesondere IL-6 (Overhaus et al., 2006) -, UV-Licht (Kutty et al., 1995), oxidativer als auch hyper- und hypothermischer Stress (da Silva et al., 2001; Rucker

et al., 2009), Hypoxie, Sauerstoffradikale und der feieberbedingte Anstieg der Zelltemperatur (Katayose et al., 1993).

Das Hämoxxygenase-System ist bei der Regulation wichtiger physiologischer und pathophysiologischer Mechanismen beteiligt (Wagener et al., 2003). Dazu zählen zytoprotektive, apoptotische und entzündliche Vorgänge: die Enzyme der HO-Gruppe katalysieren die Konversion von Häm – einem Eisen-Porphyrin. Häm ist ein essentielles Element für eine Vielzahl von biologischen Prozessen. Wenn es jedoch in großen Mengen ungebunden vorliegt, wirkt es durch die Anreicherung von Sauerstoffradikalen toxisch und hält Entzündungsreaktionen aufrecht (Balla et al., 1993). Bei der Degradation von Häm durch die HO entsteht Biliverdin, welches durch die Biliverdin-Reduktase zu Bilirubin – einem Antioxydanten – reduziert wird (Overhaus et al., 2006). Bei diesem Vorgang ist die Hämoxxygenase das geschwindigkeitsbestimmende Enzym. Bilirubin und Biliverdin sind u.a. in der Lage, Radikale zu binden (Dennerly et al., 1995) und die Zelle vor Oxidation zu schützen. Biliverdin schwächt sogar selektiv die Wirkung von IL-6 und steigert im Gegensatz dazu die anti-entzündliche Potenz von IL-10 (Overhaus et al., 2006).

Zusätzlich zu Biliverdin und Bilirubin steigen nach Induktion der HO der zelluläre Eisengehalt $[Fe^{2+}]$ und der Gehalt an Kohlenmonoxid $[CO]$ (Wagener et al., 2003). Alle diese katabolen Degradationsprodukte sind in großen Mengen, ebenso wie der Ausgangs-Komplex Häm, potentiell zytotoxisch (Wagner et al., 2000). Eisen wird durch Ferritin gespeichert, dessen Synthese parallel zur Aktivitätssteigerung der HO induziert wird (Wagner et al., 2000). CO ist ein Zellzyklusmodulator, der das endotheliale Zellwachstum erhöht und das Muskelzellwachstum vermindert (Li Volti et al., 2002). Zudem ist CO ein Vasodilatator (Kushida et al., 2002; Nishikawa et al., 2004) und wirkt somit unmittelbar auf die umliegenden Gefäße des Liberationsortes (Nishikawa et al., 2004).

Es wird zudem vermutet, dass das HO-System die Caspase-3- und -9-Aktivität vermindert und so einen antiapoptotischen Effekt hat, der sich möglicherweise durch die vermehrte Expression von antiapoptotischen Molekülen verstärkt (Botros et al., 2007). Bei Entzündung lässt sich darüber hinaus eine Verminderung von iNOS und von freien Radikalen beobachten (Wang et al., 2001). Primär überwiegt somit die protektive Rolle des Hämoxxygenase-Systems, welche in dieser Studie durch Zinn-Metalloporphyrin gehemmt wurde.

Zu den wichtigsten *Nebenwirkungen* der Metalloporphyrine gehört die dosisabhängige Phototoxizität (Hintz et al., 1990). Insbesondere bei der Gabe von SnPP liegt bei massiver Lichtexposition ein Mortalitätsrisiko vor. SnMP hat hingegen weniger phototoxische Eigenschaften, ZnPP und ZnMP fast keine. Als weitere unerwünschte Eigenschaft besteht das Risiko der durch Metalloporphyrine induzierten Hepatotoxizität. SnMP und SnPP

beeinträchtigen nur geringfügig die Integrität des Leberparenchyms (Scheingraber et al., 2009). Des Weiteren müssen Veränderungen bezüglich der Mikrozirkulation beachtet werden. Auf diese hat SnMP allerdings nahezu keinen Einfluss.

In der vorliegenden Studie wurde aufgrund der relativ geringen Nebenwirkungen Zinn-Metalloporphyrin zur Blockierung der HO-1 in Kombination mit Cooling verwendet, um ein Weichteiltrauma therapeutisch zu beeinflussen. Wir wollten erforschen, ob die Wirkung des Coolings über eine HO-1-Induktion erfolgt.

3.4 Experimentelle Modelle zur Analyse des Weichteiltraumas

Das Ziel der vorliegenden Studie war es, ein leicht reproduzierbares tierexperimentelles Modell zur standardisierten Applikation eines Weichteiltraumas auf die quergestreifte Rückenmuskulatur von Mäusen zu verwenden (Amon et al., 2006) und die provozierten Gewebeschäden zu reduzieren. Dabei wurden insbesondere nach potentiell auf den Menschen übertragbare Therapieansätze geforscht.

Bisher gibt es in der Literatur nur wenige experimentelle Modelle, die die direkte Visualisierung der für die Gewebenutrition essentiellen Mikrozirkulation beschreiben. Dabei sind die meisten dieser Modelle auf einen bestimmten Untersuchungszeitpunkt limitiert. Beispielsweise handelt es sich dabei um die Darstellung von Weichteilverletzungen am Hinterlauf von Nagern (Szczesny et al., 2000) oder am isolierten Cremastermuskel der Ratte (Lee et al., 2005). Die Etablierung von repetitiven Untersuchungen der mikrovaskulären Dysfunktion nach lokalem Weichteiltrauma an der chronischen Rückenhautkammer erfolgte erst 2006 (Amon et al., 2006). Mittlerweile gibt es aber auch Ansätze, die Kammer an Hinterläufen von Nagern zu standardisieren (Szczesny et al., 2000; Schaser et al., 2006).

3.5 Modell der Rückenhautkammer

Das Modell der chronischen Rückenhautkammerpräparation an Mäusen diente als Versuchsgrundlage. Etabliert wurde dieses Verfahren als Akutmodell 1943 durch Algire et al. Später kam es zur modifizierten Anwendung an Ratten (Papenfuss et al., 1979), Hamstern (Endrich et al., 1980) und Mäusen (Lehr et al., 1993). Es ermöglichte die wiederholte Untersuchung einer großen Anzahl verschiedener Parameter von Kapillarfeldern sowie von Arteriolen und Venolen innerhalb eines Zeitraumes von bis zu 14 Tagen.

4. Ziel der Studie

Die mikrovaskuläre Dysfunktion - bestehend aus nutritivem Perfusionsversagen und einer Leukozyten-Endothelzell-Interaktion vermittelten Entzündungsreaktion - spielt eine wesentliche Rolle bei der Entstehung der Weichteilschädigung (Menth-Chiari et al., 1998; Schaser et al., 1999). Wir setzten uns daher die genauere Erforschung möglicher Therapieansätze für die Verminderung der mikrovaskulären Dysfunktion nach Weichteiltrauma als Ziel unserer Studie. Dabei interessierte uns insbesondere die Beeinflussbarkeit einzelner Schritte innerhalb der Entzündungskaskade (s. *Abb. 1-3*).

Bei der in vivo mittels Intravitalmikroskopie durchgeführten Untersuchung der Hämodynamik und verschiedener Entzündungsparameter bewerteten wir folgende Punkte:

- Welche Auswirkungen hat die standardisierte Applikation eines Weichteiltraumas auf die Mikrohämodynamik und die Entzündungsreaktion im Musculus retractor der Rückenhautkammer (s. *Abb. 8-10*)?
- Kann durch Aprotinin die mikrovaskuläre Dysfunktion und die Entzündungsreaktion des Weichteilschadens reduziert werden?
- Kann durch Cooling die mikrovaskuläre Dysfunktion und die Entzündungsreaktion des Weichteilschadens reduziert werden?
- Wird die durch Cooling induzierte Protektion über HO-1 vermittelt?

5. Material und Methoden

5.1 Modellaufbau

5.1.1 Mikrozirkulationsmodell

Bei dem hier beschriebenen tierexperimentellen Modell der Rückenhautkammer handelt es sich um ein etabliertes Verfahren. In vergleichbarer Weise kam es schon 1943 durch Algire zur erstmaligen Anwendung. Durch Modifikationen konnte der Versuchsaufbau auf ein chronisches Modell erweitert werden. Dabei wurden zunächst die immunkompetente Maus (Cardon et al., 1970), die Ratte (Papenfuss et al., 1979), der Hamster (Menger et al., 2002) und schließlich die immuninkompetente Maus (Lehr et al., 1993) verwendet.

Der Versuchsaufbau bietet vielerlei Einsatzmöglichkeiten. Das Gewebeareal der Kammer lässt sich sowohl mit Auflicht-Fluoreszenz-Mikroskopie als auch mit Durchlichtmikroskopie analysieren. Dies wird durch die geringe Dicke der freipräparierten Schichten ermöglicht (s. *Abb. 9C*). Durch die fakultative Deckglasentnahme bietet das Modell Möglichkeiten für verschiedene Versuchsansätze. Beispielsweise können die Einflüsse auf das zu beobachtende Gewebe durch implantierte Organgewebe bzw. Fremdmaterialien, durch zu verschiedenen Zeitpunkten lokal oder systemisch angewandte Therapeutika oder eben durch applizierte Traumata in vivo über einen gewissen Zeitraum verfolgt und analysiert werden. Die zum Zeitpunkt „Baseline“ ([BL], in der vorliegenden Studie definiert als der Zeitpunkt 48h nach der Kammerpräparation) ausgesuchten Arteriolen und Venolen können über einen Zeitraum von bis zu 14d repetitiv sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch beobachtet werden. Die durch die Versuche induzierten Veränderungen lassen sich zudem auf Ebene der kapillären Mikrozirkulation mikroskopisch verfolgen. Die intravenöse Gabe von verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen dient dabei zur Darstellung des Blutplasmas bzw. von korpuskulären Blutbestandteilen (s. *Kap. 5.3.1*). Durch Verwendung eines speziellen Bildverarbeitungs-Systems können alle auf DVD aufgezeichneten Sequenzen im Anschluss an den Versuch ‚off-line‘ ausgewertet werden (s. *Kap. 5.4*).

5.1.2 Versuchstiere

Sämtliche Versuche erfolgten an C57BL/6-Mäusen (Charles River, Sulzfeld, Deutschland). Tiere beiderlei Geschlechts mit einem durchschnittlichen Alter von 12 Wochen und einem mittleren Gewicht von 22-25g wurden für die Versuche verwendet (s. *Abb. 5*). Um die mit zunehmendem Alter auftretenden physiologischen Mikrozirkulationsstörungen als

potentiellen Störfaktor zu umgehen (Vollmar et al., 2000), wurden relativ junge Tiere verwendet. Über den gesamten Versuchszeitraum wurden die Tiere in Einzelkäfigen unter standardisierten Bedingungen gehalten - dies entsprach einer Raumtemperatur von 22°C mit einer relativen Luftfeuchtigkeit von 60-70% und einem 12-stündigen Tag- und Nachtrhythmus. Standardlaborfutter (Altromin® Haltungsfutter, Lage, Deutschland) und Wasser wurde den Mäusen während der gesamten Versuchsperiode ad libitum zur Verfügung gestellt. Nach der Genehmigung durch die Behörde wurden die Versuche gemäß dem deutschen Tierschutzgesetz und unter Aufsicht von Frau Dr. med. vet. M. Frings, Tierschutzbeauftragte der Universität des Saarlandes, durchgeführt.



Abbildung 5: C57BL/6-Maus im Alter von 12 Wochen.

5.1.3 Versuchsablauf

Die erste intravitalmikroskopische Analyse [Baseline=BL] erfolgte 48h nach Kammerpräparation (s. Abb. 6, s. Kap. 5.1.6 und 5.3), um den Tieren eine Erholungsphase zu gewähren. Dies garantierte zudem das Abklingen der durch das chirurgische Trauma der Implantation ausgelösten Veränderungen der Mikrozirkulation und der Entzündung des Gewebes (Yamauchi et al., 1999). Nach dieser basalen Analyse wurde das Weichteiltrauma durch eine mechanische Schädigung induziert. Dazu wurde ein 25g schwerer Edelstahlzylinder durch eine 14,5cm lange Plexiglasröhre auf die Rückseite des Beobachtungsfeldes der Kammer fallen gelassen (s. Abb. 10, s. Kap. 5.1.8). Als Kontrolle diente die Sham-Gruppe, bei der das Trauma lediglich durch das Anheben des Deckglases simuliert wurde. Die weiteren intravitalmikroskopischen Untersuchungen erfolgten 8h, 24h, 72h und 120h nach Trauma. Während des gesamten Beobachtungszeitraumes wurden die Kammern täglich qualitativ beurteilt und dokumentiert, so dass Tiere mit neu aufgetretenem pathologischem Befund oder Kammerverletzung rechtzeitig aus dem Versuch ausgeschlossen werden konnten (s. Kap. 5.1.7). Direkt vor jeder intravitalen

Fluoreszenzmikroskopie, die etwa 25min pro Tier beanspruchte, erfolgte die Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran (5%, FITC, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) und Rhodamin-6G (0.1%, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) (s. Kap. 5.3.1). Nach der letzten Intravitalmikroskopie 120h nach Trauma wurden die Tiere mit einer Überdosis des Narkotikums euthanasiert und Gewebeproben für Immunhistologie und Histochemie entnommen (s. Kap. 5.5).

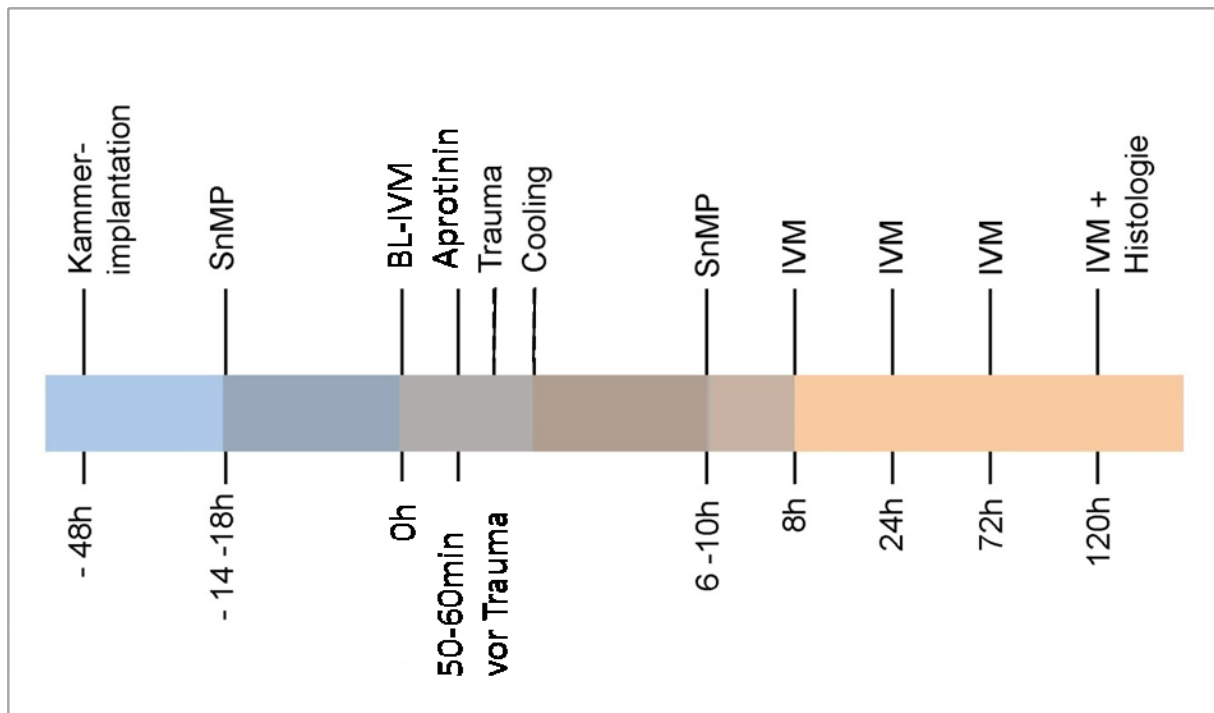


Abbildung 6: Schematische Darstellung der zeitlichen Versuchsabläufe.

5.1.4 Versuchsgruppen

Das Ziel dieser Studie war es, über einen Zeitraum von 5d die mikrozirkulatorischen und wundheilungsbedingten entzündlichen Veränderungen nach Traumainduktion sowie verschiedene Therapieansätze zu analysieren. Hierbei wurden 39 Mäuse randomisiert auf die folgenden 5 Versuchsgruppen aufgeteilt:

- I. Sham (Kontrollgruppe; n=7)
- II. Trauma (n=10)
- III. Trauma+Aprotinin (n=8)
- IV. Trauma+Cooling (n=7)
- V. Trauma+Cooling+SnMP (n=7)

Die Gabe und Dosierung der Medikamente und die Applikation sowohl des Traumas als auch des Coolings erfolgte nach der beschriebenen Vorgehensweise (s. Kap. 5.1.8 und 5.2).

5.1.5 Anästhesie

Für jegliche Versuche erhielten die Tiere eine intraperitoneale Anästhesie, die sich aus einer Mischung von Ketaminhydrochlorid (100mg/kg Körpergewicht [KG], Ketavet[®], Park Davis, Freiburg, Deutschland) und Xylazinhydrochlorid (25mg/kg KG, Rompun[®], Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) zusammensetzte. Dies entsprach einer Dosierung von 0,1ml/10g KG, die sowohl bei der Präparation der Rückenhautkammer, der Traumatisierung des Gewebes als auch bei der repetitiven Analyse der Mikrozirkulation zur Anwendung kam. So konnte eine schnell wirkende, ca. 30min andauernde Narkose mit gleichzeitiger Analgesie und Muskelrelaxierung garantiert werden. Kreislauf- oder Atemdepressionen traten auch bei wiederholten Anästhesien nicht auf.

5.1.6 Implantationstechnik der Rückenhautkammer

Nach erfolgreicher Anästhesie des Versuchstieres erfolgte zur Implantation der Rückenhautkammer (s. Abb. 7) die Entfernung des Rückenfells mittels Elektrorasur (Elektra[®]II GH 204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und 10min dauernder chemischer Depilation (PilcaMed[®], Schwarzkopf, Düsseldorf, Deutschland).

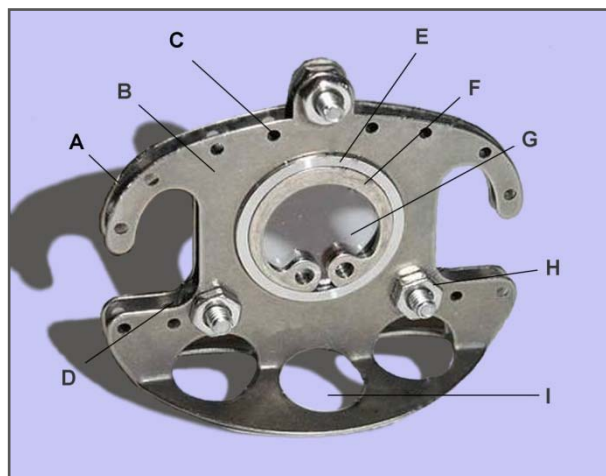


Abbildung 7: Übersichtsaufnahme einer zu Modellzwecken montierten Kammer; Gewicht: ca. 3,2g; A: Hintere Hälfte des aus zwei identischen Platten bestehenden Titan-Rahmens; B: Vordere Hälfte des Titan-Rahmens; C: Öffnungen für Fixationsnähte; D: Mutter als Abstandshalter; E: Beobachtungsfenster; F: Sprengring; G: Deckglas; H: Mutter zur Fixierung; I: Stanzlöcher zur Gewichtsreduktion.

Die enthaarte Rückenhaut wurde mit lauwarmem Wasser gereinigt und mit 70%-igem Alkohol (Softasept[®]N, B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) desinfiziert. Parallel hierzu wurde das später benötigte Präparationsbesteck über 15min in ein Sterilisationsbad (Elma[®], Elmasonic, Singen, Deutschland) getaucht. Nach Positionierung des Tieres in Bauchlage wurde die dehnbare Rückenhautfalte entlang ihrer Mittellinie angehoben und mit Hilfe von jeweils einem in dorso-cranialer und -caudaler Position fixierten Haltefaden an einem Metallgestell vertikal aufgespannt (s. *Abb. 8A*). Unter Berücksichtigung der bilateral parallel verlaufenden Versorgungsgefäße - entsprechend der menschlichen Arteriae thoracica lateralis und Arteriae circumflexa iliaca - wurde zuerst die eine Hälfte der aus zwei identischen Titan-Rahmen zusammengesetzten Rückenhautkammer als Rückseite auf der dem Operateur abgewendeten Hälfte der Hautfalte fixiert (s. *Abb. 8B*). Dazu wurden 5.0 Seide-Nähte unter Gegenlichtkontrolle verwendet. Der obere Rand des Titan-Rahmens schloss dabei mit dem dorsalen Bereich der Rückenhautfalte ab. Mit einer Präparierschere wurden im ventralen Bereich des Hautlappens 2 Durchlässe für die unten und außen liegenden Schrauben des Rahmens geschaffen, ohne das spätere Versuchsareal oder die versorgenden Gefäße zu tangieren. Zusätzlich diente jeweils eine Schraubenmutter (ca. 400µm) auf jeder Verbindungsschraube als Abstandshalter zwischen hinterem und später

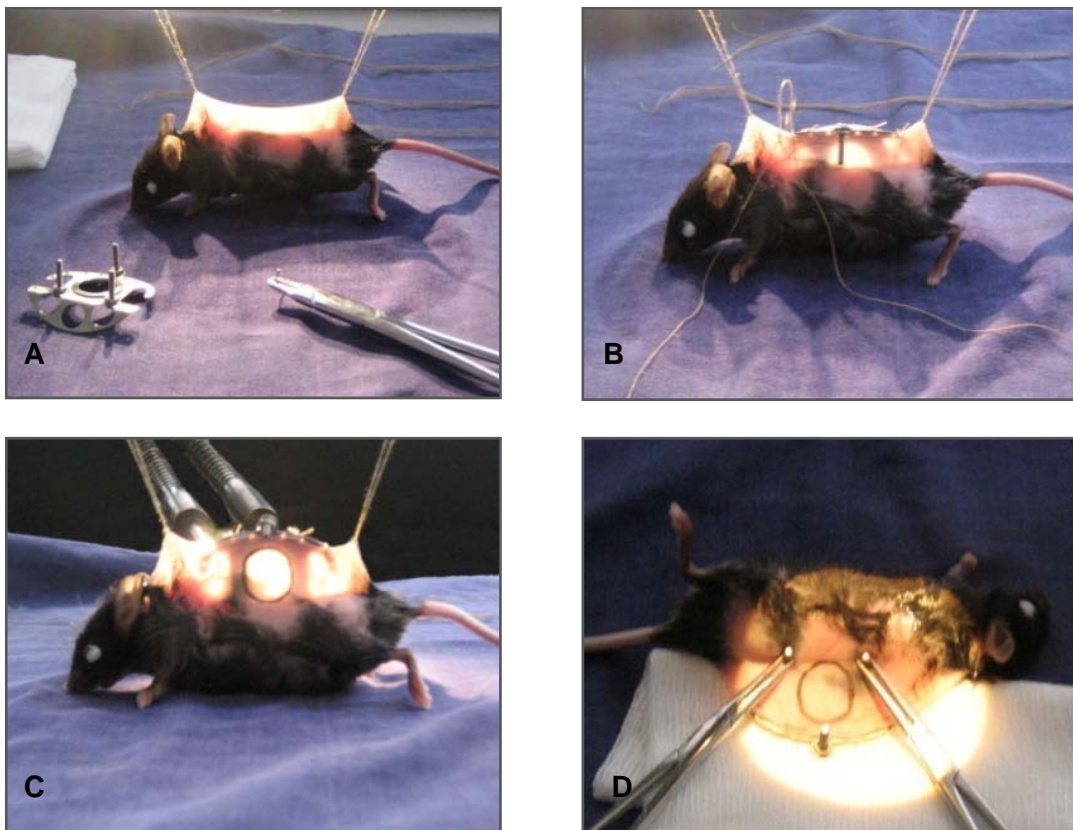


Abbildung 8: A: Maus an Haltefäden aufgespannt; B: erste Hälfte des Titan-Rahmens fixiert; C: Markierung des OP-Gebietes; D: Maus nach Umlagerung.

installiertem vorderen Rahmen, um eine Kompression aller Strukturen der Rückenhaut zu vermeiden (s. *Abb. 8C*). Zur präziseren Präparation des Gewebes für die Versuche wurde auf Höhe des späteren Beobachtungsfensters der leicht vergrößerte Schatten (ca. 14mm) der sich in diesem Bereich befindenden Aussparung des hinteren Rahmens auf die Haut gezeichnet (s. *Abb. 8C*). Diese Vergrößerung des Versuchsareals diente ebenfalls als Kompressionsprophylaxe. Nach Fixierung der Schrauben durch Gefäßklammern auf der dem Operateur zugewandten Seite und der Entfernung der Haltefäden erfolgte die Umlagerung des Versuchstieres auf die Seite der schon implantierten hinteren Kammerhälfte (s. *Abb. 8D*).

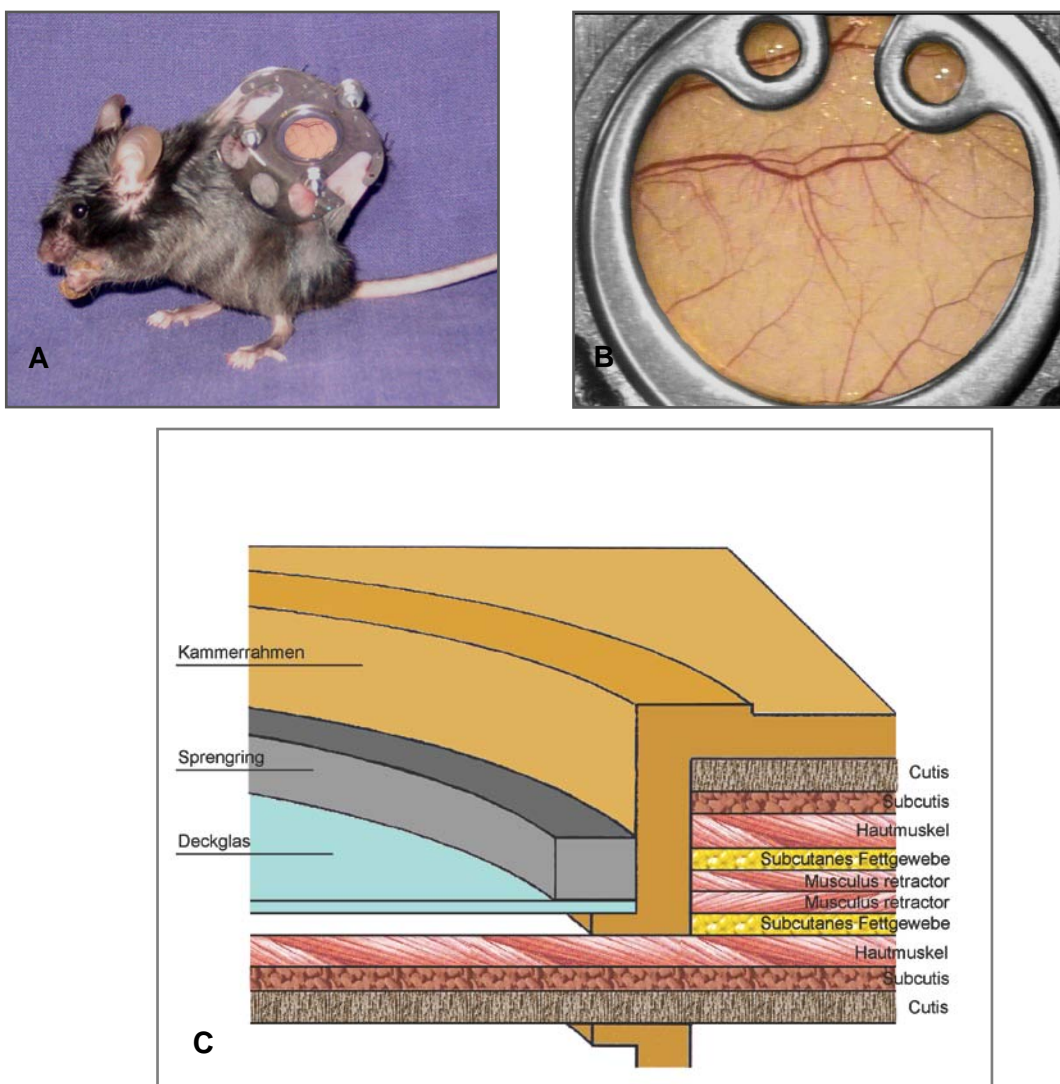


Abbildung 9: A: Maus unmittelbar nach Kammerpräparation; B: Übersichtsaufnahme auf das Beobachtungsfenster einer frisch präparierten Kammer; C: Schematische Darstellung der Hautschichten nach Präparation.

Innerhalb des vorher markierten Gebietes wurden nun mit den bereits sterilisierten mikrochirurgischen Instrumenten unter Visualisierung mittels eines Operationsmikroskops (Leica Microsystem, Bensheim, Deutschland) die Cutis, die Subcutis mit quergestreiftem Hautmuskel und die beiden Schichten des Retraktormuskels samt subcutanem Fettgewebe entfernt (s. Abb. 9C).

Es verblieben der dünne quergestreifte Hautmuskel, das Subkutangewebe, die Dermis und die Epidermis des hinteren Anteils der Hautfalte (s. Abb. 9C). Nach Spülung des Operationsgebietes mit isotoner Kochsalzlösung ([NaCl], B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) erfolgte die luftdichte Abdeckung des Gewebeareals auf der Vorderseite der Kammer, in deren ausgestanztem Beobachtungsfeld ein Deckglas eingebracht wurde (s. Abb. 7 und 9B). Letzteres wurde mit einem Kupfersprengring fixiert, der während des gesamten Versuchszeitraumes abgenommen werden konnte. Dies ermöglichte während der gesamten Versuchsperiode das Austauschen des Glases und garantierte somit den uneingeschränkten Zugang zum Untersuchungsareal. Der gesamte Eingriff dauerte jeweils etwa 30min, weshalb die Tiere im Normalfall nur eine einmalige Applikation des Narkosemittels benötigten und sich nach der Präparation schnell wieder erholten. Die Versuchstiere tolerierten die Rückenhautkammer gut, was sich durch ein normales Putz-, Fress-, und Schlafverhalten äußerte. Da die gesamte Rückenhautkammer ein Gewicht von etwa 3,2g hat, wurden die Tiere hierdurch nicht weiter eingeschränkt. Erst nach 48h kam es zu weiterführenden Schritten innerhalb des Versuchsprotokolls, was den Tieren eine vollständige Erholung und innerhalb des Beobachtungsfeldes ein Abklingen der inflammatorischen Auswirkungen der Operation erlaubte (Yamauchi et al., 1999).

5.1.7 Ausschlusskriterien

Sowohl der Allgemeinzustand der Versuchstiere als auch die Qualität der Kammerpräparation wurden vor Beginn des Experimentes beurteilt. Die Ausschlusskriterien umfassten Einblutungen in das Untersuchungsareal sowie Entzündungszeichen wie Rötung, Überwärmung oder Ödem innerhalb der Kammer. Bei Infektzeichen wie Eiterbildung, bei Beeinträchtigung des Putz- und Fressverhaltens oder des Schlaf-Wach-Rhythmus sowie bei Veränderungen der Kammergefäße wurden die Tiere ebenfalls vom Versuch ausgeschlossen.

5.1.8 Weichteiltrauma

Die Tiere wurden 48h nach Implantation der Rückenhautkammer erneut intraperitoneal anästhesiert und nach erfolgter erster Intravitalmikroskopie [Baseline=BL] mit dem horizontal

nach oben gerichteten Beobachtungsfeld seitlich auf einer Plexiglasbühne fixiert. Nach Entfernung des Sprengringes wurde das Deckglas vorsichtig entnommen und durch ein vorher desinfiziertes (Softasept[®]N, B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) und mit isotoner Kochsalzlösung (B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) gespültes Metallplättchen derselben Größe ersetzt (s. Abb. 10C).

Anschließend wurden die Tiere um 180° umgelagert. Dabei kam die vorher eingesetzte Metallscheibe auf einem entsprechend geformten Widerlager, bestehend aus einem Edelstahlzylinder gleichen Durchmessers, zu liegen. Der Kammerrahmen wurde zur Stabilisierung genau horizontal auf der zur besseren Haftung mit Knete ausgelegten Bühne fixiert. Eine Plexiglasröhre mit einem Innendurchmesser von 12,8mm und einer Höhe von 14,5cm wurde auf den rückwärtigen Titanrahmen der Kammer aufgesetzt (s. Abb. 10C). Diese Röhre diente als Leitschiene für einen 25g schweren Edelstahlzylinder. Der Zylinder wurde zur Hälfte in das obere Ende der Röhre eingeführt, bevor man ihn auf das Gewebe der Rückenhautkammer fallen ließ. Bei der so standardisiert durchgeführten Traumatisierung des Weichteilgewebes wurde eine freigesetzte Energie von 450J/m² garantiert (s. Abb. 10B). Dies entspricht einem schweren mechanischen Trauma (Amon et al., 2006), ausgelöst durch ein ‚weight-drop device‘. Nach dem Trauma waren die Tiere nicht beeinträchtigt und zeigten wieder ein normales Putz- und Fressverhalten (s. Abb. 10A).

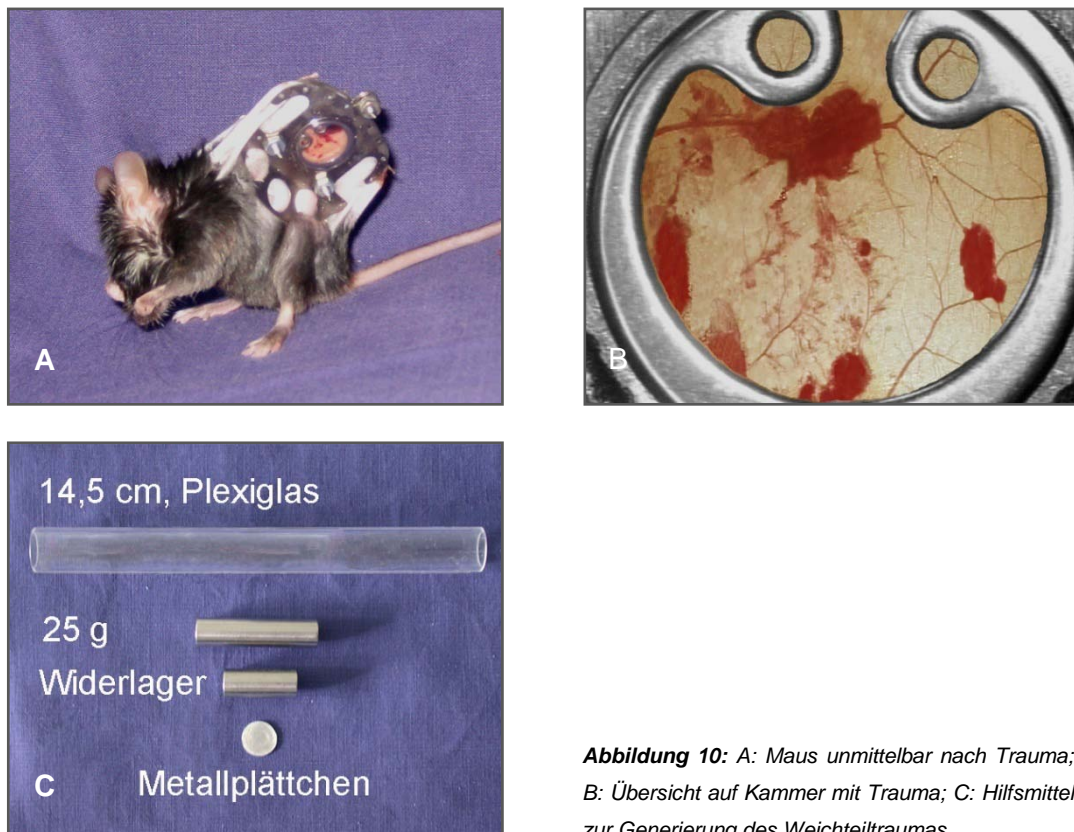


Abbildung 10: A: Maus unmittelbar nach Trauma; B: Übersicht auf Kammer mit Trauma; C: Hilfsmittel zur Generierung des Weichteiltraumas.

5.2 Therapieansätze

5.2.1 Aprotinin

Unmittelbar nach der Baseline-Mikroskopie erhielten die Tiere eine einmalige Gabe von Aprotinin (Trasylo[®], Bayer Vital, Leverkusen, Deutschland), 60min vor Trauma (s. Abb. 6). Die Gabe erfolgte intravenös in den retrobulbären Venenplexus. Die Dosierung wurde mit 200IE/10g Maus berechnet, die jeweils in 0,1ml NaCl gelöst waren. Das Gemisch wurde jeweils neu angesetzt.

5.2.2 Cooling

Die Applikation des Coolings erfolgte jeweils unmittelbar nach der Traumainduktion (s. Abb. 6). Die Versuchstiere wurden seitlich in horizontaler Lage auf einer Bühne fixiert, wobei das Beobachtungsfeld nach unten zu liegen kam. Über einen Zeitraum von 30min wurde die Rückseite der Kammer mit ca. 1-2° kaltem, fließendem Wasser behandelt. Die Bühne wurde dafür in einer speziellen Vorrichtung leicht schräg positioniert, so dass das Wasser isoliert auf der Rückseite des Beobachtungsfeldes appliziert werden und direkt abfließen konnte. Die Temperatur wurde permanent mit einer Licox-Messsonde (Licox1 GMS, Licox[®]CMP Kiel-Mielkendorf, Deutschland) am Rand des rückwärtigen Beobachtungsfensters innerhalb der Aussparung des hinteren Rahmens der Kammer gemessen und mit Hilfe eines speziellen Programmes (Integra, Licox[®]CMP Plainsboro, Now York, USA) kontrolliert. Über die Geschwindigkeit des Wasserzulaufs wurde die gewünschte Temperatur von 4°C reguliert und konstant gehalten. Nach Beendigung der Therapie erfolgte die langsame Akklimatisierung der Tiere vor einer Rotlichtlampe (Sahuquillo et al., 2001; Schwab et al., 2001).

5.2.3 SnMP

Zinnmetalloporphyrin ([SnMP] Sn(IV) Mesoporphyrin IX dichloride, Frontier Scientific, Carnforth, Lancashire, United Kindom) wurde den Versuchstieren an 2 Zeitpunkten in einem Abstand von 24h zu gleichen Mengen intraperitoneal verabreicht. Am Tag nach der Kammerpräparation mit einem zeitlichen Abstand von 14-18h vor dem Weichteiltrauma erfolgte die 1. Injektion. Die 2. Medikamentengabe erfolgte am 1. Versuchstag nach Weichteiltrauma (s. Abb. 6), 24h nach der 1. Injektion. Den Tieren wurde jeweils 10mg/kg SnMP verabreicht, welches versetzt mit Dimethylsulfoxid ([DMSO], minimum 99,5% GC; Sigma-Aldrich[®], Chemie GmbH P.O., Steinheim, Deutschland) zu einem 10%igen Gemisch

verarbeitet und mit physiologischer Kochsalzlösung ([NaCl], B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zu einer 1%igen Lösung verdünnt worden war.

5.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Ein wichtiger Teil der Analyse der Mikrozirkulation wurde mit Hilfe der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt. Bei diesem Verfahren besteht die Möglichkeit der repetitiven, direkten Visualisierung verschiedener hämodynamischer Parameter. Die quantitative Auswertung erfolgte anschließend mit Hilfe eines speziellen Computerprogrammes (s. Kap. 5.4).

5.3.1 Fluoreszenzfarbstoffe

Die Darstellung einzelner Blutbestandteile erfolgte durch die Kontrastierung mit verschiedenen Farbstoffen, die den Tieren vor jeder Untersuchung im Verhältnis 1:1 in Kurznarkose über den retrobulbären Venenplexus injiziert wurden.

5.3.1.1 Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran 150000

Fluorescein-Isothiocyanat-Dextran 150000 ([FITC], Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ist ein Derivat von Fluorescein, das an ein hochmolekulares Dextran gekoppelt ist. Eine Extravasation unter physiologischen Bedingungen wird so verhindert. Diese Verbindung ermöglicht die Darstellung der Blutgefäße durch das Anfärben des Blutplasmas (s. Abb. 11A, B, D). Verabreicht wurde den Versuchstieren jeweils 0,07ml einer 5%-igen Lösung (in NaCl, Molekulargewicht [MG] 150000, Exzitationsmaximum 490nm, Emissionswellenlänge > 520nm). Der Farbstoff wird über Leber und Nieren metabolisiert und ausgeschieden.

5.3.1.2 Rhodamin-6G

Rhodamin-6G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ermöglicht die in-vivo Kontrastierung von Leukozyten, indem es an Cytochrom C in Leukozyten und Thrombozyten bindet (s. Abb. 11C). Die Tiere erhielten ebenfalls 0,07ml einer 0,1%-igen Lösung (in NaCl, MG 479, Exzitationsmaximum 530nm, Emissionswellenlänge > 590nm). Die Lösung wurde bis zum Gebrauch bei einer Temperatur von -20°C lichtgeschützt gelagert.

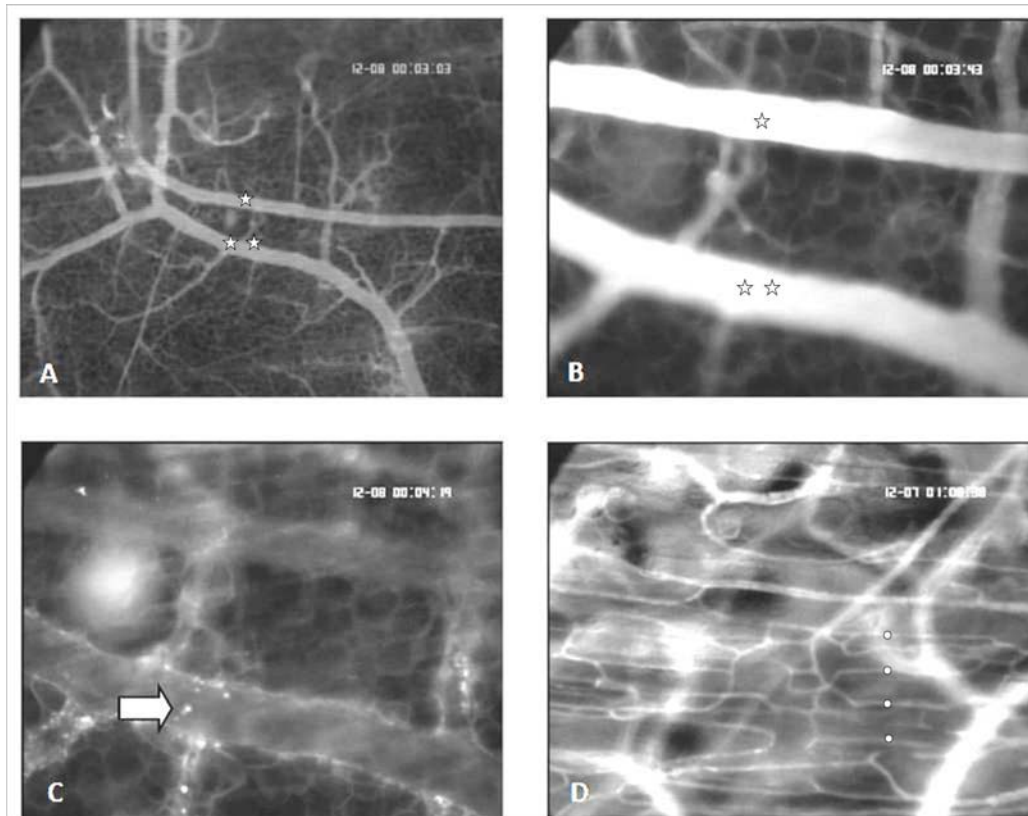


Abbildung 11: Intravitale Fluoreszenzmikroskopie eines arterio-venösen Bündels (A-C) sowie eines Kapillarfeldes (D) in einer Rückenhautkammer zum Zeitpunkt Baseline; A: Übersichtsaufnahme mit einem 5x Objektiv mit FITC-Dextran zur Darstellung der Gefäße (1 Sternchen: Arteriole, 2 Sternchen: Venole); B: dasselbe Bündel mit einem 20x Objektiv, Darstellung unter Verwendung eines Filterblockes mit den Wellenlängen 450-490nm (s. Kap. 5.3.2); C: Aufnahme desselben Bündels mit einem 20x Objektiv mit Rhodamin-6G unter Verwendung eines Filterblocks mit den Wellenlängen 530-560nm zur Darstellung der Leukozyten (Pfeil: Leukozyt; s. Kap. 5.3.2); D: Kapillarfeld in Blaulicht-Epi-Illumination, Aufnahme mit einem 20x Objektiv (Punkt: Kapillare; s. Kap. 5.3.2).

5.3.2 Mikroskopie

Nach erfolgter Anästhesie und Kontrastmittelgabe wurden die Tiere auf einer speziellen Plexiglasbühne in horizontaler Seitenlage mit dem Beobachtungsfeld nach oben positioniert und der Sprengring entfernt (s. *Abb. 12A*). Die Darstellung der Mikrozirkulation erfolgte mit Hilfe eines modifizierten Axiotech-Mikroskops (Axiotech Vario, Zeiss Werk Göttingen, Göttingen, Deutschland) mit Auf- und Durchlichteinrichtung (s. *Abb. 12B*). Für die Auflicht-Technik wurde eine 100W Quecksilberdampf-Lampe (HBO, 100W OFR, Osram, Augsburg, Deutschland) in einem speziellen Gehäuse für die Lichtquelle (FluoArc-BP/400.26A, FluoArc, Jena, Deutschland) verwendet. Zwei in den Strahlengang eingebrachte Filterblöcke ermöglichten eine Anregung mit Licht der Wellenlänge 450-490nm (Blaulicht-Epi-Illumination) und 530-560nm (Grünlicht-Epi-Illumination). Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden unter Verwendung eines FSA-Tubus-GW sowie eines Vario-Zooms (0.5, IQ-S, Pieper GmbH, Schwerte, Deutschland) mittels einer hochempfindlichen CCD [charge

coupled device]-Videokamera (Lichtempfindlichkeit 10^{-2} Lux, Prospektive Measurements, San Diego, California, USA) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern/s aufgenommen. Die Bilder wurden auf einen Bildschirm (Trinitron, KV-14CT1E, Sony, Tokyo, Japan) übertragen und parallel von einem DVD-Aufnahmegerät (DVD-R121, RAM-RW-R, Samsung, Seoul, Korea) registriert. Ein zwischen Videokamera und Bildschirm geschalteter Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A, Aston Broadcast Systems, Pangbourne, Großbritannien) diente zur gleichzeitigen Einblendung und Aufnahme sowohl der jeweiligen Versuchstiernummer und des Versuchstages als auch der Zeit in min, s, 1/10s und 1/100s. Für Übersichtsaufnahmen wurde ein 5x Objektiv (Numerische Apertur [n.a.]: 0.15, Plan-Neofluar, Zeiss, Jena, Deutschland) verwendet. Für Detailaufnahmen der Mikrozirkulation und Beobachtungen der inflammatorischen Parameter, die später computerassistent quantitativ ausgewertet wurden (s. Kap. 5.4), diente ein 20x Objektiv (n.a.: 0.40, LM PlanFI, Olympus, Tokyo, Japan).

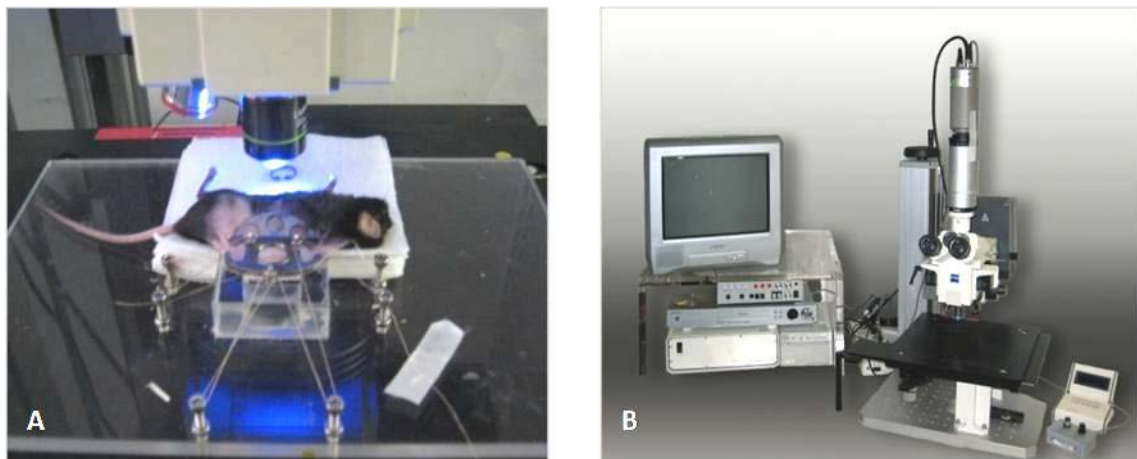


Abbildung 12: A: Positionierung des Tieres auf der Plexiglasbühne, Entfernung des Sprengtringes. Lichtquelle: Blaulicht-Epi-Illumination. B: Anordnung des Arbeitsplatzes der Intravitalmikroskopie [IVM].

5.4 Analyse der Mikrozirkulation

Jede Auswertung der mittels der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie aufgenommenen Bilder wurde ‚off-line‘ durchgeführt. Nach Beendigung der Mikroskopie erfolgte die Auswertung der mikrozirkulatorischen und inflammatorischen Parameter mit dem computerassistenten Bildverarbeitungssystem CapImage (Version 8,5, Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) durch Wiedergabe der jeweiligen DVD mittels eines DVD Video Recorders

(LQ-MD 800, Panasonic, Osaka, Japan). Dies reduzierte den Untersuchungszeitraum der Tiere und somit deren Belastung erheblich.

Bei der Bewertung der Kapillarfelder wurde eine repetitive Vorgehensweise berücksichtigt (s. *Abb. 11D*). Pro Beobachtungsfeld und Zeitpunkt wurden jeweils 6 Bereiche aufgenommen und nachfolgend computerassistent die folgenden Parameter bestimmt:

- *Funktionelle Kapillardichte*
- *Kapillärer Durchmesser*
- *Kapilläre Blutzellgeschwindigkeit*
- *Kapillärer volumetrischer Blutfluss*

In jeweils 3 arterio-venösen Bündeln pro Beobachtungsfeld wurden identische Gefäßabschnitte zum jeweiligen Versuchszeitpunkt für jeweils etwa 1min aufgezeichnet (s. *Abb. 11A-C*). Dies garantierte die Analyse identischer Gefäße zu den unterschiedlichen Zeitpunkten. Die folgenden Parameter wurden erhoben, um die Veränderungen im Verlauf der Versuchsperiode beurteilen zu können:

- *Arteriöler und venulärer Durchmesser*
- *Arteriöle und venuläre Blutzellgeschwindigkeit*
- *Arteriöler und venulärer volumetrischer Blutfluss*
- *Leukozyten-Endothelzell-Interaktion*

Alle Ergebnisse sind zur besseren Vergleichbarkeit in Prozent des Ausgangswertes angegeben. Eine Ausnahme bilden die Daten des Leukozytenfließverhaltens. Hier werden Absolutzahlen dargestellt.

Für die mikrohämodynamische Analyse erfolgte die Mikroskopie mit Blaulicht-Epi-Illumination. Zur Beurteilung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion erfolgte die Mikroskopie mit Grünlicht-Epi-Illumination.

5.4.1 Funktionelle Kapillardichte

Zur Analyse der funktionellen Kapillardichte wurden an jedem Versuchszeitpunkt 6 für die jeweilige Kammer repräsentative Gesichtsfelder ausgewählt und über 20s aufgenommen. Durch die Injektion von FITC-Dextran (5%, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) erfolgte die präzise Darstellung der Gefäße durch die visualisierten Fluoreszenzunterschiede zwischen Gefäßlumen und extravaskulärem Gewebe. Bei der Auswertung mittels CaplImage wurden

nur die Gefäße erfasst, die zu dem Aufnahmezeitpunkt mit Blutplasma perfundiert waren. Die funktionelle Kapillardichte wurde anhand der Gesamtlänge der markierten Gefäße pro Fläche des Beobachtungsfeldes in cm/cm^2 errechnet.

5.4.2 Kapillärer Durchmesser

Hierbei wurde in der Mitte des Beobachtungsfeldes eine durchgängige Kapillare ausgewählt und im Standbildmodus eine zum Gefäßverlauf senkrechte Strecke zwischen 2 Punkten gezogen, die auf den gegenüberliegenden Wänden des zu messenden Gefäßes lagen. Aufgrund der deutlich kleineren Durchmesser im Vergleich zu den arterio-venösen Bündeln wurde zur Präzisierung des Messwertes an derselben Stelle mit Hilfe der Programme des Caplimages 6 mal die Streckendistanz erhoben und anschließend der Mittelwert bestimmt. Dies erfolgte zu jedem Untersuchungszeitpunkt in 6 verschiedenen Gesichtsfeldern der jeweiligen Kammer.

5.4.3 Kapilläre Blutzellgeschwindigkeit

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit wurde mit Hilfe der Line-Shift-Diagramm-Methode (Version 8.5, Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) anhand der Bewegungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen quantifiziert. Dabei wurde entlang der Flussrichtung innerhalb der Gefäße, in denen vorher der Durchmesser bestimmt worden war, eine Messlinie zentral im Gefäßlumen positioniert und anschließend die Aufzeichnung über 10s abgespielt. Während dieses Zeitraumes wird für jedes Halbbild entlang der Messlinie ein Grauwertprofil erstellt und in einem Bildspeicher aufgezeichnet. Daraus erzeugt das Programm ein sogenanntes ‚Line-Shift-Diagramm‘, das von der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes der einzelnen Blutbestandteile abhängig ist. Aus der Steigung dieser Linien errechnet sich die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten bzw. des Blutplasmas in $\mu\text{m}/\text{s}$.

5.4.4 Kapillärer volumetrischer Blutfluss

Für die Berechnung des volumetrischen Blutflusses wird die Blutzellgeschwindigkeit mit der Querschnittsfläche des Gefäßes multipliziert. Dabei wurden in dieser Studie eine zylindrische Gefäßgeometrie und ein parabolisches Geschwindigkeitsprofil innerhalb der Gefäße zugrunde gelegt. Um die geringeren Randgeschwindigkeiten im Vergleich zum Zentralstrom berücksichtigen zu können, wurde ein Korrekturfaktor verwendet (Baker und Wayland, 1974).

$$\text{Mikrovaskulärer Blutfluss} = \pi \times (d/2)^2 \times v/K \text{ [pl/s]}$$

wobei die Variablen **d** für den Durchmesser des Einzelgefäßes und **v** für die gemessene Blutzellgeschwindigkeit im Zentralstrom sowie **K** für den Proportionalitätsfaktor nach Lipowsky stehen. Für die Berechnung des kapillären segmentalen Blutflusses wurde ein Faktor von 1,3 verwendet (Lipowsky et al., 1978).

5.4.5 Arteriöler und venulärer Durchmesser

Hierbei wurde eines der 3 ausgewählten Gefäßbündel in der Mitte des Beobachtungsfeldes eingestellt und in jedem der beiden Gefäße im Standbildmodus eine zum Gefäßverlauf senkrechte Strecke zwischen 2 Punkten gezogen, die auf den gegenüberliegenden Wänden des zu messenden Gefäßes lagen. Die Streckendistanz wurde für jedes Gefäß 3 mal erhoben und daraus der Mittelwert gebildet. Dazu wurde zu jedem Untersuchungszeitpunkt dieselbe Stelle auf den jeweils 3 bei der BL-Mikroskopie festgelegten arterio-venösen Bündeln einer Kammer gewählt.

5.4.6 Arteriöle und venuläre Blutzellgeschwindigkeit

Die Messung der Blutzellgeschwindigkeit wurde mit Hilfe der ‚Line-Shift-Diagramm-Methode‘ (Version 8.5, Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) anhand der Bewegungsgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen quantifiziert. Es wurden dieselben Gefäße zur Messung der Blutzellgeschwindigkeit herangezogen wie bei der Messung des Durchmessers. Die Position entsprach erneut derjenigen der Durchmesserbestimmung. Eine Messlinie wurde zentral im Gefäßlumen positioniert und anschließend die Aufzeichnung über 10 Sekunden abgespielt. Während dieses Zeitraumes wird für jedes Halbbild entlang der Messlinie ein Grauwertprofil erstellt und in einem Bildspeicher aufgezeichnet. Daraus erzeugt das Programm ein sogenanntes ‚Line-Shift-Diagramm‘, das von der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes der einzelnen Blutbestandteile abhängig ist. Aus der Steigung dieser Linien errechnet sich die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten bzw. des Blutplasmas in $\mu\text{m/s}$.

5.4.7 Arteriöler und venöler volumetrischer Blutfluss

Die Berechnung des arteriölen und venölen volumetrischen Blutflusses entspricht derjenigen des kapillären Blutflusses (s. Kap. 5.4.4), wobei hier ein Proportionalitätsfaktor von 1,6 (Baker und Wayland, 1974) verwendet wurde.

5.4.8 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Durch die Applikation des Farbstoffes Rhodamin-6G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) erfolgte die Anfärbung der weißen Blutkörperchen. Dies ermöglichte die intravitalmikroskopische Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion innerhalb der jeweils 3 bekannten arterio-venösen Bündel pro Kammer. Diese wurden über 30s durch einen Filter mit Grünlicht-Epiillumination mikroskopiert und aufgenommen. Mit Hilfe des computerassistierten Bildverarbeitungssystems CapImage (Version 8.5, Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland) wurden die Leukozyten innerhalb eines annähernd geraden, 100µm langen Abschnittes ausgewertet, in dessen Mitte sich in etwa die Stelle des vorher bestimmten Durchmessers befand. Dabei wurde zwischen frei fließenden, rollenden und adhärenen Leukozyten unterschieden. In dieser Studie wurden rollende und adhärenente Leukozyten bestimmt.

Roller sind durch eine Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit unter $\frac{2}{5}$ des Zentralstroms aufgrund Margination und kurzzeitigem Endothelkontakt gekennzeichnet. Ihre Anzahl wurde innerhalb von 30s auf Höhe des vorher gemessenen Gefäßdurchmessers in Arteriolen und Venolen bestimmt.

Die quantitative Analyse der adhärenen Leukozyten erfolgte innerhalb der venölen Gefäße. Sie wurden über die Adhärenzdauer innerhalb von 30s auf einer bestimmten Endotheloberfläche in mm² - hier über eine Länge von 100µm, wobei die Stelle der Durchmesserbestimmung nach Möglichkeit mittig lag - nach der Formel

$$\text{Leukozytenadhärenz} = n \times 10^6 / (d \times \pi \times l)$$

definiert. Dabei ist **n** die Anzahl adhärenen Leukozyten und **d** der Durchmesser des Gefäßes sowie **l** die Länge des analysierten Gefäßabschnittes.

5.5 Immunhistologie und Histochemie

Nach letzter erfolgter Mikroskopie 120h nach Trauma erfolgte in dieser Studie die Fixierung der von den Empfängertieren exzidierten Rückenhautkammer-Präparationen der jeweiligen Versuchsreihen in 4%-iger Formaldehyd-Lösung.

Mit Hilfe dieses Verfahrens war es möglich, die mit der Wundheilung einhergehende zelluläre Apoptoserate sowie die Entzündungsreaktion innerhalb des Kammergewebes weiterführend zu untersuchen. Bei diesem Versuchsteil wurden ohne Ausnahme immunhistologische und histochemische Präparate hergestellt. Alle Schnitte wurden anschließend lichtmikroskopisch beurteilt (40x, Olympus BX60, Hamburg, Deutschland).

5.5.1 Immunhistologie

Das gewonnene Gewebematerial wurde in 4%-iger Formaldehydlösung bei 20°C für 24h fixiert. Nach Einbettung in Paraffin erfolgte die Anfertigung von Serienschnitten mit einer Schnittdicke von 5µm.

Für den immunhistologischen Nachweis von apoptotischen Zellen im Untersuchungsgebiet wurde eine Caspase-3 Färbung durchgeführt. Als Primärantikörper wurde ein polyklonaler cleaved Caspase-3 Antikörper von Kaninchen (1:100, New England Biolabs, Frankfurt, Deutschland) verwendet. Ein meerrettichperoxidasemarkierter Ziege-Anti-Kaninchen Antikörper (1:100, Dianova, Hamburg, Deutschland) wurde als Sekundärantikörper gewählt. Als Chromogen zum Nachweis der Antigen-Antikörperreaktion diente 3.3' Diaminobenzidin. Für die Negativ-Kontrollen wurden die Präparate ohne Anwendung des Primärantikörpers behandelt. Alle Kontrollfärbungen waren negativ. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalau nach Mayer (s. Abb. 13A).

Nach Beendigung der immunhistologischen Aufbereitung erfolgte die Übersichtsaufnahme mit einem 20x Objektiv (Olympus BX60, Hamburg, Deutschland). Die Auszählung aller Caspase-3-positiven Zellen in 25 Gesichtsfeldern pro Tier wurde mit einem 40x Objektiv (Olympus BX60, Hamburg, Deutschland) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte mit Excel und die Statistik wurde mit den Programmen ‚SigmaStat‘ 2,03 und ‚SigmaPlot‘ 11,0 (Jandel Corporation, San Rafael, Californien, USA) durchgeführt.

5.5.2 Histochemie

Entsprechend des Ablaufes bei der Immunhistologie erfolgte die Fixierung des exzidierten Rückenhautkammer-Materials in Formaldehyd und die Erstellung von Paraffinschnitten.

In der vorliegenden Studie wurde die Naphthol AS-D Chloracetatesterase [CAE] verwendet. Die CAE ist ein spezifisches Enzym, das eine hohe Aktivität und somit starke Färbereigenschaft in Mastzellen, in Promyelozyten und neutrophilen Granulozyten zeigt, jedoch keine oder nur eine geringe Aktivität in Lymphozyten, Plasmazellen, Monozyten und basophilen Granulozyten aufweist (Yam et al., 1971).

Nach Inkubation der Schnitte in einer aus Dimethylformamid (Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland), Naphtol (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Deutschland), Pararosanilin (4%, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) und Natrium-Nitrit (4%, Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland) bestehenden Lösung erfolgte die Kernfärbung in Hämatoxilin nach Böhmer (s. Abb. 13B).

Nach Fertigstellung der gefärbten Schnitte erfolgte eine Übersichtsaufnahme mit einem 20x Objektiv (Olympus BX60, Hamburg, Deutschland). Alle CAE-positiven Zellen wurden innerhalb 25 Gesichtsfeldern pro Schnitt mittels eines 40x Objektivs (Olympus BX60, Hamburg, Deutschland) gezählt und das Ergebnis ausgewertet [n/HPF].

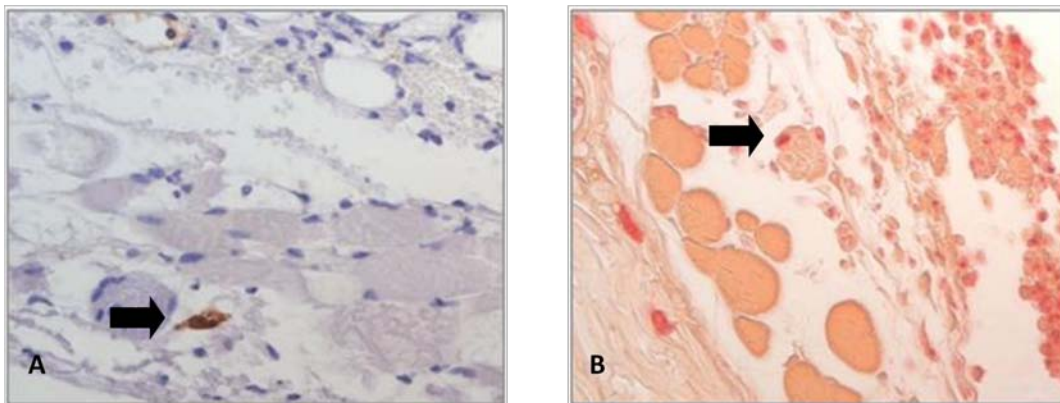


Abbildung 13: Jeweils eines von 25 Gesichtsfeldern einer histologischen Kammerpräparation mit Caspase-3- (s. Abb. 13A) und CAE-Färbung (s. Abb. 13B). Aufnahme mit einem 40x Objektiv. Die Pfeile markieren jeweils eine gefärbte Zelle.

5.6 Statistik

Die primäre Datenerfassung erfolgte während der Auswertung der Aufzeichnungen auf Erhebungsbögen. Zur elektronischen Datenverarbeitung wurde im folgenden Schritt ein Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft Corporation, Unterschleißheim, Deutschland) verwendet. Die statistische Auswertung und graphische Darstellung erfolgte mit den Programmen ‚SigmaStat‘ 2,03 und ‚SigmaPlot‘ 11,0 (Jandel Corporation, San Rafael, Californien, USA).

Sämtliche Daten sind als Mittelwert [MW] mit Standardfehler des Mittelwerts [MW ± SEM] angegeben. Der MW der einzelnen mikrozirkulatorischen Parameter an den jeweiligen Untersuchungstagen errechnet sich aus der Anzahl der Tiere innerhalb einer Gruppe.

Wenn normal verteilte Daten vorlagen, erfolgte der Vergleich der Werte der jeweiligen Versuchszeitpunkte zwischen 2 Gruppen mit Hilfe des ‚t-Testes‘ für den unverbundenen Paarvergleich. Bei nicht normal verteilten Daten wurde mit dem ‚Mann-Whitney Rank Sum Test‘ geprüft.

Bei mehr als zwei Gruppen kam eine ‚One way analysis of variance‘ [ANOVA] gefolgt von dem unverbundenen Paarvergleich mit dem ‚Student-Newman-Keuls-Test‘ zum Einsatz.

Für Intragruppenvergleiche mit normal verteilten Daten wurde zunächst eine ANOVA für verbundene Stichproben, gefolgt von einem ‚post hoc Bonferroni t-Test‘ herangezogen. Die Ausgangswerte [BL] dienten als Referenz. Dies ist ein etablierter Test für Mehrfachvergleiche. Alternativ wurde bei fehlender Normalverteilung die Analyse mit einer ‚ANOVA on Ranks‘ durchgeführt.

Als Signifikanzniveau wurde ein p-Wert von <0,05 festgelegt.

6. Ergebnisse

6.1 Trauma

Zunächst sollte aufgezeigt werden, welcher Schaden durch das ‚weight-drop device‘ in der Rückenhautkammer hervorgerufen wurde.

6.1.1 Kapilläre Perfusion

Nach der Traumatisierung des Gewebes war eine signifikante Verminderung der *funktionellen Kapillardichte* nach 8h und 24h gegenüber der Sham-Gruppe erkennbar (s. Abb. 14A). In der Trauma-Gruppe fielen ebenfalls signifikante Unterschiede nach 8h, 24h und 72h gegenüber dem Ausgangswert auf. Nach 120h entsprachen die Werte in beiden Gruppen in etwa den Ausgangswerten: in der Trauma-Gruppe lagen sie leicht unter und in der Sham-Gruppe leicht über dem Ausgangsniveau.

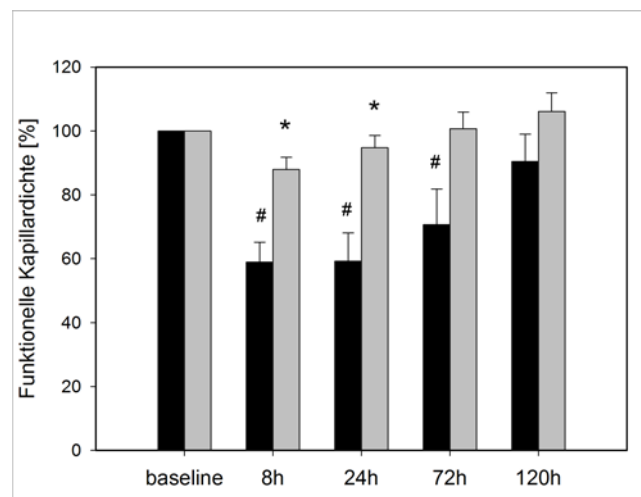


Abbildung 14A: Funktionelle Kapillardichte des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhautkammern der Sham-Gruppe (□) dienten als Kontrolle; MW±SEM; *p<0,05 vs. Trauma; #p<0,05 vs. Baseline.

Der *kapilläre Gefäßdurchmesser* war nach Trauma leicht vermindert (s. Abb. 14B). Diese Reduktion blieb an allen Meßzeitpunkten bestehen. Eine signifikante Vasokonstriktion gegenüber dem Ausgangswert wurde nach 8h und 120h objektiviert. In der Sham-Gruppe zeigte sich eine leichte Vasodilatation nach 8h.

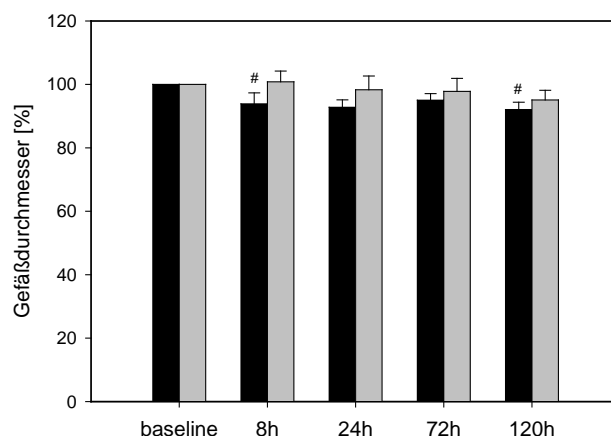


Abbildung 14B: Kapillärer Gefäßdurchmesser des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhautkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Die kapilläre Blutzellgeschwindigkeit wurde durch das Trauma nach 8h und 24h signifikant gegenüber dem Ausgangswert und der Sham-Gruppe vermindert (s. Abb. 14C). In der Sham-Gruppe fiel eine leichte Verminderung der Blutzellgeschwindigkeit nach 8h auf. 72h nach Applikation des Traumas war die Fließgeschwindigkeit in der Trauma-Gruppe noch vermindert, nach 120h allerdings konnten zur Sham-Gruppe vergleichbare Werte bestimmt werden.

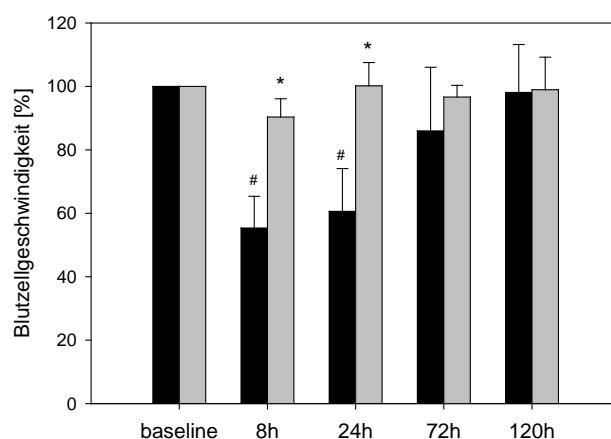


Abbildung 14C: Kapilläre Blutzellgeschwindigkeit des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhautkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Der kapilläre volumetrische Blutfluss errechnete sich aus den Werten der kapillären Querschnittsfläche und der Blutzellgeschwindigkeit. Seine Analyse ergab eine ausgeprägte, signifikante Reduktion der Werte der Trauma-Gruppe gegenüber dem Ausgangswert 8h und

24h nach Trauma-Applikation (s. *Abb. 14D*). Im Vergleich zur Sham-Gruppe ergab sich eine Signifikanz nach 24h. Nach 120h war noch keine vollständige Erholung von dem Weichteilschaden erkennbar.

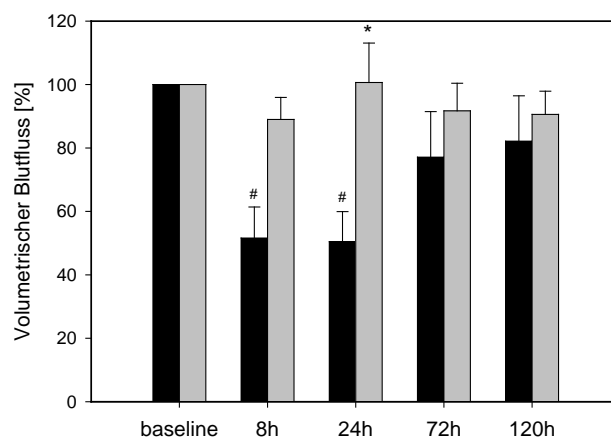


Abbildung 14D: Kapillärer volumetrischer Blutfluss des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhautkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

24h nach Trauma waren die petechialen Blutungen gut erkennbar und wurden 72h nach Trauma zum Teil resorbiert (s. *Abb. 14E und F*). Dies wurde in diesem Versuch nicht quantifiziert und wird hier zur besseren Anschaulichkeit demonstriert.

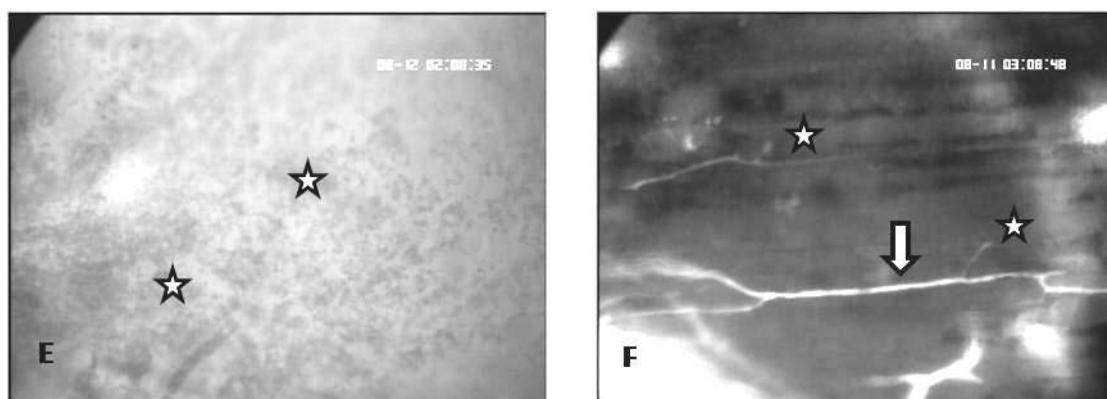


Abbildung 14E: Aufnahme mit einem 20x Objektiv 24h nach Trauma; Extravasation von Erythrozyten in das Gewebe, die als petechiale Einblutungen imponieren (Sternchen); **F:** Aufnahme mit einem 20x Objektiv 72h nach Trauma; deutliches Hämatom (Sternchen) mit einzelnen perfundierten Kapillaren (Pfeil).

6.1.2 Arteriöläre Mikrohämodynamik

Der arteriöläre Gefäßdurchmesser war nach Applikation des Traumas geringfügig vermindert und verblieb bis 120h unter dem Ausgangswert (s. Abb. 15A). In der Sham-Gruppe konnte eine leichte Dilatation der Arteriolen beobachtet werden. Dies führte zu einem signifikanten Unterschied zwischen den beiden Gruppen nach 8h.

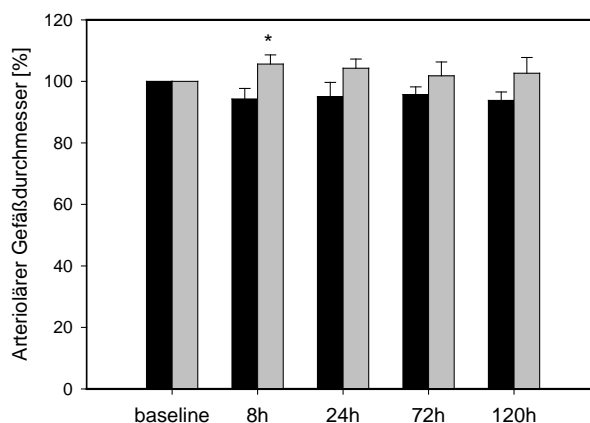


Abbildung 15A: Arteriölärer Gefäßdurchmesser des quergestreiften Muskels der Rückenhaultkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhaultkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma.

Die arteriöläre Blutzellgeschwindigkeit wurde durch das Weichteiltrauma stark beeinflusst (s. Abb. 15B). 8h nach Trauma war die Geschwindigkeit in der Trauma-Gruppe auf die Hälfte reduziert und somit signifikant gegenüber der Vergleichsgruppe gesenkt. Dabei war die Geschwindigkeit in der Sham-Gruppe 8h nach Deckglasanhebung ebenfalls leicht vermindert. Nach 8h und nach 24h waren die Werte in der Trauma-Gruppe signifikant gegenüber dem

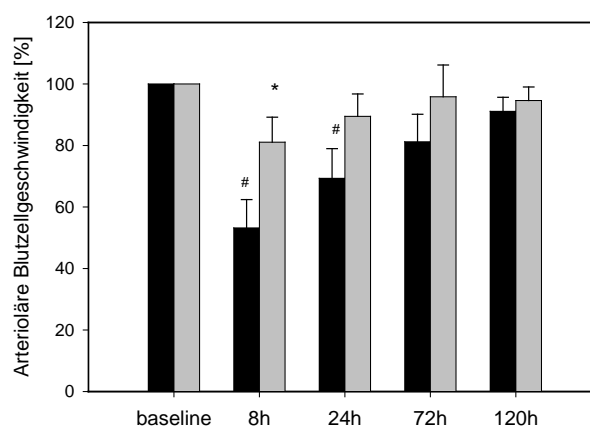


Abbildung 15B: Arteriöläre Blutzellgeschwindigkeit des quergestreiften Muskels der Rückenhaultkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhaultkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Ausgangswert gesenkt. In der Trauma-Gruppe näherten sich die Werte nach 120h dem Ausgangsniveau. Die Erholung in der Sham-Gruppe war nach 72h schon fast vollständig.

Der *arterioläre volumetrische Blutfluss* errechnete sich aus den Werten der arteriolären Querschnittsfläche und der Blutzellgeschwindigkeit (s. Abb. 15C). Es imponierte ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen 8h nach Trauma, wobei der Blutfluss der Sham-Gruppe ebenfalls um etwa 10% vermindert war. 8h und 24h nach Trauma waren die Werte der Trauma-Gruppe signifikant zu dem Ausgangswert vermindert. Bis 120h nach Trauma konnten sie sich nicht vollständig erholen und blieben circa 20% unter dem Ausgangsniveau.

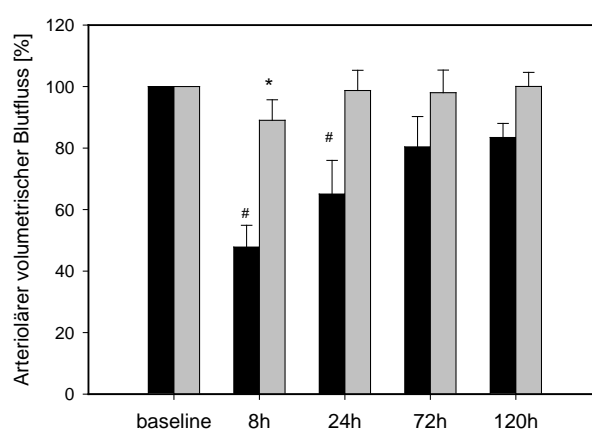


Abbildung 15C: Arteriolarer volumetrischer Blutfluss des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhautkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

6.1.3 Venuläre Mikrohämodynamik

Die Analyse der *venulären Gefäßdurchmesser* ergab in beiden Gruppen keine signifikanten Unterschiede (s. Abb. 16A). Zu allen Versuchszeitpunkten wurden annähernd die Ausgangswerte gemessen.

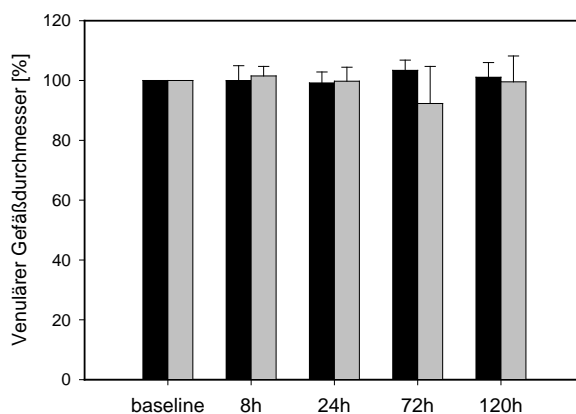


Abbildung 16A: Venulärer Gefäßdurchmesser des quergestreiften Muskels der Rückenhaultkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhaultkammern der Sham-Gruppe (□) dienten als Kontrolle; $MW \pm SEM$.

Die venuläre Blutzellgeschwindigkeit war 8h und 24h nach Weichteiltrauma um etwa 20% gesenkt (s. Abb. 16B). Nach 72h erreichte sie wieder das Niveau der Ausgangswerte. Bei den Tieren der Vergleichsgruppe konnte eine erhöhte Blutzellgeschwindigkeit 24h nach Deckglasanhebung gemessen werden, die sich nach 120h wieder an das Ausgangsniveau angleich.

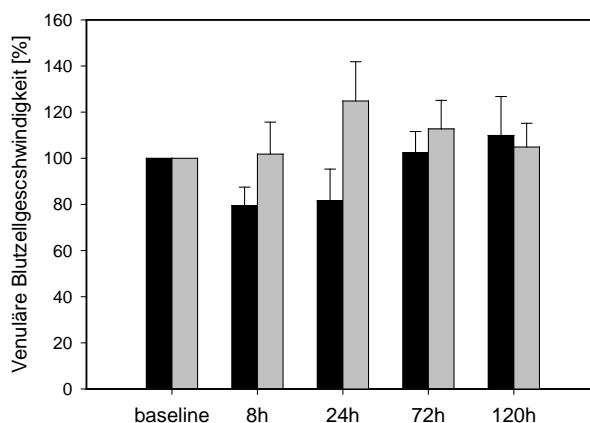


Abbildung 16B: Venuläre Blutzellgeschwindigkeit des quergestreiften Muskels der Rückenhaultkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhaultkammern der Sham-Gruppe (□) dienten als Kontrolle; $MW \pm SEM$.

Der venuläre volumetrische Blutfluss errechnete sich aus den Werten der venulären Querschnittsfläche und der Blutzellgeschwindigkeit (s. Abb. 16C). Nach 8h und 24h war ein Abfall des volumetrischen Blutflusses in der Trauma-Gruppe zu verzeichnen. 72h und 120h nach Trauma erfolgte eine überschießende Reaktion. In der Sham-Gruppe stieg der

volumetrische Blutfluss bis 24h nach Deckglasmanipulation an und normalisierte sich dann wieder.

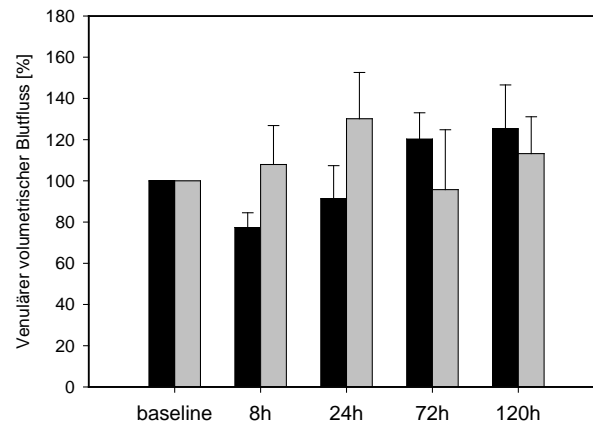


Abbildung 16C: Venulärer volumetrischer Blutfluss des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhautkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$.

6.1.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Zur besseren Vergleichbarkeit wurden alle Daten bzgl. der weißen Blutkörperchen in Absolutzahlen erhoben.

Die Anzahl der *arteriolären rollenden Leukozyten/Minute* stieg nach Weichteiltrauma an. Dabei ist zu berücksichtigen, dass sich die Ausgangswerte schon signifikant unterschieden (s. Abb. 17A). Das Maximum des Anstieges wurde 24h nach Trauma-Applikation erreicht. Dieser Wert war signifikant zur Vergleichsgruppe erhöht. Nach 72h war die Anzahl der rollen-

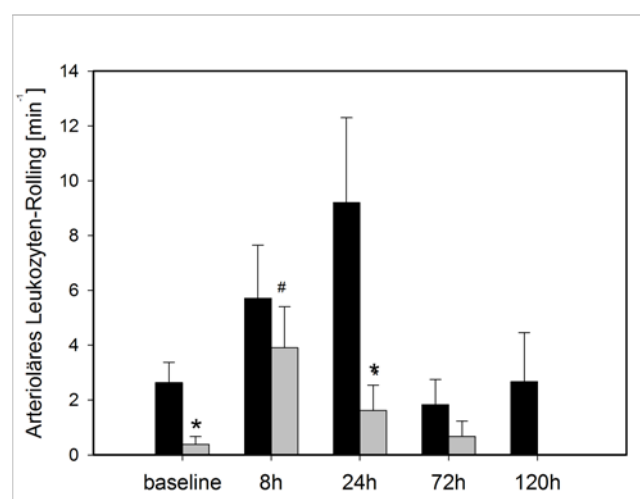


Abbildung 17A: Arterioläres Leukozyten-Rolling des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhautkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

den Leukozyten der Trauma-Gruppe wieder vergleichbar mit dem Ausgangswert. In der Sham-Gruppe waren die arteriolären rollenden Leukozyten nach 8h signifikant gegenüber dem Ausgangsniveau erhöht und fielen dann bis 120h nach Deckglasmanipulation bis auf 0 ab.

Die Ausgangswerte der *venulären rollenden Leukozyten/Minute* beider Gruppen waren in etwa vergleichbar (s. Abb. 17B). Die venulären rollenden Leukozyten stiegen bis 24h nach Weichteiltrauma an und waren nach 8h und 24h signifikant gegenüber dem Ausgangswert erhöht. In der Sham-Gruppe stiegen die rollenden Leukozyten bis 8h nach Deckglas-Anhebung an. Nach 72h wurden in der Sham-Gruppe wieder Werte im Ausgangsbereich gemessen, nach 120h ebenfalls in der Trauma-Gruppe.

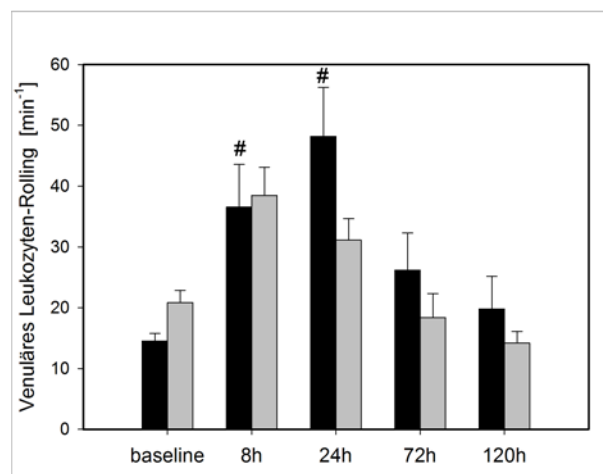


Abbildung 17B: Venuläres Leukozyten-Rolling des quergestreiften Muskels der Rückenhaultkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhaultkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$; [#] $p < 0,05$ vs. Baseline.

Die Analyse der *venulären Leukozyten-Adhärenz/Fläche* zeigte einen gegenüber dem Ausgangswert signifikanten Anstieg 8h nach Trauma (s. Abb. 17C). Nach 8h wurde ein fast ebenso ausgeprägter Anstieg der Leukozyten-Adhärenz nach Anheben des Deckglases beobachtet, der gegenüber dem Ausgangswert signifikant war. Danach konnte ein schnellerer Rückgang der adhärennten Leukozyten in der Sham-Gruppe beobachtet werden. Der Wert lag nach 72h auf dem Ausgangsniveau. Nach 120h waren die Werte in beiden Gruppen fast identisch und glichen auch in der Trauma-Gruppe dem Ausgangswert.

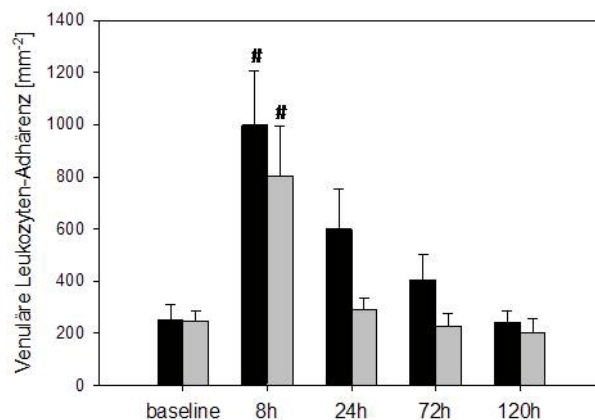
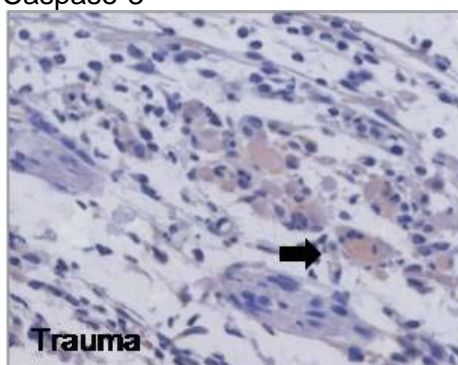


Abbildung 17C: Venuläre Leukozyten-Adhärenz des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhautkammern der Sham-Gruppe (□) dienten als Kontrolle; $MW \pm SEM$; [#] $p < 0,05$ vs. Baseline.

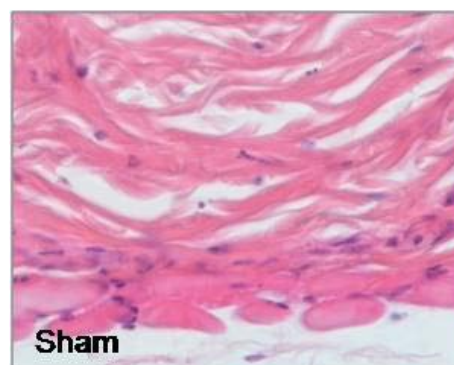
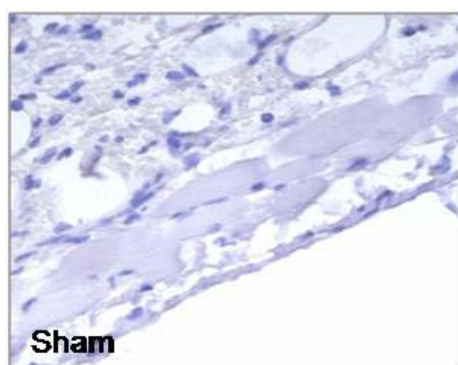
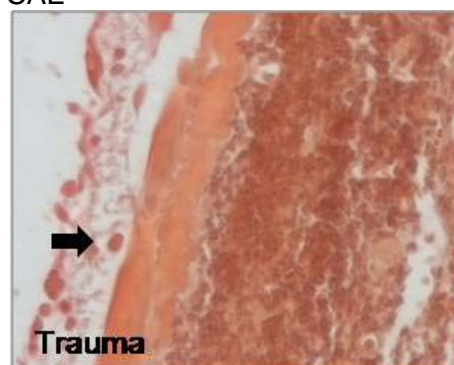
6.1.5 Histologie

Die histologischen Kontrollen der Apoptose und der Leukozyteninfiltration nach 120h ergaben keine signifikanten Unterschiede, zeigten aber bei beiden Parametern eine geringere Anzahl in der Sham-Gruppe (s. Abb. 18).

Caspase-3



CAE



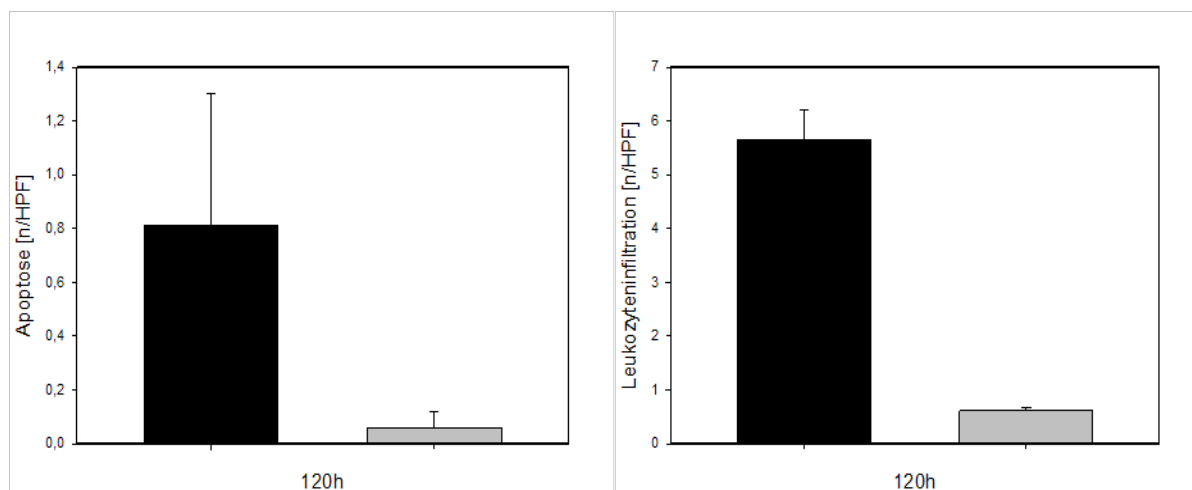


Abbildung 18: Jeweils eines von 25 Gesichtsfeldern einer histologischen Kammerpräparation mit Caspase3- und CAE-Färbung. Aufnahme mit einem 40x Objektiv. Die Pfeile markieren jeweils eine gefärbte Zelle.

Apoptose und Leukozyteninfiltration 120h nach stumpfem Trauma (■). Rückenhautkammern der Sham-Gruppe (□) dienen als Kontrolle; $MW \pm SEM$.

6.2 Trauma und Aprotinin

In diesem Versuch sollte geklärt werden, ob eine Behandlung mit Aprotinin die mikrovaskulären Schäden und die Entzündung nach Trauma vermindern kann.

6.2.1 Kapilläre Perfusion

Die zusätzliche Aprotinin-Behandlung konnte die initiale Reduktion der *funktionellen Kapillardichte* nach Trauma nicht verhindern (s. Abb. 19A). Es zeigte sich allerdings eine schnellere Erholung nach 72h. Nach 120h wurden die Ausgangswerte nicht vollständig erreicht.

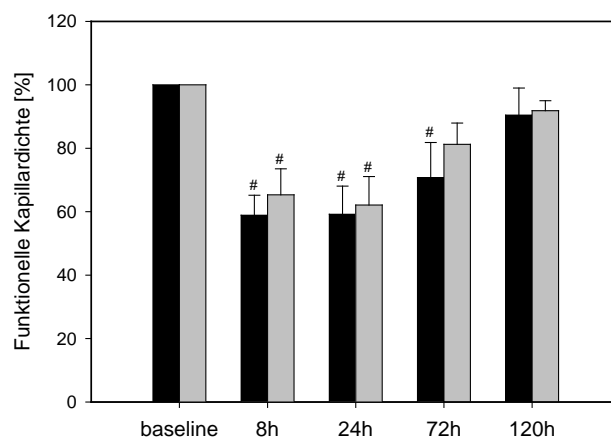


Abbildung 19A: Funktionelle Kapillardichte des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); $MW \pm SEM$; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Die *kapillären Gefäßdurchmesser* der mit Aprotinin behandelten Tiere waren an den Zeitpunkten 8h, 24h und 72h signifikant gegenüber den Tieren erweitert, die keine Behandlung erhalten hatten (s. *Abb. 19B*). Nach 120h konnte bei den mit Aprotinin behandelten Tieren eine Annäherung an den Ausgangswert beobachtet werden.

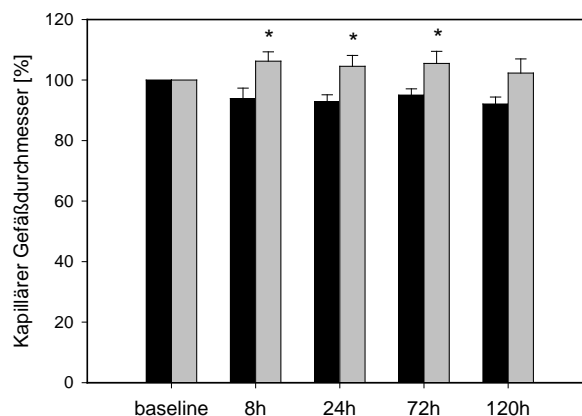


Abbildung 19B: Kapillärer Gefäßdurchmesser des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma.

Die *kapilläre Blutzellgeschwindigkeit* war 8h nach Trauma in beiden Gruppen auf etwa die Hälfte des Ausgangswertes reduziert (s. *Abb. 19C*). Im weiteren Verlauf regenerierte sich die kapilläre Fließgeschwindigkeit in der Trauma+Aprotinin-Gruppe schneller, so dass nach 72h annähernd wieder der Ausgangswert erzielt wurde. Dies konnte bei den Tieren der Trauma-Gruppe erst nach 120h erreicht werden. In der Behandlungsgruppe wurde zu diesem Zeitpunkt eine Hyperperfusion beobachtet.

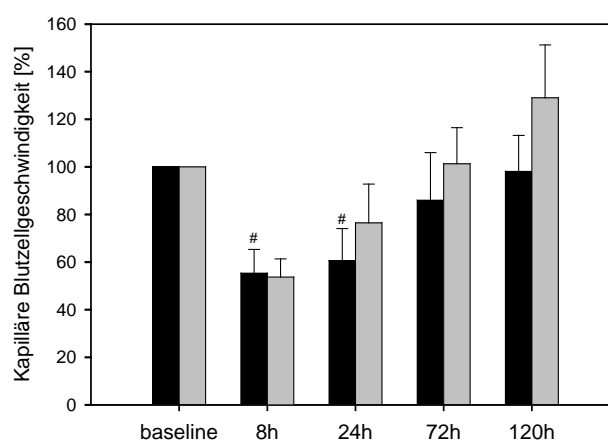


Abbildung 19C: Kapilläre Blutzellgeschwindigkeit des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); $MW \pm SEM$; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Durch Aprotinin konnte der signifikante Abfall des *kapillären volumetrischen Blutflusses* nach 8h und 24h vermindert werden (s. Abb. 19D). Es imponierte eine signifikante Hyperperfusion in der Behandlungsgruppe nach 72h und 120h, während die Werte der Trauma-Gruppe noch unter dem Ausgangsniveau blieben.

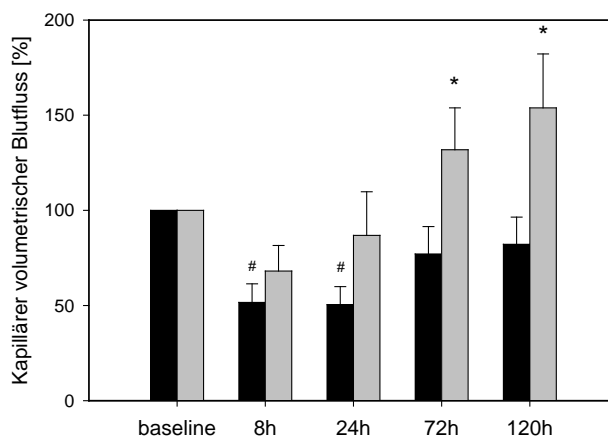


Abbildung 19D: Kapillärer volumetrischer Blutfluss des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); MW±SEM; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

6.2.2 Arteriöläre Mikrohämodynamik

8h nach Trauma wurden in der Trauma+Aprotinin-Gruppe reduzierte *arteriöläre Gefäßdurchmesser* gemessen (s. Abb. 20A). Nach 24h lag der Wert signifikant unter dem Ausgangsniveau. Nach 72h wurden in beiden Gruppen vergleichbare Werte erreicht, die noch nicht ganz den Ausgangswerten entsprachen.

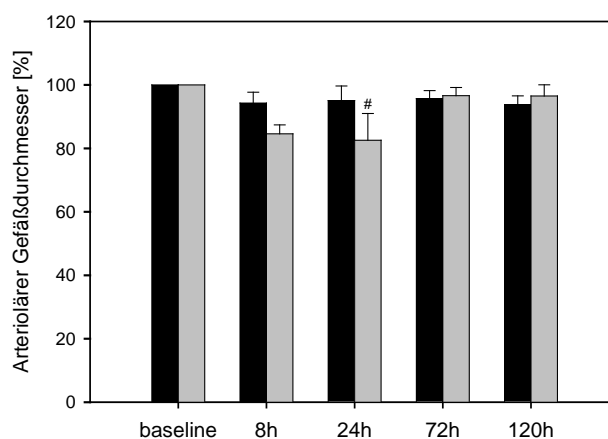


Abbildung 20A: Arteriölärer Gefäßdurchmesser des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); MW±SEM; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Die signifikante Verringerung der arteriölen *Blutzellgeschwindigkeit* auf etwa die Hälfte der Ausgangswerte nach 8h konnte durch Aprotinin nicht verhindert werden (s. *Abb. 20B*). Die Erholung erfolgte in beiden Gruppen nur langsam, so dass auch nach 120h das Ausgangsniveau nicht erreicht wurde.

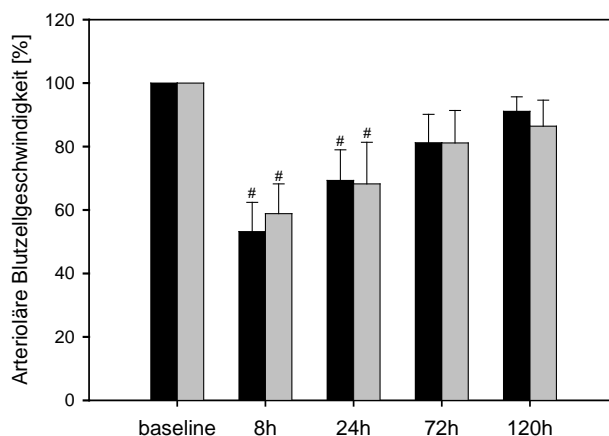


Abbildung 20B: Arteriöle Blutzellgeschwindigkeit des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); [#] $p < 0,05$ vs. Baseline.

Der arteriöle volumetrische *Blutfluss* konnte durch die Aprotinin-Gabe nicht verbessert werden (s. *Abb. 20C*). Es zeigte sich nach 8h ein signifikanter Abfall auf knapp die Hälfte der Ausgangswerte in beiden Gruppen. 24h nach Trauma lag die Verminderung des Blutflusses immer noch signifikant unter dem Ausgangsniveau. Nach 120h lagen die Werte in beiden Gruppen noch ca. 15% unter den Ausgangswerten.

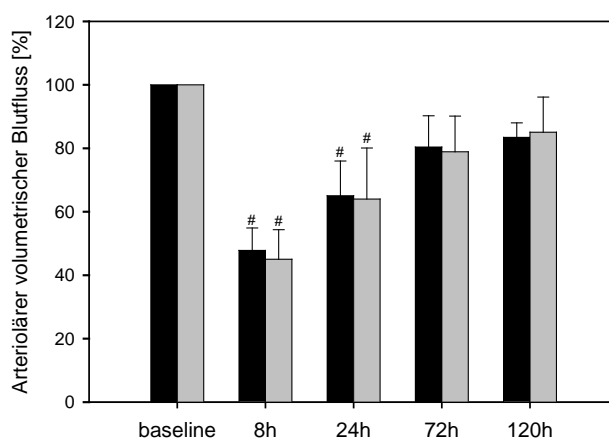


Abbildung 20C: Arteriöler volumetrischer Blutfluss des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); $MW \pm SEM$; [#] $p < 0,05$ vs. Baseline.

6.2.3 Venuläre Mikrohämodynamik

Die Aprotinin-Behandlung bewirkte nach 8h eine signifikante Reduktion des *venulären Gefäßdurchmessers* gegenüber der Trauma-Gruppe (s. Abb. 21A). Nach 72h kam es in der Trauma+Aprotinin-Gruppe zu einer Vasodilatation, die nach 120h gegenüber dem Ausgangswert signifikant war.

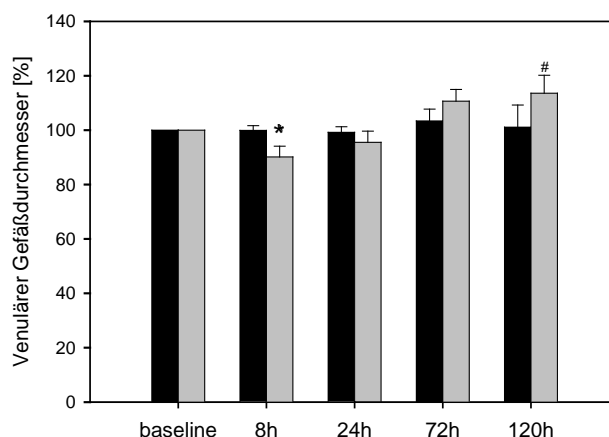


Abbildung 21A: Venulärer Gefäßdurchmesser des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Die *venuläre Blutzellgeschwindigkeit* wurde durch die Aprotinin-Gabe nach 8h signifikant gegenüber der Kontrollgruppe und gegenüber dem Ausgangswert vermindert (s. Abb. 21B). Die Erholung in der Trauma+Aprotinin-Gruppe erfolgte langsamer. Zwischen 72h und 120h blieb die Fließgeschwindigkeit stationär und somit unter dem Ausgangsniveau. In der Trauma-Gruppe wurde eine höhere Fließgeschwindigkeit als zum Ausgangszeitpunkt gemessen, auch wenn dieser Unterschied nicht signifikant war.

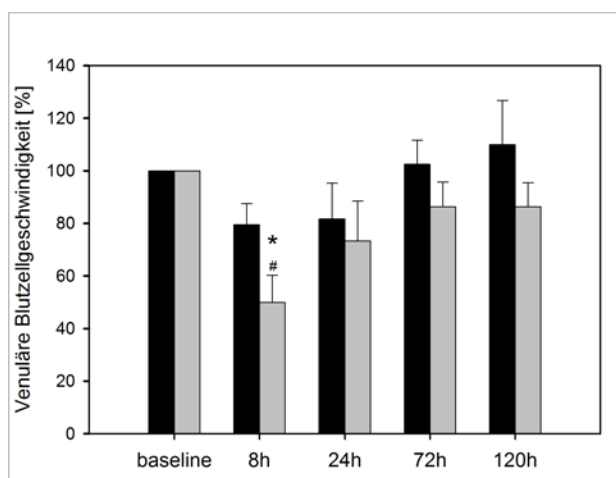


Abbildung 21B: Venuläre Blutzellgeschwindigkeit des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Die Werte des *venulären volumetrischen Blutflusses* der Trauma+Aprotinin-Gruppe lagen nach 8h signifikant unter den Werten der Trauma-Gruppe (s. Abb. 21C). Sie waren um mehr als die Hälfte vermindert und somit auch gegenüber dem Ausgangswert signifikant abgefallen. Der Anstieg in der Behandlungsgruppe erfolgte langsamer, aber überschritt nach 72h den Ausgangswert. Nach 120h hatten sich die Werte in beiden Gruppen wieder angeglichen und lagen circa 30% über dem Ausgangsniveau.

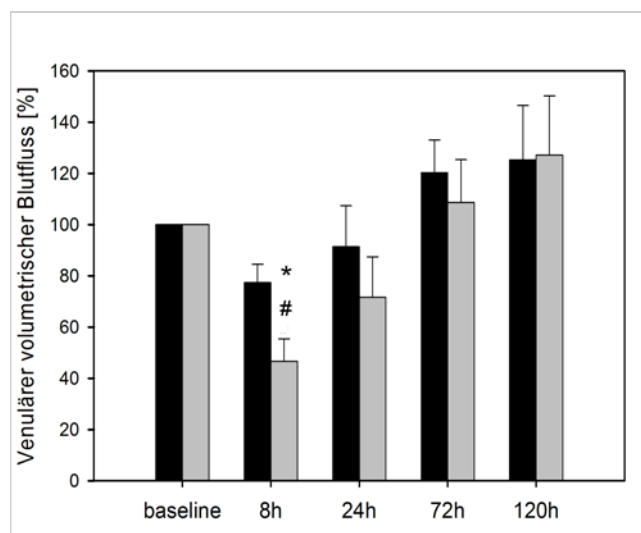


Abbildung 21C: Venulärer volumetrischer Blutfluss des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); MW±SEM; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

6.2.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Anzahl der *arteriölen rollenden Leukozyten/Minute* stieg in der mit Aprotinin behandelten Gruppe bis 24h nach Trauma etwas langsamer an (s. Abb. 22A). Das Absinken

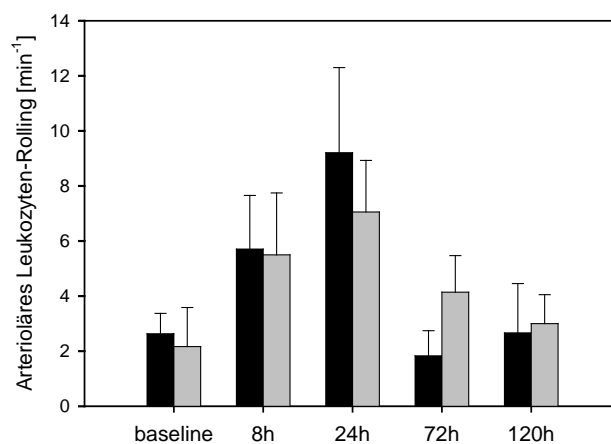


Abbildung 22A: Arteriöles Leukozyten-Rolling des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); MW±SEM.

der Leukozytenanzahl bis 120h nach Trauma erfolgte in beiden Gruppen auf ein vergleichbares Niveau wie bei den Ausgangswerten.

In der Trauma+Aprotinin-Gruppe waren zu Beginn der Messungen und somit vor Aprotinin-Gabe die *venulären rollenden Leukozyten/Minute* signifikant gegenüber denen in der Trauma-Gruppe erhöht (s. Abb. 22B). Nach Aprotinin-Gabe zeigte sich der Anstieg der Leukozytenzahl bis 24h nach Trauma verlangsamt. Nach 120h war die Anzahl der rollenden Leukozyten in der Behandlungsgruppe vergleichbar mit dem Ausgangswert.

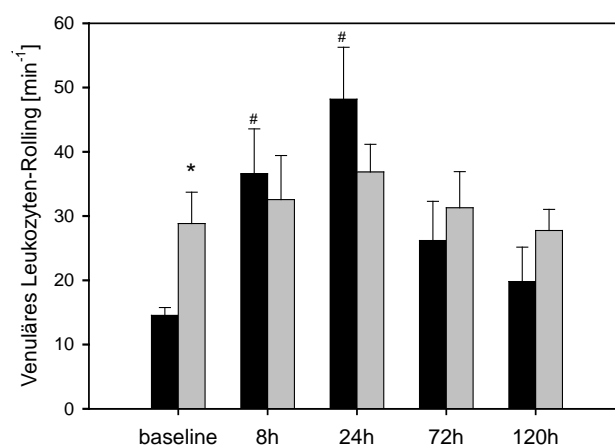


Abbildung 22B: Venuläres Leukozyten-Rolling des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Die *venuläre Leukozytenadhärenz/Fläche* wurde durch die Aprotinin-Behandlung nach 8h signifikant gegenüber der Kontroll-Gruppe vermindert und blieb bis 72h nach Trauma unter

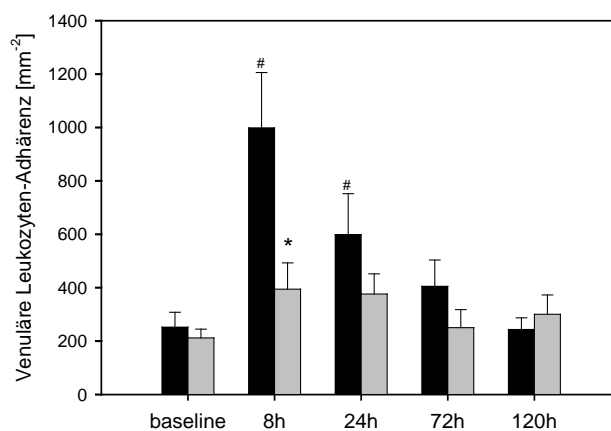


Abbildung 22C: Venuläre Leukozyten-Adhärenz des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); $MW \pm SEM$; * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

dessem Niveau (s. Abb. 22C). Nach 120h war kein Unterschied mehr zu erkennen, die Werte waren vergleichbar mit den Ausgangswerten.

6.2.5 Histologie

Die histologischen Analysen der Apoptose und der Leukozyteninfiltration nach 120h ergaben keine signifikanten Unterschiede zwischen Tieren mit Aprotinin-Behandlung und unbehandelten Tieren (s. Abb. 23).

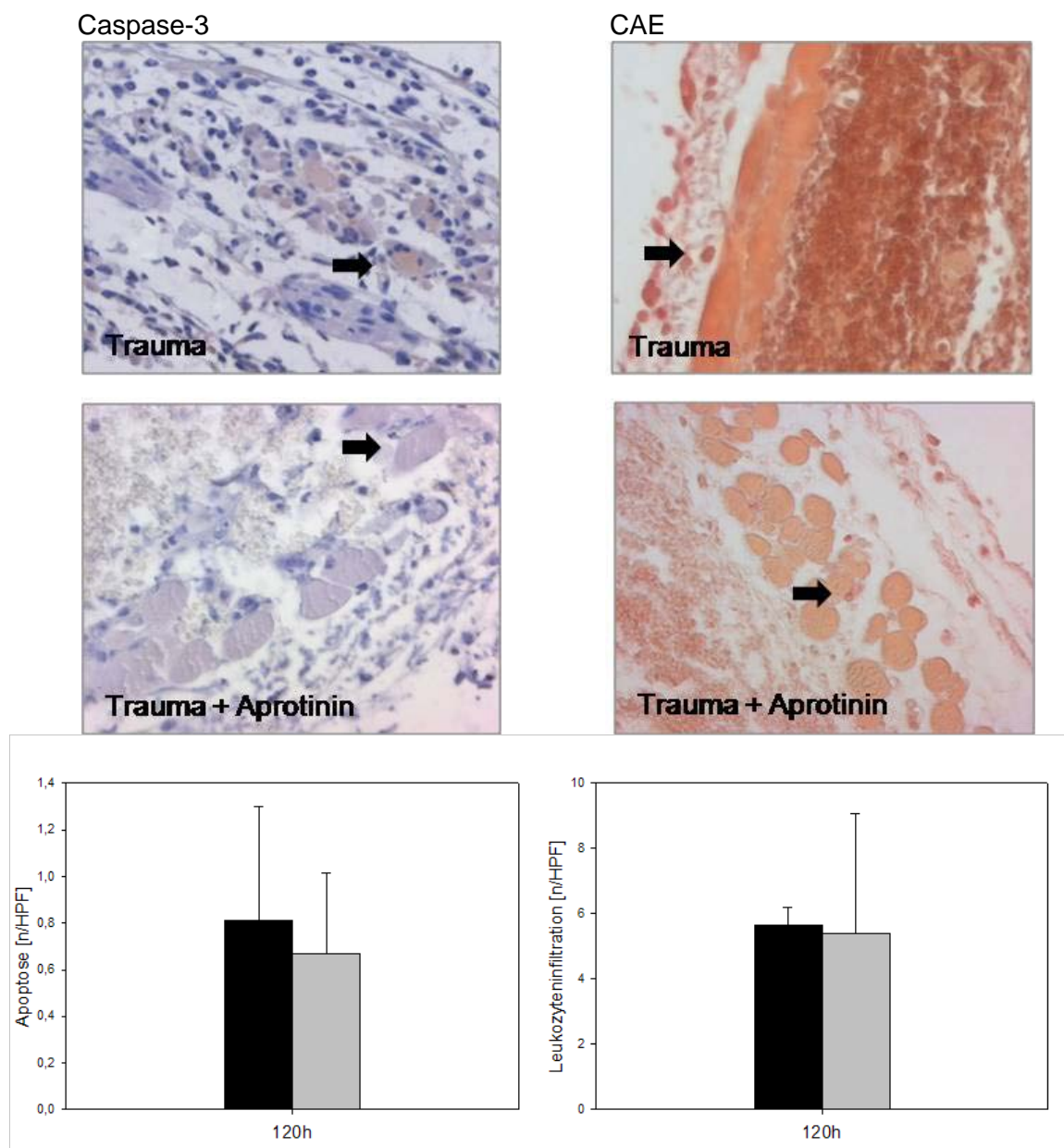


Abbildung 23: Jeweils eines von 25 Gesichtsfeldern einer histologischen Kammerpräparation mit Caspase3- und CAE-Färbung. Aufnahme mit einem 40x Objektiv. Die Pfeile markieren jeweils eine gefärbte Zelle.

Apoptose und Leukozyteninfiltration 120h nach stumpfem Trauma (■) sowie stumpfem Trauma mit zusätzlicher Aprotinin-Behandlung (□); $MW \pm SEM$.

6.3 Trauma, Cooling und SnMP

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, welchen Einfluss das Cooling auf das Weichteiltrauma hat und ob dieser Einfluss über die Induktion von HO-1 vermittelt wird.

6.3.1 Kapilläre Perfusion

Die funktionelle Kapillardichte wurde nach 8h in allen Gruppen auf ein vergleichbares Niveau reduziert (s. Abb. 24A). Anschließend erfolgte die Erholung in der Trauma+Cooling-Gruppe am schnellsten. Nach 120h glichen die Werte der Trauma-Gruppe denen der Trauma+Cooling-Gruppe und lagen geringfügig unter Ausgangsniveau. Die zusätzliche Gabe von SnMP beeinflusste die Erholung negativ. Nach 24h lag die Kapillardichte auf etwa der Hälfte des Ausgangswertes. Nach 120h lagen die Werte mit circa 60% signifikant unter dem Ausgangsniveau.

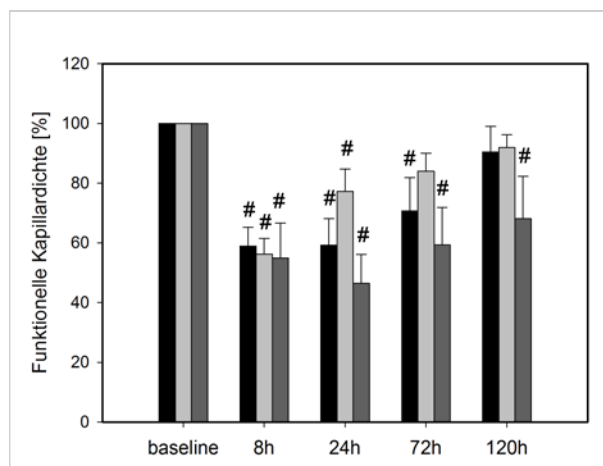


Abbildung 24A: Funktionelle Kapillardichte des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣); #p<0,05 vs. Baseline.

Der Vergleich der kapillären Gefäßdurchmesser erbrachte zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede (s. Abb. 24B). Allerdings konnte nach 8h, 24h und 72h eine leichte Zunahme des Durchmessers in der mit Cooling und SnMP behandelten Gruppe beobachtet werden, der nach 120h nicht mehr erkennbar war.

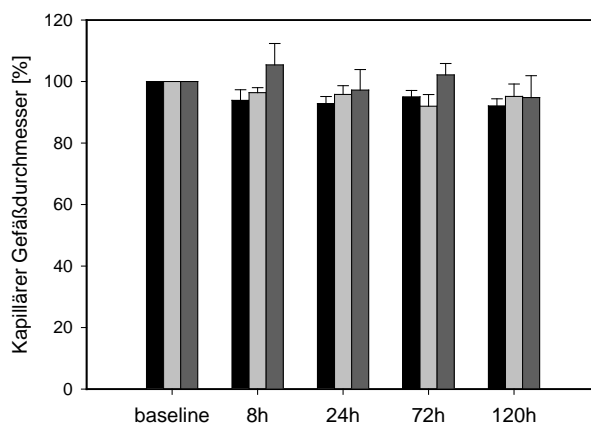


Abbildung 24B: Kapillärer Gefäßdurchmesser des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▒).

Die kapilläre Blutzellgeschwindigkeit zeigte nach 8h und 24h in allen drei Gruppen eine Reduktion der Werte, die nur in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe nicht gegenüber dem Ausgangswert signifikant war (s. Abb. 24C). Danach stiegen die Geschwindigkeiten in allen Gruppen wieder an. Nach 72h normalisierten sich die Werte aller drei Gruppen.

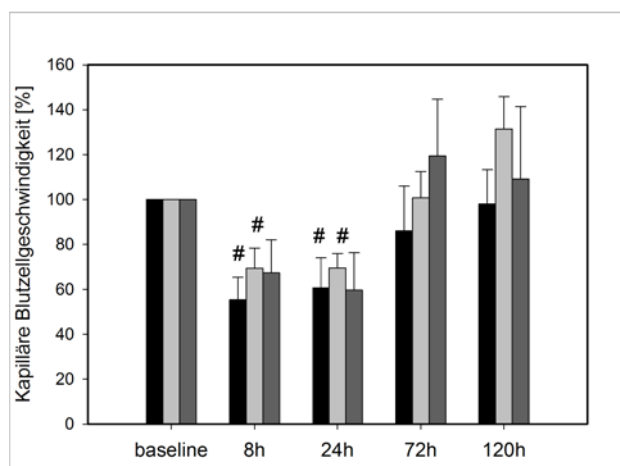


Abbildung 24C: Kapilläre Blutzellgeschwindigkeit des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▒); [#]p<0,05 vs. Baseline.

Die Analyse des kapillären volumetrischen Blutflusses zeigte in allen drei Gruppen nach 8h eine Reduktion. Er war in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe am wenigsten ausgeprägt (s. Abb. 24D). Nach 24h verstärkte sich der Rückgang in dieser Gruppe, während die anderen Gruppen stabil blieben. Zu beiden Messzeitpunkten war der Blutfluss in der Trauma-Gruppe

und Trauma+Cooling-Gruppe signifikant gegenüber den Ausgangswerten vermindert. Die Erholung erfolgte nach 72h in allen drei Gruppen.

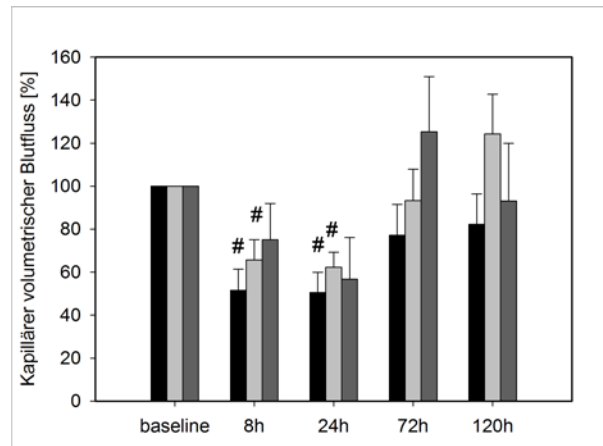


Abbildung 24D: Kapillärer volumetrischer Blutfluss des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣); # $p < 0,05$ vs. Baseline.

6.3.2 Arteriolenäre Mikrohämodynamik

Nach 8h, 24h und 72h erfolgte die stärkste Vasokonstriktion der arteriolenären Gefäßdurchmesser in der Trauma+Cooling-Gruppe (s. Abb. 25A). Diese Werte waren gegenüber dem Ausgangswert signifikant vermindert. Weniger ausgeprägt war die Reaktion in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe. 120h nach Trauma waren die Werte in allen Gruppen vergleichbar mit denen der Ausgangswerte.

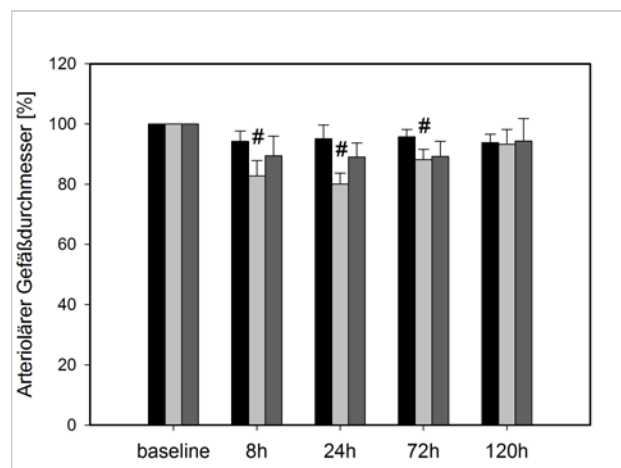


Abbildung 25A: Arteriolenärer Gefäßdurchmesser des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣); # $p < 0,05$ vs. Baseline.

8h nach Trauma war die *arterioläre Blutzellgeschwindigkeit* stark vermindert. Dies konnte durch das Cooling nicht positiv beeinflusst werden (s. *Abb. 25B*). Die zusätzliche SnMP-Gabe reduzierte die Fließgeschwindigkeit noch stärker bis auf etwa 40%. Die Erholung erfolgte nach 24h am schnellsten in der Trauma-Gruppe, wobei nach 8h und 24h die Werte aller Gruppen signifikant unter den Ausgangswerten lagen. Nach 120h lagen die Werte der Trauma-Gruppe geringfügig unter dem Ausgangsniveau. In der Trauma+Cooling-Gruppe wurde nach 120h eine leicht überschießende Reaktion gemessen. Am langsamsten erfolgte die Erholung in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe. Die Fließgeschwindigkeit erholte sich zwischen 72h und 120h nach Trauma nicht weiter und lag nach 120h mit rund 60% signifikant unter den Werten der anderen zwei Gruppen und unter dem Ausgangsniveau.

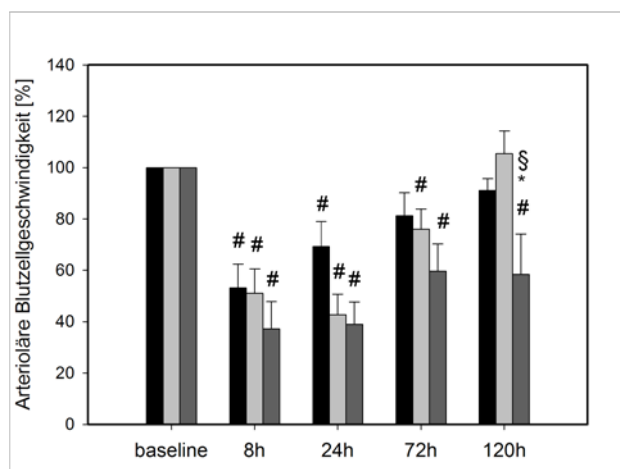


Abbildung 25B: Arteriöläre Blutzellgeschwindigkeit des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣); * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline; § $p < 0,05$ vs. Trauma+Cooling.

Der *arteriöläre volumetrische Blutfluss* war in allen drei Gruppen nach 8h signifikant um über die Hälfte gegenüber den Ausgangswerten reduziert (s. *Abb. 25C*). Die geringste Reduktion erfolgte in der Trauma-Gruppe. Diese erholte sich 72h nach Trauma am schnellsten. Die Reduktion in der Trauma+Cooling-Gruppe war nach 8h und 24h verstärkt. Die Erholung erfolgte nach 120h. Die Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe zeigte eine vergleichbare Reduktion wie die Trauma+Cooling-Gruppe, allerdings lagen die Werte 120h nach Trauma noch signifikant unter dem Ausgangsniveau.

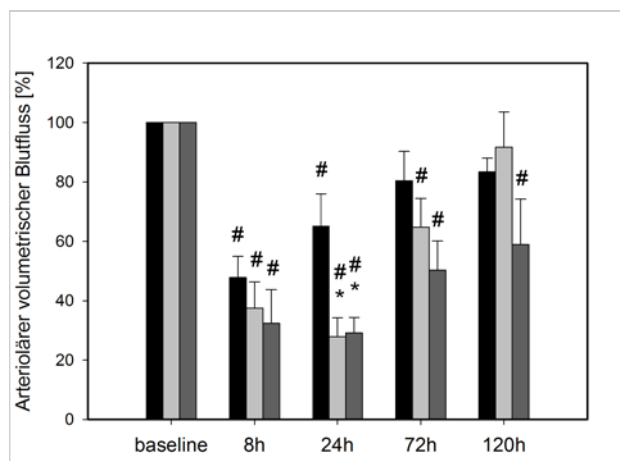


Abbildung 25C: Arteriöler volumetrischer Blutfluss des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣); * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Baseline.

6.3.3 Venuläre Mikrohämodynamik

Die venulären Gefäßdurchmesser der Trauma+Cooling-Gruppe sowie der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe zeigten 8h und 24h nach Trauma eine leichte Konstriktion (s. Abb. 26A). Nach 72h erreichten die Werte der Trauma+Cooling-Gruppe wieder Ausgangsniveau. Die Werte der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe zeigten nach 72h und 120h eine leichte Verstärkung der Vasokonstriktion.

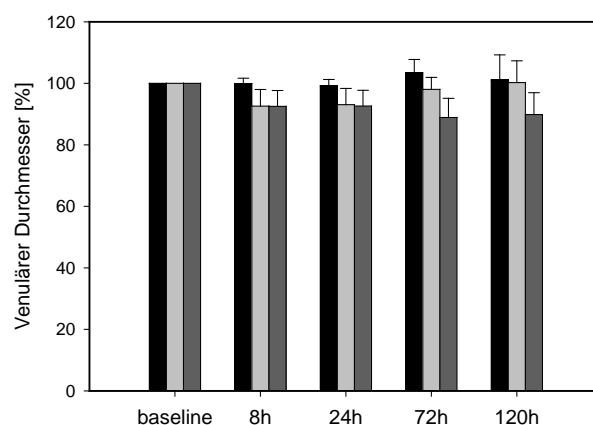


Abbildung 26A: Venulärer Gefäßdurchmesser des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣).

Der Rückgang der venulären Blutzellgeschwindigkeit war 8h nach Trauma in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe am ausgeprägtesten erkennbar (s. Abb. 26B). Es erfolgte eine

Erholung in allen drei Gruppen, wobei dies in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe am langsamsten von statten ging. In der Trauma+Cooling-Gruppe wurde ein überschießendes Ergebnis mit gut 150% nach 120h deutlich, welches gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht war. Zu diesem Zeitpunkt war die Fließgeschwindigkeit der Tiere, die zusätzlich SnMP erhalten hatten, weiterhin unter 80% des Ausgangswertes.

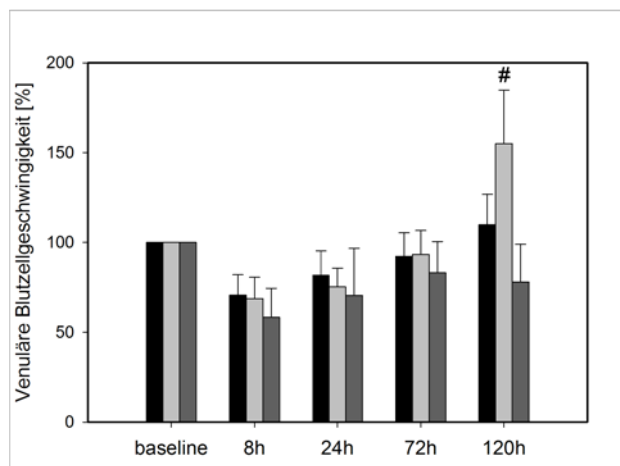


Abbildung 26B: Venuläre Blutzellgeschwindigkeit des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣); # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Die Werte des venulären volumetrischen Blutflusses waren nach 8h am stärksten in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe vermindert (s. Abb. 26C). Diese Tendenz blieb bis 120h nach Trauma mit knapp 60% des Ausgangswertes in dieser Gruppe bestehen. Nach 72h und 120h wurden überschießende Werte in der Trauma-Gruppe gemessen, die sich am schnellsten erholte. 120h nach Trauma waren die Werte in der Trauma+Cooling-Gruppe mit gut 180% signifikant gegenüber dem Ausgangsniveau erhöht.

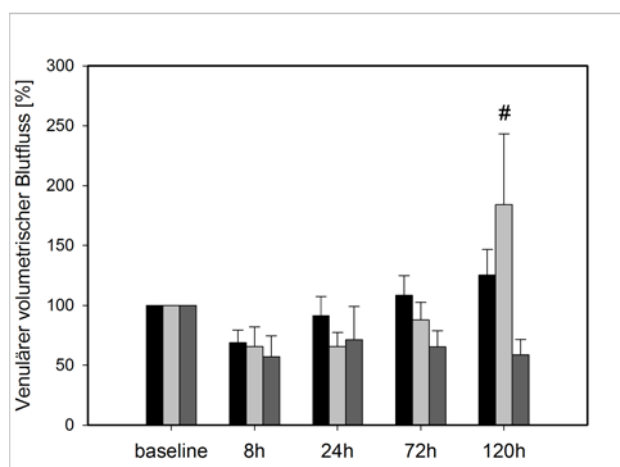


Abbildung 26C: Venulärer volumetrischer Blutfluss des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣); # $p < 0,05$ vs. Baseline.

6.3.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die arteriölen rollenden Leukozyten/Minute erreichten durch das Cooling schon nach 8h den Höchstwert (s. Abb. 27A). Danach erfolgte eine Verminderung in dieser Gruppe. Nach 120h lag die Anzahl fast bei null. Durch die zusätzliche SnMP-Gabe war nach 8h zunächst ein leichter Rückgang zu erkennen. Der Anstieg der Leukozytenzahlen erfolgte in dieser Gruppe nach 24h und war ausgeprägter als in der Trauma+Cooling-Gruppe. Nach 72h lag der Wert noch über denen der anderen beiden Gruppen, nach 120h befand er sich unter dem Ausgangsniveau und unter dem der Trauma-Gruppe.

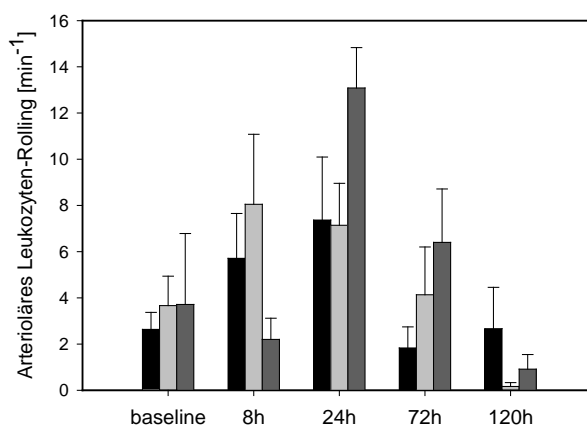


Abbildung 27A: Arteriöles Leukozyten-Rolling des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣).

Das Cooling hatte einen positiven Einfluss auf die venulären rollenden Leukozyten/Minute (s. Abb. 27B). Trotz eines leicht erhöhten Ausgangswertes stieg die Anzahl in der Trauma+Cooling-Gruppe nach 8h weniger stark an. Der Rückgang erfolgte schon nach 24h und lag nach 120h unter dem Ausgangswert und unter dem Wert der Trauma-Gruppe. Das venuläre Leukozyten-Rolling wurde in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe nach 8h und 24h fast vollständig unterbunden. Nach 72h war kein Vorteil mehr zu erkennen. Nach 120h lag der Wert über denen der anderen Gruppen.

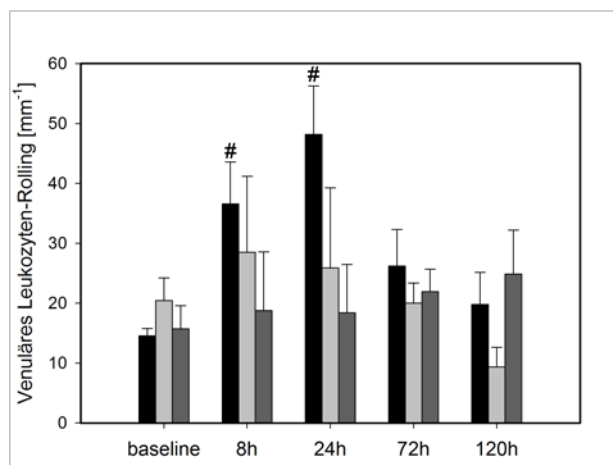


Abbildung 27B: Venuläres Leukozyten-Rolling des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣); # $p < 0,05$ vs. Baseline.

Die venulären adhärenenten Leukozyten/Fläche wurden 8h und 24h nach Trauma durch das Cooling vermindert (s. Abb. 27C). Nach 72h war in dieser Gruppe kein Vorteil mehr erkennbar, nach 120h glich der Wert dem Ausgangsniveau und lag leicht über dem der anderen Gruppen. In der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe konnte ein signifikanter Anstieg nach 8h und 24h nach Trauma nicht verhindert werden. Nach 72h glich sich der Wert denen der anderen Gruppen an.

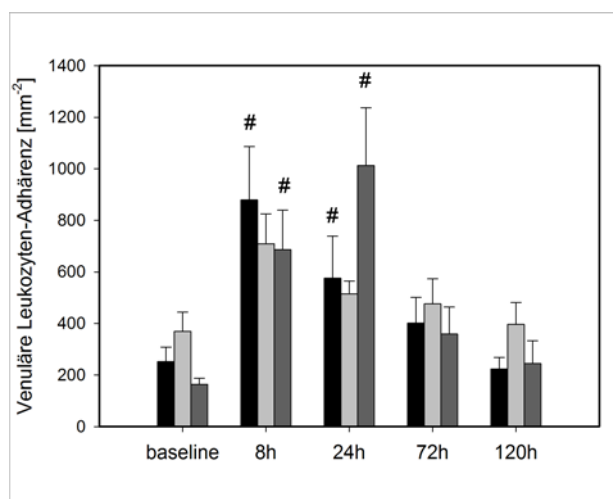
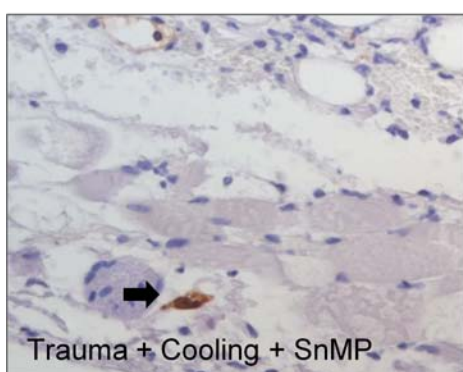
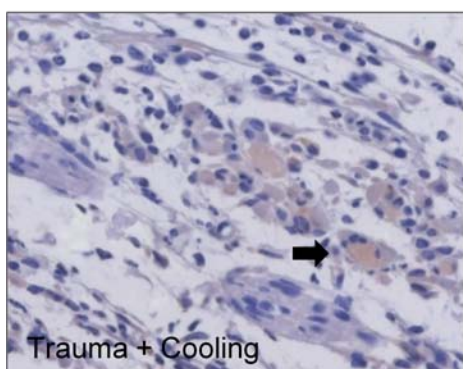
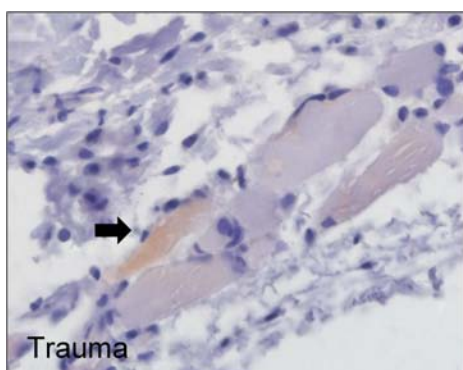


Abbildung 27C: Venuläre Leukozyten-Adhärenz des quergestreiften Muskels der Rückenhautkammer sowohl vor als auch 8h, 24h, 72h und 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (▣); # $p < 0,05$ vs. Baseline.

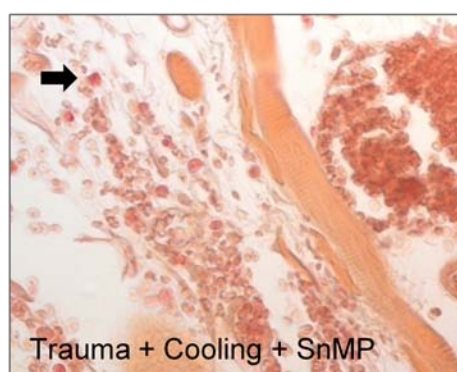
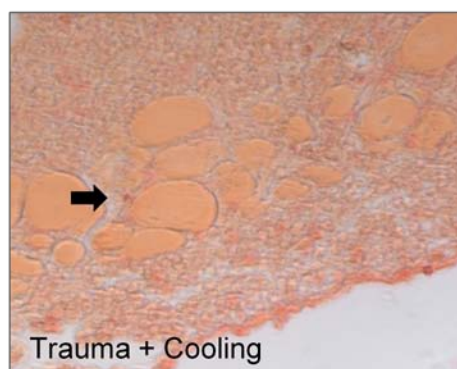
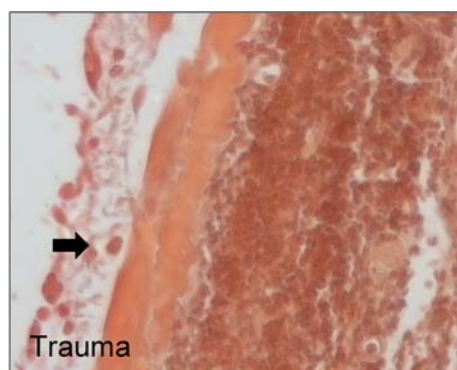
6.3.5 Histologie

Die histologischen Kontrollen nach 120h zeigten eine Verminderung der Apoptose in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe (s. Abb. 28). Die Werte der Leukozyteninfiltration nach 120h waren in allen Gruppen vergleichbar.

Caspase-3



CAE



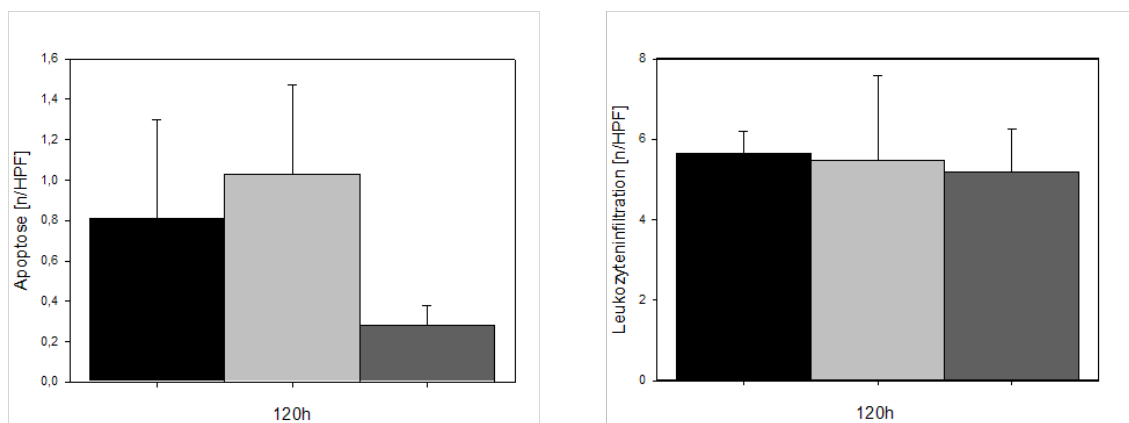


Abbildung 28: Jeweils eines von 25 Gesichtsfeldern einer histologischen Kammerpräparation mit Caspase3- und CAE-Färbung. Aufnahme mit einem 40x Objektiv. Die Pfeile markieren jeweils eine gefärbte Zelle.

Apoptose und Leukozyteninfiltration 120h nach stumpfem Trauma (■), stumpfem Trauma und Cooling-Behandlung (□) sowie stumpfem Trauma, Cooling- und SnMP-Behandlung (■).

7. Diskussion

7.1 Modell

Als Modell kam die chronische Rückenhautkammerpräparation an Mäusen zur Verwendung, um die Versuche durchzuführen. Zunächst fand dieses Modell Anwendung am Syrischen Goldhamster (Endrich et al., 1980). Später wurde es für die Verwendung an Mäusen übertragbar gemacht (Lehr et al., 1993; Amon et al., 2006). Es gewährleistet eine große Einsatzvielfalt.

Der in dieser Studie praktizierte Versuchsablauf bietet eine Reihe von Vorteilen. Da ein Großteil der Nährstoff- und Sauerstoffversorgung durch die Kapillaren erfolgt, gilt die funktionelle Kapillardichte als Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes. Sie kann anhand dieses Modells analysiert werden. Darüber hinaus weisen die arterio-venösen Bündel für jedes Tier spezifische Merkmale auf. So können dieselben Gefäße an identischen Stellen zu repetitiven Untersuchungen über einen Zeitraum herangezogen werden. Im Gegensatz zu den Akutmodellen kann die Auswirkung des Traumas und der Behandlungsmethode(n) dadurch im Verlauf beurteilt werden.

In dem hier vorgestellten Modell wurde auf das seit 1993 bestehende Verfahren des ‚weight-drop device‘ zurückgegriffen (Smith et al., 1993). Es ist bei experimentellen Untersuchungen zum Thema Trauma mittlerweile fest etabliert und vielfach benutzt worden (Knappe et al., 2005; Amon et al., 2006). Bei der zuletzt genannten Studie wurde gezeigt, dass die Stärke eines Weichteiltraumas einen unmittelbaren Einfluss auf das Ausmaß der arteriolären Vasokonstriktion hat. Darauf basierend haben wir uns für die Generierung eines schweren Weichteiltraumas entschieden (s. Kap. 5.1.8).

Bei der Verwendung des ‚weight-drop device‘ muss auf eine exakte Standardisierung geachtet werden. Insbesondere bei der Fixierung der Maus mit Knete auf der Bühne muss die vollständig horizontale Lage kontrolliert werden. Durch nur minimale Abweichung von der planen Unterlage kann es zu leichten Verkantungen des Edelstahlzylinders kommen. Hierdurch kann die Kraftverteilung des durch die Plexiglasröhre fallen gelassenen Gewichtes unregelmäßig werden. Dies könnte möglicherweise durch die Entwicklung eines Einspannsystems für die Kammer sowie einer Loslassvorrichtung für das Gewicht erleichtert werden.

Andere Gruppen haben das System der ‚Controlled-Impact-Injury-Technik‘ für geschlossene Weichteiltraumen verfeinert, wenn auch meist am Hinterlauf von Ratten (Schaser et al., 2006). Dies könnte, in modifizierter Art, bei unserem Modell in weiteren Versuchen auch etabliert werden. Eventuell könnte man es mit der für den Hinterlauf entwickelten Kammer-Technik kombinieren (Szczesny et al., 2000).

Die Sham-Gruppe diente als Kontrollgruppe ohne Trauma gegenüber den Gruppen, in denen den Tieren ein Trauma zugefügt wurde. In der Sham-Gruppe wurde die Anhebung des Deckglases vorgenommen. Da das präparierte Gewebe unmittelbar an dem Deckglas haftet, führte diese Maßnahme trotz des Aufträufelns von physiologischer Kochsalzlösung oft zu kleinen Traumen und Mikro-Einblutungen im Untersuchungsareal. Diese könnten ihrerseits Auswirkungen auf die Mikrozirkulation und die Leukozyten-Endothelzell-Reaktion des Untersuchungsareals gehabt haben und so die Ergebnisse beeinflussen (s. *Kap. 6.1*).

7.2 Untersuchungsmethoden

Der Versuchsablauf basiert auf der Möglichkeit, die Mikrozirkulation anhand der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysieren zu können.

Durch Anfärben mit bestimmten Farbstoffen und dank der Weiterentwicklung der Fluoreszenzmikroskopie können gezielt verschiedene Strukturen erfasst werden (Taylor, 2011). In der vorgestellten Studie wurden FITC-Dextran für die Darstellung der mikrovaskulären Perfusion und Rhodamin 6G für die Anfärbung von Leukozyten verwendet.

Nach deren Applikation war das Messen der gewünschten Parameter für etwa 30min möglich. Danach setzte der Abbau der Stoffe ein und die Qualität der Aufnahmen ließ nach. Zudem kann es zu unerwünschten photodynamischen Prozessen mit den Farbstoffen kommen (Friesenecker et al., 1994; Steinbauer et al., 2000). Dazu gehört u.a. die Verödung von Gefäßen bei zu langer Bestrahlung eines Bereiches. Um Komplikationen zu vermeiden wurde daher darauf geachtet, die 3 Gesichtsfelder für die Mikroskopie der arterio-venösen Bündel in der Kammer in größt möglichem Abstand voneinander zu verteilen und die direkte Untersuchungszeit so kurz wie möglich zu halten.

7.3 Diskussion der Ergebnisse

7.3.1 Trauma

Die Daten der Versuchsreihe Trauma versus Sham im Mausmodell belegen, dass das Weichteiltrauma mit 25g einen relevanten Schaden im Gewebe der Rückenhautkammer verursacht.

Die *kapilläre Perfusion* wurde durch das Weichteiltrauma stark vermindert (s. Kap. 6.1.1, Abb. 14). Die funktionelle Kapillardichte erholte sich bis 120h nach Trauma nicht vollständig. Die Blutzellgeschwindigkeit und der volumetrische Blutfluss wurden nach Trauma-Applikation für 24h signifikant beeinträchtigt. Der Kapillardurchmesser zeigte eine Vasokonstriktion, so dass er nach 8h und 120h deutlich gegenüber dem Ausgangswert vermindert war. Die funktionelle Kapillardichte, die Blutzellgeschwindigkeit und der volumetrische Blutfluss der Sham-Gruppe waren 8h nach Deckglasmanipulation um etwa 10% reduziert.

Unsere Ergebnisse bestätigen die Aussagen von vorangegangenen Studien, die sich mit der mikrovaskulären Dysfunktion durch Weichteiltrauma befasst haben (Yamauchi et al., 1999; Amon et al., 2006; Schaser et al., 2006). Je stärker ein Trauma ist, desto ausgeprägter sind das nutritive Perfusionsversagen und die Ischämie. Dabei wird die direkte mechanische Beschädigung der Gefäßwand als ausschlaggebender Faktor genannt. Als weitere Faktoren des nutritiven Perfusionsversagens werden der ‚no-reflow‘ Mechanismus (Menger et al., 1997; Nanobashvili et al., 2003) und die Zunahme des oxidativen Stresses genannt. Dieser führt zu vermehrter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und Leakage.

Die vorliegenden Ergebnisse geben Anhalt, dass das Ausmaß der kinetischen Energie einen direkten Einfluss auf das Ausmaß der Schädigung der Mikrozirkulation hat. Dies erklärt den Einfluss durch das Anheben des Deckglases auf die kapilläre Perfusion.

Die Beeinträchtigung der *arteriolären Mikrohämodynamik* durch das Trauma ist deutlich (s. Kap. 6.1.2, Abb. 15). Die Reduktion der Blutzellgeschwindigkeit und des volumetrischen Blutflusses war 8h nach Trauma gegenüber den Ausgangswerten und der Sham-Gruppe signifikant. Nach 24h waren beide Parameter der Trauma-Gruppe gegenüber den Ausgangswerten signifikant vermindert. Dies spricht für einen deutlichen Perfusionsschaden nach schwerem Trauma und belegt die Ergebnisse von vorangegangenen Studien (Amon et al., 2006). Die arterioläre Vasokonstriktion 8h nach Trauma war gegenüber der Sham-Gruppe signifikant und persistierte bis 120h nach Trauma, wenn auch weniger deutlich.

Die Sham-Gruppe zeigte 8-120h nach Anheben des Deckglases eine geringe Vasodilatation. In einer Vorläuferstudie von Amon et al. waren entsprechende Ergebnisse beobachtet worden.

Es gibt aktuell wenige Studien, die sich mit der posttraumatischen Vasokonstriktion befassen. Sie beschäftigen sich fast ausschließlich mit cerebralen Vasospasmen. Eine immer wiederkehrende Erklärung für die anhaltende Vasokonstriktion ist das durch das Trauma entstehende Hämatom (Duff et al., 1988; Clark et al., 2002; Ladner et al., 2013). Als hauptsächlichster Grund für die Vasokonstriktion werden Bilirubin und seine Abbauprodukte vermutet (s. Kap. 3.3.3) (Clark und Sharp, 2006).

Als ein weiterer beeinflussender Faktor für die Vasokonstriktion im traumatisierten Gewebe wird in anderen Studien die Freisetzung vasoaktiver Mediatoren diskutiert (Keel und Trentz, 2005). Oft werden diese durch die Hypoxie über eNOS getriggert (Han et al., 2013). Als Mediatoren werden TNF-alpha, Endothelin I, Leukotrien B4, Serotonin und Tryptamin sowie Thromboxan A2 genannt (Armstead, 1996; Anwar et al., 2012; Watts et al., 2012).

Die hauptsächlich in der Sham-Gruppe beobachtete leichte reaktive Dilatation der Gefäße ist ebenfalls kein neues, aber ein kaum beachtetes Phänomen (Szczesny et al., 2000). Sie wird als eine post-traumatische Reaktion im Sinne einer Erholungsphase interpretiert und vermutlich durch Zytokine wie TNF-alpha, aber auch durch axonale Reflexe vermittelt (Kiernan, 1976; Yamauchi et al., 1999).

Die Veränderung der *venulären Mikrohämodynamik* durch das Trauma war weniger ausgeprägt (s. Kap. 6.1.3, Abb. 16). Die Gefäßdurchmesser zeigten kaum einen Unterschied. Nach 8h und 24h waren die Blutzellgeschwindigkeit und der volumetrische Blutfluss um etwa 20% vermindert. Ein signifikanter Unterschied konnte hierbei nicht dokumentiert werden.

Die Blutzellgeschwindigkeit und der volumetrische Blutfluss in den venulären Gefäßen der Sham-Tiere waren 24h nach Deckglasmanipulation erhöht. In der Trauma-Gruppe war dies 72h bzw. 120h nach Trauma zu beobachten. Diese Reaktion könnte am ehesten - wie bei den Arteriolen - mit einer post-traumatischen Erholungsphase erklärt werden.

Die weniger ausgeprägte Veränderung der venulären Mikrozirkulation nach Trauma lässt sich mit dem unterschiedlichen Wandaufbau erklären. Die Venolen besitzen eine dünnere Schicht von glatten Muskelzellen (Curl et al., 1997). Daher ist die Kontraktionskraft weniger stark ausgeprägt. Es ist auch davon auszugehen, dass sie weniger Rezeptoren aufweisen, die auf die freigesetzten Botenstoffe reagieren können.

Wir vermuten, dass die Wiederherstellung der physiologischen Verhältnisse als erstes im Bereich der drainierenden Gefäße erfolgt. Der Abtransport des Oedems, Hämatoms und der beteiligten Botenstoffe kann so garantiert werden. Diese Hypothese wird durch die 25%ige Steigerung der venulären Blutzellgeschwindigkeit bei den Tieren der Sham-Gruppe nach 24h und der 30%igen Steigerung des venulären volumetrischen Blutflusses zu gleicher Zeit unterstrichen. Erst danach trat eine Normalisierung der kapillären Verhältnisse innerhalb der

Sham-Gruppe ein. Nach der Reduktion der Kapillardichte, der kapillären Fließgeschwindigkeit und des kapillären volumetrischen Blutflusses um etwa 10% nach 8h wurde nach 24h eine zunehmende Normalisierung der kapillären Blutzellgeschwindigkeit und des kapillären volumetrischen Blutflusses erkennbar. Die Kapillardichte erreichte allerdings erst nach 72h wieder 100%. Zum gleichen Zeitpunkt war der volumetrische Blutfluss in den Venolen leicht erniedrigt. Natürlich muss man dabei die Mechanismen wie die Ausbildung arterio-venöser Shunts und der ‚through-fare-channels‘ (Hjordal et al., 1992; Proske et al., 2000) berücksichtigen. Diese können unseres Erachtens nach die Beobachtungen nicht vollständig erklären. Wir vermuten, dass das venuläre Gefäßsystem zuerst einen Großteil seiner Funktion wiederherstellen muss, bevor sich die kapilläre Perfusion vollständig normalisieren kann.

Die Trauma-Gruppe bot ein ähnliches, zeitlich verzögertes Szenario. Es erfolgte eine Steigerung der venulären Blutzellgeschwindigkeit um 3% und dann 10% nach 72h und 120h. Der venuläre volumetrische Blutfluss stieg zu denselben Zeitpunkten um 20% und 25% an. Die Erholung der kapillären Perfusion erfolgte danach. Nach 120h lag die Kapillardichte der Trauma-Gruppe noch 10% unter dem Ausgangswert und die kapilläre Blutzellgeschwindigkeit hatte das Ausgangsniveau erreicht. Der kapilläre volumetrische Blutfluss lag nur bei etwa 80%. Diese Entwicklung ist vergleichbar mit den Werten der Sham-Gruppe, auch wenn sie durch das stärkere Trauma verzögert wurde.

Die Resultate der *Leukozyten-Endothelzell-Interaktion* belegen, dass ein Trauma eine Entzündungsreaktion induziert und dass dessen Ausmaß von der Stärke des Traumas abhängt (s. Kap. 6.1.4, Abb. 17).

Die Analyse des arteriolären Leukozyten-Rollings zeigt eine signifikante Steigerung des Ausgangswertes in der Trauma-Gruppe. Die Anzahl der rollenden Leukozyten stieg bis 24h nach Trauma an. Zu diesem Zeitpunkt war die Differenz zwischen den Gruppen signifikant. 8h nach Deckglasmanipulation konnte eine signifikante Erhöhung zum Ausgangswert in der Sham-Gruppe beobachtet werden.

8h nach Trauma bzw. Deckglasmanipulation war die Anzahl der rollenden venulären Leukozyten in beiden Gruppen fast identisch. In der Sham-Gruppe erfolgte ein schnellerer Rückgang 24h nach Deckglasmanipulation. Zu dem Zeitpunkt stieg die Zahl der venulären rollenden Leukozyten nach Trauma noch an. Dies zeigt, dass die Entzündungsreaktion in einem Gebiet umso schneller eingedämmt werden kann, je geringer der Schaden ist.

Die Ausgangswerte der venulären Leukozytenadhärenz waren in beiden Gruppen vergleichbar. Nach 8h erfolgte ein Anstieg der adhärenenten Leukozyten, der in der Trauma-Gruppe ausgeprägter war. Die Erholung war nach 72h in der Sham-Gruppe vollständig und

der Wert war auf dem Ausgangsniveau. In der Trauma-Gruppe wurde der Ausgangswert erst nach 120h erreicht.

Das Vorkommen adhärenter Leukozyten nach Trauma ist nicht nur in Venolen bewiesen, sondern auch in Arteriolen belegt (Menth-Chiari et al., 1998; Amon et al., 2006). Ihre Anzahl ist ebenfalls von der Stärke der einwirkenden Kraft abhängig. Die mechanisch ausgelösten Schäden in Arteriolen und Venolen und die freigesetzten molekularen Botenstoffe beeinflussen die Ausprägung der Entzündungsreaktion (s. *Abb. 3*). Dies konnte in unserer Studie bestätigt werden: der Aufprall des 25g schweren Edelstahlzylinders erzeugte eine stärkere und länger anhaltende Entzündungsreaktion als die Manipulation des Deckglases in der Sham-Gruppe.

Abschließend kann man sagen, dass die Stärke des Traumas die Ausprägung des Mikrozirkulationsschadens und der Entzündungsreaktion bestimmt.

7.3.1.1 Histologie

Es konnten keine signifikanten Unterschiede bei der Ermittlung der Apoptose und der Leukozyteninfiltration nach 120h ermittelt werden. In der Sham-Gruppe zeigten sich eine niedrigere Apoptose-Rate und eine geringere Leukozyteninfiltration (s. *Kap. 6.1.5, Abb. 18*). Die Tatsache, dass keine signifikanten Unterschiede zu beobachten waren, ist wohl auf die relativ geringe Größe der Stichprobe zurückzuführen.

7.3.2 Trauma und Aprotinin

Die Wirkung von Aprotinin auf die Mikrozirkulation nach Weichteiltrauma wurde bis jetzt nicht untersucht. Aprotinin hatte auf den Mikrozirkulationsschaden nach Trauma einen variablen Einfluss. Die Auswirkung auf die Entzündungsreaktion war positiv.

Die Aprotinin-Behandlung hatte einen positiven Einfluss auf die Erholung der *kapillären Perfusion* nach Trauma, konnte das initiale Perfusionsversagen aber nicht verhindern (s. *Kap. 6.2.1, Abb. 19*). Die Kapillardichte verhielt sich in beiden Gruppen annähernd gleich. 8h bis 72h nach Trauma erfolgte eine signifikante Vasodilatation durch die Aprotinin-Gabe. 72h nach Trauma erreichte die kapilläre Blutzellgeschwindigkeit durch die Aprotinin-Behandlung wieder das Ausgangsniveau und lag nach 120h darüber. Der gegenüber dem Ausgangswert signifikante Rückgang des volumetrischen Blutflusses 8h und 24h nach Trauma konnte durch Aprotinin vermindert werden und 72h sowie 120h nach Trauma erfolgte durch die

Aprotinin-Behandlung eine signifikante Hyperperfusion. Zu diesen Zeitpunkten hatte sich der kapilläre volumetrische Blutfluss der Tiere ohne Behandlung noch nicht vollständig erholt.

Bis jetzt wurde von einer Hemmung der mit Acetylcholin, Bradykinin oder Stickstoffmonoxid ausgelösten Vasodilatation durch das Polypeptid berichtet (Ulker et al., 2001; Ulker et al., 2002). Wir hatten daher mit einer Vasokonstriktion, einer Verminderung der Blutzellgeschwindigkeit und des volumetrischen Blutflusses durch die Aprotinin-Gabe gerechnet, da Aprotinin ein Protease-Inhibitor ist (s. Kap. 3.3.1). Die bis jetzt veröffentlichten Studien bezogen sich allerdings nicht auf die Untersuchung von Kapillaren oder Venolen, sondern immer auf die arteriolen Gefäße [Aorta, Koronaren]. Die bisherigen Untersuchungen waren an Ratten, Kaninchen und Schweinen, aber nicht an Mäusen durchgeführt worden. Es gibt allerdings Studien, die belegen, dass die Hemmung der endothelabhängigen Vasodilatation speziesspezifisch und konzentrationsabhängig ist (Steinhoff, 2004; Fischer und Steinhoff, 2005).

Bei der Interpretation der vorliegenden Ergebnisse sollte berücksichtigt werden, dass laut Herstellerangaben die Plasmakonzentration von Aprotinin nach 5h sehr gering ist. Man könnte in unserem Modell also vermuten, dass die vasokonstriktive Wirkung 8h nach Trauma schon abgeklungen war. Dabei ist zu bedenken, dass die Injektion in den retrobulbären Venenplexus als Bolus verabreicht wurde und dies unmittelbar nach der BL-Mikroskopie und somit 50-60min vor Trauma erfolgte (s. Abb. 6).

Es könnten weiterführende Versuchsreihen mit unterschiedlichen Dosierungen als Bolus und Infusion durchgeführt werden. So könnte man auf die Studien eingehen, in denen dosis- und speziesspezifische Reaktionen von Aprotinin bewiesen wurden (Steinhoff, 2004; Fischer und Steinhoff, 2005). Durch weitere Versuchsreihen mit verschiedenen Medikationszeitpunkten und schneller aufeinander folgenden Messzeitpunkten mit Bestimmung der Plasmakonzentration von Aprotinin könnte man die optimale präventive Dosis für die Mikrozirkulation am Mausmodell ermitteln.

Die *arteriolen Mikrohämodynamik* wurde durch die Aprotinin-Behandlung kaum beeinflusst (s. Kap. 6.2.2, Abb. 20). 8h und 24h nach Trauma trat eine Vasokonstriktion in der Trauma+Aprotinin-Gruppe auf. Dieser Rückgang war nach 24h signifikant gegenüber dem Ausgangswert. Die Analyse der arteriolen Blutzellgeschwindigkeit und des volumetrischen Blutflusses erbrachte vergleichbare Werte in beiden Gruppen.

Die Ergebnisse bestätigten die Analysen von vorangegangenen Studien. Aprotinin hemmt über Acetylcholin, Bradykinin und NO die vasodilatatorischen Prozesse nach Trauma in den arteriolen Gefäßen (s. Abb. 3) (Ulker et al., 2001; Ulker et al., 2002).

Interessant wären detaillierte Untersuchungen bis 5h nach Aprotinin-Injektion, evt. mit Messung der Plasmakonzentration, um die Pharmakokinetik am Mausmodell besser nachvollziehen zu können. Nach 5h ist die Plasmakonzentration von Aprotinin laut

Herstellerangaben stark vermindert. Ein weiterer Versuchsansatz könnte eine Langzeitstudie über mehrere Tage sein, an denen die Medikation 2-3x täglich verabreicht werden könnte. So könnte ein Behandlungseffekt über die ganze Länge des Mikrozirkulationsschadens und der Entzündungsreaktion nach Trauma untersucht werden (s. Abb. 1-3).

Die *venuläre Mikrohämodynamik* wurde durch die Aprotinin-Gabe stark beeinflusst (s. Kap. 6.2.3, Abb. 21). Nach 8h imponierte eine signifikante Vasokonstriktion gegenüber der Kontrollgruppe. Nach 120h erfolgte eine gegenüber dem Ausgangswert signifikante Dilatation. Die Verminderung der venulären Blutzellgeschwindigkeit und des volumetrischen Blutflusses wurde 8h nach Trauma durch die Aprotinin-Gabe signifikant verstärkt. Die Blutzellgeschwindigkeit konnte sich bis 120h nach Trauma in der Aprotinin-Gruppe nicht vollständig erholen. Der volumetrische Blutfluss war in beiden Gruppen 120h nach Trauma wieder vergleichbar und lag über dem Ausgangsniveau.

Zum jetzigen Zeitpunkt liegen keine Studien vor, die die venulären Gefäße nach Aprotinin-Behandlung untersuchen.

Die Hyperperfusion in beiden Gruppen 72h und 120h nach Trauma könnte mit der post-traumatischen Erholungsphase erklärt werden. Dies ist ein wichtiger Mechanismus bei der Wiederherstellung von physiologischen Bedingungen der Mikrozirkulation nach Trauma (s. Kap. 7.3.1) (Kiernan, 1976; Yamauchi et al., 1999; Szczesny et al., 2000). Als weitere Mechanismen können die Ausbildung arterio-venöser Shunts und der ‚through-fare-channels‘ genannt werden (Hjortdal et al., 1992; Proske et al., 2000).

Die Erholung der venulären Mikrohämodynamik nach Aprotinin-Behandlung war 120h nach Trauma noch nicht abgeschlossen. Weiterführende Studien könnten die Entwicklung bis zur vollständigen Normalisierung mit und ohne Trauma untersuchen. Da es noch keine Studien zum Verhalten von Kapillaren und Venolen nach Aprotinin-Gabe gibt, könnten so genauere Aussagen über das Verhalten der Mikrozirkulation getroffen werden. Dies erscheint uns in dem Zusammenhang der Wiederherstellung physiologischer Verhältnisse wichtig, da wir vermuten, dass die Normalisierung zuerst in den Venolen erfolgt, bevor sich die kapilläre Perfusion erholen kann (s. Kap 7.3.1).

Die Aprotinin-Gabe reduzierte die *Leukozyten-Endothelzell-Interaktion* nach Trauma (s. Kap. 6.2.4, Abb. 22). Das arterioläre Leukozyten-Rolling in der Trauma+Aprotinin-Gruppe war nach 24h vermindert und nach 72h gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Nach 120h waren die Werte in beiden Gruppen und mit ihren Ausgangswerten vergleichbar. Der signifikante Anstieg der venulären rollenden Leukozyten 8h und 24h nach Trauma wurde durch die Aprotinin-Gabe vermindert. Die signifikante Erhöhung der venulären Leukozyten-Adhärenz 8h und 24h nach Trauma wurde durch Aprotinin ebenfalls reduziert.

Das Polypeptid Aprotinin kann die Leukozytenmigration und die Leukozytenausschüttung der einzelnen Organe vermindern (Asimakopoulos et al., 2000; Vaporciyan et al., 2004). Es wurde an Mäusen gezeigt, dass der Proteinase-aktivierte Rezeptor 4 wichtig bei dem Anlocken von Neutrophilen ist (Gomides et al., 2012). Dieser kann bis zu 4h nach Aktivierung mittels Trypsin-Injektion durch die Gabe von Aprotinin gehemmt werden. Aprotinin vermindert auch auf Basis des Kallikrein-Kinin-Systems die Entzündungsreaktion (Davis und Whittington, 1995; Yousef und Diamandis, 2001; Menezes et al., 2012).

Da die Hemmung der endothelabhängigen Vasodilatation durch Aprotinin spezies- und konzentrationsabhängig ist (Steinhoff 2004; Fischer und Steinhoff, 2005), könnte es auch die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sein. Die in der vorliegenden Studie gewählte Dosis hat einen hemmenden Effekt auf die Entzündungsreaktion bis 24h nach Trauma im Mausmodell. Es könnte das Ziel weiterer Versuchsreihen sein, die Wirkung einer Aprotinin-Behandlung über die ganze Dauer der Entzündungsreaktion zu testen (s. *Abb. 2*). Dabei könnte man das Verhalten der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach mehrmaligen Injektionen/Tag analysieren, da die Plasmakonzentration von Aprotinin nach 5h sehr gering ist. In einer weiteren Versuchsreihe könnte die Auswirkung von Langzeitinfusionen im Gegensatz zu Bolusinjektionen untersucht werden.

7.3.2.1 Histologie

Die histologischen Kontrollen der Apoptose und der Leukozyteninfiltration 120h nach Trauma zeigten in beiden Gruppen vergleichbare Werte (s. *Kap. 6.2.5, Abb. 23*). Dies kann man damit erklären, dass die Wirkung von Aprotinin 120h nach Trauma - in diesem Modell somit 121h nach Aprotinin-Gabe - abgeklungen war. Die Proben könnten 24h nach letzter Medikamentengabe entnommen werden. Es könnte auch von Vorteil sein, eine größere Anzahl von Versuchstieren auszuwerten.

7.3.3 Trauma, Cooling und SnMP

Die Cooling-Behandlung konnte den initialen Perfusionsschaden und die initiale Entzündungsreaktion nach Trauma nicht verhindern, bewirkte allerdings eine beschleunigte Wiederherstellung der physiologischen Verhältnisse.

Die Inhibition der HO-1 durch Zinnmetalloporphyrin verstärkte den Mikrozirkulationsschaden und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach Trauma sowohl gegenüber der Trauma+Cooling-Gruppe als auch gegenüber der Trauma-Gruppe.

Die Cooling-Behandlung hatte einen positiven Einfluss auf die Wiederherstellung der *kapillären Perfusion* nach Trauma, konnte das initiale Perfusionsversagen aber nicht verhindern (s. Kap. 6.3.1, Abb. 24). In der Trauma+Cooling-Gruppe normalisierte sich die Kapillardichte am schnellsten. Die Blutzellgeschwindigkeit und der volumetrische Blutfluss waren 8h und 24h nach Trauma signifikant gegenüber den Ausgangswerten vermindert. Nach 72h lagen sie wieder auf Ausgangsniveau und somit früher als in der Trauma-Gruppe. Der Einfluss von Cooling auf die kapilläre Perfusion wurde bisher nur wenig untersucht. In einer der wenigen Studien wurde gezeigt, dass das Cooling auf 8° über 30min keinen bleibenden Einfluss auf die kapilläre Perfusion hat (Thorlacius et al., 1998). Während des Coolings wird die kapilläre Perfusion allerdings erheblich beeinflusst. Eine Erklärung für die schnellere Wiederherstellung der kapillären Perfusion durch Cooling nach Trauma könnte die Induzierung des Akute-Phase-Proteins HO-1 durch den hypothermen Stress sein (s. Kap. 3.3.2 und 3.3.3) (da Silva et al., 2001; Rucker et al., 2009). Die positive Wirkung von Cooling auf die funktionelle Kapillardichte lässt sich vermutlich zum Teil durch die anti-apoptische (Botros, Olszanecki et al., 2007) und anti-thrombotische Wirkung (Rucker et al., 2009) der Hämoxxygenase erklären. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass die Apoptose von Gefäß- und Muskelzellen nach Trauma und der Gefäßverschluss durch Thromben durch die HO-Induktion mittels Cooling vermindert werden. Dies könnte die schnellere Wiederherstellung der Blutzellgeschwindigkeit und des volumetrischen Blutflusses erklären.

Der Kapillardurchmesser zeigte physiologische Schwankungen. Dies lässt sich unter anderem mit der zeitlichen Distanz von durchschnittlich 7,5h zwischen dem Cooling und der folgenden Mikroskopie erklären (Thorlacius et al., 1998). Da die durch das Cooling induzierte HO-1 den Abbau von Häm katalysiert und dabei u.a. CO entsteht (Wagener et al., 2003), könnte auch dies die schnelle Wiederherstellung physiologischer Durchmesser erklären.

Wir stellen zudem die Vermutung auf, dass Cooling durch eine initiale Vasokonstriktion eine Extravasation vermindert. Somit liegt weniger Häm vor, das durch die aktivierte Hämoxxygenase abgebaut werden muss und die physiologischen Verhältnisse können schneller wieder hergestellt werden. Um den protektiven Mechanismus von Cooling nach Trauma genauer zu verstehen, könnten weiterführende Studien die HO-Konzentration parallel zu den Mikroskopie-Zeitpunkten bestimmen. So könnte man die Dauer der Hämoxxygenase-1-Wirkung durch Cooling bestimmen. Interessant wäre es auch, das Leakage zu bestimmen, um unsere Hypothese zu überprüfen.

In der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe verminderte sich die funktionelle Kapillardichte bis 24h nach Trauma und lag nach 120h noch signifikant unter dem Ausgangsniveau. Der kapilläre Gefäßdurchmesser zeigte nach 8h und 72h eine leichte Dilatation, war nach 120h allerdings mit den anderen Gruppen und dem Ausgangswert vergleichbar. Die kapilläre

Blutzellgeschwindigkeit wurde nach 8h und 24h nicht signifikant vermindert und lag nach 72h über und nach 120h auf dem Ausgangsniveau. Der Abfall des kapillären volumetrischen Blutflusses 8h und 24h nach Trauma war nicht signifikant.

Zinn-Metalloporphyrin inhibiert maßgeblich die Hämoxygenase-1 (s. *Abb. 3 und Kap. 3.3.3*) (Cannon et al., 1993), ohne mit weiteren Akute-Phase-Proteinen zu interagieren (Berglund et al., 1999). Die geringe Wirkung von SnMP auf das Kapillarbett wurde schon von Scheingraber et al. 2009 beschrieben. Die deutlich langsamere Wiederherstellung der Kapillardichte erklären wir zum Teil mit der in unserer Versuchsreihe relativ häufig beobachteten Verödung der Kapillaren nach SnMP-Gabe und Blaulicht-Epi-Illumination (Hintz et al., 1990), obwohl ein Gesichtsfeld nie länger als 1min dem Blaulicht exponiert war (s. *Kap. 5.4*). Zudem kann es zu unerwünschten photodynamischen Prozessen mit den Farbstoffen Rhodamin 6G und FITC-Dextran kommen (Friesenecker et al., 1994; Steinbauer et al., 2000). Diese Mechanismen könnten sich potenziert haben. Das könnte den nicht signifikanten Rückgang der kapillären Blutzellgeschwindigkeit und des kapillären volumetrischen Blutflusses bis 24h nach Trauma erklären, da diese in den wenigen verbliebenen Kapillaren relativ verstärkt wurden. Die überschießenden Reaktionen der kapillären Blutzellgeschwindigkeit, des kapillären volumetrischen Blutflusses sowie die leichte Vasodilatation 72h nach Trauma lassen erneut auf eine post-traumatische Erholungsphase schließen (Szczeny et al., 2000). Auch diese war in den wenigen verbliebenen Kapillaren relativ verstärkt.

Weiterführende Studien sollten nur wenige Parameter erheben, um das Risiko der Verödung zu vermindern.

Die *arterioläre Mikrozirkulation* wurde in beiden Behandlungsgruppen stark beeinflusst (s. *Kap. 6.3.2, Abb. 25*). In der Trauma+Cooling-Gruppe erfolgte eine gegenüber dem Ausgangswert signifikante Vasokonstriktion 8h bis 72h nach Trauma, die in der Trauma-Gruppe nicht beobachtet werden konnte. Die Blutzellgeschwindigkeit und der volumetrische Blutfluss lagen 72h nach Trauma und Cooling noch signifikant unter den Ausgangswerten. In der Trauma-Gruppe war der Unterschied zu den Ausgangswerten nach 72h nicht mehr signifikant vermindert.

Cooling löst innerhalb von Minuten über die α_{2C} -adrenergen Rezeptoren eine Vasokonstriktion aus (Chotani et al., 2000; Friedman et al., 2009). Die Rezeptoren werden aus den Golgi-Apparaten sezerniert und über das sympathische Nervensystem durch Norepinephrin (Jeyaraj et al., 2001) oder in Arterien auch durch die Rho/Rho-Kinase aktiviert (Bailey et al., 2004). Die Vasokonstriktion wird ebenfalls über die Sezernierung von reaktiven Sauerstoffspezies aus Mitochondrien der glatten Muskulatur ausgelöst (s. *Kap. 3.2.1 und Abb. 3., s. Kap. 3.3.2*). Thorlacius et. al zeigten 1998, dass während des Coolings über

30min auf 8°C die arteriölen Gefäßdurchmesser um über 40% vermindert werden. Das Cooling auf 8°C hat ebenfalls einen starken Einfluss auf die arteriöle Fließgeschwindigkeit und den volumetrischen Blutfluss. Diese hämodynamischen Veränderungen sind nach Ende des Coolings und einer Aufwärmphase von 30min reversibel. In der vorliegenden Studie hielt der arteriöle Mikrozirkulationsschaden in der Trauma+Cooling-Gruppe länger an als nach alleinigem Trauma. Dies könnte eventuell mit einer systemischen Auswirkung des Coolings in der vorliegenden Studie zusammen hängen. Weiterführende Studien könnten die optimale Temperatur und Kühldauer untersuchen, um einen maximalen protektiven Effekt zu erzielen. Die Körperkerntemperatur der Versuchstiere könnte rektal überwacht werden, damit es nicht zu einer systemischen Beeinflussung kommen kann.

Wie in Kapitel 7.3.1 erklärt, löst ebenfalls die Trauma-Applikation eine Vasokonstriktion aus. Vermutlich wurden diese Mechanismen durch die direkt anschließende Cooling-Behandlung potenziert. Man könnte in weiterführenden Studien testen, welchen Einfluss die Cooling-Behandlung hat, wenn man zunächst die reaktive, durch das Trauma ausgelöste Vasokonstriktion abklingen lässt.

Der arteriöle Gefäßdurchmesser in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe war bis 72h nach Trauma leicht vermindert. Die Blutzellgeschwindigkeit wurde stärker als in den anderen beiden Gruppen reduziert und war nach 120h mit etwa 60% gegenüber beiden Gruppen und dem Ausgangswert signifikant vermindert. Der arteriöle volumetrische Blutfluss war in dieser Gruppe ebenfalls nach 8h am stärksten vermindert und war nach 120h mit 60% noch signifikant gegenüber dem Ausgangsniveau reduziert.

SnMP hemmt die HO-1. Wir hatten vermutet, dass die protektive Wirkung von Cooling über HO-1 vermittelt wird. Die Wirkungsdauer von SnMP ist nicht bekannt. In unserem Versuch haben wir SnMP an 2 verschiedenen Zeitpunkten verabreicht (s. *Kap. 5.1.3 und Abb. 6*). Da die erste Gabe 14-18h vor der BL-Mikroskopie erfolgte, könnte die Regeneration nach Kammerpräparation negativ beeinflusst worden sein. Die Ausgangswerte wären in diesem Fall schwierig zu interpretieren. Das Cooling erfolgte unmittelbar nach der Trauma-Applikation und somit kurz nach der BL-Mikroskopie. Die zweite SnMP-Gabe erfolgte mit einem Abstand von 6-10h nach Trauma.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass der protektive Effekt von Cooling tatsächlich HO-1-vermittelt ist. Da nach Hemmung der HO-1 die Erholung in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe noch langsamer erfolgte als in der alleinigen Trauma-Gruppe, lassen die Ergebnisse zudem vermuten, dass das Weichteiltrauma sowie die Kammerpräparation als mechanische Insulte ebenfalls eine Induktion der endogenen HO-1 auslösen. Diese war durch die erste SnMP-Gabe schon gehemmt worden, weswegen die Regeneration nach

Kammerpräparation vermutlich verzögert ablief. Weiterführende Studien könnten kontrollieren, ob die Ergebnisse ohne erste SnMP-Gabe noch signifikanter sind.

Die Werte der *venulären Mikrozirkulation* der Trauma+Cooling-Gruppe ähnelten denen der arteriolen Mikrozirkulation. Das venuläre Perfusionsversagen war weniger ausgeprägt und hielt weniger lang an (s. Kap. 6.3.3, Abb. 26). Es zeigte sich eine leichte Vasokonstriktion an 8-72h. Die venuläre Blutzellgeschwindigkeit und der venuläre volumetrische Blutfluss verminderten sich 8-72h nach Trauma und zeigten beide signifikant überschießende Reaktionen 120h nach Trauma.

Die schnellere Regenerationsfähigkeit der Venolen beruht, wie in Kapitel 7.3.1 erklärt, auf der geringeren Wanddicke und der geringeren Anzahl an Rezeptoren. Die überschießende Reaktion 120h nach Trauma unterstützt unsere Hypothese, dass die Wiederherstellung physiologischer Verhältnisse zunächst in den drainierenden Gefäßen erfolgen muss, bevor die Wiederherstellung der kapillären Perfusion erfolgen kann. Die Verminderung der Blutzellgeschwindigkeit und des venulären volumetrischen Blutflusses hielt in der Trauma+Cooling-Gruppe jedoch bis 72h an. Das war länger als in der Trauma-Gruppe. Dies unterstreicht die Vermutung, mit dem Cooling eine kritische Hypothermie erzeugt und die reaktive Vasokonstriktion nach Trauma verstärkt zu haben. Thorlacius hatte nach einem Cooling auf 8°C über 30min und einer Aufwärmphase von 30min die unmittelbare Normalisierung der venulären Mikrozirkulation angegeben.

Die Werte in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe waren ebenfalls vergleichbar mit denen der arteriolen Mikrozirkulation, ohne dass Signifikanzen ermittelt werden konnten. Dabei muss man berücksichtigen, dass die Interpretation der Ausgangswerte durch die zweizeitige SnMP-Gabe erschwert wurde.

Es wurde eine leichte venuläre Vasokonstriktion gemessen, die bis 120h nach Trauma anhielt. Dies könnte mit der phototoxischen Eigenschaft nach Porphyrin-Gabe im Zusammenhang mit der dünneren Wanddicke der Venolen erklärt werden (Hintz et al., 1990). Dieses Phänomen könnte durch unerwünschte photodynamische Prozesse mit den Farbstoffen Rhodamin 6G und FITC-Dextran potenziert worden sein (Friesenecker et al., 1994; Steinbauer et al., 2000). Da die Blockierung von HO-1 den Abbau von Häm zu CO vermindert (s. Kap. 3.3.3), könnte dies ebenfalls eine trauma- und Cooling-bedingte Vasokonstriktion unterhalten (s. Kap. 7.3.1) (Chotani et al., 2000; Wagener et al., 2003; Amon et al., 2006; Friedman et al., 2009).

Da die Erholung der erhobenen venulären Parameter in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe langsamer als in den anderen beiden Gruppen erfolgte, bestätigen die Ergebnisse ebenfalls,

dass der protektive Effekt von Cooling HO-1-vermittelt ist und dass ein mechanischer Insult eine endogene HO-1-Induktion bewirkt.

Cooling beeinflusste die *Leukozyten-Endothelzell-Interaktion* nach Trauma im Gegensatz zur Trauma-Gruppe positiv (s. Kap. 6.3.4, Abb. 27). Das arterioläre Leukozyten-Rolling zeigte nach 8h leicht erhöhte Werte, war nach 120h allerdings am niedrigsten. Das venuläre Leukozyten-Rolling und die venuläre Leukozyten-Adhärenz zeigten keinen signifikanten Anstieg 8h und 24h nach Trauma trotz leicht erhöhter Ausgangswerte.

Verschiedene Studien belegen die positive Auswirkung von Cooling und milder Hypothermie auf die Entzündungsreaktion (s. Abb. 3). Milde Hypothermie vermindert die Wirkung von TFN-alpha (Westermann et al., 1999), verzögert die Ausschüttung von proinflammatorischen Zytokinen (Kimura et al., 2002; Diestel et al., 2008), scheint aber die IL-6-Sekretion zu erhöhen (Diestel et al., 2008). Cooling konnte die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion vermindern. Um die optimale therapeutische Temperatur und Kühldauer zur Prävention respektive zur Behandlung von Entzündungsreaktionen nach Trauma zu ermitteln, sollten unbedingt weitere Studien durchgeführt werden.

In der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe stieg das arterioläre Leukozyten-Rolling bis 24h nach Trauma stark an. Beim venulären Leukozyten-Rolling verlief der Anstieg langsam bis 120h nach Trauma. Die venuläre Leukozyten-Adhärenz war bis 24h nach Trauma signifikant gegenüber BL erhöht, lag nach 120h aber wieder circa auf Höhe ihres Ausgangsniveaus.

Wir hatten erwartet, dass die Entzündungsreaktion durch die Hemmung des Akute-Phase-Proteins HO-1 anhand SnMP verstärkt und verlängert wird (s. Kap. 3.3.3). Dies wurde in der vorliegenden Studie bestätigt. Da Häm nicht mehr zu Bilirubin abgebaut werden kann, liegt es ungebunden vor. Durch die Anreicherung von Sauerstoffradikalen wirkt es toxisch und hält Entzündungsreaktionen aufrecht (Balla et al., 1993; Wagner et al., 2000).

Die Abbauprodukte von Häm sind Biliverdin und Bilirubin (Dennery et al., 1995; Overhaus et al., 2006). Weitere Degradationsprodukte sind Kohlenstoffmonoxid und Eisen. Alle diese katabolen Produkte können in großen Mengen, wie auch Häm, potentiell zytotoxisch sein (Wagner et al., 2000).

Auch diese Ergebnisse lassen vermuten, dass der protektive Effekt des Coolings bei der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion HO-1-vermittelt ist.

7.3.3.1 Histologie

Die histologischen Kontrollen der Apoptose und der Leukozyteninfiltration 120h nach Trauma zeigten keine signifikanten Unterschiede in den drei Gruppen (s. Kap. 6.3.5, Abb. 28). Die

Apoptose-Rate war jedoch in der Trauma+Cooling+SnMP-Gruppe leicht gegenüber den anderen Gruppen vermindert. Dieses Ergebnis können wir zum jetzigen Zeitpunkt nicht interpretieren. Wie schon erwähnt müssen weiterführende Studien angeschlossen und größere Fallzahlen für die histologische Auswertung herangezogen werden, um genauere Aussagen treffen zu können.

8. Schlussfolgerung

8.1.1 Trauma

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie unterstützen die Hypothese, dass das Ausmaß der kinetischen Energie eines Weichteiltraumas einen direkten Einfluss auf das Ausmaß des Mikrozirkulationsschadens hat. Dies erklärt die Ergebnisse nach Deckglasmanipulation.

Die Wiederherstellung physiologischer Verhältnisse erfolgt nach einer post-traumatischen Erholungsphase. Wir vermuten, dass das venuläre Gefäßsystem zuerst einen Großteil seiner Funktion wiederherstellen muss, bevor sich die kapilläre Perfusion vollständig normalisieren kann. Diese Prozesse laufen umso schneller ab, je geringer das Trauma ist.

Die Ergebnisse dieser Studie bestätigen zudem, dass ein Weichteiltrauma eine Entzündungsreaktion in Arteriolen und Venolen auslöst. Die Ausprägung der Immunantwort ist von der Stärke des Weichteiltraumas abhängig.

8.1.2 Trauma und Aprotinin

Die Wirkung von Aprotinin auf die Mikrozirkulation wurde bis jetzt nicht untersucht. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass Aprotinin den Mikrozirkulationsschaden nach Weichteiltrauma nicht verhindern, diesen aber zum Teil positiv beeinflussen kann. Die kapilläre Regeneration erfolgte deutlich schneller und die Antwort der arteriolen Mikrozirkulation ähnelte derjenigen der Trauma-Gruppe. Die venuläre Regeneration wurde negativ beeinflusst. Die in der vorliegenden Studie gewählte Dosis konnte die Entzündungsreaktion 24h lang positiv beeinflussen. Die Aprotinin-Gabe ist somit ein vielversprechender Ansatz für eine protektive Therapiemaßnahme bei Weichteiltrauma.

8.1.3 Trauma, Cooling und SnMP

Cooling kann die Mikrozirkulation und die Entzündungsreaktion nach Trauma positiv beeinflussen. Als wesentlichen Mechanismus vermuten wir die Aktivierung der Hämoxxygenase-1.

Wir schlagen vor, die Cooling-Applikation mit verschiedenen Temperaturen und/oder über einen kürzeren Zeitraum zu testen. Wir empfehlen die Überprüfung der Körperkerntemperatur mit Hilfe einer Rektalsonde. Der zeitliche Abstand des Coolings zur Trauma-Applikation könnte variiert werden, um die reaktive Vasokonstriktion nach Trauma nicht zu

potenzieren. So könnte die optimale therapeutische und präventive Kühltemperatur und -dauer ermittelt werden.

Die Resultate der vorliegenden Studie belegen, dass sich die Hemmung der HO-1 durch SnMP negativ auf die Mikrozirkulation und die Entzündungsreaktion auswirkt.

Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass die protektive Wirkung von Cooling über eine HO-1-Induktion vermittelt wird. Nach Blockierung der HO-1 durch SnMP war die Erholung der erhobenen Parameter ebenfalls gegenüber der alleinigen Trauma-Gruppe verlangsamt. Wir vermuten daher, dass die endogen nach Trauma induzierte Hämoxxygenase Gewebe-
protektiv ist.

9. Verzeichnis der Abkürzungen

a.Chr.n.	ante Christum natum
AHA	American Heart Association
ANOVA	Analysis of variance
BART	Blood conservation using Antifibrinolytics: A randomized trial in High-Risk Cardiac surgery Patients
BfArM	Bundesinstitut für Arzneimittel und Medizinprodukte
BL	Baseline
C	Celsius
ca.	circa
CAE	Chloracetatesterase
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrome
CCD	charge coupled device
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratzenimeter
CO	Kohlenmonoxid
CRP	C-reaktives Protein
d	Tag(e)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DVD	Digital Versatile Disc
eNOS	endotheliale Stickstoff-Synthase
FDA	Food and Drug Administration
Fe ²⁺	Eisen
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
g	Gramm
h	Stunden
HO	Hämoxygenase
HPF	High power field
IE	Internationale Einheit
IL	Interleukin
ILCOR	International Liaison Committee on Resuscitation
iNOS	induzierbare Stickstoff-Synthase
J	Joule
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht

KKT	Körperkerntemperatur
m ²	Quadratmeter
mg	Milligramm
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome
MOV	Multiorganversagen
MW	Mittelwert
n	Anzahl
n.a.	Numerische Apertur
NaCl	isotone Kochsalzlösung
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
p. T.	post Trauma
s	Sekunden
SEM	Standardfehler des Mittelwerts
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
SnMP	Zinn-Metalloporphyrin
SnPP	Zinn-Protoporphyrin
TGF	transforming growth factor = transformierender Wachstumsfaktor
TNF	Tumornekrosefaktor
u.a.	unter anderem
UV-Licht	Ultraviolettes Licht
vs.	versus
W	Watt
ZnMP	Zink-Metalloporphyrin
ZnPP	Zink-Protoporphyrin
°	Grad
µm	Mikrometer

10. Literaturverzeichnis

- Abbassi, O., T. K. Kishimoto, et al. (1993). "Neutrophil adhesion to endothelial cells." Blood Cells **19**(2): 245-59; discussion 259-60.
- Algire, G. H. (1943). "An adaption of the transparent chamber technique to the mouse." J Natel Cancer Inst **4**: 1-11.
- Amon, M., M. W. Laschke, et al. (2006). "Impact of severity of local soft-tissue trauma on long-term manifestation of microcirculatory and microlymphatic dysfunctions." J Trauma **61**(4): 924-32.
- Andersen, K. and B. K. Pedersen (2008). "The role of inflammation in vascular insulin resistance with focus on IL-6." Horm Metab Res **40**(9): 635-9.
- Angermayr, B., M. Mejias, et al. (2006). "Heme oxygenase attenuates oxidative stress and inflammation, and increases VEGF expression in portal hypertensive rats." J Hepatol **44**(6): 1033-9.
- Anwar, M. A., W. R. Ford, et al. (2012) "Vasoconstrictor and vasodilator responses to tryptamine of rat-isolated perfused mesentery: comparison with tyramine and beta-phenylethylamine." Br J Pharmacol **165**(7): 2191-202.
- Armstead, W. M. (1996). "Role of endothelin in pial artery vasoconstriction and altered responses to vasopressin after brain injury." J Neurosurg **85**(5): 901-7.
- Asimakopoulos, G., R. Thompson, et al. (2000). "An anti-inflammatory property of aprotinin detected at the level of leukocyte extravasation." J Thorac Cardiovasc Surg **120**(2): 361-9.
- Axelrod, P. (2000). "External cooling in the management of fever." Clin Infect Dis **31 Suppl 5**: S224-9.
- Backer, C. L., A. M. Kelle, et al. (2007). "Aprotinin is safe in pediatric patients undergoing cardiac surgery." J Thorac Cardiovasc Surg **134**(6): 1421-6; discussion 1426-8.
- Bailey, S. R., A. H. Eid, et al. (2004). "Rho kinase mediates cold-induced constriction of cutaneous arteries: role of alpha2C-adrenoceptor translocation." Circ Res **94**(10): 1367-74.
- Baker, M. and H. Wayland (1974). "On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels." Microvasc Res **7**(1): 131-43.
- Bakken, A. F., M. M. Thaler, et al. (1972). "Metabolic regulation of heme catabolism and bilirubin production. I. Hormonal control of hepatic heme oxygenase activity." J Clin Invest **51**(3): 530-6.
- Balla, J., H. S. Jacob, et al. (1993). "Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: induction of sensitization and desensitization to oxidant damage." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(20): 9285-9.
- Balsara, K. R., S. T. Morozowich, et al. (2008). "Aprotinin's effect on blood product transfusion in off-pump bilateral lung transplantation." Interact Cardiovasc Thorac Surg **8**(1):45-48.

- Bauerova, K. and A. Bezek (1999). "Role of reactive oxygen and nitrogen species in etiopathogenesis of rheumatoid arthritis." Gen Physiol Biophys **18 Spec No**: 15-20.
- Berglund, L., R. A. Galbraith, et al. (1999). "Heme oxygenase inhibitors transiently increase serum ferritin concentrations without altering other acute-phase reactants in man." Pharmacology **59**(1): 51-6.
- Bernard, S. (2009). "Hypothermia after cardiac arrest: expanding the therapeutic scope." Crit Care Med **37**(7 Suppl): S227-33.
- Bernard, S., M. Buist, et al. (2003). "Induced hypothermia using large volume, ice-cold intravenous fluid in comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest: a preliminary report." Resuscitation **56**(1): 9-13.
- Bernard, S. A. (2005). "Hypothermia improves outcome from cardiac arrest." Crit Care Resusc **7**(4): 325-7.
- Bernard, S. A., T. W. Gray, et al. (2002). "Treatment of comatose survivors of out-of-hospital cardiac arrest with induced hypothermia." N Engl J Med **346**(8): 557-63.
- Blankenship, R. B. and T. Baker (2007). "Imaging modalities in wounds and superficial skin infections." Emerg Med Clin North Am **25**(1): 223-34.
- Boger, R. H. (2003). "When the endothelium cannot say 'NO' anymore. ADMA, an endogenous inhibitor of NO synthase, promotes cardiovascular disease." Eur Heart J **24**(21): 1901-2.
- Borghetti, P., R. Saleri, et al. (2009). "Infection, immunity and the neuroendocrine response." Vet Immunol Immunopathol **130**(3-4): 141-62.
- Botros, F. T., R. Olszanecki, et al. (2007). "Induction of heme oxygenase-1 in renovascular hypertension is associated with inhibition of apoptosis." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **53**(4): 51-60.
- Broughton, G., 2nd, J. E. Janis, et al. (2006). "The basic science of wound healing." Plast Reconstr Surg **117**(7 Suppl): 12S-34S.
- Brown, K. A., S. D. Brain, et al. (2006). "Neutrophils in development of multiple organ failure in sepsis." Lancet **368**(9530): 157-69.
- Brux, A., A. R. Girbes, et al. (2005). "[Controlled mild-to-moderate hypothermia in the intensive care unit]." Anaesthesist **54**(3): 225-44.
- Bühling, K. J., J. Lepenies, et al. (2004). Intensivkurs, Allgemeine und spezielle Pathologie. München, Jena, URBAN & FISCHER. **3**: S. 44-53, 63-69, 76-77, 88.
- Bundock, E. A., G. S. Drummond, et al. (1996). "Tissue distribution of synthetic heme analogues: studies with tin, chromium, and zinc mesoporphyrins." Pharmacology **52**(3): 187-98.
- Calogero, A. E., E. M. Sternberg, et al. (1992). "Neurotransmitter-induced hypothalamic-pituitary-adrenal axis responsiveness is defective in inflammatory disease-susceptible Lewis rats: in vivo and in vitro studies suggesting globally defective hypothalamic secretion of corticotropin-releasing hormone." Neuroendocrinology **55**(5): 600-8.

- Cannon, J. B., C. Martin, et al. (1993). "Targeted delivery of a heme oxygenase inhibitor with a lyophilized liposomal tin mesoporphyrin formulation." Pharm Res **10**(5): 715-21.
- Cardon, S. Z., C. F. Oestermeyer, et al. (1970). "Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy." Microvasc Res **2**(1): 67-76.
- Chida, D., T. Imaki, et al. (2005). "Involvement of corticotropin-releasing hormone- and interleukin (IL)-6-dependent proopiomelanocortin induction in the anterior pituitary during hypothalamic-pituitary-adrenal axis activation by IL-1alpha." Endocrinology **146**(12): 5496-502.
- Chotani, M. A., S. Flavahan, et al. (2000). "Silent alpha(2C)-adrenergic receptors enable cold-induced vasoconstriction in cutaneous arteries." Am J Physiol Heart Circ Physiol **278**(4): H1075-83.
- Clark, J. F., M. Reilly, et al. (2002). "Oxidation of bilirubin produces compounds that cause prolonged vasospasm of rat cerebral vessels: a contributor to subarachnoid hemorrhage-induced vasospasm." J Cereb Blood Flow Metab **22**(4): 472-8.
- Clark, J. F. and F. R. Sharp (2006). "Bilirubin oxidation products (BOXes) and their role in cerebral vasospasm after subarachnoid hemorrhage." J Cereb Blood Flow Metab **26**(10): 1223-33.
- Curl, W. W., B. P. Smith, et al. (1997). "The effect of contusion and cryotherapy on skeletal muscle microcirculation." J Sports Med Phys Fitness **37**(4): 279-86.
- da Silva, J. L., B. A. Zand, et al. (2001). "Heme oxygenase isoform-specific expression and distribution in the rat kidney." Kidney Int **59**(4): 1448-57.
- Davies, J. W. (1982). "Prompt cooling of burned areas: a review of benefits and the effector mechanisms." Burns Incl Therm Inj **9**(1): 1-6.
- Davis, R. and R. Whittington (1995). "Aprotinin. A review of its pharmacology and therapeutic efficacy in reducing blood loss associated with cardiac surgery." Drugs **49**(6): 954-83.
- DeBoard, R. H., D. F. Rondeau, et al. (2007). "Principles of basic wound evaluation and management in the emergency department." Emerg Med Clin North Am **25**(1): 23-39.
- Deetjen, P., E.-J. Speckmann, et al. (2005). Physiologie. München, ELSEVIER Urban & Fischer. **4**: S. 380-391.
- Dennery, P. A., A. F. McDonagh, et al. (1995). "Hyperbilirubinemia results in reduced oxidative injury in neonatal Gunn rats exposed to hyperoxia." Free Radic Biol Med **19**(4): 395-404.
- Di Noia, M. A., S. Van Driesche, et al. (2006). "Heme oxygenase-1 enhances renal mitochondrial transport carriers and cytochrome C oxidase activity in experimental diabetes." J Biol Chem **281**(23): 15687-93.
- Diestel, A., J. Roessler, et al. (2008). "Hypothermia downregulates inflammation but enhances IL-6 secretion by stimulated endothelial cells." Cryobiology **57**(3): 216-222.
- Duff, T. A., J. A. Feilbach, et al. (1988). "Bilirubin and the induction of intracranial arterial spasm." J Neurosurg **69**(4): 593-8.

- Endrich, B., K. Asaishi, et al. (1980). "Technical report--a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters." Res Exp Med (Berl) **177**(2): 125-34.
- Erdogan, A., G. Gurses, et al. (2007). "The sealing effect of a fibrin tissue patch on the esophageal perforation area in primary repair." World J Surg **31**(11): 2199-203.
- Findlay, J. Y. and R. P. Kufner (2003). "Aprotinin reduces vasoactive medication use during adult liver transplantation." J Clin Anesth **15**(1): 19-23.
- Fischer, J. H. and M. Steinhoff (2005). "Effects of aprotinin on endothelium-dependent relaxation of large coronary arteries." Eur J Cardiothorac Surg **28**(6): 801-4.
- Friedman, E. A., P. A. Harris, et al. (2009). "The alpha2C-adrenoceptor deletion322-325 variant and cold-induced vasoconstriction." Clin Auton Res **19**(4): 247-54.
- Friesenecker, B., A. G. Tsai, et al. (1994). "Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle." Am J Physiol **267**(6 Pt 2): H2204-12.
- Galaneus, C. (129-199). *Opera Omnia (Medicorum Graecorum Opera)*. Translation: Brock, A.J. Galaneus: On the natural facilities. Akademie Verlag, ISBN: 978-3-05-000745-8.
- Georgiadis, D., S. Schwarz, et al. (2001). "Endovascular cooling for moderate hypothermia in patients with acute stroke: first results of a novel approach." Stroke **32**(11): 2550-3.
- Gierer, P., J. N. Hoffmann, et al. (2008). "Sublethal trauma model with systemic endotoxemia for the study of microcirculatory disorders after the second hit." J Surg Res **147**(1): 68-74.
- Gomides, L. F., I. D. Duarte, et al. (2012) "Proteinase-activated receptor-4 plays a major role in the recruitment of neutrophils induced by trypsin or carrageenan during pleurisy in mice." Pharmacology **89**(5-6): 275-82.
- Greisen, G. (2001). "[Cooling as treatment of birth asphyxia]." Lakartidningen **98**(14): 1670-3.
- Gundersen, Y., P. Vaagenes, et al. (2001). "Moderate hypothermia blunts the inflammatory response and reduces organ injury after acute haemorrhage." Acta Anaesthesiol Scand **45**(8): 994-1001.
- Gustilo, R. B. and J. T. Anderson (1976). "Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses." J Bone Joint Surg Am **58**(4): 453-8.
- Hadfield, G. (1963). "The Earlier Phases of Definitive Healing in an Experimental Skin Wound." Br J Surg **50**: 751-64.
- Hamilton, T. A., Y. Ohmori, et al. (2002). "Regulation of chemokine expression by antiinflammatory cytokines." Immunol Res **25**(3): 229-45.
- Han, J. A., E. Y. Seo, et al. (2013). "Hypoxia-augmented constriction of deep femoral artery mediated by inhibition of eNOS in smooth muscle." Am J Physiol Cell Physiol **304**(1): C78-88.

- Henry, D., P. Carless, et al. (2009). "The safety of aprotinin and lysine-derived antifibrinolytic drugs in cardiac surgery: a meta-analysis." Cmaj **180**(2): 183-93.
- Hintz, S. R., H. J. Vreman, et al. (1990). "Mortality of metalloporphyrin-treated neonatal rats after light exposure." Dev Pharmacol Ther **14**(3): 187-92.
- Hippocrates (460–375 AC). *De Vetere Medicina*. Translation: Jones W.H.S., Withington E.T. Hippocrates., Loeb Classical Library, ISBN: 978-0-67-499162-0.
- Hirner, A. and K. Weise (2004). Schnitt für Schnitt, Thieme: S. 34-35, 44-45, 180-191, 265-273.
- Hirota, M., F. Nozawa, et al. (2000). "[SIRS and CARS: discussion based on the pathologic condition of acute pancreatitis]." Rinsho Byori **48**(6): 527-32.
- Hjortdal, V. E., E. S. Hansen, et al. (1992). "The microcirculation of myocutaneous island flaps in pigs studied with radioactive blood volume tracers and microspheres of different sizes." Plast Reconstr Surg **89**(1): 116-22; discussion 123-4.
- Jeong, D. S., K. H. Kim, et al. (2008). "Efficacy of a high-dose aprotinin regimen for reducing transfusion requirements and inflammatory responses in adult cardiac surgery." J Int Med Res **36**(5): 1039-48.
- Jeyaraj, S. C., M. A. Chotani, et al. (2001). "Cooling evokes redistribution of alpha2C-adrenoceptors from Golgi to plasma membrane in transfected human embryonic kidney 293 cells." Mol Pharmacol **60**(6): 1195-200.
- Johnstone, C. C. and A. Farley (2005). "The physiological basics of wound healing." Nurs Stand **19**(43): 59-65; quiz 66.
- Kadl, A. and N. Leitinger (2005). "The role of endothelial cells in the resolution of acute inflammation." Antioxid Redox Signal **7**(11-12): 1744-54.
- Kahnt, H. (1994). DER BROCKHAUS in einem Band. Leipzig, Mannheim, Brockhaus: S. 998.
- Kalicke, T., U. Schlegel, et al. (2003). "Influence of a standardized closed soft tissue trauma on resistance to local infection. An experimental study in rats." J Orthop Res **21**(2): 373-8.
- Karkouti, K. and W. S. Beattie (2006). "Aprotinin is useful as a hemostatic agent in cardiopulmonary surgery: no." J Thromb Haemost **4**(9): 1879-81.
- Katayose, D., S. Ioyama, et al. (1993). "Separate regulation of heme oxygenase and heat shock protein 70 mRNA expression in the rat heart by hemodynamic stress." Biochem Biophys Res Commun **191**(2): 587-94.
- Keel, M. and O. Trentz (2005). "Pathophysiology of polytrauma." Injury **36**(6): 691-709.
- Kiernan, J. A. (1976). "Evidence for the involvement of vasoactive constituents of mast cells in axon reflex vasodilatation in the skin of the rat." Acta Hepatogastroenterol (Stuttg) **255**(1): 1-8.
- Kimura, A., S. Sakurada, et al. (2002). "Moderate hypothermia delays proinflammatory cytokine production of human peripheral blood mononuclear cells." Crit Care Med **30**(7): 1499-502.

- Knappe, T., T. Mittlmeier, et al. (2005). "Effect of systemic hypothermia on local soft tissue trauma-induced microcirculatory and cellular dysfunction in mice." Crit Care Med **33**(8): 1805-13.
- Koepfen, A. H., A. C. Dickson, et al. (2004). "Heme oxygenase in experimental intracerebral hemorrhage: the benefit of tin-mesoporphyrin." J Neuropathol Exp Neurol **63**(6): 587-97.
- Kondo, T. (2007). "Timing of skin wounds." Leg Med (Tokyo) **9**(2): 109-14.
- Korthuis, R. J., D. C. Anderson, et al. (1994). "Role of neutrophil-endothelial cell adhesion in inflammatory disorders." J Crit Care **9**(1): 47-71.
- Kushida, T., G. Li Volti, et al. (2002). "Role of human heme oxygenase-1 in attenuating TNF-alpha-mediated inflammation injury in endothelial cells." J Cell Biochem **87**(4): 377-85.
- Kushida, T., S. Quan, et al. (2002). "A significant role for the heme oxygenase-1 gene in endothelial cell cycle progression." Biochem Biophys Res Commun **291**(1): 68-75.
- Kutty, R. K., G. Kutty, et al. (1995). "Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: suppression by the antioxidant dimethylthiourea." Proc Natl Acad Sci U S A **92**(4): 1177-81.
- Ladner, T. R., S. L. Zuckerman, et al. (2013). "Genetics of cerebral vasospasm." Neurol Res Int **2013**: Article ID 291895.
- Larrey, I. J. (1814). *Memories of military service and campaigns of the French armies.* Classics of Medicine Library (1987), ISBN: B002UB6QSW.
- Lee, H., H. Natsui, et al. (2005). "Effects of cryotherapy after contusion using real-time intravital microscopy." Med Sci Sports Exerc **37**(7): 1093-8.
- Lehr, H. A., M. Leunig, et al. (1993). "Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice." Am J Pathol **143**(4): 1055-62.
- Li, M., D. H. Kim, et al. (2008). "Treatment of obese diabetic mice with a heme oxygenase inducer reduces visceral and subcutaneous adiposity, increases adiponectin levels, and improves insulin sensitivity and glucose tolerance." Diabetes **57**(6): 1526-35.
- Li Volti, G., J. Wang, et al. (2002). "Differential effect of heme oxygenase-1 in endothelial and smooth muscle cell cycle progression." Biochem Biophys Res Commun **296**(5): 1077-82.
- Lipowsky, H. H., S. Kovalcheck, et al. (1978). "The distribution of blood rheological parameters in the microvasculature of cat mesentery." Circ Res **43**(5): 738-49.
- Lloyd, J. D., M. J. Marke, 3rd, et al. (2007). "Closure techniques." Emerg Med Clin North Am **25**(1): 73-81.
- Loppnow, H., K. Werdan, et al. (2008). "Vascular cells contribute to atherosclerosis by cytokine- and innate-immunity-related inflammatory mechanisms." Innate Immun **14**(2): 63-87.
- Mackowiak, P. A. (2000). "Brief history of antipyretic therapy." Clin Infect Dis **31** **Suppl 5**: S154-6.

- MacLellan, C. L., D. L. Clark, et al. (2009). "Use of prolonged hypothermia to treat ischemic and hemorrhagic stroke." J Neurotrauma **26**(3): 313-23.
- Mangano, D. T., R. D. Rieves, et al. (2006). "Judging the safety of aprotinin." N Engl J Med **355**(21): 2261-2.
- Manukhina, E. B., H. F. Downey, et al. (2006). "Role of nitric oxide in cardiovascular adaptation to intermittent hypoxia." Exp Biol Med (Maywood) **231**(4): 343-65.
- Meeusen, R. and P. Lievens (1986). "The use of cryotherapy in sports injuries." Sports Med **3**(6): 398-414.
- Menezes, T. N., J. B. Carnielli, et al. (2012) "Local inflammatory response induced by scorpionfish *Scorpaena plumieri* venom in mice." Toxicon **60**(1): 4-11.
- Menger, M. D., M. W. Laschke, et al. (2002). "Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber." Eur Surg Res **34**(1-2): 83-91.
- Menger, M. D., M. Rucker, et al. (1997). "Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow"." Shock **8**(1): 2-7.
- Menth-Chiari, W. A., W. W. Curl, et al. (1998). "Contusion of skeletal muscle increases leukocyte-endothelial cell interactions: an intravital-microscopy study in rats." J Trauma **45**(4): 709-14.
- Murkin, J. M. (2009). "Lessons Learned in Antifibrinolytic Therapy: The BART Trial." Semin Cardiothorac Vasc Anesth **13**(2): 127-31.
- Nanobashvili, J., C. Neumayer, et al. (2003). "Development of 'no-reflow' phenomenon in ischemia/reperfusion injury: failure of active vasomotility and not simply passive vasoconstriction." Eur Surg Res **35**(5): 417-24.
- Nishikawa, Y., D. W. Stepp, et al. (2004). "In vivo role of heme oxygenase in ischemic coronary vasodilation." Am J Physiol Heart Circ Physiol **286**(6): H2296-304.
- Okazaki, Y. and A. Matsukawa (2009). "Pathophysiology of sepsis and recent patents on the diagnosis, treatment and prophylaxis for sepsis." Recent Pat Inflamm Allergy Drug Discov **3**(1): 26-32.
- Orchard, J., A. Massey, et al. (2008). "Successful management of tendinopathy with injections of the MMP-inhibitor aprotinin." Clin Orthop Relat Res **466**(7): 1625-32.
- Overhaus, M., B. A. Moore, et al. (2006). "Biliverdin protects against polymicrobial sepsis by modulating inflammatory mediators." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **290**(4): G695-703.
- Pape, H. C., P. V. Giannoudis, et al. (2005). "Timing of fixation of major fractures in blunt polytrauma: role of conventional indicators in clinical decision making." J Orthop Trauma **19**(8): 551-62.
- Papenfuss, H. D., J. F. Gross, et al. (1979). "A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold." Microvasc Res **18**(3): 311-8.

- Polderman, K. H. (2004). "Application of therapeutic hypothermia in the ICU: opportunities and pitfalls of a promising treatment modality. Part 1: Indications and evidence." Intensive Care Med **30**(4): 556-75.
- Proske, S., B. Vollmar, et al. (2000). "Microvascular consequences of thrombosis in small venules: an in vivo microscopic study using a novel model in the ear of the hairless mouse." Thromb Res **98**(6): 491-8.
- Reddy, P., S. Najundaswamy, et al. (2003). "Tin-mesoporphyrin in the treatment of severe hyperbilirubinemia in a very-low-birth-weight infant." J Perinatol **23**(6): 507-8.
- Royston, D. (1990). "The serine antiprotease aprotinin (Trasylol): a novel approach to reducing postoperative bleeding." Blood Coagul Fibrinolysis **1**(1): 55-69.
- Rucker, M., M. W. Laschke, et al. (2009). "Local preconditioning by thermal stress accelerates microvascular thrombus formation." Shock **31**(6): 627-33.
- Sahuquillo, J., A. Biestro, et al. (2001). "[The use of moderate hypothermia in the treatment of patients with severe craniocerebral trauma]." Neurocirugia (Astur) **12**(1): 23-35.
- Schaser, K. D., J. F. Stover, et al. (2006). "Local cooling restores microcirculatory hemodynamics after closed soft-tissue trauma in rats." J Trauma **61**(3): 642-9.
- Schaser, K. D., B. Vollmar, et al. (1999). "In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury." J Orthop Res **17**(5): 678-85.
- Scheingraber, S., S. Messner, et al. (2009). "Metalloporphyrins, used for HO-1 inhibition, themselves affect hepatic microcirculation, liver function, and hepatocellular integrity." Microcirculation **16**(4): 355-63.
- Schwab, S., D. Georgiadis, et al. (2001). "Feasibility and safety of moderate hypothermia after massive hemispheric infarction." Stroke **32**(9): 2033-5.
- Smith, T. L., W. W. Curl, et al. (1993). "New skeletal muscle model for the longitudinal study of alterations in microcirculation following contusion and cryotherapy." Microsurgery **14**(8): 487-93.
- Soehnlein, O., A. Zernecke, et al. (2008). "Neutrophil secretion products pave the way for inflammatory monocytes." Blood **112**(4): 1461-71.
- Steinbauer, M., A. G. Harris, et al. (2000). "Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model." Langenbecks Arch Surg **385**(4): 290-8.
- Steinhoff, K. W. (2004). "Attention-deficit/hyperactivity disorder: medication treatment-dosing and duration of action." Am J Manag Care **10**(4 S3suppl): S99-106.
- Sternberg, E. M., G. P. Chrousos, et al. (1992). "The stress response and the regulation of inflammatory disease." Ann Intern Med **117**(10): 854-66.
- Sterz, F., M. Holzer, et al. (2003). "Hypothermia after cardiac arrest: a treatment that works." Curr Opin Crit Care **9**(3): 205-10.

- Szczesny, G., D. Nolte, et al. (2000). "A new chamber technique for intravital microscopic observations in the different soft tissue layers of mouse hindleg." J Trauma **49**(6): 1108-15.
- Taylor, C. R. (2011). "From microscopy to whole slide digital images: a century and a half of image analysis." Appl Immunohistochem Mol Morphol **19**(6): 491-3.
- Thorlacius, H., B. Vollmar, et al. (1998). "Effects of local cooling on microvascular hemodynamics and leukocyte adhesion in the striated muscle of hamsters." J Trauma **45**(4): 715-9.
- Toft, P., S. K. Andersen, et al. (2003). "[The systematic inflammatory response after major trauma]." Ugeskr Laeger **165**(7): 669-72.
- Trott, A. (1988). "Mechanisms of surface soft tissue trauma." Ann Emerg Med **17**(12): 1279-83.
- Ulker, S., M. G. Cinar, et al. (2001). "Aprotinin impairs endothelium-dependent relaxation in rat aorta and inhibits nitric oxide release from rat coronary endothelial cells." Cardiovasc Res **50**(3): 589-96.
- Ulker, S., P. P. McKeown, et al. (2002). "Aprotinin impairs coronary endothelial function and down-regulates endothelial NOS in rat coronary microvascular endothelial cells." Cardiovasc Res **55**(4): 830-7.
- Vaday, G. G., H. Schor, et al. (2001). "Transforming growth factor-beta suppresses tumor necrosis factor alpha-induced matrix metalloproteinase-9 expression in monocytes." J Leukoc Biol **69**(4): 613-21.
- Valaes, T., S. Petmezaki, et al. (1994). "Control of jaundice in preterm newborns by an inhibitor of bilirubin production: studies with tin-mesoporphyrin." Pediatrics **93**(1): 1-11.
- Vaporciyan, A. A., J. B. Putnam, Jr., et al. (2004). "The potential role of aprotinin in the perioperative management of malignant tumors." J Am Coll Surg **198**(2): 266-78.
- Vollmar, B., M. Morgenthaler, et al. (2000). "Skin microvascular adaptations during maturation and aging of hairless mice." Am J Physiol Heart Circ Physiol **279**(4): H1591-9.
- Wagener, F. A., H. D. Volk, et al. (2003). "Different faces of the heme-heme oxygenase system in inflammation." Pharmacol Rev **55**(3): 551-71.
- Wagner, K. R., Y. Hua, et al. (2000). "Tin-mesoporphyrin, a potent heme oxygenase inhibitor, for treatment of intracerebral hemorrhage: in vivo and in vitro studies." Cell Mol Biol (Noisy-le-grand) **46**(3): 597-608.
- Wang, W. P., X. Guo, et al. (2001). "Protective role of heme oxygenase-1 on trinitrobenzene sulfonic acid-induced colitis in rats." Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol **281**(2): G586-94.
- Warnaar, N., S. V. Mallett, et al. (2009). "Aprotinin and the risk of thrombotic complications after liver transplantation: a retrospective analysis of 1492 patients." Liver Transpl **15**(7): 747-53.
- Wassermann, D. (2002). "[Evaluation and first aid of burned patients]." Rev Prat **52**(20): 2228-33.

- Watts, S. W., S. F. Morrison, et al. (2012). "Serotonin and blood pressure regulation." Pharmacol Rev **64**(2): 359-88.
- Westermann, S., B. Vollmar, et al. (1999). "Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle." Surgery **126**(5): 881-9.
- Whitten, C. W., P. M. Allison, et al. (1994). "Administration of high-dose aprotinin during nonprimary cardiovascular surgery: case reports and review of the literature." J Clin Anesth **6**(6): 515-20.
- Yam, L. T., C. Y. Li, et al. (1971). "Cytochemical identification of monocytes and granulocytes." Am J Clin Pathol **55**(3): 283-90.
- Yamauchi, J., B. Vollmar, et al. (1999). "Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction." Dig Surg **16**(5): 400-6.
- Yousef, G. M. and E. P. Diamandis (2001). "The new human tissue kallikrein gene family: structure, function, and association to disease." Endocr Rev **22**(2): 184-204.
- Zhang, H., M. Zhou, et al. (2008). "Therapeutic effect of post-ischemic hypothermia duration on cerebral ischemic injury." Neurol Res **30**(4): 332-6.

11. Publikationen

Unsere wissenschaftliche Arbeit wurde 09/2008 auf den 12. Chirurgischen Forschungstagen in Freiburg, Deutschland, vorgestellt:

Impact of local cooling on microcirculatory dysfunction and leukocytic inflammation after soft-tissue trauma

C. Heinen, M. Amon, S. Dold, M.W. Laschke and M.D. Menger

Institute for Clinical & Experimental Surgery, University of Saarland, Homburg/Saar, Germany

Zudem wurde sie 09/2010 auf den 14. Chirurgischen Forschungstagen in Rostock, Deutschland, präsentiert:

Aprotinin improves microvascular perfusion and protects against leukocytic inflammation after soft-tissue trauma

C.V. Heinen, M. Amon, M.W. Laschke, J. Roller, M.D. Menger

Institute for Clinical & Experimental Surgery, University of Saarland, 66421 Homburg/Saar, Germany

Folgendes Manuskript ist in Vorbereitung:

Cooling protects by HO-1 action

C. Heinen-Vees, M.W. Laschke and M.D. Menger

Institute for Clinical & Experimental Surgery, University of Saarland, Homburg/Saar, Germany

12. Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand unter der Betreuung von Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger, dem Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes. Ihm gilt mein besonderer Dank für die Überlassung des Themas, seine hilfreichen Anregungen und seine Unterstützung.

Erwähnt und bedankt seien ebenfalls Dr. Claudia Scheuer, Janine Becker und Ruth Nickels, die bei der Erstellung der histologischen und immunhistologischen Präparate eine hervorragende Arbeit geleistet haben.

An dieser Stelle möchte ich auch der sorgfältigen und umsichtigen Arbeit der Mitarbeiter der Versuchstierhaltung danken und darunter insbesondere Elisabeth Gluding, Leiterin der Versuchstierhaltung.

Ganz herzlich danke ich meinem Mann Jochen, der immer mein Pfeiler war, ist und sein wird.

Mein Dank gilt ebenfalls meinen Eltern, die mich stetig unterstützt haben in dieser anspruchsvollen Aufgabe.

In ihrer Rolle als Lektorin stand mir meine Tante Margret mit ihrer sprachlichen Versiertheit stets zur Seite. Danke.

Dankend erwähnt sei ebenfalls Max, der mir in der Schlußphase unter die Arme gegriffen hat.