

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie

der Universität des Saarlandes

(Direktor: Prof. Dr. med. M. D. Menger)

## **Die Heilung von Inzisionswunden nach lokalem Weichteiltrauma**

**- Eine intravitalmikroskopische Untersuchung an der Maus -**

*als Dissertationsschrift*

*zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin*

*an der Medizinischen Fakultät der Universität des Saarlandes*

vorgelegt von

Nora Verena Schmid

geboren am 24.11.1983 in Homburg/Saar

2011

**Dekan:** Prof. Dr. med. M. D. Menger

**1. Gutachter:**

**2. Gutachter:**

Jahr der Promotion: 2012

**meiner Familie in Dankbarkeit gewidmet**

# Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
1.1. Zusammenfassung	1
1.2. Summary	3
2. Einleitung	5
2.1. Wundheilung	5
2.1.1. Definition	5
2.1.2. Phasen der Wundheilung	5
2.1.2.1. Exsudationsphase	6
2.1.2.2. Resorptionsphase	8
2.1.2.3. Proliferationsphase	8
2.1.2.4. Reparationsphase	8
2.1.3. Neovaskularisation	9
2.1.4. Formen der Wundheilung	10
2.1.5. Externe Einflussfaktoren auf die Wundheilung	11
2.2. Auswirkungen der lokalen Weichteilschädigung	14
2.3. Heilung von Inzisionswunden nach lokalem Weichteilschaden	18
3. Ziel der Studie	20
4. Material und Methodik	21
4.1. Versuchstiere	21
4.2. Modell	21
4.2.1. Mikrozirkulationsmodell der Rückenhautkammer	21
4.2.2. Anästhesie	21

4.2.3. Implantation der Rückenhautkammer	22
4.2.4. Ausschlusskriterien	24
4.2.5. Induktion des Weichteiltraumas	25
4.2.6. Induktion der Inzisionswunde	26
4.3. Experimentelles Protokoll	28
4.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	29
4.4.1. Intravitales Fluoreszenzmikroskop	29
4.4.2. Fluoreszenzfarbstoffe	31
4.4.2.1. Rhodamin 6G	31
4.4.2.2. Fluoreszein-Isotiozyanat (FITC)	32
4.4.3. Intravitalmikroskopisches Protokoll	32
4.5. Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen	34
4.5.1. CapImage	34
4.5.2. OP-Mikroskop	35
4.5.3. Mikrozirkulatorische Parameter	35
4.5.3.1. Arteriöle und venuläre Blutzellgeschwindigkeit	36
4.5.3.2. Arteriöle und venuläre Durchmesser	36
4.5.3.3. Arteriöler und venulärer volumetrischer Blutfluss	36
4.5.3.4. Funktionelle Kapillardichte	37
4.5.3.5. Angiogenese	37
4.5.3.6. Arteriöle und venuläre Leukozytenadhärenz	37
4.5.3.7. Nekrose	38
4.5.3.8. Makromolekulare Permeabilität	39
4.5.3.9. Übersicht Untersuchungsparameter	40
4.6. Histologie und Immunhistochemie	40
4.7. Datenerfassung und graphische Darstellung	41

4.8. Statistik	41
5. Ergebnisse	42
5.1. Heilung von Inzisionswunden in nicht-traumatisiertem Gewebe	42
5.1.1. Inoskulation und Angiogenese	42
5.1.2. Funktionelle Kapillardichte und Angiogenese	42
5.1.3. Arteriöler und venöler Blutfluss inzidiertes GefäÙe	45
5.1.4. Nekrose	47
5.1.5. Leukozytenadhärenz	47
5.1.6. Histologie und Immunhistochemie	48
5.2. Heilung von Inzisionswunden in traumatisiertem Gewebe	50
5.2.1. Trauma-assoziierte mikrozykulatorische Dysfunktion	50
5.2.2. Inoskulation und Angiogenese	51
5.2.3. Funktionelle Kapillardichte	53
5.2.4. Arteriöler und venöler Blutfluss	57
5.2.5. Nekrose und Trauma-assoziierte Entzündungsreaktion	59
5.2.6. Mikrovasculäre Permeabilität	62
5.2.7. Histologie und Immunhistochemie	63
6. Diskussion	66
6.1. Diskussion des Modells	66
6.2. Diskussion der Untersuchungstechnik	69
6.3. Diskussion der Ergebnisse	70
6.3.1. Inoskulation	71
6.3.2. Angiogenese und funktionelle Kapillardichte	75
6.3.3. Mikrovasculäre Dysfunktion	77
6.3.4. Mikrovasculäre Permeabilität, Nekrose und Entzündungsreaktion	78

7.	Schlussfolgerung	81
8.	Verzeichnis der Abkürzungen	82
9.	Literaturverzeichnis	84
10.	Danksagung	95
11.	Veröffentlichungen	96
12.	Lebenslauf	98

# 1. Zusammenfassung

## 1.1. Zusammenfassung

Die verzögerte Wundheilung nach chirurgischen Eingriffen stellt nach wie vor ein Problem dar, das zur erhöhten Morbidität und Mortalität der Patienten sowie zu deutlich erhöhten Kosten im Gesundheitswesen beiträgt. Bei Patienten, die eine ausgeprägte Weichteilschädigung aufweisen, sei es als isolierte Verletzung oder im Rahmen von knöchernen Verletzungen oder einer Schädigung innerer Organe, ist oft ein chirurgisch-operatives Vorgehen indiziert. Nicht immer ist es hierbei möglich, Inzisionen und Nähte zum Wundverschluss auf ausschließlich gesundes Gewebe zu beschränken. Daraus ergibt sich oftmals eine verzögerte und unvollständige Wundheilung, bzw. eine sekundäre Wunddehiscenz mit der Konsequenz einer verzögerten Rehabilitation. Oftmals hat dies wiederholte chirurgische Revisionen zur Folge. Da fundierte Grundlagen zum Mechanismus der Wundheilung im traumatisierten Gewebe nur in unzureichendem Ausmaß vorliegen, war es das Ziel der vorliegenden Arbeit, den Einfluss des vorangehenden Weichteilschadens auf die Wundheilung am in-vivo-Modell der Rückenhautkammer an der Maus zu untersuchen. Die Untersuchungen konzentrierten sich hierbei v.a. auf die Manifestation von Angiogenese, Inoskulation und Nekrose nach der Induktion einer akuten chirurgischen Wunde. Hierzu wurde die Technik der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie verwendet, die eine repetitive Analyse der angiogenen und inflammatorischen Reaktion während den Phasen der Wundheilung in der Rückenhautkammer ermöglichte.

Für die Untersuchungen wurden insgesamt 47 ausgewachsenen C57BL/6-Mäusen eine Rückenhautkammer implantiert. Das Weichteilgewebe in der Kammer wurde einem schweren mechanischen Trauma ( $450 \text{ J/m}^2$ ) ausgesetzt. Anschließend wurde im traumatisierten Gewebe eine chirurgische Inzision von 3 mm Länge gesetzt. Die Wundränder wurden unmittelbar im Anschluss mit 3 Einzelknopfnähten adaptiert. Die einzelnen Versuchsgruppen unterschieden sich in dem zeitlichen Abstand der Inzision zum Weichteiltrauma: Zunächst erfolgte die Analyse der Wundheilung bei Tieren, welche unmittelbar nach Trauma einer chirurgischen Inzision ausgesetzt waren (Inzision direkt nach Trauma,  $n=7$ ). In weiteren Gruppen analysierten wir die Wundheilung in Mäusen, welche die chirurgische Inzision 24 Stunden (Inzision 1d nach Trauma,  $n=6$ ), 3 Tage (Inzision 3d nach Trauma,  $n=9$ ) sowie 5 Tage (Inzision 5d nach Trauma,  $n=7$ ) nach Trauma erhielten. Unverletzte Rückenhautkammern dienten als Kontrolle (keine Inzision, kein Trauma, sham 1,  $n=5$ ). Nicht-traumatisierte Tiere (Inzision, kein Trauma, sham 2,  $n=8$ ), sowie traumatisierte Tiere ohne Wundinduktion (keine

Inzision, Trauma, sham 3, n=6) dienten ebenfalls als Kontrolle. Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie wurde dann (i) der arterioläre und venuläre Blutfluss im Wundgebiet, (ii) die funktionelle Kapillardichte und angiogene Reaktion, sowie (iii) die Manifestation von Inoskulation und (iv) Nekrose analysiert. Gleichzeitig untersuchten wir (v) die arterioläre und venuläre Leukozytenadhärenz und (vi) interstitielle Ödembildung im Wundgebiet 2, 4, 6 und 10 Tage nach Wundinduktion.

Nach der chirurgischen Inzision konnte der Perfusionsabfall im Wundgebiet sowohl in zuvor traumatisiertem als auch nicht-traumatisiertem Gewebe durch die Ausbildung von Angiogenese und Inoskulation der durchtrennten Gefäße kompensiert werden. Letztere konnte in allen Gruppen in Venolen, niemals aber in Arteriolen, nachgewiesen werden. Während die Angiogenese im Wundheilungsverlauf einen kontinuierlichen Anstieg zeigte, wurde die initial nicht-perfundierte Fläche im Inzisionsgebiet zunehmend kleiner. Die chirurgische Inzision bewirkte in allen Versuchsgruppen eine angiogene Reaktion im OP-Gebiet. Im Vergleich zu anderen Gruppen zeigte sich jedoch bei Tieren, welche der Inzision 24 Stunden nach Trauma ausgesetzt waren, ein signifikant geringerer angiogener Prozess bei gleichzeitig nur unzureichender Reperfusion des initial nicht-perfundierten Areal. In 3 von 6 Mäusen dieser Gruppe fand sich eine unvollständige Heilung der Inzisionswunde. Um die Nekrose konnte in allen Fällen eine Entzündungsreaktion und Ödembildung beobachtet werden. Inzidierte Gefäße aller Gruppen wiesen eine starke Reduktion des arteriolären und venulären Blutflusses auf, ohne dass im weiteren Verlauf die initialen Werte vor Wundinduktion wieder erreicht werden konnten.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass der initiale nutritive Perfusionsausfall im Wundgebiet durch kapillare Angiogenese im Heilungsverlauf kompensiert werden kann. Weiterhin sind durchtrennte Venolen, nicht jedoch Kapillaren und Arteriolen, dazu in der Lage, über Inoskulation reperfundiert zu werden.

Ein vorangegangenes Weichteiltrauma führt zu einer irreversiblen mikrozirkulatorischen Dysfunktion, welche mit einer verzögerten Wundheilung einhergeht. Die vorliegende Studie zeigt, dass insbesondere eine Inzision 24 Stunden nach Weichteiltrauma mit einer erhöhten Nekroserate bei gleichzeitig reduzierter angiogener Reaktion, sowie reaktiven inflammatorischen Reaktion im Wundgebiet einhergeht.

Eine chirurgische Intervention 24 Stunden nach Weichteiltrauma könnte somit zu einer erhöhten Rate von Wundheilungsstörungen in der klinischen Praxis führen. Die Wahl des korrekten Zeitpunktes der Operation ist folglich essentiell notwendig zur Reduktion von Wundheilungsstörungen bei z.B. polytraumatisierten Patienten zur Sicherung einer

suffizienten Blutzirkulation im Wundgebiet und Vermeidung einer erhöhten Morbidität und Mortalität nach chirurgischen Eingriffen.

## 1.2. Summary

Delayed wound healing after surgical procedures continues to be a problem that contributes to increased morbidity and mortality of patients and, as a consequence, increased health care costs. In patients who were exposed to a strong soft tissue injury, either as isolated injury, bone injuries or injuries of internal organs, a surgical procedure is often indicated. For these surgical procedures the incisions frequently have to be placed in the traumatized tissue. This often results in a delayed or incomplete wound healing with persistent wound dehiscence. As a consequence, surgical revisions are necessary. The herein presented study was conducted to analyze the effect of a previous soft-tissue trauma on incisional wound healing in mice. Hereby, special attention was paid on the analysis of angiogenesis, inosculation and necrosis in acute wound healing. The present study aimed at quantitatively evaluating the impact of time span between a local soft-tissue trauma and incisional wounding on manifestation of injury-associated microcirculatory and inflammatory response in a chronic wound model that allowed repeated analyses by intravital fluorescence microscopy.

Therefore, a chronic dorsal skinfold chamber was implanted into 47 adult C57BL/6 mice. The tissue under observation was subjected to severe trauma ( $450 \text{ J/m}^2$ ). Subsequently, mice were subjected a local surgical incision of 3 mm length. Three stitches were necessary for wound adaption. The experimental groups differed in the time span between the incision and the soft tissue trauma: first, we analyzed the wound healing in animals which received an incision directly after trauma (incision directly after trauma,  $n=7$ ). Additional mice received the surgical incision 24 hours (incision 1d after trauma,  $n=6$ ), 3 days (incision 3d after trauma,  $n=9$ ) and 5 days (incision 5d after trauma,  $n=7$ ) after trauma. Uninjured dorsal skin chambers served as controls (no incision, no trauma, sham 1,  $n=5$ ). Non-traumatized mice receiving only an incision also served as controls (incision, no trauma, sham 2,  $n=8$ ). The third control group consisted of traumatized animals without incision (no incision, trauma, sham 3,  $n=6$ ). By means of intravital fluorescence microscopy, (i) arteriolar and venular blood flow in the wound, (ii) the functional capillary density and angiogenesis, (iii) the manifestation of inosculation and (iv) tissue necrosis were evaluated. Moreover, we analyzed (v) the arteriolar and venular leukocyte adhesion and (vi) interstitial edema formation before and 2, 4, 6 and 10 days after the incision.

Of interest, the microcirculatory dysfunction after a local surgical trauma could be compensated by development of angiogenesis and inosculation. These findings were evident in traumatized as well as non-traumatized experimental groups. Inosculation of dissected blood vessels could be observed only in venules, but not in arterioles. Reciprocal to angiogenesis, which showed a constant increase during the process of wound healing, the initial non-perfused area declined during the observation period. The surgical incision induced in all experimental groups an angiogenic response in the injured area. Compared to the other groups, animals which received an incision 24 hours after soft-tissue trauma showed a significantly reduced angiogenesis and only inadequate reperfusion of the non-perfused tissue area. In 3 out of 6 animals of this group wound healing was incomplete and associated with manifestation of tissue necrosis. An inflammatory response and interstitial oedema around the wound could be regularly observed. Severed vessels of all animals showed a massive reduction of blood flow with moderate but not complete recovery during the observation period.

In summary, the blood circulation in acute wounds could be partially recovered by angiogenesis and inosculation. The process of inosculation could only be observed in the venular blood system.

A previous severe soft-tissue trauma provokes irreversible microcirculatory dysfunction, which is associated with delayed wound healing. The present study demonstrates that an incision 24 hours after a soft-tissue trauma causes tissue necrosis, a surrounding inflammatory response, and a reduced microvascular blood flow due to reduced angiogenesis and microvascular dysfunction. This indicates that a surgery 24 hours after soft-tissue trauma could be responsible for impaired wound healing in clinical practice. Thus, the selection of the correct time point for the surgical intervention in (poly-) traumatized patients is essentially necessary for an adequate blood circulation in acute wounds and could avoid the increased morbidity and mortality after surgery.

## 2. Einleitung

### 2.1. Wundheilung

#### 2.1.1. Definition

Eine Wunde ist definiert als Durchtrennung oder Schädigung der Haut, wobei die Verletzung je nach Schweregrad zur weiteren Schädigung des gesamten Organismus führen kann (Siewert 2001).

Als Wundheilung bezeichnet man den körpereigenen Verschluss einer Wunde durch die weitestgehende Wiederherstellung des beschädigten Körpergewebes. Sie stellt den Versuch eines Organismus dar, eine bestehende Wunde in kürzester Zeit zu verschließen und die Funktion des verletzten Gewebes weitestmöglich wiederherzustellen (Jonson&Jonson).

Eine Wundheilungsstörung wird durch die Abweichung des Wundheilungsprozesses vom physiologischen Wundheilungsverlauf definiert. Sie liegt dann vor, wenn Wunden gar nicht oder nur schlecht heilen (Schick 2001). Sie können durch lokale oder systemische Einflussfaktoren bedingt sein.

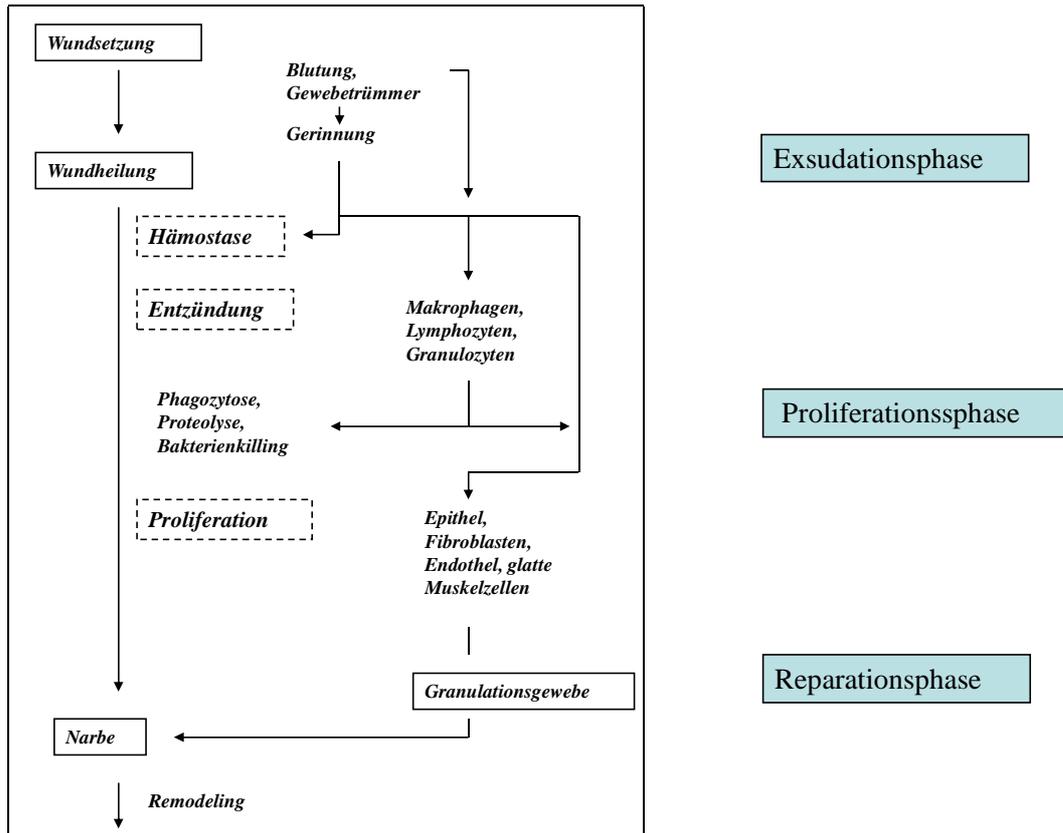
#### 2.1.2. Phasen der Wundheilung

Die Wundheilung ist ein komplexer und biologisch dynamischer Prozess. Eine in ihrem Ablauf ungestörte Wundheilung spielt fächerübergreifend eine zentrale Rolle in der klinischen Praxis und stellt eine der wichtigsten Anforderungen im Klinikalltag dar (Toyokawa, Matsui et al. 2003). Hierbei beeinflussen Art, Schwere und Lokalisation einer mechanischen, physikalischen, thermischen oder chemischen Gewebsschädigung das Ausmaß und den Ablauf des Wundheilungsvorgangs (Weise und Hirner 2004).

Das wohl bekannteste Modell der Wundheilung unterteilt diese in vier Phasen (Lippert, Tautenhahn und Piatek 2006):

- Exsudationsphase
- (Resorptive Phase)
- Granulations- bzw. Proliferationsphase
- Reparative Phase

Andere Autoren unterteilen den Ablauf der Wundheilung in lediglich 3 Phasen (Pschyrembel 1998), wobei diese als temporär einander überlappend zur Darstellung kommen und somit nur willkürlich voneinander unterschieden werden können (**Abb. 1**).



**Abb. 1:** Immunologische Vorgänge (links) und Stadien der Wundheilung (rechts) (Weise und Hirner 2004).

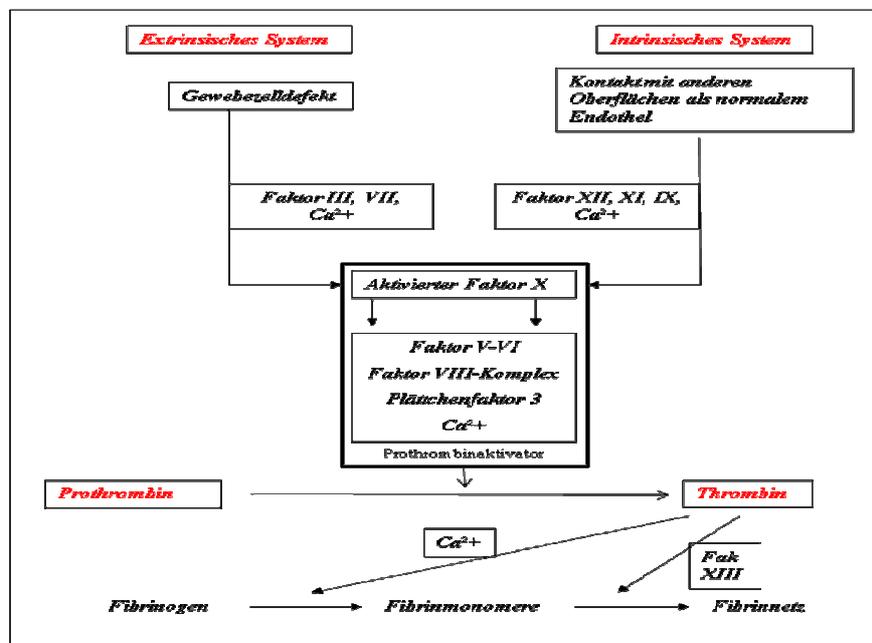
#### 2.1.2.1. Exsudationsphase (1.-8. Stunde)

Die exsudative Phase ist gekennzeichnet durch die sogenannte Schorfbildung. Der provisorische Wundverschluss setzt innerhalb von kürzester Zeit nach der Verletzung ein, hervorgerufen durch die Exsudation von Blutbestandteilen und Blutplasma infolge von Gefäßläsionen und Mikrozirkulationsstörungen. Ziel dieser „ersten Hilfe“ ist die primäre Blutstillung. Zuerst wird die durch die Verletzung entstandene Gewebelücke durch Wundsekret ausgefüllt. Das Sekret stammt aus Substanzen in Lymphe und Blut, die zuvor aus rupturierten Gefäßen und Gewebstücken ins Wundgebiet einfließen. Die hier zu beobachtende Vasokonstriktion dient zur akuten Blutstillung und konsekutiven Verminderung des Blutverlustes. Sie wird im weiteren Verlauf von einer Vasodilatation der verletzten Gefäße abgelöst und dauert 5-10 Minuten (Lippert, Tautenhahn und Piatek 2006). Leukozyten und Thrombozyten infiltrieren das Wundareal. Dabei haften die eingewanderten aktivierten Leukozyten in kurzer Zeit bestenfalls am gesamten Gefäßendothel. Hierbei ist die Leukozytenadhärenz vornehmlich in Venolen zu beobachten, weniger in Arteriolen. Durch das Haftenbleiben von weiteren sich in der Blutbahn befindenden Thrombozyten und

Erythrozyten okkludiert das Gefäß und der initiale Blutverlust im verletzten Gewebe kann gemindert, bestenfalls kurzfristig sogar gestoppt werden. Aufgrund der mechanischen Schädigung der Gefäße werden parallel zu diesen Vorgängen zunehmend Kollagenstrukturen exprimiert, an welchen Thrombozyten aggregieren und den Prozess weiter antreiben. In zahlreichen Studien der letzten Jahre konnte hier die Beteiligung von diversen Wachstumsfaktoren, Zytokinen und Adhäsionsmolekülen nachgewiesen werden (Weise und Schaffer 2000). Vornehmlich Thrombozyten sezernieren die an der Wundheilung im Wesentlichen beteiligten Wachstumsfaktoren, u.a.:

- Transforming growth factor –  $\beta$  (TGF- $\beta$ )
- Platelet-derived growth factor (PDGF)
- Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)
- Epidermal growth factor (EGF)

Die Aktivierung der Gerinnungskaskade (**Abb. 2**) (Schauf, Moffett und Moffett 1993) sowie Aggregation der Thrombozyten resultiert in einer Wundverklebung mit unlöslichem Fibrin. Eine Vasodilatation der traumatisierten Gefäße mit konsekutiver Verlangsamung des Blutflusses und Erhöhung der Gefäßpermeabilität schließt sich diesem Vorgang an.



**Abb. 2:** Schema der Blutgerinnung (Schauf, Moffett und Moffett 1993)

#### 2.1.2.2. Resorptionsphase (1.-4. Tag)

Die Phase wird eingeleitet durch die Migration neutrophiler Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten ins Wundgebiet. Hauptaufgabe der neutrophilen Granulozyten besteht darin, nekrotische und apoptotische Zellen zu phagozytieren. Die Phagozytose von Bakterien wird vornehmlich von Makrophagen übernommen. Parallel zu diesen Prozessen werden verschiedene Enzyme sezerniert, welche zusätzlich zur Lyse des apoptotischen und nekrotischen Zellmaterials beitragen. Auch T-Lymphozyten werden über die Ausschüttung von Monokinen zur Reinigung und konsekutiven Infektsanierung im Wundbereich aktiviert. Zusammenfassend kommt es in dieser Phase der Wundheilung zur katabolen Autolyse im verletzten Gewebe.

#### 2.1.2.3. Proliferationsphase ( 3.-10.Tag)

Diese Phase ist gekennzeichnet durch die anabole Reparation mittels Kollagen. Durch im Wundgebiet sezernierte Wachstumsfaktoren, insbesondere bFGF, wird diese eingeleitet. Im Vordergrund stehen hier die Fibroblastenproliferation sowie der angiogene Prozess. Angiogenese ist einer der wichtigsten Determinanten im Prozess der Wundheilung (vgl. Kap. 2.3.4) und ist gekennzeichnet durch die Einsprossung von Kapillarendothel. Die Wundfläche wird reepithelisiert und gewinnt letztlich durch zunehmende Kollagen- und Mukopolysaccharidproduktion an Reißfestigkeit. Hierdurch erlangt das Gewebe außerdem eine vermehrte Resistenz gegenüber extern einwirkender Noxen (Lippert, Tautenhahn und Piatek 2006).

#### 2.1.2.4. Reparationsphase/Modulationsphase (ab 7.Tag)

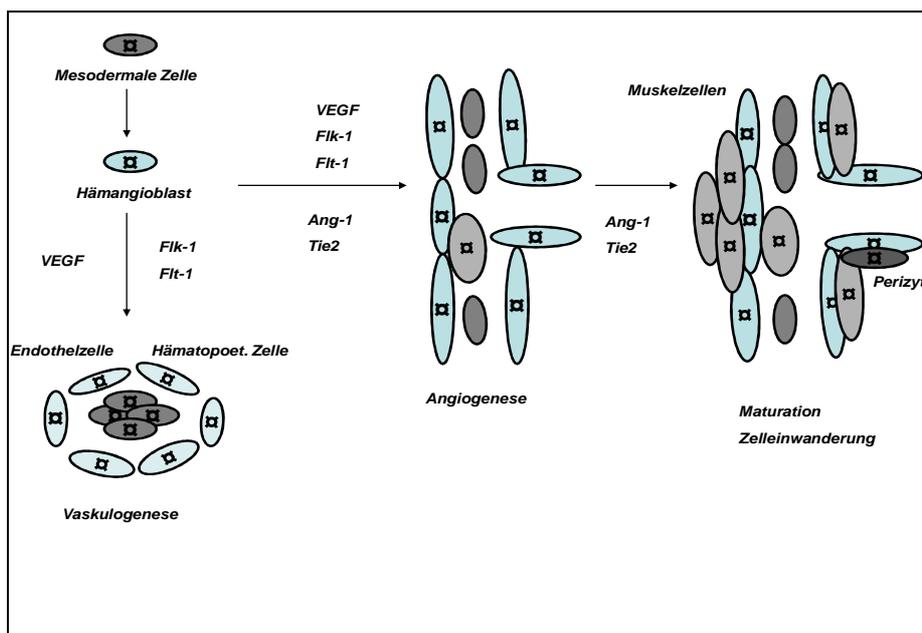
In dieser Phase entsteht das endgültige Narbengewebe. Die Wunde erlangt unter physiologischen Bedingungen seine Kontinuität und bestenfalls seine endgültige Reißfestigkeit wieder. Nach der Vernetzung der Kollagenfasen erneuert sich das Plattenepithel der Haut. Die Epithelzellen migrieren hierfür in der Regel vom Wundrand in Richtung Zentrum der Wunde. Kommt es während der Migration zur Kollision der wandernden Epithelzellen, wird der mitotische Prozess abgebrochen. Das entstandene Narbengewebe besitzt keine Talg- oder Schweißdrüsen und erscheint bei fehlender Regenerationsfähigkeit der Melanozyten weiß-perlmutterartig.

### 2.1.3. Neovaskularisation

Die Neovaskularisation ist Grundvoraussetzung für den Ablauf der Wundheilung unter physiologischen Bedingungen. Diesem Prozess soll ein gesondertes Kapitel gewidmet werden. Neovaskularisation wird in zwei unterschiedliche Prozesse unterteilt: Angiogenese und Vaskulogenese.

Angiogenese ist definiert als die Aussprossung eines neuen komplexen Kapillarnetzwerkes aus präexistenten Blutgefäßen. Die Ausbildung neuer Gefäße hat die Aufgabe ein minderdurchblutetes Organ oder Gewebe zu reperfundieren und so die funktionelle Vitalität in diesem Gebiet zu verbessern (Schaper und Ito 1996). Der angiogene Prozess findet seinen Anfang in der enzymatischen Lyse der Basalmembran durch Endothelzellen, welche anschließend in die Peripherie migrieren können. Die Endothelzellen proliferieren und dringen in das umliegende Interstitium ein. Diverse angiogene Zytokine treiben diesen Vorgang voran (Folkman und Shing 1992, Risau 1997). Es entstehen neue Gefäßlumina mit transkapillären Gewebepfeilern (Sherer und Abulafia 2001, Koblizek, Weiss et. al. 1998, Risau 1997) (**Abb. 3**).

Vaskulogenese beschreibt eine de-novo-Bildung von Blutgefäßen aus Vorläuferzellen. Der Prozess beginnt im Knochenmark während der Embryonalentwicklung und endet in der Ausbildung eines komplexen vaskulären Netzwerkes und Gefäßsystems (Risau 1997). Aus dem Mesoderm differenzieren sich Angioblasten und hämatopoetische Zellen (Geva und Jaffee 2000, Tallquist, Soriano und Klinghoffer 1999). Diese formieren sich im weiteren Verlauf zu zellulären Aggregaten und letztlich zu Endothelzellen. Durch die Fusion der Endothelzellen entstehen neue Gefäßlumina (Folkman und Shing 1992) (**Abb. 3**).



**Abb. 3:** Wege der Gefäßneubildung durch Vaskulogenese und Angiogenese unter dem Einfluss von Wachstumsfaktoren (modifiziert nach Breier 1999).

#### 2.1.4. Formen der Wundheilung

Die epitheliale Wundheilung stellt einen regenerativen Prozess dar, bei dem nur die Epidermis und Teile des Coriums verletzt werden. Bleiben hierbei Basalzellen der Epidermis erhalten, so kann eine vollständige Regeneration ohne Narbenbildung erfolgen. Beobachtet lässt sich diese Form der Wundheilung bei oberflächlichen Wunden, wie z.B. Schürfwunden.

Die primäre und sekundäre Wundform sind gekennzeichnet durch einen reparativen Verlauf, d.h. durch die Ausbildung von Narbengewebe. Bei der primären Wundheilung werden angrenzende glatte Wundränder durch einen schmalen Spalt von neuem Bindegewebe überbrückt. Sie ist gekennzeichnet durch einen schnellen und komplikationslosen Verlauf. Nur wenig Gewebe muss neu gebildet werden, um einen adäquaten Wundverschluss zu erzielen. Die *Sanatio per primam intentionem* beobachtet man typischerweise bei chirurgisch gesetzten, sowie traumatischen Wunden mit glatten Rändern ohne wesentliche Vaskularisationsstörungen oder Kontamination (z.B. Schnittverletzungen) (Weise und Hirner 2004). Grundvoraussetzungen für den ungestörten Ablauf der primären Wundheilung sind saubere und gut perfundierte Wundränder.

Sollten Wunden einen höheren Kontaminationsgrad oder zu starke Spannung der Ränder aufweisen, so kann eine postprimäre Verunreinigung der Verletzung drohen. Von verzögerter Primärheilung spricht man, wenn Nähte zwar unmittelbar nach Säuberung und Débridement

angelegt werden, jedoch erst nach Abklingen der entzündlichen Phase im weiteren Verlauf fest verknötet werden, wenn keine Infektion aufgetreten war. Im Anschluss hieran verheilt die Wunde bestenfalls analog zur Primärheilung (Weise und Hirner 2004).

Die sekundäre Wundheilung kommt zum Tragen bei Wunden mit minderperfundierte oder dehiszenten oder gequetschten Wundrändern (z. B. Quetschtraumata, Bissverletzungen, Verbrennungen, usw.). Auch präexistente trophische Störungen resultierten nicht selten in dieser Wundheilungsform. Solche Defekte können nicht primär chirurgisch geschlossen werden, sondern müssen von der Tiefe zur Oberfläche granulieren. Nicht selten muss hier ein chirurgischer Eingriff im Sinne eines Débridements vorausgehen (Abtragung von nekrotischem und kontaminiertem Gewebe). Häufig verbleibt eine funktionsbeeinträchtigende Narbe (Weise und Hirner 2004).

#### 2.1.5. Externe Einflüsse auf den Prozess der Wundheilung

Insgesamt zeigen viele physiologische und pathologische Bedingungen in unterschiedlichem Ausmaß einen Einfluss auf den Prozess der Wundheilung (Kuś, Karowicz-Bilińska et al. 2009, Gilliver, Emmerson et al. 2010).

Wundheilungsstörungen entstehen bei Prozessen, die den physiologischen Ablauf der Wundheilung verzögern oder negativ beeinflussen. Klinisch können sie in unterschiedlichsten Formen imponieren (**Tab. 1**). Nahezu alle Wundheilungsstörungen resultieren in einem protrahierten Krankheitsverlauf und einer verzögerten Rehabilitation. Lokale und systemische Faktoren können zum Auftreten von Wundheilungsstörungen beitragen (**Tab. 2**).

<b>Wundkomplikationen in der klinischen Praxis</b>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Hämatom/Nachblutung</li> <li>• Serom</li> <li>• Dehiszenz der Wunde</li> <li>• Allergische Reaktionen (z.B. Pflaster, Nahtmaterial, Desinfektionsmittel)</li> <li>• Keloidbildung und hypertrophe Narbenbildung</li> <li>• Maligne Entartung (selten)</li> <li>• Infektion/Kontamination</li> </ul>

**Tab. 1:** Wundkomplikationen in der klinischen Praxis.

Lokale Faktoren	Systemische Faktoren
Lokale vorangegangene Gewebeschädigung (z.B. Migrationsdefekt der Epithelien, Ischämie/Nekrose, Nervenschaden, Lokaltherapeutika, Radiatio, Verbrennung, Kälte, Infektion, Hämatom)	Stoffwechsel- und Begleiterkrankungen (z.B. Diabetes mellitus, Leberzirrhose, Anämie, Malignom, Gerinnungsstörungen, Immunsuppression)
Fremdkörper in situ, Art und Schwere der Verletzungen und von Begleitverletzungen	Ernährungszustand (z.B. Kachexie, Adipositas, Albuminmangel, Mangel an Spurenelementen oder Vitaminen)
OP-Techniken (z.B. Nahtmaterial, Nahttechnik, Elektrokoagulation, Druck durch Haken)	Lebensalter, Hormonstatus
	Pharmaka (z.B. Zytostatika, Kortikosteroide, Antikoagulation)
	Gefäßerkrankungen (z.B. pAVK, CVI, Lymphgefäßerkrankungen)
	Mangelnde Mobilität, Nikotin-/Alkoholabusus

**Tab. 2:** Übersicht über lokale und systemische Störfaktoren für die Wundheilung.

Auf einige wichtige Einflussfaktoren, die die Wundheilung stören, soll hier im Detail eingegangen werden. Die chronische Therapie mit Kortikosteroiden führte sowohl in experimentellen als auch in klinischen Studien zu einer deutlich erhöhten Rate von Wundheilungsstörungen (Goforth and Gudas 1980, Spandow, Hellström und Schmidt 1990). Verantwortlich hierfür können zum einen die eingeschränkte Entzündungsreaktion des Gewebes (Zhang and Thorlacius 2000, Polat, Nayci et al. 2002) und die damit verbundene Störung der regulären Phasen sein, zum anderen spielt hier sicher eine erhöhte systemische und lokale Infektanfälligkeit dieser Patienten eine wesentliche Rolle. Zusätzlich wird die Produktion von Wachstumsfaktoren gehemmt, welche für den Prozess der Wundheilung eine entscheidend wichtige Rolle spielen (Chedid, Hoyle et al. 1996).

Da jedoch die Entzündungsantwort des traumatisierten Gewebes unter Umständen zur Gewebeischämie und damit zu einer sekundären Schädigung führt, könnte die Behandlung mit Steroiden unter Umständen auch zu einer verbesserten Wundheilung im Bereich traumatischer Gewebeschädigungen beitragen.

Ein weiterer Faktor, welcher die Wundheilung negativ beeinflusst, ist der Tabakkonsum (Sherwin und Gastwirth 1990). Diverse Studien haben eine anti-angiogene Wirkung des Rauchens in verschiedenen experimentellen Modellen sowie eine verzögerte Wundheilung nach Rauchexposition belegt (Hoogendoorn, Simmermacher et al. 2002). Ein wesentlicher Bestandteil von Zigaretten ist Nikotin. Von dieser Substanz ist bereits bekannt, dass sie im Rahmen pathologischer Prozesse, wie z.B. neoplastischer Veränderungen (Natori, Sata et al. 2003) und Gewebeischämie (Heeschen, Weis et al. 2002), den angiogenen Prozess (Angiogenese) fördert und damit pro-kanzerogenes Potential besitzt. Auch im Rahmen einer Wundheilungsstudie an diabetischen Mäusen konnte in diesem Zusammenhang eine Zunahme der Angiogenese nachgewiesen werden (Jacobi, Jang et al. 2002). Zusätzlich konnte in *in-vitro* Versuchen an isolierten Endothelzellen gezeigt werden, dass Nikotin den apoptotischen Zelltod in hypoxischem Milieu reduziert. Zu den Auswirkungen von Nikotin auf traumatisiertes Gewebe existieren bis dato keine experimentellen Studien.

Cyclooxygenase-2 ist ein induzierbares Enzym, welches im Rahmen entzündlicher Prozesse aber auch im Rahmen der Wundheilung vermehrt synthetisiert wird und damit zur gesteigerten Freisetzung von Prostaglandinen und Thromboxanen führt. Die selektive Inhibition dieses Enzymes resultiert in einer verzögerten Abheilung von Ulzerationen der Magenmukosa und einer verminderten Gefäßdichte (Schmassmann, Peskar et al. 1998). Im Rahmen einer Weichteilverletzung konnte demgegenüber eine Verbesserung der Mikrozirkulation sowie eine Verminderung der entzündlichen Antwort des Gewebes erzielt werden (Gierer, Mittlmeier et al. 2005). Inwieweit nun die Wundheilung in traumatisiertem Gewebe durch die Inhibition der Cyclooxygenase beeinflusst wird, ist bisher nicht geklärt.

Des Weiteren konnte in diversen Studien experimentell und klinisch gezeigt werden, dass die lokale Präkonditionierung von Gewebe zu einer deutlichen Protektion gegenüber nachfolgenden, ansonsten teils letalen Schädigungen führt. So konnte in einem Lappenmodell am Schwein durch lokale Erwärmung des späteren Lappengewebes eine deutliche Verminderung der Nekrose erzielt werden (Harder Y, Contaldo et al. 2004). Als Mechanismen werden einerseits die Verbesserung der Mikrozirkulation, einer erhöhte Ischämietoleranz aber auch eine direkte Verminderung des apoptotischen Zelltodes diskutiert. Welche dieser Faktoren eine Gewebeprotektion bewirken ist bis dato noch nicht vollständig geklärt. Alle diese Präkonditionierungsmethoden führen zu einer gesteigerten Expression von Hämoxxygenase-1 (Kubulus, Roesken et al. 2004). Dieses Enzym könnte jedoch auch durch die Trauma-induzierte Ischämie und Entzündung aktiviert worden sein. Bisher ist nicht geklärt, ob endogen induzierte HO-1 zur regulären Wundheilung beiträgt. Die Klärung dieser

Frage wäre durch die Blockade der beschriebenen Enzymaktivität möglich. Auch eine systemische Konditionierung wurde evaluiert, wobei hier vor allem aus Bakterien isoliertes Lipopolysaccharid (LPS) zu nennen ist. Studien der letzten Jahre führten zu unterschiedlichen Ergebnissen nach LPS-Vorbehandlung: zum einen wurde eine verzögerte Wundheilung aufgrund gesteigerter TNF- $\alpha$ -Produktion beschrieben (Ishimura, Moroguchi et al. 2002), zum anderen scheint LPS auch proangiogene Wirkungen zu besitzen (Mattsby-Baltzer, Jakobsson et al. 1994). Aufgrund der toxischen Wirkungen von LPS ist der klinische Einsatz im Rahmen einer möglichen Konditionierung problematisch, in den letzten Jahren wurden allerdings Substanzen entwickelt, so genannte cytidine-phosphate-guanosine-oligodeoxynucleotides (CpG ODN), Bruchstücke bakterieller DNS, die zu einer ausgeprägten Aktivierung des Immunsystems führen, jedoch ohne die typischen Nebenwirkungen von LPS hervorzurufen (Nichani, Kaushik et al. 2004). Ob diese Effekte auch im Rahmen der Wundheilung von Bedeutung sind, ist bisher nicht geklärt.

Eine weitere Substanz, die zunehmend Interesse auf sich zieht, ist die Aminosäure Glycin. Im Rahmen verschiedener Studien konnte gezeigt werden, dass die Vorbehandlung von Versuchstieren mit dieser Substanz zu einer Reduktion des Ischämie/Reperfusionsschadens nach Organtransplantationen führt. Außerdem konnten Organschädigungen, die durch Manipulation des betroffenen Gewebes verursacht wurden, vermindert werden (Schemmer, Bradford et al. 1999). Da das mechanische Weichteiltrauma einer ausgeprägten Manipulation entspricht, könnte somit auch Glycin im Rahmen der Wundheilung in traumatisiertem Gewebe protektive Effekte aufweisen.

Erythropoietin wird schon heute in der Klinik häufig angewendet, vor allem im Rahmen der Anämiebehandlung dialysepflichtiger Patienten. Die hämatopoetischen Effekte dieses Medikaments sind schon seit vielen Jahren bekannt. Studien der letzten Jahre zeigten allerdings auch einen deutlichen Einfluss auf die Angiogenese, z.B. beim Wachstum maligner Tumoren (Yasuda, Fujita et al. 2002). Aufgrund dieser Eigenschaften ist es sehr wahrscheinlich, dass die Wundheilung durch Erythropoietin durch seine proangiogene Wirkung positiv beeinflusst werden könnte.

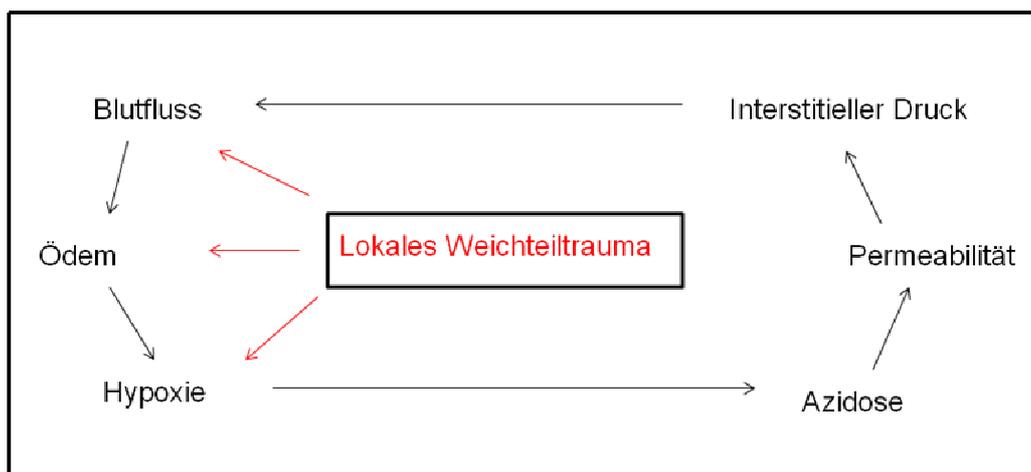
## 2.2. Auswirkungen der lokalen Weichteilschädigung

Das lokale Weichteiltrauma resultiert zunächst in einer lokalen Perfusionsstörung mit konsekutiver Hypoxie und Ischämie. Neben der traumatischen Zerstörung von Blutgefäßen und des umliegenden Parenchyms sowie der Ausbildung eines Weichteilödems lassen sich

hierbei weitere prolongierte pathologische Veränderungen der Mikrozirkulation beobachten (Amon, Laschke et al. 2006).

Durch die Trauma-induzierte Hypoxie und Ischämie und dem hieraus resultierenden Sauerstoffmangel kommt es zur zellulären Azidose und Laktatakkumulation. Über weitere komplexe chemische Reaktionen unter Zuhilfenahme verschiedener Enzyme werden in diesem Milieu letztlich hochreaktive Hydroxyl-Radikale ( $\text{OH}^\circ$ ) frei (Fenton-Reaktion). Die Entstehung dieses hochaggressiven Moleküls ist wohl das wesentliche Ereignis, dass die Lipidoxidation von Phospholipiden der Zellmembran antreibt. Basierend auf diesem Wissen kann vermutet werden, dass diese destabilisierenden Mechanismen die Grundbausteine der endothelialen Dysfunktion und daraus resultierenden Permeabilitätsstörungen nach Weichteiltrauma bilden (**Abb. 4**).

Aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass nach Weichteiltrauma nicht nur die beschriebene Permeabilitätsstörung einen wesentlichen pathobiochemischen Prozess darstellt, sondern auch eine massive Leukozyten-Endothelzellreaktion als entzündliche Reaktion auf das Trauma beobachtet werden kann. Parallel hierzu ist ein signifikanter Abfall der kapillären Perfusion zu verzeichnen (Menger MD 1995, Menger, Pelikan et al. 1992). Die Schwere des Weichteiltraumas beeinflusst maßgeblich die Schwere der kapillären Minderperfusion sowie die entzündliche Komponente als Antwort auf die entsprechende Weichteilverletzung (Amon, Laschke et al. 2006). Obwohl nahezu regelmäßig nach länger bestehender Hypoxie und Ischämie eine Reperfusion des verletzten Gewebes beobachtet werden kann, so kommt es doch zu keiner adäquaten kapillären Reperfusion mehr (no-reflow-Phänomen). Konsekutiv entwickelt sich im verletzten Areal ein interstitielles Ödem mit Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität, des Gefäßwiderstandes sowie des interstitiellen Drucks. Dieser Zusammenbruch der mikrovaskulären Perfusion ist mit einer Abnahme der Kapillardichte und mit einer zunehmenden extraluminalen Kompression des Gefäßbettes vergesellschaftet. Parallel zu diesen Vorgängen werden durch im Traumagebiet entstandene freie Radikale verschiedene chemotaktische und proinflammatorische Zytokine freigesetzt. Diese Mediatoren (u.a.  $\text{TNF-}\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8) führen zu einer vermehrten Aktivität diverser Enzyme, wie z.B. Stickstoffmonoxid (NO)-Synthase sowie Cyclooxygenase, wobei aus vorangegangenen Studien bereits bekannt ist, dass v.a. induzierbare Isoformen wie iNOS (Lee und Lee 2003) und COX-2 (Gierer, Mittlmeier et al 2005) hierbei betroffen sind.



**Abb. 4:** Schematische Darstellung der lokalen Auswirkung des mechanischen Traumas auf das Weichteilgewebe.

Weitere Zelladhäsionsmoleküle (L-Selectin auf Leukozyten und E-Selectin auf Endothelzellen) werden exprimiert. Des Weiteren werden durch die progrediente posttraumatische Entzündungsreaktion die endothelialen Zellen im Gefäßlumen wiederum aktiviert, was zur Expression weiterer Mediatoren wie Stickstoffmonoxid, Prostaglandinen, Platelet activating factors, Thromboxane und Adhäsionsmolekülen führt. Diese sind letztlich für das mikrovaskuläre Perfusionsversagen sowie für die nutritive Dysfunktion und primär lokale, später ggf. systemische Entzündungsreaktion verantwortlich (Menth Chiari, Curl et al. 1998). Die Adhärenz der aktivierten Leukozyten führt im weiteren Verlauf zur verstärkten Schädigung von Endothelzellen und des Parenchyms basierend auf der Sekretion toxischer Radikale (respiratory burst). Auch die Freisetzung von verschiedenen Enzymen mit proteolytischer Wirkung (Elastase) trägt maßgeblich zur Gewebsschädigung im traumatisierten Gewebe bei. Die entstandene Hypoxie führt gleichzeitig zur lokalen Azidose. Durch das saure Milieu und konsekutiver Permeabilitätssteigerung der Gefäße erhöht sich der interstitielle Druck, was die Hypoxie im betroffenen Gewebeareal weiter verstärkt. Dies hat schließlich eine zusätzliche Verminderung der Perfusion im Weichteilgewebe zur Folge. Außerdem lässt sich als Konsequenz der bestehenden Hypoxie eine Steigerung der leukozytären Entzündung nachweisen.

Die zentrale Bedeutung der Leukozyten-Endothelzell-interaktionen für die Entwicklung des Reperfusionsschadens ist heute unumstritten und von verschiedenen Autoren belegt (Menger 1995, Menger, Rücker et al. 1997, Owens, Edwards et al. 1999). Die kausale Rolle der Leukozyten in der Pathogenese der postischämischen Reperfusionsschäden wird auch in etlichen vorangegangenen Studien postuliert (Morgan, Moore et al. 1997, Chiba, Muraoka et

al. 1993). Diese Entzündungsreaktion resultiert wiederum in einer Behinderung der Perfusion und somit weiteren Beeinträchtigung der endothelialen Funktion.

Pathophysiologisch bleibt nun der traumatische Weichteilschaden zunächst durch einsetzende Reparaturmechanismen lokal begrenzt (in Abhängigkeit von individuellen Faktoren sowie von der Art und Schwere der Begleitverletzungen), und greift erst nach Überschreiten einer bestimmten Schwelle auf den Gesamtorganismus über (Rose, Marzi 1996). Nach Übergreifen auf den gesamten Organismus können in Abhängigkeit der Traumaschwere die entsprechenden sezernierten Entzündungsmediatoren auch Strukturen und Organe schädigen, welche fern der initialen Verletzung liegen und so in einen generalisierten Entzündungsprozess resultieren. Kommt es nach schweren Verletzungen (z.B. Polytraumata) oder bei vorerkrankten Patienten (z.B. Immunschwäche) nach lokalem Weichteiltrauma zu einer Ausschwemmung der inflammatorischen Zytokine in den systemischen Kreislauf, so hat dies eine Aktivierung der Gerinnungskaskade zur Folge (Bone 1996).

Ein generalisierter Entzündungsprozess mehrerer Organsysteme zugleich wird in der Literatur als SIRS (systemic inflammatory response syndrome) bezeichnet (Smail, Messiah et al. 1995). Verstärkt sich dieser Prozess kann dies ein Ein- oder Mehr- Organversagen sowie Dysfunktion der Immunantwort und der Mikrozirkulation zur Folge haben. Die daraus resultierende Ischämie stellt die Endstrecke der Kaskade zellulärer Veränderungen als Antwort auf eine von extern einwirkende Noxe dar (Gullo, Berlot 1996, Kirkpatrick, Bittinger et al. 1996). Grund hierfür sind multiple Mikrothromben, die einzelne oder mehrere Gefäße okkludieren und letztendlich zur Ischämie in den betroffenen Organen führen können (Gando, Kameue et al. 1996). Die Schädigung dieser Organe kann hierbei reversibel oder irreversibel sein und unabhängig von Art und Schwere oder Lokalisation des initialen Schadens beobachtet werden. Kommt es im weiteren Verlauf zur Reperfusion, so stellt der „Reperfusionsschaden“ eine der gefürchteten Komplikationen im Rahmen dieses Krankheitsbildes dar (Cipolle, Pasquale und Cerra 1993). Für die betroffenen Patienten bedeutet dies nicht selten eine intensivmedizinische Betreuung mit einem protrahiertem Krankheitsverlauf und einer höheren Letalität in der Folge. Der Organismus ist in dieser Phase bemüht, entsprechende Organsysteme wieder adäquat mit Sauerstoff zu versorgen. Parallel hierzu wird durch die Sekretion von anti-inflammatorischen Zytokinen versucht, die bestehende Entzündungsreaktion zu sanieren. Dieser Zytokinausschüttung (v.a. IL-4, IL-10, IL-13, TGF- $\beta$ ) folgt eine generalisierte Immundepression, welche im klinischen Alltag auch als CARS bekannt ist (compensatory anti-inflammatory response syndrome). Schließt sich eine Infektion mit pathogenen Keimen an oder kommt es zur systemischen Ausbreitung

derselbigen, kann der Organismus bis hin zur Sepsis und zum septischen Schock geschädigt werden (Levin und Condit 1996). Vom „mixed antagonist response syndrome“ (MARS) spricht man dann, wenn beide Syndrome (SIRS und CARS) parallel zueinander im Organismus ablaufen (Davies und Hagen 1997).

CHAOS (cardiovascular shock, apoptosis, organ dysfunction, immune suppression) ist der zusammenfassende Begriff für all diejenigen systemischen Reaktionen und Krankheitsbilder, welche hieraus resultieren können (Bone 1996; Davies und Hagen 1997). CHAOS stellt den Oberbegriff für die schwerwiegendsten Folgen eines lokalen Weichteilschadens auf den Organismus dar. Oftmals geht dieser Prozess mit lebensbedrohlichen Folgen für den Gesamtorganismus einher.

### 2.3. Heilung von Inzisionswunden nach lokalem Weichteilschaden

Die verzögerte Wundheilung nach chirurgischen Eingriffen stellt nach wie vor ein Problem dar, das zur erhöhten Morbidität und Mortalität der Patienten beiträgt. Bei chronisch kranken oder meist älteren Patienten (Diabetes mellitus, Arteriosklerose) ist das Risiko nach chirurgischen Interventionen eine Wundheilungsstörung auszubilden deutlich erhöht. Auch akute Verletzungen erhöhen die Komplikationsrate der Wundheilung. So konnte nachgewiesen werden, dass ein experimenteller Weichteilschaden wesentlich die periostale Durchblutung des darunterliegenden Knochens beeinflusst und eine Entzündungsreaktion hervorruft (Schaser, Zhang et al. 2003). Damit könnte bei einer zusätzlichen Schädigung des Knochens die Frakturheilung beeinträchtigt werden. Sachgerechte Wundversorgung und Wundbehandlung bleibt folglich Grundbaustein der operativen Disziplinen.

Bei etlichen Patienten, die einen mehr oder weniger ausgedehnten Weichteilschaden aufweisen, ist nicht selten ein operatives Verfahren indiziert. Dabei kann es sich um eine isolierte Weichteilverletzung handeln oder aber knöcherne bzw. intraabdominale Verletzungen mitbeinhalten.

Eine intakte Blutversorgung des verletzten Gewebes ist unmittelbare Voraussetzung für eine adäquate Geweberegeneration (Bondár, Uhl et al. 1991). Desweiteren ist seit langem bekannt, dass im ischämischen Wundgebiet die Heilungstendenz deutlich geringer ist als in nicht-ischämischem Gebiet (Hunt 1980). Trotz dieser Kenntnisse ist es allerdings nicht immer möglich, Inzisionen und Nähte zum Wundverschluss auf ausschließlich gesundes nichttraumatisiertes Gewebe zu beschränken. Bisher existieren keine Studien, die die Mechanismen der verzögerten Wundheilung im traumatisierten Weichteilgewebe eindeutig erklären. Außerdem ist bisher noch nicht geklärt, zu welchem Zeitpunkt nach Trauma eine

chirurgische Intervention durchgeführt werden sollte, damit möglichst optimale Bedingungen für eine adäquate Wundheilung gegeben werden können. Die Wahl eines optimalen Zeitpunktes für operative Eingriffe in traumatisiertem Gewebe gestaltet sich damit als sehr schwierig. In der klinischen Praxis bedarf eine unvollständige Wundheilung bzw. sekundäre Wunddehiszenz häufig einer chirurgischen Revision und resultiert oftmals in einer verzögerten Rehabilitation.

### 3. Ziel der Studie

Ziel dieser experimentellen Studie war es, zu klären, inwieweit ein Weichteiltrauma die Heilung einer Inzisionswunde beeinträchtigt. Die entsprechenden Informationen sollten durch tierexperimentelle Versuche an der Maus nach einem bewährten Modell gewonnen werden. Bisher konnte noch nicht geklärt werden, zu welchem Zeitpunkt ein chirurgischer Eingriff durchgeführt werden sollte, um diesbezüglich eine möglichst optimale Bedingung für den postoperativen Verlauf in einem traumatisierten Wundgebiet zu schaffen.

Dazu wurde in mehreren Versuchsgruppen der Einfluss des lokalen Weichteiltraumas auf die Heilung akuter Inzisionswunden untersucht, welche jeweils zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach dem lokalen Weichteiltrauma induziert wurden.

Nach der jeweiligen Weichteilschädigung wurde am gleichen Tag, sowie einen Tag, drei und fünf Tage später eine chirurgische Inzision im traumatisierten Gewebe durchgeführt. Im Anschluss daran erfolgte die intravitalmikroskopische Analyse der Wundheilung in den einzelnen Versuchsgruppen.

Anhand der Analyse von Hämodynamik, entzündlichen Reaktionen des Gewebes sowie histopathologischen Untersuchungen wurde auf folgende Fragestellungen im Detail eingegangen:

1. Wodurch wird der Blutfluss in Inzisionswunden im nichttraumatisierten Gewebe aufrecht erhalten?
2. Welche Pathologie nach isoliertem Weichteiltrauma beeinflusst die primäre Wundheilung?
3. Wird die Wundheilung negativ beeinflusst, wenn chirurgische Inzision und Nahtmaterial innerhalb des traumatisierten Gewebes gesetzt werden?
4. Zu welchem Zeitpunkt sollte nach einer Weichteilschädigung die Operation/ chirurgische Inzision erfolgen, damit bestmögliche Voraussetzungen für eine komplikationslose Wundheilung geschaffen werden können?

## 4. Material und Methodik

### 4.1. Versuchstiere

Alle Tierversuche wurden in Übereinstimmung mit dem deutschen Tierschutzgesetz durchgeführt. Im Voraus fand eine Überprüfung und Genehmigung seitens der saarländischen Tierschutzkommission statt. Als Versuchstiere verwendeten wir C57BL/6-Mäuse aus eigener Zucht im Alter von drei Monaten (**Abb. 5A**).

Für das geplante Projekt wurden Versuchstiere unterschiedlichen Geschlechts mit einem Gewicht von 23-27g (bei Versuchsbeginn) verwendet. Unter der Aufsicht der Tierschutzbeauftragten der Universität des Saarlandes wurden die Mäuse bis zum jeweiligen Versuchsende in der Tierhaltung des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie in Homburg/Saar gehalten. Bei einem 12 h Tag-Nachtrhythmus hielt man die Raumtemperatur konstant auf 22 bis 24 °C, die Luftfeuchtigkeit betrug konstant 60%. Alle Mäuse erhielten die gleiche Menge an Trinkwasser ad libitum und Laborstandardfutter (Altromin 0801, Botzenhardt KG, Kempten; 15.000 I.E./kg Vitamin A, 500 I.E./kg Vitamin D3, 150 mg/kg Vitamin E, 50 mg/kg Vitamin C).

### 4.2. Modell

#### 4.2.1. Mikrozirkulationsmodell der Rückenhautkammer

Als Modell verwendeten wir die Rückenhautkammer der C57BL/6-Maus (**Abb. 5B**). Erstmals beschrieben wurde das Kammermodell von Algire (Algire 1943). Nach weiterem Modifizieren konnten im Verlauf Untersuchungen an der Ratte (Papenfuss, Gross et al. 1997), an der Maus (Cardon, Oestermeyer und Bloch 1970, Lehr, Leunig et al. 1993), sowie am syrischen Goldhamster (Endrich, Asaishi et al. 1980) durchgeführt werden. Durch das Anbringen der Rückenhautkammer wurde eine Untersuchung des Gewebes (Kutis, Subkutis, quergestreifte Muskulatur) am lebenden Versuchsobjekt in regelmäßigen Abständen ermöglicht. Mit Hilfe von Durchlicht- sowie Fluoreszenzauflicht-Mikroskopie und diverser Fluorochrome konnten die Mikrozirkulation, Entzündungsantwort und Nekrose des verletzten Gewebes beurteilt werden.

#### 4.2.2. Anästhesie

Eine Narkotisierung der Tiere erfolgte regelmäßig vor der Rasur, der Präparation der Rückenhautkammer, den darauffolgenden invasiven Maßnahmen sowie der Fluoreszenzmikroskopie im Beobachtungsverlauf. Die Tiere konnten durch manuelle

Fixierung einer Rückenhautfalte immobilisiert werden. Im Anschluss wurde das Narkotikum intraperitoneal als Bolus von 0,1 ml pro 10 g Körpergewicht injiziert. Verwendet wurde ein Narkosegemisch aus 90 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet c, Upjohn GmbH, Heppenheim) und 25 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun, Bayer AG, Leverkusen). Nach Verabreichung der Narkose konnte im Durchschnitt eine 20-minütige Anästhesie mit gleichzeitiger Muskelrelaxierung gewährleistet werden (**Abb. 5C**). War die Wirkung der Narkose (in Ausnahmefällen) verzögert oder zeigte gar keine Wirkung, war eine intraperitoneale Nachinjektion von 0,1 ml des Anästhesiegemisches erforderlich. Auch wiederholte Anästhesien über einen längeren Zeitraum wurden von den Mäusen gut toleriert.



**Abb. 5:** (A): C57BL/6-Maus (Gewicht 23g ohne Rückenhautkammer) im Alter von 12 Wochen. (B) 24 h nach Kammerpräparation. (C) Wirkeintritt der Anästhesie 2 Tage nach Kammerpräparation.

#### 4.2.3. Implantation der Rückenhautkammer

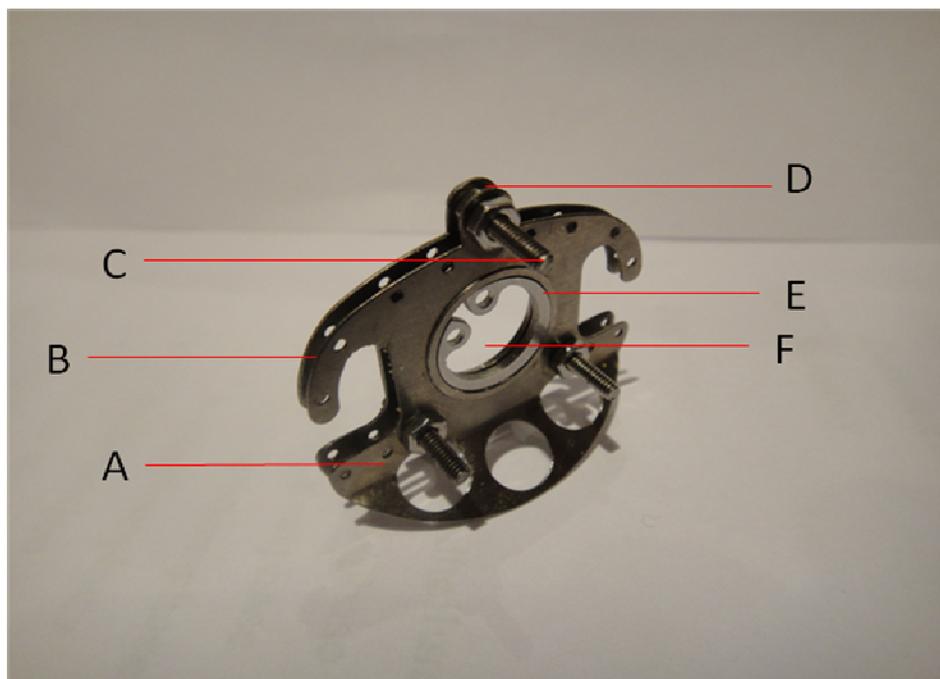
Es wurde immer dasselbe Verfahren zur Kammerpräparation angewendet. Die Implantation erfolgte in tiefer Narkose. Nach entsprechender Anästhesie des Tieres wurde der Rücken unter Zuhilfenahme eines Elektrorasierers (Elektra II GH 204; Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) sowie chemischer Depilation mit Enthaarungscreme (PilcaMed®, Schwarzkopf, Deutschland) vollständig von Haaren befreit. Nach Reinigung des enthaarten Areal mit lauwarmem Wasser erfolgte die Desinfektion in diesem Gebiet mit Softasept (Fa. Braun, Melsungen), um ein möglichst steriles Operationsfeld zu schaffen.

Nach Abwarten der regulären Einwirkzeit des Desinfektionsmittels wurde das Tier in Bauchlage vor einer Kaltlichtlampe positioniert. Nach Anheben der Haut kontrollierten wir nun unter Gegenlichtkontrolle den Verlauf der von ventral und dorsal in die Kammer ziehenden Gefäßäste der Arteria circumflexa iliaca und Arteria thoracica lateralis, um eine standardisierte Implantation der Kammer zu gewährleisten. Es wurde genauestens darauf geachtet, dass sich korrespondierende Gefäßäste in der Seitenansicht parallel überdeckten. Die Rückseite der aus zwei symmetrischen Titan-Rahmen zusammengesetzten Rücken-

hautkammer (**Abb. 6**) wurde kranial mit Haltefäden an der Maus angebracht. In Bereich der basal gelegenen Schrauben wurden mit einer Schere zwei kleine Inzisionen gesetzt, ohne die Hauptstammgefäße zu verletzen.

Mit einem feinen Permanenttextmarker zeichneten wir ebenfalls unter Gegenlichtkontrolle das Beobachtungsfenster auf die Haut ein. Der Durchmesser dieses kreisrunden Bereichs betrug ca. 12mm. Die Größe dieses Abschnittes wurde hierbei bewusst größer gewählt als das eigentliche spätere Beobachtungsfenster (10mm). Grund hierfür war, dass damit eine Beeinträchtigung der Blutversorgung sowie Lufteinschlüsse nach Anbringen des vorderen Titanrahmens vermieden werden konnten. Die zuvor eingezeichnete Fläche wurde mit einer gebogenen Schere exakt ausgeschnitten.

Unter einem Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) erfolgte die chirurgische Entfernung der Kutis, Subkutis und der quergestreiften Muskulatur sowie die zwei Schichten des Retraktormuskels. Nach Spülung des Gewebes mit steriler Elektrolytlösung (NaCl, Isotone Kochsalzlösung, Fa. Braun, Melsungen) wurde die vordere Seite der Titankammer in den Schrauben des zuvor angebrachten hinteren Titanrahmens verankert und mit den passenden Schraubenmuttern fixiert. Eine Kompression der Gefäße konnte durch Schraubenmuttern, die als Abstandshalter dienten, vermieden werden (**Abb. 6**). Der Abstand zwischen den beiden Rahmen betrug nach Fixierung ca. 400-500µm. Das freiliegende Kammergewebe wurde luftdicht nach erneuter sorgfältiger Spülung mit steriler Elektrolytlösung (NaCl, Isotone Kochsalzlösung, Fa. Braun, Melsungen) durch ein Deckglas zum Schutz vor Austrocknung und Verschmutzung abgedeckt. Um ein Herausfallen des Deckglases aus seiner Position zu vermeiden, setzten wir zur Protektion des Beobachtungsfensters einen Sprengring in die Kammervorderseite ein. Abschließend wurde nun der ventrale Titanrahmen an seinem kranialen Rand durch 5.0 Seide-Nähte an der Hautfalte befestigt. Der gesamte Eingriff dauerte ca. 20 Minuten. Die Rückenhautkammer wurde von den Mäusen gut toleriert. Die Tiere zeigten postoperativ ein normales Fress-, Schlaf- und Putzverhalten.



**Abb. 6:** Perspektivische Sicht auf die Rückenhautkammer bestehend aus 2 identischen Titanrahmen (Gewicht ca. 3,2g). A: Vorderer Titanrahmen; B: Hinterer Titanrahmen; C: Verbindungsschraube; D: Schraubenmutter als Abstandshalter zwischen den Titanrahmen; E: Sprengring zur Fixation des Deckglases; F: Beobachtungsfenster (Durchmesser 10 mm).

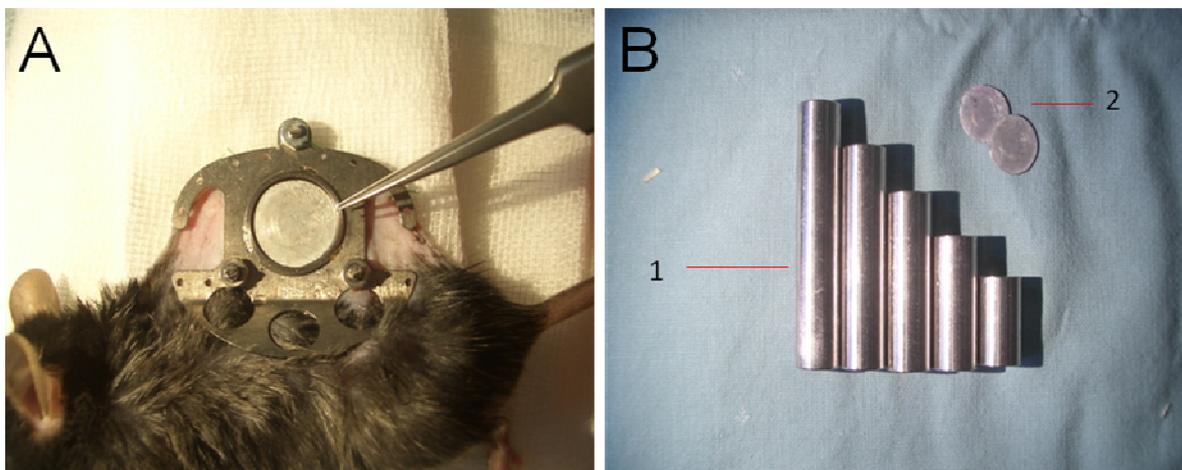
#### 4.2.4. Ausschlusskriterien

Nach der Kammerpräparation hatten die Tiere insgesamt 48 h Zeit, sich von der Anästhesie und dem chirurgischen Trauma zu erholen, bevor die erste intravitalmikroskopische Analyse durchgeführt wurde. Ehe die Mäuse für die Mikroskopie erneut narkotisiert wurden, prüften wir sie zum einen auf ihren Allgemeinzustand, zum anderen auf die Qualität der Kammerpräparation. Ausschlusskriterien für den weiteren Versuchsablauf waren:

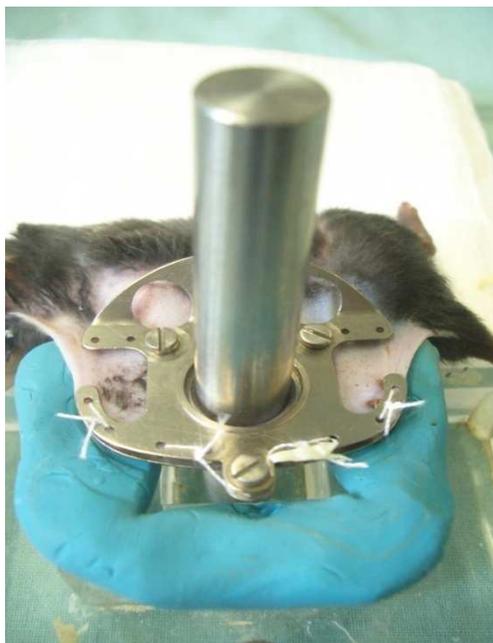
- Gewichtsverlust
- Lethargie
- Exsiccose
- Einblutungen
- Systemische oder lokale Entzündungszeichen
- Ödem
- Mechanische Faktoren (z.B. Gewebeaussriss aus der Kammer)

#### 4.2.5. Induktion des Weichteiltraumas

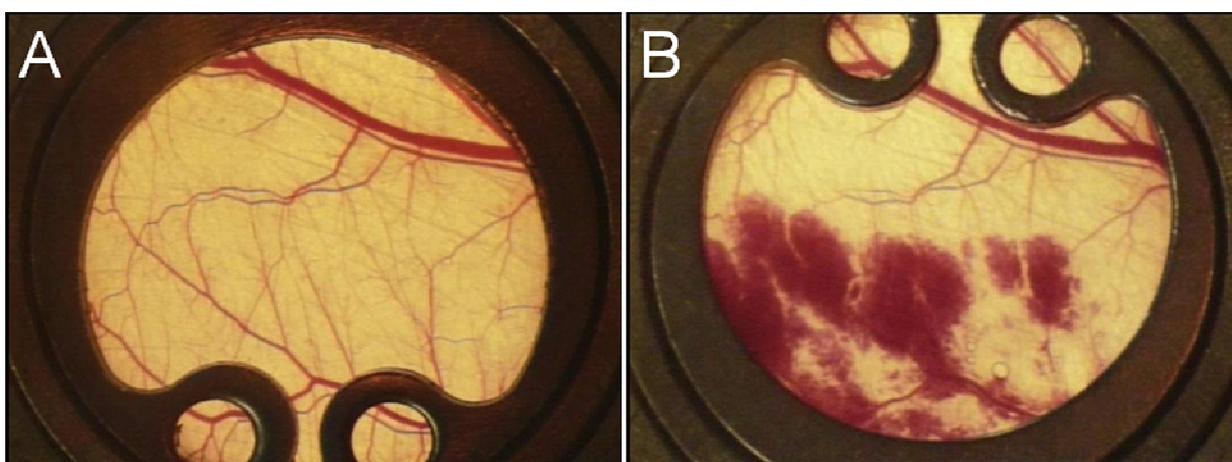
Bei allen Versuchstieren wurde frühestens vier Tage nach der Kammerpräparation und 48 h nach der ersten intravitalmikroskopischen Analyse ein standardisiertes Weichteiltrauma des Gewebes induziert (Amon, Laschke et al. 2006). Tiere ohne Trauma dienten als Kontrolle. Im Rahmen unserer Versuchsreihe fixierten wir die narkotisierten Tiere in Seitlage auf einer Plexiglasplatte. Das Deckglas wurde entfernt und anschließend durch ein feines Metallplättchen derselben Größe ersetzt (**Abb. 7A, B**). Dieses Metallplättchen wurde mit einem Sprengring fixiert, was ein festes Widerlager für den Stahlzylinder sicherstellte. Zur Weichteiltraumainduktion standen uns Edelstahlzylinder unterschiedlichen Gewichtes zur Verfügung (5g, 10g, 15g, 25g, 30g) (**Abb. 7B**). In unserer Studie verwendeten wir ein Gewicht von 25g, was einer beim Aufprall freigesetzten Energie von  $450 \text{ J/m}^2$  entsprach. Der Stahlzylinder wurde aus einer Höhe von 145 mm durch eine als Leitschiene eingesetzte Plexiglasröhre (Durchmesser 12 mm) vertikal auf das Gewebe fallen gelassen (**Abb. 8**). Somit wurde eine gleichmäßige Verteilung der freigesetzten Energie im Kammergewebe gewährleistet und eine homogene Weichteiltraumatisierung erzielt (**Abb. 9**).



**Abb. 7:** (A) Aufsicht auf die Rückenhautkammer. Das Deckglas wurde entfernt und durch ein Metallplättchen als Widerlager zur Weichteiltraumainduktion ersetzt. (B) Stahlzylinder unterschiedlichen Gewichtes (1) (von links nach rechts: 30g, 25g, 15g, 10g, 5g) und zwei Metallplättchen, die als Widerlager dienten (2).



**Abb. 8:** Rückenhautkammer unmittelbar nach Traumainduktion mit noch aufsitzendem Edelstahlzylinder (25g). Die Plexiglasröhre als Leitschiene wurde zur besseren Darstellung bereits entfernt.



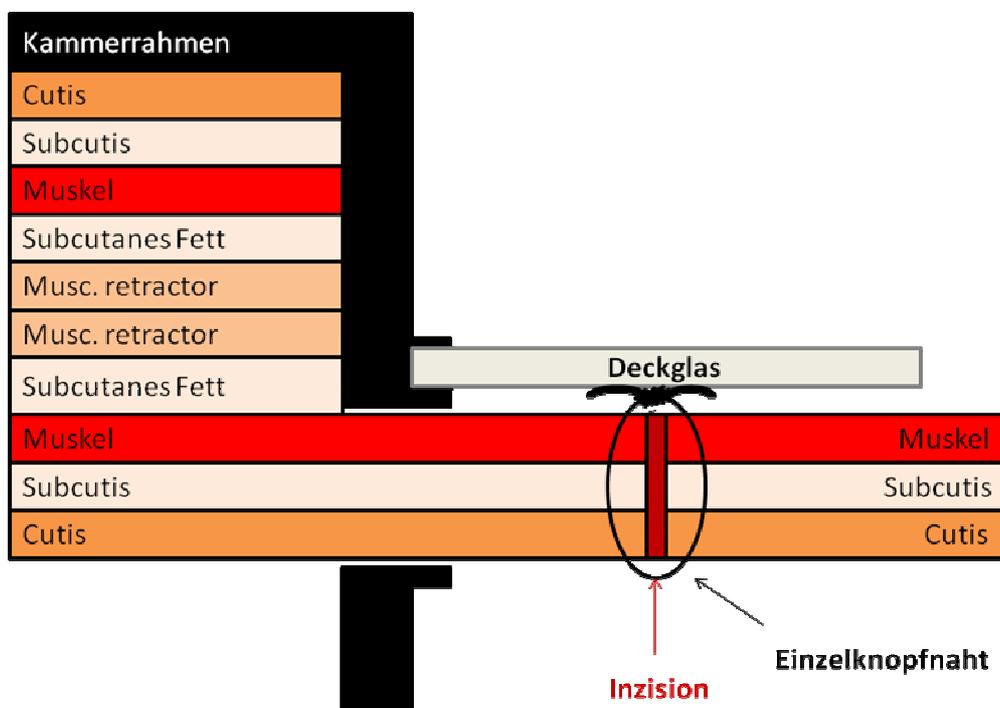
**Abb. 9:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme einer Rückenhautkammer vor (A) sowie nach schwerem (B) Weichteiltrauma. Die entstandenen Hämatome konfluieren und nehmen eine große Fläche im Beobachtungsfenster ein (6-fache Vergrößerung).

#### 4.2.6. Induktion der Inzisionswunde

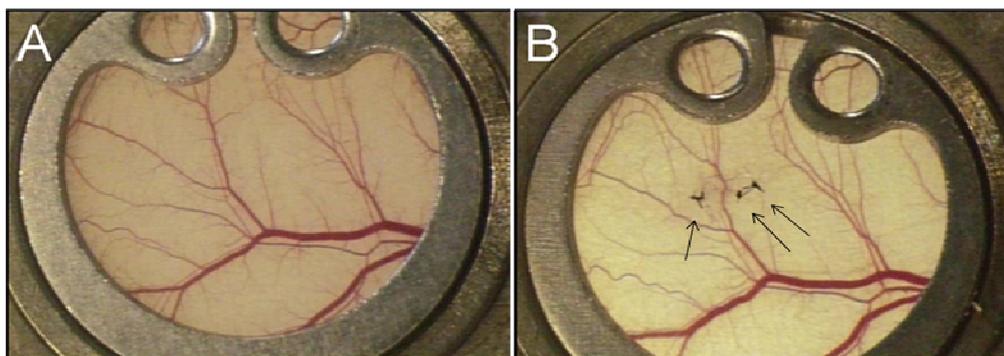
In den einzelnen Versuchsreihen wurde bereits vor der Traumatisierung des Gewebes ein arteriovenöses Gefäßbündel der 1. Generation im mittleren Bereich des Beobachtungsfensters für die spätere Inzision ausgewählt. Das AV-Bündel konnte aufgrund sorgfältiger

Videodokumentation während der ersten Fluoreszenzmikroskopie zwei Tage nach Kammerpräparation zuverlässig identifiziert werden. Nach Deckglasentfernung erfolgte mit einem Skalpell (Fa. Aesculap, Größe 11) die Durchtrennung der Arteriole sowie der begleitenden Venole samt quergestreifter Muskulatur, Subkutis und Kutis (**Abb. 10**). Dabei achteten wir auf eine strenge senkrechte Schnittführung zum Gefäßbündel unter mikroskopischer sowie makroskopischer Sichtkontrolle, um ein standardisiertes Vorgehen zu gewährleisten. Die Länge der Inzisionswunde wurde unter Zuhilfenahme eines Lineals intraoperativ ausgemessen und betrug in jedem Versuchstier 3 mm. Anschließend wurde der Situs mehrfach mit steriler Elektrolytlösung (NaCl, Isotone Kochsalzlösung, Fa. Braun, Melsungen) gespült.

Im Anschluss erfolgte unter dem Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) der primäre Wundverschluss mit Einzelknopfnähten (Prolene, Ethicon®, Größe 10-0). Die Wundränder konnten in der Regel mit 3 Einzelknopfnähten - welche Kutis, Subkutis und quergestreiftes Muskelgewebe umfassten - wieder adäquat adaptiert werden (**Abb. 11**). In den einzelnen Versuchsreihen wurden die Inzisionswunden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Weichteilschädigung vorgenommen. Als Kontrolle dienten nicht-traumatisierte Tiere ohne Inzision.



**Abb. 10:** Schematischer Querschnitt der Rückenhaut nach Inzision.



**Abb. 11:** (A) Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme (6-fache Vergrößerung) einer Rückenhautkammer ohne Weichteiltrauma vor (A) und unmittelbar nach (B) Induktion einer Inzisionswunde. Zur Wundrandadaption waren 3 Einzelknopfnähte (Pfeile) erforderlich.

### 4.3. Experimentelles Protokoll

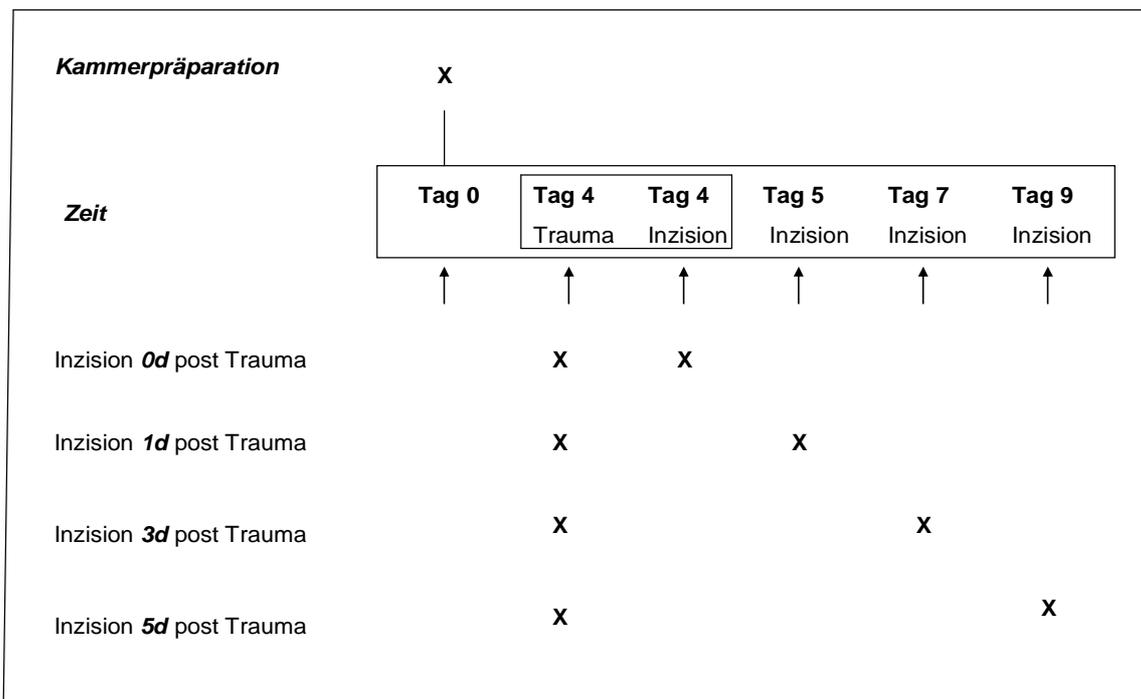
Zwei Tage nach Kammerpräparation erfolgte am narkotisierten Tier die erste intravitalmikroskopische Untersuchung zur Analyse der Hämodynamik unter physiologischen Bedingungen. Die einzelnen Versuchsgruppen unterschieden sich in dem zeitlichen Abstand der Inzision zum vorangegangenen Weichteiltrauma. Mit Ausnahme der Kontrollgruppen ohne Weichteilschädigung wurden alle Tiere 4 Tage nach Kammerpräparation einer schweren Weichteiltraumatisierung unterzogen (**Abb. 12**). In einer der Gruppen wurde unmittelbar nach dem Trauma die Durchtrennung der Gewebeschichten vorgenommen. In den weiteren Gruppen erweiterten wir diesen zeitlichen Abstand, indem wir die Inzision 1 Tag, 3 Tage und 5 Tage nach Weichteiltrauma vornahmen. Insgesamt dienten uns 47 C57BL/6-Mäuse zur Beobachtung. Unsere Versuchsreihen setzten sich aus 3 Kontrollgruppen und 4 Untersuchungsgruppen zusammen (**Abb. 12**).

#### - Kontrollgruppen:

1. Keine Inzision, kein Trauma (sham 1, n=5)
2. Inzision, kein Trauma (sham 2, n=8)
3. Keine Inzision, Trauma (sham 3, n=6)

#### - Untersuchungsgruppen (**Abb. 13**):

4. Inzision 0 Tage nach Trauma (n=7)
5. Inzision 1 Tag nach Trauma (n=6)
6. Inzision 3 Tage nach Trauma (n=9)
7. Inzision 5 Tage nach Trauma (n=7)



**Abb. 12:** Schematische Übersicht über das experimentelle Protokoll. Tag X markiert den Tag der Kammerpräparation. Eine Weichteiltraumatisierung fand frühestens 4d nach der Präparation statt. Die Inzision erfolgte in den einzelnen Versuchsgruppen 0d, 1d, 3d und 5d nach Trauma.



**Abb. 13:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme einer Rückenhautkammer vor (A) sowie unmittelbar nach (B) schwerem Trauma. (C) Bei diesem Tier wurde die Inzision 24 h später induziert (16-fache Vergrößerung).

#### 4.4. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

##### 4.4.1. Intravitales Fluoreszenzmikroskop

Die intravitale Untersuchung folgte immer einem standardisierten Ablauf. Durch die Gabe verschiedener Floreszenzfarbstoffe (vgl. Kap. 4.4.2.) wurde eine Kontrastierung des Blutplasmas bzw. der Leukozyten erzielt. Die Mäuse wurden auf einer Plexiglasplatte fixiert.

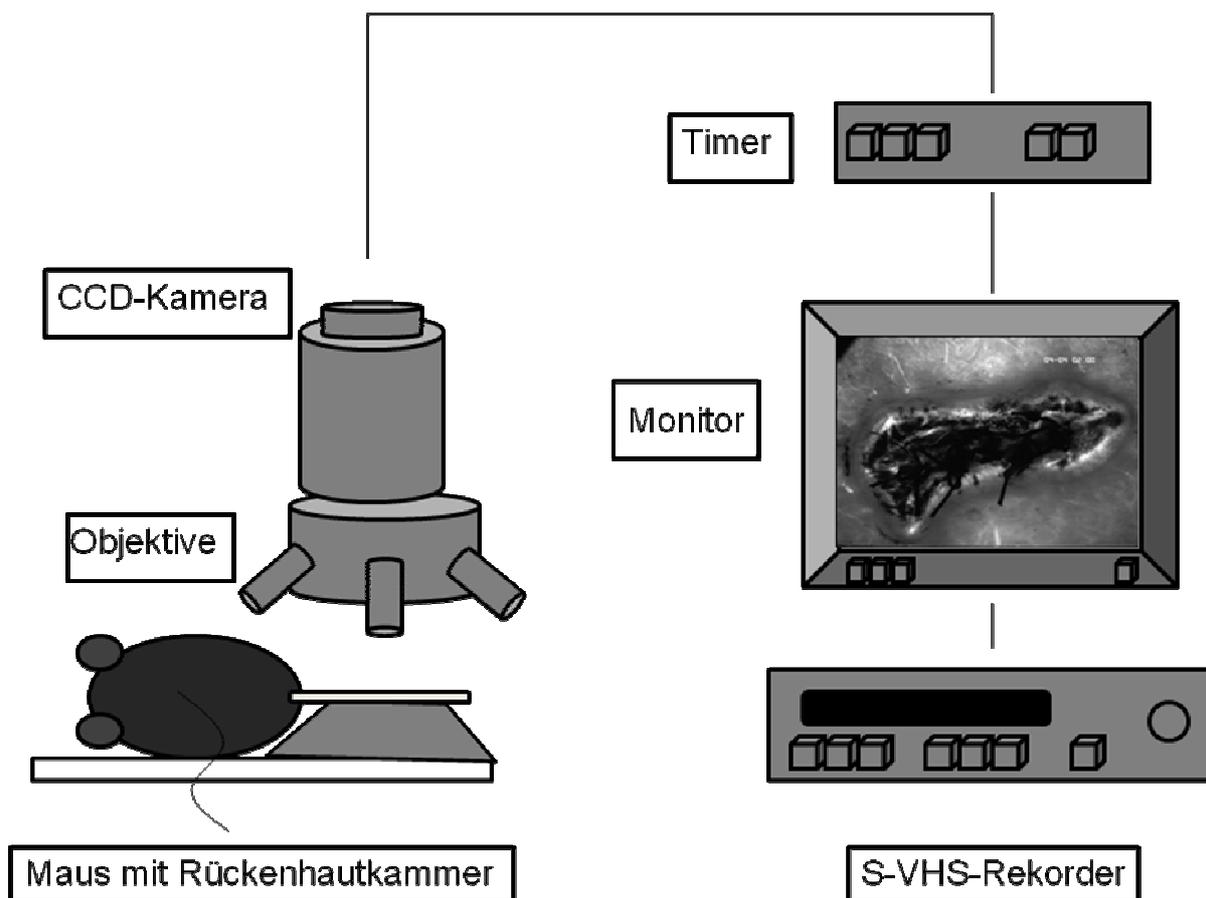
Dies garantierte eine horizontale Position der Maus in Seitlage während der Mikroskopie. Der Sprengring wurde entfernt und das Deckglas mit steriler Elektrolytlösung (NaCl, Isotone Kochsalzlösung, Fa. Braun, Melsungen) gereinigt. Anschließend wurde der entsprechende Farbstoff in einem Mischungsverhältnis 1:1 in den retrobulbären Venenplexus (0,05 ml Rhodamin 6G und 0,05 ml FITC-Dextran) injiziert.

Wir verwendeten zur Erfassung der Mikrozirkulation ein Zeiss-Axiotech-Mikroskop (**Abb. 14**; Zeiss, Oberkochen) mit einer HBO-Quecksilberdampf Lampe als Lichtquelle (HBO 100W OFR, Osram, Augsburg; Gehäuse 100Z, Fa. Leitz GmbH, Wetzlar). Zur Aufsichtbeleuchtung war der Lampe ein Ploemo-Pak-System (Ploemopak 2, Fa. Leitz GmbH, Wetzlar) zwischengeschaltet. Im Strahlengangsystem konnte nun mit diversen Filtern mit unterschiedlichen Anregungs- und Emissionswellenlängen eine Quantifizierung der mikrozirkulatorischen Parameter im Beobachtungsfenster erzielt werden (**Tab. 3**).

	Anregungswellenlänge	Emissionswellenlänge
Filter blaues Licht	450 bis 490 nm	>520 nm
Filter grünes Licht	530 bis 560 nm	>580 nm

**Tab. 3:** Übersicht über die zur Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Filter mit deren Anregungs- und Emissionswellenlängen.

Für die spätere Auswertung der Daten erstellten wir Videoaufnahmen unter Zuhilfenahme einer hochempfindlichen CCD (charged coupled device)-Videokamera (FK 6990; Lichtempfindlichkeit  $10^{-2}$  Lux; Prospective Measurements, San Diego, California, USA) und eines S-VHS Videorekorders (Panasonic AG-7350, Matsushita Electric Corp., Japan). An Videokamera und Bildschirm wurde ein Video-Zeitgenerator (VTG 33, FOR-A Company Ltd., Tokyo, Japan) gekoppelt, der eine Aufzeichnung und parallele Einblendung der Videoaufnahme, Identifikationsnummer der Maus und dem jeweiligen Untersuchungszeitpunkt ermöglichte. Zur Mikroskopie bedienten wir uns verschiedener Objektive. Zum einen verwendeten wir ein 5x Objektiv (Zeiss, Oberkochen, Deutschland), um eine adäquate Übersicht über das Beobachtungsfenster gewährleisten zu können, zum anderen 10x und 20x Objektive (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) zur detaillierten Darstellung und quantitativen mikrozirkulatorischen Untersuchung.



*Abb. 14: Schematischer Aufbau der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie.*

#### 4.4.2. Fluoreszenzfarbstoffe

##### 4.4.2.1. Rhodamin 6G

Bei Rhodaminen handelt es sich um fluoreszierende Farbstoffe, welche sich in ihrer chemischen Struktur stark ähneln. Im Rahmen unserer Versuche verwendeten wir Rhodamin 6G. Der Vorteil dieses Farbstoffes beruht auf einer sehr hohen Quantenausbeute von nahezu 95 %. Durch die Kopplung des Farbstoffes an Leukozyten und Thrombozyten erschienen diese Zellen dem Beobachter während der Mikroskopie als hell leuchtend. Durch den Größenunterschied ließen sich die Thrombozyten von Leukozyten bei guter Kammerqualität gut abgrenzen.

Vor Applikation wurde der Farbstoff in 1%-iger isotoner Kochsalzlösung gelöst und im Anschluss filtriert. Farbkristalle konnten auf diesem Wege zuverlässig aus der genannten Lösung entfernt werden. Bis zur retrobulbären Injektion wurde Rhodamin 6G lichtgeschützt bei einer Temperatur von  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

#### 4.4.2.2. Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)

Dieser Fluoreszenzfarbstoff (Molekulargewicht 150 kDa, Sigma Chemical Co) ist mit einem hochmolekularen Dextran gekoppelt, um die Wahrscheinlichkeit einer Extravasation nach Injektion unter physiologischen Bedingungen gering zu halten. Nachdem der Farbstoff retrobulbär injiziert wurde, gewährleistete FITC eine gute Darstellung der Gefäße und Kapillaren unter dem Mikroskop. Der Farbstoff wurde über Niere und Leber ausgeschieden. Das Mischungsverhältnis der beiden Farbstoffe in unserer Studie betrug 1:1, die Injektion erfolgte in den retrobulbären Venenplexus (0,05 ml Rhodamin 6G und 0,05 ml FITC-Dextran). Unterschiedliche Emissionswellenlänge und Exzitationsmaxima waren zu berücksichtigen (**Tab. 4**).

#### 4.4.3. Intravitalmikroskopisches Protokoll

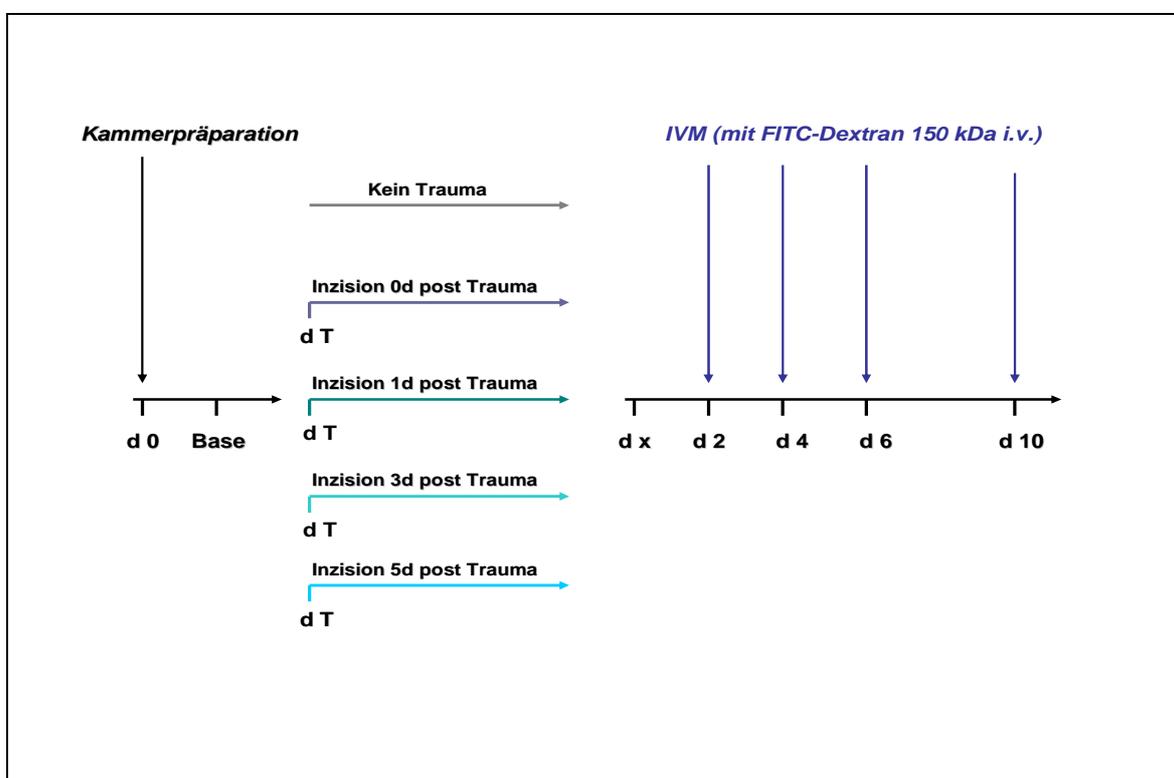
Die repetitive intravitalmikroskopische Untersuchung aller Tiere erfolgte erstmals 2 Tage nach Kammerpräparation. Bei Mäusen, welche einer Inzision ausgesetzt wurde, erfolgte die intravitalmikroskopische Analyse jeweils 2, 4, 6 und 10 Tage nach Induktion der Inzisionswunde (**Abb. 15**). Am Ende der Untersuchungen wurden die Tiere, nachdem ausreichend Gewebe zur histologischen Untersuchung entnommen wurde, mit einer Überdosis des beschriebenen Narkosegemisches eingeschlafert.

	<b>Emissionswellenlänge</b>	<b>Exzitationsmaximum</b>
<b>Rhodamin 6G</b>	590 nm	530 nm
<b>FITC-Dextran</b>	520 nm	495 nm

*Tab. 4: Übersicht über die zur Fluoreszenzmikroskopie verwendeten Fluorochrome mit deren Emissionswellenlänge und Exzitationsmaxima.*

Zu Beginn jeder intravitalmikroskopischen Untersuchung erfolgte eine Übersichtsaufnahme des Beobachtungsfensters im 5x Objektiv. Die Kammer wurde zunächst meanderförmig abgefahren. Nach dieser Übersichtsaufnahme des Gewebes im Beobachtungsfenster wurden nacheinander 4 verschiedene arteriovenöse Gefäßbündel ausgewählt. Es erfolgte bei diesen im Einzelnen ebenfalls eine Übersichtsaufnahme mit dem 5x Objektiv. Um bei den darauf folgenden Untersuchungszeitpunkten das jeweilige Gefäßbündel wieder zu finden, wurde neben der Videoaufnahme ein Standbild aufgenommen und ausgedruckt. Um zu einem

späteren Zeitpunkt eine adäquate Parameteranalyse zu gewährleisten, erfolgte nun mittels 20x Objektiv über mindestens 30 Sekunden lang die Aufnahme der jeweiligen Gefäßbündel mit dem blauen und grünen Filter. Eine Arteriole wurde mit ihrer begleitenden Venole für die Inzision im weiteren Versuchsablauf selektiert und nach standardisiertem Schema fotodokumentiert. Durch dieses Vorgehen konnten zu einem späteren Zeitpunkt sowohl die Fließgeschwindigkeit in den Gefäßen, als auch der Gefäßdurchmesser und das Leukozytenfließverhalten an der Gefäßwand analysiert werden. Im Anschluss wurden zufallsverteilt 5 Kapillarfelder im 20x Objektiv unter ständigem Fokussieren in der Kammer aufgenommen (**Tab. 5**).



**Abb. 15:** Übersicht über das intravitalmikroskopische Protokoll. 2d nach Kammerpräparation (d 0) erstmalige Intravitalfluoreszenzmikroskopie (Base). Nach Inzision (d x) wurden 2, 4, 6 und 10 Tage später die mikrozirkulatorischen Parameter analysiert.

	<b>FITC</b>	<b>Rhodamin 6G</b>
<b>Kammerübersicht</b>	5x	
<b>AV-Bündel 1</b>	5x, 20x	20x
<b>AV-Bündel 2</b>	5x, 20x	20x
<b>AV-Bündel 3</b>	5x, 20x	20x
<b>AV-Bündel 4</b>	5x, 20x	20x
<b>5 Kapillarfelder peripher</b>	20x	

*Tab. 5: Übersicht über die intravitalmikroskopische Analyse der einzelnen Strukturen in der Baseline-Aufnahme.*

Nach Weichteilschädigung und Induktion der Inzisionswunde verlief die Intravitalmikroskopie in leicht abgewandelter Form verglichen zur Baselineaufnahme. Erneut wurde vom Gewebe des Beobachtungsfensters eine meanderförmige Übersichtsaufnahme mit dem 5x Objektiv angefertigt. Anschließend erfolgte die Zuwendung zur Inzisionswunde. Das Areal wurde nacheinander mit dem 10x und 20x Objektiv abgefahren, um zur späteren Analyse mindestens 3 Kapillarfelder über dem Inzisionsspalt und 3 Kapillarfelder in unmittelbarer Nähe zur Inzision zu gewinnen. Zusätzlich wurden in der Peripherie der Kammer 3 Kapillarfelder aufgenommen. Das inzidierte arteriovenöse Gefäßbündel wurde im Bereich beider Wundränder unter Zuhilfenahme des 20x Objektiv aufgenommen, um später Rückschlüsse auf Fließgeschwindigkeit, Durchmesser und Leukozytenadhäsion in diesem Areal treffen zu können (**Tab. 6**).

## 4.5. Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen

### 4.5.1. CapImage

Die quantitative Auswertung aller mikrozirkulatorischen Parameter erfolgte im Anschluss an die Mikroskopie an einem computergestützten Analysesystem. Dieses bestand zum einen aus einem S-VHS-Videorekorder (AG-7350, Panasonic, Ratingen), zum anderen aus einem Monitor (36 cm Diagonale, PVM 2130 QM, Sony, München). Die Analyse erfolgte nun anhand von während der Mikroskopie erstellten Videoaufnahmen mit einer speziellen Software (CapImage Version 5.03, Zeintl software, Heidelberg).

		<b>FITC</b>	<b>Rhodamin 6G</b>
<b>Kammerübersicht</b>		5x	
<b>Inzision</b>	<b>3 Kapillarfelder inzisionsnah</b>	5x, 10x, 20x	
	<b>3 Kapillarfelder über Inzision</b>	5x, 10x, 20x	
<b>AV-Bündel 1</b>		5x, 20x	20x
<b>AV-Bündel 2</b>		5x, 20x	20x
<b>AV-Bündel 3</b>		5x, 20x	20x
<b>AV-Bündel 4</b>	<b>vor Inzision</b>	5x, 20x	20x
	<b>nach Inzision</b>	5x, 20x	20x
<b>3 Kapillarfelder peripher</b>		20x	

*Tab. 6: Übersicht über die intravitalmikroskopische Analyse der einzelnen Strukturen nach Inzision.*

#### 4.5.2. OP-Mikroskop

Bei allen Versuchstieren wurde nach der intravitalen Mikroskopie sowie invasiven Maßnahmen (Trauma und/oder Inzision) eine lichtmikroskopische Übersichtsaufnahme der Kammer erstellt. Sämtliche Aufnahmen wurden mit dem Stereo-Operationsmikroskop (Wild M650; Leitz, Schweiz) angefertigt. Dabei wurde nach sorgfältiger Reinigung des Deckglases die Positionierung des Tieres auf einer Plexiglasplatte sichergestellt. Das OP-Mikroskop, welches mit einem S-VHS Videorekorder (Panasonic AG-7350, Matsushita Electric Corp., Japan) verbunden war, ermöglichte die Aufnahme des Beobachtungsfensters in 16-, 25- und 40-facher Vergrößerung.

#### 4.5.3. Mikrozirkulatorische Parameter

Folgende Parameter wurden erhoben:

- Blutzellgeschwindigkeit (4.5.3.1.)
- Durchmesser (4.5.3.2.)
- Blutfluss (4.5.3.3.)

- Funktionelle Kapillardichte (4.5.3.4.)
- Angiogenese (4.5.3.5.)
- Leukozyten (4.5.3.6.)
- Nekrose (4.5.3.7)
- Gefäßpermeabilität (4.5.3.8)

#### 4.5.3.1. Arteriöläre und venuläre Blutzellgeschwindigkeit

Die örtliche Festlegung der Messung der Fließgeschwindigkeit orientierte sich stets am Ort der Durchmessermessungen. Mittels der so genannten „line-shift“-Methode (CapImage, Fa. Zeintl, Heidelberg) erfolgte die Erfassung der Bewegungsgeschwindigkeit der Erythrozyten (Klyszcz, Junger et al. 1997). Dabei bediente sich das Analysesystem den während der Mikroskopie auftretenden Helligkeitsdifferenzen, die beim Erythrozytenfluss innerhalb des Gefäßes auftraten. Diese Helligkeitsunterschiede wurden in Form der Lichtstärke angepassten Linien erfasst. Die Steigung dieser Linien entsprach der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten bzw. des Blutplasmas im Gefäß. Pro Messung wurde jeweils der Mittelwert aus mindestens fünf Messlinien erhoben. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit wurden im Versuchsverlauf diese Werte als Prozent des Initialwertes der Baseline-Aufnahme angegeben.

#### 4.5.3.2. Arteriöläre und venuläre Durchmesser

Der Durchmesser der Arteriolen und Venolen wurde am stehenden Videobild ausgemessen. Der Ort der Messung befand sich stets im Bereich der Messung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (vgl. Kap. 4.5.3.1.). Zur Bestimmung des Durchmessers bedienten wir uns der durch FITC-Dextran dargestellten Gefäßränder. Dabei wurde eine Markierung zwischen sich zwei gegenüber liegenden Punkten der Gefäßwände gesetzt und anschließend miteinander verbunden. Nach durchschnittlich 6 Einzelmessungen und dem daraus berechneten Mittelwert ergab sich der Durchmesser des jeweiligen Gefäßes. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit wurden im Versuchsverlauf diese Werte als Prozent des Initialwertes der Baseline-Aufnahme angegeben.

#### 4.5.3.3. Arteriölärer und venulärer volumetrischer Blutfluss

Zur Berechnung des Blutflusses aus Fließgeschwindigkeit und Durchmesser bedienten wir uns der Gleichung von Gross und Aeroesty, wobei  $v$  der Zellgeschwindigkeit und  $d$  dem Durchmesser entspricht (Gross und Aeroesty 1972):

$$BF = v * \pi * d^2/4$$

Durch einfache Multiplikation dieser Parameter konnten so der arterioläre und venuläre volumetrische Blutfluss errechnet werden. Eine zylindrische Gefäßgeometrie wurde dieser Berechnung zugrunde gelegt.

#### 4.5.3.4. Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte stellte eine der wichtigsten Parameter in unserer Studie als Maß für die nutritive Perfusion dar. Die Kapillarfelder wurden über 20 Sekunden aufgenommen. Dabei wurden lediglich die Kapillaren, welche während der Mikroskopie perfundiert waren, berücksichtigt. Es wurden bei den Tieren, welche eine Inzision erhielten, 3 periphere Kapillarfelder, 3 inzisionsnahe Felder sowie 3 Felder unmittelbar über der Inzision ausgewählt. Bei den Versuchstieren ohne Inzision wurden randomisiert 5 Gesichtsfelder pro Kammer untersucht. Bei laufendem Videoband wurden die einzelnen Kapillaren nun ihrer Länge nach pro Fläche des Beobachtungsfelds ausgemessen. Die Gesamtlänge der markierten Kapillaren ergab die funktionelle Kapillardichte in  $\text{cm}/\text{cm}^2$ . Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit wurden im Versuchsverlauf diese Werte als Prozent des Initialwertes angegeben.

#### 4.5.3.5. Angiogenese

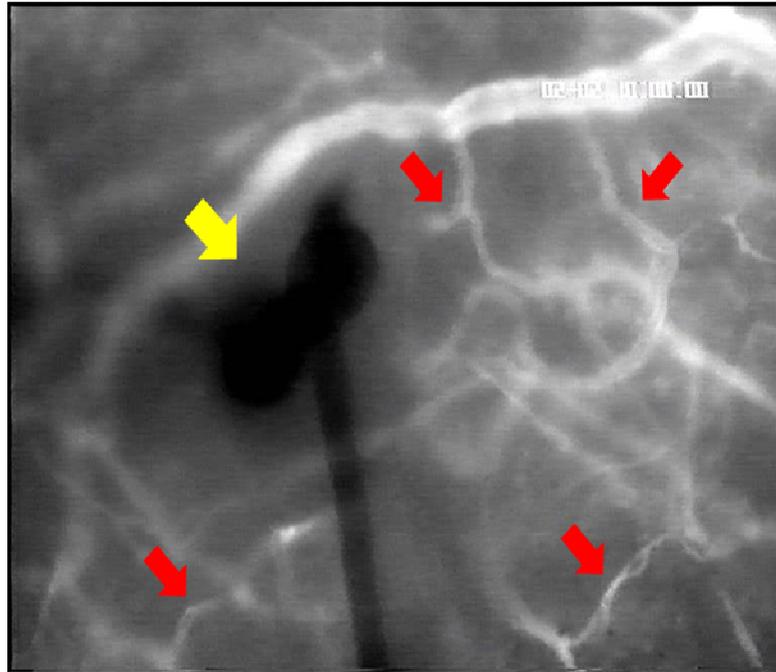
Von großem Interesse war die Analyse der Gefäßneubildung über und um den Wundspalt. Analog zur Analyse der funktionellen Kapillardichte (vgl. Kap. 4.5.3.4.) wurden die funktionell neu gebildeten Kapillaren in diesem Bereich ihrer Länge nach bei laufendem Videoband nachgezeichnet. Dabei wurden nur die mit Erythrozyten sowie mit Blutplasma perfundierten Kapillaren erfasst. Dahingegen blieben nicht-perfundierte Gefäßneubildungen unberücksichtigt. Die Gesamtlänge der markierten angiogenen Strukturen pro Gesichtsfeld ergab die Dichte dieses neu gebildeten Kapillarkomplexes in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  (**Abb. 16**).

#### 4.5.3.6. Arteriöläre und venuläre Leukozytenadhärenz

Die Leukozyten konnten unter Zuhilfenahme des Fluorchroms Rhodamin 6G in vivo angefärbt und ihr Adhäsionsverhalten am Endothel analysiert werden. Auf einer Strecke von 100  $\mu\text{m}$  eines gerade verlaufenden Gefäßabschnittes wurde die Anzahl der adhärennten Leukozyten pro  $\text{mm}^2$  Endotheloberfläche berechnet. Bei laufendem Videoband wurde diese Interaktion festgehalten und im Anschluss ausgewertet. Hierzu bedienen wir uns folgender Formel:

$$L = n * 10^6 / (d * \pi * 1)$$

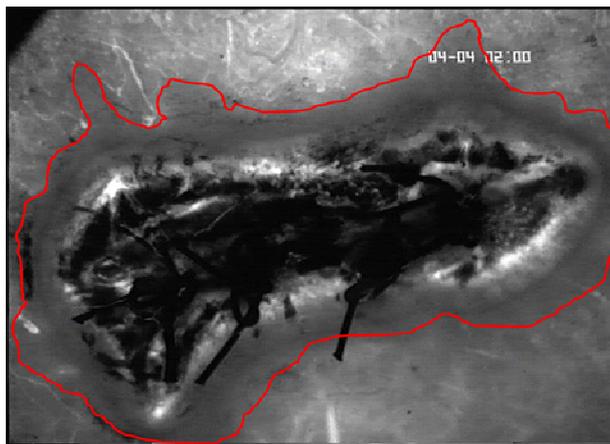
Dabei stellt  $n$  die Anzahl der Leukozyten dar, während  $d$  den Durchmesser des Gefäßes kennzeichnet und  $l$  die Strecke des analysierten Gefäßabschnittes ( $100\mu\text{m}$ ) dargestellt. In unserer Versuchsreihe fanden lediglich die Leukozyten Beachtung, die permanent über einen Zeitraum von 30 Sekunden an der Endotheloberfläche haften blieben.



**Abb. 16:** Analyse des angiogenen Prozesses im Bereich des zur Wundadaption einliegenden Nahtmaterials (gelber Pfeil). Anhand intravitalmikroskopischer Aufnahmen (20x Objektiv) wurde das komplexe Netzwerk neu gebildeter Kapillaren (rote Pfeile) manuell markiert.

#### 4.5.3.7. Nekrose

Zur Beurteilung der Nekrose wurde das nicht-perfundierte Gewebeareal über dem Inzisionsspalt bestimmt. In jedem aufgenommenen Gesichtsfeld um die Inzisionswunde wurde der nicht-perfundierte Anteil der Fläche umrandet und die einzelnen Flächen bei der Auswertung addiert (**Abb. 17**).



*Abb. 17: Analyse des nicht-perfundierten Areal im Inzisionsgebiet. Zur Vereinfachung der Darstellung ist hier eine geringere Vergrößerung dargestellt. Für die Datenerhebung in dieser Arbeit wurde die Fläche in hoher Vergrößerung (Objektiv 20x) ausgemessen und die Flächen der Einzelbilder addiert, um eine höhere Messgenauigkeit zu erzielen.*

#### 4.5.3.8. Makromolekulare Permeabilität

Zur Beurteilung der makromolekularen Permeabilität wurde die Extravasation von FITC-Dextran in das umliegende Gewebe gemessen. Die gesteigerte Gefäßpermeabilität und damit die Endothelschädigung wurden anhand der makromolekularen Leakage bestimmt. Der Fluoreszenzfarbstoff, welcher ein Molekulargewicht von 150000 Dalton aufweist, tritt unter physiologischen Bedingungen nicht aus dem intravasalen Raum ins Interstitium aus. Kommt es zu einer Schädigung des Gewebes, kann dies bei endothelialer Schädigung eine Extravasation des Farbstoffes bewirken. Innerhalb einer postkapillären Venole sowie in dem angrenzenden extravasalen Gewebe wurde nacheinander die Fluoreszenzintensität bestimmt. Computergestützt konnten die Grauwerte im extraluminalen Bereich ( $I_a$ ) und im intraluminalen Bereich ( $I_i$ ) zueinander in Relation gesetzt werden. Aus dem Verhältniswert ergab sich die Permeabilität der Gefäßwand:

$$QF = I_a / I_i$$

Unter physiologischen Bedingungen strebt dieser Quotient den Wert 0 an. Zur Verbesserung der Vergleichbarkeit unter den einzelnen Versuchsgruppen wurde dieser Parameter als Prozent des Initialwertes angegeben.

#### 4.5.3.9. Übersicht über die Untersuchungsparameter und deren Einheiten

Messparameter	Einheiten
Blutzellgeschwindigkeit	mm/s
Gefäßdurchmesser	$\mu\text{m}$
Volumetrischer Blutfluss	pl/s
Funktionelle Kapillardichte	$\text{cm}/\text{cm}^2$
Angiogenese	$\text{cm}/\text{cm}^2$
Leukozytenadhärenz	Leukozyten/ $\text{mm}^2$ Endotheloberfläche
Nekrose	$\text{mm}^2$
Makromolekulare Leakage	--

#### 4.6. Histologie und Immunhistochemie

Mit Hilfe der Histologie war es möglich, die Wundheilung morphologisch zu untersuchen. Hierzu wurde am 10. Versuchstag die Rückenkammerpräparation exzidiert. Das Kammergewebe wurde zunächst isoliert und unter Zuhilfenahme von 4%-iger Formaldehyd (Roti-Histofix 4% Carl Roth GmbH, Karlsruhe) bei 20°C für 24 h fixiert. Nach Entwässerung und Einbettung des Gewebes in Paraffin erfolgte dann die Anfertigung von Serienschnitten. Die Aufarbeitung der Schnitte mit einer Dicke von 5 $\mu\text{m}$  sowie die Anfärbung mit Hämatoxylin-Eosin wurde von den Assistentinnen/Assistenten des Instituts für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes durchgeführt. Als Standardfärbung diente uns die Hämatoxylin-Eosin (HE)-Färbung.

Als Apoptosemarker wurden Caspase-3-Spaltprodukte, als Proliferationsmarker PCNA (Proliferating cell nuclear antigen) immunhistochemisch dargestellt. Hierzu erfolgte zunächst die Entparaffinierung der Schnitte. Mittels Immunoperoxidasetechnik wurden anschließend Caspase-3 und PCNA angefärbt. Die Inkubation dauerte 18 Stunden bei 4°C für PCNA und über Nacht bei Raumtemperatur für Caspase-3. Dabei diente als Primärantikörper gegen Caspase-3 ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Maus-Caspase-3-Antikörper (ASP175, 1:50; Cell Signaling Technology, Frankfurt). Dahingegen kam als Primärantikörper gegen PCNA ein

monoklonaler Maus-Anti-Pan-PCNA-Antikörper zur Anwendung (PC10; 1:50; DakoCytomation, Hamburg).

Als Sekundäntikörper für die Peroxidasereaktion verwendeten wir biotinylierte Ziegen-Anti-Maus- und Ziegen-Anti-Kaninchen-Immunglobulin-Antikörper (1:200; LSAB 2 System HPR, DakoCytomation), während 3,3'-Diaminobenzidin (DakoCytomation) als Chromogen diente.

Die angefertigten Schnitte wurden im Anschluss nach Mayer mit Hämalaun gegengefärbt und unter einem Lichtmikroskop (Model BX60F; Olympus Optical Co., Tokyo) untersucht. Nach Einstellen der jeweiligen Schnitte in 20-facher Vergrößerung wurden die einzelnen Ebenen fokussiert. Anschließend wurde die Zahl der positiven Zellen pro Gesichtsfeld bestimmt und dokumentiert.

#### 4.7. Datenerfassung und graphische Darstellung

Die Datenerfassung erfolgte während der Videoauswertung computergestützt mit einer speziellen Software (CapImage Version 5.03, Zeintl software, Heidelberg) auf vorher eigens dafür angefertigten Messbögen. Anschließend wurden die Daten von diesen Messbögen in Exceltabellen übertragen und elektronisch gespeichert (Microsoft-Excel-Software), so dass auch zu einem späteren Zeitpunkt auf diese Zugriff gewährleistet werden konnte.

Alle erhobenen Werte wurden als ein Mittelwert mit ihrem zugehörigen Standardfehler (SEM) angegeben. Diese Daten ermöglichten einen Vergleich der Gruppen untereinander sowie zwischen den unterschiedlichen Untersuchungstagen innerhalb einer Gruppe.

Die graphische Darstellung der Mittelwerte erfolgte mittels Sigma Plot (Jandel Corporation, SAN Rafael, CA, USA).

#### 4.8. Statistik

Zur Erfassung der statistischen Signifikanzen diente uns das Programm Sigma Stat (Jandel Corporation, San Rafael, CA). Zuerst wurden die Daten auf Normalverteilung geprüft, dann kam eine One Way Analysis of Variance (ANOVA) zur Anwendung. Bei der Durchführung multipler Vergleiche wendeten wir den Students-Newman-Keul (SNK) post hoc-Test an. Unterschiede mit einem  $p < 0,05$  wurden als signifikant angesehen und in den zuvor erstellten Graphen entsprechend gekennzeichnet.

## 5. Ergebnisse

### 5.1 Die Heilung von Inzisionswunden in nicht-traumatisiertem Gewebe

#### 5.1.1. Inoskulation und Angiogenese

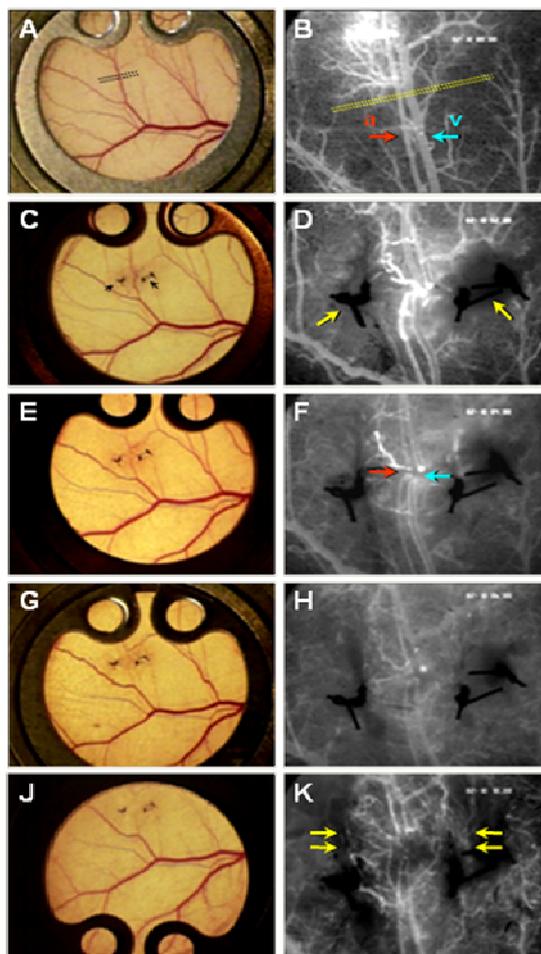
Unmittelbar nach Inzision konnte der Blutfluss inzidiertes Gefäße im Wundgebiet nicht aufrechterhalten werden und fiel rapide ab. Jedoch ließen sich bereits 2 Tage nach Inzision kapillare Aussprossungen der verletzten Blutgefäße beobachten. Am 10. Beobachtungstag war die Inzisionswunde von einem komplexen Netzwerk neuer Kapillare überbrückt. Der Blutfluss konnte somit im Wundheilungsverlauf durch das kompensatorische Einsprossen eines neuen Gefäßsystems wieder hergestellt werden (**Abb. 18**).

Beim Wundverschluss wurde sorgfältig darauf geachtet, die blutenden Enden der durchtrennten Gefäße zu readaptieren. Während dem 10-tägigen Beobachtungszeitraum blieben diese Gefäßstümpfe in den meisten Fällen voneinander getrennt (**Abb. 18 F**). Interessanterweise konnten sich einige inzidierte Venolen (in 4 von 8 Tieren), nicht jedoch Kapillaren und Arteriolen, durch Inoskulation wieder miteinander verbinden und somit im Heilungsverlauf reperfundiert werden. Der Gefäßanschluss beschränkte sich dabei nicht nur auf Gefäße, die vor Wundsetzung einem identischen Blutflusssystem angehörten. Auch ein neuer Kontakt zweier Gefäße, die vor Inzision eine getrennte Blutzirkulation aufwiesen, konnte beobachtet werden (**Abb. 19**).

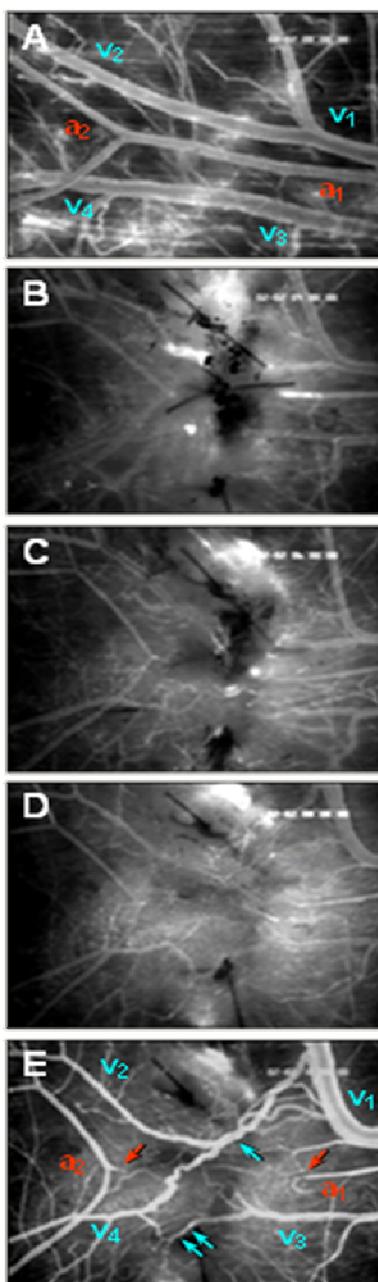
#### 5.1.2. Funktionelle Kapillardichte und Angiogenese

Bei der Analyse der funktionellen Kapillardichte im Wundgebiet konnten folgende Areale unterschieden werden: Kapillaren inzisionsfern, Kapillaren inzisionsnah, Kapillaren über der Inzision. In der Kontrollgruppe (Sham1, keine Inzision, kein Trauma, n=5) zeigte die funktionelle Kapillardichte im Beobachtungsfeld der Rückenhautkammer konstante Werte von über 250 cm/cm<sup>2</sup>. In Tieren, welche einer Inzision ausgesetzt wurden, zeigte sich in inzisionsfernen Beobachtungsfeldern kein signifikanter Unterschied im Vergleich zu Sham1-Kontrolltieren (**Abb. 20A**). Demgegenüber konnte über dem Inzisionsspalt eine starke Reduktion der funktionellen Kapillardichte verglichen mit den initialen Werten vor Verletzung nachgewiesen werden. Zwei Tage nach Inzision war sie auf weniger als 20% des Ausgangswertes reduziert. Innerhalb des 10-tägigen Beobachtungszeitraumes wurde jedoch eine erneute Zunahme der Kapillardichte bis 30% des Ausgangswertes beobachtet (**Abb. 20A**). Eine moderate, jedoch unvollständige Erholung konnte demnach nachgewiesen werden. Inzisionsnahe war die Kapillardichte um 30% im Vergleich zu den Ausgangswerten

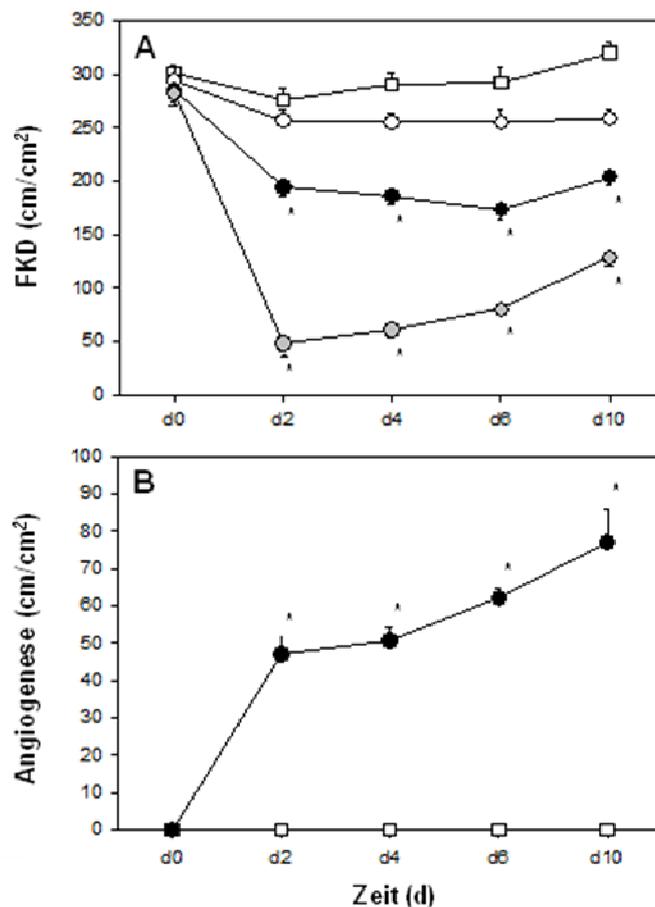
abgefallen, ohne dass über den weiteren Beobachtungszeitraum eine signifikante Steigung beobachtet werden konnte (**Abb. 20A**). Die funktionelle Kapillardichte in diesem Areal beinhaltete zum einen die präexistente Kapillaren, zum anderen das komplexe Netzwerk der neu entstandenen Kapillaren (Angiogenese). Die separate Analyse dieser neu entstandenen Gefäße zeigte, dass am 10. Beobachtungstag nach Inzision insgesamt  $80 \text{ cm/cm}^2$  von  $200 \text{ cm/cm}^2$  von neuen Gefäßeinsprossungen gebildet wurde (**Abb. 20B**). In Kontrolltieren ohne Inzision fand sich keine Angiogenese.



**Abb. 18:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen (A, C, E, G, J) im Beobachtungsfeld der Rückenhautkammer in der Kontrollgruppe (Sham 2, Inzision, kein Trauma,  $n=8$ ) in 16-facher Vergrößerung. (A) Die schwarze Linie markiert das Gefäßbündel für die Inzision 2 Tage nach Kammerpräparation. (C) Zeigt die zur Wundadaption (Inzision 2d alt) gesetzten Einzelknopfnähte (Pfeile). Intravitalmikroskopische Aufnahmen (B, D, F, H, K) im selben Tier in geringer Vergrößerung (Objektiv 5x). (B) Die Linie senkrecht zum Bündel illustriert die spätere Inzision von Arteriole (a) und Venole (v). (D) Inzision und Nähte (Pfeile) am selben Tag in der intravitalmikroskopischen Aufnahme. (F) 4d nach Inzision zeigt sich eine deutliche Konstriktion der Arteriole (roter Pfeil), die Blutung sistierte auch in der Venole (blauer Pfeil). (K) Am 10. Versuchstag ist der Wundspalt durch ein komplexes Netzwerk neuer Kapillaren überbrückt (gelbe Doppelpfeile).



**Abb. 19:** (A) Intravitalmikroskopische Aufnahme einer Arteriolen ( $a^1 = a^2$ ) und begleitenden Venolen ( $v^1 = v^2$ ,  $v^3 = v^4$ ) vor Wundinduktion (Objektiv 5x). (B) 2 Tage nach Inzision erkennt man noch deutlich das Hämatom nach Inzision. (C) 4. Tag nach Inzision, Beginn der Neovaskularisation. (D) 6 Tage nach Wundinduktion lässt sich ein erster Kontakt der Gefäßenden venulär beobachten. Man erkennt eine ausgeprägte arterioläre Vasokonstriktion. (E) 10 Tage nach Inzision erkennt man einerseits eine Inoskulation zwischen der Venole  $v1$  und  $v2$  (blauer Pfeil) und zwischen  $v3$  und  $v4$  (blauer Doppelpfeil), welche bereits vor Wundinduktion dem selben Gefäßsystem angehörten. Interessanterweise imponiert außerdem ein Gefäßanschluss zwischen  $v1$  und  $v4$  (blauer Pfeil), obwohl diese Venolen vor Inzision eine streng separate Perfusion aufwiesen. Die Stümpfe der Arteriolen blieben voneinander getrennt und kontrahiert (roter Pfeil).

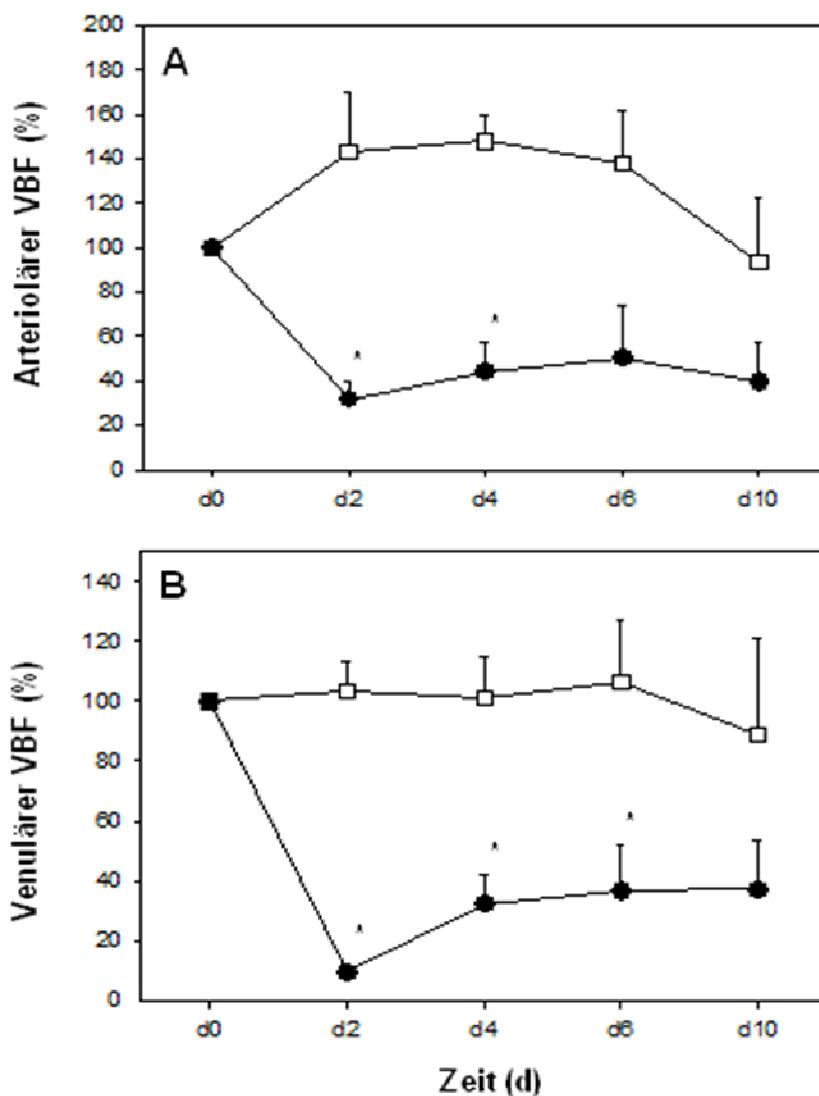


**Abb. 20:** (A) Quantitative Analyse der funktionellen Kapillardichte in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  im Beobachtungsfeld der Rückenhautkammer. Die FKD in Kontrolltieren ohne Inzision (A, weiße Quadrate,  $n=5$ ) zeigt konstante Werte über  $250 \text{ cm}/\text{cm}^2$  analog zu peripheren Feldern von Tieren, die einer Inzision ausgesetzt waren (A, weiße Kreise,  $n=8$ ). Dahingegen ließ sich in letzt genannten Mäusen ein signifikanter Abfall der FKD nahe der Inzisionswunde (A, schwarze Kreise,  $n=8$ ) und direkt über der Inzisionswunde (A, graue Kreise,  $n=8$ ) nachweisen. (B) Quantitative Analyse der Angiogenese in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  im Beobachtungsfeld der Rückenhautkammer (B, schwarze Kreise). Tiere ohne Inzision dienten als Kontrolle (B, offene Quadrate,  $n=5$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM.  $*p < 0,05$  vs Sham 1.

### 5.1.3. Arteriölerer und venulärer Blutfluss inzidiertes Gefäße

Aus arteriölerem bzw. venulärem Durchmesser und Blutzellgeschwindigkeit wurde der arteriöler bzw. venuläre volumetrische Blutfluss errechnet (**Abb. 21**). In der Kontrollgruppe ohne Inzision zeigte sich während des gesamten Beobachtungszeitraumes keine signifikante Beeinträchtigung. Im Gegensatz hierzu ließ sich in Mäusen, welche einer Inzisionswunde ausgesetzt waren, eine massive Reduktion der arteriöleren Perfusion auf 30% des Ausgangswertes beobachten. Auch 10 Tage nach dem Insult konnten die initialen Werte nicht wieder erreicht werden (**Abb. 21A**).

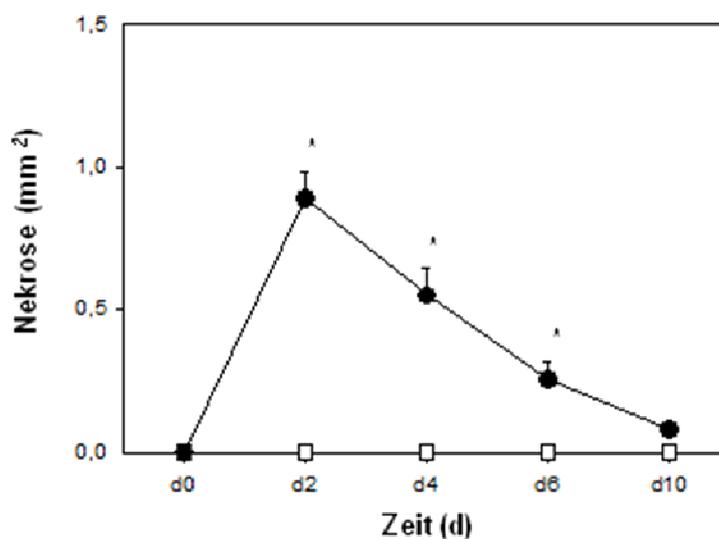
Die Analyse des venulären volumetrischen Blutflusses von Kontrolltieren ohne Inzision zeigten während des 10-tägigen Beobachtungszeitraums konstante Werte. Dahingegen resultierte eine Inzision der Venole in einer vorübergehenden 90%-igen Reduktion des Blutflusses verglichen zu den Ausgangswerten; 4d nach Insult konnte ein moderater, jedoch unvollständiger Wiederanstieg der Perfusion verzeichnet werden. In beiden Gefäßsystemen konnte die intialen Werte vor Verletzung nicht wieder erreicht werden (**Abb. 21 A und B**).



**Abb. 21:** Quantitative Analyse des (A) arteriulären und (B) venulären Blutflusses in Prozent des Ausgangswertes (d0) im Beobachtungsfeld der Rückenhautkammer von Tieren ohne Inzision (A, B, weiße Quadrate; Sham 1; n=5) und in Tieren, die einer Inzisionswunde ausgesetzt wurden (A, B, schwarze Kreise, n=8). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs Sham 1.

#### 5.1.4. Nekrose

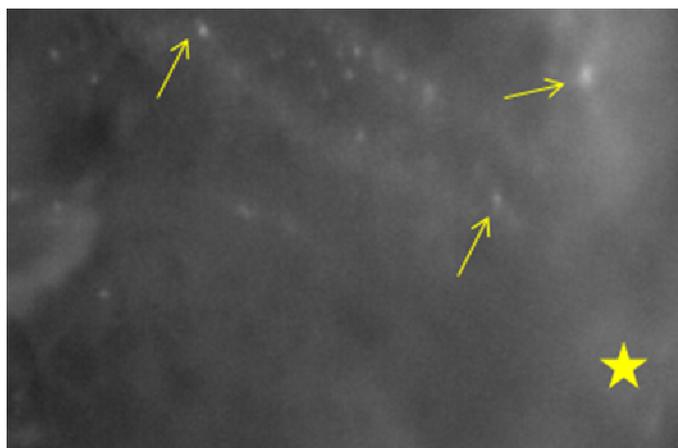
Bei nahezu allen Tieren zeigte sich initial ein nicht-perfundiertes Gewebeareal im Wundbereich, dessen Größe im Zeitverlauf durch kapillare Angiogenese kontinuierlich kleiner wurde. Am 2. Tag nach Inzision betrug das nicht-perfundierte Gewebeareal nahezu 1 mm<sup>2</sup>. Nach Abschluss des 10-tägigen Beobachtungszeitraumes war diese Fläche auf nahezu 0 mm<sup>2</sup> reduziert. In Kontrolltieren ohne Inzision ließ sich zu keinem Zeitpunkt ein nicht-perfundiertes Gewebeareal nachweisen (**Abb. 22**).



**Abb. 22:** Quantitative Analyse der nicht-perfundierten Fläche im Inzisionsgebiet in der Rücken-  
hautkammer. Die Flächenausmessung der Nekrose erfolgte am Tag 2, 4, 6 und 10 nach Setzen der  
Inzisionswunde (schwarze Kreise, n=8). Unbehandelte Kammern dienten als Kontrolle (weiße  
Quadrate, n=5). Mittelwert  $\pm$  SEM; \* $p < 0,05$  vs sham 1.

#### 5.1.5. Leukozytenadhärenz

Die chirurgische Inzision bewirkte eine Schädigung der Blutgefäße und dadurch eine ausgeprägte Blutung in das umgebende Gewebe. Hierbei konnte die Zahl der adhärenen Leukozyten am Gefäßendothel nicht immer zuverlässig evaluiert werden, da das entstandene Hämatom und das Ödem die intravitalmikroskopische Analyse deutlich behinderte. Erste aussagekräftige Beobachtungen ließen sich im idealen Fall 10 Tage nach Versuchsbeginn machen. Eine Differenzierung zwischen Leukozyten und Thrombozyten gestaltete sich abhängig von der Ödembildung nicht selten auch zu diesem Zeitpunkt als schwierig. Eine vermehrte Leukozytenadhärenz inzidierter Gefäße ließ sich zwar vermuten, konnte jedoch nicht zuverlässig dokumentiert und ausgewertet werden (**Abb. 23**).

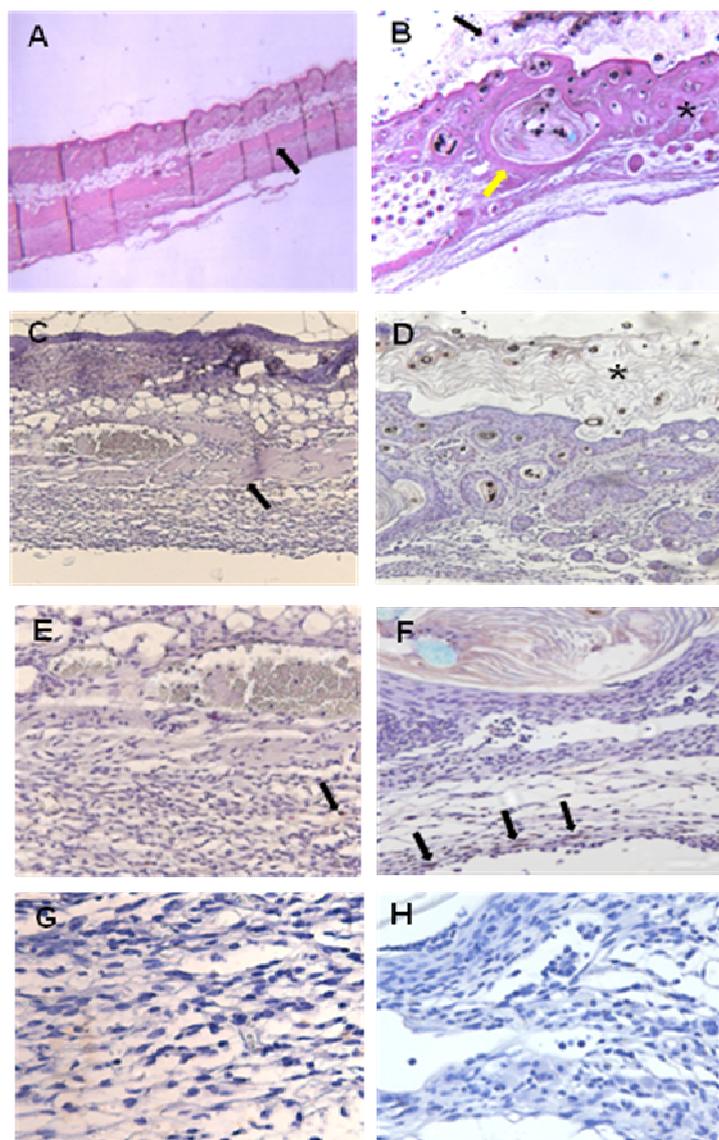


*Abb. 23: Intravitalmikroskopische Aufnahmen einer Kammer zur Bestimmung der Leukozyten-adhärenz (gelbe Pfeile) einer durchtrennten Venole 10 Tage nach Inzision. Der gelbe Stern markiert den Wundspalt. Die Arteriole lässt sich nicht adäquat abgrenzen.*

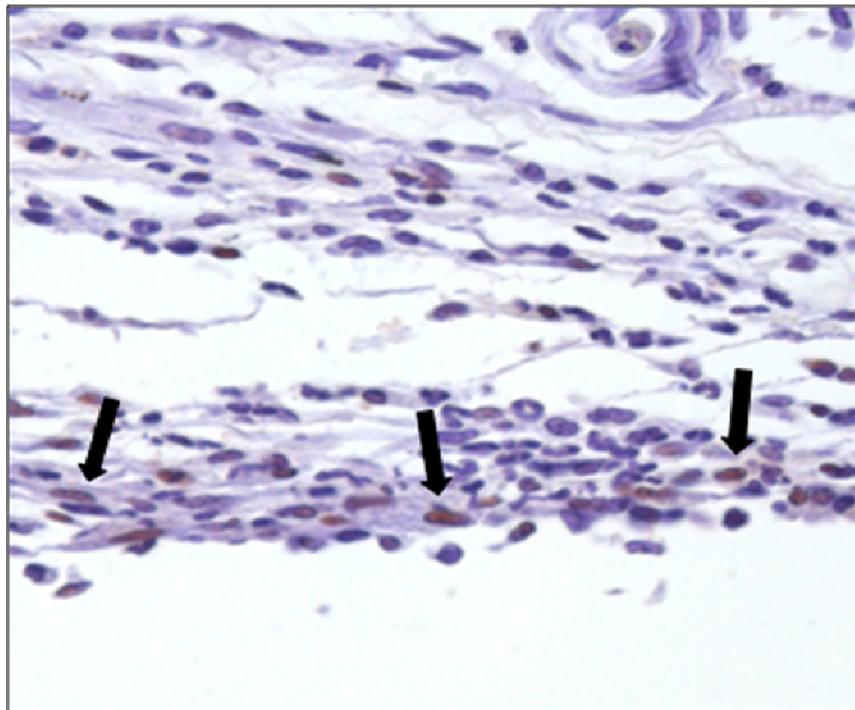
#### 5.1.6. Histologie und Immunhistochemie

Die lichtmikroskopische Untersuchung der histologischen Präparate der Rückenhautkammer am 10. Versuchstag konnte die intravitalmikroskopischen Ergebnisse weitestgehend bestätigen. Das am Tag 10 noch persistierende nicht-perfundierte Areal beschränkte sich zu diesem Zeitpunkt nahezu immer auf den Bereich des einliegenden Nahtmaterials (**Abb. 24B**), war jedoch in den meisten Fällen gar nicht mehr darstellbar. Interessanterweise kam es nach der Inzision zu keiner Regeneration des durchtrennten Muskelgewebes, welches in Kontrolltieren ohne Inzision jeweils intakt und unverletzt zur Darstellung kam (**Abb. 24 C, D**). In verletzten Tieren ließ sich am 10. Tag nach Inzision deutlich PCNA-positive Zellen nachweisen, während diese in unverletzten Kontrolltieren lediglich vereinzelt gefunden werden konnten (**Abb. 24 E, F, Abb. 25**).

Die Caspase-3 Färbung diente uns dazu, das Vorliegen von apoptotischen Zellen in der Wundregion darzustellen. Es zeigte sich jedoch innerhalb der beiden Kontrollgruppen mit und ohne Inzision keine Unterschiede hinsichtlich des apoptotischen Zelltodes. Insgesamt war die Zahl der nachgewiesenen apoptotischen Zellen in Kammern von Mäusen beider Gruppen sehr gering (**Abb. 24 G, H**).



**Abb. 24:** (A, B) Histologische Schnittpräparate des Kammergewebes. (A) In Kontrolltieren (Sham 1, keine Inzision, kein Trauma) zeigte sich ein intaktes Muskelgewebe (schwarzer Pfeil) (1,25x). (B) In inzidierten Mäusen (Sham 2, Inzision, kein Trauma) war kein Muskelgewebe im Wundareal mehr durchgängig darstellbar (10x). Der Wundspalt (schwarzer Stern) ist adaptiert, das einliegende Nahtmaterial hat ein Fadengranulom ausgebildet (gelber Pfeil). Abgestorbene Epithelzellen (schwarzer Pfeil) bedecken den Wundspalt. (C-H) Immunhistochemische Färbung von PCNA (C-F) und Caspase (G, H). (C-D) zeigt den Vergleich von (C) einem Kontrolltier mit intakter Muskelschicht (schwarzer Pfeil) (Sham 1, keine Inzision, kein Trauma) zu einem Tier, welches einer Inzision ausgesetzt war (D) in 10-facher Vergrößerung. Der Stern markiert abgestorbenes Gewebematerial im Wundgebiet (D). In der 20-fachen Vergrößerung können in nicht-inzidierten Mäusen (E) vereinzelt PCNA-positive Zellen nachgewiesen werden (schwarzer Pfeil), während diese in Tieren mit Inzision deutlich vermehrt zur Darstellung kommen (schwarze Pfeile) (F). Nach Caspase-3 Färbung lässt sich weder in unverletzten (G, 40x) noch in Tieren mit Wunde (H, 20x) eine hohe Apoptosezahl dokumentieren.

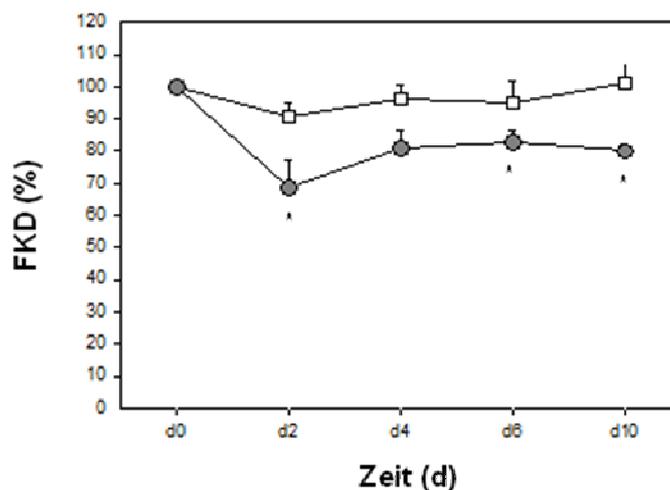


*Abb. 25: Immunhistochemische Färbung (PCNA) des Kammergewebes 10 Tage nach Inzision (40x). Die schwarzen Pfeile markieren PCNA-positive Zellen im Wundareal.*

## 5.2. Heilung von Inzisionswunden in traumatisiertem Gewebe

### 5.2.1. Trauma-assoziierte mikrozirkulatorische Dysfunktion

Die funktionelle Kapillardichte stellt die Qualität der nutritiven Perfusion dar. Ein großer Teil des adäquaten Nähr- und Sauerstoffaustausches basiert auf einer intakten nutritiven Durchblutung. Ein schweres Weichteiltrauma resultierte in einem initialen Perfusionsversagen (65% vom Ausgangswert nach 2 Tagen) mit einer moderaten Erholung über den 10-tägigen Beobachtungsraum. Am 10. Tag nach Weichteiltrauma konnte ein Wiederanstieg der FKD auf 80% der Ausgangswerte beobachtet werden (Sham 3, keine Inzision, Trauma, n=6). Dahingegen zeigte die funktionelle Kapillardichte in Kontrolltieren (Sham 1, keine Inzision, kein Trauma, n=5) kein Perfusionsversagen im gesamten Beobachtungsfeld der Rücken- hautkammer, sondern konstante Werte über den gesamten Beobachtungszeitraum (**Abb. 26**).



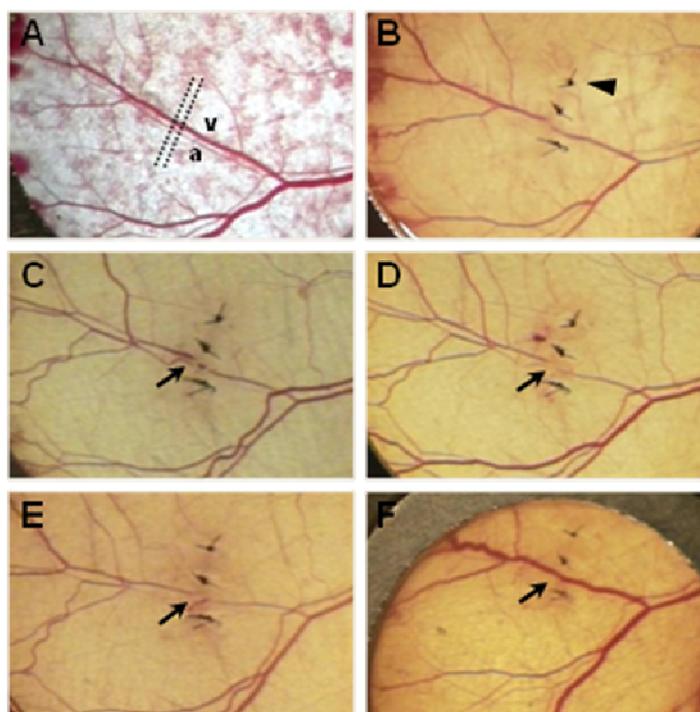
**Abb. 26:** Quantitative Analyse der funktionellen Kapillardichte in Prozent des Ausgangswertes ( $d_0$ ) im Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer vor ( $d_0$ ) sowie 2, 4, 6 und 10 Tage nach Weichteiltrauma (graue Kreise,  $n=6$ ). Nicht-traumatisierte Tiere dienten als Kontrolle (weiße Quadrate,  $n=5$ ). Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$ .

### 5.2.2. Inoskulation und Angiogenese

Durch Inoskulation konnte bereits in Inzisionswunden ohne vorangegangenes Weichteiltrauma eine Wiederherstellung des venösen Blutflusses nachgewiesen werden (vgl. Kap. 5.1.1.). In dieser Untersuchungsgruppe konnte der Anschluss inzidierter Gefäße in 4 von 8 Tieren beobachtet werden. Tiere, welche 24 h nach lokalem Weichteiltrauma eine Inzisionswunde erhielten, zeigten dies lediglich in einem von 6 Fällen über den 10-tägigen Beobachtungszeitraum. Nach Induktion einer Inzisionswunde unmittelbar nach Weichteiltrauma konnte in 2 von 7 Fällen eine venuläre Inoskulation beobachtet. Des Weiteren zeigten 2 von 9 Tiere eine venuläre Inoskulation in der Gruppe, in denen die Versuchstiere die Inzision 3 Tage nach Trauma erhielten, sowie 2 von 7 Tiere in der Gruppe, in denen die Inzision 5 Tage nach Trauma induziert wurde. Prozentual imponierte die Inoskulation am häufigsten in nicht-traumatisierten Tieren. Hier waren 50 % der inzidierten Venolen zur Inoskulation fähig (**Tab. 7**). Interessanterweise ließ sich – verglichen zu den Ergebnissen nicht-traumatisierter Mäuse – auch nach Trauma ein ausschließliches Vorkommen der Inoskulation von Venolen verzeichnen. In allen Versuchs- und Kontrollgruppen verblieben die Gefäßstümpfe der Arteriolen im umliegenden Wundbett kontrahiert und getrennt voneinander (**Abb. 27, Abb. 28**).

Gruppe	Venuläre Inoskulation
Inzision, kein Trauma (Sham 2, n=8)	50 %
Inzision direkt nach Trauma (n=7)	28,6 %
Inzision 1d nach Trauma (n=6)	16,6 %
Inzision 3d nach Trauma (n=9)	22,2 %
Inzision 5d nach Trauma (n=7)	28,6 %

**Tab. 7:** Nachweis einer venulären Inoskulation nach Inzision in der Kontrollgruppe (Sham 2, Inzision, kein Trauma, n=8) sowie in den einzelnen Versuchsgruppen in Prozent der Gesamtanzahl der Tiere in einer Gruppe.



**Abb. 27:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen des Beobachtungsfeldes einer Maus, welche 3 Tage nach Weichteiltrauma einer Inzision ausgesetzt wurde (A-F). (A) Zeigt das diffuse Hämatom im Beobachtungsfenster unmittelbar nach lokalem Weichteiltrauma. Die schwarze Linie markiert die Schnittführung für die Inzision von Arteriole (a) und Venole (v). (B) Illustriert unmittelbar nach Wundinduktion die Adaption mit Einzelknopfnähten (schwarzer Pfeil). (C) Das Hämatom zeigt eine Rückbildungstendenz. 4 (D) und 6 Tage (E) nach der Inzision imponiert eine deutliche Vasokonstriktion (schwarzer Pfeil). (F) Am 10. Tag konnte die Inoskulation der Venole beobachtet werden (schwarzer Pfeil), während die Arteriole durch Kontraktion im umliegenden Gewebeareal kaum noch abzugrenzen ist.

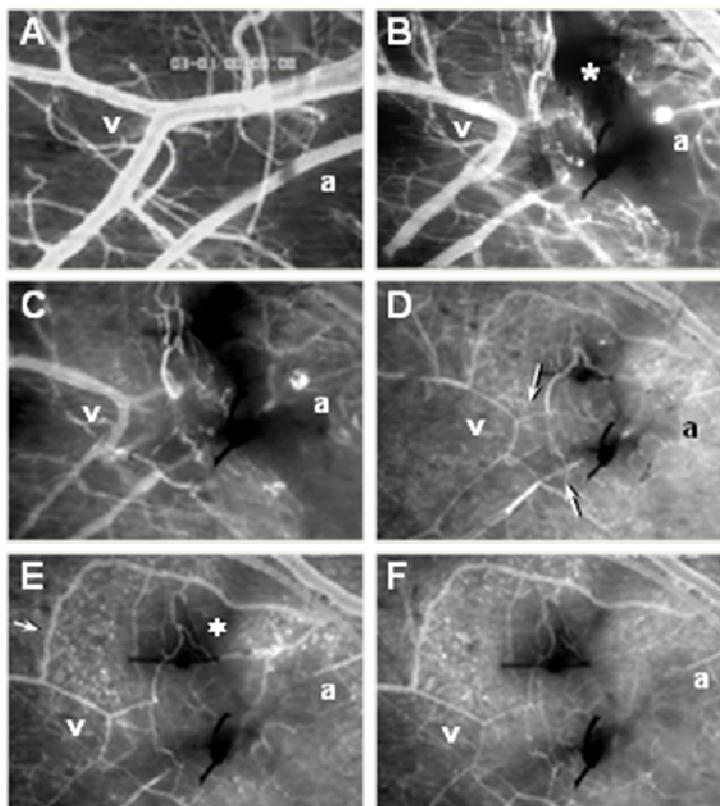
Bereits in nicht-traumatisierten Tieren wurde nachgewiesen, dass die Inzisionswunde durch kapillare Angiogenese reperfundiert werden konnte. In Kontrollgruppen ohne Weichteiltrauma konnten 2 Tage nach Wundinduktion kapillare Aussprossungen dieser Gefäße beobachtet werden. Der angiogene Prozess ließ sich jedoch auch in Versuchstieren wieder finden, welche zuvor einem lokalen Weichteiltrauma ausgesetzt waren, gleich an welchem Tag die Inzision nach diesem erfolgte. Innerhalb der Versuchsgruppen wies der Prozess jedoch z.T. deutliche Unterschiede bzgl. seiner Ausprägung auf. In nicht-traumatisierten Kontrolltieren, welche isoliert einer Inzision ausgesetzt waren, wurde nachgewiesen, dass am 10. Tag nach Versuchsbeginn insgesamt  $80 \text{ cm/cm}^2$  von  $200 \text{ cm/cm}^2$  der funktionellen Kapillardichte im Wundgebiet durch neue Kapillaren gebildet sind. Ähnliche Messdaten konnten wir in Tieren erheben, in welchen unmittelbar nach Weichteiltrauma eine Durchtrennung des arterio-venösen Bündels erfolgte. Am 10. Tag des Beobachtungszeitraumes zeigte sich ein komplexes Netzwerk neuer Kapillaren, die eine Reperfusion des initial nicht durchbluteten Wundspalts sicherstellten (**Abb. 28**). Dahingegen konnte in Tieren, welche 24 h, sowie 3 und 5 Tage nach Trauma einer chirurgischen Inzision ausgesetzt waren, lediglich ein mäßig ausgeprägter angiogener Prozess beobachtet werden. Am 2. Tag zeigten sich in diesen Versuchsgruppen Werte von  $20 \text{ cm/cm}^2$ , welche 2 Tage später auf  $30 \text{ cm/cm}^2$  anstiegen. Interessanterweise fand sich während des 10-tägigen Beobachtungszeitraums bei Tieren mit Inzision 24 h nach Trauma keine weitere Steigerung der Angiogenese. Folglich unterschied sich die angiogene Reaktion signifikant von denen in Kontrollmäusen sowie in anderen Versuchsgruppen, in denen eine moderate Reperfusion über Angiogenese zu verzeichnen war (**Abb. 29**).

### 5.2.3. Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte spiegelt die Qualität der nutritiven Perfusion wieder. Dass ein lokaler Weichteilschaden eine mikrozirkulatorische Dysfunktion hervorruft, konnte bereits nachgewiesen werden (vgl. Kap. 5.2.1.). Bei der Analyse der funktionellen Kapillardichte in traumatisierten inzidierten Tieren wurden 3 verschiedene Gewebeareale unterschieden: (A) FKD peripher der Inzision, (B) FKD inzisionsnah, (C) FKD unmittelbar über dem Inzisionsspalt. Inzisionswunden ohne Trauma dienten als Kontrolle (Sham 2, Inzision, kein Trauma, n=8).

Unmittelbar über dem Inzisionsspalt ließ sich initial ein massiver Abfall der nutritiven Perfusion beobachten. Die funktionelle Kapillardichte war 2 Tage nach Inzision im OP-Gebiet auf weniger als 20% im Vergleich zu den Ausgangswerten reduziert. Diese Reduktion

der Perfusion konnte in vergleichbarer Ausprägung in allen Versuchsgruppen beobachtet werden. Es folgte in allen Tieren ein moderater, jedoch unvollständiger Wiederanstieg während des 10-tägigen Beobachtungszeitraumes. Am 10. Beobachtungstag ließ sich in den Versuchsgruppen ein Anstieg der Kapillardichte auf 30 bis 50% verzeichnen. Ein signifikanter Unterschied zwischen Kontrollgruppe und einzelnen Untersuchungsgruppen konnte nicht festgestellt werden (**Abb. 30 A**).

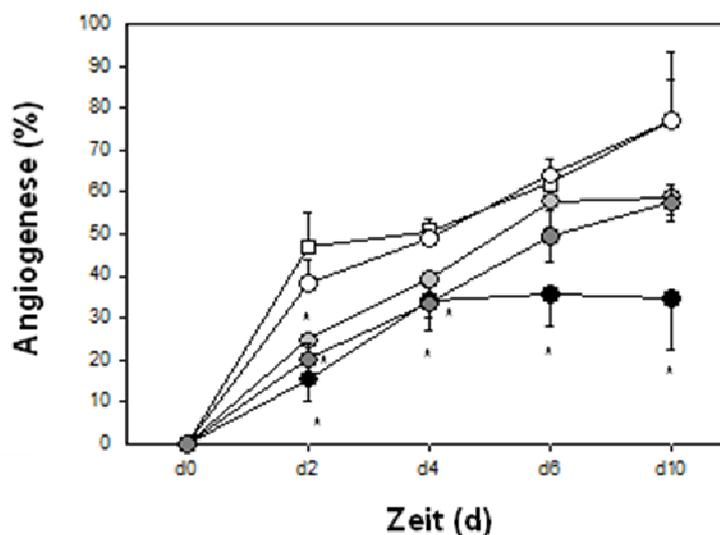


**Abb. 28:** Intravitalmikroskopische Aufnahmen der Kammer eines Tieres, welches unmittelbar nach Weichteiltrauma einer Inzision ausgesetzt wurde (Objektiv 5x). (A) Repräsentiert die Arteriole (a) und Venole (v) in der Baseline-Aufnahme. (B) 2 Tage nach Trauma und Inzision wird die Blutung aus den Gefäßstümpfen ersichtlich (weißer Stern). (C) Am 4. Tag erkennt man den Beginn der Neovaskularisation ohne Inoskulation des durchtrennten Gefäßbündels. (D) Die inzidierten Gefäße weisen eine deutliche Vasokonstriktion auf (weiße Pfeile). (E) Eine Reperfusion der inzidierten Venole kann einerseits über Angiogenese (weißer Stern), andererseits über Inoskulation (weißer Pfeil) beobachtet werden. (F) Am 10. Beobachtungstag stellt sich der Inzisionsspalt weitestgehend reperfundiert dar.

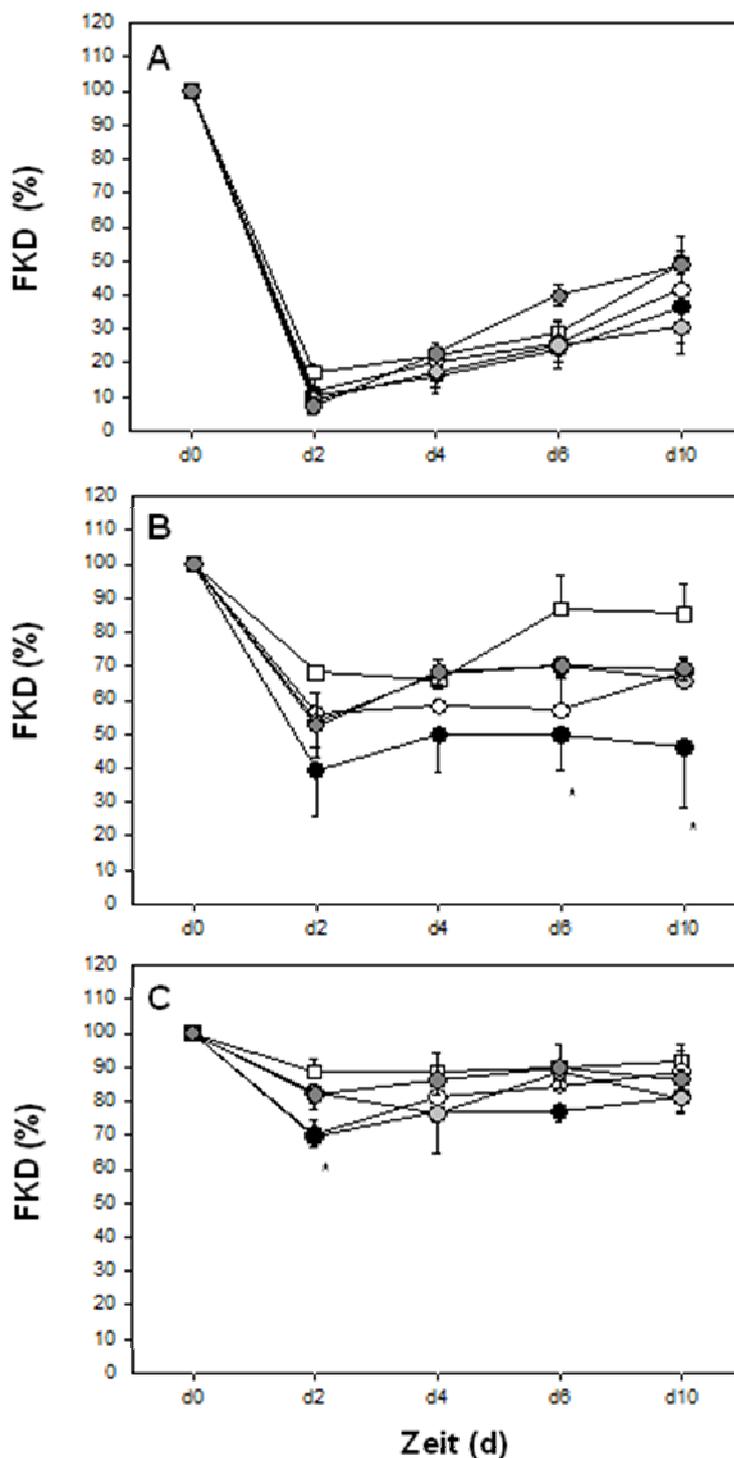
Neben Kapillaren unmittelbar über dem Wundspalt wurden diejenigen analysiert, welche in direkter Nähe verliefen. Die funktionelle Kapillardichte beinhaltete in diesem Gewebeareal

zum einen die präexistenten Kapillaren, zum anderen das komplexe Netzwerk neu-gebildeter Gefäßausprossungen (Angiogenese). Im inzisionsnahen Gewebeareal konnten wir nach 2 Tagen in allen Versuchsgruppen eine signifikante Reduktion der funktionellen Kapillardichte um mehr als 30% im Vergleich zu den Ausgangswerten beobachten, ohne dass ein signifikanter Unterschied unter der einzelnen Gruppen festgestellt werden konnte. Eine mäßiggradige Erholung ließ sich in nahezu allen traumatisierten Tieren und in der nicht-traumatisierten Kontrollgruppe nachweisen. Auffällig war, dass Mäuse, welche die Inzision 24 h nach Weichteiltrauma erhielten, den größten Kapillarverlust im Wundgebiet ohne adäquate Erholung über den 10-tägigen Beobachtungszeitraum erlitten. In den anderen Gruppen konnten keine Unterschiede untereinander ausgemacht werden. Die vor Inzision gemessenen Ausgangswerte konnten jedoch nicht mehr erreicht werden (**Abb. 30 B**).

In inzisionsfernen Beobachtungsfeldern war die nutritive Perfusion weder in der Kontrollgruppe, noch in den meisten Versuchsgruppen signifikant beeinträchtigt und vergleichbar mit der nutritiven Perfusion in Kontrollkammern ohne Inzision. Jedoch konnte bei Tieren, welche die Inzision 24 h nach Weichteiltrauma erhielten, am 2. Beobachtungstag eine signifikante Reduktion der funktionellen Kapillardichte um über 30% im Vergleich zu den Ausgangswerten nachgewiesen werden (**Abb. 30 C**).



**Abb. 29:** Quantitative Analyse der Angiogenese im Wundgebiet in der Rückenhautkammer in nicht-traumatisierten Kontrolltieren (weiße Quadrate, n=8), sowie in Gruppen, welche der Inzision unmittelbar nach (weiße Kreise, n=7), 24 h (schwarze Kreise, n=6), 3 Tage (hellgraue Kreise, n=9) und 5 Tage (dunkelgraue Kreise, n=7) nach Trauma ausgesetzt waren. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Sham 2.



**Abb. 30:** Quantitative Analyse der funktionellen Kapillardichte (A) über dem Inzisionsspalt, (B) inzisionsnah und (C) inzisionsfern in der Peripherie der Rückenhautkammer. Dargestellt sind die Beobachtungsfelder der nicht-traumatisierten Kontrolltiere (Sham 2, Inzision, kein Trauma, weiße Quadrate, n=8), sowie von Tieren, bei denen unmittelbar (weiße Kreise, n=7), 24 h (schwarze Kreise, n=6), 3 Tage (graue Kreise, n=9) und 5 Tage (dunkelgraue Kreise, n=7) nach Weichteiltrauma eine Inzisionswunde induziert wurde. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Sham 2.

#### 5.2.4. Arteriöler und venöler Blutfluss

Aus dem arteriölen und venölen Durchmesser wurde der volumetrische Blutfluss errechnet (**Tab. 8-11**). Zur Analyse wurden zum einen der Blutfluss des inzidierten Gefäßes zum Wundspalt hin-, zum anderen der Blutfluss vom Inzisionsspalt weg-führend beobachtet. Sowohl Kontrolltiere wie auch Tiere, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach Trauma einer Inzision ausgesetzt waren, zeigten einen starken Abfall des Blutflusses verglichen zu den Ausgangswerten. Zwischen den einzelnen Gruppen konnten in den meisten Fällen keine signifikanten Unterschiede evaluiert werden. Eine Ausnahme stellte die Gruppe dar, welche 5 Tage nach Trauma einer Inzision unterzogen wurde. Hier konnte eine persistente signifikante Reduktion der Perfusion der vom Wundspalt weg führenden Venolen beobachtet werden. Zusammenfassend konnte eine suffiziente Erholung weder in inzidierten Venolen, noch in Arteriolen festgestellt werden. Die Inzision resultierte in einer venölen und arteriölen Hypoperfusion, die auch zum Ende des Beobachtungszeitraums nicht reversibel war (**Tab. 8-11**).

Blutzellgeschwindigkeit (mm/s)	d 0	d 2	d 4	d 6	d 10
Inzision – kein Trauma	1,6 ± 0,2	0,8 ± 0,3	1,8 ± 0,1	1,6 ± 0,3	0,8 ± 0,4
Inzision 0 d – Trauma	1,2 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,8 ± 0,1*	0,8 ± 0,1	0,4 ± 0,1
Inzision 1 d – Trauma	1,2 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,7 ± 0,1*	1,1 ± 0,1	0,9 ± 0,1
Inzision 3 d – Trauma	1,9 ± 0,3	0,7 ± 0,2	1,3 ± 0,3	1,1 ± 0,2	1,1 ± 0,3
Inzision 5 d – Trauma	1,8 ± 0,1	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,2*	1,1 ± 0,1	1,2 ± 0,2
Durchmesser (µm)	d 0	d 2	d 4	d 6	d 10
Inzision – kein Trauma	62,9 ± 8,0	49,3 ± 3,9	36,1 ± 4,2	36,0 ± 6,5	40,7 ± 6,0
Inzision 0 d – Trauma	44,1 ± 3,9	36,5 ± 2,5	39,7 ± 3,5	40,8 ± 3,1	39,6 ± 1,6
Inzision 1 d – Trauma	49,9 ± 3,7	35,8 ± 5,9	43,5 ± 7,8	43,0 ± 6,3	32,8 ± 3,7
Inzision 3 d – Trauma	56,0 ± 5,4	51,7 ± 5,5	37,5 ± 5,9	40,8 ± 6,0	38,9 ± 9,0
Inzision 5 d – Trauma	62,9 ± 3,6	66,7 ± 7,9	34,8 ± 3,1	36,9 ± 4,8	39,9 ± 6,0
Volumetrischer Blutfluss (%)	d 0	d 2	d 4	d 6	d 10
Inzision – kein Trauma	100,0 ± 0,0	67,7 ± 33,7	97,1 ± 59,7	37,7 ± 16,2	42,7 ± 35,4
Inzision 0 d – Trauma	100,0 ± 0,0	82,9 ± 36,2	68,1 ± 22,3	57,1 ± 13,8	62,1 ± 50,5
Inzision 1 d – Trauma	100,0 ± 0,0	28,6 ± 12,0	50,3 ± 15,9	71,8 ± 19,8	71,8 ± 53,8
Inzision 3 d – Trauma	100,0 ± 0,0	45,9 ± 15,5	27,0 ± 14,2	34,3 ± 15,5	35,1 ± 8,9
Inzision 5 d – Trauma	100,0 ± 0,0	20,6 ± 13,5	16,9 ± 6,8	25,4 ± 10,0	35,0 ± 21,2

**Tab. 8:** Blutzellgeschwindigkeit, Durchmesser und volumetrischer Blutfluss zum Wundspalt führender Arteriolen in Kontrolltieren (Sham 2, Inzision, kein Trauma, n=8) sowie in Tieren, bei denen direkt (n=7), 24 h (n=6), 3 d (n=9) und 5 d (n=7) nach Trauma die Inzision erfolgte. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Sham 2.

<b>Blutzellgeschwindigkeit (mm/s)</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	1,6 ± 0,2	0,8 ± 0,3	1,6 ± 0,3	2,4 ± 0,3	1,5 ± 0,3
Inzision 0 d – Trauma	1,2 ± 0,1	1,1 ± 0,2	1,4 ± 0,3	1,0 ± 0,3*	1,0 ± 0,3
Inzision 1 d – Trauma	1,2 ± 0,1	0,7 ± 0,3	0,7 ± 0,2	0,5 ± 0,2*	0,3 ± 0,1
Inzision 3 d – Trauma	1,9 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,9 ± 0,4	0,7 ± 0,3*	0,0 ± 0,0
Inzision 5 d – Trauma	1,8 ± 0,1	0,5 ± 0,2	0,5 ± 0,1	1,1 ± 0,1*	1,3 ± 0,1
<b>Durchmesser (µm)</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	68,9 ± 0,8	48,1 ± 3,6	42,2 ± 5,4	36,2 ± 4,0	33,5 ± 4,6
Inzision 0 d – Trauma	44,1 ± 3,9*	37,1 ± 3,4	40,8 ± 2,5	34,1 ± 3,3	37,0 ± 2,6
Inzision 1 d – Trauma	46,0 ± 5,3*	35,2 ± 5,3	30,4 ± 5,6	47,5 ± 15,1	25,3 ± 0,9
Inzision 3 d – Trauma	56,0 ± 5,4	48,6 ± 5,6	47,5 ± 6,0	46,0 ± 4,4	36,0 ± 0,0
Inzision 5 d – Trauma	62,9 ± 3,6	43,0 ± 5,0	38,8 ± 3,9	38,0 ± 3,1	32,9 ± 5,8
<b>Volumetrischer Blutfluss (%)</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	100,0 ± 0,0	20,7 ± 7,6	44,3 ± 12,6	50,6 ± 23,8	39,9 ± 17,5
Inzision 0 d – Trauma	100,0 ± 0,0	63,3 ± 21,9	79,3 ± 8,9	33,0 ± 14,4	88,2 ± 67,4
Inzision 1 d – Trauma	100,0 ± 0,0	35,9 ± 14,6	32,5 ± 13,3	29,6 ± 19,1	2,4 ± 2,4
Inzision 3 d – Trauma	100,0 ± 0,0	39,5 ± 17,3	22,9 ± 11,6	53,7 ± 26,7	0,0 ± 0,0
Inzision 5 d – Trauma	100,0 ± 0,0	17,1 ± 8,5	16,6 ± 9,0	28,2 ± 8,8	23,0 ± 9,9

**Tab. 9:** Blutzellgeschwindigkeit, Durchmesser und Blutfluss vom Wundspalt weg führender Arteriolen in Kontrolltieren (Sham 2, Inzision, kein Trauma, n=8) sowie in Tieren, bei denen direkt (n=7), 24h (n=6), 3d (n=9) und 5d (n=7) nach Trauma die Inzision erfolgte. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Sham 2.

<b>Blutzellgeschwindigkeit (mm/s)</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	1,0 ± 0,2	0,2 ± 0,0	0,9 ± 0,2	1,0 ± 0,2	0,9 ± 0,1
Inzision 0 d – Trauma	1,2 ± 0,2	0,2 ± 0,1	0,4 ± 0,1	0,3 ± 0,0*	0,5 ± 0,1
Inzision 1 d – Trauma	1,0 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,9 ± 0,2	0,4 ± 0,1
Inzision 3 d – Trauma	1,5 ± 0,3	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,2
Inzision 5 d – Trauma	1,4 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,7 ± 0,1	1,0 ± 0,1	0,9 ± 0,2
<b>Durchmesser (µm)</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	89,2 ± 11,0	67,2 ± 11,2	63,3 ± 5,8	60,9 ± 11,2	70,4 ± 16,7
Inzision 0 d – Trauma	80,4 ± 10,1	77,9 ± 4,8	77,3 ± 6,6	72,3 ± 3,0	60,9 ± 0,7
Inzision 1 d – Trauma	68,7 ± 9,3	61,6 ± 8,6	58,6 ± 6,9	60,8 ± 10,6	40,0 ± 3,9
Inzision 3 d – Trauma	102,4 ± 12,3	87,4 ± 9,0	67,5 ± 8,5	63,5 ± 4,2	63,3 ± 12,4
Inzision 5 d – Trauma	96,2 ± 10,3	123,2 ± 15,7*	70,9 ± 6,0	59,3 ± 6,6	49,3 ± 4,5
<b>Volumetrischer Blutfluss (%)</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	100,0 ± 0,0	9,6 ± 2,3	32,4 ± 9,8	36,8 ± 14,9	37,2 ± 16,7
Inzision 0 d – Trauma	100,0 ± 0,0	50,9 ± 32,6	48,7 ± 24,3	39,1 ± 20,7	71,2 ± 28,3
Inzision 1 d – Trauma	100,0 ± 0,0	29,1 ± 9,9	52,8 ± 8,4	57,1 ± 20,6	14,0 ± 10,6
Inzision 3 d – Trauma	100,0 ± 0,0	26,3 ± 9,6	16,9 ± 4,8	39,3 ± 17,0	26,2 ± 11,2
Inzision 5 d – Trauma	100,0 ± 0,0	51,5 ± 25,2	35,2 ± 7,3	30,8 ± 8,8	16,7 ± 10,5

**Tab. 10:** Blutzellgeschwindigkeit, Durchmesser und Blutfluss inzidiertes zum Wundspalt führender Venolen in Kontrolltieren (Sham 2, Inzision, kein Trauma, n=8) sowie in Tieren, bei denen direkt (n=7), 24 h (n=6), 3 d (n=9) und 5 d (n=7) nach Trauma die Inzision erfolgte. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Sham 2.

<b>Blutzellgeschwindigkeit (mm/s)</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	1,0 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,6 ± 0,4	1,1 ± 0,2	0,9 ± 0,1
Inzision 0 d – Trauma	1,3 ± 0,2	0,5 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,3 ± 0,3	0,8 ± 0,2
Inzision 1 d – Trauma	1,0 ± 0,2	0,3 ± 0,1	0,5 ± 0,1*	1,0 ± 0,2	0,6 ± 0,2
Inzision 3 d – Trauma	1,5 ± 0,3	0,6 ± 0,2	0,8 ± 0,2	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,1
Inzision 5 d – Trauma	1,4 ± 0,2	0,5 ± 0,1	0,8 ± 0,1	1,0 ± 0,1	1,0 ± 0,2
<b>Durchmesser (µm)</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	89,2 ± 11,0	74,4 ± 8,0	73,0 ± 7,2	64,9 ± 16,1	33,7 ± 4,2
Inzision 0 d – Trauma	80,5 ± 10,1	80,5 ± 10,6	81,1 ± 11,8	53,8 ± 4,4	42,2 ± 1,3
Inzision 1 d – Trauma	68,7 ± 9,3	59,3 ± 6,7	45,6 ± 5,7	54,2 ± 14,5	25,2 ± 2,0
Inzision 3 d – Trauma	102,4 ± 12,3	90,2 ± 8,9	78,7 ± 9,1	61,0 ± 2,6	119,6 ± 17,6
Inzision 5 d – Trauma	96,2 ± 10,3	101,3 ± 12,5	69,5 ± 7,9	55,7 ± 5,9	43,5 ± 4,2
<b>Volumetrischer Blutfluss (%)</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	100,0 ± 0,0	68,2 ± 22,3	120,2 ± 70,6	166,2 ± 104,1	21,7 ± 2,7
Inzision 0 d – Trauma	100,0 ± 0,0	69,9 ± 49,5	96,7 ± 37,6	74,2 ± 38,6	62,9 ± 55,8
Inzision 1 d – Trauma	100,0 ± 0,0	16,0 ± 6,4	44,6 ± 22,4	152,4 ± 78,5	70,4 ± 65,0
Inzision 3 d – Trauma	100,0 ± 0,0	34,5 ± 5,5	33,6 ± 7,4	53,9 ± 21,1	162,0 ± 76,3
Inzision 5 d – Trauma	100,0 ± 0,0	96,1 ± 58,6	32,7 ± 16,8	26,8 ± 1,9	7,9 ± 4,6*

**Tab. 11:** Blutzellgeschwindigkeit, Durchmesser und Blutfluss inzidiertes vom Wundspalt weg führender Venolen in nicht-traumatisierten Kontrolltieren (Sham 2, Inzision, kein Trauma, n=8) sowie in Tieren, bei denen unmittelbar (n=7), 24h (n=6), 3d (n=9) und 5d (n=7) nach Weichteiltrauma die Inzision erfolgte. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Sham 2.

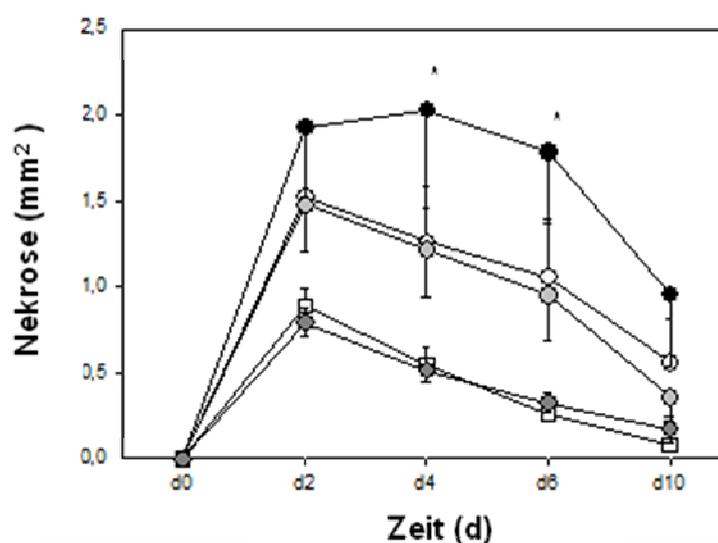
### 5.2.5. Nekrose und Trauma-assoziierte Entzündungsreaktion

Bei nahezu allen Tieren zeigte sich initial nach Inzision ein nicht-perfundiertes Gewebeareal, dessen Größe im Zeitverlauf durch kapillare Angiogenese kontinuierlich kleiner wurde. Hierbei konnte ein Zusammenhang der Ausprägung des nekrotischen Areal mit dem Zeitpunkt der Inzision nach Weichteiltrauma festgestellt werden. In nicht-traumatisierten Kontrolltieren war initial eine Fläche von ca. 1mm<sup>2</sup> nicht perfundiert. Reziprok zur Zunahme der kapillaren Angiogenese zeigte sich jedoch eine kontinuierliche Verkleinerung dieser Fläche während des 10-tägigen Versuchszeitraums. Diese Daten konnten sowohl in der nicht-traumatisierten Kontrollgruppe wie auch in den meisten Tieren der einzelnen Versuchsgruppen nach Trauma beobachtet werden. Interessanterweise fand sich das größte nicht-perfundierte Areal im chirurgischen Wundgebiet bei Tieren, welche 24 h nach Weichteiltrauma einer Inzision ausgesetzt waren. In dieser Gruppe war am 4. Beobachtungstag eine Fläche von 2,0 mm<sup>2</sup> nicht perfundiert. Zwar war eine geringe Erholung zu beobachten, jedoch lediglich bis 1,0 mm<sup>2</sup> am 10. Beobachtungstag (**Abb. 31**).

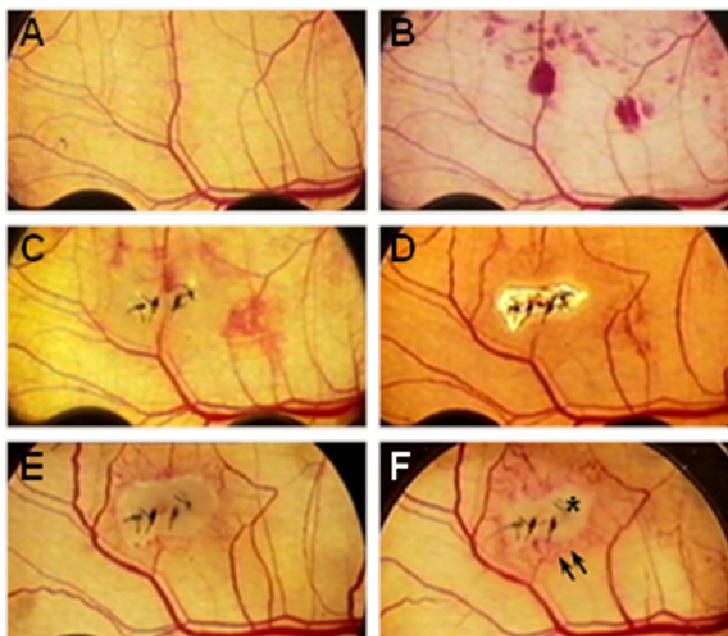
Der Blutfluss im Wundgebiet konnte in den meisten Kontroll- und Versuchstieren über kapillare Reperfusion (Angiogenese) und Inoskulation wieder verbessert werden. In einigen Tieren jedoch persistierte die Größe des nicht-perfundierten Gewebeareals. Ein komplettes

Ausbleiben der Reperfusion konnte in der Versuchsgruppe, welche 24 h nach Weichteiltrauma der Inzisionswunde ausgesetzt wurde, am häufigsten beobachtet werden (**Abb. 32**). In 50% der Versuchstiere konnte in dieser Gruppe ein Ausbleiben der Wundheilung und ein persistierendes nekrotisches Gewebeareal beobachtet werden. Je größer der zeitliche Abstand der Inzision zum lokalen Weichteiltrauma war, desto seltener ließ sich dieses Phänomen nachweisen (**Tab. 12**).

Bei allen nekrotischen Inzisionswunden ließ sich gleichzeitig ein Ödem, eine reaktive Hyperämie und Entzündungsreaktion um das nicht-perfundierte Gewebeareal beobachten (**Abb. 32, 33**).



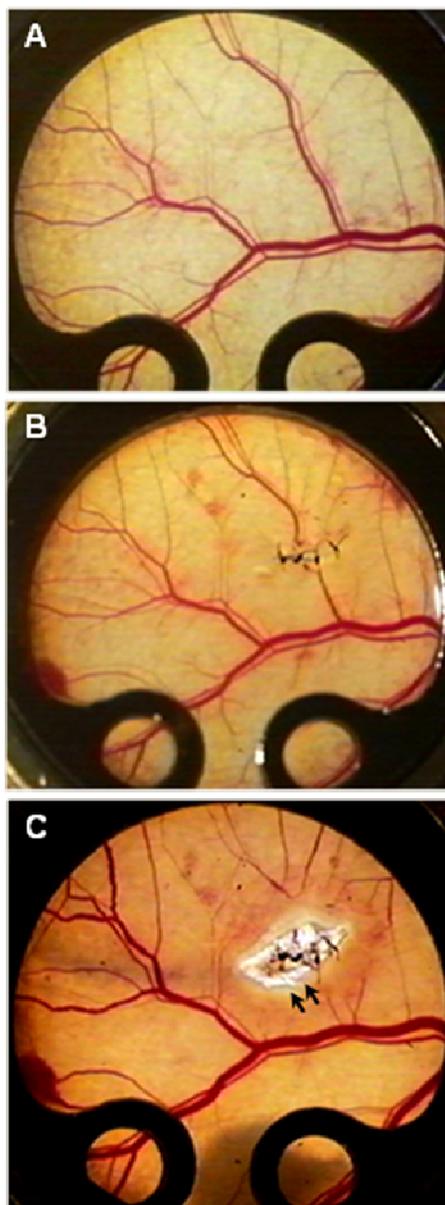
**Abb. 31:** *Quantitative Analyse des nicht-perfundierten Gewebeareals in der Rückenhautkammer in nicht-traumatisierten Kontrolltieren (Sham 2, Inzision, kein Trauma, weiße Quadrate, n=6) sowie in Tieren, bei denen unmittelbar (weiße Kreise, n=7), 24 h (schwarze Kreise, n=6), 3d (hellgraue Kreise, n=9) und 5d (dunkelgraue Kreise, n=7) nach Weichteiltrauma eine Inzision erfolgte. Das größte nicht-perfundierte Gewebeareal fand sich in Inzisionswunden, die 24 h nach Trauma gesetzt wurden (schwarze Kreise, n=6). Im Gegensatz zu den anderen Versuchsgruppen ließ sich hier die geringste kapillare Reperfusion im Wundgebiet feststellen. Mittelwert  $\pm$  SEM. \* $p < 0,05$  vs. Sham 2.*



**Abb. 32:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen des Beobachtungsfeldes der Rückenhautkammer einer Maus, welche 24 h nach Weichteiltrauma einer Inzisionwunde ausgesetzt war (A-F). (A) Das Beobachtungsfenster 2 Tage nach Kammerimplantation vor Trauma. (B) Beobachtungsfenster direkt nach Trauma. (C) Am 2. Tag nach Inzision zeichnet sich eine ödematöse Schwellung um den Wundspalt ab. (D) 4 Tage nach chirurgischer Inzision wird das nicht-perfundierte Areal im Wundgebiet deutlich. Weitere 2 Tage später (E) zeigt sich im OP-Gebiet neben einer reaktiven Hyperämie eine progrediente ödematöse Schwellung über dem Wundspalt ab. Am 10. Versuchstag war dieses Areal gering verkleinert (schwarzer Stern). Bei persistierender Hyperämie fand sich jedoch immer noch keine Vaskularisierung des Wundspaltes (schwarze Pfeile).

Gruppe	Persistierende Nekrose
Inzision, kein Trauma (Sham 2, n=8)	0 %
Inzision direkt nach Trauma (n=7)	14,2 %
Inzision 1d nach Trauma (n=6)	50,0 %
Inzision 3d nach Trauma (n=9)	0 %
Inzision 5d nach Trauma (n=7)	0 %

**Tab. 12:** Entwicklung einer Nekrose bei fehlender Reperfusion von Inzisionswunden in Kontrolltieren (Sham 2, Inzision, kein Trauma, n=8) sowie in den einzelnen Versuchsgruppen in Prozent der Gesamtanzahl der Tiere in einer Gruppe.



**Abb. 33:** Lichtmikroskopische Übersichtsaufnahmen des Beobachtungsfeldes der Rückenhautkammer einer Maus, welche 24 Stunden nach Weichteiltrauma einer Inzisionswunde ausgesetzt war in 6-facher Vergrößerung (A-C). (A) Beobachtungsfeld vor Trauma und Inzision. (B) Beobachtungsfeld unmittelbar nach Inzision, welche 24 h nach Weichteiltrauma gesetzt wurde. Das nicht-perfundierte Gewebeareal um die Inzision sowie die begleitende entzündliche Gewebereaktion (schwarzer Doppelpfeil) werden bereits 2 Tage nach Wundinduktion deutlich (C).

#### 5.2.6. Mikrovaskuläre Permeabilität

Die Extravasation des hochmolekularen Fluoreszenzmarkers FITC-Dextran 150.000 repräsentiert die Schädigung des Gefäßendothels. Hierdurch wird die Permeabilität für Substanzen, die unter physiologischen Bedingungen im Gefäßsystem zurückgehalten werden,

gesteigert. Der Austritt von Blutplasma in das Interstitium resultiert in einer interstitiellen Ödembildung.

In den einzelnen Tieren der Kontroll- und Versuchsgruppen konzentrierten wir uns bei der Analyse der mikrovaskulären Permeabilität auf die Schädigung der Kapillaren (A) über dem Inzisionsspalt, (B) um den Inzisionsspalt und (C) Kapillaren in der Peripherie der Rückenhautkammer. In allen nicht-traumatisierten Kontrolltieren wie auch in den einzelnen traumatisierten Versuchstieren ließ sich ein unterschiedlich stark ausgeprägter Anstieg der makromolekularen Leakage im Wundgebiet nachweisen. Unmittelbar über dem Inzisionsspalt wurde kein signifikanter Unterschied der Versuchsgruppen im Vergleich zur nicht-traumatisierten Kontrollgruppe festgestellt. Dahingegen zeigte sich in der Gruppe, welche 3 Tage nach Weichteiltrauma einer Inzision ausgesetzt wurde, am 2. und 10. Beobachtungstag eine signifikant erhöhte makomolekulare Leakage im Vergleich zur Kontrolle. Interessanterweise ließ sich in den Beobachtungsfeldern der Peripherie der Rückenhaukammer, welche 24 Stunden und 3 d nach Trauma einer Wundinduktion unterzogen wurden, erst nach Beginn der zweiten Beobachtungshälfte ein signifikanter Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität verzeichnen (**Tab. 13**).

#### 5.2.7. Histologie und Immunhistochemie

Die lichtmikroskopische Untersuchung der histologischen Präparate der Beobachtungsfenster 10 Tage nach Wundinduktion bestätigte die Ergebnisse, die bereits intravitalmikroskopisch erhoben werden konnten. Die PCNA-Färbung diente uns dazu, die proliferativen Prozesse in den Zellen im Wundareal darstellen zu können. Die Caspase-3 Färbung nutzten wir dazu, das Vorliegen von apoptotischen Zellen in der Wundregion darzustellen.

In nicht-traumatisierten Kontrolltieren ließen sich deutlich PCNA-positive Zellen im Wundareal nachweisen, während der apoptotische Zelltod selten bis gar nicht zu beobachten war.

Wurde die chirurgische Wunde unmittelbar nach lokalem Weichteiltrauma induziert, so konnten beide Phänomene in mäßiggradiger Ausprägung nachgewiesen werden. Die Proliferation der Zellen überwog dabei zahlenmäßig den apoptotischen Zelltod.

Je größer der zeitliche Abstand zwischen Inzision und lokalem Weichteiltrauma war, desto mehr proliferative Zellen konnten gefunden werden. Auffallend war, dass gleichzeitig das Auftreten des apoptotischen Zelltodes zahlenmäßig abnahm.

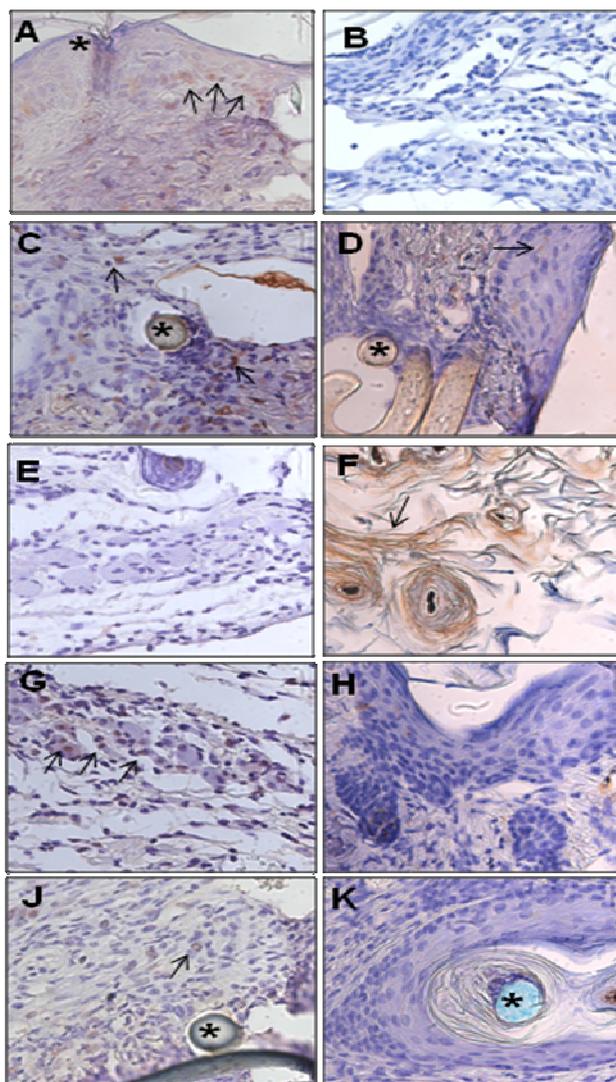
Bereits intravitalmikroskopisch konnte im Wundareal bei Tieren, welche 24 Stunden nach lokalem schwerem Weichteiltrauma einer Inzision ausgesetzt wurden, in 50 % der Fälle ein

Ausbleiben der Wundheilung und ein Persistieren einer nekrotischen Fläche im Inzisionsbereich beobachtet werden. Die lichtmikroskopische Untersuchung dieser histologischen Schnittpräparate bestätigte dieses Phänomen eindrücklich. Vitale Zellen konnten in diesem Gebiet nicht erfasst werden (**Abb. 34 F**). Desweiteren analysierten wir in dieser Gruppe den benachbarten Gewebebereich, der der Nekrose unmittelbar angrenzte. In diesem Gewebeareal konnten ebenfalls keine proliferativen Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 34 E**).

Interessanterweise konnte in den histologischen Schnittpräparaten in keiner Kontroll- oder Untersuchungsgruppe eine Regeneration von durchtrenntem Muskelgewebe im Wundareal beobachtet werden. Der verletzte quergestreifte Muskel zeigte über den 10-tägigen Beobachtungszeitraum unabhängig von einem vorangegangenen lokalen Weichteiltrauma keine Heilungstendenz und blieb irreversibel geschädigt.

<b>Leakage über Inzision</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	100,0 ± 0,0	120,7 ± 18,4	116,2 ± 13,9	119,3 ± 12,2	114,1 ± 13,6
Inzision 0 d - Trauma	100,0 ± 0,0	138,3 ± 15,8	116,4 ± 10,8	132,3 ± 11,5	131,8 ± 10,6
Inzision 1 d - Trauma	100,0 ± 0,0	114,5 ± 12,8	130,5 ± 14,2	109,0 ± 6,3	107,4 ± 6,5
Inzision 3 d - Trauma	100,0 ± 0,0	134,4 ± 17,1	134,0 ± 14,9	127,7 ± 9,9	133,0 ± 14,0
Inzision 5 d – Trauma	100,0 ± 0,0	114,5 ± 10,4	103,8 ± 7,9	95,8 ± 6,8	108,7 ± 6,1
<b>Leakage nahe Inzision</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	100,0 ± 0,0	110,1 ± 7,7	113,8 ± 9,2	109,0 ± 10,3	96,0 ± 7,2
Inzision 0 d - Trauma	100,0 ± 0,0	112,7 ± 8,3	117,4 ± 8,2	142,2 ± 9,5	122,6 ± 8,8
Inzision 1 d - Trauma	100,0 ± 0,0	129,9 ± 6,3	134,1 ± 6,6	123,8 ± 7,2	127,0 ± 7,7
Inzision 3 d - Trauma	100,0 ± 0,0	145,1 ± 9,0*	129,5 ± 8,5	127,1 ± 7,6	152,6 ± 13,6*
Inzision 5 d – Trauma	100,0 ± 0,0	99,8 ± 9,5	102,1 ± 6,1	113,4 ± 5,8	109,3 ± 6,2
<b>Leakage peripher</b>	<b>d 0</b>	<b>d 2</b>	<b>d 4</b>	<b>d 6</b>	<b>d 10</b>
Inzision – kein Trauma	100,0 ± 0,0	109,0 ± 6,5	98,3 ± 4,5	98,8 ± 5,8	104,9 ± 6,3
Inzision 0 d - Trauma	100,0 ± 0,0	119,0 ± 5,8	115,6 ± 9,1	116,4 ± 7,4	119,8 ± 7,1
Inzision 1 d - Trauma	100,0 ± 0,0	122,1 ± 6,1	127,4 ± 5,3	113,8 ± 6,5	133,1 ± 6,5*
Inzision 3 d - Trauma	100,0 ± 0,0	124,0 ± 6,9	134,5 ± 10,1*	130,4 ± 8,8*	139,8 ± 7,5*
Inzision 5 d – Trauma	100,0 ± 0,0	101,9 ± 4,5	108,4 ± 6,8	105,8 ± 5,5	107,3 ± 6,0

**Tab. 13:** Makromolekulare Leakage in Prozent des Ausgangswertes (d 0) im Beobachtungsfenster der Rückenhautkammer in nicht-traumatisierten Kontrolltieren (Sham 2, Inzision, kein Trauma, n=8) sowie in Tieren, bei denen direkt (n=7), 24 h (n=6), 3 Tage (n=9) und 5 Tage (n=7) nach Weichteiltrauma eine Inzision erfolgte. Mittelwert ± SEM. \*p < 0,05 vs. Sham 2.



**Abb. 34:** Immunhistochemische Färbung mittels PCNA (A, C, E, G, J) und Caspase-3 (B, D, F, H, K) am 10. Versuchstag. Die Schnittpräparate des Kammergewebes illustrieren die PCNA-positiven Zellen und den apoptotischen Zelltod (A, B) in einem nicht-traumatisierten Kontrolltier (Sham 2, Inzision, kein Trauma), sowie in jeweils einem Tier, welches unmittelbar (C, D), 24h (E, F), 3d (G, H) und 5d (J, K) nach Trauma die Inzision erhielt. (A) Im Wundspalt (Stern) des nicht-traumatisierten Kontrolltieres lassen sich PCNA-positive Zellen nachweisen (Pfeile). (B) Ein apoptotischer Zelltod konnte in diesen Tieren nicht beobachtet werden. (C) In Mäusen, welche unmittelbar nach Trauma inzidiert wurden, konnten um das Nahtmaterial (Stern) vermehrt PCNA-positive Zellen (Pfeil) nachgewiesen werden, (D) gleichzeitig Apoptosen um den Fadenknoten (Stern). In Tieren, die einer Inzision 24 h nach Trauma ausgesetzt waren, (E) zeigten sich keine PCNA-positive Zellen, (F) im Wundareal imponiert eine Nekrose (Pfeil). (G, J) Je größer der zeitliche Abstand der Inzision vom Trauma war, desto mehr Proliferation konnte beobachtet werden, (H, K) und umso seltener ließen sich Apoptosen nachweisen. Diese Phänomene ließ sich über dem Wundspalt sowie im Areal des einliegenden Nahtmaterials (Stern) beobachten.

## 6. Diskussion

Es ist bekannt, dass im ischämischen Wundgebiet die Heilungstendenz deutlich geringer ist als im nicht-ischämischen Gewebe (Hunt 1980). Des Weiteren ist bekannt, dass eine schwere lokale Weichteilschädigung in einer mikrozirkulatorischen Dysfunktion resultiert (Amon, Laschke et al. 2006). Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, erstmals den Einfluss des lokalen Weichteiltraumas auf den Heilungsprozess in Inzisionswunden zu untersuchen.

### 6.1. Diskussion des Modells

Das etablierte Modell der Rückenhautkammer (Lehr, Leunig et al. 1993) bewährt sich bereits seit vielen Jahren in der tierexperimentellen Chirurgie. Erstmals wurde dieses Modell am Syrischen Goldhamster beschrieben (Endrich, Asaishi et al. 1980). Heute existieren viele Studien, die sich dieses Modell in der medizinischen Forschung zu Nutze machten (Algire und Legallais 1948; Goodall, Sanders und Shubik 1965; Nims und Irwin 1973; Menger, Laschke und Vollmar 2002).

Wesentliche Vorteile der Rückenhautkammer zur Analyse der Mikrozirkulation im myokutanen Gewebe stellt zum einen die Tatsache dar, dass repetitive Untersuchungen identischer Gefäße über einen recht großen Untersuchungszeitraum gemacht werden können. Die Blutgefäße lassen sich durch Fotodokumentation technisch unterstützt wiederholt identifizieren und analysieren. Im Gegensatz zu Akutmodellen, in denen Veränderungen des Weichteilschadens nur für kurze Zeit - z.B. über Stunden – beobachtet werden können (Schaser, Vollmar et al. 1999; Szczesny, Veihelmann et al. 2001; Szczesny, Nolte D et al. 2000; Schaser, Zhang et al. 2003), konnten wir mit Hilfe dieses Modells auch die Veränderungen im weiteren Verlauf über bis zu 10 Tage analysieren und interpretieren.

Unter Zuhilfenahme verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe konnten die arterioläre, kapillare und venuläre Perfusion sowie endotheliale Permeabilität und konsekutive Auswirkung der Endothelschädigung (Menger, Laschke und Vollmar 2002) analysiert werden. Diese Erkenntnisse konnten über den 10-tägigen Versuchszeitraum gewonnen werden, ohne dass wiederholte chirurgische Interventionen notwendig waren.

Innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen wurde auf ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen weiblichen und männlichen Mäusen geachtet, um geschlechtsspezifische Unterschiede, die in neueren veröffentlichten Studien bei polytraumatisierten Patienten nachgewiesen werden konnten (Angele, Frantz und Chaudry 2006), zu vermeiden.

Die erste intravitalmikroskopische Analyse des Gewebes erfolgte 2 Tage nach Rückenhautkammerpräparation. Auf diese Weise konnten die Auswirkungen des initialen

durch die Präparation verursachten chirurgischen Traumas auf das zu untersuchende Gewebe vernachlässigt werden, da nach dieser Zeit die präparationsbedingten Veränderungen des Gewebes nicht mehr zu beobachten waren (Yamauchi, Vollmar et al. 1999). Somit war zu diesem Zeitpunkt von einer physiologischen Perfusion bei fehlender präparationsbedingter Entzündungsreaktion im zu untersuchenden Gewebe auszugehen.

Nach Implantation der Rückenhautkammer führten wir neben wiederholten intravitalmikroskopischen Untersuchungen des Gewebes bei den meisten Versuchstieren ein Weichteiltrauma sowie eine chirurgische Inzision des Kammergewebes durch.

Es gibt verschiedene Gründe, warum Kleintiermodelle insbesondere an der Maus von Vorteil gegenüber Großtiermodellen darstellen. Zum einen verursachen sie geringere Kosten und Aufwand bzgl. Beschaffung, Haltung und Zucht, zum anderen ist das Genom der Maus in seiner Gesamtheit gut bekannt. Dies hat einen entscheidenden Vorteil für die Durchführung weiterer (z.B. molekularbiologischer) Untersuchungen, die auf den hier erhobenen Daten aufbauen könnten. Daher wurde bereits zuvor von unserer Arbeitsgruppe ein in-vivo-Modell an der Maus entwickelt, wenn gleich die Kammerpräparation am Hamster durch die deutlich leichtere Ablösung der Muskelschichten technisch wesentlich einfacher durchzuführen wäre. Ein wesentlicher Nachteil des Modells der Rückenhautkammer an der Maus stellt dagegen das relativ kleine Beobachtungs- und zugleich Operationsfeld dar, welches den nachfolgenden Eingriff zur Induktion und Versorgung der Inzisionswunde in mikrochirurgischer Technik notwendig machte und eine präzise anspruchsvolle Operationstechnik forderte.

Der komplexe biologische Prozess der Wundheilung wurde in der Vergangenheit bereits in vielen vorangegangenen Studien untersucht, zum einen in in-vivo-Studien (Breuing, Eriksson et al. 1992; Rossio-Pasquir, Casanova et al. 1999; Escámez, García et al. 2004), zum anderen in etablierten in-vitro-Modellen (Kamamoto, Paggiaro et al. 2003).

Erstmals verwendet zur Analyse der Wundheilung wurde das Modell der Rückenhautkammer von Sorg et al. (Sorg, Krueger und Vollmar 2007). In der Originalarbeit wurde der Prozess der Wundheilung nach Induktion einer vollschichtigen Hautverletzung analysiert. In dieser Studie wurde jedoch nicht das subkutan gelegene quergestreifte Muskelgewebe untersucht. In dem hier vorliegenden Modell konnte in den histopathologischen Schnittpräparaten auch auf dieses eingegangen werden, da die Inzision Kutis, Subkutis und Muskulatur umfasste. Lindenblatt et al. stellte ein Tiermodell vor, dass die wiederholte Analyse der Mikrozirkulation im Heilungsprozess in (Transplantathaut-) Lappen erlaubte (Lindenblatt, Calcagni et al. 2008). Das chirurgische Trauma in dieser Studie ist jedoch deutlich höher und nicht vergleichbar mit der verhältnismäßig kleinen chirurgischen Inzisionswunde in der hier

vorgestellten Arbeit. Insbesondere haben die Modelle von Sorg et al. und Lindenblatt et al. die Vorgänge der sekundären Wundheilung untersucht, während in der hier vorliegenden Studie erstmals die primäre Wundheilung in der Rückenhautkammer untersucht werden konnte. Eine andere Technik die Mikrozirkulation und den akuten Effekt negativer Einflussfaktoren auf die Mikrozirkulation im Wundbett zu untersuchen, zeigte Ichioka et al. 2008 (Ichioka, Watanabe et al. 2008). Allerdings erlaubte dieses Modell nicht die Analyse der funktionellen Kapillardichte wie in der vorliegenden Arbeit, sondern konzentrierte sich auf das vor- und nachgeschaltete venuläre und arterioläre Gefäßsystem. Barker et al. etablierten ein in-vivo-Modell zur direkten Untersuchung der Hämodynamik am Ohr der haarlosen Maus (Barker, Kjolseth et al. 1994). Daten zur Mikrozirkulation konnten ebenfalls durch intravitale Mikroskopie erhoben werden. Jedoch beschränkten sich die Autoren auf die Analyse der Neovaskularisation in der Kutis und Subkutis und ebenfalls auf die Prozesse der sekundären Wundheilung, während in unserer Studie Muskelgewebe in die Untersuchungen miteinbezogen wurde.

Zusammenfassend konnten bereits in früheren Studien Erkenntnisse über die Mikrodynamik während des Wundheilungsprozesses gewonnen werden. Ziel dieser Studie war es nun, zusätzlich den Einfluss des lokalen Weichteiltraumas auf die Heilung von Inzisionswunden zu analysieren.

Das Modell der Gewebetraumatisierung wurde 1993 erstmals von Smith et al. etabliert (Smith, Curl et al. 1993). Die hier angewendete Technik mittels weight-drop-device bewährte sich seither in etlichen Folgestudien (Amon, Laschke et al. 2006). Vor Traumainduktion ließ sich das dünne Deckgläschen technisch einfach entfernen. Dadurch erreichte man eine lediglich minimale Irritation des zu untersuchenden Gewebes. Die Verwendung einer Plexiglasröhre als Schiene für den Edelstahlzylinder zur Induktion des Weichteiltraumas gewährte ein gleichmäßiges Auftreffen des Gewichtes auf das Gewebe. Folglich konnte eine Verkantung des Gewichtes durch Führung vermieden werden und so eine gleichmäßige Energieverteilung erzielt werden. Konsekutiv wurde eine gleichmäßige aus dem Trauma resultierende Mikrozirkulationsstörung im gesamten Beobachtungsfeld induziert (Amon, Laschke et al. 2006). Die Induktion des Weichteiltraumas erforderte höchste Präzision. Ein Nachteil stellt hier die Tatsache dar, dass ein exakt auf die Rückenhautkammer abgestimmtes Instrumentarium vorhanden sein muss (Amon, Laschke et al. 2006). Da das Modell in der Vergangenheit bereits dazu genutzt wurde, den Einfluss des Weichteiltraumas auf das Gewebe zu analysieren, können neue Ergebnisse mit bereits vorhandenen verglichen werden (Amon, Laschke et al. 2006).

Mit Hilfe minimal-invasiver Eingriffe wurde es möglich, konkrete und detaillierte Aussagen über die Mikrozirkulation nach chirurgischer Inzision im traumatisierten Gewebe zu erzielen (Lehr, Leunig et al. 1993). Die Inzisionswunde im Kammergewebe erfasste demnach nicht nur die Kutis, sondern auch das subkutane Gewebe und die quergestreifte Muskulatur, was nahezu analoge Bedingungen wie bei einem chirurgischen Eingriff beim Menschen ermöglichte. Ein Nachteil der Rückenhautkammer stellt hier die Tatsache dar, dass das Beobachtungsfenster mit dem zu analysierenden Gewebe sehr klein ist. Dieser Faktor beschränkt daher die Inzisionslänge, zum anderen machen sie die mikrochirurgische Feinarbeit unter dem Mikroskop mit entsprechendem Instrumentarium erforderlich. Auch Nadel und Fadenstärke zu Wundrandadaptation mussten genau auf das feine Gewebe abgestimmt werden.

Bisherige Studien haben sich nicht mit dem Einfluss des unterschiedlichen Zeitabstandes der chirurgischen Inzision zum vorangegangenen Weichteiltrauma befasst.

## 6.2. Diskussion der Untersuchungstechnik

Das Modell der Rückenhautkammer ermöglichte uns in der hier vorliegenden Studie repetitive intravitalmikroskopische Untersuchungen der Mikrozirkulation im Weichteilgewebe. Die hämodynamischen Prozesse konnten mit Hilfe des Intravitalmikroskops über einen längeren Zeitraum objektiv detailliert, quantitativ und qualitativ analysiert werden (Zeintl, Sack et al. 1998; Barker, Hammersen et al. 1990; Marzi, Takei et al. 1990). Die direkte Technik der Intravitalmikroskopie wird seit Jahren in verschiedenen in-vivo-Studien zur Analyse der Hämodynamik unterschiedlicher Gewebe und Organen eingesetzt. Demgegenüber stehen sogenannte indirekte Verfahren – wie z.B. Laser-Doppler-Flowmetrie (Tenland, Salerud et al. 1983, Hedén, Jurell und Arnander 1986), Radionuklid-Clearance-Technik (Young und Hopewell 1983; Banic, Kouris et al. 1989), der H<sub>2</sub>-Gasclearance (Thomson und Kerrigan 1991) oder Indocyaningrün-Clearance-Technik (Eren, Krein und Hafemann 1995). Zu den indirekten Untersuchungsverfahren gehören auch die Bestimmung der Gewebetemperatur, welche 1997 von Tsuchida et al. beschrieben wurde (Tsuchida 1997) sowie die Partialdruckmessung des Gewebesauerstoffs von Perry und Horton (Perry und Horton 1978). Der große Vorteil bei der Verwendung der direkten intravitalmikroskopischen Technik liegt darin, dass Gefäße über einen großen Beobachtungszeitraum beobachtet und analysiert werden können.

Nach Beendigung unseres 10-tägigen Versuches erfolgte die Auswertung in den einzelnen Versuchsgruppen "off line". Die zu untersuchenden Areale wurden zuvor immer nach dem

gleichen Schema in Form von Videosequenzen aufgezeichnet. Dabei wurde genauestens darauf geachtet, Bewegungsartefakte während den Aufnahmen zu vermeiden (Klyscz, Junger et al. 1997). Zum einen gewährleistete die genannte digitalisierte Analyse den wesentlichen Vorteil einer rationellen Quantifizierung der Parameter, zum anderen konnte so eine enorm große Datenmenge in kurzer Zeit verarbeitet werden (Ellis, Inoue und Inoue 1986).

Die Analyse der Mikrozirkulation in der Rückenhautkammer wurde durch 2 verschiedenen Techniken ermöglicht: Zum einen mittels Auflicht (Epi-Illumination), zum anderen mittels Durchlicht (Trans-Illumination). Wir verwendeten in der vorliegenden Studie ausschließlich Analysen mittels Epi-illumination, während um 1950 vor allem die Trans-illuminations-Technik genutzt wurde (Bloch 1955; Knisely, Wallace et al. 1957).

Als Fluoreszenzfarbstoff diente uns FITC-Dextran. Bei der Verwendung dieses Farbstoffes wurde darauf geachtet, eine Lichtexposition so gering als möglich zu halten. Steinbauer et al. konnten nachweisen, dass nach längerer Lichteinwirkung intrazelluläre photodynamische Prozesse unsere Untersuchungsergebnisse verfälschen könnten (Steinbauer, Harris et al. 2000). Berücksichtigte man diese Tatsache und erfolgte die Applikation in einer geeigneten niedrigen Dosierung, konnte mittels FITC-Dextran eine optimale Kontrastverstärkung ohne toxische Nebenwirkungen erzielt werden.

### 6.3. Diskussion der Ergebnisse

Bereits aus vorangegangenen Studien ist bekannt, dass die lokale Weichteilschädigung wesentlich die Hämodynamik im Kammergewebe beeinträchtigt (Amon, Laschke et al. 2006). Die vorliegende Arbeit konnte nun zeigen, dass die Heilung von Inzisionswunden durch ein schweres Weichteiltrauma negativ beeinflusst wird. Es konnte zusätzlich gezeigt werden, dass die Ausprägung der Beeinträchtigung der Wundheilung wesentlich vom Zeitpunkt der chirurgischen Inzision nach Trauma bestimmt wird. Die Studie erlaubt zum ersten Mal die repetitive in vivo-Analyse der mikrovaskulären Hämodynamik, inflammatorischen Reaktion und Nekroseausbildung in Inzisionswunden über einen 10-tägigen Beobachtungsraum.

Folgende Erkenntnisse konnten gewonnen werden: Erstens, eine Inoskulation inzidierter Gefäße konnte in allen Versuchsgruppen nachgewiesen werden, jedoch ausschließlich im venulären Gefäßsystem, niemals im arteriolären. In Tieren, welche 24 h nach Trauma einer Inzision ausgesetzt waren, wurde deutlich seltener ein Anschluss von Gefäßenden beobachtet. Zweitens, die mikrozirkulatorische Dysfunktion erholte sich insuffizient in Tieren, bei welchen die Inzisionswunde 24 h nach Weichteiltrauma induziert wurde. Drittens, eine Inzision 24 h nach lokalem Weichteiltrauma zeigte eine verzögerte Ausbildung von

Angiogenese und damit verminderte Reperfusion im Inzisionsgebiet. Viertens, bei Tieren dieser Gruppe imponierte im Wundareal deutlich häufiger eine Nekroseausbildung mit ausbleibendem Heilungsprozess, welcher mit einer entzündlichen Reaktion des Gewebes um das nicht-perfundierte Areal assoziiert war. Fünftens, der starke Abfall des Blutflusses in inzidierten Gefäße ließ sich sowohl in traumatisierten als auch nicht-traumatisierten Mäusen nachweisen, ohne dass es im weiteren Verlauf zu einer vollständigen Erholung kam.

### 6.3.1. Inoskulation

Ein besonderer Aspekt der Diskussion sollte die Beantwortung der Frage sein, wie durchtrennte Gefäße in Inzisionswunden im Heilungsverlauf wieder reperfundiert werden können, sei es in zuvor traumatisiertem oder nicht-traumatisiertem Gewebe. Der Prozess der Inoskulation ist bereits in vorangegangenen Studien untersucht worden, insbesondere hinsichtlich der Revaskularisation verschiedener Gewebetransplantate, wie Haut, Nerven oder Knochen (Laschke, Vollmar und Menger 2009). Andere Autoren beschrieben eine Inoskulation von Gefäßen in Wunden von Scaffolds (Laschke, Rücker et al. 2008). In diesen Studien konnten jedoch keine Aussagen über die Präferenz des Prozesses in einzelnen Gefäßabschnitten getroffen werden. Welche Gefäße zur Inoskulation befähigt waren, blieb demnach bis dahin ungewiss.

Greenwood et al. beschrieben 2009 ein Modell der Hauttransplantation, welches sich ebenfalls mit dem Vorgang der Inoskulation befasste (Greenwood, Amjadi et al. 2009). Allerdings konnte auch in dieser Studie nicht zwischen der Präferenz des Prozesses im Nieder- oder Hochdrucksystem unterschieden werden (Greenwood, Amjadi et al. 2009).

In dieser Studie etablierten wir ein Modell, welches im Rahmen der Reperfusion von Gewebeabschnitten die Inoskulation inzidierten Gefäße illustrieren konnte und gleichzeitig die Unterscheidung im venulären oder arteriellen Gefäßsystem ermöglichte. Des Weiteren untersuchten wir den Einfluss des vorangehenden lokalen Weichteiltraumas zu unterschiedlichen Zeitpunkten auf diesen Prozess. In 4 von 8 Fällen kam es zu einem Wiederanschluss der Gefäßstümpfe nach Inzision im nicht-traumatisierten Gewebe (Kontrolle). Auch in Inzisionswunden in zuvor traumatisiertem Gewebe konnte ein Anschluss der durchtrennten Gefäße nachgewiesen werden. Je größer dabei der zeitliche Abstand zum lokalen Weichteiltrauma war, desto höher war die Häufigkeit der Inoskulation der Gefäße. Diese Beobachtungen konnten in allen Versuchsgruppen ausschließlich im venulären Gefäßsystem gemacht werden. Somit können in der hier vorgestellten Studie erstmals Aussagen getroffen werden, welche darlegen, dass eine Inoskulation ausschließlich im

Niederdrucksystem auftrat und von einem vorangegangenen Weichteiltrauma negativ beeinflusst wird.

Es existieren unterschiedliche Erklärungen zur Interpretation unserer Ergebnisse, dass ein Wiederanschluss inzidiertes Gefäße ausschließlich im venulären Gefäßsystem nachgewiesen werden kann: Die Wände der Gefäße setzen sich aus 3 Schichten zusammen: Die Tunica interna mit Endothelzellen zum Stoff-, Gas- und Flüssigkeitsaustausch, die Tunica media, welche glatte Muskelzellen und elastische Netze beinhaltet, und die Tunica externa, welche der Einbettung der Gefäße in die Umgebung dient (Fritsch und Kühnel 2009). Während die Tunica media mit ihren glatten Muskelzellen in Arterien sehr kräftig vorhanden ist, ist sie in den meisten Venen weniger stark bis schwach ausgebildet (Fritsch und Kühnel 2009). Durch die kräftige Muskelschicht hindurch ist ein Auswachsen von neuen Gefäßverbindungen sicherlich schwerer als in Venolen, welche eine sehr viel dünnere Muskelschicht aufweisen.

Es kann außerdem angenommen werden, dass Venolen weniger anfällig für mechanische Reize und vasoaktive Mediatoren sind (Curl, Smith et al. 1997). Somit könnte die Migration der zur Inoskulation notwendigen Endothelzellen in Venolen leichter sein als im anfälligeren arteriolen Blutssystem.

Da die Muskelschicht in der Tunica media in den Arteriolen stärker ausgebildet ist als in den Venolen, ist nach einem mechanischen Stress (Inzision/Trauma) auch von einer ausgeprägteren Vasokonstriktion in der Arteriolen auszugehen. Die Muskeln der Gefäßwand kontrahieren, sobald das betreffende Gewebeareal von einem zu starken Blutverlust negativ beeinflusst wird wahrscheinlich als Antwort auf den vorangegangenen mechanischen Stress und die Hypoxämie. In der vorliegenden Studie wurde dieser akute Blutverlust durch die Inzision provoziert. Die anschließende lokale Hämatomformation kann ebenfalls für die arteriolen Vasokonstriktion mitverantwortlich gemacht werden, ähnlich wie dieses Phänomen bereits im Rahmen eines cerebralen Vasospasmus nach Subarachnoidalblutung gezeigt werden konnte (Duff, Feilbach et al. 1988). Dieser Vasospasmus wird durch die Ausschüttung verschiedener vasoaktiver Substanzen verursacht. Die dabei wichtigsten endothelialen Vasokonstriktoren, die von Makrophagen, Plättchen und endothelialen Zellen sezerniert werden, stellen Angiotensin II, Endothelin-1, Sauerstoffradikale, Prostaglandin H<sub>2</sub> und Thromboxan A<sub>2</sub> dar (Siegenthaler und Blum 2006). Möglicherweise könnte diese Vasokonstriktion in Arteriolen die Migration der dazu notwendigen Zellen inhibieren und eine Inoskulation der Gefäßstümpfe verhindern, während in Venolen ohne oder nur mäßiggradiger Vasokonstriktion dieses Phänomen nicht nachweisbar ist.

Es ist bekannt, dass ein schweres lokales Weichteiltrauma per se in einer Vasokonstriktion im arteriolen Gefäßsystem resultiert (Amon, Laschke et al. 2006). Führt man demnach eine Inzision in einem bereits präoperativ durch Weichteiltrauma kontrahierten Gefäß zu, könnte dies den Effekt der Vasokonstriktion weiter verstärken und einen Gefäßwiederanschluss verstärkt inhibieren.

Zum anderen konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, dass die chirurgische Inzision mit einer Entzündungsreaktion im Wundareal einherging. Es ist bereits bekannt, dass während der Exsudationsphase der Wundheilung zahlreiche Leukozyten und Thrombozyten in das Wundgebiet einwandern. Dabei behaften die aktivierten Leukozyten in kurzer Zeit meist das gesamte Endothel in traumatisierten Gefäßen - vornehmlich in Venolen (Lippert, Tautenhahn und Piatek 2006). Diese Entzündungsreaktion konnte bereits nach isoliertem lokalem Weichteiltrauma im Vorfeld unserer Studie dargelegt werden (Amon, Laschke et al. 2006). In dieser Studie ließ sich ebenfalls eine vermehrte Leukozytenadhärenz insbesondere in Venolen, weniger in Arteriolen, nachweisen. Ein vorangegangenes Weichteiltrauma könnte somit die Leukozytenadhärenz v.a. in Venolen nach der Inzision noch weiter verstärkt haben.

Durch die vermehrte transendotheliale Migration und Infiltration dieser Leukozyten kommt es neben einer Endothelverletzung zur Schrankenfunktionsstörung und durch die Dichteminderung der extrazellulären Matrix zum klinisch manifesten Ödem (Kohler P, 2004). Bestimmte Moleküle an der Oberfläche des venulären Gefäßsystems können durch die vermehrte Schrankenfunktionsstörung stärker präsentiert werden (PECAM-1, gap junction molecules). Dieses "platelet endothelial cell adhesion molecule-1" (PECAM-1) inhibiert die konsekutive Antwort der Blutplättchen auf Kollagen. Das komplexe System der Inhibierung multipler Signalwege resultiert in einer deutlich verminderten Gefahr einer Thrombusbildung. Diese Erkenntnisse wurden bereits durch Jones et al. in der Vergangenheit gewonnen (Jones, Garner et al. 2009). Somit könnte die vermehrte Leukozytenadhärenz in Venolen – nicht aber in Arteriolen – eine fundierte Begründung sein, dass eine Inoskulation ausschließlich im Niederdrucksystem nachweislich ist. In Arteriolen, die mit einem höheren Risiko eines thrombotischen Verschlusses und somit Okklusion behaftet sind, ist ein Wiederanschluss der Gefäßenden und eine Reperfusion sicherlich schwieriger.

Aus vorangegangenen Studien geht hervor, dass ein schweres Weichteiltrauma mit einer signifikanten Reduktion der venulären Blutzellgeschwindigkeit einhergeht (Amon, Laschke et al. 2006). Diese war jedoch in dieser Studie auch nach schwerstem Trauma über den Beobachtungszeitraum wieder vollständig reversibel. Im Gegensatz dazu erfährt die arteriolen Perfusion keine vollständige Erholung zu den Ausgangswerten (Amon, Laschke et al. 2006).

Diese Erkenntnisse könnten ebenfalls erklären, warum eine Inoskulation inzidierter Gefäße im traumatisierten Gewebe ausschließlich im venulären Gefäßsystem zu beobachten ist. Durch das schwere Weichteiltrauma wird der Blutfluss im arteriolären System so stark negativ beeinflusst, dass die Migration der zur Inoskulation notwendigen Zellen in Arteriolen behindert werden könnte.

Warum eine Inoskulation prozentual seltener in Venolen auftritt, welche 24 h nach lokalem Trauma inzidiert wurden, stellt ebenfalls ein wichtiger Punkt unserer Diskussion dar. Nach der Virchowschen Trias begünstigen einerseits Änderungen der Blutzusammensetzung, andererseits eine reduzierte Blutströmungsgeschwindigkeit sowie Schäden der Intima das Auftreten einer Thrombose (Virchowsche Trias). In der vorliegenden Arbeit führen zum einen das lokale Weichteiltrauma als auch die Inzision zu einer Stase und Verletzung der Gefäßwand. Diese beiden Traumata könnten sich in ihrer Auswirkung auf die Thromboseentstehung gegenseitig verstärken, was erklären würde, warum eine Inoskulation häufiger in Versuchsgruppen zu beobachten war, je größer der zeitliche Abstand der Inzision zum Weichteiltrauma war. Dies steht jedoch den Erkenntnissen von Amon et al. entgegen, die 2006 beschrieben, dass der Blutfluss bereits 5 Minuten nach schwerem Weichteiltrauma am stärksten reduziert war (Amon, Laschke et al. 2006). Auch die Endothelschädigung sollte in der Versuchsgruppe ausgeprägter sein, in der unmittelbar nach Weichteiltrauma die Wundinduktion erfolgte. Eine Inzision unmittelbar nach Trauma führte jedoch in der vorliegenden Arbeit zu einer prozentual häufigeren Inoskulation als bei Tieren, die der Inzision 24 h nach Trauma ausgesetzt waren. Der nutritive Perfusionsausfall, der 24 h nach Weichteiltrauma am größten ist (Amon, Laschke et al. 2006), sowie die zur gleichen Zeit induzierte Inzision gehen mit einer erhöhten Nekroserate und einer generalisiert ausbleibenden Reperfusion im Wundgebiet einher (vgl. Kap. 6.3.2.). In einem nekrotischen Areal mit ausschließlich avitalen Zellen ist ein Wiederanschluss der Gefäßenden eher unwahrscheinlich.

### 6.3.2. Angiogenese und funktionelle Kapillardichte

Es ist bekannt, dass die Angiogenese im Prozess der Wundheilung eine entscheidende Rolle spielt (Bauer, Bauer und Velazquez 2005). Eine Störung der Angiogenese könnte die Ursache für die Entstehung und Persistenz von Störungen der Wundheilung sein. Verschiedene angiogen wirkende Faktoren spielen bei der Gefäßneubildung eine wichtige Rolle (Distler, Hirth et al. 2003). Initiiert wird der Prozess durch Zytokine, welche von Plättchen, Fibroblasten und Monozyten sezerniert werden. Hierdurch werden endotheliale

Zellen der Gefäßwand aktiviert und lösen sich aus ihrem Zellverband heraus. Durch das Freisetzen von Enzymen (Metalloproteinase) produzieren sie im Verlauf eine neue Membran und eine extrazelluläre Matrix, welche Grundvoraussetzungen für die Ausbildung neuer Gefäße sind. Die extrazelluläre Matrix wird lysiert. Verschiedenste Zellen sind an der Sekretion angiogener Zytokine beteiligt: Endotheliale Zellen, Fibroblasten, Plättchen, Monozyten, Makrophagen und Muskelzellen. Die Endothelzellen migrieren daraufhin durch die extrazelluläre Matrix und proliferieren. Genannte Zellen organisieren sich zu kleinen Gefäßstümpfen und Aussackungen (Bauer, Bauer et al 2005). Solche konnten auch in unserer Studie am 2. Beobachtungstag nachgewiesen werden und bildeten im weiteren Verlauf ein komplexes Netzwerk neu gebildeter Kapillaren zur Reperfusion des Inzisionsspalts in nahezu allen Versuchsgruppen. Die Enden der kleinen neu formierten Gefäßkanälchen wuchsen hierzu schrittweise aufeinander zu, um sich letztendlich nach Zusammentreffen miteinander zu verbinden. Bereits nach wenigen Tagen wurde ein komplexes Netzwerk neuer Kapillaren über einem initial nicht- oder insuffizient perfundierten Gewebeareal beobachtet, sowohl im zuvor traumatisierten als auch im nicht-traumatisierten Gewebe. Eine der wichtigsten Determinanten stellt unabhängig hiervon wohl das VEGF-System dar. Die Dilatation der wundnahen Gefäße mit konsekutiver Lyse der Basalmembran initiiert durch das Auseinanderziehen der Endothelzellen aus ihrem Verband und der Gefäßwand die Freisetzung von VEGF (vascular endothelial growth factor), aber auch bFGF (basic fibroblast growth factor) (Endrich und Menger 2000). Der "vascular endothelial growth factor" (VEGF) ist ein hochwirksamer endothelzellspezifischer Mediator, der ein Schlüsselmolekül im Prozess der Wundheilung darzustellen vermag. Dieses Molekül gehört zu einem der wichtigsten Angiogenesefaktoren und unterstützt die Proliferation der Endothelzellen mit Bildung von Kapillarsprossen und ist für die Bildung eines neuen Gefäßlumens maßgebend (Endrich und Menger 2000). Auch in vorangegangenen Studien wird diesem System größte Bedeutung zugesprochen (Brooks, Clark und Cheresch 1994; Hynes, Barder und Hodivala-Dilke 1999).

Der „basic fibroblast growth factor“ (bFGF) stellt im Prozess der Wundheilung eine weitere Determinante dar. Dieser Faktor induziert die endotheliale Zellreplikation, Migration und extrazelluläre Proteolyse (Gospodarowicz, Cheng und Lirette 1983; Montesano, Vassalli et al. 1986, Tsuboi, Sato und Rifkin 1990). Einerseits kann bFGF die Angiogenese auf direktem Wege antreiben, andererseits jedoch auch indirekt über eine Regulation des VEGF-Systems (Stavri, Zachary et al. 1995). Folglich haben bFGF und VEGF einen synergistischen Effekt bzgl. der Induktion der Angiogenese in vitro (Pepper, Ferrara et al. 1992) und in vivo

(Mattern, Koomägi et al. 1997). bFGF trägt also ebenfalls zur Angiogenese bei, jedoch in einem engem Zusammenspiel und vorangegangener Aktivierung des VEGF-Systems (Tille, Wood et al. 2001).

In unserer Studie konnte Angiogenese in Inzisionswunden sowohl im nicht-traumatisierten Gewebe als auch im zuvor traumatisierten Gewebe nachgewiesen werden. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass über dem Wundspalt die Hypoxämie durch die direkte traumatische Gewebeschädigung am größten ist und sich hier die höchste Konzentration der angiogenen Zytokine nachweisen lässt. Da die Endothelzellen während der Angiogenese diesem zytokinen Gradienten folgen, ist ein Überbrücken des Wundspalts durch neu gebildete Kapillaren nachvollziehbar. Ein vorangegangenes Weichteiltrauma könnte die Hypoxämie im Wundareal und somit die Zytokinkonzentration noch weiter verstärkt haben und die Angiogenese noch zusätzlich gefördert haben.

Auffällig war, dass eine signifikant geringere Ausbildung von Angiogenese in Tieren nachgewiesen werden konnte, welche 24 h nach Weichteiltrauma der Inzisionswunde ausgesetzt waren. Bereits 5 Minuten nach lokalem Weichteiltrauma kommt es zu einer massiven mikrozirkulatorischen Dysfunktion, welche auch 24 h später eine deutliche Verminderung verglichen zu den Ausgangswerten zeigt (Amon, Laschke et al. 2006). Eine Inzision zu diesem Zeitpunkt könnte trotz Sekretion von VEGF und bFGF sowie weiterer angiogen wirksamer Substanzen, aufgrund der durch Weichteiltrauma bereits vor Inzision deutlich verringerten Kapillardichte (Amon, Laschke et al. 2006) zu diesem Zeitpunkt die Reperfusion in diesem Gebiet negativ beeinflussen. Angiogenese konnte zunehmend beobachtet werden, je größer der zeitliche Abstand der Inzision zum Weichteiltrauma war, da hier mit einer Erholung der durch das Trauma hervorgerufenen mikrovaskulären Dysfunktion zu rechnen war (Amon, Laschke et al. 2006). Somit herrschten bessere initiale Perfusionsbedingungen für die Heilung der Inzisionswunde, je länger das lokale Weichteiltrauma zurücklag.

Nicht nur die Angiogenese, sondern auch die vorbestehenden Kapillaren inzisionsnahe, zeigten in Tieren, welche 24 h nach Weichteiltrauma einer Inzision ausgesetzt waren, signifikant geringere Werte als in den anderen Versuchsgruppen und in nicht-traumatisierten Tieren. Am ehesten kann auch hierfür die Tatsache verantwortlich gemacht werden, dass 24 h nach Weichteiltrauma die geringste Dichte der präexistenten Kapillaren bereits vor Inzision nachgewiesen werden konnte (Amon, Laschke et al. 2006). Somit ist von einer verzögerten Reperfusion, insbesondere in Anbetracht dessen, dass der angiogene Prozess in diesem Areal ebenfalls verzögert ist, auszugehen.

Bei der Analyse der funktionellen Kapillardichte unmittelbar über dem Inzisionsspalt ließ sich in unserem Modell kein signifikanter Unterschied in den verschiedenen Versuchsgruppen nachweisen. Am ehesten ist dies mit dem massiven Schaden durch die Wundsetzung in Verbindung bringen. Die initialen Werte der funktionellen Kapillardichte vor Inzision – beeinflusst durch das lokale Weichteiltrauma – spielen bei der durch Wundinduktion nahezu vollständigen Zerstörung der Kapillaren in diesem Bereich wohl lediglich eine untergeordnete Rolle.

Bei der Analyse der inzisionsfernen Kapillarfelder konnte kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe traumatisierter Mäuse zu Tieren festgestellt werden, welche neben dem lokalen Weichteiltrauma zusätzlich eine Inzisionswunde zugefügt wurde. Das periphere Gewebe bleibt von der chirurgischen Inzision am ehesten durch seine weite räumliche Entfernung unbeeinflusst.

### 6.3.3. Mikrovaskuläre Dysfunktion

Amon et al. beschrieben bereits 2006 in einem in-vivo-Modell an der Maus, dass eine direkte mechanische Schädigung des Weichteilgewebes in einer akuten, massiven arteriolen Vasokonstriktion resultiert (Amon, Laschke et al. 2006). Auch in der hier vorliegenden Studie konnten wir nach schwerem Weichteiltrauma eine arterielle Vasokonstriktion beobachten. Diese Erkenntnisse stehen im Gegensatz zu den Erkenntnissen anderer Arbeitsgruppen, welche nach Traumatisierung des Gewebes am Hinterlauf der Maus keine Differenz der arteriolen oder venulären Gefäßdurchmesser beobachten konnten (Szczeny, Nolte et al. 2000). Allerdings muss berücksichtigt werden, dass die Mikrozirkulation in dieser Studie bereits beeinträchtigt war durch die präparationsbedingte arteriolen Konstriktion, die über längere Tage bestehen kann (Yamauchi, Vollmar et al. 1999). Am ehesten im Rahmen einer posttraumatischen Erholung kam es hier im weiteren Verlauf zu einer arteriolen Dilatation (Szczeny, Nolte et al. 2000).

Die bereits beschriebene arteriolen Konstriktion führt weiterhin zu einer Reduktion des arteriolen Blutflusses und geht mit einer Einschränkung der nutritiven, kapillaren Perfusion einher. Ähnliche Erkenntnisse konnten bereits im Vorfeld für das kapillare no-reflow-Phänomen im Rahmen des Ischämie-/Reperfusionsschadens am quergestreiften Muskel von Hamstern durch Menger et al. beschrieben werden (Menger, Steiner und Messmer 1992). Verantwortlich hierfür wurde bereits durch Amon et al. (Amon, Laschke et al. 2006) eine Zunahme des oxidativen Stresses und damit einhergehend eine vermehrte Leukozyten-

Endothelzell-Interaktion sowie die gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität und Ödembildung diskutiert.

Basierend auf diesen Erkenntnissen, lassen sich die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit diskutieren. In das durch schweres Weichteiltrauma vorgeschädigte Gewebe induzierten wir eine Inzisionswunde. Als erste Reaktion auf eine Wundsetzung zeigt sich eine Vasokonstriktion der Gefäße, die in der Regel 5-10 Minuten anhielt, um erst dann von einer Vasodilatation abgelöst zu werden (Piatek, Tautenhahn, Wundatlas). Das bedeutet, dass die ohnehin bereits bestehende arterioläre Vasokonstriktion im traumatisierten Gewebe durch das Setzen der Inzisionswunde noch weiter verstärkt wurde, um dann kompensatorisch in eine Vasodilatation überzugehen. Wohlmöglich hebt sich der Effekt der posttraumatischen Vasokonstriktion mit der kompensatorischen Vasodilatation nach Wundsetzung auf und imponiert an den einzelnen Beobachtungstagen als unverändert.

Im Gegensatz zur deutlichen arteriolären Vasokonstriktion zeigt sich postkapillar und in begleitenden Venolen lediglich eine geringere konstriktive Antwort auf den Weichteilschaden durch Inzision und Weichteiltrauma, am ehesten weil diese Gefäße weniger glatte Muskelzellen enthalten, was sie weniger sensibel auf mechanischen Stress und vasoaktive Substanzen reagieren lässt (Curl, Smith et al. 1997).

Ein signifikanter Unterschied des Blutflusses von inzidierten Arteriolen und Venolen in den einzelnen Versuchsgruppen konnte in dieser Studie nicht festgestellt werden. Sowohl im Hochdruck- als auch im Niederdrucksystem lässt sich nach Inzision eine Vasokonstriktion und konsekutive Reduktion des Blutflusses nachweisen – unabhängig, ob ein lokales Weichteiltrauma voranging und zu welchem Zeitpunkt dieses stattfand. Dies könnte damit einhergehen, dass die Gewebeschädigung durch die Wundinduktion für sich alleine genommen so stark ausgeprägt ist und eine adäquate Reperfusion nicht mehr gewährleistet werden kann.

#### 6.3.4. Mikrovaskuläre Permeabilität, Nekrose und Entzündungsreaktion

In unserer Studie resultierte sowohl das Weichteiltrauma als auch die zu unterschiedlichen Zeitpunkten durchgeführte Inzision in diesem Areal in einer Vasokonstriktion. Diese arterioläre Gefäßkontraktion konnte ebenfalls, wenn auch abgeschwächt in postkapillaren Venolen dokumentiert werden (Goldie und Pedersen 1995). Hierdurch könnte ein Austreten von Makromolekülen mit Ödembildung im traumatisierten Areal erklärt werden. Die interstitielle Ödembildung nach Kontraktion venulärer Endothelzellen und folglich gesteigerten endothelialen Permeabilität wurde bereits durch andere Autoren in der

Vergangenheit beschrieben (Nagy, Kolev et al. 1995; Birukova, Smurova et al. 2004). Erstaunlicherweise bleibt nach lokalem Weichteiltrauma unabhängig von seiner Stärke das lymphatische Gewebe unbeeinträchtigt (Amon, Laschke et al. 2006; Szczesny, Veihelmann et al. 2001). Die chirurgische Inzision hingegen, wie sie in der vorliegenden Arbeit durchgeführt wurde, bewirkt eine Durchtrennung aller Gewebsschichten, das lymphatische Gefäßsystem miteingeschlossen. Nicht zu vernachlässigen ist die Tatsache, dass das interstitielle Ödem insbesondere dann auftrat, wenn die Heilung der Inzisionswunde ausblieb. In diesen Fällen zeichnete sich das interstitielle Ödem insbesondere um die Nekrose ab. Im nekrotischen Areal selbst kann davon ausgegangen werden, dass bei fehlenden vitalen Zellen keine lymphatische Funktion mehr vorhanden ist. Das interstitielle Ödem kann durch diese reduzierte Funktion der Lymphgefäße nach Weichteiltrauma und der zerstörten Lymphgefäße durch die Inzision nicht mehr adäquat resorbiert und abtransportiert werden.

In unserer Studie konnte gezeigt werden, dass das initial nach Inzision nicht-perfundierte Gewebeareal durch die Ausbildung neu geformter Kapillaren (Angiogenese) über den Versuchszeitraum in den einzelnen Versuchsgruppen in unterschiedlichem Ausmaß reperfundiert und somit in seiner Fläche reduziert werden konnte. Es existieren verschiedene Erklärungen, warum dieses nicht-perfundierte Areal initial nahezu in allen Tieren zu beobachten ist. Prisk et al. postulierten 2003, dass jeglicher Austritt von Blut aus einem Gefäß zu einer Gewebenekrose beitragen kann (Prisk und Huard 2003). In unserer Studie bewirkt zum einen das lokale Weichteiltrauma durch die massive Ausbildung eines perivaskulären Hämatoms (Amon, Laschke et al. 2006) einen Austritt von Blut aus den verletzten Gefäßen. Zum anderen kam es durch Induktion der Inzisionswunde zur zusätzlichen schweren Verletzung der Gefäße mit konsekutiver starker Blutung in das Wundgebiet. Um einen stärkeren Blutverlust zu vermeiden, kommt es zu einer reaktiven Vasokonstriktion in den Arteriolen (Piatek, Tautenhahn, Wundatlas). Diese resultiert in einer vorübergehenden Hypoxämie im Operationsfeld (Piatek, Tautenhahn, Wundatlas). Auch das lokale Weichteiltrauma begünstigt durch eine Gewebseinblutung eine Hypoxämie. Hierdurch werden Thrombozyten aktiviert, welche zur Reparatur der traumatisierten Gefäßwände beitragen sollen und kleine Mikrothromben ausbilden können. Im weiteren Verlauf können sich diese ablösen und das nachfolgende Gefäßsystem okkludieren. Diese Erkenntnisse wurden bereits durch Kraphol dargelegt (Kraphol, Mailänder et al. 1999). Die Mikrothromben könnten den nutritiven Perfusionsausfall weiter verstärken, ebenso die Hypoxämie und Nekrose in diesem Areal (Kraphol, Mailänder et al. 1999). Die Hypoxie und

Nekroseausbreitung in Folge der nach Trauma durchgeführten Inzision könnte sich hierdurch noch zusätzlich verstärken.

Die systemische Reaktion auf ein initiales lokales Weichteiltrauma allein könnte bereits die Entwicklung eines Multiorganversagens ermöglichen (Keel und Trentz 2005). Das zusätzliche chirurgische Trauma, welches initial nahezu immer ein nicht-perfundiertes Areal aufweist und die umliegende Entzündungsreaktion noch zusätzlich verstärkt, könnte diese These unterstreichen.

Weiterhin werden durch die Blutung chemotaktische Substanzen aktiv, welche unabhängig voneinander eine entzündliche Reaktion in einem bereits inflammatorischen Areal verstärken können (Rose und Marzi 1998). Durch das vorangegangene lokale Weichteiltrauma sind in unserer Studie die Grundvoraussetzungen für diese Entzündungsreaktion gegeben und werden durch die nachfolgende chirurgische Inzision in diesem Gebiet unterstrichen. Die ausgeprägte Ödembildung und Entzündungsreaktion um das nekrotische Areal konnte in unserem Modell bereits makroskopisch dokumentiert werden.

Interessanterweise konnte eine Nekrosepersistenz über den 10-tägigen Versuchszeitraum am häufigsten in Tieren postuliert werden, welche 24 h nach lokalem Weichteiltrauma eine Inzisionswunde erhielten. Es ist bekannt, dass nach schwerem Weichteiltrauma die Leukozytenadhäsion 24 h nach Gewebeschädigung am stärksten ausgeprägt (Amon, Laschke et al. 2006). Diese Erkenntnisse wurden bereits in der Vergangenheit durch andere Arbeitsgruppen gewonnen (Menger, Pelikan et al. 1992; Schaser, Vollmar et al. 1999). Eine Inzision 24 h nach lokalem Weichteiltrauma erfolgte somit in dem Zeitraum der höchsten Leukozytenadhärenz im Gewebeareal. Dies könnte die verstärkte Entzündungsreaktion und reaktive Hyperämie zu diesem Zeitpunkt bei Tieren erklären, die 24 h nach Trauma einer Inzision ausgesetzt wurden. In Mäusen der übrigen Versuchs- und Kontrollgruppen konnte dieses Phänomen nicht nachgewiesen werden, da die Entzündungsreaktion durch das Trauma zu anderen Inzisionszeitpunkten weniger stark ausgeprägt war.

## 7. Schlussfolgerungen

Mit der hier vorgestellten Studie konnte ein experimentelles Tiermodell der Maus etabliert werden, welches die direkte und repetitive in-vivo-Analyse der Hämodynamik während der Heilung von Inzisionswunden nach mechanischer Schädigung erlaubt.

Unsere Studie zeigte, dass unabhängig von einem vorangegangenen lokalen Weichteiltrauma ausschließlich Venolen zur Inoskulation befähigt sind. Die Reperfusion der Wunde erfolgte allerdings neben der Inoskulation hauptsächlich über Angiogenese.

Mit diesem Modell konnte nachgewiesen werden, dass die Wahl des Zeitpunktes einer operativen Intervention nach lokalem Weichteiltrauma wesentlich den Prozess der Wundheilung beeinflusst. Eine chirurgische Inzision 24 Stunden nach mechanischer Schädigung der Weichteile resultiert in einem erhöhten Risiko für Entzündung und Ödembildung sowie einer erhöhten Wundnekroserate durch ausbleibende Wundspaltreperfusion. Somit geht eine Operation zu diesem Zeitpunkt mit einem erhöhten Risiko für Wundheilungsstörungen einher. Basierend auf diesen Erkenntnissen könnte das Risiko von Wundheilungsstörungen im traumatisierten Gewebe, wie es in der klinischen Praxis nahezu alltäglich beobachtet werden kann, reduziert werden.

## Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
%	Prozent
Abb.	Abbildung
ANOVA	Analysis of Variance
bzgl.	bezüglich
bzw.	beziehungsweise
CARS	Compensatory anti-inflammatory response syndrome
CHAOS	Cardiovascular, hemostasis, apoptosis, organ dysfunction, immune suppression
cm	Zentimeter
COX	Cyclooxygenase
CVI	chronisch venöse Insuffizienz
d	Tag
DNA	Desoxyribonukleinsäure
EGF	epidermal growth factor
FKD	funktionelle Kapillardichte
FITC	Fluoreszein-isothiozyanat
g	Gramm
h	Stunde
HE	Haematoxylin und Eosin
I.E.	internationale Einheiten
IGF	insulin-like growth factor
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare NO-Synthase
J	Joule
KG	Körpergewicht
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
mg	Milligramm
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
MARS	mixed antagonist response syndrome

MODS	multiple organ dysfunction syndrome
n	Anzahl
nm	Nanometer
Nm	Newtonmeter
NA	numeric aperture
NO	Stickstoffmonoxid
pAVK	periphere arterielle Verschlusskrankheit
PCNA	proliferating cell nuclear antigen
PDGF	platlet-derived growth factor
r	Radius
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
TGF	transforming growth factor
TNF	tumor necrosis factor
u.a.	unter anderem
V	Geschwindigkeit
v.a.	vor allem
VBF	volumetric blood flow
vgl.	vergleiche
W	Watt
WHO	World Health Organisation
z.B.	zum Beispiel

## 9. Literaturverzeichnis

1. Algire GH (1943) An adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4:1-11
2. Algire GH, Legallais FY (1948) The transparent chamber technique in the mouse in the study of tumor histo-physiology. *Fed Proc* 7: 268
3. Amon M, Laschke MW, Harder Y, Vollmar B, Menger MD (2006) Impact of severity of local soft-tissue trauma on long-term manifestation of microcirculatory and microlymphatic dysfunctions. *J Trauma* 61:924-932
4. Angele MK, Frantz MC, Chaudry IH (2006) Gender and sex hormones influence the response to trauma and sepsis: potential therapeutic approaches. *Clinics (Sao Paulo)* 61:479-488
5. Banic A, Kouris K, al-Ghussain NM, Lewis DH (1989) Radionuclide methodology for the assessment of the microcirculation in island pedicle flaps in a sheep model. *Nucl Med Commun* 10:827-839
6. Barker JH, Hammersen F, Galla TJ, Bondar I, Zeller P, Menger MD, Messmer K (1990) Direct monitoring of capillary perfusion following normovolemic hemodilution in an experimental skin-flap model. *Plast Reconstr Surg* 86:946-954
7. Barker JH, Kjolseth D, Kim M, Frank J, Bondar I, Uhl E, Kamler M, Messmer K, Tobin GR, Weiner LJ (1994) The hairless mouse ear: an in vivo model for studying wound neovascularization. *Wound Repair Regen* 2:138-143
8. Bauer SM, Bauer RJ, Velazquez OC (2005) Angiogenesis, vasculogenesis and induction of healing in chronic wound. *Vasc Endovascular Surg* 39:293-306
9. Birukova AA, Smurova K, Birukov KG, Kaibuchi K, Garcia JG, Verin AD (2004) Role of Rho GTPases in thrombin-induced lung vascular endothelial cells barrier dysfunction. *Microvasc Res* 67:64-77
10. Bloch EH (1955) In vivo microscopic observations of the circulating blood in acute myocardial infarction. *Am J Med Sci* 229:280-294
11. Bondár I, Uhl E, Barker JH, Galla TJ, Hammersen F, Messmer K (1991) A new model for studying microcirculatory changes during dermal wound healing. *Res Exp Med* 191:379-388

12. Bone RC (1996) Immunologic dissonance: a continuing evolution in our understanding of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) and the multiple organ dysfunction syndrome (MODS). *Ann Intern Med* 125:680-687
13. Breier G (2000) Angiogenesis in embryonic development – a review. *Placenta* 21 Suppl A; *Trophobl Research* 14: S11-S15
14. Breuing K, Eriksson E, Liu P, Miller DR (1992) Healing of partial thickness porcine skin wounds in a liquid environment. *J Surg Res* 52:50-58
15. Brooks PC, Clark RA, Cheres DA (1994) Requirement of vascular integrin alpha v beta 3 for angiogenesis. *Science* 264:569-571.
16. Cardon SZ, Oestermeyer CF, Bloch EH (1970) Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc Res* 2:67-76
17. Chedid M, Hoyle JR, Csaky KG, Rubin JS (1996) Glucocorticoids inhibit keratinocyte growth factor production in primary dermal fibroblasts. *Endocrinology* 137:2232-2237
18. Chiba Y, Muraoka R, Ihaya A, Morioka K, Sasaki M, Uesaka T (1993) Leukocyte depletion and prevention of reperfusion injury during cardiopulmonary bypass: a clinical study. *Cardiovasc Surg* 1:350-356
19. Cipolle MD, Pasquale MD, Cerra FB (1993) Secondary organ dysfunction. From clinical perspectives to molecular mediators. *Crit Care Clin* 9:261-298
20. Curl WW, Smith BP, Marr A, Rosencrance E, Holden M, Smith TL (1997) The effect of contusion and cryotherapy on skeletal muscle microcirculation. *J Sports Med Phys Fitness* 37:279-286
21. Davies MG, Hagen PO (1997) Systemic inflammatory response syndrome. *Br J Surg* 84:920-935
22. Distler JH, Hirth A, Kurowska-Stolarska M, Gay RE, Gay S, Distler O (2003) Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q J Nucl Med* 47:149-161
23. Duff TA, Feilbach JA, Yusuf Q, Scott G (1988) Bilirubin and the induction of intracranial arterial spasm. *J Neurosurg* 69:593-598
24. Ellis GW, Inoué S, Inoué T (1986) Computer-aided light microscopy. *Soc Gen Physiol Ser* 40:15-30

25. Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K (1980) Technical report – a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177:125-134
26. Endrich B, Menger MD (2000) Regeneration of the microcirculation during wound healing? *Unfallchirurg* 103:1006-1008
27. Eren S, Krein R, Hafemann B (1995) Objective evaluation of the microcirculation in the skin with indocyanine green angiography (ICGA). A method for the clinic? *Handchir Mikrochir Plast Chir* 27:207-314
28. Escámez MJ, García M, Larcher F, Meana A, Muñoz E, Jorcano JL, Del Río M et al (2004); An in vivo model of wound healing in genetically modified skin-humanized mice. *J Invest Dermatol* 123:1182-1191
29. Folkman J, Shing Y (1992) Angiogenesis. *J Biol.Chem* 267:10931-10934
30. Fritsch H, Kühnel W: In: *Taschenatlas Anatomie*, Georg Thieme Verlag, 2009
31. Gando S, Kameue T, Nanzaki S, Nakanishi Y (1996) Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome. *Thromb Haemost* 75:224-228
32. Geva E, Jaffe RB (2000) Role of Angiopoietins in Reproductive Tract Angiogenesis. *Obstet Gynecol Survey* 55: 511-519
33. Gierer P, Mittlmeier T, Bordel R, Schaser KD, Gradl G, Vollmar B (2005) Selective cyclooxygenase-2 inhibition reverses microcirculatory and inflammatory sequelae of closed soft-tissue trauma in an animal model. *J Bone Joint Surg Ann* 87:153-160
34. Gilliver SC, Emmerson E, Campbell L, Chambon P, Hardman MJ, Ashcroft GS (2010) 17beta-estradiol inhibits wound healing in male mice via estrogen receptor-alpha. *Am J Pathol* 176:2707-2721
35. Goforth and Gudas (1980) Effects of steroids on wound healing a review of the literature. *J Foot Surg* 19:22-28
36. Goldie RG, Pedersen KE (1995) Mechanisms of increased airway microvascular permeability: role in airway inflammation and obstruction. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 22:387-396
37. Goodall CM, Sanders AG, Shubik P (1965) Studies of vascular patterns in living tumors with a transparent chamber inserted in hamster cheek pouch. *J Natl Cancer Inst* 35:497-521

38. Gospodarowicz D, Cheng J, Lirette M (1983) Bovine brain and pituitary fibroblast growth factors: comparison of their abilities to support the proliferation of human and bovine vascular endothelial cells. *J Cell Biol* 97: 1677–1685
39. Greenwood J, Amjadi M, Dearman B, Mackie I. (2009) Real-time demonstration of split skin graft inosculation and integral dermal matrix neovascularization using confocal laser scanning microscopy. *Eplasty* 9:e33
40. Gross JF, Aroesty J (1972) Mathematical models of capillary flow: a critical review. *Biorheology* 9:225-264
41. Gullo A, Berlot G (1996) Ingredients of organ dysfunction or failure. *World of Surg* 20: 430-436
42. Harder Y, Contaldo C, Klenk J, Banic A, Jakob SM, Erni D (2004) Improved skin flap survival after local heat preconditioning in pigs. *J Surg Res* 119: 100-105
43. Hedén P, Jurell G, Arnander C (1986) Prediction of skin flap necrosis: a comparative study between laser Doppler flowmetry and fluorescein test in a rat model. *Ann Plast Surg* 17:485-488
44. Heeschen C, Weis M, Aicher A, Dimmeler S, Cooke JP (2002) a novel angiogenic pathway mediated by non-neuronal nicotinic acetylcholine receptors. *J Clin Invest* 110:527-536
45. Hoogendoorn JN, Simmermacher RK, Schellekens PP, van der Werken C (2002) Adverse effects of smoking on healing of bones and soft tissues. *Unfallchirurg* 105:76-81
46. Hunt TK (1980) Disorders of wound healing. *World J Surg* 4:271-277
47. Hynes RO, Barder BL, Hodivala-Dilke K (1999) Integrins in vascular development. *Braz J Med Biol Res* 32:501-510
48. Ishimura K, Moroguchi A, Okano K, Maeba T, Maeta H (2002) Local expression of tumor necrosis factor-alpha and interleukin-10 on wound healing of intestinal anastomosis during endotoxemia in mice *J Surg Res* 108:91-97
49. Ichioka S, Watanabe H, Sekiya N, Shibata M, Nakatsuka T (2008) A technique to visualize wound bed microcirculation and the acute effect of negative pressure. *Wound Repair Regen* 16:460-465

50. Jacobi J, Jang JJ, Sundram U, Dayoub H, Fajardo LF, Cooke JP (2002) Nicotine accelerates angiogenesis and wound healing in genetically diabetic mice. *Am J Physiol* 161:97-104
51. Jones CI, Garner SF, Moraes LA, Kaiser WJ, Rankin A, Bloodomics Consortium, Ouwehand WH, Goodall AH, Gibbins JM (2009) PECAM-1 expression and activity negatively regulate multiple platelet signaling pathways. *FEBS Lett* 583:3618-3624
52. Jonson&Jonson Wound Management. A division of ETHICOM GmbH <http://medizinfo.com/wundmanagement/wundheilung.htm>
53. Kamamoto F, Paggiaro AO, Rodas A, Herson MR, Mathor MB, Ferreira MC (2003) A wound contraction experimental model for studying keloids and wound-healing modulators. *Artif Organs* 27:701-705
54. Keel M, Trentz O (2005) Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 36:691-709
55. Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Klein CL, Hauptmann S, Klosterhalfen B (1996) The role of the microcirculation in multiple organ dysfunction syndrome (MODS): a review and perspective. *Virchows Arch* 427:461-476
56. Klyszcz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H (1997) Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)* 42:168-175
57. Knisely WH, Wallace JM, Mahaley MS, Satterwhite WM jr (1957) Evidence, including in vivo observations, suggesting mechanical blockage rather than reflex vasospasm as the cause of death in pulmonary embolization. *Am Heart* 54:482-497
58. Koblizek TI, Weiss C, Yancopoulos GD, Deutsch U, Risau W (1998) Angiopoietin-1 induces sprouting angiogenesis in vitro. *Curr Biol* 8:529-532
59. Kohler P 2004 Leukozytenadhärenz und kapilläres Leck. [www.haes-info.de](http://www.haes-info.de). Aktuelles zu Makro- und Mikrozirkulation Nr. 22 Ausgabe 1/2004
60. Krapohl BD, Mailänder P, Siemionow M, Giunta R, Zins JE (1999) Arterial crush injury causes decrease in tissue perfusion at the level of the microcirculation in skeletal muscle flap. *Microsurgery* 19:364-368
61. Kubulus D, Roesken F, Amon M, Rucker M, Bauer M, Bauer I, Menger MD (2004) Mechanism of the delay phenomenon: tissue protection is mediated by heme oxygenase-1 *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287:H2332-2340

62. Kuś E, Karowicz-Bilińska A (2009) The influence of steroid sex hormones on collagen composition in post-operative wounds after long-term treatment with anticoagulants. *Ginekol Pol* 80:814-818
63. Laschke MW, Rücker M, Jensen G, Carvalho C, Mülhaupt R, Gellrich NC, Menger MD (2008) Improvement of vascularization of PLGA scaffolds by inosculation of in situ-preformed functional blood vessels with the host microvasculature. *Ann Surg* 248:939-948
64. Laschke MW, Vollmar B, Menger MD (2009) Inosculation: connecting the life-sustaining pipelines. *Tissue Eng Part B Rev* 15:455-465
65. Lee WY, Lee SM (2003) Differential regulation of cytochrome P450 isozyme mRNAs and proteins by femur fracture trauma. *Arch Pharm Res* 26: 1079-1086
66. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K (1993) Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143:1055-1062
67. Levin LS, Condit DP (1996) Combined injuries-soft tissue management. *Clin Orthop Relat Res* 327:172-181
68. Lindenblatt N, Calcagni M, Contaldo C, Menger MD, Giovanoli P, Vollmar B (2008) A new model for studying the revascularization of skin grafts in vivo: the role of angiogenesis. *Plast Reconstr Surg* 122:1669-1680
69. Lippert H, Tautenhahn J, Piatek S: In: *Wundatlas, Kompendium der komplexen Wundbehandlung*, Georg Thieme Verlag, Stuttgart 2006
70. Marzi I, Takei Y, Knee J, Menger MD, Gores GJ, Bühren V, Trentz O, Lemasters JJ, Thurman RG (1990) Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 22:2004-2005
71. Mattern J, Koomägi R, Volm M (1997) Coexpression of VEGF and bFGF in human epidermoid lung carcinoma is associated with increased vessel density. *Anticancer Res.* 17:2249-2252
72. Mattsby-Baltzer I, Jakobsson A, Sörbo J, Norrby K (1994) Endotoxin is angiogenic *Int J Exp Pathol* 75:191-196
73. Menger MD (1995). Microcirculatory disturbances secondary to ischemia-reperfusion. *Transplant Proc* 27:2863-2865

74. Menger MD, Laschke MW, Vollmar B (2002) Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res* 34:83-91
75. Menger MD, Steiner D, Messmer K (1992) Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „no reflow“. *Am J Physiol* 263: H1892-1900
76. Menger MD, Rucker M, Vollmar B (1997) Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary „no-reflow“. *Shock* 8:2-7
77. Menth-Chiari WA, Curl WW, Rosencrance E, Smith TL (1998) Contusion of skeletal muscle increases leukocyte-endothelial cell interactions: an intravital-microscopy study in rats. *J Trauma* 45:709-714
78. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7297-7301
79. Morgan SJ, Moore MW, Cacalano G, Ley K (1997) Reduced leukocyte adhesion response and absence of slow leukocyte rolling in interleukin-8 receptor-deficient mice. *Microvasc Res* 54:188-191
80. Nagy Z, Kolev K, Csonka E, Pék M, Machovich R (1995) Contraction of human brain endothelial cells induced by thrombogenic and fibrinolytic factors. An in vitro cell culture model. *Stroke* 26:265-270
81. Natori T, Sata M, Washida M, Hirata Y, Nagai R, Makuuchi M (2003) Nicotine enhances neovascularization and promotes tumor growth. *Mol Cell* 16:143-146
82. Nichani AK, Kaushik RS, Mena A, Popowych Y, Dent D, Townsend HG, Mutwiri G, Hecker R, Babiuk LA, Griebel PJ (2004) CpG oligodeoxynucleotide induction of antiviral effector molecules in sheep. *Cell Immunol* 227:24-37
83. Nims JC, Irwin JW (1973) Chamber techniques to study the microvasculature. *Microvasc Res* 5:105-118
84. Owens S, Edwards P, Miles K, Jenner J, Allen M (1999) Chronic compartment syndrome affecting the lower limb: MIBI perfusion imaging as an alternative to pressure monitoring: two case reports. *Br J Sports Med* 33:49-51

85. Papenfuss HD, Gross JF, Intaglietta M, Treese FA (1997) A transparent access chamber for the rat dorsal skinfold. *Microvasc Res* 18:311-318
86. Pepper MS, Ferrara N, Orci L, Montesano R (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem Biophys Res Commun* 189: 824–831
87. Perry MO, Horton J (1978) Muscle and subcutaneous oxygen tension. Measurements by mass spectrometry after sympathectomy. *Arch Surg* 113:176-178
88. Polat A, Nayci A, Polat G, Aksöyek S (2002) Dexamethasone down-regulates endothelial expression of intercellular adhesion molecule and impairs the healing of bowels anastomosis. *Eur J Surg* 29:84-87
89. Prisk V, Huard J (2003) Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. *Histol Histopathol* 18:1243-1256
90. Pschyrembel Klinisches Wörterbuch, 258. Auflage, Walter de Gruyter Berlin-New York 1998
91. Risau W: (1997) Mechanisms of angiogenesis. *Nature* 386:671-674
92. Rose S, Marzi I (1996) Mediators in polytrauma – pathophysiological significance and clinical relevance. *Langenbecks Arch Surg* 383:199-208
93. Rossio-Pasquier P, Casanova D, Jomard A, Démarchez M (1999) Wound healing of human skin transplanted onto the nude mouse after a superficial excisional injury: human dermal reconstruction is achieved in several steps by two different fibroblast subpopulations. *Arch Dermatol Res* 291:591-599
94. Schaper W, Ito WD (1996) Molecular mechanisms of coronary collateral vessel growth. *Circ Res* 79: 911-919
95. Schaser KD, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Kroppenstedt SN, Raschke M, Lübke AS, Haas NP, Mittlmeier T (1999) In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury. *J Orthop Res.* 1999 17:678-685
96. Schaser KD, Zhang L, Haas NP, Mittlmeier T, Duda G, Bail HJ (2003) Temporal profile of microvascular disturbances in rat tibial periosteum following closed soft tissue trauma. *Langenbecks Arch Surg* 388:323-330
97. Schauf Ch, Moffett DF, Moffett SB: In: *Medizinische Physiologie (nach der amerikan. Orig.-Ausg. Hrsg. Von E. Schubert)*, Berlin 1993

98. Schemmer P, Bradford BU, Rose ML, Bunzendahl H, Raleigh JA, Lemasters JJ, Thurman RG (1999) Intravenous glycine improves survival in rat liver transplantation *Am Physiol* 276:G924-932
99. Schick. Chr., Kurzfassung des Vortrags von Dr. Christian Schick. 2. Wissenschaftliche Tagung des Bundesverbands Deutscher Ernährungsmediziner, 28./29. September 2001, Erlangen
100. Schmassmann A, Peskar BM, Stettler C, Netzer P, Stroff T, Flogerzi B, Halter F (1998) Effects of inhibition of prostaglandin endoperoxide synthase-2 in chronic gastro-intestinal ulcer models in rats. *Br J Pharmacol* 123:795-804
101. Sherer DM, Abulafia O (2001) Angiogenesis during implantation, and placental and early Embryonic development. *Placenta* 22: 1-13
102. Sherwin MA, Gastwirth CM (1990) Detrimental effects of cigarette smoking on lower extremity wound healing. *J Foot Surg* 29: 84-87
103. Siegenthaler W, Blum H. Endotheliale Funktionen. In: *Klinische Pathophysiologie*, 9. Ausgabe, Stuttgart: Thieme, 2006
104. Siewert R J: In: *Lehrbuch Chirurgie*, Springer Verlag, Heidelberg 2001
105. Smail N, Messiah A, Edouard A, Descorps-Declère A, Duranteau J, Vigué B, Mimos O, Samii K (1995). Role of systemic inflammatory response syndrome and infection in the occurrence of early multiple organ dysfunction syndrome following severe trauma. *Intensive Care Med* 21: 813-816
106. Smith TL, Curl WW, Smith BP, Holden MB, Wise T, Marr A, Koman LA (1993) New skeletal muscle model for the longitudinal study of alterations in microcirculation following contusion and cryotherapy. *Microsurgery* 14:487-493
107. Sorg H, Krueger C, Vollmar B (2007). Intravital insights in skin wound healing using the mouse dorsal skin chamber. *J Anat* 211:810-818
108. Spandow O, Hellström S, Schmidt SH (1990) Hydrocortisone delay of tissue repair of experimental tympanic membrane perforations. *Ann Otol Rhinol Laryngol* 99:647-653
109. Stavri GT, Zachary IC, Baskerville PA, Martin JF, Erusalimsky JD (1995) Basic fibroblast growth factor upregulates the expression of vascular endothelial growth factor in vascular smooth muscle cells. Synergistic interaction with hypoxia. *Circulation* 92: 11–14.

110. Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K (2000) Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385: 290-298
111. Szczesny G, Nolte D, Veihelmann A, Messmer K (2000) A new chamber technique for intravital microscopic observations in the different soft tissue layers of mouse hindleg. *J Trauma* 49: 1108-1115
112. Szczesny G, Veihelmann A, Nolte D, Messmer K (2001) Changes in the local blood and lymph microcirculation in response to direct mechanical trauma applied to leg: in vivo study in an animal model. *J Trauma* 51: 508-517
113. Tallquist D, Soriano P, Klinghoffer A (1999) Growth factor signaling pathways in vascular Development. *Oncogene* 18: 7917-7932
114. Tenland T, Salerud EG, Nilsson GE, Oberg PA (1983) Spatial and temporal variations in human skin blood flow. *Int J Microcirc Clin Exp* 2:81-90
115. Thomson JG, Kerrigan CL (1991) Hydrogen clearance: assessment of technique for measurement of skin-flap blood flow in pigs. *Plast Reconstr Surg* 88: 657-663
116. Tille JC, Wood J, Mandriota SJ, Schnell C, Ferrari S, Mestan J, Zhu Z, Witte L, Pepper MS (2001) Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 antagonists inhibit VEGF- and basic fibroblast growth factor-induced angiogenesis in vivo and in vitro. *J Pharmacol Exp Ther* 299:1073-1085
117. Toyokawa H, Matsui Y, Uhara J, Tsuchiya T, Teshima S, Nakanishi , Kwon A, Azuma Y, Nagaoka T, Ogawa A, Kamiyama Y (2003) Promotive effects of far-infrared ray on full-thickness skin wound healing in rats. *Exp Biol Med* 228: 724-729
118. Tsuboi R, Sato Y, Rifkin DB (1990) Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells. *J Cell Biol* 110: 511–517.
119. Tsuchida Y (1979) Rate of skin blood flow in various regions of the body. *Plast Reconstr Surg* 64:505-508
120. Weise K, Hirner A: In: *Chirurgie, Schnitt für Schnitt*, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York 2004
121. Weise and Schaffer, 2000, Treatment strategies in wound healing disorders. *Unfallchirurg* 103:100-109

122. Yamauchi JI, Vollmar B, Wolf B, Menger MD (1999) Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction. *Dig Surg* 16:400-406
123. Yasuda Y, Fujita Y, Masuda S, Musha T, Ueda K, Tanaka H, Fujita H, Matsuo T, Nagao M, Sasaki R, Nakamura Y (2002) Erythropoitin in involved in growth and angiogenesis in malignant tumours of female reproductive organs. *Carcinogenesis* 23: 1797-1805
124. Young CM, Hopewell JW (1983) The isotope clearance technique for measuring skin blood flow. *Br J Plast Surg* 36: 222-230
125. Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K (1998) Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 8:293-302
126. Zhang XW, Thorlacius H (2000) Dexamethasone inhibits arteriolar leukocyte rolling and adhesion induced by tumor necrosis factor-alpha in vivo. *Inflamm Res* 49:95-97

## Danksagung

Ganz besonders möchte ich mich bei **Herrn Prof. Dr. Menger** bedanken, nicht nur für die Überlassung dieses Themas, sondern auch für die konsequente Unterstützung und Beratung bei der Fertigstellung dieser Dissertation. Er hatte für alle Fragen und Probleme, die sich nicht selten ergaben, ein offenes Ohr. Er hat diese Arbeit mit sehr viel Geduld und Erfahrung unterstützt und brachte mit neuen Ideen immer wieder neue Motivation und Farbe in das Projekt. Mit viel Mühe und entgegengebrachtem Vertrauen hat mich **Herr Priv. Doz. Dr. med. Laschke** insbesondere bei der Fertigstellung der Dissertation unterstützt, was ihm als nicht selbstverständliche Hilfe gedankt werden sollte. Für sein großes Engagement möchte ich mich bei ihm für seine wertvollen Ratschläge und seine Unterstützung, die er mir und dem Projekt entgegenbrachte, sehr bedanken. Er wird mir stets in guter und wertvoller Erinnerung bleiben. Ein großer Dank an **Frau Elisabeth Gluding** für die Betreuung und Hilfe mit den Versuchstieren. Die Unterstützung von **Frau Janine Becker** und **Fr. Dr. rer. med. Claudia Scheuer** war für mich bei den Laborarbeiten und der Erstellung von histologischen Präparaten von unschätzbarem Wert. Außerdem sei an dieser Stelle **Frau Dr. Frings** und dem gesamten Team der experimentellen Chirurgie gedankt, die tatkräftig an dem Gelingen dieser Studie beitrugen und immer Zeit und Mühe in Probleme und offene Fragen investierten.

Ein großer Dank auch an **Herrn Dr. med. Konstantinos Anagnostakos** für die ehrlichen Kritiken insbesondere stilistischer Natur. Die gemeinsamen Stunden am Computer haben immer sehr viel Spaß gemacht und ich denke gerne daran zurück.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern danken, die mir das Ermöglichen meines Studiums der Medizin immer als Selbstverständlichkeit erscheinen ließen und mich mit aller Kraft unterstützen. Herrn Stephan Diehl werde ich sein ständiges Nachfragen nach dem Fortschreiten meiner Dissertation und sein gleichzeitig nicht-enden-wollenden Verständnis niemals vergessen. Es erfüllt mich mit großer Freude, dass er und meine Familie, die mir immer zur Seite standen, zeigen konnten, dass der Weg zum Ziel sich in Auswege, Irrwege, Umwege, gerade oder geschlungene Wege verzweigen kann, jedoch man diesen nicht alleine begehen muss. Ohne ihre Begleitung auf diesem Wege wäre es mir wohl nie möglich gewesen, am Ziel anzukommen und meine Dissertation zu vollenden.

## 11. Veröffentlichungen

### Originalarbeiten zum Thema der Dissertation:

*Schmid NV, Laschke MW, Harder Y, Menger MD* A new model for the in vivo study of angiogenesis and vascularization during incisional wound healing (in preparation)

*Schmid NV, Laschke MW, Menger MD* Role of blood vessel inosculation during incisional wound healing (in preparation)

*Schmid NV, Laschke MW, Harder Y, Menger MD* Influence of soft tissue trauma on incisional wound healing (in preparation)

### Originalarbeiten zu anderen Themen:

*Anagnostakos K, Schmid N, Kohn D* (2009) Hip joint arthrolysis due to heterotopic ossification. *Oper Orthop Traumatol.* 2009 Dec;21(6):557-70

*Anagnostakos K, Schmid NV, Kelm J, Grün U, Jung J* (2009) Classification of hip joint infections. *Int J Med Sci.* 2009 Sep 1;6(5):227-33

*Anagnostakos K, Jung J, Schmid NV, Schmitt E, Kelm J* (2009) Mechanical complications and reconstruction strategies at the site of hip spacer implantation. *Int J Med Sci.* 2009 Sep 3;6(5):274-9

*Jung J, Schmid NV, Kelm J, Schmitt E, Anagnostakos K* (2009) Complications after spacer implantation in the treatment of hip joint infections. *Int J Med Sci.* 2009 Sep 2;6(5):265-73

### Abstracts und Forumsbeiträge:

*Jung J, Anagnostakos K, Schmid NV, Korn D, Kohn D* (2011) Komplikationen der Gipsbehandlung bei instabilen Hüften bei Neugeborenen. 25. Jahrestagung der Vereinigung für Kinderorthopädie, vom 10.-12. März in Arnstadt.

*Schmid NV, Laschke MW, Harder Y, Menger MD* (2011) Die Heilung von Inzisionswunden erfolgt durch kapillare Angiogenese und venuläre Inoskulation. Deutscher Kongress für Orthopädie und Unfallchirurgie 2011, vom 25.-28. Oktober in Berlin.

## Lebenslauf

### Personalien

Vor- und Zuname: Nora Verena Schmid  
 Geburtstag: 24.11.1983  
 Geburtsort: Homburg  
 Konfession: römisch-katholisch  
 Eltern: Werner Schmid (\* 22.06.1950)  
           Mireille Schmid, geb. Eckert (\* 13.03.1951)  
 Geschwister: Judith Schmid (\* 17.12.1972)  
                   Thomas Schmid (\* 16.06.1977)  
                   Eric Schmid (\* 08.02.1986)

### Schulische Ausbildung

9/1989 - 7/1993                    Grundschule Langenäcker in Homburg  
  
 9/1993 - 6/2002                    Gymnasium Johanneum in Homburg  
  
 2002                                    Abitur

### Universitäre Ausbildung

7/2002 – 9/2002                    Pflegepraktikum in der Inneren Medizin I am  
   Universitätsklinikum des Saarlandes  
  
 10/2002 – 12/2008                 Studium der Medizin an der Universität des  
   Saarlandes in Homburg  
  
 7/2004                                 Ärztliche Vorprüfung

Seit 3/2006	Promotion am Institut für klinisch-experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
8/2007	Beginn des praktischen Jahres
8/2007 – 12/2007	Erstes Tertial im Departement Innere Medizin am Universitätsspital Zürich (Notfallstation, Ambulatorium, Kardiologie, Pulmologie, Psychosomatik, Psychiatrie)
12/2007 – 03/2008	Zweites Tertial in der orthopädischen Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes
03/2008 – 07/2008	Drittes Tertial in der chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums des Saarlandes
12/2008	Staatsexamen
Seit 02/2009	Assistenzärztin in der Klinik für Orthopädie und orthopädischer Chirurgie des Universitätsklinikums des Saarlandes

## **Sonstige Tätigkeiten**

10/2002 - 02/2006	Sitzwache in der Inneren Medizin I (Abteilung für Hämatologie/Onkologie) des Universitätsklinikums des Saarlandes
09/2004 - 03/2005	anatomische Hilfswissenschaftlerin bei Prof. Dr. h. c. P. Mestres am anatomischen Institut der Universität des Saarlandes
09/2005 - 03/2006	anatomische Hilfswissenschaftlerin bei Prof. Dr. h. c. P. Mestres am anatomischen Institut der Universität des Saarlandes