

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock
Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

Das antiinflammatorische Potential von Ebselen auf das geschlossene Weichteiltrauma

- Eine intravitalmikroskopische Studie am Unterschenkel der Ratte -



**Inauguraldissertation
zur
Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Rostock**

vorgelegt von
Julia Röther
aus St. Gallen, geboren in Bützow
Rostock 2012

Dekan:

1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Vollmar

2. Gutachter: Prof. Dr. med. Th. Mittlmeier

3. Gutachter: Prof. Dr. med. T. Pohlemann

Tag der Verteidigung: 05. Dezember 2012

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis	IV
Tabellenverzeichnis	V
Abkürzungsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
1.1 Weichteiltrauma	1
1.1.1 Weichteilschädigungen im Überblick	1
1.1.2 Pathophysiologie des Weichteiltraumas	2
Lokale Auswirkungen des Weichteiltraumas	2
Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	4
Systemische Effekte des Weichteiltraumas	9
1.1.3 Therapie des Weichteiltraumas	10
1.2 Selen	11
1.3 Ebselen	12
1.3.1 Chemische Eigenschaften von Ebselen	12
1.3.2 Reaktions-/Wirkmechanismus von Ebselen	13
1.3.3 Aktuelle Studienlage zu Ebselen	16
2 Ziel der Studie	18
3 Material und Methoden	19
3.1 Versuchstiere	19
3.2 Modell	19
3.3 Traumainduktion an der Skelettmuskulatur der Ratte	20
3.4 Präparation des <i>Musculus extensor digitorum longus</i>	21

3.5	Makrohämodynamisches Monitoring	22
3.6	Mikrozirkulationsmodell: Mikrohämodynamisches Monitoring mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie	23
3.6.1	Gewebeoxygenierung	25
3.6.2	Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit	26
3.6.3	Gefäßpermeabilität	26
3.6.4	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	27
3.6.5	Funktionelle Kapillardichte	28
3.6.6	Apoptose	29
3.7	Hämatologische Untersuchungen	29
3.8	Bestimmung des Feucht-/Trockengewichtes	29
3.9	Histologische Untersuchungen	30
3.10	Statistische Auswertung	30
4	Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll	32
4.1	Versuchsgruppen	32
4.2	Vorbehandlung der Versuchstiere	32
4.3	Versuchsablauf der Traumainduktion	33
4.4	Analyse 24h nach Traumainduktion	34
5	Ergebnisse	35
5.1	Blutbild und Gerinnungsparameter	35
5.2	Hämodynamik	36
5.3	Feucht-/Trockengewicht	36
5.4	Traumainduzierte Apoptose	38
5.5	Mikrozirkulation im traumatisierten Skelettmuskel der Ratte	39
5.6	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	40
5.7	Zusammenfassung der Ergebnisse	42

6	Diskussion	43
	Diskussion von Material und Methode	43
	Diskussion der Untersuchungsergebnisse	49
	Klinische Perspektiven	54
7	Zusammenfassung	55
8	Quellen und Literaturangaben	56
9	Lebenslauf	66
10	Danksagung	67
11	Thesen zur Dissertation	68
12	Eidesstattliche Erklärung	70

Abbildungsverzeichnis

- Abbildung 1: Lokale Auswirkungen des Weichteiltraumas auf einzelne Perfusionsparameter des betroffenen Gewebes
- Abbildung 2: Schematische Darstellung der Selektine und ihrer korrespondierenden Liganden
- Abbildung 3: Initialer Kontakt eines aktivierten neutrophilen Granulozyten mit den Endothelzellen
- Abbildung 4: Feste Adhäsion eines Granulozyten mit dem Endothel
- Abbildung 5: Emigration eines neutrophilen Granulozyten
- Abbildung 6: PECH-Schema nach Böhmer
- Abbildung 7: Strukturformel von Ebselen
- Abbildung 8: Enthaarung des Unterschenkels einer Sprague-Dawley-Ratte
- Abbildung 9: Druckluftbetriebene Apparatur zur Traumainduktion
- Abbildung 10: Lagerung des Versuchstieres und mikrochirurgische Präparation der Muskulatur
- Abbildung 11: Intravitalmikroskopische Untersuchung
- Abbildung 12: Fest an der Venolenwand haftende und sich frei im Gefäß bewegende Leukozyten nach Applikation von Rhodamin 6G während der Intravitalmikroskopie
- Abbildung 13: Repräsentative Darstellung der funktionellen Kapillardichte nach intravitalmikroskopischer Untersuchung bei einem Kontrolltier (A) und einem Versuchstier der 'Trauma'-Gruppe (B)
- Abbildung 14: Schematische Darstellung der experimentellen Gruppen
- Abbildung 15: Zeitliche Darstellung des Versuchsablaufs
- Abbildung 16: Darstellung der Gerinnungsparameter Quick-Wert (A) und pTT (B)
- Abbildung 17: Wet-to-dry-weight-Ratio der linken, traumatisierten (A) und rechten, intakten (B) Extremität der Sprague-Dawley-Ratten
- Abbildung 18: Anzahl apoptotischer Muskelzellkerne pro Gesichtsfeld nach CapImage (A) und TUNEL-Methode (B)
- Abbildung 19: Darstellung der Mikrozirkulationsparameter NADH-Autofluoreszenz (A) und funktionelle Kapillardichte (B)
- Abbildung 20: Darstellung der systemischen Leukozytenzahl (A) sowie der Fraktion rollender Leukozyten und der Anzahl fest adhärenter Leukozyten innerhalb der Skelettmuskulatur in Abhängigkeit von Traumainduktion und Ebselenapplikation

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Antiinflammatorische Effekte von Ebselen

Tabelle 2: Spezifische Enzyminhibitionen durch Ebselen

Tabelle 3: Darstellung der einzelnen Blutbildparameter

Tabelle 4: Darstellung der makrohämodynamischen Parameter MAP und HF

Abkürzungsverzeichnis

AK	Antikörper
ANOVA	one way analysis of variance
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
aU	arbitrary unit [willkürliche Einheiten]
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
CARS	compensatory antiinflammatory response syndrome
CCD	charge-coupled device
CD	cluster of differentiation [Differenzierungsantigene]
CED	Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen
CHAOS	cardiovascular shock, apoptosis, organ dysfunction, immune suppression
CII-Technik	Controlled-Impact-Injury-Technik
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
COX-2	Cyclooxygenase-2
CT	Computertomographie
D	Dalton
DAPI	4,6-Diamidin-2-phenylindol
d.h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dUTP	Desoxy-Uridintriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ESL-1	E-selectin ligand-1
et al.	<i>et alii</i> [und andere]
ff.	folgende(n)
FITC	Fluoreszein-Isothiozyanat
GF	Gesichtsfeld
GlyCAM-1	glycosylation-dependent cell adhesion molecule-1
GPx	Gluthation-Peroxidase
GSH	Gluthation

h	Stunde
H ⁺	Wasserstoffion
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HE	Hämatoxilin-Eosin
HF	Herzfrequenz
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
H ₂ Se	Selenwasserstoff
H ₂ SeO ₄	Selensäure
HWZ	Halbwertszeit
I _a /I _i	Intensität außen/innen
ICAM	intracellular adhesion molecule
Ig	Immunglobulin
Il	Interleukin
INF-γ	Interferon-γ
iNOS	Induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
i.p.	intraperitoneal
IVM	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
KG	Körpergewicht
LEC-CAMS	leukocyte endothelial cell-cell adhesion molecules
LT	Leukotrien
m	Meter
MAdCAM-1	mucosal vascular addressin cell adhesion molecule-1
MAP	mean arterial pressure
MARS	mixed antagonistic response syndrome
mg	Milligramm
min	Minute
mind.	mindestens
MIP-1α	macrophage inflammatory protein-1α
mm	Millimeter
mm ²	Quadratmillimeter

mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
msec	Millisekunde
μmol	Mikromol
MW	Molekulargewicht
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NAD	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidiert
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduziert
NADPH	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid-Phosphat, reduziert
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NSAID	Nichtsteroidale Antiphlogistika
ONOO ⁻	Peroxynitrit
p-Wert	Signifikanzwert
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
p _a O ₂	Sauerstoffpartialdruck
p _a CO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
PC	personal computer
PGE ₂	Prostaglandin E ₂
PGI ₂	Prostaglandin I ₂ [Prostacyclin]
pH	<i>pondus Hydrogenii</i> [pH-Wert]
PH-GPx	Phospholipid-Gluthationperoxidase
PMN	Polymorphkernige neutrophile Granulozyten
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand-1
pTT	partielle Thromboplastinzeit
S	Schwefel
sec	Sekunde
SeO ₂	Selendioxid
SEM	Standard Error of the Mean
SIC-Studie	Selenium in Intensive Care - Studie
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
sog.	sogenannt
S-VHS	Super Video Home System

Tab.	Tabelle
TdT	Terminale Desoxynucleotidyl-Transferase
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
TUNEL	TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

1 Einleitung

1.1 Weichteiltrauma

1.1.1 Weichteilschädigungen im Überblick

Die Schädigung des Weichteilmantels ist Bestandteil des Verletzungsmusters bei Sportverletzungen (Bily und Kern 1998) sowie mehrfach- bzw. schwerverletzten Patienten und betrifft bei unfallbedingten Verletzungen zumeist die untere Extremität. Regelmäßig kommt es demzufolge v.a. bei Frakturen nicht allein zur Knochenschädigung, sondern auch zur Traumatisierung umliegender Weichteile (Oestern und Tscherne 1983; Amon et al. 2006). Genauso bedeutsam wie die unmittelbare Muskelzerstörung durch ein Trauma sind jene Schäden, die während der Bergung Verletzter, bei Repositionsmaßnahmen, beim Anlegen von Verbänden oder auch bei der operativen Frakturversorgung entstehen können (Koslowski 1999).

Die meisten Weichteilverletzungen betreffen i.d.R. insbesondere die Muskulatur. Die Relevanz der Schädigung anderer Weichteile, wie jene von Haut, Nerven und Gefäßen ist in Relation zur Muskelschädigung gering (Koslowski 1999; Müller und Braun 2004).

Bei geschlossenen Verletzungen lässt sich die Mitbeteiligung der Muskulatur schwerer abschätzen. In der Regel ist jene wesentlich ausgedehnter als tatsächlich sicht- und tastbar. Lokale Komplikationen wie das Frakturhämatom sind zwar aufgrund der sekundären Knochenheilung nicht unerwünscht (Adler 2005), allerdings können sich starke Blutungen infizieren oder zu einem Kompartiment-Syndrom führen, sodass Anlass zur operativen Revision gegeben ist (Murdoch und Murdoch 2012). Eine ausgedehnte Muskelzerstörung an muskelschwachen Extremitätenabschnitten mit Reduktion des frakturbedeckenden Bindegewebes erhöht zudem die Infektanfälligkeit (Amon et al. 2006). Spätfolgen, wie nicht erkannte Nekrosen oder revisionspflichtige Hämatome, können sich sehr komplikationsreich entwickeln und geben nicht selten Anlass zu ausgedehnten operativen Eingriffen und langwieriger Nachbehandlung (Oestern und Tscherne 1983; Järvinen et al. 2005; Amon et al. 2006).

Weichteilschäden und ihre Auswirkungen sind bis heute nur teilweise erforscht, trotzdem besteht kein Zweifel daran, dass sie sich negativ auf den Krankheitsverlauf auswirken (Pape et al. 2005). Insbesondere im Verlauf komplexer Extremitätenverletzungen wird die

Prognose maßgeblich durch den Weichteilschaden bestimmt (Oestern und Tscherner 1983; Kellett 1986; Barlow und Willoughby 1992; Levin und Condit 1996). Zentrale Bedeutung obliegt dabei dem Ausmaß und der Schwere des Weichteiltraumas hinsichtlich des Frakturmanagements (Rommens und Broos 1992; Rommens et al. 1994; Claes et al. 2002). Die Notwendigkeit einer suffizienten Blutversorgung steht dabei im Mittelpunkt (Hulth 1989; Einhorn 1995), sodass die klinische Versorgung bei Frakturen mit zusätzlichen, ausgeprägten Weichteilschädigungen und resultierender eingeschränkter Gewebsperfusion initial erhöhter Aufmerksamkeit bedarf.

1.1.2 Pathophysiologie des Weichteiltraumas

Lokale Auswirkungen des Weichteiltraumas

In Folge einer geschlossenen Weichteilschädigung, sei es durch Kontusion oder auch Fraktur, bleibt das Trauma durch einsetzende Reparaturmechanismen zunächst lokal begrenzt. Dabei kommt es initial zur Freisetzung zahlreicher proinflammatorischer Mediatoren, die potenziell toxische Effekte entfalten können (Harris und Gelfand 1995; Harris und Skalak 1996). Es entstehen daraufhin vermehrt Stoffwechselprodukte, wie Stickstoffmonoxid, Thromboxane, Prostaglandine und PAF - und es erfolgt die Expression endothelialer und leukozytärer Adhäsionsmoleküle. In einem komplexen Zusammenspiel kommt es zunächst zur frühen Störung der endothelialen Funktion, sowie letztlich zum mikrovaskulären Perfusionsversagen mit nutritiven Defiziten und resultierendem, ausgeprägten Gewebsschaden:

Die Ausschüttung spezifischer Mediatoren, wie z.B. TNF- α , Il-1, -6, -8 und Interferon- γ , gefährdet die Regulationsmechanismen im Kapillarbett, wie sie u.a. durch Thromboxan A₂, PGI₂ und NO gewährleistet werden (Kharbanda et al. 2001). Die benannten proinflammatorischen Mediatoren führen zu einem Ungleichgewicht zwischen Vasodilatation und -konstriktion, wodurch die vaskuläre Homöostase und die Weichteilversorgung massiv beeinträchtigt werden. Der Endothelzellschaden spielt demzufolge eine essentielle Rolle bei der Entstehung des endgültigen Weichteilschadens nach Traumainduktion, wobei insbesondere Hypoxie- und Reperfusionsgeschehen zentrale Ursachen im Verlauf darstellen (Carden und Granger 2000). Im Kapillarbett stellt sich diese endotheliale Dysfunktion infolge der erhöhten Kapillarpermeabilität mit verstärkter interstitieller Flüssigkeitsinfiltration dar, wobei v.a. die reduzierte Menge verfügbaren Stickstoffmonoxids NO ursächlich zu sein scheint (Harris und Skalak 1996; Harris et al. 1997). Unter physiologischen Bedingungen

wirken die Mediatoren PGI₂ und NO gefäßerweiternd, sowie antithrombozytär und -leukozytär gegenüber dem Endothel. Diese endogenen Signalstoffe werden nach Zellschädigung vermindert exprimiert, während die Produktion der vasokonstriktiven und präadhäsiven Stoffe Endothelin und v.a. Thromboxan A₂ gesteigert wird (Kharbanda et al. 2001). Desweiteren bewirkt eine lokale Gefäßschädigung die Freisetzung von PAF, woraufhin die thrombozytäre Aggregation und Adhäsion an Gefäßzellen forciert wird (Gawaz et al. 1997). Das Ergebnis stellen dann Mikrothromben dar, welche zur Obliteration des mikrovaskulären Netzwerkes führen können.

Aus der mikrozirkulatorischen Verteilungsstörung des Blutes und dem Gewebsödem resultiert wiederum eine verlängerte Diffusionsstrecke des Sauerstoffes. Weiterhin sinkt durch die extraluminale Kompression des Gefäßbettes die absolute Anzahl perfundierter Kapillaren (Carden und Granger 2000), wodurch das ohnehin unterversorgte, traumatisierte Skelettmuskelparenchym in seiner Funktion durch verminderte Sauerstoffzufuhr bedroht ist. Neben den gesteigerten nutritiven und metabolischen Defiziten wird auch die Entsorgung schädigender Stoffwechselprodukte reduziert (Gullo und Berlot 1996).

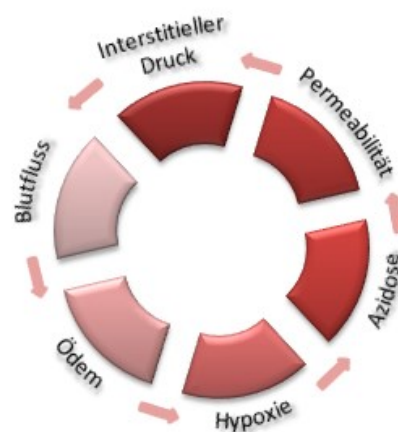


Abbildung 1: Lokale Auswirkungen des Weichteiltraumas auf einzelne Perfusionsparameter des betroffenen Gewebes (nach Amon et al. 2006)

Unter dem Einfluss dieser fortschreitenden Entzündungsreaktion erfolgt die Aufrechterhaltung oder gar Zunahme des bestehenden Sauerstoffdefizits im geschädigten Gewebe. Im postkapillaren Gefäßbett wird der Endothelzellschaden insbesondere durch die ausgeprägte Leukozyten-Endothel-Interaktion hervorgerufen. Nach Traumatisierung von Weichteilgewebe erfolgt im Bereich postkapillarer Venolen die inflammatorische Immunantwort durch neutrophile Granulozyten (Harrison 1997; Hayashi et al. 1999; Kubes

et al. 1998). Dabei konnte in verschiedenen Arbeiten ein deutlicher Zusammenhang zwischen dem Ausmaß der Granulozytenaktivierung und dem Grad der Adhäsion aktivierter Leukozyten durch Traumata - als grundlegende Ursachen des endgültigen Gewebsschadens - beschrieben werden (Hernandez et al. 1987; Wakefield et al. 1993; Liao et al. 1995; Hoffmann et al. 1999). Die Arbeitsgruppe um Harris et al. zeigte ebenso eine Korrelation zwischen der Anzahl adhärenter Leukozyten in Venolen und dem Ausmaß des Weichteilschadens (Harris und Skalak 1996).

Den Zusammenbruch der Mikrozirkulation nach Gewebischämie bezeichnet man auch als *No-reflow*-Phänomen, d.h. trotz nachfolgender Reperfusion werden die Kapillaren nicht adäquat perfundiert (Menger et al. 1992a; Menger et al. 1992b). Dieser Teufelskreis (siehe Abbildung 1) ist nur sehr schwer zu durchbrechen und kann durchaus schwerwiegende lokale Komplikationen zur Folge haben, wie die Verzögerung oder sogar Verhinderung einer regulären Wund- und Frakturheilung, die Bildung von Gewebnekrosen sowie eine erhöhte Infektanfälligkeit des traumatisierten Gewebes infolge der verminderten Perfusion (Amon et al. 2006). Aus dem primär lokalen Entzündungsgeschehen entwickelt sich später u.U. eine systemische Entzündung im Sinne eines SIRS (Menth-Chiari et al. 1998; Menth-Chiari et al. 1999; Zhang et al. 2003).

Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Leukozyten-Endothel-Interaktion, Endothelzellaktivierung und nachfolgende Gewebefiltration durch Neutrophile sind grundlegende Mechanismen der Entzündung, wie sie z.B. im Rahmen von Traumata oder auch Reperfusionprozessen auftreten (Zimmerman et al. 1992; Zimmerman et al. 1996).

Bei der transendothelialen Migration und Extravasation im Blutstrom zirkulierender Neutrophiler an den Ort der Entzündung erfolgt die Kommunikation über endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle (Ben-Baruch et al. 1995; Zimmerman et al. 1996). Die beteiligten Adhäsionsmoleküle werden nach ihrer chemischen Struktur in drei Gruppen unterteilt: Selektine, Integrine und Immunglobulin-Superfamilie (Carlos und Harlan 1994). Selektiv erhöhen jene Adhäsionsmoleküle postischämisch im Rahmen der Reperfusion die Bindungsaffinität polymorphkerniger Neutrophiler und vermitteln schließlich deren Adhäsion an die Gefäßwand, bevorzugt in postkapillaren Venolen (Zimmerman et al. 1996; Kupatt et al. 1997a; Kupatt et al. 1997b).

Selektine werden auch als *leukocyte endothelial cell-cell adhesion molecules* LEC-CAMS bezeichnet. Es handelt sich um transmembranale Glykoproteine. Je nach ihrem

hauptsächlich auf einzelnen Zellen werden Selektine in L-(Leukozyten), P-(platelets) und E-(Endothelzell)-Selektine unterschieden (McEver et al. 1995; Bendas und Gerd 2005). Endotheliale und leukozytäre Liganden dieser Gruppe von Adhäsionsmolekülen sind in der Abbildung 2 dargestellt. Es handelt sich dabei um Glykoproteine, die strukturell Mucin ähneln (McEver et al. 1995).

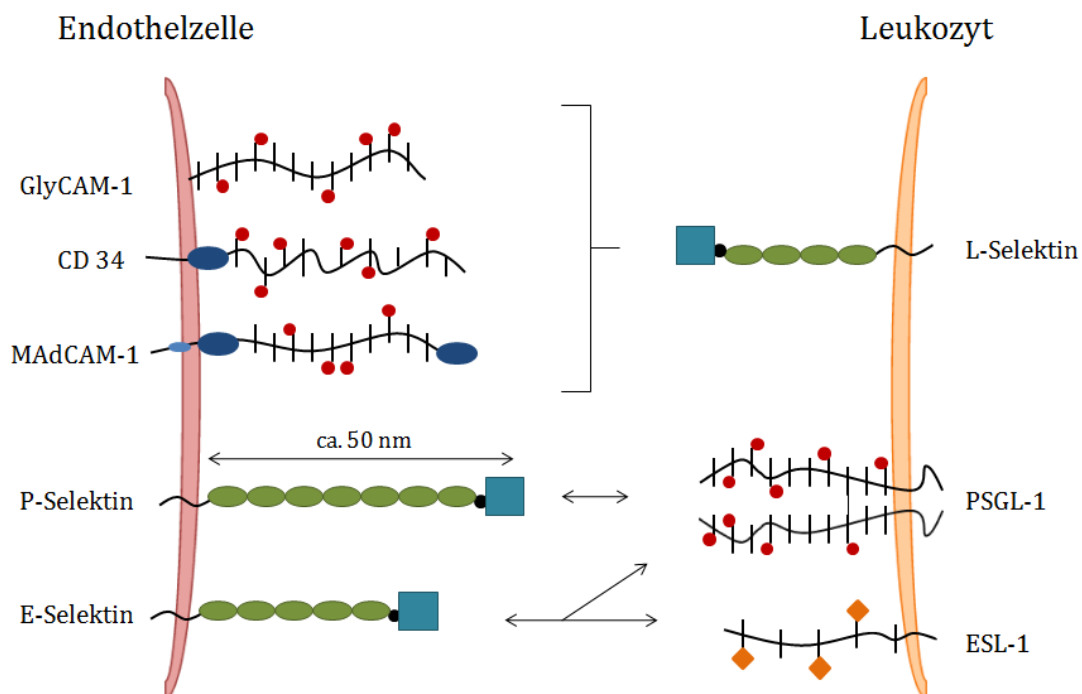


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Selektine und ihrer korrespondierenden Liganden (McEver et al. 1995; Bendas 1998)

Integrine ermöglichen die feste Bindung der Leukozyten an die Gefäßwand und deren Transmigration in das entzündete Gewebe (Zimmerman et al. 1996). Moleküle dieser Gruppe bestehen aus zwei membranverankerten Peptidketten, der α - und β -Kette. Die Integrinfamilien differenziert man nach den Eigenschaften der β -Ketten. β 2-Integrine befinden sich ausschließlich auf Leukozyten und vermitteln neben der Phagozytose auch die Zelladhäsion an aktivierte Endothelzellen. Dabei soll v.a. das MAC-1 (auch: CD11b/CD18) benannt werden, welches nach Aktivierung von Leukozyten aus deren Speichergranula freigesetzt wird (Bendas 1998). β 3-Integrine ermöglichen Zellen die Bindung an extrazelluläre Matrix, wie z.B. an Kollagen, Elastin, Fibronectin oder von-Willebrand-Faktor.

Zur Immunglobulin-Superfamilie gehören zahlreiche Moleküle, die besonders für die antigenspezifische Erkennung bedeutsam sind. Diese Ig-ähnlichen Adhäsionsmoleküle können andere Moleküle der eigenen Gruppe binden, jedoch auch Selektine und Integrine. ICAM-1 und -2, sog. *intracellular adhesion molecules*, befinden sich lediglich auf

Endothelzellen, während ICAM-3 zudem auf Leukozyten (Lymphozyten, Monozyten, Neutrophilen) und Epithelzellen exprimiert wird (Bendas 1998). Ein weiteres Mitglied der Immunglobulin-Superfamilie ist PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule-1, Synonym: CD 31) (Muller et al. 1993). PECAM-1 vermittelt durch eine homogene Bindung den interzellulären Endothelzellkontakt (Bendas 1998; Bendas und Gerd 2005).

Die Extravasation in das Gebiet der Inflammation erfolgt im Rahmen eines Traumas vor allem durch neutrophile Granulozyten, wobei das endotheliale P-Selektin die initiale Interaktion der Leukozyten mit der Gefäßwand steuert (Zimmerman et al. 1996). In dieser Frühphase der Entzündung tritt P-Selektin mit dem komplementären Ligand PSGL-1 in Kontakt, welcher auf den Microvilli der Leukozyten lokalisiert ist. Diese initiale Kontaktaufnahme wird als *'tethering'* bezeichnet (siehe Abbildung 3). Es erhöht sich daraufhin die Anzahl schwach affiner Ligand-Rezeptor-Wechselwirkungen, was im Scherstrom der Gefäße zu einer Verlangsamung der Leukozyten (ca. 20 $\mu\text{m/s}$) und rollenden Bewegung entlang des Gefäßendothels führt (Bendas 1998). Das Phänomen der Leukozytenakkumulation und Rollbewegung am Endothel im Entzündungsgebiet wurde bereits vor über 100 Jahren mittels intravitalmikroskopischer Untersuchungen beschrieben. Es konnte jedoch erst Anfang der 90er Jahre die molekulare Grundlage dieser Prozesse - nach der Entdeckung der Selektinrezeptoren - vollständig aufgeklärt werden (Bendas und Gerd 2005).

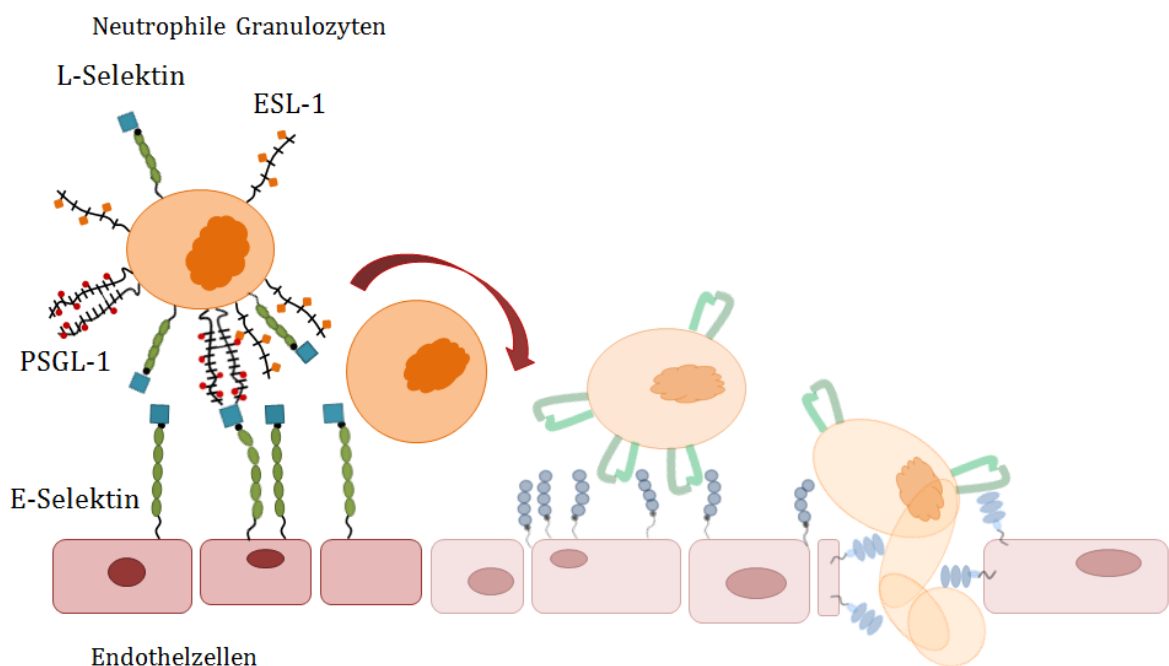


Abbildung 3: Initialer Kontakt eines aktivierten neutrophilen Granulozyten mit den Endothelzellen (Bendas 1998; Bendas und Gerd 2005)

Innerhalb von 1-2 Stunden werden weitere Selektinrezeptoren auf den aktivierten Endothelzellen exprimiert. Sie interagieren mit den polysaccharid- oder mucinähnlichen Liganden auf Leukozyten und vermitteln das Entlangrollen der Leukozyten an der Endothelzelloberfläche. Der im Randbereich der leukozytären Microvilli vorkommende ESL-1, wie in Abbildung 3 dargestellt, ist ein hochaffiner Ligand des E-Selektins und spielt eine wichtige Rolle für das sog. 'rolling' der Zellen an der Gefäßwand (Bendas 1998). Dadurch wird der transendotheliale Migrationsprozess eingeleitet, zusätzliche Interaktionen leukozytärer Selektine mit Endothelzellglykoproteinen werden ermöglicht und die Leukozyten werden ebenso aktiviert (Zimmerman et al. 1996). Diese lose Haftung kann allerdings durch Scherkräfte des Blutstroms mehrfach unterbrochen werden (Bendas 1998).

Im nächsten Schritt kommt es zum festen Anhaften der Neutrophilen an die Blutgefäßwand. Hierbei wird die noch instabile Zellinteraktion in einen stabilen Kontakt überführt.

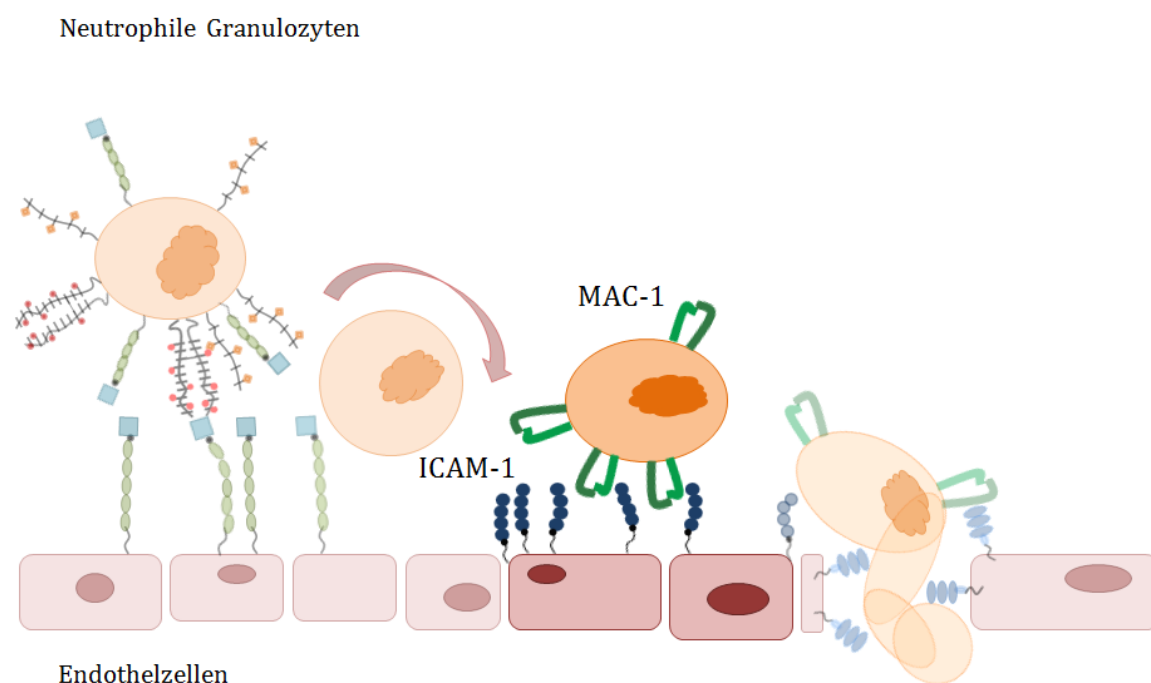


Abbildung 4: Feste Adhäsion eines Granulozyten mit dem Endothel (Bendas 1998)

Die Vermittlung der Adhäsion erfolgt über Liganden aus der Immunglobulin-Superfamilie und durch die Gruppe der Integrine. Zusätzlich wird dieser Schritt durch chemotaktisch wirksame Mediatoren, wie Leukotrien B₄, C_{5a} und PAF, verstärkt (Zimmerman et al. 1996). Die wichtigsten Liganden für die leukozytären Rezeptoren, wie beispielsweise MAC-1, sind dabei *intercellular adhesion molecules*, wobei die Expression von ICAM-1 durch die benannten Zytokine aktiviert wird (Bendas 1998). Gleichzeitig nimmt die Anzahl der L-Selektine auf der

leukozytären Zelloberfläche ab, was man auch *'shedding'* nennt. Die integrinvermittelte Bindung an komplementäre Zelladhäsionsmoleküle initiiert die Adhäsion zwischen Endothelzellen und Leukozyten, das *'rolling'* wird zusätzlich verlangsamt und der feste Kontakt zwischen den Zellen intensiviert. Dieser Zell-Zell-Kontakt wird auch als *'sticking'* oder feste Adhäsion bezeichnet (siehe Abbildung 4), und führt zur Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit des Blutes im Gefäßbett. Nach Akkumulation im Gefäßbett und Adhäsionsmolekül abhängiger Interaktion mit dem Endothel erfolgt schließlich die transendotheliale Migration der Neutrophilen in das perivaskuläre Gewebe (Hernandez et al. 1987). Zunächst schieben sich die Leukozyten - nach Lösung der homogenen PECAM-1-Kontakte durch Bindung an ICAM-1 (Muller et al. 1993) - zwischen den resultierenden Endothelzellzwischenräumen hindurch (Bendas 1998), dauern mittels Kollagenase die Basallamina an und gelangen schließlich ins Interstitium (siehe Abbildung 5). Von dort aus erreichen die Leukozyten wiederum chemokinvermittelt den Ort der Entzündung.

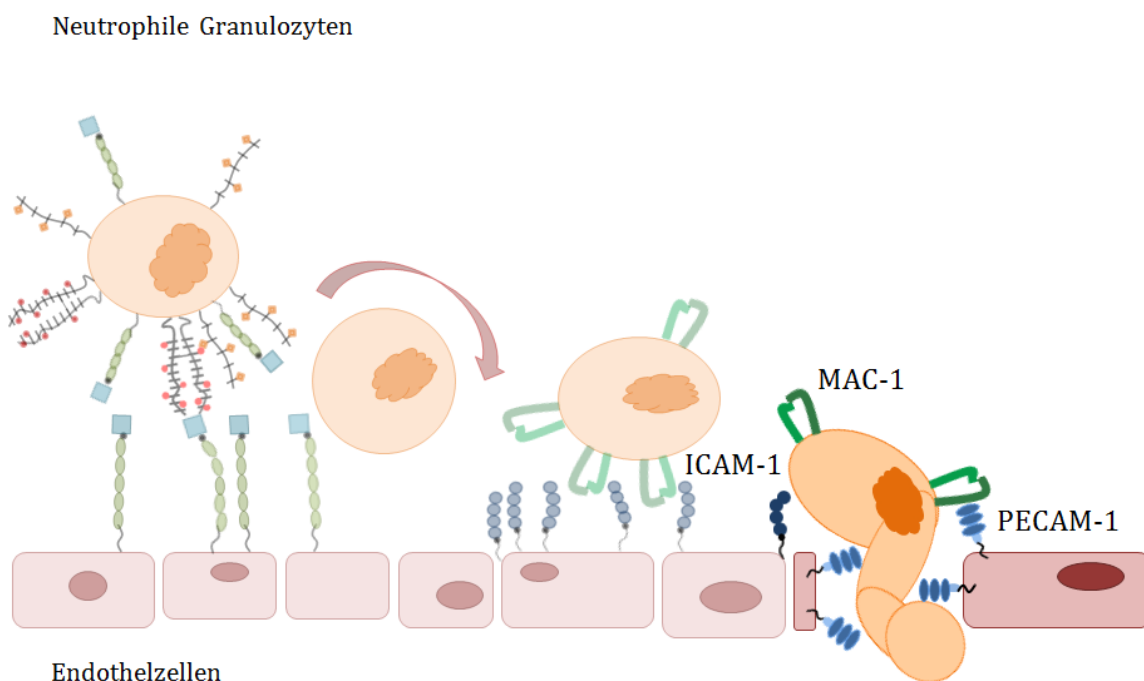


Abbildung 5: Emigration eines neutrophilen Granulozyten (Bendas 1998)

Diese Leukozyten-Endothel-Interaktion findet vor allem in postkapillaren Venolen statt (Harrison 1997; Kubes et al. 1998; Hayashi et al. 1999). Gleichzeitig kommt es aber aufgrund des von endotheliale und perivaskulärem Ödem eingeengten Gefäßlumens zum sog. *'leukocyte capillary plugging'* in Kapillaren postischämischen Gewebes (Harris und Skalak 1996; Harris et al. 1997). Nach Extravasation können neutrophile Granulozyten im Inflammationsgebiet ihre Funktionen ausüben, wie unspezifische Phagozytose, Freisetzung

proinflammatorischer Mediatoren und schließlich die Geweberekonstruktion. Jedoch ist in den oben benannten Studien auch nachgewiesen worden, dass eine lokale Anhäufung von Entzündungszellen durchaus zur Ausdehnung des Gewebsschadens beitragen kann, was sowohl auf granulozytäre Enzyme als auch reaktive Sauerstoffmetabolite zurückzuführen ist. Die schwere Zerstörung des endothelialen Zellverbandes durch Leukozytenadhäsion in der Frühphase der Entzündung führt zum *'capillary leakage'*, einem Verlust der endothelialen Barrierefunktion, und bewirkt damit die Extravasation von Flüssigkeit und Plasmaproteinen (Fries et al. 1993; Cowley et al. 1994). Durch kontinuierliche Adhärenz, insbesondere polymorphkerniger neutrophiler Granulozyten, werden sowohl der Endothel-, als auch der Parenchymzellschaden verstärkt. Ursächlich dafür sind neben proteolytischen Enzymen (Elastase, Kollagenase) vor allem toxische Sauerstoffradikale, die u.a. beim *'respiratory burst'* phagozytischer, weißer Blutzellen freigesetzt werden. Dabei kommt es durch das Enzym NADPH-Oxidase zur Produktion von Superoxidanionen (O_2^-). Weitere wichtige Sauerstoffradikalquellen in der Pathophysiologie von Entzündung und Reperfusionstrauma sind Enzyme, wie Cyclooxygenasen und Lipoxygenasen durch die Synthese von Prostaglandinen bzw. Leukotrienen, Xanthinoxidasen, die induzierbare NO-Synthase stimulierter Leukozyten oder die Mitochondrien nekrotischer Zellen. Dem menschlichen Organismus stehen neben den bedeutenden Gluthation-Peroxidasen zur Bekämpfung reaktiver Sauerstoffmoleküle, wie dem Hydroxyl-, Hydroperoxyl-Radikal oder Wasserstoffperoxid, verschiedene enzymatische und nicht-enzymatische Antioxidantien zur Verfügung.

Systemische Effekte des Weichteiltraumas

Bei besonders schweren Verletzungen und bei vorerkrankten Patienten kann es zusätzlich zum lokal begrenzten Entzündungsgeschehen auch zur Beteiligung des gesamten Organismus kommen. Inflammatorische Zytokine werden dann systemisch freigesetzt (Hildebrand et al. 2005). In der Folge werden Entzündungszellen, Thrombozyten und das Gerinnungssystem generell aktiviert. Sofern diese systemische Reaktion nicht kompensiert werden kann, entwickelt sich ein *systemic inflammatory response syndrome* (SIRS) (Lenz et al. 2007), welches im Krankenhausalltag eine gefürchtete Komplikation darstellt (Amon et al. 2006). Grundsätzlich verursachen die freigesetzten Mediatoren dieselben Veränderungen, die auch am ursprünglichen Entzündungsort zu beobachten sind (Pape et al. 1994; Pape et al. 1998). Die Bildung von Mikrothromben in Gefäßen kann bis zur Ischämie von Organen führen (Gando et al. 1996). Wird die Funktion primär nicht-traumatisierter Organsysteme durch die

systemische Entzündungsreaktion beeinträchtigt, bezeichnet man die entsprechenden Organe als sog. *'remote organs'* (Gradl et al. 2005). Dauert dieser Zustand an, entwickelt sich ein Multi-Organ-Versagen, das auch heute noch in 31-80% der Fälle zum Tod des Patienten führt (Ciesla et al. 2005). Um die systemische Inflammation zu verhindern bzw. zu minimieren, werden schließlich auch antiinflammatorische Zytokine ausgeschüttet. Dieses Phänomen nennt man *compensatory antiinflammatory response syndrome* (CARS). Unter dessen Einfluss erfolgt eine endogene Immunsuppression, welche zum gehäuftem Auftreten von Infektionen mit pathogenen Keimen bis hin zur Sepsis führen kann (Levin und Condit 1996). Nach einer Definition von Davies und Hagen (1997) fasst man das gemeinsame Auftreten von SIRS und CARS als sog. *mixed antagonist response syndrome* (MARS) zusammen (Davies und Hagen 1997). Die Gesamtheit der beschriebenen systemischen Reaktionen und der resultierenden Krankheitssymptomatik bezeichnet man als CHAOS (= *cardiovascular shock, apoptosis, organ dysfunction, immune suppression*).

1.1.3 Therapie des Weichteiltraumas

Die diagnostische und therapeutische Problematik geschlossener Weichteilschädigungen liegt in der Unzugänglichkeit der unter der zwar geschädigten, aber noch geschlossenen Haut liegenden, verletzten Weichteile (Koslowski 1999).

Die Therapie der Wahl sind frühfunktionelle konservative Maßnahmen (Bily und Kern 1998). Die initiale Behandlung eines Weichteilschadens umfasst demzufolge die Immobilisation und Stabilisierung der verletzten Extremität, die Hochlagerung zur Verbesserung des venösen und auch lymphatischen Abflusses als auch das Anlegen eines Druckverbandes unter mäßiger Spannung (Uslu et al. 2010). Als empirische Grundlage bei der Therapie von Weichteiltraumata gilt zudem der Einsatz lokaler Kälte, deren günstige Wirkung auf Schwellung und Schmerz akuter Verletzungen lange bekannt ist (Menth-Chiari et al. 1999; Bleakley et al. 2006; Uslu et al. 2010). Aktuelle Therapieoptionen lassen sich im sog. PECH-Schema nach Böhmer (siehe Abbildung 6) (Steinmann und Allwang 2009) bzw. dem entsprechenden englischen Akronym 'RICE' (*rest, ice, compression, elevation*) (Järvinen et al. 2005) zusammenfassen:

PECH-Schema nach Böhmer	
P	• Pause: Abbruch der zur Verletzung führenden Tätigkeit
E	• Eis: Kühlung des betroffenen Areals, keine Unterkühlung!!
C	• Compression: Druckverband mit mäßiger Spannung
H	• Hochlagerung: Verbesserung des venösen und lymphatischen Abflusses

Abbildung 6: PECH-Schema nach Böhmer (Steinmann und Allwang 2009)

Mit dem Ziel, die Beweglichkeit zu verbessern, den Schmerz zu lindern und die Dauer der Rehabilitation zu verkürzen, kommen bei Kontusionen vor allem antiphlogistische Analgetika, aber auch antithrombotisch wirksame Medikamente zum Einsatz (Mehallo 2006; Uslu et al. 2010). Zwar konnte in experimentellen Studien ein positiver Einfluss nichtsteroidaler Antiphlogistika auf die Muskelzellregeneration nachgewiesen werden (Thorsson et al. 1998). Die Verabreichung von NSAID wird jedoch vor allem bei lang andauernder Behandlung aufgrund des Nebenwirkungsprofils und des eher ungünstigen Einflusses auf die Heilungsergebnisse sehr kritisch beurteilt (Paoloni und Orchard 2005; Mehallo et al. 2006; Ziltener et al. 2010).

Ist die Skelettmuskelvitalität im Verlauf der konservativ behandelten Weichteilverletzung gefährdet, werden chirurgische Maßnahmen in Erwägung gezogen, um etwa ein Hämatom zu entlasten oder ein Kompartment-Syndrom zu therapieren (Järvinen et al. 2005; Murdock und Murdoch 2012).

1.2 Selen

Mit der Entdeckung der einundzwanzigsten proteinogenen Aminosäure Selenocystein 1978 in dem Enzym Gluthation-Peroxidase GPx und der Identifizierung des darin enthaltenen Selens hat die Forschung über eben jenes essentielle Spurenelement laufend neue Erkenntnisse hervorgebracht (Soriano-Garcia 2004). Im menschlichen Organismus existieren verschiedene selenhaltige Proteine (Gladyshev und Hatfield 1999; Hatfield und Gladyshev 2002; Kryukov et al. 2003). So ist Selen beispielsweise integraler Bestandteil des benannten körpereigenen Enzyms Gluthation-Peroxidase, welches u.a. die Erythrozyten vor Schädigungen durch Sauerstoffradikale schützt. Die Funktion selenspezifischer Proteine ist an eine adäquate Selenzufuhr gekoppelt, was bereits in verschiedenen klinischen Studien, u.a. zum Mamma- oder Prostatakarzinom, herausgestellt werden konnte (Clark et al. 1998; Yoshizawa et al. 1998). Physiologische Eigenschaften selenhaltiger Enzyme erklären die therapeutischen Effekte dieses bedeutsamen Spurenelementes. In experimentellen Modellen und klinischen Studien konnte u.a. die antioxidative Funktion als sog. Radikalfänger, die antiinflammatorische, immunmodulierende (Koller et al. 1986; Kiremidjian-Schumacher et al. 1996; Rao et al. 2001) wie auch gefäß- und kardioprotektive (Salonen et al. 1982; Miller et al. 2001; Yoshizawa et al. 2003) Wirksamkeit des Selens nachgewiesen werden. Galt Selen jahrzehntelang als hoch toxisch (Nogueira und Rocha 2011), so findet es sich heute im klinischen Alltag bei der Behandlung von chronisch entzündlichen Darmerkrankungen (CED), von Autoimmunerkrankungen der Schilddrüse (Gärtner und Gasnier 2003), zur Ergänzung

der HAART HIV-Erkrankter oder im Rahmen onkologischer Zusatztherapien wieder. Ebenso profitieren Patienten mit Sepsis oder gar septischem Schock von einer Selentherapie. Durch die Gabe eines hochdosierten Selenpräparates kann laut den Ergebnissen der SIC-Studie (Selenium in Intensive Care) die Zahl der Todesfälle signifikant herabgesetzt werden (Angstwurm et al. 2007).

Zusätzliche Entwicklungen in der Selenforschung und zahlreiche Studien geben seit einigen Jahren Aussicht auf immer weitere, vielversprechende Anwendungen von Selen und dessen Derivaten in der Biochemie, der Ernährungswissenschaft und vor allem in der Medizin (Soriano-Garcia 2004). In diesem Zusammenhang hat auch die organische Selenverbindung Ebselen an Bedeutung gewonnen (Schewe 1995) und soll im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie zum Weichteiltrauma der Ratte genauer betrachtet werden.

1.3 Ebselen

1.3.1 Chemische Eigenschaften von Ebselen

Ebselen ist eine niedrigmolekulare, organische Selenverbindung, die sich dank des energetisch bevorzugten Fünfrings (siehe Abbildung 7) durch eine thermodynamische Stabilität, eine dadurch bedingte geringe Toxizität und eine vergleichsweise lange HWZ in Versuchstieren und Menschen auszeichnet.

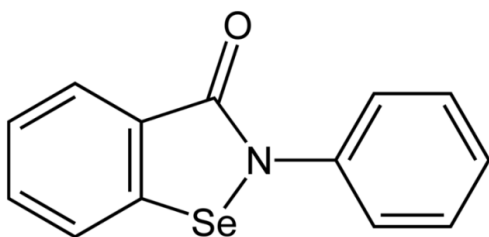


Abbildung 7: Strukturformel von Ebselen

In der Studie von Parnham und Graf von 1987 konnte die geringe Toxizität des Ebselen im Gegensatz zu anderen Selenverbindungen durch die fehlende Freisetzung des reinen Selen während Biotransformationsvorgängen bestätigt werden (Parnham und Graf 1987). Ebselen wird desweiteren sowohl *in vitro* als auch *in vivo* (Wagner et al. 1994) kovalent über eine Selenylsulfidbindung an das Serumalbumin gebunden, d.h. mehr als 90% des Ebselen findet man *in vivo* an Albumin gebunden vor. Diese ist allerdings kein Hindernis für die hohe Bioverfügbarkeit innerhalb der Zellen. Die Albuminbindung kann dann auf andere Proteine,

die Thiolgruppen enthalten, übertragen werden, so z.B. auf Gluthation-S-Transferasen und verschiedene Membranproteine. Diese Übertragung ist entscheidend für die zelluläre Ebselenaufnahme (Wagner et al. 1994). Laut Wagner et al. konnte kein Unterschied in der Aufnahme freien oder Albumin-gebundenen Ebselens in Hepatozyten beobachtet werden. Der Transfer aus der Selenylsulfidbindung im Albumin auf andere Thiolgruppen in Plasmamembranen erfolgt sehr effizient. Offensichtlich kann Ebselen ohne große Schwierigkeiten in alle subzellulären Kompartimente einer Zelle eindringen.

1.3.2 Reaktions-/Wirkmechanismus von Ebselen

Antiinflammatorische, zytoprotektive und antiarteriosklerotische Eigenschaften lassen sich auf die zahlreichen Enzyminhibitionen durch niedrig dosiertes Ebselen zurückführen, die von verschiedenen Arbeitsgruppen, wie in Tabelle 1 dargestellt, beschrieben worden sind:

<u>Inhibierter Parameter</u>	<u>Gewebe/Versuchstierart</u>	<u>Referenzen</u>
IFN- γ - und TNF- α -Produktion	Humane Lymphozyten	(Piasecki et al. 1992)
Leukotrien B ₄ -Bildung	Granulozyten, Ratte	(Safayhi et al. 1985)
NO-Bildung	Kupfferzellen, Ratte	(Wang et al. 1992)
Oxidative Burst, Produktion von O ₂ -	Humane Granulozyten	(Cotgreave et al. 1989)
Produktion von O ₂ -	Kupfferzellen, Ratte	(Wang et al. 1992)
Thrombin-induzierte Zellaggregation	Humane Thrombozyten	(Brüne et al. 1991)
Transendotheliale Migration	Humane Granulozyten	(Issekutz und Lopes 1992)

Tabelle 1: Antiinflammatorische Effekte von Ebselen

Man geht davon aus, dass der Inhibitionsmechanismus von Ebselen auf der Blockade von Thiolgruppen beruht, die für Funktion und Struktur des jeweiligen Enzyms essentiell sind.

<u>Enzyme</u>	<u>Gewebe/Versuchstierart</u>	<u>Referenzen</u>
15-Lipoxygenase	Retikulozyten, Kaninchen	(Schewe 1995)
H ⁺ -/K ⁺ -ATPase	Magen, Schwein	(Beil et al. 1990; Tabuchi et al. 1995)
NADPH-Cytochrom P ₄₅₀ -Reduktase	Mausleber	(Wendel et al. 1984)
NADPH-Oxidase	Humane Granulozyten	(Cotgreave et al. 1989)
Prostaglandin-H-Synthase-1	Bläschendrüse, Schaf	(Schewe 1995)
Proteinkinase C	Humane Granulozyten	(Cotgreave et al. 1989)

Tabelle 2: Spezifische Enzyminhibitionen durch Ebselen

Die Mehrzahl dieser Enzyme spielt eine Rolle in der Pathogenese von Entzündungsprozessen, was die antientzündliche Aktivität dieser Selenverbindung *in vivo* erklärt (siehe Tabelle 2). Auf zellulärer Ebene konnte die hemmende Wirksamkeit von Ebselen von Lipoxygenasen, der H⁺-/K⁺-ATPase des Magens, der Proteinkinase C und der NADPH-Oxidase in Leukozyten bestätigt werden. In Experimenten an intakten Zellen sind jedoch wesentlich höhere Ebselenkonzentrationen notwendig als in Untersuchungen an reinen Enzymen, um vergleichbare Enzymhemmungen zu erreichen. Ursächlich scheint die geringere Enzymsensitivität in Zellen durch Ebselenbindung an andere Proteine und durch Gluthation, welches bestimmte Reaktionen umkehrt, bedingt zu sein (Schewe 1995). Im Folgenden soll lediglich eine Auswahl entzündungsfördernder Enzyme, wie sie auch im Rahmen des geschlossenen Weichteiltraumas auftreten, betrachtet werden.

Lipoxygenasen spielen im Arachidonsäurestoffwechsel von Leukozyten eine grundlegende Rolle. So entstehen durch Reaktion mit der 5-Lipoxygenase Leukotriene wie LTB₄, das chemotaktisch bedeutsam ist, während LTD₄ und LTE₄ u.a. die Gefäßpermeabilität stark erhöhen. Ebselen kann die Enzymaktivität der 5-Lipoxygenase und damit die Produktion proinflammatorischer Leukotriene unterdrücken, was sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden konnte (Wendel et al. 1997). Auch in diesem Fall werden wiederum deutlich erhöhte Ebselenkonzentrationen benötigt, um ähnliche Effekte in funktionstüchtigen Zellen, z.B. polymorphkernigen Granulozyten, im Vergleich zu puren extrazellulären Enzymsubstraten zu erreichen (Safayhi et al. 1985; Schewe 1995).

Weitere Enzyme, die durch Ebselen inhibiert werden können, sind die Proteinkinase C und die NADPH-Oxidase phagozytischer Zellen. Die NADPH-Oxidase, ein Multienzymkomplex aus spezifischen Untereinheiten, wird durch verschiedene, Phagozytose

-einleitende Faktoren in ruhenden Zellen aktiviert und ihre Funktion über eine komplexe Signaltransduktionskaskade vermittelt, wobei die Proteinkinase C den letzten Schritt, d.h. die Phosphorylierung der NADPH-Oxidase, katalysiert. Aus molekularem Sauerstoff entsteht schließlich durch Oxidation von NADPH das reaktive Superoxidanion, dessen bakterizide und proinflammatorische Wirkung für Granulozyten beim sog. 'respiratory burst' unentbehrlich ist. Die Aktivierung wird zum einen durch eine direkte Proteinkinase C-Inhibition, zum anderen durch Hemmung der katalytischen NADPH-Oxidase-Aktivität mittels Ebselen eingeschränkt (Cotgreave et al. 1989). Da die Proteinkinase C maßgeblich auch an anderen proinflammatorischen Reaktionen beteiligt ist, erklärt die Suppression dieses Enzyms zusätzlich das hohe antiinflammatorische Potential von Ebselen (Schewe 1995). Auch das Enzym NO-Synthase, welches Stickstoffmonoxid aus L-Arginin synthetisiert, spielt in Entzündungsprozessen eine wichtige Rolle. Während die endotheliale, konstitutiv exprimierte Form physiologischerweise den Gefäßtonus und somit den Blutfluss in Gefäßen reguliert (Moncada und Higgs 1993), hat die induzierbare NO-Synthase z.B. in Makrophagen oder glatten Muskelzellen Bedeutung im inflammatorischen Geschehen, u.a. durch Freisetzung hoher Konzentrationen an NO und damit Bildung des schädigenden, hochreaktiven Peroxynitrits ONOO⁻. Die induzierbare NO-Synthase zeichnet sich durch eine vergleichsweise hohe Umsatzrate aus, wobei bis zu 1000-fach größere Mengen an NO synthetisiert werden können, wenn sie im Rahmen von Infektion oder Entzündung aktiviert worden ist. Hohe Konzentrationen von NO sind wiederum zytotoxisch wirksam und münden in Zelltod und Gewebeschädigung. In Experimenten konnten Hattori et al. die höhere Sensitivität der induzierbaren Form gegenüber einer Hemmung durch Ebselen beobachten, wobei diese Selektivität ein weiteres Mal die antiinflammatorische Wirksamkeit des Ebselen unterstreicht (Hattori et al. 1994).

Neben der Hemmung proinflammatorisch wirksamer Enzyme konnte zudem sowohl *in vitro* (Issekutz und Lopes 1992), als auch *in vivo* (Gao und Issekutz 1993) der Einfluss von Ebselen auf die Interaktion zwischen Leukozyten und Gefäßendothel beschrieben werden. Dabei sind insbesondere die Adhäsion an das Endothel und die Transmigration polymorphkerniger Leukozyten durch Ebselen inhibiert worden. In einer *In-vitro*-Studie von Patrick et al. wurde beobachtet, dass die Hemmung dann besonders stark auf die Chemotaxis der Leukozyten wirkte, wenn jene durch LTB₄ aktiviert worden sind (Patrick et al. 1993). Die Fähigkeit von Ebselen, LTB₄ in dessen inaktives *trans*-Isomer umzuwandeln, ist 1986 von Kuhl et al. beobachtet worden und stellt den inaktivierenden Einfluss von Ebselen auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion deutlich heraus (Kuhl et al. 1986).

Letztlich bleibt noch das antithrombotische Potential Ebselens zu nennen, welches bedeutsam für den Verlauf des Weichteilschadens ist. So konnte durch Dimmeler et al. 1991 ein hemmender Effekt auf die Inositol-(1,4,5)-triphosphat-gebundene Calciumfreisetzung *in vitro* festgestellt werden (Dimmeler et al. 1991). Die dadurch beeinträchtigte intrazelluläre Calciumhomöostase wird für eine mögliche reduzierte Thrombozytenaggregation verantwortlich gemacht (Brüne et al. 1991). *In-vitro*-, aber auch *In-vivo*-Untersuchungen konnten zudem erfolgreich den antagonisierenden Einfluss von Ebselen auf die H₂O₂-induzierte, thrombozytäre P-Selektin-Expression zeigen (Lindenblatt et al. 2003). Bedenkt man die zentrale Bedeutung des P-Selektins, welches auch auf dem Endothel exprimiert wird, bei der Vermittlung der leukozytären Transmigration und bei der Entstehung von Gefäßthromben bzw. eines Reperfusionsschadens, zeigt sich die Gabe von Ebselen auch in diesem Fall als eine effektive therapeutische Möglichkeit.

Abschließend kann man zusammenfassen, dass Ebselen dank seiner geringen Toxizität, der guten Bioverfügbarkeit *in vivo* und insbesondere der pharmakologischen Effekte eine sehr vielversprechende Selenverbindung darstellt, welche durchaus in der Therapie inflammatorischer Prozesse angewandt werden und diese möglicherweise sogar verbessern könnte. Dabei sind die antioxidative Wirkung als Radikalfänger, die antientzündliche, zytoprotektive, aber auch die immunmodulierende Aktivität herauszustellen (Schewe 1995).

1.3.3 Aktuelle Studienlage zu Ebselen

In experimentellen Tiermodellen konnte der positive Einfluss von Ebselen auf das Herzmuskelgewebe, welches initial einer Ischämie und anschließend oxidativen Stress verursachender Reperfusion ausgesetzt worden ist, belegt werden (Maulik et al. 1998; Maulik und Yoshida 2000). Durch Issekutz et al. ist beschrieben worden, dass Ebselen in der Lage ist, die Adhäsion an und Migration polymorphkerniger Leukozyten durch aktiviertes Endothel humaner Umbilikalvenen *in vitro* zu hemmen (Issekutz und Lopes 1992).

Noch interessanter ist allerdings der klinische Einsatz von Ebselen in placebo-kontrollierten, doppelblind angelegten Studien verschiedener klinischer Zentren bei der Behandlung von Patienten mit neurologischen Defiziten nach Subarachnoidalblutungen (Saito et al. 1998) und bei Patienten mit akutem, ischämischen Hirninfarkt (Yamaguchi et al. 1998; Ogawa et al. 1999).

In der Studie von Saito et al. wurden 286 Patienten nach durchgemachter Subarachnoidalblutung in zwei Gruppen eingeteilt, über mehrere Monate mit Ebselen bzw. Placebo behandelt und beobachtet (Saito et al. 1998). Das Vorkommen Ischämie-bedingter,

verzögert auftretender neurologischer Defizite - klinisch zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Glasgow Outcome Score (Jennett und Bond 1975) beurteilt - zeigte sich in beiden Gruppen unverändert. Jedoch ergab die Behandlung mit Ebselen ein signifikant besseres Ergebnis in der computertomographischen Untersuchung hinsichtlich der Zahl als auch des reduzierten Ausmaßes sog. Gebiete niedrigerer Dichte. Das neuroprotektiv wirksame Ebselen hat den Umfang der Hirnschädigung deutlich reduziert (Saito et al. 1998).

Die Arbeitsgruppe um Yamaguchi et al. untersuchte das neuroprotektive Potential von Ebselen an Patienten, die einen akuten Hirninfarkt erlitten hatten. Diese Studie umfasste 302 Personen und ist ebenfalls doppelblind und placebo-kontrolliert durchgeführt worden. Die Beurteilung des Outcome erfolgte wiederum zu festgelegten Zeitpunkten anhand des Glasgow Outcome Score (Jennett und Bond 1975). Während nach einem Monat der Medikation die Ebselen-Gruppe eine deutliche Besserung zeigte, ließ sich nach einem Zeitraum von drei Monaten kein Unterschied zu Patienten darstellen, die ein Placebo erhalten hatten. Eine signifikante Verbesserung des Outcome der Patienten konnte zudem nur erreicht werden, wenn Ebselen innerhalb von 24 h nach dem akuten Ereignis verabreicht worden ist (Yamaguchi et al. 1998). Diese Tatsache ist ebenso in einer weiteren Studie dokumentiert worden (Ogawa et al. 1999), wobei eine signifikante Reduktion des durch akuten, zerebralen Gefäßverschluss geschädigten Hirngewebes bei Ebseleneinsatz innerhalb von 6 h erreicht wurde.

2 Ziel der Studie

In der Versorgung von Unfallverletzungen haben Weichteiltraumata einen wesentlichen Einfluss auf die Heilungsprognose des generell zerstörten Gewebes, da nicht selten Mikrozirkulationsstörungen mit Gewebshypoxie und-azidose resultieren. Als Komplikationen treten dann Regenerationsstörungen des möglicherweise frakturierten Knochens, aber auch umgebenden Weichteilmantels auf. Im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie zum geschlossenen Weichteiltrauma am Beispiel der Ratte sollen die antioxidativen, antiinflammatorischen und immunmodulierenden Eigenschaften der organischen Selenverbindung Ebselen genutzt werden, um den posttraumatischen, entzündlichen Muskelgewebsschaden zu reduzieren.

Als Parameter für den auftretenden Gewebsschaden sollen dazu die posttraumatische Mikrozirkulation und die Leukozyten-Endothel-Interaktion in der Skelettmuskulatur mittels Intravitalmikroskopie genauer untersucht werden. Dazu ist von unserer Arbeitsgruppe ein durch Schaser et al. standardisiertes Traumamodell genutzt worden (Schaser et al. 1999). Folgende Fragestellungen sollen innerhalb dieser Arbeit diskutiert werden:

- Welchen Einfluss zeigt Ebselen auf die gestörte Mikrozirkulation im traumatisierten Muskelgewebe?
- Kann die posttraumatisch resultierende Leukozytenadhärenz und die nachfolgende Transmigration durch Ebselen signifikant vermindert werden?
- Werden die durch Mikrozirkulationsstörungen bedingte Hypoxie und daraus entstehende Gewebsazidose unter Ebselen-Therapie reduziert?
- Ist es möglich die Gefäßpermeabilität positiv zu beeinflussen? Welche Aussage lässt sich über das Trauma-induzierte Gewebsödem unter Ebselentherapie treffen?
- Wird der Gewebsschaden, welcher anhand apoptotischer Zellen intravitalmikroskopisch und auch histologisch quantifiziert wird, durch diese organische Selenverbindung entscheidend verringert?

3 Material und Methoden

3.1 Versuchstiere

Für die Versuchsreihe wurden männliche *Sprague-Dawley*-Ratten (Charles River Laboratories, Sulzfeld, Deutschland) verwendet, wobei der Ursprung dieses Auszuchtstammes auf die *Sprague-Dawley*-Company in Wisconsin von 1925 zurückzuführen ist. *Sprague-Dawley*-Ratten zeichnen sich durch eine einfache Handhabung und gutmütige Veranlagung aus. Desweiteren ist dieser ausgezüchtete Rattenstamm aufgrund der genotypischen Variabilität innerhalb geschlossener Kolonien besonders geeignet, um Modelle humaner Erkrankungen zu studieren, die keinen spezifischen Genotyp erfordern. Nach der Anlieferung sind die Ratten erst nach adäquater Akklimatisierungszeit von mindestens 10 Tagen den Experimenten unterzogen worden.

Das Körpergewicht der einzelnen Versuchstiere betrug zwischen 250 und 300 Gramm. Die Unterbringung der *Sprague-Dawley*-Ratten erfolgte in der Zentralen Versuchstierhaltung des Instituts der Experimentellen Chirurgie der Universität Rostock bei konstanter Raumtemperatur von etwa 23°C. Der Tag-Nacht-Rhythmus für die Ratten betrug jeweils 12 Stunden und wurde durch die wechselnde Beleuchtung gewährleistet. Der Zugang zum Futter war frei. Alle experimentellen Gruppen erhielten normales Standardfutter und Wasser *ad libitum*.

Gemäß §8 (1) des Tierschutzgesetzes ist das experimentelle Protokoll vor Beginn der Arbeit genehmigt worden.

3.2 Modell

Im Rahmen dieser prospektiven, tierexperimentellen Studie wurden die Versuchstiere einem standardisierten Modell zum geschlossenen Weichteiltrauma unterzogen. Jenes Tiermodell ist ursprünglich zur Darstellung und Untersuchung schwerer, traumatischer Hirnschädigungen am Beispiel der Ratte entwickelt worden (Lighthall et al. 1989; Edward Dixon et al. 1991). Zum besseren Verständnis komplexer Weichteilschädigungen wurde es durch Schaser et al. modifiziert und bereits in mehreren experimentellen Reihen angewandt (Schaser et al. 1999; Gierer et al. 2004; Gierer et al. 2008). Dabei konnte eine ausgeprägte entzündliche Weichteilreaktion infolge dieses standardisierten Traumas dokumentiert werden. Neben verschiedenen anderen Untersuchungsschritten hatte das

mikrohämodynamische Monitoring zentrale Bedeutung für die Datengewinnung in dieser Studie und erfolgte im Anschluss an die Traumainduktion und Muskelpräparation mittels hochauflösender Intravitalmikroskopie, wie sie durch die Arbeitsgruppe Schaser et al. erarbeitet und etabliert worden ist (Schaser et al. 1999).

3.3 Traumainduktion an der Skelettmuskulatur der Ratte

Der geschlossene Weichteilschaden wurde mittels standardisierter, sogenannter Controlled-Impact-Injury-(CII-)Technik am jeweils lateralen, tibialen Kompartiment des linken Hinterlaufes der Versuchstiere erzeugt. So konnte ein reproduzierbares Hochgeschwindigkeitstrauma mit genau definierter Gewebsimpression erzeugt werden. Die verwendete Apparatur setzte sich aus einem computergesteuerten, druckluftbetriebenen Metallbolzen, einem PC-assistierte Interface, einer Halterungsvorrichtung für die Befestigung der Versuchstiere und einer Stickstoffflasche zusammen.



Abbildung 8: Enthaarung des Unterschenkels einer Sprague-Dawley-Ratte

Nachdem am linken Hinterlauf der bereits narkotisierten Ratten zunächst durch Rasur und Enthaarungscreme gründlich das Fell entfernt worden ist (siehe Abbildung 8), fixierte man die betreffende Extremität in Extensionsstellung innerhalb einer anatomisch angepassten Plastikform (Technovit; Kulzer, Wertheim, Deutschland). Diese Form sicherte, dass der Unterschenkel nicht verrutscht. Zudem konnte so die Energie besser auf das Muskelgewebe übertragen werden. Die Kraftübertragung des zylinderförmigen Metallstempels auf den Hinterlauf erfolgte an einer definierten Stelle des lateralen, linken Unterschenkels. In der Vorbereitung hat der maximal ausgezogene Stempel knapp Hautkontakt mit dem zu traumatisierenden Gebiet. Die erforderliche Eindringtiefe von 11 mm konnte durch das nachfolgende Einstellen des zurückgeschobenen Metallbolzens anhand eines einfachen Schraubmechanismus erzielt werden, der Stempeldurchmesser betrug 10 mm. Die

Anprallgeschwindigkeit lag definitionsgemäß bei 7m/s, der Metallbolzen wurde nach einer Anschlagdauer von 100 msec automatisch zurückgezogen. In Abbildung 9 ist die entsprechende Apparatur zur Induktion eines Weichteilschadens dargestellt. Die Weichteilkontusion erfolgte ohne Ausbildung eines Kompartmentsyndroms oder einer Fraktur, welche im Anschluss an die Induktion des Traumas stets manuell ausgeschlossen worden ist. Abschließend wurde das jeweilige Versuchstier aus der Apparatur herausgelöst und zum Erwachen aus der Narkose zurück in den Käfig gebracht.

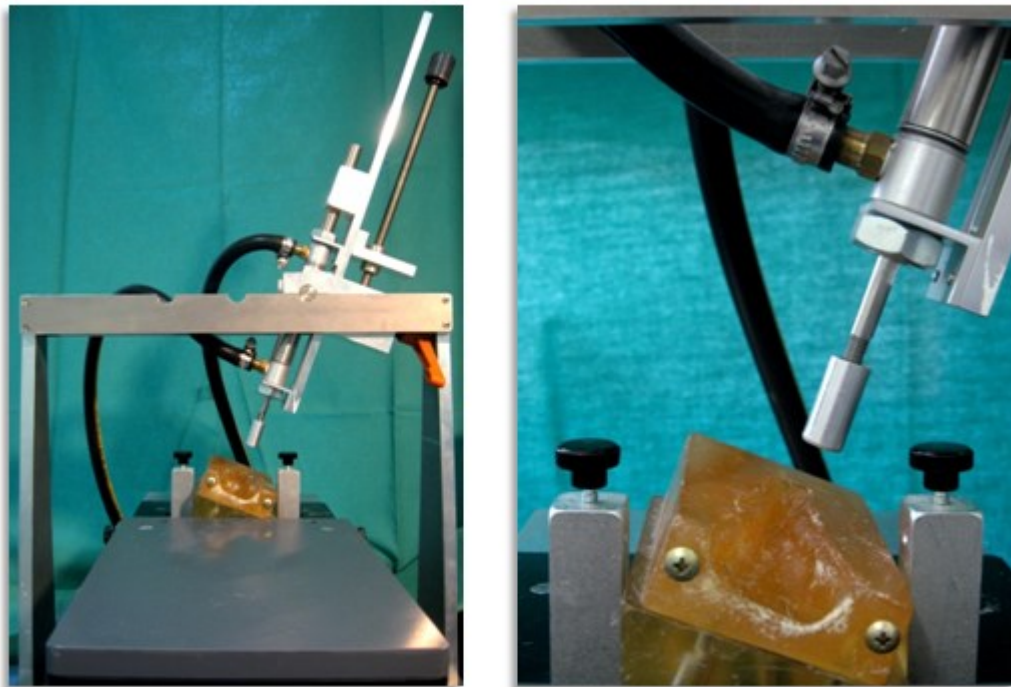


Abbildung 9: Druckluftbetriebene Apparatur zur Traumainduktion

3.4 Präparation des *Musculus extensor digitorum longus*

Bevor die intravitalmikroskopischen Untersuchungen an der Skelettmuskulatur der Ratte durchgeführt wurden, wurde zunächst der *Musculus extensor digitorum longus* des traumatisierten, linken Hinterlaufs dargestellt. Die mikrochirurgische Präparationstechnik ist erstmals durch Tyml und Budreau beschrieben worden. Die Arbeitsgruppe Schaser et al. hat diese Technik wiederum abgewandelt, um die mikroskopischen Methoden *in vivo* effizienter nutzen zu können (Tyml und Budreau 1991; Schaser et al. 1999).

Auf einer Heizplatte gelagert ist der linke Hinterlauf der Ratte fixiert worden, um problemlos die benannte, ipsilaterale Muskulatur präparieren und schließlich darstellen zu können. Dazu erfolgte zunächst die Inzision der oberhalb des *Musculus extensor digitorum* liegenden,

enthaarten Haut über eine Länge von knapp 2,5 cm. Der zu untersuchende Muskel konnte dann zwischen benachbarter Beuge- und Streckmuskulatur, die jeweils durch einen Haltefaden aus Prolene (5-0) retrahiert worden ist, dargestellt werden (siehe Abbildung 10).

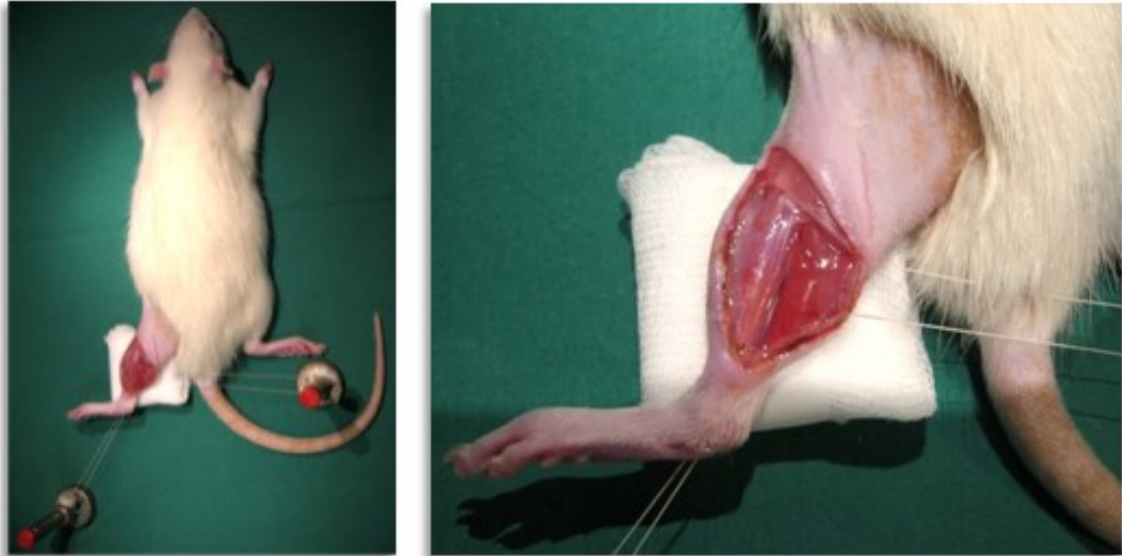


Abbildung 10: Lagerung des Versuchstieres und mikrochirurgische Präparation der Muskulatur

Das Präparationsgebiet wurde immer wieder mit physiologischer Natriumchloridlösung (Braun, Melsungen, Deutschland) befeuchtet. Die Temperatur der Lösung betrug 37°C und bewahrte das freigelegte Muskelgewebe vor dem Austrocknen. Sowohl die benannte, auf 37°C erwärmte Heizplatte, als auch die verwendete NaCl-Lösung dienten der Aufrechterhaltung einer konstanten Körpertemperatur der Versuchstiere über die Dauer jeden Experimentes. Nachdem der *Musculus extensor digitorum longus* sorgfältig vorbereitet wurde, wurde ein Deckglas auf das zu untersuchende Gewebe gelegt, welches wiederum dem Schutz vor Dehydratation der Muskulatur und vor Interferenz durch die Raumluft während der nachfolgenden mikroskopischen Untersuchungen diente. Die Intravitalmikroskopie wurde im Anschluss an eine zwanzigminütige Stabilisierungsphase durchgeführt.

3.5 Makrohämodynamisches Monitoring

Über die Dauer der Muskelpräparation und der Intravitalmikroskopie sind kontinuierlich makrohämodynamische Parameter aufgezeichnet worden. Zu diesem Zweck wurde ein Katheter (PE-50; Portex, Hythe, Kent, UK) mit einem Innendurchmesser von 0,4 mm und einem Außendurchmesser von 0,8 mm in die rechte *Arteria carotis* eingelegt und befestigt. Das zentrale hämodynamische Monitoring umfasste die Aufzeichnung von Blutdruck und

Pulsfrequenz (Sirecust; Siemens, Deutschland). Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) sollte sich im Bereich von 120-140 mmHg und die Herzfrequenz (HF) zwischen 400 und 450 Schlägen/min liegen. Wurden diese Kriterien nicht erfüllt, erfolgte der Ausschluss der Tiere. Zur Kreislaufstabilisierung erhielten alle Versuchstiere nach Bedarf Natriumchloridlösung in physiologischer Konzentration über den Carotiskatheter. Zudem diente der arterielle Katheter am Ende jedes einzelnen Experimentes der Gewinnung von Blutproben.

Parallel zur Anlage des Carotiskatheters wurde ein Katheter in die linke *Vena jugularis* gelegt und fixiert, um später die Fluoreszenzfarbstoffe für die Intravitalmikroskopie zu injizieren.

3.6 Mikrozirkulationsmodell: Mikrohämodynamisches Monitoring mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie

Zur *In-vivo*-Analyse der Mikrozirkulation in der Skelettmuskulatur ist eine Auflichtilluminationstechnik verwendet worden. Dazu wurde ein Mikroskop der Firma Nikon (E600-FN, Nikon, Tokio, Japan), welches mit einer Quecksilberdampf-Lampe (HBO 100W OFR, Osram, Augsburg) als Lichtquelle und mit blauen (Exzitation 465-495nm; Emission >505nm), grünen (510-560nm; >575nm) und ultravioletten (340-380nm; >400nm) Filtersätzen zur Belichtung ausgestattet war, genutzt. Diese hochauflösende Mikroskopiertechnik erlaubt die Visualisierung kleinster Gefäße der traumatisierten Skelettmuskulatur. Die verschiedenen Filter ermöglichten zusätzlich die Messung der Gewebsoxygenierung sowie - unter Nutzung von Fluoreszenzfarbstoffen - die Differenzierung und Quantifizierung verschiedener mikrozirkulatorischer Parameter und zellulärer Blutbestandteile.

Durch den Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffe Fluoreszein-Isotiozyanat-Dextran (FITC-Dextran) (Sigma, Deisenhofen, Deutschland), Rhodamin 6G (Sigma, Deisenhofen) und Bisbenzimid (Sigma, Deisenhofen) konnten einzelne Blutbestandteile, wie Plasma und Leukozyten, sowie apoptotische Muskelzellen differenziert werden. Zudem ermöglichte die Anwendung der Farbstoffe die Bestimmung der Geschwindigkeit des Blutflusses und des Gefäßdurchmessers. Alle genannten Farbstoffe wurden intravenös, in zeitlich festgelegter Reihenfolge, appliziert.



Abbildung 11: Intravitalmikroskopische Untersuchung

Zunächst wurde 2%-iges FITC-Dextran (MW 150 kDa) in einer Konzentration von 15mg/kg Körpergewicht verabreicht, das zur Kontrastierung des Gefäßnetzes durch Markierung des Blutplasmas diente. FITC-Dextran zeichnet sich durch ein Exzitationsmaximum zwischen 465-495 nm und ein Emissionsmaximum bei > 505 nm aus. Die Metabolisierung erfolgt durch Leber und Nieren.

Danach erfolgte die intravenöse Applikation von 0,2%-igem Rhodamin 6G. Rhodamin 6G dient *in vivo* der spezifischen Darstellung von Leukozyten, wobei der Farbstoff an das leukozytäre Cytochrom C bindet. Die Färbung mit Rhodamin 6G ermöglicht die Beurteilung der leukozytären Fließdynamik und Interaktion mit dem Endothel postkapillarer Venolen im traumatisierten Gewebe. Dieser Farbstoff kennzeichnet sich durch ein Exzitationsmaximum um 535 nm, das Emissionsmaximum liegt bei >575 nm. Rhodamin 6G wurde in einer Konzentration von 0,15 mg/kg KG verabreicht.

In dem letzten intravitalmikroskopischen Untersuchungsschritt wurde zusätzlich Bisbenzimid (2 μ mol/kg KG) appliziert. Dieser Farbstoff dient unter Verwendung des DAPI-Filters der Analyse apoptotischer Muskelzellkerne und zeichnet sich durch ein Exzitationsmaximum von 340-380 nm und ein Emissionsmaximum von > 400nm aus. Durch diese spezielle Färbung können anhand der Kondensation und Fragmentation des nukleären Chromatins apoptotische Zellen dargestellt werden (Gradl et al. 2004).

Die Versuchstiere wurden während der gesamten mikroskopischen Untersuchung auf der Heizplatte gelagert. Die linke hintere Extremität blieb nach geringfügiger Korrektur ähnlich fixiert gelagert wie schon bei der Muskelpräparation (siehe Abbildung 11). Die Geweboberfläche des *Musculus extensor digitorum longus* ist daraufhin systematisch von proximal nach distal folgend mikroskopiert worden. Um die Mikrozirkulation, wie in der Arbeit von Schaser et al. beschrieben, zuverlässig beurteilen zu können, wurden in jedem Untersuchungsschritt mikroskopische Bilder aus mind. 10 unterschiedlichen Gesichtsfeldern (GF) der Muskulatur bzw. mind. 5 verschiedene Venolen betrachtet und aufgenommen (Schaser et al. 1999).

Durch den Gebrauch von Wasserimmersionsobjektiven (x20/0,75W; x40/0,80W, Nikon) konnte eine Vergrößerung von 306x und 630x erzielt werden. Die Bildaufnahme erfolgte durch eine hochempfindliche CCD-(*charge-coupled-device*)-Videokamera (FK 6990-IQ-S, Pieper, Schwerte, Deutschland) und die Datenspeicherung mittels S-VHS-Videosystem auf Videokassetten. Dadurch konnte die Bildauswertung im Anschluss an die Präparation und Mikroskopie der Skelettmuskulatur zeitlich und räumlich getrennt als sog. *Offline*-Analyse an einem speziellen Computerarbeitsplatz erfolgen. Jener Computer ist mit dem Programm *CapImage* (CapImage v7.4, Zeintl, Heidelberg, Deutschland) ausgestattet, welches als Standardprogramm in der Bildanalyse der Mikrozirkulation gilt und u.a. die Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität, der funktionellen Kapillardichte, sowie des leukozytären Fließverhaltens zulässt. Die zu untersuchenden Bilder wurden dabei von einem Videorekorder eingelesen.

Im folgenden Abschnitt wird die Bedeutung der oben beschriebenen mikrozirkulatorischen Parameter für die Studie erläutert.

3.6.1 Gewebeoxygenierung

Initial ist ohne Farbstoffapplikation die Gewebeoxygenierung und somit Sauerstoffversorgung durch die Messung von reduziertem NADH beurteilt worden. Bei einer 20-fachen Vergrößerung und unter Anwendung des sog. DAPI-Filters sind 10 GF über eine Dauer von 10 Sekunden aufgenommen worden.

Nach ultravioletter Epi-Illumination über zwei Sekunden wurde die NADH-Autofluoreszenz des Skelettmuskelgewebes densitometrisch anhand der Analyse einzelner Graustufen bestimmt. Um den Einfluss mikrovaskulärer Strukturen auf den zu ermittelnden Parameter

zu vermeiden, beschränkte sich die nachfolgende Graustufenbestimmung mit *CapImage* ausschließlich auf den Interkapillarraum (Vollmar et al. 1997).

3.6.2 Gefäßdurchmesser und Blutzellgeschwindigkeit

Der Gefäßdurchmesser und die Blutzellgeschwindigkeit sind im selben Untersuchungsschritt aufgezeichnet und später in der *Offline*-Analyse bestimmt worden. Im Anschluss an die Permeabilitätsaufnahmen wurde mit Hilfe des Blau-Filters, welcher das zu untersuchende Gebiet blau belichtet, und nach Gabe von 0,1 - 0,2 ml des 2%-igen Fluoreszenzfarbstoffes FITC-Dextran der Durchmesser von mind. 5 exemplarischen, postkapillaren Venolen an jeweils mehreren Stellen des Gefäßes gemessen. FITC-Dextran dient als intravaskulärer Fluoreszenzfarbstoff der Darstellung der Gefäßgrenzen. Zur Bestimmung der zugehörigen Blutzellgeschwindigkeit wurden zusätzlich Aufnahmen dieser Venolen über mind. 10 sec gemacht. Eine gezielte Auswertung erfolgte mit dem bereits genannten Programm *CapImage*. Die Geschwindigkeit der Blutzellen wurde in der Mittellinie der Venolen gemessen und mittels der sog. *Line-shift*-Methode (CapImage, Fa. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) bestimmt. In Abhängigkeit von der Farbstoffkonzentration innerhalb des Plasmarumes und dort unterschiedlich schnell zirkulierender Blutkörperchen ergeben sich Linien unterschiedlicher Helligkeit. Die mittlere Blutflussgeschwindigkeit kann daraufhin anhand der Steigung mehrerer bewerteter Linien errechnet werden.

3.6.3 Gefäßpermeabilität

Die Einschätzung der endothelialen Gefäßschädigung im traumatisierten Weichteilgewebe mit nachfolgendem '*capillary leakage*' erfolgte wiederum durch den Einsatz des hochmolekularen FITC-Dextran, das aufgrund des hohen Molekulargewichtes unter physiologischen Bedingungen nicht aus dem Intravasalraum in das umgebende Muskelgewebe wandert. Dadurch konnte die Gefäßpermeabilität anhand des Grades der Extravasation beurteilt werden. Es sind dazu Fluoreszenzintensitäten des Extravasal- und des Intravasalraumes in der *Offline*-Analyse bestimmt worden, aus denen sich anhand des Quotienten $Q = I_a/I_i$ die makromolekulare Permeabilität errechnen lässt. I_a entspricht demzufolge der Intensität außerhalb und I_i der Fluoreszenzintensität innerhalb des Gefäßraumes.

3.6.4 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Danach erfolgte unter Nutzung des grün-illuminierenden G2A-Filters und der Gabe von 0,3 - 0,5 ml 0,2%-igen Rhodamin 6G die intravitalmikroskopische Aufzeichnung der Interaktion von Leukozyten mit der Gefäßwand. Hierzu wurde das Strömungsverhalten der Leukozyten in fließend, rollend oder adhärent unterschieden, wie in Abbildung 12 dargestellt. Rollende Leukozyten wurden definitionsgemäß beschrieben als sich an der Gefäßwand entlang bewegend mit einer Geschwindigkeit von weniger als 40% jener Leukozyten, die sich im Zentralstrom postkapillaren Gefäßes bewegten. Fest sitzende Leukozyten wurden wiederum als über den Beobachtungszeitraum von 20 sec hinweg an der Venolenwand haftende, sich nicht bewegende Zellen definiert.

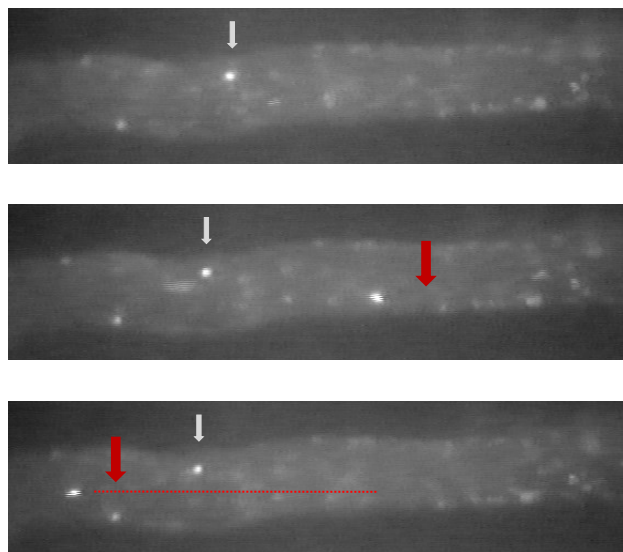


Abbildung 12: Fest an der Venolenwand haftende (weißer Pfeil) und sich frei im Gefäß bewegende (roter Pfeil) Leukozyten nach Applikation von Rhodamin 6G während der Intravitalmikroskopie (Richtung des Blutstroms von rechts nach links)

Es sind dazu die im oben beschriebenen zweiten Untersuchungsschritt betrachteten 5 venösen Gefäße über 30 sec beobachtet und bei 20-facher Vergrößerung auf das Videoband aufgenommen worden.

Innerhalb eines möglichst geraden Venolenabschnittes, dessen Länge zwischen 100-200 μm lag und die vermessen wurde, wurden in mehreren Schritten die einzelnen Rhodamin-6G-gefärbten Leukozyten nach ihrer Fließeigenschaft beurteilt, quantifiziert und dokumentiert. Der Betrachtungszeitraum war dabei immer derselbe. Die Anzahl fest adhärenter Leukozyten pro mm^2 Endothelzelloberfläche wurde anhand der Anzahl der sich über den Zeitraum nicht

bewegenden Leukozyten, der Länge des betrachteten Gefäßabschnittes und dem Venolendurchmesser errechnet.

Die Auswahl geeigneter postkapillarer Venolen fand unter Epi-Illumination durch den FITC-Filter statt, so dass in diesem Schritt keine Entzündungszellen und deren Strömungsverhalten sichtbar gemacht worden sind. Erst im Folgeschritt wurde mit dem grün-belichtenden G2A-Filter die Entzündungsreaktion anhand zirkulierender Leukozyten beurteilt und dokumentiert. Ein Bias bezüglich der Auswahl an Venolen und des Auftretens ausgeprägter Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen konnten so minimiert werden (Gierer et al. 2008).

3.6.5 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte, definiert als die Gesamtlänge der pro Gesichtsfeld von Erythrozyten durchflossenen Kapillaren und angegeben in Gefäßlänge pro Fläche des GF (cm/cm^2), ist bei 40-facher Vergrößerung mit Hilfe des FITC-Filters beurteilt worden.

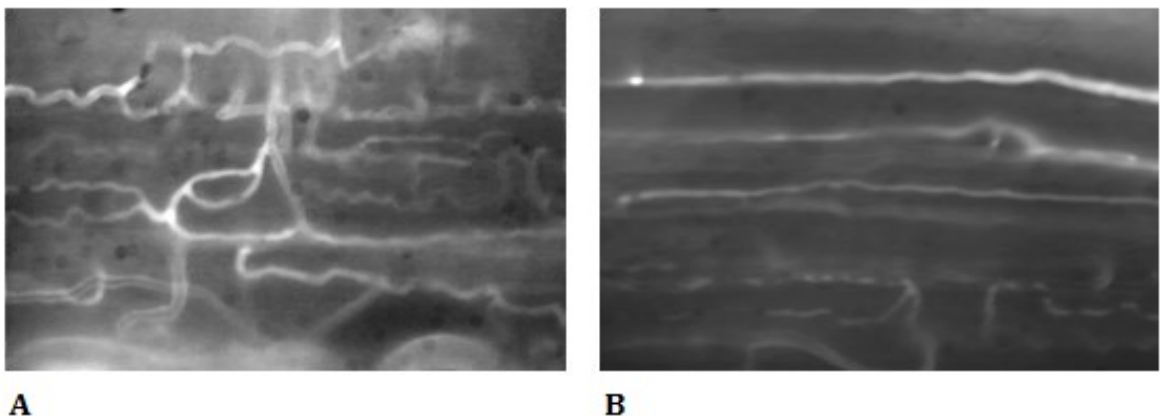


Abbildung 13: Repräsentative Darstellung der funktionellen Kapillardichte nach intravitalmikroskopischer Untersuchung bei einem Kontrolltier (A) und einem Versuchstier der 'Trauma'-Gruppe (B). Sichtbar ist die deutliche Einschränkung der Kapillardichte nach Trauma.

Dabei sind mind. 10 GF des Muskelgewebes langsam von oberflächlichen Schichten in tiefer liegende durchfokussiert worden. Mittels *CapImage* konnten nach der Aufzeichnung perfundierter, muskulärer Kapillaren zur Quantifizierung der funktionellen Dichte alle zum Zeitpunkt der Intravitalmikroskopie durchbluteten Kapillargefäße pro GF genau markiert werden. In der Abbildung 13 ist die funktionelle Kapillardichte bei einem Kontrolltier und bei einem Versuchstier nach Traumainduktion dargestellt, wobei eine deutlich eingeschränkte Kapillardichte nach Trauma sichtbar ist.

3.6.6 Apoptose

Neben der mikrohäodynamischen Analyse ermöglichte die Intravitalmikroskopie auch die Beurteilung des traumabedingten Zelltodes der Muskelzellen. Ebenfalls in 40-facher Vergrößerung wurde dazu im letzten Mikroskopierschritt, unter Applikation von 0,2 - 0,5 ml Bisbenzimid und Verwendung des DAPI-Filters, die Anzahl apoptotischer Muskelzellkerne pro GF bestimmt. Zehn Gesichtsfelder dienten als Grundlage und sind von der Oberfläche in die Tiefe durchfokussiert worden.

Als positive Kriterien bei der Bestimmung apoptotischer Zellen wurden eine deutliche Kernkondensation, aber auch Fragmentation und halbmondähnliche Formation des Kernchromatins benannt (Gradl et al. 2004; Gradl et al. 2005).

3.7 Hämatologische Untersuchungen

Neben den makro- und mikrohäodynamischen Untersuchungen wurden auch zahlreiche hämatologische Laboranalysen durchgeführt. Das Blutbild jeden Versuchstieres wurde durch einen Coulter Counter (AcTdiff, Coulter, Hamburg, Deutschland) untersucht. Ebenso erfolgte eine Blutgasanalyse (Rapidlab 348, Bayer Vital, Fernwald, Deutschland), sowie die Bestimmung der Elektrolytkonzentration und die Analyse des Gerinnungsstatus anhand von Quick- und pTT-Wert aus Citrat-Plasma. So lieferten neben den intravitalmikroskopischen und den abschließenden histologischen Methoden auch diese Blutuntersuchungen Ergebnisse, die den Einfluss von Ebselen auf die systemische Entzündungsreaktion beim geschlossenen Weichteiltrauma charakterisierten.

Für alle oben benannten Laboranalysen wurde arterielles Blut aus dem *A. carotis*-Katheter in EDTA- und Citrat-Röhrchen oder aber eine Glaskapillare entnommen. Die Entnahme erfolgte planmäßig zwischen abgeschlossener Muskelpräparation und nachfolgender Intravitalmikroskopie. Nach Gewinnung der Blutproben wurde eine Stabilisierungsphase über 20 Minuten gewährleistet.

3.8 Bestimmung des Feucht-/Trockengewichtes

Zur Beurteilung des posttraumatischen Gewebsödems wurde im Anschluss an die Intravitalmikroskopie anatomisch identisches Muskelgewebe des verletzten linken als auch

des nicht-traumatisierten rechten Hinterlaufes der Labortiere entnommen. Dazu diente der *Musculus tibialis anterior*.

Das frisch gewonnene Gewebe wurde gewogen, auf Aluminiumfolie gelagert und entsprechend gekennzeichnet. Das gemessene Gewicht wurde dokumentiert. Die Trocknung erfolgte bei 60°C über 72 Stunden, anschließend wurden die Proben ein zweites Mal gewogen. Zur Bestimmung des Ausmaßes der Ödembildung wurde dann die Differenz zwischen Feucht- und Trockengewicht des traumatisierten Gewebes gebildet und jeweils mit der Differenz zwischen Feucht- und Trockengewicht des zugehörigen Gewebes des kontralateralen Hinterlaufes verglichen.

3.9 Histologische Untersuchungen

In Folge der abgeschlossenen Intravitalmikroskopie wurde zusätzlich jeweils Gewebe des traumatisierten, linken *M. extensor digitorum longus* eines jeden Versuchstieres asserviert, für 2-3 Tage in Formalin konserviert und im Anschluss in Paraffin eingebettet. Später wurden aus den Paraffinblöcken 4 µm dünne Gewebsschnitte angefertigt und mittels HE- bzw. TUNEL-Färbung aufgearbeitet. Durch die HE-gefärbten Schnitte konnte ein grober Überblick des geschädigten Skelettmuskels gewonnen werden, während die TUNEL-Färbung (ApopTag, Chemicon International, Temecula, Kalifornien, USA) eine Apoptose-spezifische Färbemethode darstellt. Die Quantifizierung apoptotisch veränderter, speziell markierter Zellen erfolgte lichtmikroskopisch durch einfache Auszählung in je 50 konsekutiven Gesichtsfeldern bei einer 400-fachen Vergrößerung.

3.10 Statistische Auswertung

Im Anschluss an die Experimente wurden die erhobenen Daten der Videokassetten im Rahmen der sog. *Offline*-Analyse auf Auswertungsbögen erfasst. Zur elektronischen Datenverarbeitung wurden jene Daten dann im Tabellenkalkulationsprogramm *Excel* (Microsoft Corporation, Unterschleißheim, Deutschland) systematisch eingegeben und aufgearbeitet. Der statistischen Analyse und folgender graphischer Darstellung der Ergebnisse dienen die Programme *SigmaStat* und *SigmaPlot* (Jandel Corporation, San Rafael, Kalifornien, USA).

Der Vergleich aller experimentellen Gruppen miteinander erfolgte anhand der ANOVA-(*one way analysis of variance*)-Analyse mit anschließendem t-Test nach Bonferroni (*SigmaStat*,

Jandel, San Rafael, Kalifornien, USA). Alle ermittelten Untersuchungsergebnisse wurden als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Statistische Signifikanz wurde Ergebnissen ab einem p-Wert von $<0,05$ erteilt.

4 Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll

4.1 Versuchsgruppen

Im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie wurden vier Versuchsgruppen mit je 7 Versuchstieren definiert und bearbeitet. Insgesamt wurden die Ergebnisse von 28 *Sprague-Dawley*-Ratten verwertet. Dabei sind die Tiere der Kontrollgruppe (*'Kontrolle'*) nicht traumatisiert worden und - statt mit Ebselen (Sigma, Taufkirchen, Deutschland) - lediglich mit der Trägersubstanz DMSO behandelt worden. Diese Gruppe dient demzufolge als sog. *time-matched* Kontrollgruppe. Parallel dazu gab es eine zweite Gruppe an Tieren, die keinem Weichteiltrauma unterzogen wurden, denen jedoch Ebselen (30mg/kg KG) intraperitoneal appliziert wurde. Diese Gruppe wird im Folgenden *'Ebselen'* genannt.

Schließlich sind zwei zusätzliche Gruppen an Versuchstieren dem beschriebenen Weichteiltrauma ausgesetzt worden, wobei wiederum eine Versuchsgruppe die Trägersubstanz DMSO und die andere in DMSO gelöstes Ebselen erhalten hat. Beide Gruppen werden in dieser Arbeit je nach applizierter Substanz als *'Trauma'*- bzw. *'Therapie'*-Gruppe bezeichnet.

Alle benannten Gruppen und die jeweilige Vorgehensweise sind in der nachfolgenden Abbildung 14 nochmal schematisch dargestellt:

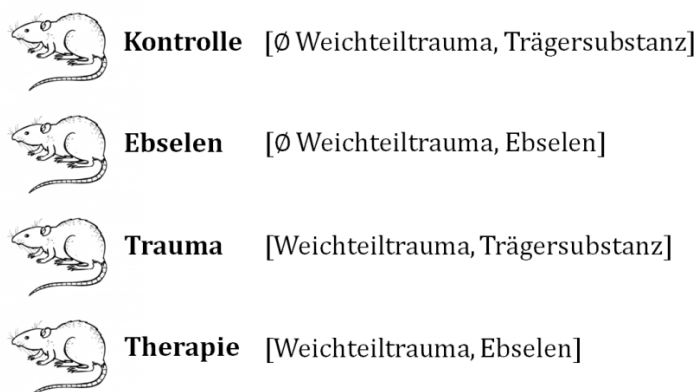


Abbildung 14: Schematische Darstellung der experimentellen Gruppen

4.2 Vorbehandlung der Versuchstiere

Zunächst wurden die *Sprague-Dawley*-Ratten mit 6%-iger Pentobarbitallösung (55mg/kg KG i.p.; Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) intraperitoneal anästhetisiert. So

konnte eine sorgfältige Enthaarung des linken Hinterlaufs und des Halses durch Rasur und anschließende Behandlung mit Enthaarungscreme gewährleistet werden. Die Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte durch intraperitoneale Gabe von 3%-igem Pentobarbital.

Die Versuchstiere wurden zu Beginn des zweiten Versuchsabschnittes tracheotomiert und während der gesamten Untersuchungsdauer bei der Muskelpräparation und -mikroskopie mechanisch beatmet (Tidalvolumen 1ml/100g KG; 50 Atemzüge/min). Zielparameter der adäquaten Ventilation waren ein $p_aO_2 > 100$ mmHg und ein p_aCO_2 von ~ 35 mmHg.

4.3 Versuchsaufbau der Traumainduktion

Anhand des Zeitstrahls soll der zentrale Versuchsaufbau der Traumainduktion verdeutlicht werden (siehe Abbildung 15).

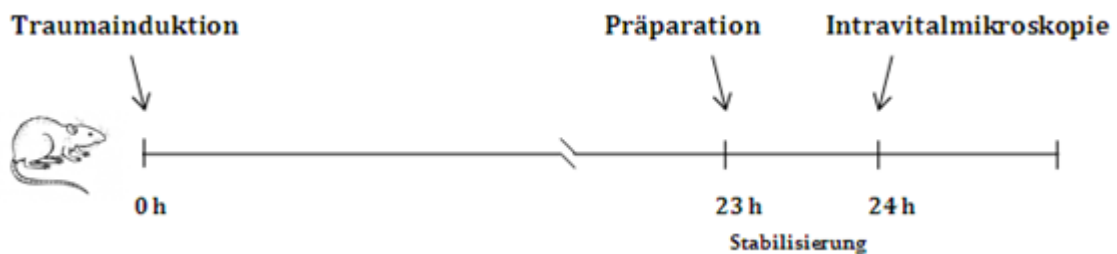


Abbildung 15: Zeitliche Darstellung des Versuchsaufbaus. Nach entsprechender Vorbehandlung ist zum Zeitpunkt $t = 0$ das Weichteiltrauma induziert worden, 24 h später erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung.

Zum Zeitpunkt '0h' wurde jeweils das Weichteiltrauma an den narkotisierten Versuchstieren in bereits beschriebener Weise durchgeführt. Direkt im Anschluss wurde je nach Gruppenzugehörigkeit DMSO oder Ebselen intraperitoneal injiziert. Die Versuchstiere wurden danach zum Erwachen zurück in ihre Käfige gebracht, wo die Ratten bis zum Beginn des zweiten Versuchsabschnittes 23 h später freien Zugang zu Futter und Wasser hatten. Ab dem Zeitpunkt der Traumainduktion bzw. Substratapplikation wurden die Tiere einzeln oder max. zu zweit in den Käfigen gehalten.

Nach Abschluss des jeweiligen Versuchs wurde das Tier durch eine Überdosis des verwendeten Narkotikums euthanasiert.

4.4 Analyse 24h nach Traumainduktion

Zum Zeitpunkt '23h' wurden die Versuchstiere erneut in beschriebener Weise mit Pentobarbital anästhetisiert und tracheotomiert. Dann erfolgte die mikrochirurgische Präparation des *M. extensor digitorum longus* an den auf einer Heizplatte gelagerten Tieren. Bevor die mikroskopischen Untersuchungen durchgeführt wurden, sind makrohämodynamische Parameter, wie MAP und HF, kontrolliert und Blutproben zur Bestimmung des Hämatokrit (45- 50%), des p_aO_2 (> 100 mmHg) bzw. p_aCO_2 (35-40 mmHg) und des pH-Wertes (7,35- 7,45) entnommen worden. Im Anschluss an eine 20-minütige Erholungsphase, die insbesondere der Kreislaufstabilisierung diene, konnte schließlich 24h nach der Traumainduktion die hochauflösende Intravitalmikroskopie durchgeführt werden.

5 Ergebnisse

5.1 Blutbild und Gerinnungsparameter

Bezüglich des Blutbildes zeigten sich in allen vier experimentellen Gruppen keine signifikanten Unterschiede, d.h. die Hämoglobinkonzentration, der Hämatokrit, sowie die Erythrozyten- und Thrombozytenzahl der einzelnen Tiere lagen – unabhängig vom Einsatz von Ebselen – im Rahmen physiologischer Normwerte (siehe Tabelle 3).

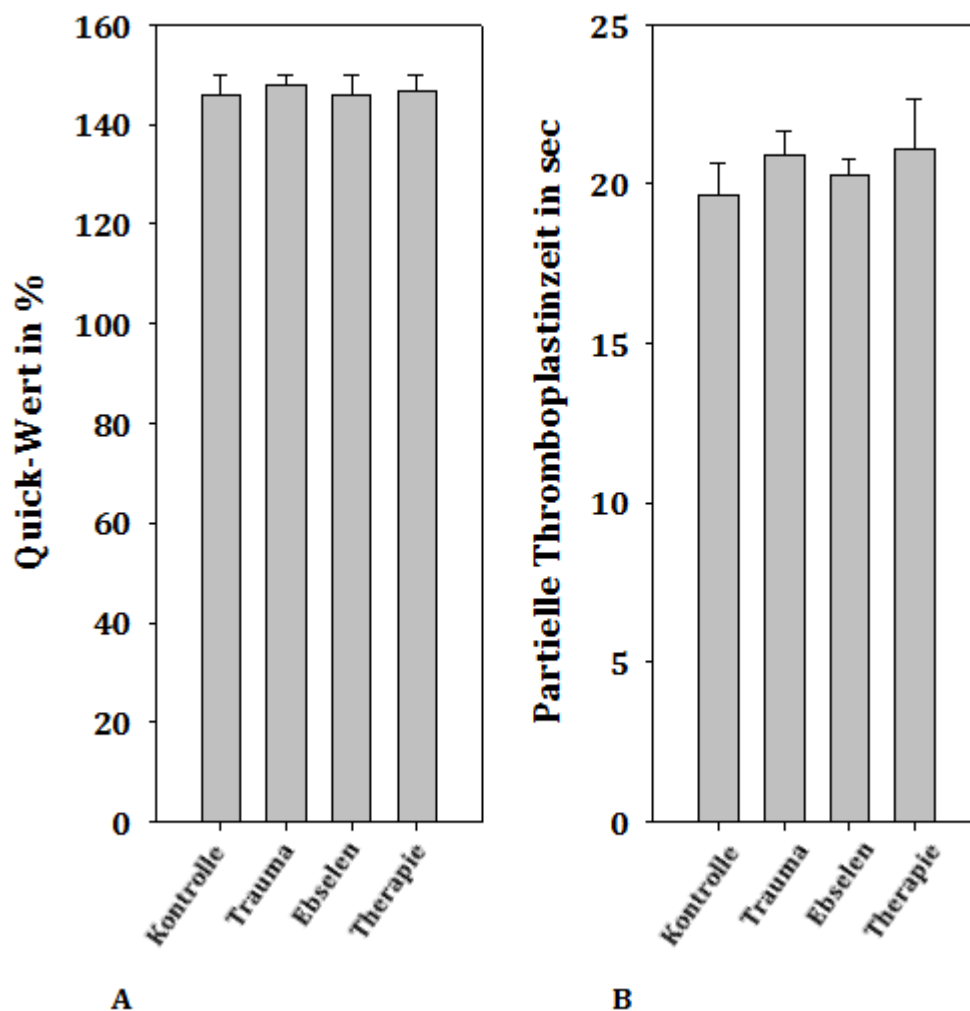


Abbildung 16: Darstellung der Gerinnungsparameter Quick-Wert (A) und pTT (B). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. One-way-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich.

Vergleichbar zu den hämatologischen Parametern zeigten die Elektrolytkonzentrationen und auch die Gerinnungsparameter, wie in Abbildung 16 dargestellt, Thromboplastinzeit und die partielle Thromboplastinzeit aller Versuchstiergruppen annähernd physiologische Werte. Die systemische Leukozytenzahl als Maß der Entzündungsreaktion war jedoch in der Versuchsgruppe 'Trauma' signifikant vermindert (siehe Kapitel 5.6).

	Kontrolle	Trauma	Ebselen	Therapie
Hämoglobin (mmol/l)	8,9 ± 0,2	8,5 ± 0,6	8,7 ± 0,2	8,5 ± 0,4
Hämatokrit (%)	43,5 ± 0,8	43,0 ± 2,6	41,4 ± 1,3	42,1 ± 1,9
Thrombozyten (10⁹/l)	548 ± 80	815 ± 107	620 ± 39	701 ± 128
Na⁺ (mmol/l)	135 ± 1	135 ± 1	136 ± 1	138 ± 1
K⁺ (mmol/l)	4,0 ± 0,1	3,9 ± 0,2	4,2 ± 0,1	4,6 ± 0,4

Tabelle 3: Darstellung der einzelnen Blutbildparameter. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

5.2 Hämodynamik

Die Messungen des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz (HF) im zweiten Teil der Versuchsreihe ergaben keine Abweichungen von den festgelegten Zielwerten (siehe Tabelle 4), sodass in der statistischen Auswertung keine signifikanten Differenzen des MAP oder der HF zwischen den Versuchsgruppen zu beobachten waren. Alle Mittelwerte lagen innerhalb der definierten Bereiche von MAP 120 – 140 mmHg und HF 400 – 450 Schläge/min.

	Kontrolle	Trauma	Ebselen	Therapie
MAP (mmHg)	125 ± 6	120 ± 8	132 ± 4	129 ± 6
HF (Schläge/min)	400 ± 13	420 ± 0	429 ± 20	429 ± 9

Tabelle 4: Darstellung der makrohämodynamischen Parameter MAP und der HF. Alle Daten sind als Mittelwert ± SEM angegeben.

5.3 Feucht-/Trockengewicht

Die Untersuchung der Wirkung von Ebselen auf die intramuskuläre Ödembildung erfolgte anhand der Messung des Feucht- und Trockengewichtes, das pro Versuchstier jeweils für Muskulatur des (traumatisierten) linken als auch des intakten rechten Hinterlaufes bestimmt worden ist. So wurde das konkrete Muskelgewicht vor und nach einer Trocknungszeit von 72 h bei einer Temperatur von 60°C bestimmt und wiederum das Verhältnis des

Ausgangsgewichtes zum Trockengewicht als Maßstab für den Wasserverlust unter definierten Bedingungen errechnet. Die Berechnung erfolgte durch die einfache Bildung des Quotienten aus Feuchtgewicht und Trockengewicht, auch bezeichnet als sog. *Wet-to-dry-weight-Ratio*, welche für die linke, traumatisierte und die rechte, intakte Extremität der einzelnen Versuchstiergruppen graphisch in Abbildung 17 dargestellt wurde.

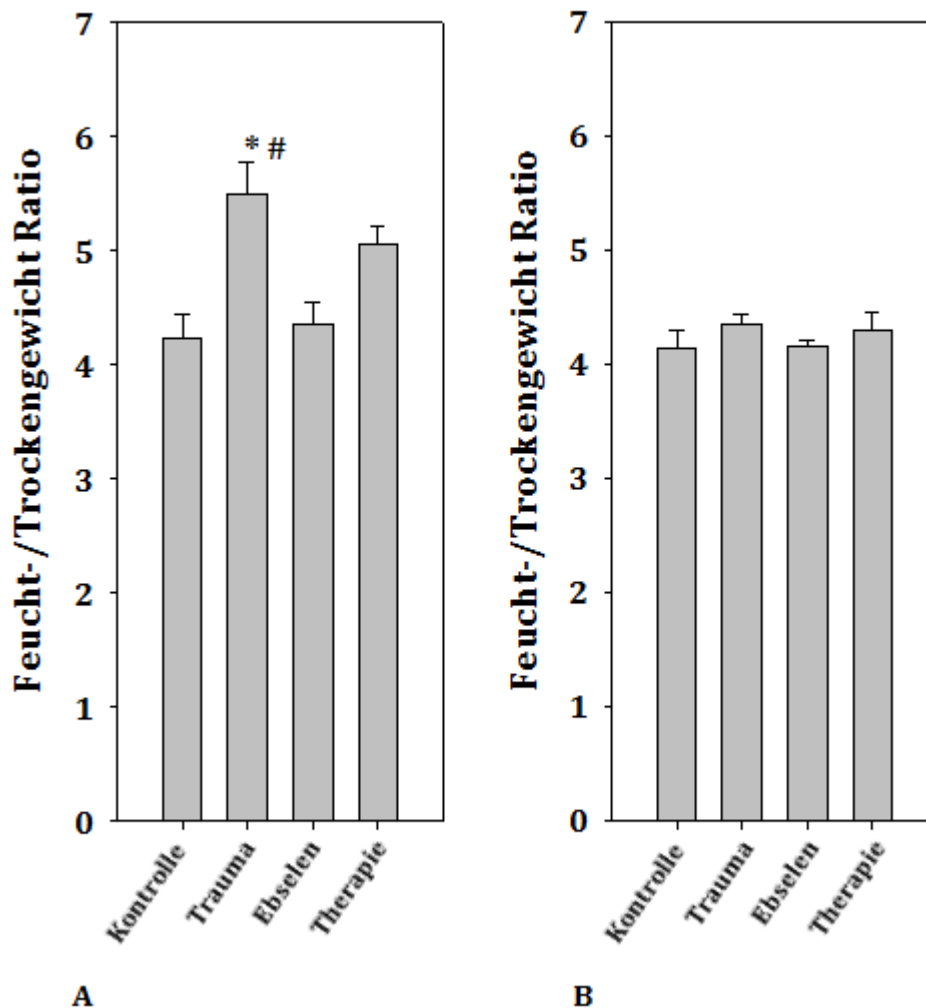


Abbildung 17: *Wet-to-dry-weight-Ratio* der linken, traumatisierten (A) und rechten, intakten (B) Extremität der Sprague-Dawley-Ratten. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. One-way-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. Ebselen.

Dieser Quotient spiegelte eine ausgeprägte Ödemausbildung innerhalb der Gruppe 'Trauma' wider, während der positive Einfluss von Ebselen in der mit 'Therapie' gekennzeichneten Versuchsgruppe deutlich wurde. Die Entstehung posttraumatischer Wassereinlagerungen in das Muskelgewebe konnte durch Ebselen deutlich reduziert werden.

5.4 Traumainduzierte Apoptose

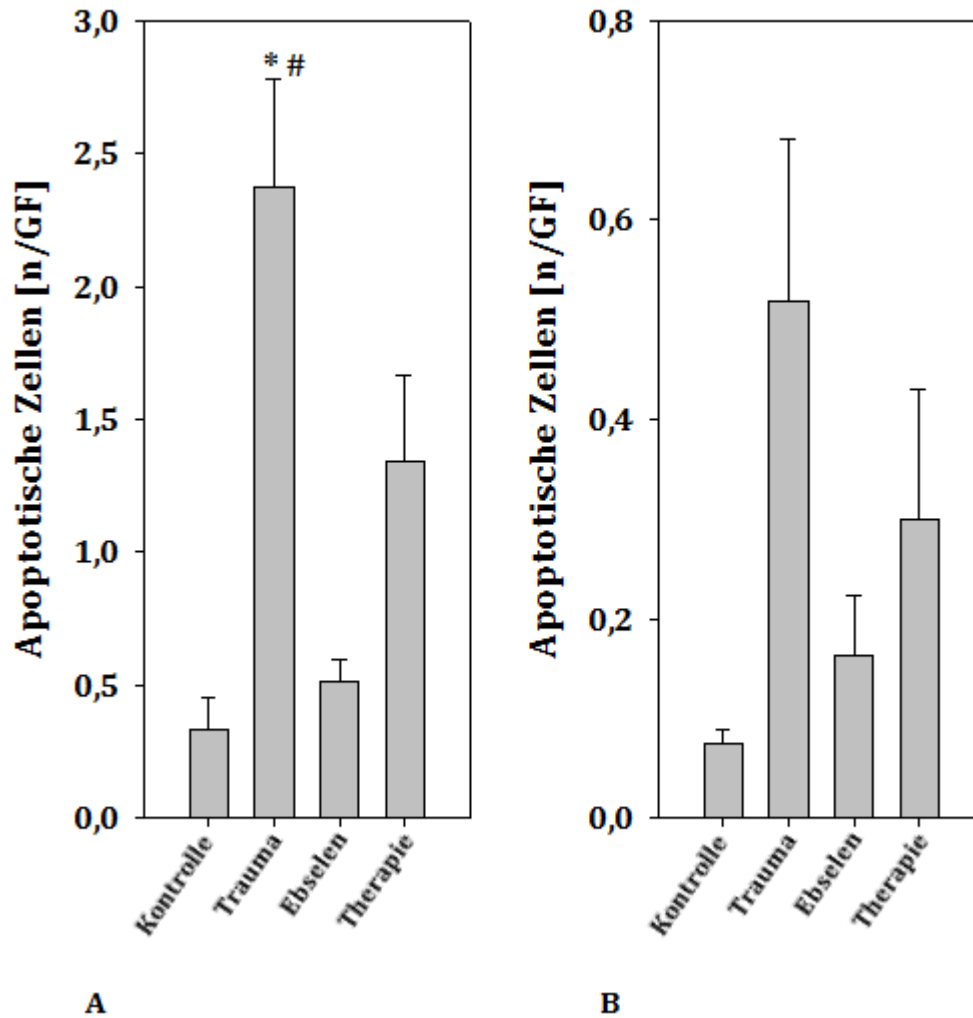


Abbildung 18: Anzahl apoptotischer Muskelzellkerne pro Gesichtsfeld nach CapImage (A) und TUNEL-Methode (B). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. One-way-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich. * $p < 0,05$ vs. Kontrolle; # $p < 0,05$ vs. Ebselen.

Die durch Trauma bedingte Zunahme apoptotischer Zellen spiegelte sich sowohl in den mikroskopischen *In-vivo*-Betrachtungen durch Bisbenzimidfärbung als auch in den histologischen Untersuchungen mittels TUNEL-Technik wider (siehe Abbildung 18). Beide Methoden zeigten unter Verwendung der antiinflammatorischen und antiapoptotischen Substanz Ebselen eine ~50%-ige Reduktion der Anzahl an Muskelzellkernen, welche Apoptosezeichen wie Chromatinkondensation, DNA-Fragmentierung und Abschnürung von Membranvesikeln (*apoptotic bodies*) aufwiesen.

5.5 Mikrozirkulation im traumatisierten Skelettmuskel der Ratte

Das geschlossene Weichteiltrauma am linken Hinterlauf der Versuchstiere verursachte eine wesentliche Beeinträchtigung der nutritiven Kapillarperfusion, welche mit einem Durchschnittswert der funktionellen Kapillardichte von $619 \pm 52 \text{ cm/cm}^2$ innerhalb der 'Trauma'-Gruppe einhergeht. Währenddessen führt die Behandlung mit Ebselen in der 'Therapie'-Gruppe zur Erhöhung der durchschnittlichen Kapillarperfusion auf physiologische Basiswerte, wie sie bei Versuchstieren der Kontrollgruppe beobachtet wurden ('Therapie' $767 \pm 64 \text{ cm/cm}^2$ vs. 'Kontrolle' $794 \pm 37 \text{ cm/cm}^2$, siehe Abbildung 19).

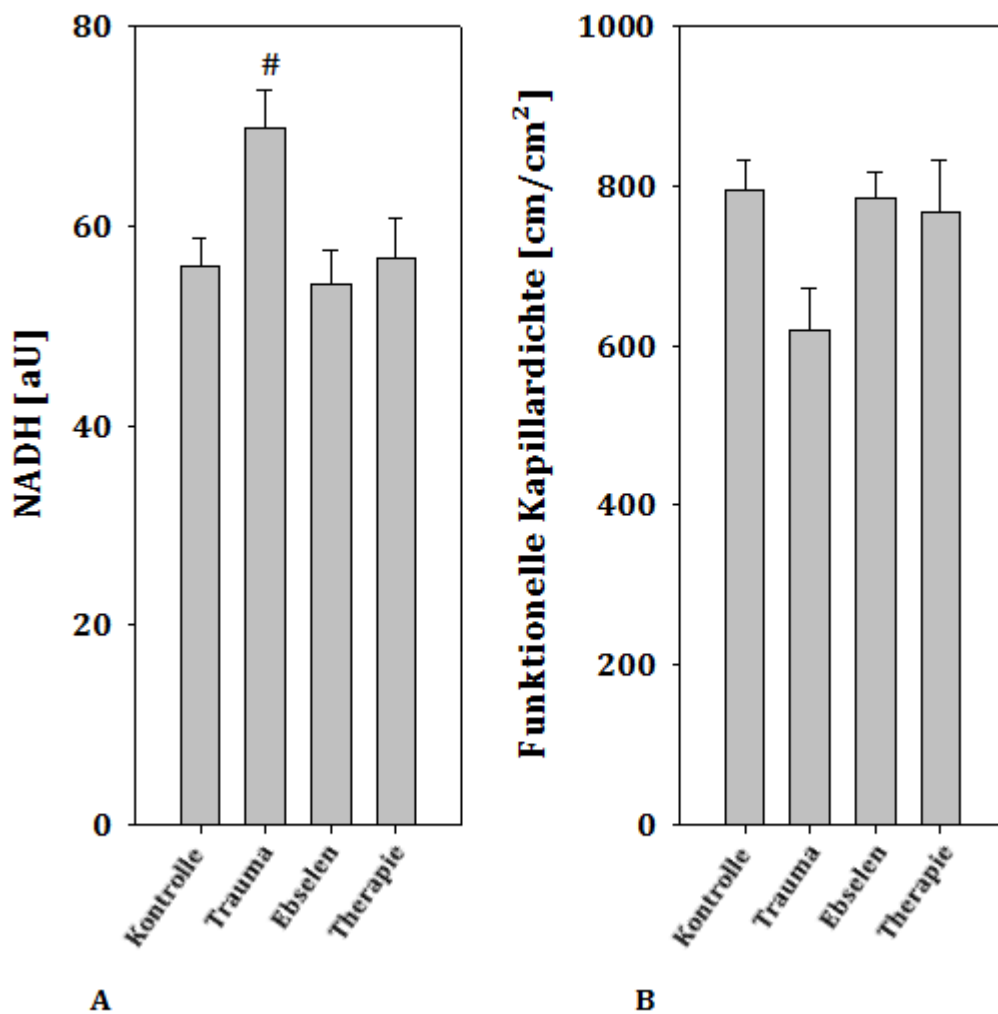


Abbildung 19: Darstellung der Mikrozirkulationsparameter NADH-Autofluoreszenz (A) und funktionelle Kapillardichte (B). Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. One-way-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich. # $p < 0,05$ vs. Ebselen.

Als Konsequenz der eingeschränkten nutritiven Kapillarperfusion zeigten sich erhöhte Werte der NADH-Autofluoreszenz im Skelettmuskelgewebe – als Nachweis der verursachten Gewebehypoxie – bei traumatisierten Versuchstieren nach alleiniger DMSO-Applikation ('Trauma' 70 ± 4 aU vs. 'Kontrolle' 56 ± 3 aU). Im Gegensatz dazu wurde in der Gruppe traumatisierter Versuchstiere unter Ebselen-Therapie eine stark reduzierte NADH-Autofluoreszenz ('Therapie' 57 ± 4 aU) beobachtet, was sich adäquat zur Gefäßperfusion derselben experimentellen Gruppe verhält. Die Autofluoreszenz-Werte in der Versuchstiergruppe 'Therapie' näherten sich deutlich den entsprechenden Werten der Kontrollgruppe.

Die Regressionsanalyse zeigte eine signifikante umgekehrte Korrelation zwischen funktioneller Kapillardichte und der NADH-Autofluoreszenz des untersuchten Skelettmuskelgewebes mit einem Regressionskoeffizienten von $r = -0.98$.

Die Blutzellgeschwindigkeit innerhalb der ausgewählten Venolen war in den experimentellen Gruppen 'Trauma' ('Trauma' 313 ± 57 mm/sec) und 'Therapie' ('Therapie' 315 ± 77 mm/sec) leicht erniedrigt, unterschied sich jedoch nicht signifikant von den nicht-traumatisierten Kontrolltieren ('Kontrolle' 511 ± 108 mm/sec).

5.6 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Reaktion von Entzündungszellen auf die Verletzung des Muskelgewebes wurde anhand der Prozentzahl sog. rollender Leukozyten und der Anzahl fest adhärenter neutrophiler Granulozyten pro mm^2 beurteilt. Intravitalmikroskopisch konnte beobachtet werden, dass sich die lokale Funktion der Leukozyten in Abhängigkeit von Traumainduktion und/oder Ebselenapplikation zwischen den einzelnen Versuchsgruppen ganz wesentlich unterscheidet. Die entsprechende Darstellung erfolgt in nachfolgender Abbildung 20.

So wurde nachgewiesen, dass unter dem Einfluss des pneumatisch gesetzten Traumas ohne Verabreichung des antientzündlichen Ebselen die inflammatorische Zellreaktion massiv anstieg. Die Zahl fest an der venulären Gefäßwand haftender Leukozyten war um das etwa 4-fache gegenüber der Kontrollgruppe signifikant erhöht ('Trauma' 409 ± 18 n/ mm^2 , 'Kontrolle' 113 ± 40 n/ mm^2 , siehe Abbildung 20). Die Blutbildanalyse zeigte entsprechend eine Verminderung an systemischen Entzündungszellen in der Versuchsgruppe 'Trauma' ($5 \pm 1 \times 10^9/\text{l}$), während in den übrigen Versuchsgruppen physiologische Leukozytenzahlen bestimmt wurden. Die Gabe von Ebselen führte in der Versuchsgruppe 'Therapie' zu einer deutlichen Reduktion der inflammatorischen Zellantwort. Es zeigte sich bei den fest an der Venolenwand haftenden Leukozyten ein positiver immunmodulatorischer Einfluss der

selenoorganischen Substanz. So ergab die Zahl permanent adhärenter Leukozyten in der 'Therapie'-Gruppe lediglich einen Mittelwert von 198 ± 32 n/mm².

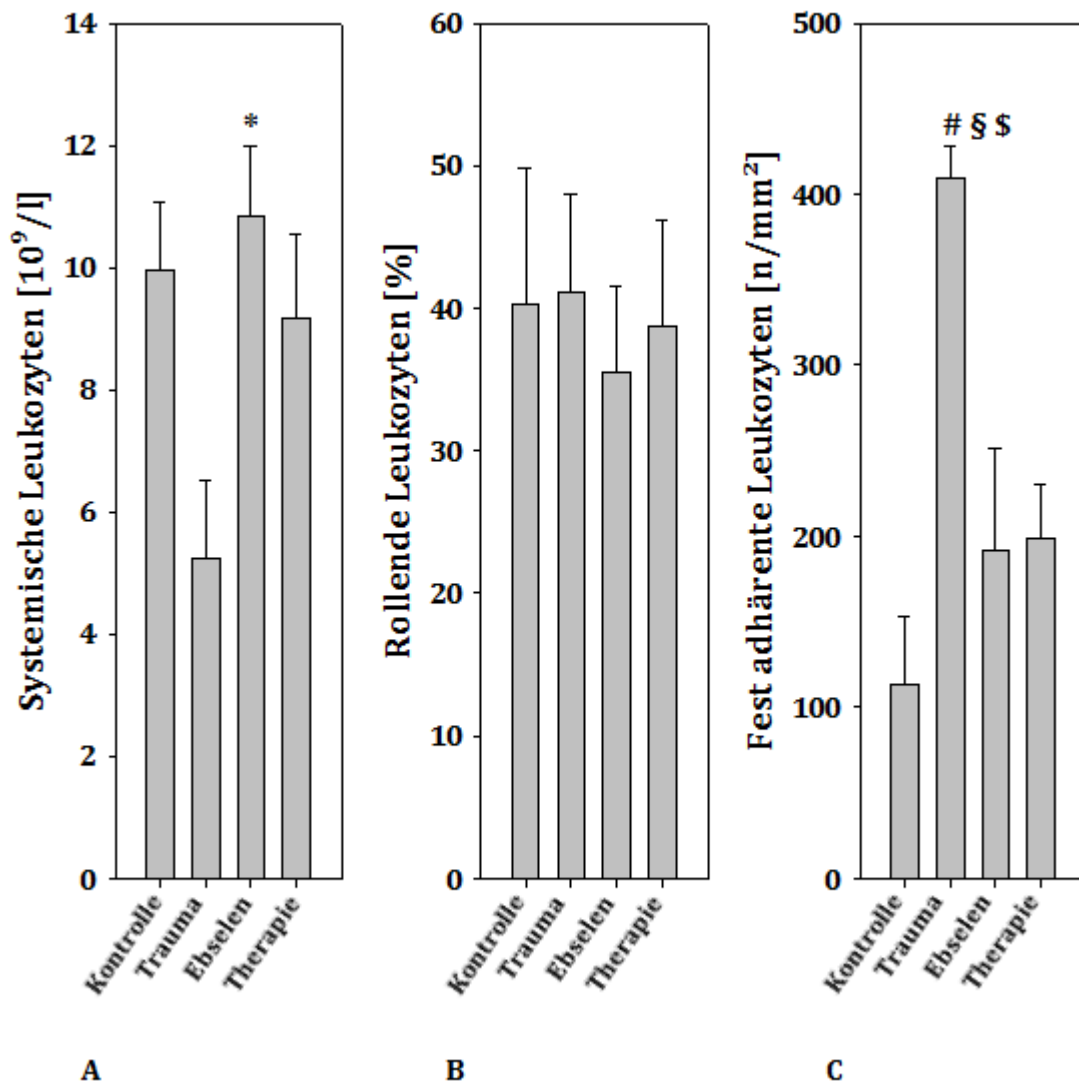


Abbildung 20: Darstellung der systemischen Leukozytenzahl (A) sowie der Fraktion rollender Leukozyten und der Anzahl fest adhärenter Leukozyten innerhalb der Skelettmuskulatur in Abhängigkeit von Trauma-induktion und Ebselenapplikation. Alle Daten sind als Mittelwert \pm SEM angegeben. One-way-ANOVA und nachfolgender Paarvergleich. * $p < 0,05$ vs. Trauma; # $p < 0,05$ vs. Kontrolle; \$ $p < 0,05$ vs. Ebselen; \$\$\$ $p < 0,05$ vs. Therapie.

Der Anteil jener weißer Blutzellen, die als sog. rollende Leukozyten in lockerer Interaktion mit dem Endothel standen, betrug in der Versuchsgruppe 'Therapie' 39 ± 7 % und unterschied sich somit unwesentlich von jenen Werten der übrigen experimentellen Gruppen ('Kontrolle' 40 ± 10 %, 'Ebselen' 35 ± 6 %, 'Trauma' 41 ± 7 %).

5.7 Zusammenfassung der Ergebnisse

Obwohl die Gluthation-Peroxidase-ähnliche Substanz Ebselen im Hinblick auf das Blutbild, die Gerinnungsparameter und die Makrohämodynamik der Versuchstiere in den einzelnen experimentellen Gruppen nur sehr geringe oder überhaupt keine Wirkung zeigt, bewirkte Ebselen eine wesentliche Verbesserung der gestörten Mikrozirkulation des traumatisierten Skelettmuskels am Beispiel der Ratte.

Durch den Einsatz dieser antiinflammatorischen Substanz konnte die funktionelle Kapillardichte aufrechterhalten, die Gefäßpermeabilität gesenkt und somit die Gewebeoxygenierung – gemessen anhand der NADH-Autofluoreszenz – verbessert werden und erreichte nahezu Werte der nicht traumatisierten Kontrollgruppe. Die entzündungshemmende und immunmodulatorische Potenz von Ebselen bewirkte im Rahmen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion eine verminderte Adhäsion aktivierter Leukozyten. Die intravitalmikroskopische Analyse zeigte eine wesentliche Reduktion der Zahl permanent adhärenter Leukozyten unter der Gabe von Ebselen. Entsprechend war auch die Entwicklung des posttraumatischen Weichteilödems unter der 24-h-Therapie mit Ebselen deutlich geringer ausgeprägt. Dies wiederum begünstigte die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation. Zuletzt konnte eine antiapoptotische Wirksamkeit von Ebselen durch Reduktion der leukozytenabhängigen Gewebeerstörung bestätigt werden.

Schlussfolgernd lassen die Ergebnisse in eindrucksvoller Weise die positive Wirkung der selenoorganischen Verbindung Ebselen auf die gestörte Durchblutung der verletzten Extremitätenmuskulatur erkennen und geben Hoffnung auf den Einsatz dieser vielversprechenden Substanz im klinischen Bereich.

6 Diskussion

Diskussion von Material und Methode

Der entscheidendste prognostische Faktor für Morbidität und Mortalität im Rahmen komplexer Extremitätenverletzungen ist der Schweregrad des Weichteiltraumas (Levin und Condit 1996). In einem experimentellen Modell an Mäusen konnten Amon et al. diesen wesentlichen Zusammenhang bestätigen. In Abhängigkeit von der Schwere des jeweils zugefügten Weichteiltraumas zeigten sich das Ausmaß der mikrovaskulären Dysfunktion und der leukozytären Entzündungsreaktion mehr oder weniger stark ausgeprägt (Amon et al. 2006).

Innerhalb der hier vorgelegten Studie ist ein bereits etabliertes, tierexperimentelles Traumainduktionsmodell angewandt worden. Zunächst beschrieben von Lighthall et al. (1989) zur Beobachtung schwerer, traumatischer Hirnschädigungen an der Ratte (Lighthall et al. 1989), modifizierte die Arbeitsgruppe um Schaser et al. (1999) das Modell zur Darstellung und Untersuchung komplexer, geschlossener Weichteiltraumata. Besondere Vorteile dieses Modells stellen die einfache Reproduzierbarkeit und die standardisierte, genau definierte Schwere der gezielt hervorzurufenden Gewebsschädigung dar (Schaser et al. 1999).

Ursprünglich geht die angewandte mikrochirurgische Präparationstechnik auf Tyml und Budreau (1991) zurück (Tyml und Budreau 1991). Die Präparationstechnik zur Darstellung des zu untersuchenden *Musculus extensor digitorum longus* wurde wiederum durch Schaser et al. (1999) abgewandelt und der mikroskopischen Untersuchungsmethode angepasst (Schaser et al. 1999). Nach Präparation des Muskelgewebes konnten nun die intravitalmikroskopischen Aufzeichnungen vorgenommen werden. Fiebig et al. beschrieben im Zusammenhang mit experimentellen Protokollen, welche einen hohen mikrochirurgischen Präparationsaufwand umfassen, den nicht unerheblichen Einfluss einer Gewebspräparation, welche bereits als solche zu einem chirurgischen Schaden führt. Daraus resultiert erfahrungsgemäß eine nahezu unumgängliche proinflammatorische Antwort mit in der Folge Einstrom von Entzündungszellen, Extravasation, Thrombusentstehung, Zerstörung der zellulären Integrität des betreffenden Parenchyms und des Endothels, wodurch mikrohämodynamische Parameter signifikant beeinträchtigt werden können (Fiebig et al. 1991). Um jener Tatsache gerecht zu werden, ist in diesem experimentellen Versuchsvorhaben eine Versuchsgruppe bearbeitet worden, die nach alleiniger

mikrochirurgischer Präparation ohne vorhergehende Traumainduktion bzw. Ebselenapplikation die Analyse der Mikrozirkulation des Muskels beinhaltete. Die erarbeiteten Werte entsprechen demzufolge den Perfusionsbedingungen nach kleinstmöglicher, chirurgischer Gewebeerregung und ermöglichen einen Vergleich mit den anderen Gruppen.

Das beschriebene Modell zum geschlossenen Weichteiltrauma der Ratte, welches ein Hochgeschwindigkeitstrauma imitiert, zeigt eine deutliche Reduktion der Kapillarperfusion, eine Steigerung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und eine Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität (Schaser et al. 1999). Die anhaltende Beeinträchtigung der Mikrozirkulation in Kombination mit dem sekundären, entzündlichen Gewebeschaden aggravieren all jene Faktoren, die schließlich zur lokalisierten Ischämie der Muskulatur führen, nämlich die perivaskuläre Hämorrhagie, der Kapillargefäßverschluss und die Ödembildung. Entsprechend der eingeschränkten mikrovaskulären Versorgung zeigt das traumatisierte Muskelgewebe einen Anstieg der NADH-Autofluoreszenz, welche eine ausgeprägte Gewebshypoxie widerspiegelt. Dieser Sachverhalt lässt sich durch die Störung der oxidativen Phosphorylierungsvorgänge, welche durch die inadäquate Sauerstoffversorgung hervorgerufen werden und den Gehalt von nicht oxidiertem NADH im Gewebe steigern, erklären (Ince et al. 1992). Die Mikroskopie der NADH-Autofluoreszenz *in vivo* erlaubt eine nicht-invasive Untersuchung des oxidativen Stoffwechsels der Muskulatur als Ergebnis der Alteration sauerstoffabhängiger Phosphorylierungen (Chance et al. 1962). In dem Zusammenhang konnte innerhalb dieser Studie die negative Regression zwischen NADH-Autofluoreszenz und kapillarer Perfusion im traumatisierten Skelettmuskelgewebe dargestellt werden. Als Konsequenz aus der verminderten Sauerstoffversorgung wird das Weichteilgewebe abgebauten Membranphospholipiden, freien Radikalen sowie durch Leukozyten induzierten oxidativem Stress ausgesetzt (Perler et al. 1990; van der Laan et al. 1997). Aktivierte Leukozyten spielen dabei eine besondere Rolle, da sie proinflammatorische Zytokine produzieren und lysosomale Enzyme und reaktive Sauerstoffmoleküle freisetzen. Diese entzündungsfördernden Komponenten sind als Hauptursache für die traumabedingte Weichteilschädigung identifiziert worden und verursachen u.a. die Zerstörung der Integrität des Gefäßendothels (van der Laan et al. 1997; Carden und Granger 2000). Umgekehrt aktiviert eine starke Erhöhung des oxidativen Stresses im Weichteilgewebe endogene, antioxidative Abwehrmechanismen. Einer der wichtigsten Vertreter der Gruppe endogen produzierter Substanzen ist das Gluthation GSH (Harrison et al. 1991; Ruffmann und Wendel 1991; Bulger und Maier 2001). Bei der Gluthation-Peroxidase handelt es sich um ein Enzym,

welches im Organismus Biomembranen und andere zelluläre Komponenten vor oxidativer Schädigung schützt, indem es mit unterschiedlichen Hydroperoxiden reagiert und diese reduziert. Als essentielles Substrat nutzt GSH-Peroxidase GSH (Flohe et al. 1973; Bhabak und Mugesh 2007). Schaser et al. konnten in einem tierexperimentellen Modell aufzeigen, dass die posttraumatische, intravenöse Infusion von N-Acetylcystein die Mikrozirkulationsdefizite, die Myonekrose, die Ödembildung und die leukozytäre Adhärenz signifikant reduzieren kann. Dabei wirkt N-Acetylcystein zum einen selbstständig antioxidativ, andererseits versorgt es das Gewebe mit Cystein, um verbrauchte Vorräte des endogenen Antioxidanz GSH aufzufüllen (Schaser et al. 2005).

Zur Beeinflussung der Entzündungsreaktion und des resultierenden, sekundären Gewebeschadens nach geschlossenem Weichteiltrauma wählten wir in dieser Studie die Substanz Ebselen, 2-Phenyl-1,2-Benzisoselenazol-3(2H)-one. Diese Substanz zeigt eine Vielzahl biologischer Wirkungen, welche in dieser Arbeit von Interesse waren. U.a. zeigt Ebselen eine ausgeprägte antioxidative Aktivität, indem es das aktive Zentrum der Gluthation-Peroxidase mimt. Dabei resultiert diese GPx-ähnliche Aktivität hauptsächlich aus der Bildung katalytisch aktiver Selenole (Bhabak und Mugesh 2007). So konnten antioxidative Eigenschaften von Ebselen *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen werden, wobei organische Hydroperoxide in Anwesenheit von Thiolen wie z.B. GSH durch Ebselen umgewandelt und schließlich entschärft werden (Sies 1994; Miorelli et al. 2008; Yamagata et al. 2008). Ebenso sind antiinflammatorische und immunmodulatorische Effekte von Ebselen beschrieben worden. Ebselen hemmt die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine (TNF- α , Interferon γ , Leukotriene B₄/D₄/E₄) und stimuliert die Ausschüttung antiinflammatorischer Moleküle, wie z.B. Interleukin-10 (Parnham und Graf 1987; Parnham 1990; Wendel et al. 1997; Tiegs et al. 1998). Die konstitutive (endotheliale) als auch die induzierbare, leukozytäre NO-Synthase können gezielt durch Ebselen gehemmt werden, wobei dadurch die Produktion von zellschädigendem, hochreaktiven Peroxynitrit ONOO⁻ eingeschränkt wird (Hattori et al. 1994). Neben den zuvor dargestellten Eigenschaften ist Ebselen zudem in der Lage, die intravaskuläre Thrombusformation und die thrombozytäre Expression von P-Selektin zu reduzieren (Lindenblatt et al. 2003). Diese antithrombotischen Fähigkeiten tragen mit hoher Wahrscheinlichkeit zum Potential von Ebselen bei, die posttraumatische Beeinträchtigung der Muskeldurchblutung zu vermindern. Lindenblatt et al. konnten mit Fokus auf die Prävention mikrovaskulärer Thrombusbildung zeigen, dass Versuchstiere, die mit Ebselen vorbehandelt worden sind, eine signifikant verzögerte venuläre Thrombusbildung im *Musculus cremaster* aufwiesen (Lindenblatt et al. 2003).

In einem experimentellen Modell zu Verletzungen der Wirbelsäule an Ratten konnten deutlich geringere Gewebeverletzungen unter Ebselen-Gabe im Vergleich zu den Kontrolltieren gezeigt werden (Kalayci et al. 2005). Parallel dazu konnten Ishii et al. die protektiven Fähigkeiten von Ebselen am Beispiel der akuten Lungenverletzung verdeutlichen. Unter der Annahme, dass Ebselen schädigende Peroxynitrite nach Ozon-induzierter, pulmonaler Inflammation abfängt, zeigte sich eine günstige Beeinflussung des durch ein Oxidanz hervorgerufenen Entzündungsprozesses (Ishii et al. 2000). Andere wissenschaftliche Arbeiten zeigen, dass Ebselen in Experimenten an Mäusen und Ratten die durch Ischämie-Reperfusion induzierte ZNS-Schädigung reduzieren kann. Die Arbeitsgruppe um Wong et al. hat sich wiederum besonders der GPx-ähnlichen Aktivität des Substrates Ebselen gewidmet. So konnte an Mäusen mit defizitären GPx-Konzentrationen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen eine lokalisierte Hirnischämie *in vivo* ausgelöst werden, die von einer reduzierten mikrovaskulären Perfusion und einer verstärkten inflammatorischen Zellantwort begleitet war. Desweiteren führte eine Vorbehandlung der Versuchstiere mit Ebselen zur verbesserten Gefäßperfusion und einer geringeren Größe des Hirninfarktes (Wong et al. 2008). Die durch Wong et al. gewonnenen Erkenntnisse werden durch die wissenschaftliche Arbeit von He et al., in der die Protektion nach fokaler kortikaler Infarzierung an Ratten durch Ebselen nachgewiesen werden konnte, unterstrichen (He et al. 2007).

Neben dem breiten pharmakologischen Wirkspektrum ist auch die hohe Bioverfügbarkeit von Ebselen *in vivo* zu unterstreichen (Wagner et al. 1994). Zudem ist zu bemerken, dass in den zahlreichen Studien - wie auch der vorliegenden Arbeit - zu Ebselen keinerlei Nebenwirkungen (Parnham und Graf 1987; Kalayci et al. 2005; Wong et al. 2008) beobachtet wurden, was die besondere Eignung von Ebselen bei der Behandlung leukozytärer Entzündungsreaktionen und des mikrovaskulären Perfusionsversagens im Rahmen des Skelettmuskeltraumas unterstreicht.

Die Narkotisierung und Aufrechterhaltung der Narkose der *Sprague-Dawley*-Ratten erfolgte mittels Pentobarbital, zunächst bei der Traumainduktion und schließlich ein zweites Mal 24 h später zur Muskelpräparation für die nachfolgende Intravitalmikroskopie. Bei sehr zügiger Injektion kann das Narkotikum Pentobarbital zu einer schweren kardiovaskulären und v.a. respiratorischen Depression führen, während es in sehr geringer Dosierung und vorsichtiger Applikation lediglich eine Sedation bewirkt (Paddleford 1992). Eine Analgesie tritt dagegen erst bei hoher Dosierung dieses Narkotikums auf, wobei dann wiederum mit unerwünschten Nebenwirkungen gerechnet werden muss. Im Rahmen dieser tierexperimentellen Studie ist

die Pentobarbitallösung (55mg/kg KG i.p.; Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, Deutschland) in einer Konzentration von 6% verwendet worden. Zudem erfolgte die Gabe intraperitoneal, sodass unerwünschten Atem- bzw. Kreislaufdepressionen durch intravasale Gabe vorgebeugt werden konnte. Eine Aufrechterhaltung der Anästhesie erfolgte mit der peritonealen Applikation von 3%-iger Pentobarbitallösung. Seit Jahren nutzen unterschiedliche Arbeitsgruppen ebenfalls Pentobarbital als Anästhetikum. Der Wirkstoff konnte sich demzufolge in der Nutzung an Versuchstieren durchsetzen (Gierer et al. 2004; Gierer et al. 2008).

Zum Ausschluss geschlechtsspezifischer Reaktionen, wie sie u.a. beim polytraumatisierten Menschen zu beobachten sind (Angele und Chaudry 2005), wurden ausnahmslos männliche Versuchstiere verwendet. Zudem lag das Durchschnittsalter der Tiere bei etwa 9 Wochen, sodass altersbedingte Mikrozirkulationsstörungen und Beeinträchtigungen der Gefäßreaktivität nahezu vernachlässigbar waren.

Da der Untersuchungszeitraum dieses Akutmodells sich auf den Zeitraum von 24 h nach Traumainduktion bzw. Ebselenapplikation beschränkt, ist eine Beurteilung der Mikrozirkulation und der Gewebsrestitution im posttraumatischen Verlauf über Tage oder gar Wochen nicht möglich. Diese Studie berücksichtigt ebenso wenig den Einfluss höherer oder auch niedrigerer Ebselenkonzentrationen auf das geschlossene Weichteiltrauma. Inwiefern spezifische, in einer Vielzahl anderer Studien nachgewiesene Wirkmechanismen von Ebselen Einfluss auf den Ausgang der Gewebsschädigung nach Weichteiltrauma nehmen, war nicht Untersuchungsziel dieser Arbeit. Trotzdem stellt sich die Frage, welchen biologischen Effekten in welchem Ausmaß eine besondere Bedeutung bei der Therapie von komplexen Extremitätenverletzungen zukommt. Es bleibt deshalb neben der Analyse charakteristischer Enzymmuster im Skelettmuskelgewebe weiterführenden Studien überlassen, u.a. die Bestimmung spezifischer Mediatoren, wie z.B. TNF- α , einzelner Leukotriene, aber auch von Interleukin-10 oder gar zytotoxischer Sauerstoffradikale durchzuführen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit ist als zentrale Untersuchungstechnik die intravitale Fluoreszenzmikroskopie aufgrund der besonderen Eignung zur direkten Analyse mikrozirkulatorischer Parameter im traumatisierten Weichteilgewebe angewandt worden. Zahlreiche wissenschaftliche Gruppen haben in den vergangenen Jahrzehnten innerhalb akuter Versuchsmodelle die Mikrozirkulation unterschiedlichster Organe verschiedener Tierspezies anhand der Intravitalmikroskopie quantitativ und qualitativ untersucht, wie z.B. der Skelettmuskulatur (Menger et al. 1992a; Gierer et al. 2004; Gierer et al. 2008), der

Cremaster-Muskulatur (Lindenblatt et al. 2003), des Pankreas (Vollmar et al. 1994), des Knochens (Rücker et al. 1999) und der Herzmuskulatur (Vollmar et al. 1995). Die Intravitalmikroskopie hat sich auf diesem Weg vielfach etabliert und gilt als aussagekräftige Methode, insbesondere bei sog. Akutmodellen wie dem hier verwendeten geschlossenen Weichteiltrauma an der Ratte.

Andere Untersuchungstechniken der Mikrozirkulation umfassen neben verschiedenen Farbstofftechniken (Elias und Petty 1953) beispielsweise auch die Laser-Doppler-Flowmetrie (Heden et al. 1986; Vollmar et al. 1994; Chávez-Cartaya et al. 1995) oder die Partialdruckmessung des im Gewebe vorhandenen Sauerstoffs (Conzen et al. 1988; Vollmar et al. 1992). Diesen indirekten Verfahren zur Untersuchung der Mikrozirkulation bzw. -hämodynamik ist die Fluoreszenzmikroskopie *in vivo*, kombiniert mit der zuvor beschriebenen Epi-Illuminationstechnik, durch die Möglichkeit der direkten Gewebe-, Gefäß-, sowie Zirkulationsanalyse deutlich überlegen. So erlaubt sie die Visualisierung dynamischer Phänomene des Gefäßsystems nicht-transilluminierbarer Gewebe. Skelettmuskelgewebe und das zugehörige arterielle, venöse und kapillare Gefäßsystem konnte mittels hochauflösender Mikroskopietechnik nach erfolgter Traumainduktion und mikrochirurgischer Muskelpräparation dargestellt und dank ausführlicher Videodokumentation objektiv reproduzierbar untersucht werden (Zeintl et al. 1989; Marzi et al. 1990). Unterschiede der Gewebeversorgung mit Sauerstoff (Rücker et al. 2000), des Verhaltens spezifischer Entzündungszellen (Zhang et al. 2003) und der Mikrozirkulation innerhalb des Skelettmuskelgewebes konnten so zwischen den Gruppen erfasst und ausgewertet werden. Dazu beigetragen hat die simultane Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, welche sowohl die Analyse der arteriellen, kapillaren und venulären Perfusion, als auch die Bestimmung zellulärer Parameter ermöglichten. So wurden innerhalb dieser Studie nach Applikation von Rhodamin 6G, Bisbenzimid und FITC-Dextran das Strömungsverhalten der Leukozyten und Thrombozyten (Menger et al. 1992a; Hoffmann et al. 1999, 2000; Knappe et al. 2005), die Änderung der Gefäßpermeabilität (Pries 1988) und die apoptotische Zellschädigung (Westermann et al. 1999) dargestellt, dokumentiert und quantifiziert.

Innerhalb der vorgestellten Arbeit wurde die Auflichtmethode, auch Epi-Illumination genannt, zur Untersuchung des Skelettmuskelgewebes genutzt und verschiedene Farbstoffe eingesetzt. Beide Methoden erfordern besondere Beachtung während der Intravitalmikroskopie. Da durch eine andauernde Lichtexposition photodynamische, zellschädigende Prozesse induziert werden können, wurde die Belichtung eines Gesichtsfeldes auf eine Dauer von max. 45 - 50 sec beschränkt. Zudem wurden bereits

belichtete, unmittelbar nebeneinander liegende Gesichtsfelder nicht untersucht. Die Gesamtdauer der Epi-Illumination wurde auf höchstens 15 min festgelegt.

Neben den lichtabhängigen, intrazellulären Effekten spielen auch die verwendeten Substanzen eine wichtige Rolle hinsichtlich einer möglichen Beeinträchtigung der Untersuchungsergebnisse. FITC-Dextran wurde zur Darstellung der Perfusion intravenös appliziert, wodurch eine Gefäßkontrastierung erreicht wurde. Da die verwendeten Farbstoffe in zu hoher Dosierung die Ergebnisse durchaus ungünstig beeinflussen, galt es darauf zu achten, während der mikroskopischen Aufnahmen die Dosis - bei optimaler Kontrastverstärkung - möglichst gering zu halten (Steinbauer et al. 2000). Zudem wurden phototoxische Effekte in der Arbeit von Roesken et al. (1997) beschrieben, welche sich aus der Interaktion von FITC-Dextran mit Licht ergeben (Roesken et al. 1997). Dabei konnten elektronenmikroskopisch u.a. Zellmembranschädigungen und die Unterbrechung der endothelialen Zellkontakte mit der Basallamina beobachtet werden, was wiederum zu einer verstärkten thrombo- und leukozytären Zellaggregation innerhalb der verletzten Gefäße mit konsekutiver Thrombusbildung und möglicher Okklusion führte (Roesken et al. 1997). Diese Beobachtungen wurden zuvor auch von anderen wissenschaftlichen Gruppen beschrieben (Herrmann 1983).

Die anschließende *Offline*-Analyse des Videomaterials beinhaltet zum einen den Vorteil, die erhaltenen Ergebnisse unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit des einzelnen Versuchstiers und dem vorhergehenden experimentellen Ablauf objektiv auswerten zu können. Desweiteren lassen sich die zu bestimmenden Mikrozirkulationsparameter auf der Grundlage des Programmes *CapImage* manuell oder auch computergestützt automatisch sehr detailliert, sowohl quantitativ als auch qualitativ, untersuchen (Klyszcz et al. 1997). Prinzipiell ergeben sich bei der Auswertung des Videomaterials mögliche Probleme durch Bewegungsartefakte während der Mikroskopie, welche allerdings durch die Untersuchung an der fixierten, hinteren Extremität der narkotisierten Versuchstiere kaum Einfluss gewinnen (Klyszcz et al. 1997).

Diskussion der Untersuchungsergebnisse

Wie schon in zahlreichen anderen Studien zum geschlossenen Weichteiltrauma (Schaser et al. 2005; Amon et al. 2006; Gierer et al. 2008) zeigte sich auch in dieser Arbeit die ausgeprägte mikrovaskuläre Perfusionsstörung, einhergehend mit einer v.a. im Bereich der Venolen auftretenden Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Bisher wurde Ebselen noch nicht zur

Behandlung traumatischer Skelettmuskelschädigungen im Tierexperiment eingesetzt. Unter Applikation dieser selenorganischen Verbindung ist es uns gelungen, die Verbesserung der Mikrozirkulation und der akuten inflammatorischen Reaktion nach Muskeltrauma zu zeigen. Diese Tatsache gibt Aussicht auf den zukünftigen klinischen Einsatz des antiinflammatorisch sowie antioxidativ wirksamen Ebselens im Bereich der Traumatologie. Da jedoch die zahlreichen beschriebenen Wirkmechanismen von Ebselen im Hinblick auf die molekulare und zelluläre Komplexität einer ausgedehnten Gewebeschädigung nach geschlossenem Weichteiltrauma nur bedingt genaue Angriffspunkte der Testsubstanz darstellen lassen, fällt eine abschließende Beurteilung spezifischer Wirkmechanismen im Rahmen des durchgeführten Weichteiltraumas innerhalb dieser Arbeit schwer. Inwiefern also die antiinflammatorischen Effekte gegenüber antioxidativen oder gar antithrombotischen Mechanismen von Ebselen überwiegen, blieb unbeantwortet, zumal von einem Zusammenspiel mehrerer Effekte - wie sie eben auch bei der Entstehung der traumatisch bedingten Weichteilschädigung ineinandergreifen - ausgegangen werden kann. Im Folgenden sollen mögliche, herausragende Wirkmechanismen anhand der Untersuchungsergebnisse und vorangegangener experimenteller Studien zu Ebselen nochmals beleuchtet werden:

Zunächst konnte der günstige Einfluss von Ebselen im Beobachtungszeitraum von 24 h auf die überschießende Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach Trauma aufgezeigt werden. Innerhalb der systemischen Blutbildanalyse zeigten sich keine wesentlichen Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen 'Kontrolle', 'Ebselen' und 'Therapie'. Allerdings war die Leukozytenzahl der 'Trauma'-Gruppe deutlich erniedrigt. Intravitalmikroskopisch wurde beobachtet, dass sich die lokale Akkumulation und die Adhäsion von Leukozyten in Abhängigkeit von Traumainduktion und/oder Ebselenapplikation wesentlich unterschieden. Nach Traumainduktion zeigte sich eine signifikant erhöhte Zahl fest an der venulären Gefäßwand haftender Leukozyten. Die Substitution von Ebselen führte dagegen zu einer deutlichen Reduktion der inflammatorischen Zellantwort. Der Anteil rollender Leukozyten in der traumatisierten Skelettmuskulatur unterschied sich hingegen kaum zwischen den einzelnen experimentellen Gruppen, sodass Ebselen offenbar v.a. auf die Leukozytenadhäsion Einfluss hat.

Worauf beruht nun diese immunmodulierende und antiinflammatorische Wirksamkeit von Ebselen?

Zum einen ist die bekannte starke chemotaktische Wirksamkeit von LTB_4 bedeutsam. LTB_4 entsteht im leukozytären Arachidonsäurestoffwechsel durch deren Reaktion mit der 5-Lipoxygenase. Dieses Enzym kann wiederum unter Einsatz von Ebselen inhibiert werden,

wodurch schließlich die Produktion proinflammatorischer Leukotriene reduziert (Wendel et al. 1997) und die weitere Anlockung sowie Aktivierung neutrophiler Granulozyten im traumatisierten Gewebe und die Stimulation der leukozytären Superoxidanion-Produktion gehemmt wird (Lucchesi 1994). Generell erfolgt auf diesem Weg also eine Inhibition der inflammatorischen Immunantwort. In demselben Zusammenhang seien ebenso LTD₄ und LTE₄ genannt, welche durch leukozytäre Lipoxygenasen produziert werden und u.a. die Gefäßpermeabilität stark erhöhen können, wodurch die mikrovaskuläre Perfusion nach geschlossenem Weichteiltrauma massiv beeinträchtigt werden kann. Entsprechend dem einleitend beschriebenen Teufelskreis (siehe Abb. 1) verursacht die resultierende Ödembildung im Muskelgewebe eine Kompression der Mikrogefäße, mit nachfolgender Verminderung der Blutflussgeschwindigkeit und verstärkter Akkumulation von Leukozyten.

Neben der gezielten Hemmung der proinflammatorisch wirksamen Lipoxygenase wurde sowohl *in vitro* (Issekutz und Lopes 1992) als auch *in vivo* (Gao und Issekutz 1993) die Wirksamkeit von Ebselen auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion dokumentiert. So konnte v.a. die Inhibition der Adhäsion an das Gefäßendothel und der Transmigration polymorphkerniger Neutrophiler dargestellt werden. In einer *In-vitro*-Studie von Patrick et al. (1993) spielt wiederum LTB₄ eine zentrale Rolle (Patrick et al. 1993). Die Hemmung wirkte insbesondere dann sehr stark auf die Chemotaxis der Leukozyten, wenn diese durch LTB₄ aktiviert wurden. Kuhl et al. (1986) beobachteten, dass die selenoorganische Testsubstanz LTB₄ in dessen inaktives *trans*-Isomer umzuwandeln vermag, und stellt somit den inaktivierenden Einfluss von Ebselen auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion - unabhängig von der eigentlichen Enzymhemmung der 5-Lipoxygenase - heraus (Kuhl et al. 1986).

Das geschlossene Weichteiltrauma verursacht eine wesentliche Beeinträchtigung der nutritiven Kapillarperfusion, was bereits in zahlreichen anderen wissenschaftlichen Arbeiten dargestellt werden konnte (Gierer et al. 2004; Schaser et al. 2005; Amon et al. 2006; Gierer et al. 2008).

In der vorliegenden Arbeit wurde die Kapillarperfusion durch die Behandlung mit Ebselen auf physiologische Basiswerte wiederum angehoben. Als Konsequenz auf die eingeschränkte nutritive Kapillarperfusion zeigten sich intravitalmikroskopisch erhöhte Werte der NADH-Autofluoreszenz im Skelettmuskelgewebe als Parameter der Gewebehypoxie bei traumatisierten Versuchstieren. Im Gegensatz dazu führte die Gabe von Ebselen bei traumatisierten Versuchstieren zu einer stark reduzierten NADH-Autofluoreszenz entsprechend der annähernd adäquaten Gefäßperfusion. Zusammenfassend konnte

demzufolge durch die Substitution der antiinflammatorischen und antioxidativen Substanz die Beeinträchtigung der funktionellen Kapillardichte reduziert, die Gefäßpermeabilität durch Aufrechterhaltung der endothelialen Integrität gesenkt und somit die Sauerstoffversorgung der Skelettmuskulatur - gemessen anhand der NADH-Autofluoreszenz - verbessert werden.

Grundlegende Wirkmechanismen von Ebselen werden anhand weiterer Enzyminhibitionen deutlich. So werden sowohl die Proteinkinase C als auch die NADPH-Oxidase phagozytierender Zellen durch Ebselen inaktiviert (Cotgreave et al. 1989). Schließlich wird durch Unterbrechung komplexer Signalkaskaden die granulozytäre Produktion reaktiver Superoxidanionen aus molekularem Sauerstoff und die proinflammatorische Wirkung beim sog. '*respiratory burst*' verhindert. Die Proteinkinase C ist zudem maßgeblich auch an anderen proinflammatorischen Reaktionen beteiligt. Die direkte Suppression der katalytischen Aktivität dieses Enzyms erklärt zusätzlich das hohe antiinflammatorische Potential von Ebselen (Schewe 1995).

Im inflammatorischen Geschehen nach Trauma spielt auch das Enzym NO-Synthase, insbesondere die induzierbare Isoform, eine bedeutende Rolle. Die induzierbare NO-Synthase (iNOS) kommt in Makrophagen und glatten Muskelzellen vor und bewirkt durch die Herstellung hoher Konzentrationen an NO die Produktion von zellschädigendem hochreaktiven Peroxynitrit ONOO⁻. Eine ausgeprägte Weichteilschädigung könnte laut einer Studie von Hattori et al. jedoch günstig beeinflusst werden, da Ebselen die selektive Hemmung der iNOS durch eine erhöhte Enzymsensitivität gegenüber der zytoprotektiven Selenverbindung ermöglicht (Hattori et al. 1994). Zudem bleibt die für den physiologischen Gefäßtonus endotheliale, konstitutiv exprimierte Form (Moncada und Higgs 1993) nahezu unbeeinträchtigt und kann ihre regulatorische Funktion bezüglich der Gewebeperfusion wahrnehmen.

Nutritive Defizite der Mikrozirkulation und resultierende Muskelgewebsverluste werden desweiteren durch das antithrombotische Potential von Ebselen günstig beeinflusst. Dimmeler et al. konnten einen hemmenden Effekt auf die Inositol-(1,4,5)-triphosphat-gebundene Calciumfreisetzung *in vitro* feststellen, wodurch die thrombozytäre Zellaktivierung inhibiert wird (Dimmeler et al. 1991). Die Beeinträchtigung der intrazellulären Calciumhomöostase wird für eine verminderte Thrombozytenaggregation verantwortlich gemacht (Brüne et al. 1991), da die Translokation intrazellulärer P-Selektin-Speicher eine Aktivierung der Proteinkinase C mit anschließender Erhöhung der Calciumkonzentration erforderlich macht. Die Arbeitsgruppe um Lindenblatt et al. konnte

zudem *in vivo* erfolgreich den antagonisierenden Einfluss von Ebselen auf die H₂O₂-induzierte, thrombozytäre P-Selektin-Expression am *Musculus cremaster* der Ratte darstellen. Die Thromboseentstehung und der vollständige Verschluss kleinster Gefäße kann durch Ebselen offenbar signifikant reduziert werden, wodurch die Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff aufrechterhalten wird (Lindenblatt et al. 2003).

Die Erfassung der intramuskulären Ödembildung erfolgte durch die einfache Bildung des Quotienten aus Feucht- und Trockengewicht, auch als sog. *Wet-to-dry-weight*-Ratio bezeichnet. Dabei ergab sich eine deutliche Ödemausbildung innerhalb der Gruppe 'Trauma', während sich ein positiver Effekt von Ebselen nach 24 h anhand der verminderten Wassereinlagerung in der untersuchten Skelettmuskulatur zeigte. Die verminderte interstitielle Flüssigkeitsansammlung begünstigt wiederum die Perfusion. Exemplarisch für die Komplexität der Wirkmechanismen von Ebselen und die Entstehung des Gewebeschadens nach Traumatisierung soll schließlich auch die intramuskuläre Ödembildung beleuchtet werden. Hierbei ergeben sich vielfältige Entstehungs- und damit Einflussmöglichkeiten von Ebselen, wie sie im vorangehenden Abschnitt bereits beschrieben worden sind. Neben der Produktionshemmung leukozytärer Stoffwechselprodukte und der chemotaktischen Beeinträchtigung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion stellen auch der Erhalt der endothelialen Integrität durch Enzyminhibition, beispielsweise der leukozytären Kollagenase, und antioxidative, GPx-ähnliche Mechanismen von Ebselen (Wang et al. 1992; Mishra et al. 2006) wesentliche Faktoren bei der Reduktion des Ödems dar. Bezüglich der antioxidativen Funktion von Ebselen im Sinne der Gluthation-Peroxidase sei daran erinnert, dass Ebselen - trotz variabler Nutzung verschiedener Co-Substrate (Mishra et al. 2006) - im Vergleich zu anderen Sauerstoffradikalfängern eine geringere Potenz besitzt, reaktive Sauerstoffmetabolite zu entschärfen.

All jene Faktoren stellen nur einen Teil der tatsächlich möglichen Mechanismen dar und sind in ihrer spezifischen Wirksamkeit schwer voneinander zu trennen, was allerdings auch nicht Bestandteil dieser tierexperimentellen Arbeit sein sollte. Trotzdem spiegelt sich auch am Beispiel der Gewebeödemausbildung ein weiteres Mal die umfangreiche Funktion von Ebselen wider.

Letztlich konnte auch die Trauma-bedingte Zunahme apoptotischer Zellen, wie sie innerhalb dieser Arbeit durch zwei unterschiedliche Verfahren quantifiziert worden sind, unter Verwendung von Ebselen um etwa 50% reduziert werden. Ohne Zweifel resultiert auch dieses Ergebnis aus dem Zusammenspiel verschiedener Effekte, wie sie bereits in anderen vorliegenden Studien beschrieben und im vorangehenden Text diskutiert wurden.

Klinische Perspektiven

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die schützenden Effekte von Ebselen schlussfolgern lassen, dass u.a. die GPx-ähnliche Aktivität zur Prävention schwerer, traumainduzierter Weichteilschädigungen beiträgt. Dieser Beitrag ist von besonderem Interesse, da während des Einsatzes dieser selenorganischen Substanz keine schwerwiegenden Nebeneffekte beobachtet wurden. So mag Ebselen zukünftig von herausragendem Wert im Hinblick auf den Schutz vor posttraumatischen Mikrozirkulationsstörungen sowie sekundären, inflammatorisch bedingten Gewebeerstörungen sein. Desweiteren kann möglicherweise die Heilung generell beschleunigt und eine gezielte Unterstützung des Reparationsvorganges bei geschlossenen Weichteiltraumata erreicht werden.

7 Zusammenfassung

Die traumatische Weichteilverletzung hat wesentlichen Einfluss auf das Heilungsergebnis und die Prognose mehrfach verletzter Patienten. Neben dem mikrovaskulären Perfusionsversagen und der inflammatorisch bedingten Einwanderung von Neutrophilen tragen auch der Verlust der endothelialen Integrität, die durch leukozytäre Mediatoren bedingte Konstriktion von Arteriolen, die entstehende Gewebhypoxie und die Zirkulationsstörung im Kapillarbett wesentlich zur Weichteilschädigung bei. Typischerweise verstärken die genannten Faktoren sich im Verlauf gegenseitig, sodass ein noch größerer Gewebeschaden, insbesondere der Skelettmuskulatur resultiert. Im klinischen Alltag ist es deshalb zentrale Aufgabe diesen Teufelskreis zu durchbrechen, um den posttraumatischen Verlauf und die Heilungsergebnisse gezielt positiv zu beeinflussen.

Mit der Vorstellung dieser prospektiven, tierexperimentellen Studie konnte anhand eines bereits etablierten Traumainduktionsmodells am Beispiel der Ratte der günstige Einfluss der selenoorganischen Substanz Ebselen auf das geschlossene Weichteiltrauma und dem resultierenden, sekundären Gewebeschaden nachgewiesen werden.

Dazu sind männliche *Sprague-Dawley*-Ratten in vier Versuchsgruppen (n=7) eingeteilt worden, die je nach Gruppenzugehörigkeit zum Zeitpunkt t = 0 h nicht traumatisiert bzw. traumatisiert und entweder nicht mit Ebselen bzw. mit Ebselen (30mg/kg KG) intraperitoneal therapiert wurden. 23 h nach der Vorbehandlung erfolgte die chirurgische Präparation des *M. extensor digitorum longus* zur intravitalmikroskopischen Analyse zum Zeitpunkt t = 24 h. Zur Beurteilung der Ödemausprägung und Bestimmung der Anzahl apoptotischer Zellen mittels TUNEL-Methode wurde anschließend Skelettmuskelgewebe asserviert.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse dieser Arbeit, dass die Applikation von Ebselen eine effektive Behandlungsstrategie der durch Trauma induzierten Mikrozirkulationsstörungen darstellt, wobei eine nahezu vollständige Wiederherstellung der Zirkulation innerhalb des Untersuchungszeitraumes von 24 h erreicht werden konnte. Diese Beobachtungen lassen annehmen, dass die Therapie geschlossener Weichteiltraumen mit Ebselen den Regenerationsprozess des verletzten Gewebes unterstützt und die sekundäre, entzündungsbedingte Schädigung vermindern kann.

8 Quellen und Literaturangaben

- Adler, C.-P. (2005): Knochenkrankheiten: Diagnostik makroskopischer, histologischer und radiologischer Strukturveränderungen des Skeletts 3. Auflage. Berlin: Springer.
- Amon, M.; Laschke, M.W.; Harder, Y.; Vollmar, B.; Menger, M.D. (2006): Impact of Severity of Local Soft-Tissue Trauma on Long-Term Manifestation of Microcirculatory and Microlymphatic Dysfunctions. In: *J Trauma* 61 (4), S. 924–932.
- Angele, M.K; Chaudry, I.H (2005): Surgical trauma and immunosuppression: pathophysiology and potential immunomodulatory approaches. In: *Langenbecks Arch Surg* 390 (4), S. 333–341.
- Angstwurm, M.W.; Engelmann, L.; Zimmermann, T.; Lehmann, C.; Spes, C.H.; Abel, P. et al. (2007): Selenium in Intensive Care (SIC): results of a prospective randomized, placebo-controlled, multiple-center study in patients with severe systemic inflammatory response syndrome, sepsis, and septic shock. In: *Crit Care Med* 35 (1), S. 118–126.
- Barlow, Y.; Willoughby, J. (1992): Pathophysiology of soft tissue repair. In: *Br Med Bull* 48 (3), S. 698–711.
- Beil, W.; Staar, U.; Sewing, K. (1990): Interaction of the anti-inflammatory seleno-organic compound ebselen with acid secretion in isolated parietal cells and gastric H⁺/K⁺-ATPase. In: *Biochem Pharmacol* 40 (9), S. 1997–2003.
- Ben-Baruch, A.; Michiel, D.F.; Oppenheim, J.J. (1995): Signals and Receptors Involved in Recruitment of Inflammatory Cells. In: *J Biol Chem* 270 (20), S. 11703–11706.
- Bendas, G. (1998): Selectins as new targets for immunoliposome-mediated drug delivery A potential way of anti-inflammatory therapy. In: *Pharm Acta Helv* 73 (1), S. 19–26.
- Bendas; G. (2005): Inhibitors of Membrane Receptors Involved with Leukocyte Extravasation. In: *Mini Rev Med Chem* 5 (6), S. 575-584.
- Bhabak, K.P.; Mughesh, G. (2007): Synthesis, Characterization, and Antioxidant Activity of Some Ebselen Analogues. In: *Chem Eur J* 13 (16), S. 4594–4601.
- Bily, W.; Kern, H. (1998): Diagnose, Erstversorgung und Klassifikation von Muskelverletzungen in der Sportmedizin. In: *Sportverletz Sportschaden* 12 (3), S. 87–93.
- Bleakley, C. M.; McDonough, S. M.; MacAuley, D.C. (2006): Cryotherapy for acute ankle sprains: a randomised controlled study of two different icing protocols. In: *Br J Sports Med* 40 (8), S. 700–705.
- Brüne, B.; Diewald, B.; Ullrich, V. (1991): Ebselen affects calcium homeostasis in human platelets. In: *Biochem Pharmacol* 41 (12), S. 1805–1811.
- Bulger, E.M.; Maier, R.V. (2001): Antioxidants in critical illness. In: *Arch Surg* 136(10), S. 1201–1207.
- Carden, D. L.; Granger, D. N. (2000): Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury. In: *J Pathol* 190 (3), S. 255–266.
- Carlos, T. M.; Harlan, J. M. (1994): Leukocyte-endothelial adhesion molecules. In: *Blood* 84 (7), S. 2068–2101.

- Chance, B.; Cohen, P.; Jobsis, F.; Schoener, B. (1962): Intracellular Oxidation-Reduction States in Vivo: The microfluorometry of pyridine nucleotide gives a continuous measurement of the oxidation state. In: *Science* 137 (3529), S. 499–508.
- Chávez-Cartaya, R.E.; Ramirez, P.; Jamieson, N.V. (1995): Haemoglobin Saturation in the Rat Liver after Ischaemia and Reperfusion: Study Using a Laser Photometry Technique and Correlation with Changes in Liver Tissue Blood Flow. In: *Eur Surg Res* 27 (2), S. 82–92.
- Ciesla, D.J.; Moore, E.E.; Johnson, Jeffrey L.; Burch, J.M.; Cothren, C.C.; Sauaia, A. (2005): A 12-Year Prospective Study of Postinjury Multiple Organ Failure: Has Anything Changed? In: *Arch Surg* 140 (5), S. 432–440.
- Claes, L.; Grass, R.; Schmickal, T.; Kisse, B.; Eggers, C.; Gerngross, H. et al. (2002): Monitoring and healing analysis of 100 tibial shaft fractures. In: *Langenbecks Arch Surg* 387 (3-4), S. 146–152.
- Clark, D.; Krongrad, C.Jr.; Turnbull, S. et al. (1998): Decreased incidence of prostate cancer with selenium supplementation: results of a double-blind cancer prevention trial. In: *BJU Int* 81 (5), S. 730–734.
- Conzen, P.F.; Hobbhahn, J.; Goetz, A.E.M.D; Habazettl, H.; Granetzny, T.; Peter, K.; Brendel, W. (1988): Splanchnic Oxygen Consumption and Hepatic Surface Oxygen Tensions during Isoflurane Anesthesia. In: *Anesthesiology* 69 (5), S. 643–651.
- Cotgreave, I.; Duddy, S.; Kass, G.; Thompson, D.; Moldeus, P. (1989): Studies on the anti-inflammatory activity of ebselen: Ebselen interferes with granulocyte oxidative burst by dual inhibition of nadph oxidase and protein kinase C? In: *Biochem Pharmacol* 38 (4), S. 649–656.
- Cowley, H.C.; Heney, D.; Gearing, A.J.; Hemingway, I.; Webster, N.R. (1994): Increased circulating adhesion molecule concentrations in patients with the systemic inflammatory response syndrome: a prospective cohort study. In: *Crit Care Med* 22 (4), S. 651-7.
- Davies, M.G.; Hagen, P.-O. (1997): Systemic inflammatory response syndrome. In: *Br J Surg* 84 (7), S. 920–935.
- Dimmeler, S.; Brune, B.; Ullrich, V. (1991): Ebselen prevents inositol (1,4,5)-trisphosphate binding to its receptor. In: *Biochem Pharmacol* 42 (5), S. 1151–1153.
- Dixon, E.C.; Clifton, G.L.; Lighthall, J.W.; Yaghamai, A.A.; Hayes, R.L. (1991): A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. In: *J Neurosci Methods* 39 (3), S. 253–262.
- Einhorn, T. A. (1995): Enhancement of fracture-healing. In: *J Bone Joint Surg Am* 77 (6), S. 940-56.
- Elias, H.; Petty, D. (1953): Terminal distribution of the hepatic artery. In: *Anat Rec* 116 (1), S. 9–17.
- Fiebig, E.; Ley, K.; Arfors, K.E. (1991): Rapid leukocyte accumulation by "spontaneous" rolling and adhesion in the exteriorized rabbit mesentery. In: *Int J Microcirc Clin Exp* 10 (2), S. 127–144.
- Flohe, L.; Günzler, W.A.; Schock, H.H. (1973): Glutathione peroxidase: A selenoenzyme. In: *FEBS Letters* 32 (1), S. 132–134.
- Fries, J.W.; Williams, A.J.; Atkins, R.C.; Newman, W.; Lipscomb, M.F.; Collins, T. (1993): Expression of VCAM-1 and E-selectin in an in vivo model of endothelial activation. In: *Am J Pathol* 143 (3), S. 725–737.
- Gando, S.; Kameue, T.; Nanzaki, S.; Nakanishi, Y. (1996): Disseminated intravascular coagulation is a frequent complication of systemic inflammatory response syndrome. In: *Thromb Haemost* 75 (2), S. 224–228.

- Gao, J.-X.A.; Issekutz, Andrew C. (1993): The effect of ebselen on polymorphonuclear leukocyte and lymphocyte migration to inflammatory reactions in rats. In: *Immunopharmacology* 25 (3), S. 239–251.
- Gärtner, R.; Gasnier, B.C.H. (2003): Selenium in the treatment of autoimmune thyroiditis. In: *BioFactors* 19 (3-4), S. 165–170.
- Gawaz, M.; Dickfeld, T.; Bogner, C.; Fateh-Moghadam, S.; Neumann, F. J. (1997): Platelet function in septic multiple organ dysfunction syndrome. In: *Intensive Care Med* 23 (4), S. 379–385.
- Gierer, P.; Hoffmann, J.N.; Mahr, F.; Menger, M.D.; Mittlmeier, T.; Gradl, G.; Vollmar, B. (2008): Sublethal Trauma Model With Systemic Endotoxemia for the Study of Microcirculatory Disorders After the Second Hit. In: *J Surg Res* 147 (1), S. 68–74.
- Gierer, P.; Vollmar, B.; Schaser, K.-D.; Andreas, C.; Gradl, G.; Mittlmeier, T. (2004): Efficiency of small-volume resuscitation in restoration of disturbed skeletal muscle microcirculation after soft-tissue trauma and haemorrhagic shock. In: *Langenbecks Arch Surg* 389 (1), S. 40–45.
- Gladyshev, V.N.; Hatfield, D.L. (1999): Selenocysteine-containing proteins in mammals. In: *J Biomed Sci* 6 (3), S. 151–160.
- Gradl, G.; Gaida, S.; Finke, B.; Lindenblatt, N.; Gierer, P.; Menger, M.D. et al. (2005): Supernatant of traumatized muscle induces inflammation and pain, but not microcirculatory perfusion failure and apoptotic cell death. In: *Shock* 24 (3), S. 219–225.
- Gradl, G.; Gaida, S.; Gierer, P.; Mittlmeier, T.; Vollmar, B. (2004): In vivo evidence for apoptosis, but not inflammation in the hindlimb muscle of neuropathic rats. In: *Pain* 112 (1-2), S. 121–130.
- Gullo, A.; Berlot, G. (1996): Ingredients of Organ Dysfunction or Failure. In: *World J Surg* 20 (4), S. 430–436.
- Harris, A.G.; Skalak, T.C. (1996): Effects of leukocyte capillary plugging in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 271 (6), S. H2653-H2660.
- Harris, A.G.; Steinbauer, M.; Leiderer, R.; Messmer, K. (1997): Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 273 (2), S. H989-H996.
- Harris, B.H.; Gelfand, J.A. (1995): The immune response to trauma. In: *Semin Pediatr Surg* 4 (2), S. 77-82.
- Harrison, D.G. (1997): Cellular and molecular mechanisms of endothelial cell dysfunction. In: *J Clin Invest* 100 (9), S. 2153–2157.
- Harrison, P.M.; Wendon, J.A.; Gimson, A.E.S.; Alexander, G.J.M.; Williams, R. (1991): Improvement by Acetylcysteine of Hemodynamics and Oxygen Transport in Fulminant Hepatic Failure. In: *N Engl J Med* 324 (26), S. 1852–1857.
- Hatfield, D.L.; Gladyshev, V.N. (2002): How Selenium Has Altered Our Understanding of the Genetic Code. In: *Mol Cell Biol* 22 (11), S. 3565–3576.
- Hattori, R.; Inoue, R.; Sase, K.; Eizawa, H.; Kosuga, K.; Aoyama, T. et al. (1994): Preferential inhibition of inducible nitric oxide synthase by ebselen. In: *Eur J Pharmacol* 267 (2), S. R1.
- Hayashi, S.; Takamiya, R.; Yamaguchi, T.; Matsumoto, K.; Tojo, S.J.; Tamatani, T. et al. (1999): Induction of heme oxygenase-1 suppresses venular leukocyte adhesion elicited by oxidative stress: role of bilirubin generated by the enzyme. In: *Circ Res* 85 (8), S. 663–671.
- He, M.; Xing, Shihui, Y., Bo; Zhao, L.; Hua, H.; Liang, Z. et al. (2007): Ebselen attenuates oxidative DNA damage and enhances its repair activity in the thalamus after focal cortical infarction in hypertensive rats. In: *Brain Res* 1181, S. 83–92.

- Heden, 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. In: *Ann Plast Surg* 17 (6), S. 485–488.
- Hernandez, L.A.; Grisham, M.B.; Twohig, B.; Arfors, K.E.; Harlan, J.M.; Granger, D.N. (1987): Role of neutrophils in ischemia-reperfusion-induced microvascular injury. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 253 (3), S. H699-H703.
- Herrmann, K.S. (1983): Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. In: *Microvasc Res* 26 (2), S. 238–249.
- Hildebrand, F.; Pape, H.-C.; Krettek, C. (2005): Die Bedeutung der Zytokine in der posttraumatischen Entzündungsreaktion. In: *Unfallchirurg* 108 (10), S. 793–803.
- Hoffmann, J.N.; Vollmar, B.; Inthorn, D.; Schildberg, F.W.; Menger, M.D. (1999): A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. In: *Shock* 12 (5), S. 355–364.
- Hoffmann, J.N.; Vollmar, B.; Inthorn, D.; Schildberg, F.W.; Menger, M.D. (2000): Antithrombin reduces leukocyte adhesion during chronic endotoxemia by modulation of the cyclooxygenase pathway. In: *Am J Physiol Cell Physiol* 279 (1), S. C98-C107.
- Hulth, A. (1989): Current Concepts of Fracture Healing. In: *Clin Orthop Relat Res*, S. 265–284.
- Ince, C.; Coremans, J.M.; Bruining, H.A. (1992): In vivo NADH fluorescence. In: *Adv Exp Med Biol* 317, S. 277–296.
- Ishii, Y.; Hashimoto, K.; Hirano, K.; Morishima, Y.; Mochizuki, M.; Masuyama, K. et al. (2000): Ebselen Decreases Ozone-Induced Pulmonary Inflammation in Rats. In: *Lung* 178 (4), S. 225–234.
- Issekutz, A.C.; Lopes, N. (1992): Effect of Ebselen on polymorphonuclear leukocyte adhesion to and migration through cytokine-activated vascular endothelium. In: *Int J Immunopharmacol* 14 (8), S. 1383–1390.
- Järvinen, T.A.H.; Järvinen T.L.N.; Kääriäinen, M.; Kalimo, H.; Järvinen, M. (2005): Muscle Injuries: Biology and Treatment. In: *Am J Sports Med* 33 (5), S. 745–764.
- Jennett, B.; Bond, M. (1975): Assessment of outcome after severe brain damage A Practical Scale. In: *Lancet* 305 (7905), S. 480–484.
- Kalayci, M.; Coskun, O.; Cagavi, F.; Kanter, M.; Armutcu, F.; Gul, S.; Acikgoz, B. (2005): Neuroprotective Effects of Ebselen on Experimental Spinal Cord Injury in Rats. In: *Neurochem Res* 30 (3), S. 403–410.
- Kellett, J. (1986): Acute soft tissue injuries-a review of the literature. In: *Med Sci Sports Exerc* 18 (5), S. 489-500.
- Kharbanda, R.K.; Peters, M.; Walton, B.; Kattenhorn, M.; Mullen, M.; Klein, N. et al. (2001): Ischemic Preconditioning Prevents Endothelial Injury and Systemic Neutrophil Activation During Ischemia-Reperfusion in Humans In Vivo. In: *Circulation* 103 (12), S. 1624–1630.
- Kiremidjian-Schumacher, L.; Roy, M.; Wishe, H.I.; Cohen, M.W.; Stotzky, G. (1996): Supplementation with selenium augments the functions of natural killer and lymphokine-activated killer cells. In: *Biol Trace Elem Res* 52 (3), S. 227–239.
- 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. In: *Biomed Tech* 42 (6), S. 168–175.

- Knappe, T.; Mittlmeier, T.; Eipel, C.; Amon, M.; Menger, M.D.; Vollmar, B. (2005): Effect of systemic hypothermia on local soft tissue trauma-induced microcirculatory and cellular dysfunction in mice. In: *Crit Care Med* 33 (8), S. 1805–1813.
- Koller, L.D.; Exon, J.H.; Talcott, P.A.; Osborne, C.A.; Henningsen, G.M. (1986): Immune responses in rats supplemented with selenium. In: *Clin Exp Immunol* 63 (3), S. 570–576.
- Koslowski, L. (Hg.) (1999): Die Chirurgie. Mit 244 Tabellen und 110 Synopsen. 4. Aufl. Stuttgart: Schattauer.
- Kryukov, G.V.; Castellano, S.; Novoselov, S.V.; Lobanov, A.V.; Zehtab, O.; Guigó, R.; Gladyshev, V.N. (2003): Characterization of Mammalian Selenoproteomes. In: *Science* 300 (5624), S. 1439–1443.
- Kubes, P.; Payne, D.; Ostrovsky, L. (1998): Preconditioning and adenosine in I/R-induced leukocyte-endothelial cell interactions. In: *Am J of Physiol Heart Circ Physiol* 274 (4), S. H1230–H1238.
- Kuhl, P.; Borbe, H.; Fischer, H.; Romer, A.; Safayhi, H. (1986): Ebselen reduces the formation of LTB₄ in human and porcine leukocytes by isomerisation to its 5S, 12R-6-trans-isomer. In: *Prostaglandins* 31 (6), S. 1029–1048.
- Kupatt, C.; Habazettl, H.; Zahler, S.; Weber, C.; Becker, B.F.; Messmer, K.; Gerlach, E. (1997a): ACE-inhibition prevents postischemic coronary leukocyte adhesion and leukocyte-dependent reperfusion injury. In: *Cardiovasc Res* 36 (3), S. 386–395.
- Kupatt, C.; Weber, C.; Wolf, D.A.; Becker, B.F.; Smith, T.W.; Kelly, R.A. (1997b): Nitric Oxide Attenuates Reoxygenation-induced ICAM-1 Expression in Coronary Microvascular Endothelium: Role of NFκB. In: *J Mol Cell Cardiol* 29 (10), S. 2599–2609.
- Lenz, A.; Franklin, G.A.; Cheadle, W.G. (2007): Systemic inflammation after trauma. In: *Injury* 38 (12), S. 1336–1345.
- Levin, L.S.; Condit, D.P. (1996): Combined Injuries-Soft Tissue Management. In: *Clin Orthop Relat Res* 327, S. 172–181.
- Liao, F.; Huynh, H.K.; Eiroa, A.; Greene, T.; Polizzi, E.; Muller, W.A. (1995): Migration of monocytes across endothelium and passage through extracellular matrix involve separate molecular domains of PECAM-1. In: *J Exp Med* 182 (5), S. 1337–1343.
- Lighthall, J.W.; Dixon, C.E.; Anderson, T.E. (1989): Experimental Models of Brain Injury. In: *J Neurotrauma* 6 (2), S. 83–97.
- Lindenblatt, N.; Schareck, W.; Belusa, L.; Nickels, R.M.; Menger, M.D.; Vollmar, B. (2003): Anti-oxidant ebselen delays microvascular thrombus formation in the rat cremaster muscle by inhibiting platelet P-selectin expression. In: *Thromb Haemost* 90 (5), S. 882–892.
- Lucchesi, B.R. (1994): Complement, neutrophils and free radicals: mediators of reperfusion injury. In: *Arzneimittelforschung* 44 (3A), S. 420–432.
- Marzi, I.; Takei, Y.; Knee, J.; Menger, M.; Gores, G. J.; Buhren, V. et al. (1990): Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat. In: *Transplant Proc* 22 (4), S. 2004–2005.
- Maulik, N.; Yoshida, T. (2000): Oxidative Stress Developed During Open Heart Surgery Induces Apoptosis: Reduction of Apoptotic Cell Death by Ebselen, a Glutathione Peroxidase Mimic. In: *J Cardiovasc Pharmacol* 36 (5), S. 601–608.
- Maulik, N.; Yoshida, T.; Das, D.K. (1998): Oxidative Stress Developed During the Reperfusion of Ischemic Myocardium Induces Apoptosis. In: *Free Radic Biol Med* 24 (5), S. 869–875.

- McEver, R.P.; Moore, K.L.; Cummings, R.D. (1995): Leukocyte trafficking mediated by selectin-carbohydrate interactions. In: *J Biol Chem* 270 (19), S. 11025–11028.
- Mehallo, C.J.; Drezner, J.A.; Bytowski, J.R. (2006): Practical Management: Nonsteroidal Antiinflammatory Drug (NSAID) Use in Athletic Injuries. In: *Clin J Sport Med* 16 (2), S. 170–174.
- Menger, M.D.; Pelikan, S.; Steiner, D.; Messmer, K. (1992a): Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "reflow paradox". In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 263 (6), S. H1901-H1906.
- Menger, M.D.; Steiner, D.; Messmer, K. (1992b): Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of "no reflow". In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 263 (6), S. H1892-H1900.
- Menth-Chiari, W.A.; Curl, W.W.; Paterson-Smith, B.; Smith, T.L. (1999): Microcirculation of striated muscle in closed soft tissue injury: effect on tissue perfusion, inflammatory cellular response and mechanisms of cryotherapy. A study in rat by means of laser Doppler flow-measurements and intravital microscopy. In: *Unfallchirurg* 102 (9), S. 691–699.
- Menth-Chiari, W.A.; Curl, W.W.; Rosencrance, E.; Smith, T.L. (1998): Contusion of Skeletal Muscle Increases Leukocyte-Endothelial Cell Interactions: An Intravital-Microscopy Study in Rats. In: *J Trauma* 45 (4), S. 709-714.
- Miller, S.; Walker, S.W.; Arthur, J.R.; Nicol, F.; Pickard, K.; Lewin, M.H. et al. (2001): Selenite protects human endothelial cells from oxidative damage and induces thioredoxin reductase. In: *Clin Sci* 100 (5), S. 543–550.
- Miorelli, S.T.; Rosa, R.M.; Moura, D.J.; Rocha, J.C.; Carneiro Lobo, L.A.; Pegas Henriques, J.A.; Saffi, J. (2008): Antioxidant and anti-mutagenic effects of ebselen in yeast and in cultured mammalian V79 cells. In: *Mutagenesis* 23 (2), S. 93–99.
- Mishra, B.; Priyadarsini, K.I.; Mohan, H.; Mugesh, G. (2006): Horseradish peroxidase inhibition and antioxidant activity of ebselen and related organoselenium compounds. In: *Bioorg Med Chem Lett* 16 (20), S. 5334–5338.
- Moncada, S.; Higgs, A. (1993): The L-Arginine-Nitric Oxide Pathway. In: *N Engl J Med* 329 (27), S. 2002–2012.
- Müller, C.; Braun, J. (2004): Basisleitfaden Famulatur & PJ. 2. Aufl. München: Urban & Fischer.
- Muller, W.A.; Weigl, S.A.; Deng, X.; Phillips, D.M. (1993): PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. In: *J Exp Med* 178 (2), S. 449–460.
- Murdock, M.; Murdoch, M.M. (2012): Compartment syndrome: a review of the literature. In: *Clin Podiatr Med Surg* 29 (2), S. 301-310.
- Nogueira, C.W.; Rocha, J.B. (2011): Toxicology and pharmacology of selenium: emphasis on synthetic organoselenium compounds. In: *Arch Toxicol* 85 (11), S. 1313-1359.
- Oestern, H.J.; Tscherne, H. (1983): Pathophysiology and classification of soft tissue damage in fractures. In: *Orthopäde* 12 (1), S. 2–8.
- Ogawa, A.; Yoshimoto, T.; Kikuchi, H.; Sano, K.; Saito, I.; Yamaguchi, T.; Yasuhara, H. (1999): Ebselen in Acute Middle Cerebral Artery Occlusion: A Placebo-Controlled, Double-Blind Clinical Trial. In: *Cerebrovasc Dis* 9 (2), S. 112–118.
- Paddleford, R.R. (1992): Anästhesie bei Kleintieren. Stuttgart/New York: Schattauer.
- Paoloni, J.A.; Orchard, J.W. (2005): The use of therapeutic medications for soft-tissue injuries in sports medicine. In: *MJA* 183 (7), S. 384–388.

- Pape, H.C.; Grotz, M.; Remmers, D.; Dwenger, A.; Vaske, R.; Wisner, D.; Tscherne, H. (1998): Multiple organ failure (MOF) after severe trauma - A sheep model. In: *Intensive Care Med* 24 (6), S. 590-598.
- Pape, H.C.; Remmers, D.; Kleemann, W.; Goris, J.A.; Regel, G.; Tscherne, H. (1994): Posttraumatic multiple organ failure-a report on clinical and autopsy findings. In: *Shock* 2 (3), S. 228-234.
- Pape, H.-C.; Giannoudis, P.V.; Krettek, C.; Trentz, O. (2005): Timing of Fixation of Major Fractures in Blunt Polytrauma: Role of Conventional Indicators in Clinical Decision Making. In: *J Orthop Trauma* 19 (8), S. 551-562.
- Parnham, M.; Graf, E. (1987): Seleno-organic compounds and the therapy of hydroperoxide-linked pathological conditions. In: *Biochem Pharmacol* 36 (19), S. 3095-3102.
- Parnham, M.J. (1990): Biological activities and clinical potential of Ebselen. In: *Adv Exp Med Biol* 264, S. 193-197.
- Patrick, R.A.; Peters, P.A.; Issekutz, A.C. (1993): Ebselen is a specific inhibitor of LTB₄-mediated migration of human neutrophils. In: *Agents Actions* 40 (3-4), S. 186-190.
- Perler, B.A.; Tohmeh, A.G.; Bulkley, G.B. (1990): Inhibition of the compartment syndrome by the ablation of free radical-mediated reperfusion injury. In: *Surgery* 108 (1), S. 40-47.
- Piasecki, E.; Inglot, A.D.; Zielińska-Jencylyk, J.; Młochowski, J.; Syper, L. (1992): Simultaneous induction of interferon gamma and tumor necrosis factor alpha by different seleno-organic compounds in human peripheral blood leukocytes. In: *Arch Immunol Ther Exp* 40 (3-4), S. 229-234.
- Pries, A.R. (1988): A versatile video image analysis system for microcirculatory research. In: *Int J Microcirc Clin Exp* 7 (4), S. 327-345.
- Rao, L.; Puschner, B.; Prolla, T.A. (2001): Gene Expression Profiling of Low Selenium Status in the Mouse Intestine: Transcriptional Activation of Genes Linked to DNA Damage, Cell Cycle Control and Oxidative Stress. In: *J Nutr* 131 (12), S. 3175-3181.
- Roesken, F.; Ruecker, M.; Vollmar, B.; Boeckel, N.; Morgenstern, E.; Menger, M.D. (1997): A new model for quantitative in vivo microscopic analysis of thrombus formation and vascular recanalisation: the ear of the hairless (hr/hr) mouse. In: *Thromb Haemost* 78 (5), S. 1408-1414.
- Rommens, P.M.; Broos, P.L. (1992): The significance of soft tissue trauma for fracture healing. A prospective study on 70 tibial shaft fractures following primary treatment with the Monofixateur. In: *Unfallchirurg* 95 (3), S. 133-141.
- Rommens, P.M.; Claes, P.; Boodt, P.; Stappaerts, K.H.; de Broos, P.L. (1994): Therapeutic procedure and long-term results in tibial pilon fracture in relation to primary soft tissue damage. In: *Unfallchirurg* 97 (1), S. 39-46.
- Rücker, M.; Roesken, F.; Schäfer, T.; Spitzer, W.J.; Vollmar, B.; Menger, M.D. (1999): In vivo analysis of the microcirculation of osteomyocutaneous flaps using fluorescence microscopy. In: *Br J Plast Surg* 52 (8), S. 644-652.
- Rücker, M.; Strobel, O.; Vollmar, B.; Roesken, F.; Menger, M. D. (2000): Vasomotion in critically perfused muscle protects adjacent tissues from capillary perfusion failure. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279 (2), S. H550-H558.
- Ruffmann, R.; Wendel, A. (1991): GSH rescue by N-acetylcysteine. In: *Klin Wochenschr* 69 (18), S. 857-862.

- Safayhi, H.; Tiegs, G.; Wendel, A. (1985): A novel biologically active seleno-organic compound—V Inhibition by ebselen (PZ 51) of rat peritoneal neutrophil lipoxygenase. In: *Biochem Pharmacol* 34 (15), S. 2691–2694.
- Saito, I.; Asano, T.; Sano, K.; Takakura, K.; Abe, H.; Yoshimoto, T. et al. (1998): Neuroprotective Effect of an Antioxidant, Ebselen, in Patients with Delayed Neurological Deficits after Aneurysmal Subarachnoid Hemorrhage. In: *Neurosurgery* 42 (2), S. 269–277.
- Salonen, J.T.; Alfthan, G.; Huttunen, J.K.; Pikkarainen, J.; Puska, P. (1982): Association between cardiovascular death and myocardial infarction and serum selenium in a matched-pair longitudinal study. In: *Lancet* 320 (8291), S. 175–179.
- Schaser, K.-D.; Bail, H.J.; Schewior, L.; Stover, J.F.; Melcher, I.; Haas, N.P.; Mittlmeier, T. (2005): Acute effects of N-acetylcysteine on skeletal muscle microcirculation following closed soft tissue trauma in rats. In: *J Orthop Res* 23 (1), S. 231–241.
- Schaser, K.-D.; Vollmar, B.; Menger, M.D.; Schewior, L.; Kroppenstedt, S.N.; Raschke, M. et al. (1999): In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury. In: *J Orthop Res* 17 (5), S. 678–685.
- Schewe, T. (1995): Molecular actions of Ebselen - an antiinflammatory antioxidant. In: *Gen Pharmacol: The Vascular System* 26 (6), S. 1153–1169.
- Sies, H. (1994): Ebselen: A glutathione peroxidase mimic. In: *Methods Enzymol* 234, S. 476–482.
- Steinbauer, M.; Harris, A.G.; Abels, C.; Messmer, K. (2000): Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. In: *Langenbecks Arch Surg* 385 (4), S. 290–298.
- Steinmann, H.-J.; Allwang, D. (2009): Verletzungen im Sport. Vermeiden, behandeln, therapieren. 1. Aufl. München/Jena: Elsevier, Urban & Fischer.
- Soriano-Garcia M. (2004): Organoselenium compounds as potential therapeutic and chemopreventive agents: a review. In: *Curr Med Chem* 11 (12), S. 1657–1669.
- Tabuchi, Y.; Sugiyama, N.; Horiuchi, T.; Furusawa, M.; Furuhashi, K. (1995): Ebselen, a seleno-organic compound, protects against ethanol-induced murine gastric mucosal injury in both in vivo and in vitro systems. In: *Eur J Pharmacol* 272 (2-3), S. 195–201.
- Thorsson, O.; Rantanen, J.; Hurme, T.; Kalimo, H. (1998): Effects of Nonsteroidal Antiinflammatory Medication on Satellite Cell Proliferation During Muscle Regeneration. In: *Am J Sports Med* 26 (2), S. 172–176.
- Tiegs, G.; Küsters, S.; Künstle, G.; Hentze, H.; Kiemer, A.K.; Wendel, A. (1998): Ebselen Protects Mice Against T Cell-Dependent, TNF-Mediated Apoptotic Liver Injury. In: *J Pharmacol Exp Ther* 287 (3), S. 1098–1104.
- Tyml, K.; Budreau, C. H. (1991): A new preparation of rat extensor digitorum longus muscle for intravital investigation of the microcirculation. In: *Int J Microcirc Clin Exp* 10 (4), S. 335–343.
- Uslu, M.; Kılınçoğlu, V.; Toker, S.; Kalender, A.M.; Doğan, A.; Sebik, A. (2010): Comparison of anti-edema effects of iloprost and diclofenac sodium on traumatic rat paw edema. In: *Acta Orthop Traumatol Turc* 44 (6), S. 484–491.
- van der Laan, L.; Kapitein, P.J.C.; Oyen, W.J.G.; Verhofstad, A.A.J.; Hendriks, T.; Goris, R.J.A. (1997): A Novel Animal Model to Evaluate Oxygen Derived Free Radical Damage in Soft Tissue. In: *Free Radic Res* 26 (4), S. 363–372.

- Vollmar, B.; Conzen, P.; Habazettl, H.; Adili, F.; Peter, K. (1995): Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart. In: *Anesth Analg* 80 (2), S. 249–255.
- Vollmar, B.; Preissler, G.; Menger, M. D. (1994): Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas. In: *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 267 (5), S. H1936-H1940.
- Vollmar, B.; Burkhardt, M.; Minor, T.; Klauke, H.; Menger, M.D. (1997): High-Resolution Microscopic Determination of Hepatic NADH Fluorescence for in Vivo Monitoring of Tissue Oxygenation during Hemorrhagic Shock and Resuscitation. In: *Microvasc Res* 54 (2), S. 164–173.
- Vollmar, B.; Conzen, P.F.; Kerner, T.; Habazettl, H.; Vierl, M.; Waldner, H.; Peter, K. (1992): Blood Flow and Tissue Oxygen Pressures of Liver and Pancreas in Rats. In: *Anesth Analg* 75 (3), S. 421–430.
- Wagner, G.; Schuch, G.; Akerboom, T.; Sies, H. (1994): Transport of ebselen in plasma and its transfer to binding sites in the hepatocyte. In: *Biochem Pharmacol* 48 (6), S. 1137–1144.
- Wakefield, C.H.; Carey, P.D.; Foulds, S.; Monson, J.R.T.; Guillou, P.J. (1993): Polymorphonuclear Leukocyte Activation: An Early Marker of the Postsurgical Sepsis Response. In: *Arch Surg* 128 (4), S. 390–395.
- Wang, J.-F.; Komarov, P.; Sies, H.; de Groot, H. (1992): Inhibition of superoxide and nitric oxide release and protection from reoxygenation injury by ebselen in rat kupffer cells. In: *Hepatology* 15 (6), S. 1112–1116.
- Wendel, A.; Fausel, M.; Safayhi, H.; Tiegs, G.; Otter, R. (1984): A novel biologically active seleno-organic compound—II Activity of PZ 51 in relation to Glutathione Peroxidase. In: *Biochem Pharmacol* 33 (20), S. 3241–3245.
- Wendel, A.; Kuesters, S.; Tiegs, G. (1997): Ebselen - an in vivo immune response modifier. In: *Biomed Environ Sci* 10 (2-3), S. 253–259.
- Westermann, S.; Vollmar, B.; Thorlacijs, H.; Menger, M.D (1999): Surface cooling inhibits tumor necrosis factor- α -induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. In: *Surgery* 126 (5), S. 881–889.
- Wong, C.H.Y.; Bozinovski, S.; Hertzog, P.J.; Hickey, M.J.; Crack, P.J. (2008): Absence of glutathione peroxidase-1 exacerbates cerebral ischemia-reperfusion injury by reducing post-ischemic microvascular perfusion. In: *J Neurochem* 107 (1), S. 241–252.
- Yamagata, K.; Ichinose, S.; Miyashita, A.; Tagami, M. (2008): Protective effects of ebselen, a seleno-organic antioxidant on neurodegeneration induced by hypoxia and reperfusion in stroke-prone spontaneously hypertensive rat. In: *Neuroscience* 153 (2), S. 428–435.
- Yamaguchi, T.; Sano, K.; Takakura, K.; Saito, I.; Shinohara, Y.; Asano, T.; Yasuhara, H. (1998): Ebselen in Acute Ischemic Stroke. A Placebo-Controlled, Double-blind Clinical Trial. In: *Stroke* 29 (1), S. 12–17.
- Yoshizawa, K.; Ascherio, A.; Morris, J.S.; Stampfer, M.J.; Giovannucci, E.; Baskett, C.K. et al. (2003): Prospective Study of Selenium Levels in Toenails and Risk of Coronary Heart Disease in Men. In: *Am J Epidemiol* 158 (9), S. 852–860.
- Yoshizawa, K.; Willett, W. C.; Morris, S. J.; Stampfer, M. J.; Spiegelman, D.; Rimm, E. B.; Giovannucci, E. (1998): Study of prediagnostic selenium level in toenails and the risk of advanced prostate cancer. In: *J Natl Cancer Inst* 90 (16), S. 1219–1224.
- Zeintl, H.; Sack, F. U.; Intaglietta, M.; Messmer, K. (1989): Computer assisted leukocyte adhesion measurement in intravital microscopy. In: *Int J Microcirc Clin Exp* 8 (3), S. 293–302.

Zhang, L.; Bail, H.; Mittlmeier, T.; Haas, Norbert P.; Schaser, K.-D. (2003): Immediate Microcirculatory Derangements in Skeletal Muscle and Periosteum after Closed Tibial Fracture. In: *J Trauma* 54 (5), S. 979–985.

Ziltener, J.-L.; Leal, S.; Fournier, P.-E. (2010): Non-steroidal anti-inflammatory drugs for athletes: An update. In: *Ann Phys Rehabil Med* 53 (4), S. 278–288.

Zimmerman, G. A.; McIntyre, T. M.; Prescott, S. M. (1996): Adhesion and signaling in vascular cell-cell interactions. In: *J Clin Invest* 98 (8), S. 1699–1702.

Zimmerman, G.A.; Prescott, S.M.; McIntyre, T.M. (1992): Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. In: *Immunol Today* 13 (3), S. 93–100.

9 Lebenslauf

Persönliches

Name: Julia Röther
 Geburtsdatum: 17. März 1984
 Geburtsort: Bützow
 Staatsangehörigkeit: deutsch
 Familienstatus: ledig, Söhne Moritz [* 30.07.2010] & Jonas [* 22.01.2012]

Schulbildung

1990 - 1994 Grundschule Redefin
 1994 - 2003 Robert-Stock-Gymnasium Hagenow
 07/2003 Abitur

Hochschulbildung

10/2003 Aufnahme des Medizinstudiums an der Universität Rostock
 08/2005 Ärztliche Vorprüfung an der Universität Rostock
 08/2008 - 06/2009 Praktisches Jahr
 10/2009 Ärztliche Prüfung an der Universität Rostock

Promotion

03/2008 - 12/2011 Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Berufserfahrung

01/2010 - 08/2011 Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe, Paul-Gerhardt-Stift
 Lutherstadt Wittenberg
 seit 09/2011 Klinik für Chirurgie, Kantonsspital St. Gallen/Schweiz

Publikation

Gierer, P.; **Röther, J.**; Mittlmeier, T.; Gradl, G.; Vollmar, B. (2010): Ebselen reduces inflammation and microvascular perfusion failure after blunt skeletal muscle injury of the rat. In: *J Trauma* 68, S. 853-858.

10 Danksagung

Mein herzlichster Dank gilt all denjenigen, die mich tatkräftig und leitend bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt und damit zu deren Gelingen wesentlich beigetragen haben.

Zunächst danke ich Prof. Dr. T. Mittlmeier für die Überlassung des Dissertationsthemas.

Frau Prof. B. Vollmar danke ich für die Möglichkeit, die Experimente an ihrem Institut durchführen zu können. Zudem danke ich ihr für die ständige Bereitschaft, mir mit ihrem beeindruckenden Sachverstand und konstruktiver Kritik zur Seite zu stehen. Dank Frau Prof. B. Vollmar konnte ich grundlegende Elemente des wissenschaftlichen Arbeitens erlernen.

Meinem Betreuer, Philip Gierer, danke ich für die unkomplizierte Einarbeitung in das Tiermodell und das stets umfassende Engagement.

Ein besonderer Dank gilt auch den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Instituts für Experimentelle Chirurgie, Berit Blendow, Doris Butzlaff, Dorothea Frenz, Maren Nerowski, und Dr. rer. nat. Christian Eipel, die mich, wann immer Fragen auftraten, mit Rat und Tat unterstützten und ohne deren unerlässlichen Einsatz diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Für die Aufzucht und Pflege der für die Arbeit notwendigen Versuchstiere danke ich den Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern der Zentralen Versuchstierhaltung Kathrin Sievert, Karin Gerber und Reinhard Schwärmer.

Für die hilfreiche und produktive Zusammenarbeit während vieler gemeinsamer Stunden im Labor danke ich meinem Mitdoktoranden Fabian Laue.

Schließlich gilt mein Dank auch meiner Familie und meinen Freunden, die mich auf dem langen Weg dieser Arbeit unermüdlich motiviert, begleitet und in besonderem Maße zum erfolgreichen Abschluss der vorliegenden Arbeit beigetragen haben.

Vielen Dank!

11 Thesen zur Dissertation

1. Die traumatische Weichteilverletzung hat wesentlichen Einfluss auf das Heilungsergebnis und bestimmt maßgeblich die Prognose im Verlauf komplexer Extremitätenverletzungen. Klinische Studien geben Hinweis auf einen Zusammenhang zwischen der Schwere des frakturbegleitenden Weichteilschadens und einer verzögerten Heilung des Knochengewebes.
2. Skelettmuskelgewebe ist im Rahmen von Weichteiltraumata häufiger betroffen, die Relevanz anderer Weichteilverletzungen ist in Relation als geringer einzuschätzen.
3. Spätfolgen, wie nicht erkannte Nekrosen oder revisionspflichtige Hämatome, können sich sehr komplikationsreich entwickeln und geben nicht selten Anlass zu ausgedehnten operativen Eingriffen und langwieriger Nachbehandlung.
4. Neben dem mikrovaskulären Perfusionsversagen und der inflammatorisch bedingten Einwanderung von Neutrophilen trägt auch der Verlust der endothelialen Integrität im Kapillarbett wesentlich zur Weichteilschädigung bei. Im klinischen Alltag ist es deshalb zentrale Aufgabe, diesen Teufelskreis zu durchbrechen, um den posttraumatischen Verlauf und die Heilungsergebnisse gezielt positiv zu beeinflussen.
5. Der günstige Einfluss der selenorganischen Substanz Ebselen auf das geschlossene Weichteiltrauma und dem resultierenden sekundären Gewebsschaden konnte innerhalb der vorliegenden tierexperimentellen Studie nachgewiesen werden.
6. Dazu sind männliche *Sprague-Dawley*-Ratten - unterteilt in vier experimentelle Gruppen - einem etablierten Traumainduktionsmodell unterzogen und mit Ebselen (30mg/kg KG) bzw. DMSO intraperitoneal therapiert worden. Nach einem Zeitraum von 24 h erfolgte die intravitalmikroskopische Untersuchung des präparierten *M. extensor digitorum longus*.
7. Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ist festzustellen, dass die Applikation des Substrates Ebselen eine effektive Behandlungsstrategie der durch Trauma induzierten Mikrozirkulationsstörungen darstellt.

8. So konnte im Rahmen der Ebselensubstitution die funktionelle Kapillardichte aufrechterhalten, die Gefäßpermeabilität gesenkt und somit die Gewebeoxygenierung deutlich verbessert werden.
9. Ebenso konnte die traumatisch bedingte Zahl apoptotischer Zellen unter Ebselen reduziert werden.
10. Die Therapie geschlossener Weichteiltraumen mittels Ebselen unterstützt den Regenerationsprozess des verletzten Gewebes und reduziert die sekundäre, entzündungsbedingte Schädigung.

12 Eidesstattliche Erklärung

Ich erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Arbeit von mir selbstständig und nur unter Benutzung der angegebenen Quellen und Hilfsmittel erstellt worden ist. Die den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen sind als solche kenntlich gemacht.

Ich versichere weiterhin, dass diese Arbeit nicht vorher und auch nicht gleichzeitig bei einer anderen als der Medizinischen Fakultät der Universität Rostock zur Eröffnung eines Promotionsverfahrens eingereicht worden ist.

St. Gallen, den 30.03.2012

Julia Röther

