

Aus dem Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock

Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar

# **Der Einfluss von Antithrombin III auf das geschlossene Weichteiltrauma bei Endotoxinämie**



Inauguraldissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der Universität Rostock

vorgelegt von

Fabian Laue

aus Bad Oldesloe

Rostock, 16. Mai 2012

Dekan: Prof. Dr. med. Emil Christian Reisinger

1. Gutachter: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar  
Institut für Experimentelle Chirurgie mit Zentraler Versuchstierhaltung, Universität Rostock
2. Gutachter: PD Dr. med. Philip Gierer  
Chirurgische Klinik und Poliklinik Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie,  
Universitätsmedizin Rostock
3. Gutachter: Prof. Dr. med. Klaus-Dieter Schaser  
Centrum für Muskuloskeletale Chirurgie, Klinik für Unfall - und Wiederherstellungschirurgie,  
Charité - Universitätsmedizin Berlin

Tag der Verteidigung: 05.06.2013

**INHALTSVERZEICHNIS**

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>III</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>VI</b>
<b>1 Abstract.....</b>	<b>1</b>
<b>2 Zusammenfassung.....</b>	<b>3</b>
<b>3 Einleitung.....</b>	<b>5</b>
3.1 Das schwere Skelettmuskeltrauma .....	5
3.1.1 Anatomie und Funktion des Skelettmuskels .....	5
3.1.2 Pathophysiologie des traumatischen Muskelschadens .....	7
3.1.3 Offenes und geschlossenes Weichteiltrauma.....	8
3.1.4 Muskelregeneration nach traumatischer Schädigung.....	9
3.1.5 Systemische Folgeerscheinungen nach schwerem Weichteiltrauma ...	10
3.1.5.1 Inflammation .....	11
3.1.5.2 Blutgerinnung .....	12
3.1.5.3 SIRS und Multiorganversagen nach Trauma.....	13
3.1.6 Therapie des Weichteiltraumas .....	14
3.2 Antithrombin III (ATIII).....	16
3.2.1 ATIII, Heparin und Blutgerinnung .....	16
3.2.2 ATIII und Antiinflammation .....	17
<b>4 Ziel der Studie.....</b>	<b>20</b>
<b>5 Material und Methodik.....</b>	<b>21</b>
5.1 Versuchstiere .....	21
5.2 Modell .....	21
5.2.1 Anästhesie.....	21
5.2.2 Induktion des geschlossenen Weichteiltraumas.....	21
5.2.3 Endotoxinämie und Applikation von ATIII .....	23
5.2.4 Chirurgische Präparation.....	24
5.3 Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll.....	26
5.3.1 Experimentelle Gruppen .....	26
5.3.2 Experimentelles Protokoll .....	27

---

5.4 Untersuchungstechniken.....	28
5.4.1 Makrohämodynamisches Monitoring .....	28
5.4.2 Mikrohämodynamik .....	29
5.4.2.1 Grundlagen der intravitalem Multifluoreszenzmikroskopie in Epi- Illuminationstechnik.....	29
5.4.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe .....	32
5.4.2.3 Geräteanordnung .....	32
5.4.2.4 Durchführung der intravitalem Multifluoreszenzmikroskopie .....	34
5.4.3 Untersuchung der muskulären Mikrozirkulation und Apoptose.....	35
5.4.3.1 Funktionelle Kapillardichte.....	35
5.4.3.2 NADH-Autofluoreszenz .....	35
5.4.3.3 Leukozyten-Endothelzellinteraktion .....	36
5.4.3.4 Gefäßpermeabilität .....	36
5.4.3.5 Gefäßdurchmesser und Erythrozytenfließgeschwindigkeit.....	37
5.4.3.6 Apoptose .....	37
5.4.4 Asservierung von Blut und Gewebe .....	38
5.4.5 Blutanalysen.....	38
5.4.6 Histologische Analysen und Feucht-Trockengewicht Ratio des Muskels .....	39
5.5 Statistische Analysen .....	41
<b>6 Ergebnisse .....</b>	<b>42</b>
6.1 Makrohämodynamik.....	42
6.2 Muskuläre Mikrozirkulation und Apoptose.....	42
6.2.1 Funktionelle Kapillardichte und NADH-Autofluoreszenz.....	42
6.2.2 Leukozyten-Endothelzellinteraktion .....	44
6.2.3 Gefäßpermeabilität.....	46
6.2.4 Gefäßdurchmesser und Erythrozytenfließgeschwindigkeit.....	48
6.2.5 Apoptose .....	48
6.3 Blutuntersuchungen .....	49
6.3.1 Blutgasanalyse .....	49
6.3.2 Kleines Blutbild .....	50
6.3.3 Interleukin-6.....	52
6.3.4 Blutgerinnung .....	52
6.4 Histologie und Feucht-Trockengewicht Ratio des Muskels .....	54

---

<b>7 Diskussion .....</b>	<b>58</b>
7.1 Diskussion von Material und Methodik.....	58
7.2 Diskussion der Ergebnisse.....	67
7.3 Klinische Perspektiven .....	79
<b>8 Literaturverzeichnis .....</b>	<b>82</b>
<b>9 Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>97</b>
<b>10 Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>100</b>
<b>11 Lebenslauf .....</b>	<b>101</b>
<b>12 Danksagung.....</b>	<b>103</b>
<b>Thesen zur Dissertation .....</b>	<b>X</b>
<b>Eidesstattliche Erklärung.....</b>	<b>XIII</b>

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

°C	Grad Celsius
Abb.	Abbildung
ADP	Adenosindiphosphat
ANOVA	Analysis of variance, Varianzanalyse
ATIII	Antithrombin III
aU	Arbitrary unit, arbiträre Einheit
BE	Base excess, Basenüberschuss
BGA	Blutgasanalyse
CAE	Chlor-Acetatesterase
CD	Cluster of differentiation, immunphänotypische Oberflächenmerkmale
DIC	Disseminated intravascular coagulation, Verbrauchskoagulopathie
EDRF	Endothelium-derived relaxant factor
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EFG	Erythrozytenfließgeschwindigkeit
et al.	et alii, und andere
EZG	Echtzeitgenerator
FCD	Functional capillary density, funktionelle Kapillardichte
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
GF	Gesichtsfeld
h	Hour, Stunde
Hb	Hämoglobin
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hkt	Hämatokrit
HPF	High power field, Gesichtsfeld in 400facher Vergrößerung
HR	Heart rate, Herzfrequenz
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
i.p.	intraperitoneal
i.v.	intravenös
ICAM	Intercellular adhesion molecule
ID	Inner diameter, Innendurchmesser
IgM	Immunglobulin M
IL	Interleukin

---

IU	International unit, internationale Einheit
IVM	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
JAM	Junctional adhesion molecule
K <sup>+</sup>	Kalium
KG	Körpergewicht
LBP	Lipopolysaccharid bindendes Protein
LEI	Leukozyten-Endothelzell-Interaktion
LFA-1	Lymphocyte function-associated antigen 1 (CD11a)
LPS	Lipopolysaccharid
M.	Musculus, Muskel
MADCAM 1	Mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MD2	Lymphozyten-Antigen 96
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MODS	Multiple organ dysfunction syndrome
MOF	Multiple organ failure
ms	Millisekunde
MW	Mittelwert
n	Stück, Anzahl
Na <sup>+</sup>	Natrium
NaCl	Kochsalzlösung
NAD <sup>+</sup>	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, oxidierte Form
NADH	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid, reduzierte Form
NF-κB	Kernfaktor κB
NO	Stickstoffmonoxid
OD	Outer diameter, Außendurchmesser
p	Statistisches Signifikanzniveau
PaCO <sub>2</sub>	Kohlendioxid-Partialdruck
PAF	Platelet activating factor
PE	Polyethylen
PECAM 1	Platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1
pg	Picogramm
PGI <sub>2</sub>	Prostazyklin
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase

---

pO <sub>2</sub>	Sauerstoffpartialdruck
PSGL 1	P-selectin glycoprotein ligand 1
PTT	Partielle Thromboplastinzeit
rhAPC	Rekombinantes aktiviertes Protein C
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
SD	Standard deviation, Standardabweichung
SEM	Standard error of the mean, Standardfehler
SIRS	Systemic inflammatory response syndrome
Tab.	Tabelle
TdT	Terminale Deoxynucleotidyl-Transferase
TF	Tissue factor
TFPI	Tissue factor pathway inhibitor
TLR	Toll-like Rezeptor
TM	Thrombomodulin
TNF $\alpha$	Tumornekrosefaktor $\alpha$
TNFR1	Tumornekrosefaktor-Rezeptor 1
TPZ	Thromboplastinzeit (Quick)
TRY <sup>49</sup> -AT	Tryptophan <sup>49</sup> -blockiertes ATIII
UV	ultraviolett
VLA-4	Very late antigen-4
vs.	versus
W	Watt



## 1 ABSTRACT

The endogenous serpin Antithrombin III (AT III) is known as an important inhibitor of blood coagulation. Its effect is based on the inhibition of a variety of serine proteases of plasmatic coagulation. In addition to anticoagulant effects studies have also demonstrated significant anti-inflammatory properties of ATIII.

The present study investigated the anti-inflammatory effects of ATIII in the peripheral skeletal muscle after severe closed soft tissue trauma in an experimental animal approach. In addition to the soft tissue trauma, sublethal endotoxemia was induced to reproducibly simulate septic conditions in the sense of a 'second hit' which is often observed in the clinical course of severe trauma. The trauma-related changes in skeletal muscle microcirculation and morphology were characterized and quantified by high-resolution intravital multicolor fluorescence microscopy as well as by histological and laboratory parameters.

27 of 34 animals received a closed soft tissue trauma (T) in the left hind leg, applied by means of a "Controlled impact device". Six hours after trauma endotoxemia (E) was induced via intraperitoneal administration of LPS (T/E, n=7). Animals were treated by an intravenous injection of ATIII (T/Th, n=6 and T/E/Th, n=7) simultaneously to the induction of endotoxemia. 24 hours after trauma intravital multicolor fluorescence microscopy of the traumatized extensor digitorum longus muscle was performed. Functional capillary density (FCD), NADH tissue autofluorescence and venular leucocyte adherence were analyzed. Control animals (K, n=7) received no trauma. Instead of endotoxemia and ATIII equivalent amounts of physiological saline were administered.

Both the traumatic soft tissue injury (T) and trauma in combination with systemic administration of LPS (T/E) were characterized by reduced nutritive perfusion (FCD: T  $383 \pm 15$ ; T/E  $379 \pm 20$  cm/cm<sup>2</sup>), tissue hypoxia (NADH: T  $80 \pm 3$ ; T/E  $77 \pm 4$  aU), and increased numbers of venular adherent leucocytes (T  $686 \pm 37$ ; T/E  $773 \pm 35$  n/mm<sup>2</sup>). Treatment with ATIII improved the microcirculatory and microvascular dysfunction in the traumatized muscle after 18 hours, both with and without endotoxemia (FCD: T/Th  $438 \pm 29$ ; T/E/Th  $469 \pm 22$  cm/cm<sup>2</sup>; NADH: T/Th  $56 \pm 3$ ; T/E/Th  $61 \pm 5$  aU; adherent leucocytes: T/Th  $176 \pm 37$ ; T/E/Th  $237 \pm 20$  n/mm<sup>2</sup>). When compared to the control group (K: FCD  $573 \pm 13$  cm/cm<sup>2</sup>; NADH  $56 \pm 2$  aU; adherent leucocytes  $204 \pm 20$

n/mm<sup>2</sup>), ATIII-therapy caused almost physiological values of tissue oxygenation and of inflammatory cell response in the muscle. Microvascular perfusion improved significantly after ATIII treatment compared with T and T/E.

In summary the present study shows an improvement of microvascular perfusion and tissue oxygenation after severe closed soft tissue injury and endotoxemia by ATIII-therapy. Furthermore, the cellular inflammatory response was significantly reduced by ATIII therapy. Therefore ATIII, already a long-approved and clinically used drug, could be used in the treatment of closed skeletal muscle trauma in the future.

## 2 ZUSAMMENFASSUNG

Das endogene Serpin Antithrombin III (ATIII) ist als bedeutender zentral wirkender Hemmstoff der Blutgerinnung bekannt. Seine Wirkung kommt über die Inhibition einer Vielzahl von Serinproteasen der plasmatischen Gerinnung zustande. Neben der Gerinnungshemmung konnten im Rahmen von experimentellen Studien auch bedeutende antiinflammatorische Eigenschaften von ATIII nachgewiesen werden.

Die vorliegende Studie untersuchte erstmalig in einem tierexperimentellen Ansatz den antiinflammatorischen Effekt von ATIII in der peripheren Skelettmuskulatur nach schwerem geschlossenem Weichteiltrauma. Eine zusätzlich zum Trauma induzierte sublethale Endotoxinämie simulierte reproduzierbar einen septischen Zustand im Sinne eines ‚second hit‘, wie er im klinischen Verlauf nach schwerem Trauma häufig zu beobachten ist. Die traumatisch bedingten Veränderungen der Skelettmuskulatur wurden sowohl durch die hochauflösende intravitale Multifluoreszenz-Mikroskopie als auch durch histologische und laborchemische Parameter charakterisiert und quantifiziert.

Von 34 Versuchstieren erhielten 27 ein mit einem „Controlled impact device“ induziertes schweres geschlossenes Weichteiltrauma (T) am linken Hinterlauf. Sechs Stunden nach dem Trauma erfolgte die Induktion der Endotoxinämie durch intraperitoneale Applikation von LPS (T/E; n=7). Zeitgleich zur Induktion der Endotoxinämie wurde per intravenöser Injektion mit ATIII therapiert (T/Th; n=6 und T/E/Th; n=7). Vierundzwanzig Stunden nach Trauma erfolgte die intravitale Multifluoreszenzmikroskopie des geschlossen traumatisierten M. extensor digitorum longus sinister mit Erfassung der funktionellen Kapillardichte (FCD), der NADH-Gewebeautofluoreszenz und der venulären Leukozytenadhärenz. Kontrolltiere (K; n=7) erhielten kein Trauma und statt Endotoxinämie und ATIII äquivalente Mengen physiologischer Kochsalzlösung.

Der traumatisch bedingte Weichteilschaden (T) allein und in Kombination mit Endotoxinämie (T/E) war durch nutritives Perfusionsversagen (FCD: T  $383 \pm 15$ ; T/E  $379 \pm 20$  cm/cm<sup>2</sup>), Gewebehypoxie (NADH: T  $80 \pm 3$ ; T/E  $77 \pm 4$  aU) und inflammatorische Leukozytenadhärenz (T  $686 \pm 37$ ; T/E  $773 \pm 35$  n/mm<sup>2</sup>) charakterisiert. Die Therapie mit ATIII führte nach 18h zu einer Reduktion der Mikrozirkulationsstörungen im

traumatisierten Muskel mit und ohne Endotoxinämie (FCD: T/Th  $438\pm 29$ ; T/E/Th  $469\pm 22$  cm/cm<sup>2</sup>; NADH: T/Th  $56\pm 3$ ; T/E/Th  $61\pm 5$  aU; Leukozytenadhärenz: T/Th  $176\pm 37$ ; T/E/Th  $237\pm 20$  n/mm<sup>2</sup>). Unter Therapie mit ATIII kam es, verglichen mit der Kontrollgruppe (K: FCD  $573\pm 13$  cm/cm<sup>2</sup>; NADH  $56\pm 2$  aU; Leukozytenadhärenz  $204\pm 20$  n/mm<sup>2</sup>), zu einer annähernd gleich hohen Gewebeoxygenierung und vergleichbar geringen Leukozytenadhärenz im Muskel. Die mikrovaskuläre Perfusion verbesserte sich nach Therapie gegenüber T und T/E signifikant.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass in der vorliegenden Arbeit erstmals eine Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion und somit auch der Gewebeoxygenierung nach schwerem geschlossenem Weichteiltrauma mit Endotoxinämie und ATIII-Therapie nachgewiesen werden konnte. Weiterhin wurde die zelluläre Entzündungsreaktion durch die ATIII-Therapie signifikant reduziert. Die Ergebnisse der Studie weisen darauf hin, dass ATIII als seit langem zugelassenes und klinisch eingesetztes Medikament künftig auch in der Therapie der geschlossenen traumatisierten Skelettmuskulatur Anwendung finden könnte.

### 3 EINLEITUNG

#### 3.1 Das schwere Skelettmuskeltrauma

Bei einem Großteil traumatischer Verletzungen im Sport- und Freizeitbereich sowie bei Arbeits- und Verkehrsunfällen ist die Skelettmuskulatur mitbeteiligt (*SMITH et al. 2008, GHALY & MARSH 2010*). Über 90% aller Sportverletzungen sind Muskelkontusionen oder -zerrungen (*KIEB et al. 2010*). Besonders häufig ist die untere Extremität betroffen. Verletzungen dieser Körperregion sind eine führende Ursache traumatologischer Einweisungen und stellen zudem die häufigste Teilverletzung polytraumatisierter Patienten dar (*RUCHHOLTZ et al. 1996, ZELLE et al. 2005*).

Das schwere Trauma und seine Folgeerscheinungen sind in Deutschland und der westlichen Welt eine der Haupttodesursachen unter 45 Lebensjahren (*WICK et al. 1997, KEEL & TRENTZ 2005, HIETBRINK et al. 2006*). Die Schwere der Weichteilbeteiligung ist bei Extremitätenverletzungen von besonderer prognostischer Bedeutung (*SCHASER et al. 1999*). In einem gut perfundierten und infektfreien Weichteilmantel können selbst schwerste Frakturen mit knöchernem Substanzverlust ausheilen (*SCHWABE et al. 2010*). Prognostisch besonders bedeutsam ist neben den primären Traumafolgen v.a. der Einfluss der Trauma-assoziierten Immunreaktion im geschädigten Gewebe und Organismus (*HIETBRINK et al. 2006*).

Für die erfolgreiche Behandlung muskulärer Weichteilverletzungen ist es wichtig, zu Grunde liegende Schädigungsmechanismen zu kennen und zelluläre Vorgänge im Rahmen der Wundheilung zu verstehen, um davon abgeleitet geeignete Therapiestrategien zu finden (*SMITH et al. 2008*). Die vorliegende tierexperimentelle Studie beschäftigt sich mit Antithrombin III, einer aufgrund seiner antiinflammatorischen Potenz vielversprechenden Therapieoption bei geschlossenem Kontusions-trauma und der damit verbundenen (systemischen) Entzündungsreaktion.

##### 3.1.1 Anatomie und Funktion des Skelettmuskels

Die Struktur der Skelettmuskulatur kann vereinfacht in zwei wesentliche Komponenten, die zur Kontraktion befähigten Muskelfasern und das diese umgebende Bindegewebe, unterteilt werden (*JÄRVINEN et al. 2005*).

Das im Muskel enthaltene Bindegewebe dient als Leitstruktur für Nerven und Gefäße. Zudem ist es an der Differenzierung und am Wachstum des Muskels beteiligt. Es bündelt die Kontraktionen einzelner Muskelfasern zu einer funktionellen Einheit (TAKALA & VIRTANEN 2000, CHARGÉ & RUDNICKI 2004). Das kräftige Epimysium umkleidet den gesamten Muskelbauch, während das innerhalb der Muskulatur liegende Perimysium zwischen zehn und einigen hundert Muskelfasern zu Faserbündeln zusammenfasst. Jede einzelne Faser ist von dünnem Endomysium umgeben (KIEB et al. 2010) (Abb. 1).

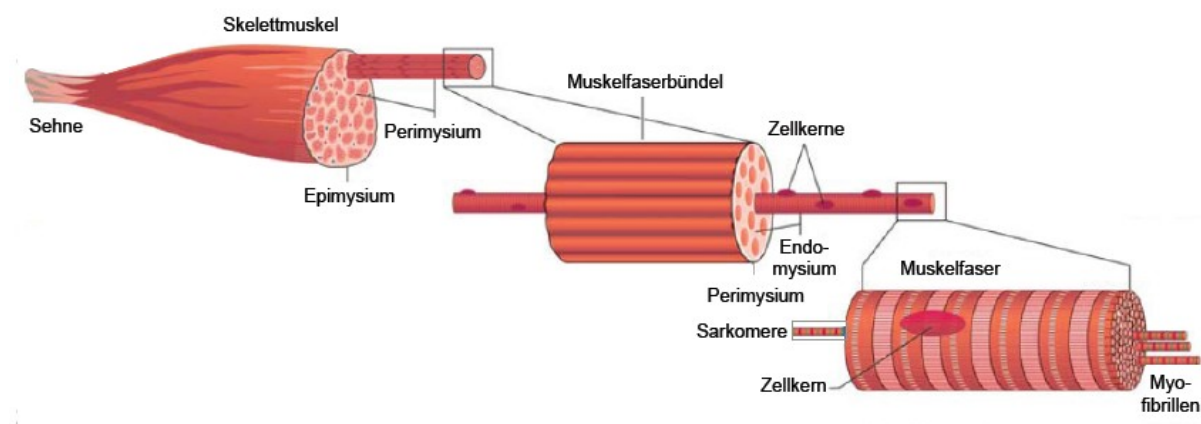


Abb. 1: Schematische Darstellung der hierarchischen Organisation im Bauplan der Skelettmuskulatur. Gezeigt sind die drei Bindegewebsblätter in ihrer anatomischen Anordnung. In der Muskelfaser liegen die Myofibrillen. Muskelfasern werden zu Muskelfaserbündeln zusammengefasst, deren Gesamtheit den Skelettmuskel bildet. Quelle: modifiziert nach Schmidt & Lang 2007; Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. 30. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).

Die bindegewebige Bündelung von Muskelfasern erhöht die muskuläre Druck- und Zugfestigkeit. Und zuletzt stellt der Bindegewebsapparat noch das Bindeglied zwischen kontraktile Muskelfasern und Sehnen dar, die mit dem knöchernen Skelett verbunden sind (CHARGÉ & RUDNICKI 2004).

Auf Ebene der Zellorganellen stellt die im Sarkoplasma der Skelettmuskelfaser liegende Myofibrille die Grundstruktur des Skelettmuskels dar. Während der Muskel-differenzierung ordnen sich die im Myoblasten liegenden Myofilamente Aktin und Myosin zu den charakteristischen Myofibrillen zusammen. Skelettmuskelfasern sind vielkernige Synzytien aus zusammengelagerten Myoblasten, deren Zellkerne unter dem Sarkolemm an der Zelloberfläche liegen (Abb. 1).

### 3.1.2 Pathophysiologie des traumatischen Muskelschadens

Der traumatische Muskelschaden basiert auf einer akuten Störung der Gewebeintegrität. Kontusionsverletzungen der Skelettmuskulatur gehen mit einer Verschlechterung der lokalen Gewebepерfusion einher, die zu einer Ischämie führt (KARLANDER *et al.* 2000). Nach Akkumulation von Laktat kommt es zur zellulären Azidose. Der Sauerstoffmangel beeinträchtigt die Funktion der Zytochrom-Oxydase in der mitochondrialen Atmungskette und damit die oxidative Phosphorylierung, woraus ein starkes Absinken der ATP-Konzentration resultiert (HOCHACHKA 1986, KAM *et al.* 2001). So kommt es schließlich auch zum Funktionsverlust der ATP-abhängigen  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, was die Dysregulation zellulärer Transportmechanismen und Störungen des zellulären Ionenhaushaltes mit konsekutivem Zusammenbruch des Zellstoffwechsels zur Folge hat. Die Reperfusion des geschädigten Gewebes mit sauerstoffreichem Blut führt zur Einschwemmung toxischer Metabolite in den Organismus und zur lokalen Bildung reaktiver Stickstoff- und Sauerstoffspezies (ROS) (PATTWELL *et al.* 2003, HUDA *et al.* 2004, ZIMIANI *et al.* 2005). Oxidativer Stress ist ein starker Aktivierungsreiz, der zur Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Chemokine und Adhäsionsmoleküle aus geschädigtem Muskelgewebe und Endothel führt. Hierdurch wird schließlich auch die zelluläre Immunantwort aktiviert (GHALY & MARSH 2010).

Neutrophile Granulozyten und Makrophagen sind nach rascher Rekrutierung in großer Zahl an der initialen, unspezifischen Immunantwort beteiligt (ADAMS *et al.* 1994, BRICKSON *et al.* 2003). Aktivierte Leukozyten produzieren ebenfalls eine Reihe inflammatorischer Mediatoren, wie ROS, Zytokine (PAF,  $\text{TNF}\alpha$ , IL1, IL6, IL8, IL10) und proteolytische Enzyme, welche ihrerseits die Entzündungsreaktion verstärken (PRISK & HUARD 2003, BRICKSON *et al.* 2003). Leukozytäre Degranulationsprodukte (z.B. ROS) verursachen schwerwiegende vaskuläre Dysfunktionen mit Erhöhung der Gefäßpermeabilität und generalisierter Ödembildung (TYML 2011). An dieser Stelle schließt sich der Circulus vitiosus des traumatischen Muskelschadens. Die ödematöse Schwellung verschlechtert den mikrovaskulären Blutfluss und damit die Sauerstoffversorgung des Gewebes (KEEL & TRENTZ 2005). Die Trias aus Endothelzellschaden, Leukozytenakkumulation und Mikrozirkulationsstörung nach Muskeltrauma führt schließlich zu Apoptose und Nekrose von

Parenchymzellen und zur Exazerbation des traumatisch bedingten Weichteilschadens (*BEINER et al. 1999, TUOMI & BEST 2003, KEEL & TRENTZ 2005*).

### 3.1.3 Offenes und geschlossenes Weichteiltrauma

Offene Frakturen mit Weichteilbeteiligung sind anhand von Durchblutung, Kontamination und Frakturstabilität oft schon direkt nach der Verletzung einfach zu klassifizieren. Eine besonders populäre Klassifikation stammt von Gustilo und Anderson (*GUSTILO & ANDERSON 1976*). Erschwerend kommt jedoch bei offenen Verletzungen stets ein erhöhtes Infektionsrisiko hinzu (*SCHWABE et al. 2010*).

Bei geschlossenen Extremitätenverletzungen liegt die Problematik in der schwierigen Einschätzung des Weichteilschadens unter vermeintlich intakter Haut. Bedingt durch die erhaltene Kontinuität dermatofaszialer Strukturen und ödem- oder blutungsbedingten Druckanstieg im traumatisierten Gewebe kommt es zu Mikrozirkulationsstörungen und es droht ein Kompartmentsyndrom (*GOURGIOTIS et al. 2007*). Die daraus resultierende kritische Perfusion des Weichgewebes begünstigt die Entwicklung postprimärer Weichteil- und Myonekrosen mit sekundärem, progressivem Gewebeverlust (*SCHWABE et al. 2010*). Aus diesem Grund ist die frühe Einschätzung, Beurteilung und Klassifikation einer geschlossenen Weichteilverletzung für den späteren Krankheitsverlauf besonders wichtig (*PAPE et al. 2005*). Aus Verletzungsklassifikationen lassen sich u.a. geeignete Therapien und Komplikationsrisiken ableiten (*STROHM et al. 2010*).

Die in deutschsprachigen Ländern gebräuchlichste Einteilung geschlossener Weichteilverletzungen ist die nach Tscherne und Oestern (1982). Die Einteilung der Weichteilbeteiligung bei geschlossenen Frakturen reicht von unbedeutenden (G0) bis hin zu ausgedehnten Verletzungen von Haut, Muskulatur und Hauptgefäßen (GIII) (*TSCHERNE & OESTERN 1982*). □

International hat sich heute auch die AO-Weichteil-Klassifikation durchgesetzt. Die anatomisch orientierte AO-Klassifikation differenziert Hautverletzungen (Integument) bei geschlossenen (IC) und offenen (IO) □ Frakturen und berücksichtigt zusätzlich muskulotendinöse (MT) sowie neurovaskuläre (NV) Verletzungen in je fünf Schweregraden (*SÜDKAMP 2008, STROHM et al. 2010*). Sie hat sich besonders bei höhergradigen Verletzungen bewährt. Durch die Evaluation von Schäden an



muskulotendinösen und neurovaskulären Strukturen wird die Risikoabwägung bezüglich einer drohenden Amputation möglich (SÜDKAMP 2008).

#### 3.1.4 Muskelregeneration nach traumatischer Schädigung

Die Regeneration der Muskulatur ist ein komplexer Prozess, der für die vollständige Wiederherstellung der Muskelarchitektur koordinierte Einflüsse von Inflammation, myogenen Vorläuferzellen, Wachstumsfaktoren und Extrazellulärmatrix erfordert (GOETSCH *et al.* 2003). Obwohl die Skelettmuskulatur normalerweise nur einen geringen Zell-Turnover von 1-2% pro Woche hat, ist sie nach traumatischer Schädigung zu schneller und extensiver Regeneration fähig (SCHMALBRUCH & LEWIS 2000, CHARGÉ & RUDNICKI 2004). Die Muskelheilung verläuft in drei typischen Phasen (HURME *et al.* 1991, JÄRVINEN *et al.* 2005, KIEB *et al.* 2010).

Die *Destruktionsphase* ist durch Ruptur und lokale Nekrose von Muskelfasern mit Hämatombildung und zellulärer Entzündungsreaktion gekennzeichnet. Die traumatische Zellzerstörung aktiviert in der extrazellulären Matrix des Muskelgewebes gespeicherte Wachstumsfaktoren, die potentielle Aktivatoren und Regulatoren gewebeständiger myogener Vorläuferzellen sind. Hierzu zählen unter anderem der Fibroblasten-Wachstumsfaktor (FGF), die Insulinähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF 1 und 2), der Transformierende Wachstumsfaktor (TGF- $\beta$ ), der Leberzellen-Wachstumsfaktor (HGF), der Tumornekrosefaktor (TNF- $\alpha$ ) und Interleukin 6 (IL-6) (CHARGÉ & RUDNICKI 2004). In der *Reparaturphase* erfolgt nach einer gezielten Phagozytose nekrotischen Gewebes durch Makrophagen die eigentliche Muskelfaserregeneration. Zeitgleich entsteht Narbengewebe und es kommt zur Einsprossung neu gebildeter Kapillaren. Während des darauf folgenden *Remodelings* reifen die aus Vorläuferzellen neu gebildeten Muskelfasern zur ihrer vollen Funktionsfähigkeit.

Eine mitotische Neubildung traumatisch geschädigten Muskelgewebes ist nicht möglich. Die Skelettmuskulatur zählt zu den postmitotischen Geweben. An Reparaturvorgängen sind jedoch Satellitenzellen beteiligt, die unter der Basallamina der Muskelfasern liegen (HURME & KALIMO 1992, RANTANEN *et al.* 1995). Diese Zellen stellen im Skelettmuskel eine Reserve an spezifizierten, aber noch nicht ausdifferenzierten Myoblasten dar, die eine Schlüsselrolle in der Muskelregeneration einnehmen (MANSOURI *et al.* 1999, JÄRVINEN *et al.* 2005). Die Entwicklung myogener

Vorläuferzellen zu Satellitenzellen wird auf genetischer Ebene von verschiedenen Transkriptionsfaktoren reguliert. Die daran beteiligten Faktoren Pax 3 und Pax 7 aus der Gruppe der ‚paired-box‘-Transkriptionsfaktoren gelten als wichtige Regulatoren der somitischen Myogenese (*MAROTO et al. 1997, SEALE et al. 2000, LE GRAND & RUDNICKI 2007*). Im Rahmen der Muskelregeneration werden Satellitenzellen aus ihrer Ruhephase heraus aktiviert und beginnen zu proliferieren. Ihre Aktivierung ist durch eine schnelle Hochregulierung der myogenen Regulationsfaktoren (MRF) Myf5 und MyoD charakterisiert. Während MyoD die Differenzierung von Satellitenzellen reguliert, ist Myf5 an der Steuerung ihrer Proliferation und Selbsterneuerung beteiligt (*COOPER et al. 1999, LE GRAND & RUDNICKI 2007*). Nach Abschluss der Proliferation werden vermehrt die Regulationsfaktoren Myogenin und MRF4 exprimiert. Diese regulieren die Differenzierung von Myoblasten zu Myozyten, die Reifung von Myofibrillen und die Fusion von Muskelzellen (*CHARGÉ & RUDNICKI 2004*).

Neben dem Wiederaufbau zerstörten Muskelgewebes über den zellulären Ersatz durch Satellitenzellen entsteht gleichzeitig auch immer ein fibrotisches Ersatzgewebe. Die mit dem Blut ins Muskelhämatom strömenden Plasmaproteine Fibrin und Fibronectin verbinden sich zu einem frühen Granulationsgewebe, an dem sich einströmende Fibroblasten verankern können (*HURME et al. 1991*). Diese synthetisieren verschiedene Proteine und Proteoglykane für den Aufbau neuer Extrazellulärmatrix und stabilisieren den Muskel durch Wiederherstellung der Bindegewebsintegrität (*GOETSCH et al. 2003*).

Die meisten Muskelverletzungen heilen ohne übermäßige, die spätere Funktion beeinträchtigende Narbenbildung aus. Dennoch kann es unter bestimmten Voraussetzungen zu Funktionseinbußen durch Vernarbung kommen (*JÄRVINEN et al. 2005*). Aus diesem Grund ist ein koordinierter Heilungsverlauf mit entsprechender Balance zwischen Bindegewebs- und Muskelzellregeneration entscheidend für die funktionell optimale Wiederherstellung von Muskelarchitektur und -funktion.

### 3.1.5 Systemische Folgeerscheinungen nach schwerem Weichteiltrauma

Die posttraumatische Immunreaktion ist zunächst lokal auf das Wundgebiet beschränkt. Nach schwerem Trauma kann eine entzündliche Reaktion jedoch exazerbieren und zu einer systemischen Entzündungsreaktion (SIRS) führen.

## 3.1.5.1 Inflammation

Am Ort der traumatischen Schädigung kommt es zu einer lokalen zellulären Entzündungsreaktion, deren Hauptakteure, die Leukozyten, in Interaktion mit dem Gefäßendothel treten (MATZINGER 2002, BHATIA et al. 2006). Über diese Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (LEI) gelangen die Entzündungszellen aus dem Blutstrom in ihr Zielgewebe (LEY et al. 2007).

Vermittelt durch endotheliale Adhäsionsmoleküle (Selektine) beginnen Leukozyten nach initialem Kontakt langsam am Endothel entlang zu rollen („rolling“). Dadurch erhöht sich die lokale Leukozytenkonzentration (LEY 2003).

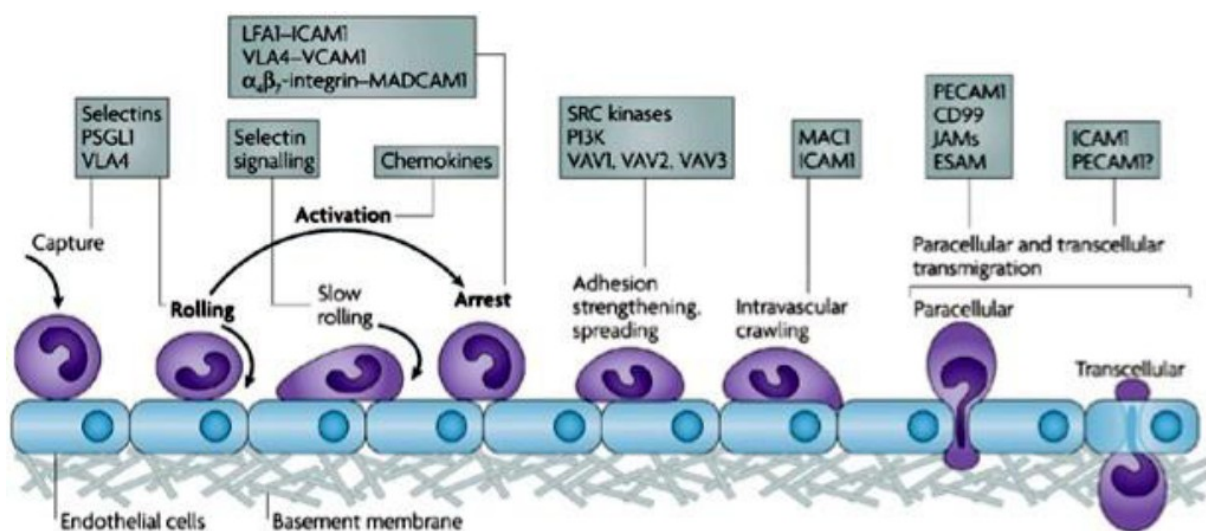


Abb. 2: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Nach Selektin-vermittelter „Capture“ von Leukozyten aus dem Blutfluss erfolgt deren Chemokin-vermittelte Aktivierung. Das Rolling entlang des Endothels erfolgt durch Selektine. In der Folge kommt es über die Wirkung von  $\beta_2$ -Integrinen auf Leukozyten und deren Interaktion mit ICAM-1 auf dem Endothel zum Arrest und zur festen Adhäsion am Endothel. Zuletzt findet die trans- oder parazelluläre Transmigration in das umliegende Gewebe statt. Die an den jeweiligen Prozessen beteiligten Schlüsselmoleküle sind in den entsprechenden Kästen angegeben. ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule), ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), JAM (junctional adhesion molecule), LFA1 (lymphocyte function-associated antigen 1), MAC1 (macrophage antigen 1), MADCAM1 (mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1), PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand 1), PECAM1 (platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1), PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), VCAM1 (vascular cell-adhesion molecule 1), VLA4 (very late antigen 4). Quelle: Ley et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. 2007;7:678–689.

An der LEI sind drei verschiedene Selektintypen (L-, E- und P-Selektin) beteiligt (KANSAS 1996, LEY et al. 2007). Ein wichtiger Selektinligand ist der P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL1), der auch an der Aufnahme von Leukozyten in bereits bestehende Leukozytenakkumulationen beteiligt ist (ERIKSSON et al. 2001) (Abb. 1).

Chemotaktisch wirkende Zytokine und freie Sauerstoffradikale aktivieren Leukozyten und auf deren Oberfläche sitzende Adhäsionsmoleküle, die Integrine. Diese vermitteln die permanente Leukozytenadhäsion an endothelialen Rezeptoren (RUOSLAHTI 1991, ZIMMERMAN *et al.* 1992, LEY *et al.* 2007). Zu den wichtigsten Integrinen der LEI zählen die  $\beta$ 2-Integrine CD11a/CD18 (LFA-1) und CD11b/CD18 (MAC-1) sowie das  $\beta$ 1-Integrin CD49d/CD29 (VLA-4) (LEY *et al.* 2007, CHAVAKIS *et al.* 2009) (Abb. 1). Während Granulozyten über ihre  $\beta$ 2-Integrine an endothelständige „intracellular adhesion molecules“ ICAM-1 und ICAM-2 binden, interagieren Lymphozyten und Monozyten über das VLA-4 vor allem mit dem „vascular cell adhesion molecule“ VCAM-1 (SMITH 1993, RAHMAN *et al.* 2009) (Abb. 2). Nach fester leukozytärer Adhäsion an das Endothel („sticking“) kommt es schließlich unter dem Einfluss migrationsfördernden Faktoren zur Diapedese der Leukozyten in das Zielgewebe (Abb. 2). Beispiele für solche Faktoren sind IL-8 und MIP-1 $\beta$  (macrophage inflammatory protein 1 beta) (TANAKA *et al.* 1993).

### 3.1.5.2 Blutgerinnung

Eine Vielzahl innerer und äußerer Faktoren ist in der Lage, das Blutgerinnungssystem zu beeinflussen. In der Unfallchirurgie sind diesbezüglich insbesondere das schwere Trauma, die Sepsis und Verbrennungen von Bedeutung. Veränderungen von Gerinnungsparametern sind ein wichtiges diagnostisches Erkennungszeichen der posttraumatischen Inflammation. Sie reichen vom einfachen Absinken der Thrombozytenzahl im Blut über Fibrinablagerungen im Gefäßsystem mit Thrombusbildung bis hin zur voll ausgeprägten Verbrauchskoagulopathie (DIC). Patienten nach Trauma, im Schock und bei Sepsis weisen durch Verbrauchsvorgänge auch dann schon eine verringerte ATIII-Aktivität auf, wenn noch keine fassbare DIC vorliegt (SMITH-ERICHSEN *et al.* 1982, VOSS *et al.* 1990, FOURRIER *et al.* 1992). Die DIC stellt für den Patienten eine besondere Gefahr dar. Sie kann primär bedingt durch das Trauma oder sekundär durch septische Mediatorausschüttung auftreten (VERVLOET *et al.* 1998). Neben dem generalisierten Missverhältnis einzelner Mediatoren der Hämostase ist ihre Entstehung auf eine vermehrte Thrombinproduktion zurückzuführen (DUNBAR & CHANDLER 2009, CHANDLER 2010).

Die Gerinnungsaktivierung wird in erster Linie durch den Tissue Factor (TF) initiiert. Dieser wird nach Stimulation durch Entzündungsmediatoren von Monozyten und Endothelzellen exprimiert (*OSTERUD 1998*). TF bildet mit dem Gerinnungsfaktor VIIa einen Komplex, der in der Lage ist, die Gerinnungsfaktoren IX und X und somit die Gerinnungskaskade zu aktivieren (*OSTERUD et al. 1977*).

Zur Vermeidung überschießender Gerinnungsreaktionen und zur Aufrechterhaltung des koagulatorischen Systemgleichgewichts wirkt der Blutgerinnung das System der Fibrinolyse entgegen. Außerdem wird sie von verschiedenen antikoagulatorisch wirkenden Systemen moduliert, die einer unkontrollierten Aktivierung und der Entstehung einer DIC entgegenwirken. Hierzu gehören der Tissue Factor Pathway Inhibitor (TFPI), der die extrinsische Aktivierung der Gerinnung verhindert (*BROZE 1995*), an Glykosaminoglykan gebundenes Antithrombin III (ATIII), das innerhalb der Gerinnungskaskade als Serinproteaseinhibitor fungiert (*ROSENBERG 1989*) und das Thrombomodulin (TM) / Protein C- und S-System, das die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa inaktiviert (*ESMON 2003*).

### 3.1.5.3 SIRS und Multiorganversagen nach Trauma

Aktivierte Leukozyten sequestrieren nicht nur in traumatisch geschädigtes Gewebe, sondern auch in andere Organe. Nach dem Übergriff auf solche „remote organs“ kann die Entzündung zu einem SIRS (systemic inflammatory response syndrome) generalisieren (*DURHAM et al. 2003, HIETBRINK et al. 2006*). Die massive systemische Freisetzung von Entzündungsmediatoren im Rahmen des SIRS stört die Mikrozirkulation (*PASQUALE et al. 1996*). Mikrozirkulationsstörungen können zu Organfunktionsstörungen („remote organ failure“) und nicht zuletzt zum Multiorganversagen (MOF) führen (*CHIEREGO et al. 2006, VINCENT et al. 2005, INCE 2005*).

Eine mögliche Erklärung für die systemische Ausbreitung der primär lokalen Inflammation bietet die „two-hit-Theorie“ (*ROTSTEIN 2003*). Diese beschreibt ein Szenario, an dessen Anfang das Trauma („first hit“) mit lokaler Gewebeschädigung und beginnender Immunantwort steht (*KEEL & TRENTZ 2005*). Während der Immunreaktion kommt es immer zu einem Wechselspiel aus pro- und antiinflammatorischen Einflüssen (*BONE 1996*). Trifft nun ein zweites schädigendes Ereignis („second hit“) in einer vulnerablen Phase den Organismus, ist der systemischen Ausbreitung der

Inflammation der Weg geebnet. Unter dem Begriff „second hit“ fasst man verschiedenste Ereignisse zusammen. Es kann sich z.B. um die Folgeerscheinung von Ischämie und Reperfusion, von prolongierter Hypovolämie oder um eine Infektion handeln. Auch zum falschen Zeitpunkt durchgeführte große chirurgische Eingriffe können ein „second hit“ darstellen (*KEEL & TRENTZ 2005, BHATIA et al. 2006*).

Um den Einfluss eines solchen klinisch häufig vorkommenden „second hit“ nach schwerem Trauma zu simulieren, erhielten einige Versuchstiere der vorliegenden Studie eine Endotoxämie. Das Immunsystem erkennt Keiminvasionen anhand mikrobieller Signalmoleküle. Zu diesen gehören Lipopolysaccharide (LPS) gramnegativer Bakterien (Endotoxine) (*de KIMPE et al. 1995, SALUK-JUSZCZAK et al. 2005*). LPS bindet an das LPS-bindende Protein (LBP), welches LPS zu seinem Rezeptor (CD14) transportiert. Dieses Oberflächenmolekül liegt membranständig (mCD14) und in gelöster Form (sCD14) vor und ist, wie die sogenannten Toll-like-Rezeptoren (TLR), ein wichtiges Molekül in der „Nicht-Selbst-Erkennung“ des Immunsystems (*HAZIOT et al. 1988, SCHUMANN et al. 1990, WRIGHT et al. 1990*). CD14 hat jedoch primär eine Erkennungsfunktion für LPS und ist nicht in der Lage Signale auf zellulärer Ebene weiterzuleiten (*CALVANO et al. 2003*). Für diese Weiterleitung LPS-induzierter Signale liegt CD14 im Komplex mit MD2 und TLR-4 vor (*HEUMANN & ROGER 2002*). MD2 ist ein Oberflächenprotein, das an der TLR4-Oberflächenexpression beteiligt ist und dessen Antwort auf LPS ermöglicht (*DZIARSKI & GUPTA 2000*). Die Signalweiterleitung nach intrazellulär erfolgt über eine von TLR-4 ausgehende intrazelluläre Signalkaskade, die NF- $\kappa$ B aktiviert, der auf genetischer Ebene die Produktion verschiedener Entzündungsmediatoren reguliert (*CALVANO et al. 2003, MIYAKE 2004*). Die Bindung von LPS/LBP an seinen immunzellständigen Rezeptorkomplex (CD14-MD2-TLR4) aktiviert oder verstärkt folglich die bereits ablaufende zelluläre Immunreaktion über eine Ausschüttung proinflammatorischer Zytokine (TNF  $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-8) (*SPOONER et al. 1992, DENTENER et al. 1993*).

### 3.1.6 Therapie des Weichteiltraumas

Die heutigen Erkenntnisse zur Therapie von Extremitätenverletzungen mit Weichteilbeteiligung stammen größtenteils aus tierexperimentellen Studien oder haben sich nach empirischer Testung durchgesetzt (*JÄRVINEN et al. 2007*). Ziel der

Versorgung von Weichteildefekten an Extremitäten ist die Wiederherstellung der ursprünglichen Funktion.

In der Akutbehandlung traumatischer Weichteilverletzungen hat sich ein aus den vier Strategien Immobilisation, Kryotherapie, Kompression und Hochlagerung bestehendes Therapieprinzip durchgesetzt (*JÄRVINEN et al. 2005, KIEB et al. 2010*). Die Kombination dieser Maßnahmen soll die Einblutung ins Gewebe minimieren und Schwellungen entgegenwirken (*DEAL et al. 2002, BLEAKLEY et al. 2004*).

Aus übermäßiger Bindegewebsneubildung bei der Muskelregeneration resultieren Funktionseinschränkungen. Da die Bindegewebsneubildung in Zusammenhang mit dem Ausmaß des Hämatoms steht, wird versucht, dessen Bildung und Ausbreitung zu verhindern. Kryotherapie und Kompression senken den muskulären Blutfluss und vermindern die Hämatombildung (*DEAL et al. 2002, BLEAKLEY et al. 2004*). Zudem vermindert Kälte den Gewebemetabolismus, die zelluläre Entzündungsreaktion und somit die endotheliale Permeabilität, wodurch der interstitiellen Ödembildung vorgebeugt wird (*DEAL et al. 2002, HUBBARD & DENEGAR 2004, SCHASER et al. 2006*). Die Hochlagerung der betroffenen Extremität über Herzhöhe wirkt der Ödembildung durch Absenkung des hydrostatischen Druckes entgegen (*JÄRVINEN et al. 2005*). Die sofortige konsequente Immobilisation soll die Retraktion zerrissener Muskelstümpfe und Rerupturen verhindern. Hierdurch werden auch die Größe des Hämatoms und der späteren Narbe zugunsten neuen Muskelgewebes reduziert (*JÄRVINEN & LEHTO 1993, JÄRVINEN et al. 2005, KIEB et al. 2010*). Nach drei bis fünf Tagen ist in der traumatisierten Muskelregion durch das frische Granulationsgewebe eine gewisse Festigkeit erreicht. Zu diesem Zeitpunkt sollte mit einer stufenweisen Remobilisation der betroffenen Extremität begonnen werden, um deren positiven Effekte auf die Muskelregeneration auszunutzen (*JÄRVINEN et al. 2005, KIEB et al. 2010*).

Bei geschlossenen Weichteilverletzungen werden, ergänzend zu den bereits oben genannten, immer neue Therapieansätze diskutiert. Ein wesentlicher Ansatz ist die antiinflammatorische Therapie der posttraumatischen Entzündungsreaktion im Skelettmuskel, um den Circulus vitiosus aus Inflammation und daraus resultierenden Sekundärfolgen kausal zu unterbrechen (*GIERER et al. 2005, GIERER et al. 2007, GIERER et al. 2010*). In der vorliegenden Studie wurde die antiinflammatorische

Wirksamkeit von Antithrombin III auf die Inflammation nach einem geschlossenen Skelettmuskeltrauma der Ratte untersucht.

### 3.2 Antithrombin III (ATIII)

ATIII ist ein Plasmaglykoprotein mit einem Molekulargewicht von etwa 58 kD. Es gehört zur Familie der Serpine (Serin-Protease-Inhibitoren) und wird Vitamin K-unabhängig in der Leber synthetisiert. Seine Plasmakonzentration liegt normalerweise bei ~12,5 mg/dl (*MURANO et al. 1980*). Die Halbwertszeit liegt zwischen 1,5 und 2,5 Tagen (*ANGSTWURM et al. 2009*). Sie kann im Rahmen einer Verbrauchskoagulopathie drastisch auf 8 - 12 h absinken (*LEVI & CATE 1999, ILIAS et al. 2000*). ATIII kommen im Wesentlichen zwei voneinander unabhängige Aufgaben zu: die Regulation der Blutgerinnung und die antiinflammatorische Modulation entzündlicher Prozesse (*ROEMISCH et al. 2002*).

#### 3.2.1 ATIII, Heparin und Blutgerinnung

ATIII ist als Breitspektrum-Serin-Protease-Inhibitor ein universaler Modifikator der Blutgerinnung (*OPAL et al. 2002*). Es ist in der Lage, einen Großteil der während der Gerinnung aktivierten Enzyme zu neutralisieren. Von besonderer Bedeutung ist seine Wirkung auf Thrombin (Faktor IIa) und die aktivierten Faktoren VII, IX, X, XI und XII (*DAMUS et al. 1973, ROSENBERG et al. 1975, STEAD et al. 1976, OLDS et al. 1994, RAO et al. 1995*).

Nach äquimolar kovalenter Bindung inaktiviert ATIII seine Zielproteasen irreversibel (*SCHREUDER et al. 1994, EISELE et al. 1998*). Durch Bindung von Heparin an den aminoterminalen Bereich des ATIII-Moleküls kommt es in diesem zu einer Konformationsänderung. Hierdurch verbessert sich der Zugang der Zielproteasen zum aktiven Zentrum und die dortige Komplexbildung wird beschleunigt (*ROEMISCH et al. 2002, LEVI & CATE 1999, MAMMEN 1995*). Heparin bewirkt eine bis zu 1.000-fache Beschleunigung der ATIII-bedingten Inaktivierung von Thrombin (*ROSENBERG 1989*).

Heparin bindet mit seiner Pentasaccharideinheit an den Komplex aus Thrombin und ATIII. Das auf Endothelzellen vorkommende Glykosaminoglykan Heparansulfat (HSPG) enthält ebenfalls ein Pentasaccharid, mit dem es ATIII bindet und dessen



Wirkung unterstützt (*ROEMISCH et al. 2002*). Es wird angenommen, dass ein Großteil der physiologischen ATIII-Wirkung durch die Interaktion zwischen ATIII und Heparansulfat zustande kommt. Bemerkenswert ist, dass das Endothel im mikrovaskulären System etwa zehnmal so viel heparinähnliche Aktivität bereitstellt wie das makrovaskuläre Endothel. Dies wird durch die Anzahl der ATIII-Bindungsstellen pro Endothelzelle deutlich, die sich mit etwa 50.000 im makrovaskulären Endothel im Gegensatz zu etwa 500.000 im mikrovaskulären Endothel unterscheiden (*BOMBELLI et al. 1997*). Dieser Unterschied deutet darauf hin, dass ATIII an der Aufrechterhaltung der physiologischen Mikrozirkulation wesentlich beteiligt ist (*OPAL et al. 2002*).

### 3.2.2 ATIII und Antiinflammation

In den vergangenen Jahrzehnten wurde in vielen Studien immer wieder von antiinflammatorischen Wirkungen von ATIII berichtet. Bei septischen Intensivpatienten gemessene erniedrigte ATIII-Level korrelierten mit einer schlechteren Prognose (*WILSON et al. 1989, WILSON et al. 1996*). Gleichzeitig wurden bei Patienten mit normalen ATIII-Aktivitäten weniger Infektionen beobachtet (*WILSON et al. 1996*). Ein ATIII-Anstieg während eines Klinikaufenthaltes korrelierte mit einer besseren Überlebensrate (*MASSIGNON et al. 1994*).

Basierend auf diesen Erkenntnissen sind Studien zur Substitutionstherapie von ATIII bei Sepsis durchgeführt worden. In diesen Studien verbesserte ATIII z.B. septisch bedingte Organdysfunktionen. Auch organprotektive Effekte wurden beobachtet (*INTHORN et al. 1997*). Auch in verschiedenen Endotoxämie-Tiermodellen wurden die Wirkungen von ATIII untersucht. In einem Kaninchenmodell hat ATIII eine Verbesserung des Gesamtüberlebens bei Endotoxämie bewirkt, ohne dabei jedoch die Gerinnung zu beeinflussen (*TRANTAPHYLLOPOULOS 1984*).

Eine *in vitro* Studie zeigte, dass ATIII die Prostazyklinproduktion stimuliert (*YAMAUCHI et al. 1989*). Nachdem ATIII in einem Endotoxämie-Tiermodell die Leukozytenaktivierung vermindern konnte, wurde die Freisetzung von Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) nach Bindung von ATIII an endothelständige Heparansulfatproteoglykane (HSPG) als möglicher Wirkmechanismus angenommen (*OKAJIMA & UCHIBA 1998*).

Unter Nutzung des Zyklooxygenaseinhibitors Indomethazin konnte bewiesen werden, dass ATIII die Zyklooxygenaseaktivität erhöht (*HOFFMANN et al. 2000*).

Daraus resultiert eine vermehrte Freisetzung von  $\text{PGI}_2$  mit verminderter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und verbesserter Gewebepfusion (HOFFMANN *et al.* 2000) (Abb. 3).

Dass diese Wirkung von ATIII über die Bindung an HSPG zustande kommt, wurde mithilfe von Tryptophan<sup>49</sup>-blockiertem ATIII (TRY<sup>49</sup>-AT) nachgewiesen. TRY<sup>49</sup>-AT kann nicht an HSPG binden. Die Applikation von TRY<sup>49</sup>-AT bewirkte im Tiermodell die vollständige Aufhebung des zuvor gezeigten signifikanten antiinflammatorischen Effekts von ATIII (HOFFMANN *et al.* 2002a). Später wurde ergänzend hinzugefügt, dass ATIII nach HSPG-Bindung spezifisch die Cyclooxygenase 1 induziert, die für die Freisetzung von  $\text{PGI}_2$  verantwortlich ist (HARADA *et al.* 2004) (Abb. 3).

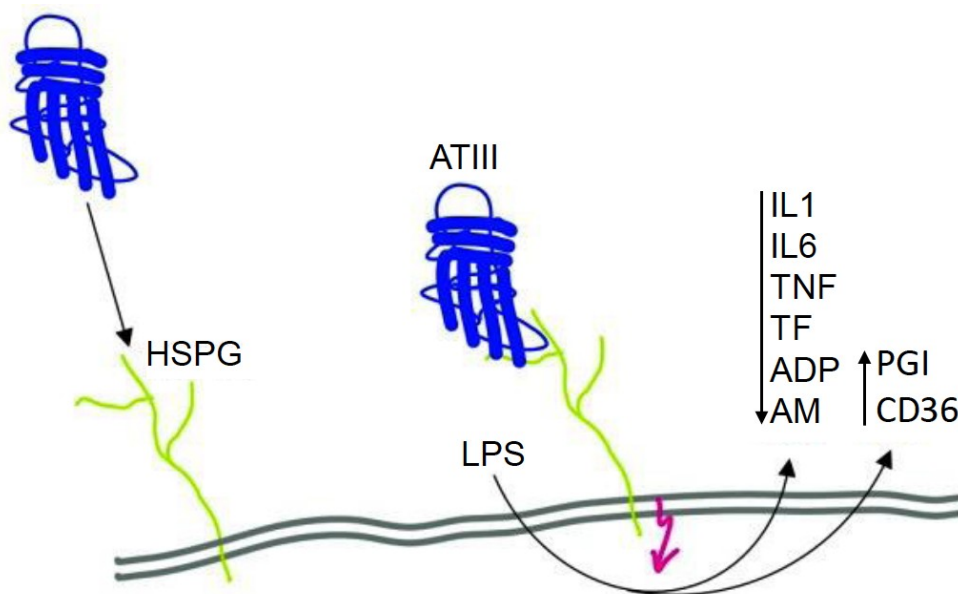


Abb. 3: Entzündungsmodulierende Wirkung von ATIII am Endothel. Die Bindung von ATIII an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) induziert zelluläre Signalwege, die ihrerseits biochemische und funktionelle Reaktionen auf entzündliche Reize, z.B. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), modifizieren. Diese Modifikationen umfassen eine verminderte Freisetzung von Entzündungs- und prokoagulatorischen Mediatoren (z.B. IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , tissue factor (TF), Adenosindiphosphat (ADP) und zellulären Adhäsionsmolekülen (AM)) sowie eine vermehrte Freisetzung von antikoagulatorischem Prostagyclin und CD36 (Glykoprotein IIIb). Quelle: modifiziert nach Wiedermann. *Clinical review: molecular mechanisms underlying the role of antithrombin in sepsis. Crit Care. 2006;10:209.*

Im Rahmen der Thromboseprophylaxe werden ATIII und Heparin auch kombiniert eingesetzt (DELLINGER *et al.* 2004). Es konnte gezeigt werden, dass die protektive antiinflammatorische Wirkung von ATIII durch gleichzeitige Gabe von Heparin vollständig aufgehoben wird (HOFFMANN *et al.* 2002b). Zudem birgt die

gleichzeitige Applikation beider Substanzen ein erhebliches Blutungsrisiko (*WARREN et al. 2001*).

Heparin bindet kompetitiv an endotheliale HSPG, wodurch die Bindung von ATIII mit zyklooxygenaseabhängiger PGI<sub>2</sub>-Ausschüttung und Entfaltung einer entsprechenden antiinflammatorischen Wirkung verhindert werden. Hier ist wahrscheinlich der Grund für die fehlende antiinflammatorische Wirksamkeit von ATIII in der KyberSept-Studie gegeben (*WARREN et al. 2001*). Nur eine Subpopulation von Patienten, die kein Heparin erhielt, profitierte - gemessen an der Mortalität nach 90 Tagen - signifikant ( $p < 0,05$ ) von der ATIII-Therapie (*WARREN et al. 2001*). Das relative Mortalitätsrisiko war in diesem Patientenkollektiv um etwa 15% geringer als in der Kontrollgruppe (*OPAL et al. 2002*).

Die KyberSept-Studie und deren Diskussion trugen entscheidend zur Idee für die vorliegende Studie bei. ATIII hat in der breiten Versorgung septischer Patienten trotz seiner nachgewiesenen antiinflammatorischen Potenz bislang keine Anwendung gefunden. Aus diesem Grund wurden in der vorliegenden Studie die pleiotropen Effekte von ATIII im Bereich der Traumaversorgung untersucht. Sie befasst sich mit dem Einfluss von ATIII auf die Mikrozirkulation nach geschlossenem Weichteiltrauma bei Endotoxinämie. Die Endotoxinämie simuliert einen Zustand systemischer Inflammation nach vorausgegangenem Trauma im Sinne eines „second hit“.

Im Rahmen der experimentellen Untersuchungen wurden traumatisch, inflammatorisch sowie therapeutisch bedingte Veränderungen am traumatisierten Muskel sowohl durch hochauflösende intravitale Multifluoreszenzmikroskopie als auch durch histologische und laborchemische Parameter ermittelt, charakterisiert und quantifiziert.

#### 4 ZIEL DER STUDIE

ATIII hat eine signifikante antiinflammatorische Potenz. Die Wirkung von ATIII auf posttraumatische Entzündungsreaktionen in der Skelettmuskulatur nach schwerem Weichteiltrauma wurde bisher nicht untersucht. Ziel der vorliegenden experimentellen Studie war es, die Wirkung und Effektivität von ATIII auf das schwere geschlossene Weichteiltrauma und die damit verbundene posttraumatische Entzündungsreaktion zu analysieren. Dabei wurden insbesondere folgende Fragestellungen bearbeitet:

1. In welchem Ausmaß kann eine lokale muskuläre Entzündungsreaktion nach schwerem Weichteiltrauma beobachtet werden?
2. Welchen Einfluss hat eine als ‚second hit‘ applizierte Endotoxinämie auf das Ausmaß einer solchen Entzündungsreaktion?
3. Welchen Einfluss hat die ATIII-Therapie auf die Entzündungsreaktion nach schwerem Weichteiltrauma mit und ohne Endotoxinämie?
4. Wie verändert sich die Blutgerinnung unter dem Einfluss von Trauma, Endotoxinämie und ATIII?
5. Werden während der Präparation ATIII-behandelter Tiere Blutungskomplikationen beobachtet?

## 5 MATERIAL UND METHODIK

### 5.1 Versuchstiere

Insgesamt wurden 34 männliche Sprague-Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Körpergewicht zwischen 250 und 300g untersucht. Vor Beginn der Experimente wurden die Tiere nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes für mindestens eine Woche paarweise in einem klimatisierten Raum der Versuchstierhaltung des Institutes für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock (Direktor: Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar) bei 12h Tag- und Nachtrhythmus in Käfigen gehalten. Sie hatten jederzeit Standardfutter und Wasser ad libitum zur Verfügung. Die Tierversuche waren gemäß dem Tierschutzgesetz genehmigt und standen unter Aufsicht des Tierschutzbeauftragten der Universität Rostock.

### 5.2 Modell

#### 5.2.1 Anästhesie

Vor jedem Trauma, zur Applikation von LPS und ATIII sowie vor der chirurgischen Präparation mit nachfolgender IVM erhielten die Tiere jeweils eine intraperitoneal mit Pentobarbital-Natrium (55 mg/kg KG; Nacoren; Merial GmbH, Halbergmoos, Deutschland) eingeleitete Narkose (WAYNFORTH & FLECKNELL 1992, MORTON *et al.* 2001). Bei Bedarf wurde Pentobarbital-Natrium (10 mg/kg KG) intermittierend nachdosiert. In Narkose wurden alle Tiere am Hals und am linken Hinterlauf rasiert (Electra GH204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und desinfiziert.

#### 5.2.2 Induktion des geschlossenen Weichteiltraumas

Jedes Tier wurde an der vorgesehenen Traumalokalisation des linken Unterschenkels farblich markiert. Zur anatomischen Orientierung dienten der Malleolus lateralis und das Fibulaköpfchen. Das Trauma wurde im distalen Drittel einer Verbindungslinie zwischen diesen beiden Strukturen appliziert (Abb. 4). Die resultierende schwere geschlossene Weichteilverletzung am linken Hinterlauf lag topographisch genau über dem M. extensor digitorum longus (SCHASER *et al.* 1999) (Abb. 4). Durch eine exakte Traumaplanung und die Lagerung des Hinterlaufes in einer spezi-

ell an seine Form angepasste Kunststoffschale (Technovit; Kulzer, Wertheim, Deutschland) wurde die Position der Extremität während des Traumas innerhalb der Schlagvorrichtung gesichert. Zusätzlich wurde eine optimierte Kraftverteilung garantiert (Abb. 5). Das beschriebene Trauma simuliert eine typische, z.B. Im Rahmen von Verkehrsunfällen häufig auftretende Verletzung der unteren Extremität. Zur sicheren Reproduzierbarkeit wurde es mithilfe der druckluftbetriebenen, computergesteuerten Schlagvorrichtung „Controlled impact device“ ausgeführt (Abb. 4 und 5).

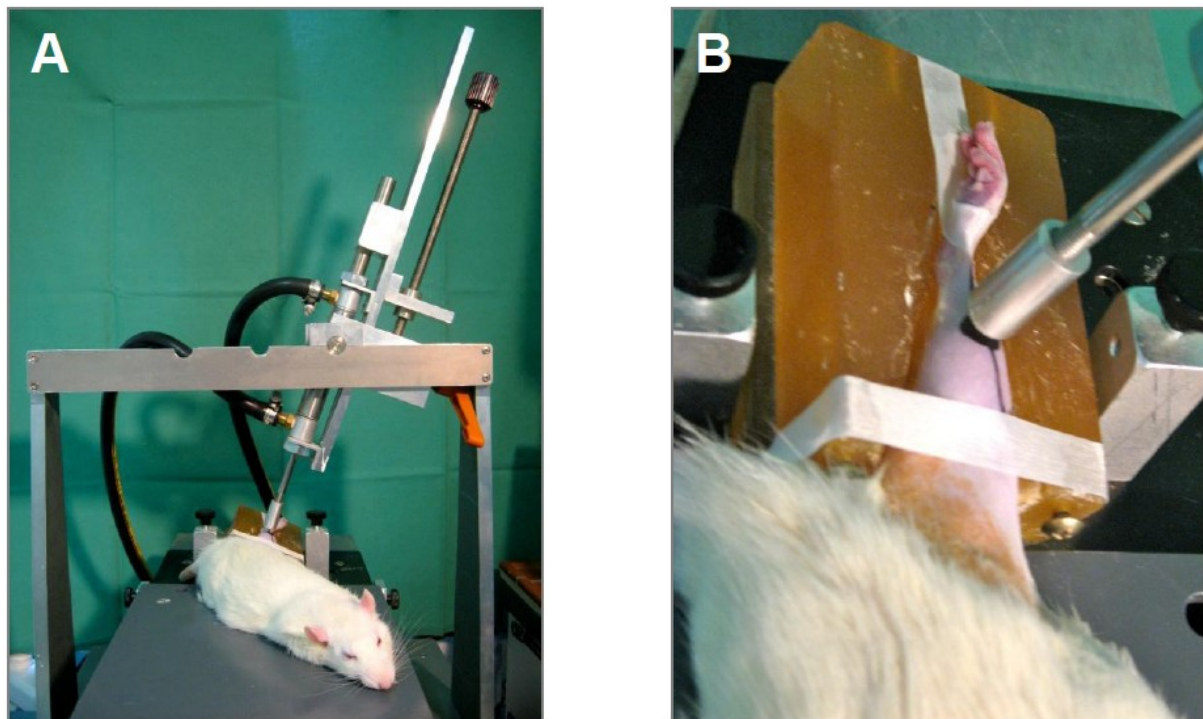


Abb. 4: Platzierung der narkotisierten Ratte im „Controlled impact device“ zur Applikation des schweren geschlossenen Weichteiltraumas. A: Das Tier liegt auf der Auflagefläche. Der linke Hinterlauf ist mit Pflasterstreifen in der Kunststoffschale fixiert. B: Nahaufnahme des fixierten linken Hinterlaufs der Ratte. Die Lokalisation des Traumas ist farblich markiert und der Schlagbolzen über ein Gewinde auf die vorgesehene Eindringtiefe eingestellt worden.

Diese Vorrichtung diente ursprünglich der Untersuchung pathophysiologischer und morphologischer Veränderungen nach schweren Schädelverletzungen der Ratte (LIGHTHALL *et al.* 1989, DIXON *et al.* 1991) und setzt sich aus einer Stickstoff-Druckluftflasche, einem in seiner Eindringtiefe verstellbaren Schlagbolzen (Durchmesser 11 mm), einem manuellen Auslöser und einer computergesteuerten Schnittstelle zur Datenübertragung und Festlegung von Zeit- und Auslenkungsparametern

des Schlagbolzens (Schlaggeschwindigkeit 7 m/s, Eindringtiefe 11 mm, Schlagdauer 100 ms) zusammen (Abb. 5).

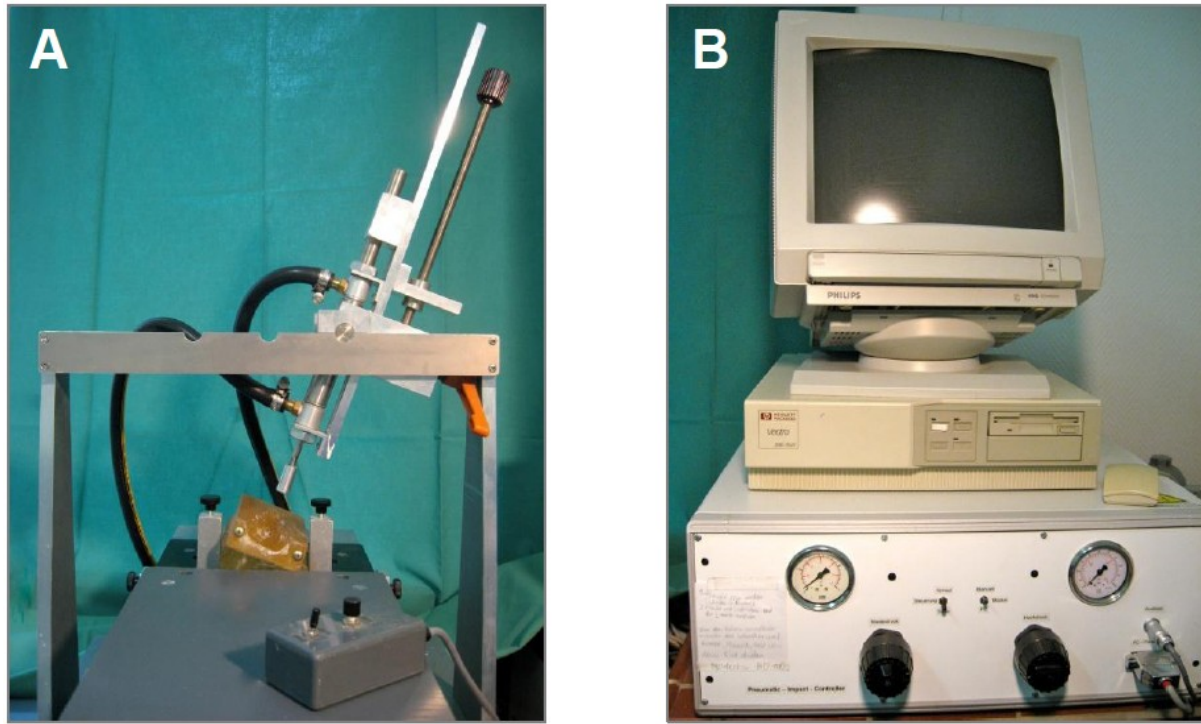


Abb. 5: Originalaufnahmen des Aufbaus der Schlagvorrichtung (A; „Controlled impact device“) und deren Steuerelemente (B). A: „Controlled impact device“ mit Schlagbolzen, Druckluftanschluss und manuellem Auslöser. Am hinteren Ende der Auflagefläche ist die an die Form des linken Hinterlaufs der Ratte angepasste Kunststoffschale zu sehen; B: computergesteuerte Schnittstelle.

Nach dem Trauma wurden die Tiere zum Schutz vor weiteren Verletzungen und zur stressfreien Erholung separiert zurück in Einzelkäfige gesetzt, die zum Aspirationsschutz bis zum Abklingen der Narkose mit Zellstoff ausgelegt wurden.

### 5.2.3 Endotoxinämie und Applikation von ATIII

Sechs Stunden nach dem Trauma erhielten die Tiere die intraperitoneale Injektion von *Escherichia coli* Lipopolysaccharid (LPS) (n=14). Die übrigen Tiere (n=20) bekamen das gleiche Volumen an Trägerlösung NaCl 0,9% i.p. verabreicht. Zeitgleich mit der Induktion der Endotoxinämie erfolgte die Therapie mit ATIII. Die Tiere erhielten intravenös ATIII (n=13) oder das gleiche Volumen an Trägerlösung NaCl 0,9% i.v. verabreicht (n=21). Die Injektionslösungen wurden nach Erwärmung des Schwanzes in handwarmem Leitungswasser (ca. 45°C) und damit einer Verbesse-

rung der lokalen Durchblutung mit einer feinen Kanüle proximal in eine der dorsalen Kollateralvenen des Schwanzes injiziert (*MORTON et al. 2001*).

Nach der Applikation von Endotoxin und ATIII wurden die Tiere wie bereits beschrieben separiert zurück in mit Zellstoff ausgelegte Einzelkäfige gesetzt.

#### 5.2.4 Chirurgische Präparation

Vierundzwanzig Stunden nach dem Trauma erfolgte die chirurgische Präparation. Um den Einfluss von Unterkühlung auf die Mikrozirkulation zu vermeiden, wurden die Tiere in Rückenlage auf einer Wärmeplatte (Fa. Effenberger, Pfaffing/Attel, Deutschland) positioniert und mit Pflasterstreifen an den Vorderläufen locker auf dieser fixiert. Die Temperatur der Wärmeplatte war kontinuierlich auf 37°C eingestellt.

Zur Sicherung der Atmung in Narkose wurde eine mikrochirurgische Tracheotomie durchgeführt. Die prätracheale Muskulatur wurde nach einem medianen Hautschnitt in Längsrichtung gespalten, die Trachea unter Schonung von Nachbarstrukturen stumpf freipräpariert und mit zwei Ligaturen angeschlungen. Nach ventralseitiger horizontaler Durchtrennung eines Ligamentum anulare tracheae wurde ein Polyethylentubus (Portex, Hythe, Kent, Großbritannien; Innendurchmesser (ID) 1,67 mm, Außendurchmesser (OD) 2,42 mm) eingelegt und mit den vorgelegten Ligaturen fixiert (Abb. 6). Über diesen Tubus wurden die Tiere mit einem Atemzugvolumen von 1ml/100g und 50 Atemzügen/min mit Raumluft beatmet.

Die Präparation der A. carotis communis erfolgte stumpf über den bereits bestehenden medianen Zugang unter Schonung des N. vagus und der V. jugularis interna. Die A. carotis wurde zweifach angeschlungen, proximal ligiert und distal vorübergehend mit einem atraumatischen Gefäßclip verschlossen, um den die distale Ligatur vorgelegt wurde. Nach mikrochirurgischer Querinzision des Gefäßes wurde intraluminal ein Polyethylenkatheter (Portex, Hythe, Kent, Großbritannien; PE50, ID 0,58 mm, OD 0,96 mm) platziert. Nach Entfernung des Gefäßclips wurde dieser mit der vorgelegten Ligatur gesichert (Abb. 6).

Die mikrochirurgische Präparation des traumatisierten M. extensor digitorum longus wurde, wie ursprünglich von *TYML und BUDREAU (1991)* beschrieben und von *SCHASER et al. (1999)* für das vorliegende Modell weiterentwickelt, durchgeführt (Abb. 6). Während der Präparation wurde besonders atraumatisch operiert, um



dem im nächsten Untersuchungsschritt zu mikroskopierenden *M. extensor digitorum longus* keine Präparationsschäden oder thermischen Schäden, z.B. bei der Benutzung einer feinen bipolaren Pinzette zur Stillung kleinster Blutungen, zuzufügen. Die Präparation erfolgte nach Umlagerung des Tieres in Bauchlage unter Abduktion und Extension des linken Hinterlaufes. Dieser wurde auf einer ca. 1 cm hohen Rolle aus einer entsprechend gefalteten Mullkompresse (10x10 cm) gelagert (Abb. 6 und 7). Zur sicheren Stabilisierung dieser Position erfolgte die Extension über einen im distalen Drittel des Unterschenkels ventral um die Achillessehne geschlungenen Nahtzügel (4-0 Prolene) (Abb. 6 und 7).

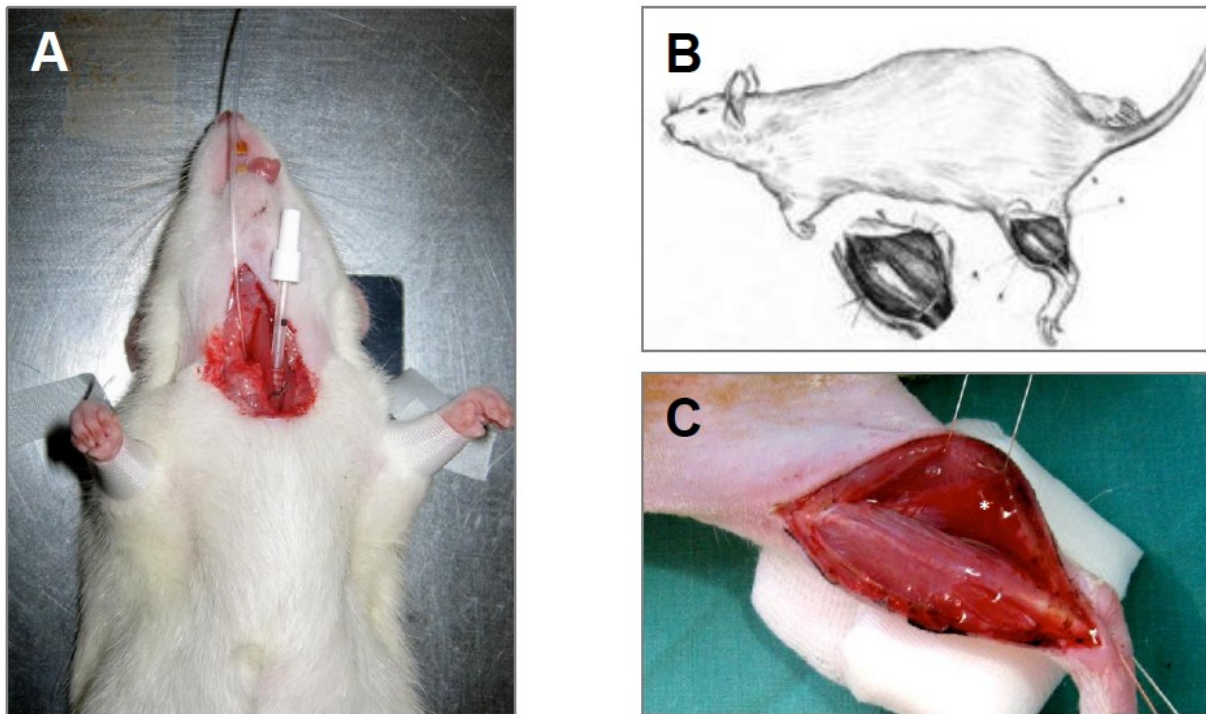
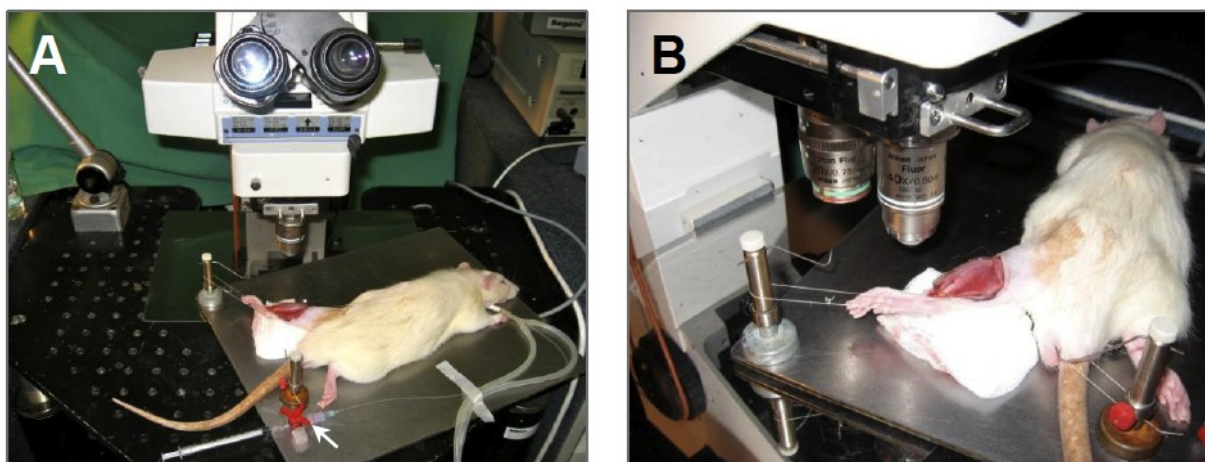


Abb. 6: Mikrochirurgische Präparation der Ratte. A: Originalaufnahme der narkotisierten Ratte nach erfolgter Präparation der Halsregion mit Tracheotomie und liegender Kanüle zur späteren maschinellen Beatmung sowie nach Katheterisierung der rechten *A. carotis communis*. B: Skizze der Präparation des *M. extensor digitorum longus sinister*. C: Originalaufnahme des präparierten *M. extensor digitorum longus sinister* nach Retraktion des *M. soleus* mithilfe einer Haltenaht.

Nach einer 2,5 cm langen lateralen Längsinzision von Haut und Faszie des linken Unterschenkels entlang einer imaginären Linie zwischen Fibulaköpfchen und Malleolus lateralis wurde der *M. extensor digitorum longus* dargestellt. Hierzu war die Retraktion des benachbarten *M. soleus* durch eine Haltenaht (4-0 Prolene) hilfreich (Abb. 6 und 7). Der *M. extensor digitorum longus* wurde während der Operation mög-

lichst nicht berührt und durch intermittierendes Betropfen mit isotonischer Kochsalzlösung feucht gehalten. Direkt im Anschluss an die Präparation erfolgte die Abdeckung des Wundgebietes mit einem handelsüblichen Deckglas (Abb. 7). Dadurch wurde sowohl der Austrocknung als auch dem Einfluss von Umgebungssauerstoff auf die freiliegende Muskulatur vorgebeugt.

Das Tier wurde unter dem Mikroskop positioniert (Abb. 7). Vor der intravitalemultifluoreszenzmikroskopie (IVM) wurde eine Ruhephase von 20 Minuten zur Stabilisierung des Tieres eingehalten.



*Abb. 7: Originalaufnahmen des Versuchsaufbaus vor Durchführung der Intravitalmikroskopie. A: Das Versuchstier liegt in physiologischer Neutralstellung der Gelenke in Bauchlage auf einer Wärmeplatte vor dem Mikroskop. Der linke Hinterlauf ist auf einer gefalteten Mullkompressen gelagert. Retraktionszängel helfen bei der Darstellung des zu mikroskopierenden Muskels. Das Wundgebiet ist mit physiologischer Kochsalzlösung benetzt worden und von einem Deckglas bedeckt. Neben den Beatmungsschläuchen ist der arterielle Zugang mit 3-Wege-Hahn und einer aufgesetzten Spritze zu erkennen (Pfeil). B: Detailreichere Darstellung des präparierten linken Hinterlaufes und der benutzten Objektive.*

Alle chirurgischen Eingriffe wurden nach gründlicher Hautdesinfektion des Operationsgebietes mit mikrochirurgischem Instrumentarium unter aseptischen Bedingungen durchgeführt.

### **5.3 Experimentelle Gruppen und experimentelles Protokoll**

#### **5.3.1 Experimentelle Gruppen**

In der vorliegenden tierexperimentellen Studie wurde der therapeutische Einfluss von ATIII auf das schwere geschlossene Weichteiltrauma mit und ohne zusätzli-

che Endotoxinämie untersucht. 34 Versuchstiere wurden fünf Versuchsgruppen randomisiert zugeordnet (Abb. 8).

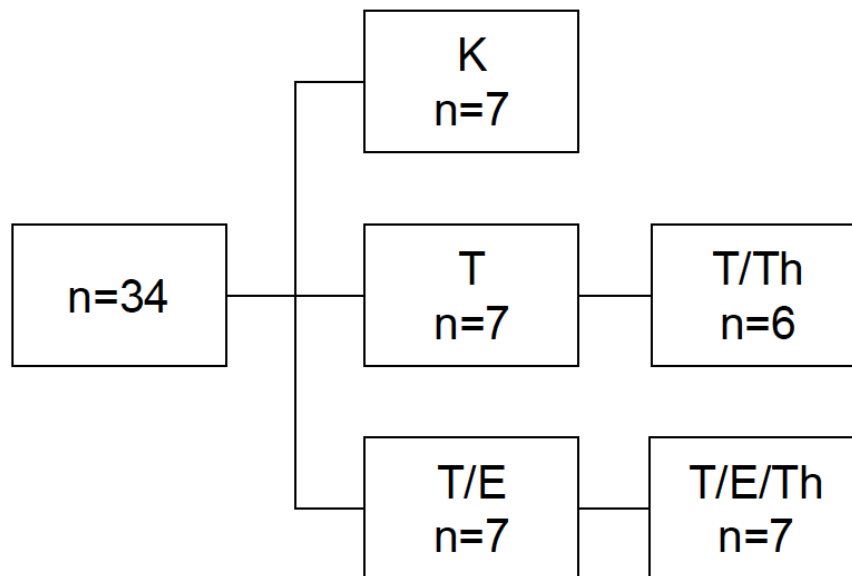


Abb. 8: Schematische Darstellung der experimentellen Gruppen. Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). In der statistischen Auswertung wurden alle Gruppen mit K verglichen, weiterhin wurden die Gruppen T und T/Th sowie T/E und T/E/Th miteinander verglichen.

### 5.3.2 Experimentelles Protokoll

Zum Zeitpunkt Null (0h) wurde bei 27 Tieren am lateralen linken Hinterlauf ein geschlossenes Weichteiltrauma induziert. Sieben Kontrolltiere wurden nicht traumatisiert.

Sechs Stunden nach dem Trauma (6h) erhielten 14 Tiere eine LPS-Injektion (10 mg/kgKG i.p.; Serotyp O128:B12; Sigma, Taufkirchen, Deutschland; n=14) (Abb. 9). Zur Kontrolle wurde allen weiteren Tieren das gleiche Volumen an Trägerlösung 0,9% NaCl i.p. appliziert (n=20).

Zeitgleich mit der Induktion der Endotoxinämie wurden 13 Tiere einmalig mit ATIII therapiert (250 IU/kgKG i.v.; Atenativ; Octapharma, Langenfeld, Deutschland; n=13) (Abb. 9), die übrigen Tiere erhielten das gleiche Volumen an Trägerlösung NaCl 0,9% i.v. (n=21).

Vierundzwanzig Stunden nach Trauma (24h) folgten die mikrochirurgische Tracheotomie und Intubation mit anschließender Beatmung sowie die Katheterisierung der A. carotis communis dextra. Zuletzt fanden die Präparation des M. extensor digitorum longus und die intravitale Multifluoreszenzmikroskopie statt (Abb. 9).

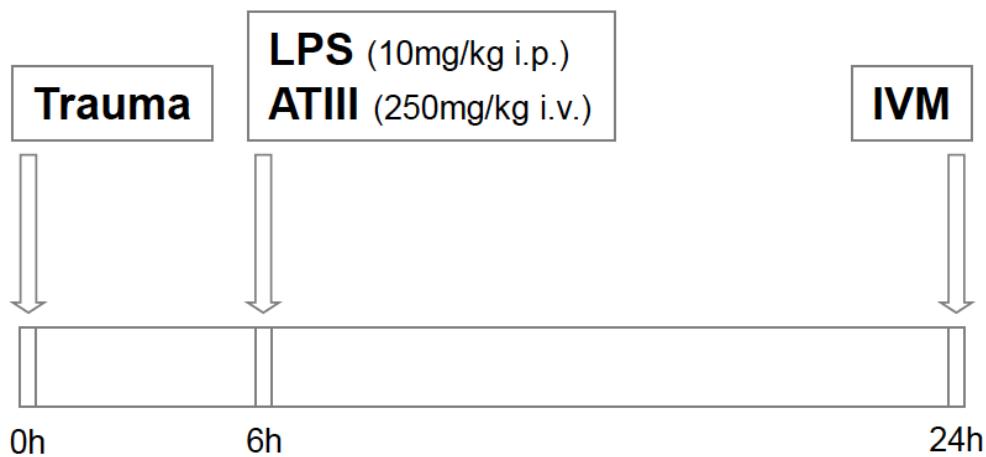


Abb. 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die geschlossene Weichteiltraumatisierung, nach sechs Stunden die intraperitoneale Applikation von Endotoxin (LPS) und die intravenöse Injektion von Antithrombin III (ATIII). 24 Stunden nach Trauma wurden die mikrochirurgische Muskelpräparation und intravitalmikroskopische Untersuchung (IVM) des traumatisierten M. extensor digitorum longus durchgeführt.

## 5.4 Untersuchungstechniken

### 5.4.1 Makrohämodynamisches Monitoring

Der arterielle Zugang wurde zur kontinuierlichen Aufzeichnung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz (HR) über einen Dreiwegehahn (Braun, Melsungen, Deutschland) an einen Druckabnehmer (Statham Typ P23 ID, Gould Inc. Oxnard, CA, USA) angeschlossen, der mit einem Monitor verbunden (Si-recust; Siemens, München, Deutschland) war. Als Zielwerte für den mittleren arteriellen Blutdruck (100-110 mmHg) und für die Herzfrequenz (350-450/min) waren die Normwerte gesunder Kontrolltiere im zirkadianen Verlauf vorgegeben (*van den BUUSE et al. 1999*). Über den arteriellen Zugang wurde den Tieren auch Blut für spätere Untersuchungen und für Blutgasanalysen zur Anpassung der Beatmungsparmeter (Zielgrößen: pH 7,35-7,45; CO<sub>2</sub> 35-45 mmHg; O<sub>2</sub> 100 mmHg; BE -4 bis +4) entnommen. Volumensubstitution und Injektionen von Fluoreszenzfarbstoffen fanden

ebenfalls über diesen Zugang statt. Zur Aufrechterhaltung von physiologischen Werten standen die Einstellung der Narkosetiefe und der Beatmung sowie die Applikation physiologischer Kochsalzlösung zur Verfügung. Diese wurde auf maximal 4ml/kg/h limitiert, um eine starke Hämodilution zu verhindern (*MORTON et al. 2001*).

#### 5.4.2 Mikrohämodynamik

Als direkte Methode zur Analyse der Mikrohämodynamik und des zellulären Entzündungsgeschehens im traumatisierten Skelettmuskel wurde die intravitale Multifluoreszenzmikroskopie (IVM) gewählt.

##### 5.4.2.1 Grundlagen der intravitalem Multifluoreszenzmikroskopie in Epilluminationstechnik

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie nutzt die Eigenschaft fluoreszierender Stoffe, bei Anregung durch Licht bestimmter Wellenlänge Licht zu emittieren. Fluoreszenz ist die spontane Lichtemission eines Moleküls während des Übergangs in ein niedrigeres Energielevel (Stokes-Verschiebung; engl. Stokes-shift) bei Bestrahlung (Abb. 10).

Da einige Stoffe schon ohne Vorbehandlung fluoreszieren, besteht in diesen Fällen die Möglichkeit das native Präparat zu bestrahlen. Ist dies nicht der Fall, kann das Präparat vor der Mikroskopie mit einem Fluoreszenzfarbstoff angefärbt werden. Die Bestrahlung des Farbstoffmoleküls mit Licht führt ihm physikalische Energie zu, wodurch kreisende Elektronen des Moleküls auf ein höheres Energieniveau gehoben werden. Da jedoch regelhaft der stabilste Zustand einer chemischen Verbindung dem energieärmsten entspricht, versucht eine angeregte Substanz wieder in diesen Zustand zu gelangen. Fluoreszierende Stoffe können ihr ursprüngliches Energieniveau durch Abgabe von Lichtquanten erreichen.

Die Stokes'sche Regel besagt, dass ein gewisser Anteil der eingestrahnten Lichtenergie nicht als Licht, sondern in einer anderen Energieform (z.B. Wärmeenergie) abgegeben wird. Hierdurch unterscheidet sich der Energiegehalt einfallender und emittierter Lichtquanten. Die emittierten Lichtquanten sind energieärmer und das emittierte Licht entsprechend der physikalischen Formel:  $\lambda = (h * c) / E$  ( $\lambda$ : Wellenlän-

ge;  $h$ : Planck'sches Wirkungsquantum;  $c$ : Lichtgeschwindigkeit;  $E$ : Energie) langwelliger als das anregende Licht (Abb. 10).

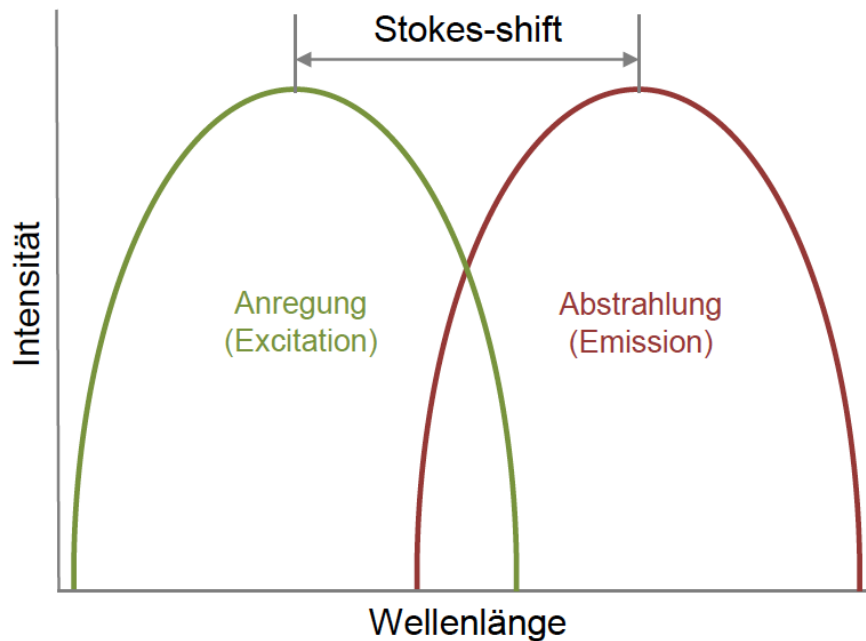


Abb. 10: Schematische Darstellung der Stokes-Verschiebung (Stokes-shift), welche als die Differenz zwischen Anregungs- und Abstrahlungswellenlänge bezeichnet wird.

Dieses Phänomen ist von den spezifischen Eigenschaften des angeregten Fluoreszenzmoleküls abhängig. Unter Nutzung der Bindungs- und Verteilungseigenschaften verschiedener Fluoreszenzfarbstoffe können unterschiedliche Blutbestandteile hervorgehoben und verschiedene Parameter untersucht werden. Durch spezielle Filteranordnungen im Mikroskop ist die exakte Unterscheidung zwischen Anregungs- und emittiertem Licht möglich.

Der erste Filter ist ein Anregungsfilter. Dieser isoliert aus dem gesamten Spektrum des einfallenden Lichtes den Wellenlängenbereich, der zur Anregung des ausgewählten Fluoreszenzfarbstoffes benötigt wird (Abb. 11). Ein nachgeschalteter dichromatischer Teilerspiegel reflektiert das Anregungslicht auf das fluoreszierende Objekt und ist zugleich für das langwelligere emittierte Licht durchlässig (Abb. 11). Anregungs- und Emissionslicht werden also voneinander getrennt. Zuletzt filtert ein Sperrfilter aus dem emittierten Wellenlängenspektrum jenen Wellenlängenbereich heraus, der für den verwendeten Fluoreszenzfarbstoff spezifisch ist, wodurch für den

Untersucher zuletzt ausschließlich die vom genutzten Fluoreszenzfarbstoff ausgehende Lichtemission erkennbar ist (Abb. 11).

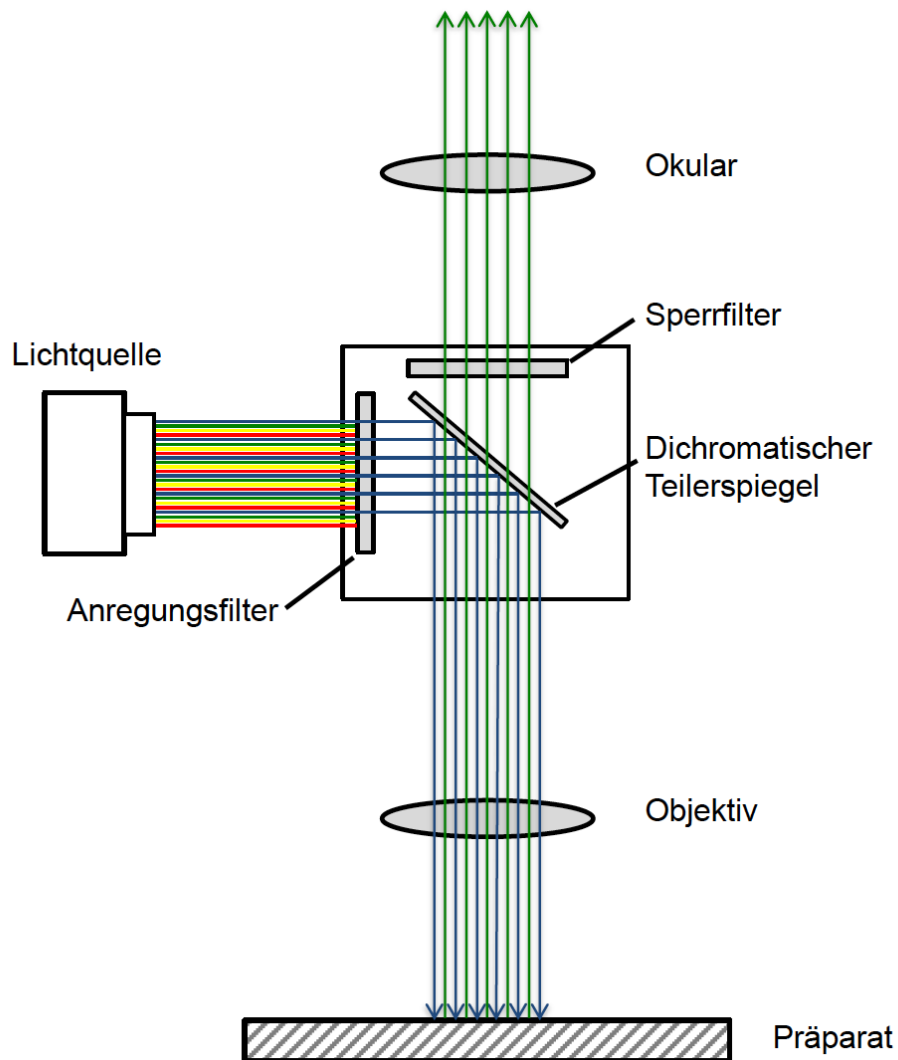


Abb. 11: Schematische Darstellung des prinzipiellen Aufbaus eines Auflichtfluoreszenzmikroskops mit seiner typischen Spiegel- und Filteranordnung.

Durch die beschriebene Diskriminierung von Licht bestimmter Wellenlängen erklären sich die hohe Sensitivität und Spezifität der Multifluoreszenzmikroskopie.

#### 5.4.2.2 Fluoreszenzfarbstoffe

In der vorliegenden Studie wurden die Fluoreszenz von drei intraarteriell verabreichten Fluoreszenzfarbstoffen sowie die Autofluoreszenz von NADH (Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid) untersucht.

Fluorescein-Isothiocyanat-markiertes Dextran (FITC-Dextran; 15 mg/kgKG, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) färbt das Blutplasma und wurde zur Kontrastierung des mikrovaskulären Gefäßbettes sowie zur Detektion kapillarer Leckage genutzt. Bei blauer Epiillumination (465-495 nm) emittiert FITC-Dextran Licht einer Wellenlänge >505 nm.

Rhodamin 6G (0,15 mg/kgKG, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) ist durch Bindung an Zytochrom C zur Intravitalfärbung von Leukozyten geeignet, wodurch die Untersuchung der lokalen zellulären Entzündungsreaktion möglich wurde. Bei grüner Epiillumination (510-560 nm) emittiert Rhodamin 6G Licht einer Wellenlänge >575 nm.

Bisbenzimid (10 µmol/kgKG, Hoechst 33342, Sigma, Deisenhofen, Deutschland) diffundiert durch Plasmamembranen von Zellen und interkaliert zwischen Adenin-Thymin-Basenpaaren der DNA. Durch Chromatinkondensation apoptotischer Zellen fluoreszieren diese besonders intensiv. Bei Epiillumination mit UV-Licht (340-380 nm) emittiert Bisbenzimid Licht einer Wellenlänge >400nm.

NADH ist die reduzierte Form des Hydridionen übertragenden Koenzyms  $\text{NAD}^+$ . Es entsteht vorwiegend beim Abbau von Fettsäuren und Kohlenhydraten im katabolen Stoffwechsel des Zitratzyklus. NADH ist in der oxydativen Phosphorylierung der Atmungskette ein wichtiges Oxidationsmittel. Die im katabolen Stoffwechsel während der Oxidation aufgenommenen Elektronen werden bei der intrazellulären Knallgasreaktion der Atmungskette auf Sauerstoff übertragen, wobei  $\text{NAD}^+$  und Wasser entstehen. Findet diese biochemische Reaktion aufgrund von Gewebehypoxie nicht statt, kommt es zur Anreicherung des autofluoreszierenden NADH im Gewebe.

#### 5.4.2.3 Geräteanordnung

Alle IVM-Untersuchungen wurden mit einem Nikon Fluoreszenzmikroskop (E600-FN, Nikon, Tokyo, Japan) in Epiillumination durchgeführt. Als Lichtquelle stand



eine 100W Quecksilberdampflampe zur Verfügung. Es wurden verschiedene Filter für blaue (Anregung/Emission 465- 495 nm/>505 nm), grüne (510-560 nm/>575 nm) und ultraviolette (340-380 nm/>400 nm) Epiillumination genutzt. Mithilfe einer CCD-Videokamera (Charge Couplet Device) (FK 6990-IQ-S, Pieper, Berlin, Deutschland) wurden die intravitalmikroskopischen Bilder aufgezeichnet, unter Zwischenschaltung eines Echtzeitgenerators (EZG) (TCI-70 RTV Alpermann/Velte, Hamburg, Deutschland) zur Einblendung von Datum und Uhrzeit zu einem SVHS-Videorekorder (Panasonic AG-7350, Osaka, Japan) übertragen und für die spätere offline-Auswertung auf Videobänder aufgezeichnet (Abb. 12).

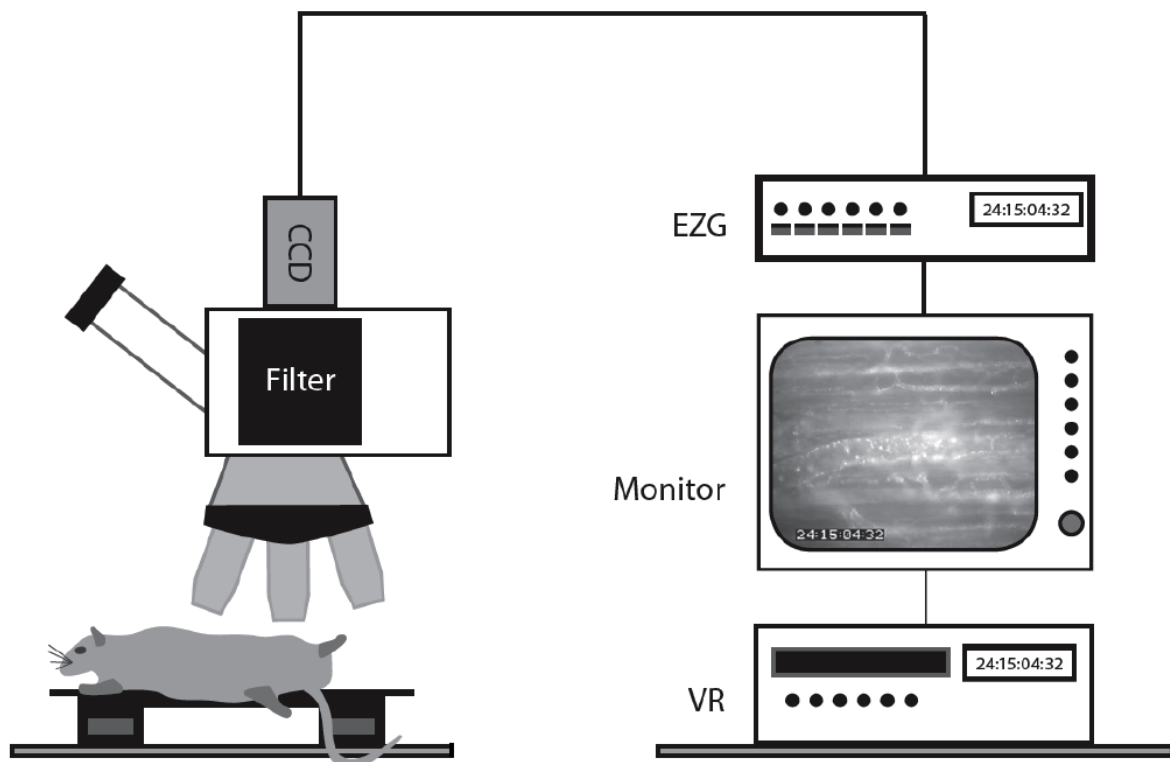


Abb. 12: Schematische Darstellung des Aufbaus der zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie notwendigen Apparaturen. Die Anordnung umfasst das Mikroskop mit einer CCD-Kamera, die über einen Echtzeitgenerator (EZG) mit einem Monitor und einem Videorekorder (VR) zur Aufzeichnung der Untersuchungsergebnisse für die spätere Offline-Auswertung gekoppelt ist.

Durch die Nutzung von Wasser-Immersionen-Objektiven (x20/0.75 W und x40/0.80 W, Nikon, Japan) wurden die Endvergrößerungen von x306 und x630 erreicht.

Sämtliche Analysen mikrozirkulatorischer Parameter wurden nach Beendigung der IVM offline durch Wiedergabe des Videobandes mit dem computerassistierten Bildverarbeitungssystem CapImage (Dr. Zeintl, Heidelberg, Deutschland) durchgeführt.

#### 5.4.2.4 Durchführung der intravitralen Multifluoreszenzmikroskopie

Nach der Platzierung des präparierten linken M. extensor digitorum longus des Versuchstieres unter dem Mikroskop wurde unter Benutzung des UV-Filters (DAPI-Filter) bei 306-facher Vergrößerung (x20/0.75 W Objektiv) zunächst die NADH-Autofluoreszenz gemessen. Hierzu wurden 10 zufällig ausgewählte Gesichtsfelder aufgezeichnet. Während dieser Untersuchung waren die automatische Kamerasteuerung und die Regelungen für Schwarzwert und Verstärkung ausgeschaltet.

Mit der Injektion von FITC-Dextran und Rhodamin 6G wurde die Mikrozirkulation sichtbar. Unter Nutzung blauer Epiillumination (FITC-Filter) wurde der Muskel systematisch von distal in Richtung proximal nach geeigneten Venolen durchsucht. Bei 306-facher Vergrößerung (x20/0.75 W Objektiv) wurden nacheinander fünf Venolen dargestellt und über einen Zeitraum von je 40 Sekunden zunächst mit blauer (FITC-Filter) und anschließend mit grüner Epiillumination (Rhodamin-Filter) aufgezeichnet. Die Auswahl der Venolenabschnitte erfolgte bei blauer Epiillumination, während der Rhodamin-gefärbte Leukozyten nicht fluoreszieren und nicht zu sehen sind. Diese Maßnahme sollte Verzerrungen (Bias) bei der Auswahl von Venolenabschnitten vermeiden.

Die Aufnahmen mit blauer Epiillumination (FITC-Filter) dienten der Messung der Gefäßpermeabilität, der venulären Gefäßdurchmesser und der Längen der untersuchten Gefäßstrecken sowie der Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Die Aufnahmen mit grüner Epiillumination (Rhodamin-Filter) machten die quantitative Beurteilung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion (LEI) beurteilbar.

Im folgenden Untersuchungsschritt wurden bei 630-facher (x40/0.80 W Objektiv) Vergrößerung und blauer Epiillumination (FITC-Filter) zehn Gesichtsfelder je 20 Sekunden lang für die Messung von funktioneller Kapillardichte (FCD) und kapillaren Gefäßdurchmessern aufgenommen.

Zuletzt wurde zur quantitativen Erfassung apoptotischer Zellen Bisbenzimid appliziert. Mit dem UV-Filter wurden 10 Gesichtsfelder auf Zellen mit Apoptosetypischer Kondensation, Fragmentierung oder Halbmondformationen des nukleären Chromatins (*GRADL et al. 2004*) untersucht, die eine intensivere Fluoreszenz als nicht apoptotische Zellen aufweisen.

### 5.4.3 Untersuchung der muskulären Mikrozirkulation und Apoptose

#### 5.4.3.1 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte (FCD) ist definiert als Gesamtlänge aller in einem Gesichtsfeld gemessenen, von Erythrozyten durchflossenen Kapillaren ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) (*GIERER et al. 2005*). Sie diente im Experiment der Erfassung nutritiver Perfusionsstörungen. Das Videomaterial zur Analyse der FCD wurde bei 630-facher Vergrößerung mit blauer Epiillumination (FITC-Filter) aufgenommen und anschließend unter Nutzung der CapImage<sup>®</sup>-Software ausgewertet. Perfundierte Kapillaren eines Gesichtsfeldes wurden auf dem Bildschirm nachgezeichnet. Anschließend wurde deren Dichte durch Erfassung der gesamten Kapillarlänge pro Beobachtungsfeld ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) berechnet.

#### 5.4.3.2 NADH-Autofluoreszenz

Die NADH-Autofluoreszenz stellt einen indirekten Parameter für die Gewebeer-oxygenierung im Skelettmuskel dar (*VOLLMAR et al. 1997*). Unter Beleuchtung mit UV-Licht wird NADH angeregt und emittiert seinerseits unter Zerfall von Doppelbindungen Licht. Die emittierte Lichtmenge entspricht dem Gehalt an NADH im untersuchten Gewebe, der wiederum negativ mit der Gewebeer-oxygenierung korreliert (*VOLLMAR et al. 1997*). Die computerassistierte Messung der NADH-Autofluoreszenz erfolgte densitometrisch über Grauwerte der Skelettmuskulatur, die in arbiträren Einheiten (aU) angegeben werden (*VOLLMAR et al. 1997*). Zur Vermeidung von Interferenzen mit mikrovaskulären Strukturen wurde ausschließlich interkapillar liegendes Muskelgewebe untersucht (*GIERER et al. 2005*). Die Messung fand stets genau zwei Sekunden nach der ersten Beleuchtung eines Gesichtsfeldes statt. Dieser Messzeitpunkt wurde eingehalten, da es bei Illumination zu einem kontinuier-

lichen Abblenden der NADH-Autofluoreszenz kommt. Es wurden insgesamt zehn Gesichtsfelder aufgezeichnet.

#### 5.4.3.3 Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Die intraarterielle Applikation von Rhodamin 6G ermöglichte die quantitative Analyse der zellulären Entzündungsreaktion im traumatisierten Muskel. Es eignet sich sehr gut zur Visualisierung von Leukozyten in Blutgefäßen (BAATZ *et al* 1995). Die untersuchten venulären Gefäßabschnitte hatten einen durchschnittlichen Durchmesser von 35-40 µm und eine Länge von 100-200 µm. Die fluoreszierenden Leukozyten wurden nach ihren Fließeigenschaften und ihrer Interaktion mit dem mikrovaskulären Endothel in drei Populationen eingeteilt.

Dazu gehören schnell im zentralen Blutstrom fließende Leukozyten ohne Adhärenz am Gefäßendothel („floating leucocytes“), verlangsamt am venulären Endothel entlang rollende, passager adhärenente Leukozyten („rolling leucocytes“) und permanent am Gefäßendothel adhärenente Leukozyten („sticking leucocytes“). Mit dem zentralen Blutstrom fließende Leukozyten wurden als  $n/30$  s angegeben. Als rollend wurden Leukozyten definiert, die sich mit einer im Vergleich zur zentralen Fließgeschwindigkeit um mindestens 40% reduzierten Geschwindigkeit am Endothel entlang bewegten. Die rollenden Leukozyten wurden als prozentualer Anteil am Gesamtleukozytenflux angegeben. Permanent adhärenente Leukozyten zeigten über einen Beobachtungszeitraum von mindestens 30 Sekunden keinen Fluss und haften stationär an der Endotheloberfläche (F) des Venolenabschnittes ( $n/\text{mm}^2$ ). Diese berechnet sich unter Annahme einer annähernd zylindrischen Geometrie aus dem Gefäßdurchmesser (d) und der Länge (l) nach der Formel  $F = d * \pi * l * 1/1000000$  ( $\text{mm}^2$ ).

#### 5.4.3.4 Gefäßpermeabilität

Nach Gabe von FITC-Dextran konnte die Gefäßpermeabilität über die Erfassung von Plasmaleckagen bestimmt werden. FITC-Dextran zeichnet sich durch ein hohes Molekulargewicht (150.000 Da) aus und weist entsprechend bei intaktem Endothel nur eine geringe Extravasation auf. Bei Erhöhung der Gefäßpermeabilität kann FITC-Dextran vermehrt austreten und im extravasalen Gewebe nachgewiesen werden. Dieser Nachweis wurde computerassistent densitometrisch über den Quoti-

enten aus Grauwerten im extravasalen Gewebe und im Blutplasma (extravasal/intravasal) erbracht (*PRIES 1988*). Der Quotient gibt Auskunft über die Gefäßpermeabilität. Während er unter physiologischen Bedingungen  $<0,8$  ist, kann er sich bei vermehrter Extravasation auf Werte  $>1$  erhöhen, was zeigt, dass die extravasale Fluoreszenz bei erhöhter Permeabilität die des intravasalen Plasmas übersteigen kann (*VOLLMAR et al. 1997*).

#### 5.4.3.5 Gefäßdurchmesser und Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Mithilfe der CapImage<sup>®</sup>-Software konnte der Innendurchmesser von Venolen und Kapillaren durch Verbindung zweier gegenüberliegender Punkte am Gefäßrand senkrecht zum Gefäßverlauf bestimmt werden. Zur Messung der venulären Gefäßdurchmesser wurden drei Durchmesser pro Gefäß, zur Bestimmung der kapillaren Gefäßdurchmesser zehn Kapillaren pro Gesichtsfeld gemessen und anschließend gemittelt. Die Gefäßgrenzen waren bei dieser Methode gut zu erkennen, da FITC-Dextran den erythrozytenfreien Plasmasaum darstellt, der direkt an die Gefäßwand angrenzt. Neben den Gefäßdurchmessern wurde die individuelle Untersuchungslänge der Venolen (zwischen 100 und 200  $\mu\text{m}$ ) festgelegt. Die untersuchte Länge hing vor allem vom Gefäßverlauf und der mikroskopischen Darstellbarkeit ab. Gerade verlaufende Gefäßabschnitte wurden bevorzugt.

Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit (EFG) wurde in den definierten Venolenabschnitten computerassistent mithilfe der Line-Shift-Diagramm-Methode ermittelt (*KLYSCZ et al. 1997*). In die Mitte einer Venole wird zur Ermittlung der EFG eine virtuelle Messlinie gelegt und das Videoband wiedergegeben. Fortlaufend wird für jedes Halbbild entlang der Messlinie ein Grauwertprofil erstellt und aufgezeichnet. Aus den aneinander gereihten Grauwertprofilen erzeugt das Programm ein Line-Shift-Diagramm, in dem weiße und schwarze schräge Linien zu erkennen sind. Diese entstehen, da sich während der Messung in ständigem Wechsel weiße Plasmalücken bzw. schwarze Erythrozyten entlang der Messlinie bewegen. Zur Berechnung der EFG (mm/s) nutzt der Computer die Steigung dieser Linien. Die EFG errechnet sich nach der Formel:  $\text{EFG} = l / t * 1/1000$  (mm/s) aus der Länge des Gefäßabschnitts ( $l$ ;  $\mu\text{m}$ ) und der für dessen Passage benötigten Zeit ( $t$ ; s).

#### 5.4.3.6 Apoptose

Innerhalb von zehn Gesichtsfeldern wurden die mit Bisbenzimid angefärbten Kerne von Myozyten des *M. extensor digitorum longus* unter Nutzung des UV-Filters bei 630-facher Vergrößerung dargestellt und quantitativ (n/GF) erfasst. Bisbenzimid färbt als DNA-Farbstoff alle Zellkerne eines Gewebes an. Apoptotische Zellkerne können dennoch von nicht-apoptotischen Zellkernen unterschieden werden. Diese Unterscheidung wird durch kernmorphologische Veränderungen während der Apoptose wie Kondensation, Fragmentierung und Margination des nukleären Chromatins möglich (*MENGER & VOLLMAR 2000, EIPEL et al. 2004*).

#### 5.4.4 Asservierung von Blut und Gewebe

Nach Anlage des arteriellen Katheters wurde aus diesem Blut entnommen. Für die Blutgasanalyse (Rapidlab 348, Bayer Vital, Fernwald, Deutschland) wurden heparinisierte Glaskapillaren (ca. 90 µl) verwendet. Zur Erstellung eines Blutbildes wurde Blut in ein EDTA-Eppendorf-Röhrchen (200 µl) abgenommen. Nach Abschluss der IVM wurden 3-5 Eppendorf-Röhrchen (200 µl) an Citrat-Blut für sich anschließende Gerinnungsuntersuchungen gewonnen.

Nach Tötung der Tiere folgte die Entnahme von Gewebeproben. Der *M. extensor digitorum longus* wurde für etwa 3-4 Tage in phosphatgepuffertem Formalin 4% (Roth, Karlsruhe, Deutschland) fixiert und anschließend zur histologischen Untersuchung in Paraffinwachs eingebettet. Aus den Proben wurden anschließend 4 µm dicke Schnitte gefertigt, auf Objektträgern fixiert und gefärbt.

Aus der ebenfalls traumatisierten muskulären Umgebung des *M. extensor digitorum longus* wurde Gewebe des *M. tibialis anterior* zur Quantifizierung des Gewebedeoms asserviert.

#### 5.4.5 Blutanalysen

Das Blutbild aus dem EDTA-Vollblut wurde mit einem automatischen Zellzähler (Coulter Counter; AcTdiff, Coulter, Hamburg, Deutschland) angefertigt. Anschließend wurden die EDTA- und Citrat-Blutproben zentrifugiert und das gewonnene Plasma für spätere Untersuchungen bei -20°C tiefgefroren. Die laborchemische Bestimmung der Gerinnungsparameter Prothrombinzeit, partielle Thromboplastinzeit, Fibrinogenkonzentration und ATIII-Konzentration sowie die Bestimmung der IL6-

Konzentration im Blutplasma wurden im Zentrallabor des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock durchgeführt.

#### 5.4.6 Histologische Analysen und Feucht-Trockengewicht Ratio des Muskels

Die qualitative und quantitative Analyse gefärbter histologischer Muskelpräparate erfolgte verblindet an einem Lichtmikroskop (Axioskop 40; Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit angeschlossener Digitalkamera (Zeiss AxioCam HRc). In 50 aufeinander folgenden Gesichtsfeldern (high power fields, HPF) wurde jedes Präparat bei 400-facher Vergrößerung (x40 Objektiv; Anchroplan 0,65 NA; Zeiss, Göttingen, Deutschland) in Durchlichttechnik meanderförmig mikroskopiert.

Als Übersichtsfärbung zur Darstellung morphologischer Veränderungen der Muskulatur nach geschlossenem Weichteiltrauma sowie nach Endotoxinämie und ATIII-Therapie wurde eine Hämatoxylin-Eosin-Färbung (HE) angefertigt. Das nach Oxidation und chemischer Aufarbeitung aus Hämatoxylin entstandene Hämalaun färbt basophile Strukturen (z.B. DNA-haltige Zellkerne) blau, Eosin färbt azidophile Strukturen (z.B. Zytoplasmaproteine) rot. Diese Eigenschaften machen verschiedene Zellstrukturen gut voneinander abgrenzbar.

Die spezifische mikroskopische Darstellung von neutrophilen Granulozyten gelang mithilfe einer Chlor-Acetatesterase-Färbung (CAE). Es wurde quantitativ zwischen intravasalen und extravasierten, intramuskulär gelegenen Leukozyten unterschieden.

Während der Apoptose kommt es zum endonukleolytischen Abbau zellulärer DNA. Mithilfe der TUNEL-Methode (‘terminal transferase nick-end-labelling’) ist die Markierung und die Detektion von DNA-Strangbrüchen möglich (*GAVRIELI et al. 1992*). Zur Quantifizierung der Apoptose wurden mit einem entsprechenden Kit (ApopTag, Chemicon International Inc., Temecula, CA, USA) nach Herstelleranweisungen Färbungen zur Detektion apoptotischer Muskelzellen angefertigt. Diese waren im Präparat an ihrer braunen Färbung erkennbar. Alle histologischen Versuchsdaten wurden in der Einheit Zellen pro Gesichtsfeld (n/GF) angegeben.

Nach Waage des frisch entnommenen M. tibialis anterior (Feuchtgewicht) wurde das Präparat über 72 h bei 60°C in einem Trockenschrank gelagert. Anschließend wurde es erneut gewogen. Die Ratio aus Feucht- und Trockengewicht lässt

---

Rückschlüsse auf die Wasserkapazität im Muskel nach dessen Entnahme bzw. auf die Schwere des vorliegenden Muskelödems zu. Je größer der errechnete Wert ist, umso schwerer ist auch das Gewebeödem.



## 5.5 Statistische Analysen

Die während der Untersuchungen erhobenen Daten bei der Auswertung der Videobänder, der histologischen Schnitte und der Blutuntersuchungen wurden zur elektronischen Datenverarbeitung direkt in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Microsoft® Excel®) erfasst. Es wurden die Mittelwerte, Standardabweichungen (SD) und Standardfehler des Mittelwertes (SEM) berechnet.

Die Daten sind als Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) angegeben. Dabei rekrutieren sich die Mittelwerte der einzelnen Parameter aus den Einzelwerten untersuchter Parameter pro Tier pro Versuchsgruppe.

Die statistische Auswertung erfolgte nach Prüfung der Daten auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov-Test) und Varianzhomogenität (ANOVA) unter Verwendung der SigmaStat® Statistical Software, Version 2.03 (Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA).

Zum Vergleich der Versuchsgruppen wurden der Holm-Sidak multipler Vergleichstest sowie der Student's t-Test für den unverbundenen Paarvergleich durchgeführt. Falls die Voraussetzungen für diese nicht gegeben waren, wurde ein Rangsummen-Test (Kruskal-Wallis-Test) für unverbundene Stichproben mit einem sich anschließenden Dunn's Test oder Tukey-Test durchgeführt.

Die Ergebnisse wurden unter Verwendung der Software SigmaPlot® (Jandel Corp., San Rafael, CA, USA) in Säulendiagrammen als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (MW  $\pm$  SEM) bzw. unter Angabe des Median mit 25. und 75. Perzentile in Box-Plot-Diagrammen dargestellt.

Ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von  $p < 0.05$ , unter Berücksichtigung der Bonferroni-Korrektur, wurden Unterschiede in den Ergebnissen als signifikant angenommen. Beim Auftreten signifikanter Unterschiede wurde keine weitere Unterscheidung hinsichtlich bestimmter Signifikanzniveaus getroffen.

## 6 ERGEBNISSE

### 6.1 Makrohämodynamik

Das makrohämodynamische Monitoring der Versuchstiere umfasste die kontinuierliche Überwachung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) und der Herzfrequenz (HF). Die Mittelwerte dieser Parameter lagen in allen untersuchten Gruppen in den Grenzen physiologischer Normwerte der Ratte.

Die Auswertung des mittleren arteriellen Blutdrucks ergab bei Werten zwischen 99 und 111 mmHg keine statistisch signifikanten Unterschiede.

Die Herzfrequenz (HF) stieg nach Endotoxinämie (T/E) statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) um etwa 12% auf Werte um 420/min an, ATIII (T/E/Th) führte zu keiner Reduktion der HF. Die übrigen Gruppen blieben sowohl nach alleinigem Trauma (T) als auch nach Therapie (T/Th) mit Werten um 380/min auf Kontrollniveau (Tab. 1).

	<i>K</i>	<i>T</i>	<i>T/E</i>	<i>T/Th</i>	<i>T/E/Th</i>
<b>MAP (mmHg)</b>	109 ± 7	111 ± 10	111,0 ± 9	107 ± 4	99 ± 7
<b>HF (1/min)</b>	364 ± 8	377 ± 17	420 ± 11 *	382 ± 17	417 ± 7 *

Tab. 1: Quantitative Analyse des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) und der Herzfrequenz (HF). Dargestellt sind die Versuchsgruppen *K* (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), *T* (Trauma), *T/E* (Trauma und Endotoxinämie), *T/Th* (Trauma und ATIII als Therapie), *T/E/Th* (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben sind der Mittelwert ± SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test : \*  $p < 0.05$  vs. *K*.

### 6.2 Muskuläre Mikrozirkulation und Apoptose

#### 6.2.1 Funktionelle Kapillardichte und NADH-Autofluoreszenz

Nach Trauma (T) zeigte sich ein ausgeprägtes nutritives Perfusionsversagen mit einer von ~570 (K) auf ~380  $\text{cm/cm}^2$  signifikant ( $p < 0,05$ ) verminderten funktionellen Kapillardichte (FCD). ATIII (T/Th) führte zu einem deutlichen Anstieg der FCD auf ~440  $\text{cm/cm}^2$ , das Kontrollniveau wurde jedoch nicht erreicht. Die Endotoxinämie (T/E) hatte mit einer FCD von 380  $\text{cm/cm}^2$  keinen weiteren Einfluss auf das Perfusionsversagen nach Muskeltrauma. ATIII bewirkte nach Endotoxinämie (T/E/Th) einen

Anstieg der FCD um ~24% und führte damit zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Verbesserung der nutritiven Gewebepfusion (Abb. 13).

Die vorwiegend traumatisch induzierte Perfusionsstörung bedingte in den Gruppen T und T/E eine um ~44% signifikant ( $p < 0,05$ ) gesteigerte NADH-Autofluoreszenz, die auf eine ausgeprägte Gewebhypoxie hinweist. Auch die NADH-Autofluoreszenz zeigte bei Werten um 78 aU keinen Unterschied zwischen alleinigem Trauma und Trauma mit Endotoxinämie. Die Therapie mit ATIII bewirkte in den Gruppen T/Th und T/E/Th einen signifikanten Rückgang der NADH-Autofluoreszenz auf Kontrollniveau (56 aU). Diese Ergebnisse sprechen für eine deutliche Verbesserung der Gewebeoxygenierung nach ATIII-Therapie (Abb. 13).

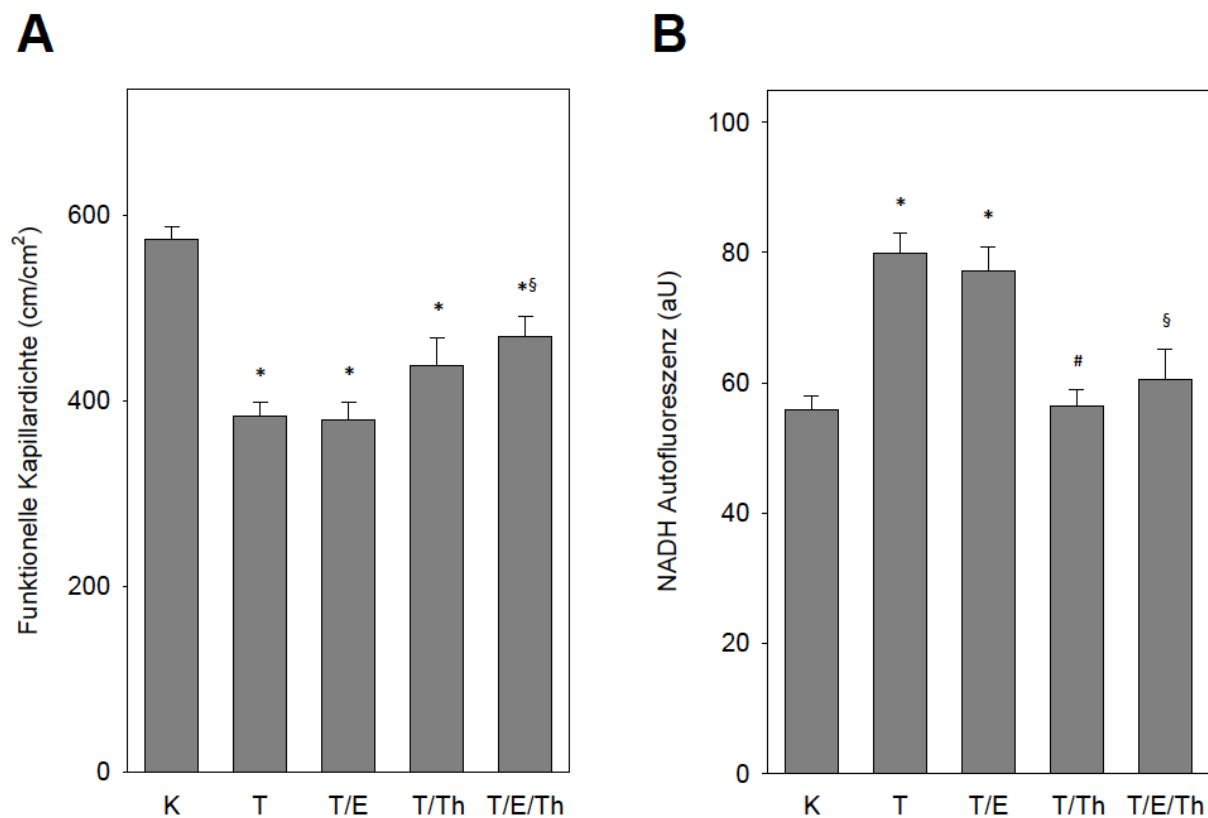


Abb. 13: Quantitative Analyse der funktionellen Kapillardichte (A) und der NADH Autofluoreszenz (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0,05$  vs. K, #  $p < 0,05$  vs. T, §  $p < 0,05$  vs. T/E.

Die Endotoxinämie hatte im Gegensatz zum Trauma weder einen entscheidenden Einfluss auf die Gewebepfusion (FCD) noch auf die aus dieser resultieren-

de Gewebehypoxie (NADH-Autofluoreszenz). Auch die Therapieergebnisse nach ATIII-Applikation mit und ohne Endotoxinämie waren vergleichbar (Abb. 13).

Im vorliegenden experimentellen Ansatz konnte eine negative Korrelation zwischen der FCD und der NADH-Autofluoreszenz gezeigt werden. Diese ist in Abb. 14 anhand eines Streudiagrammes mit Regressionsgerade dargestellt.

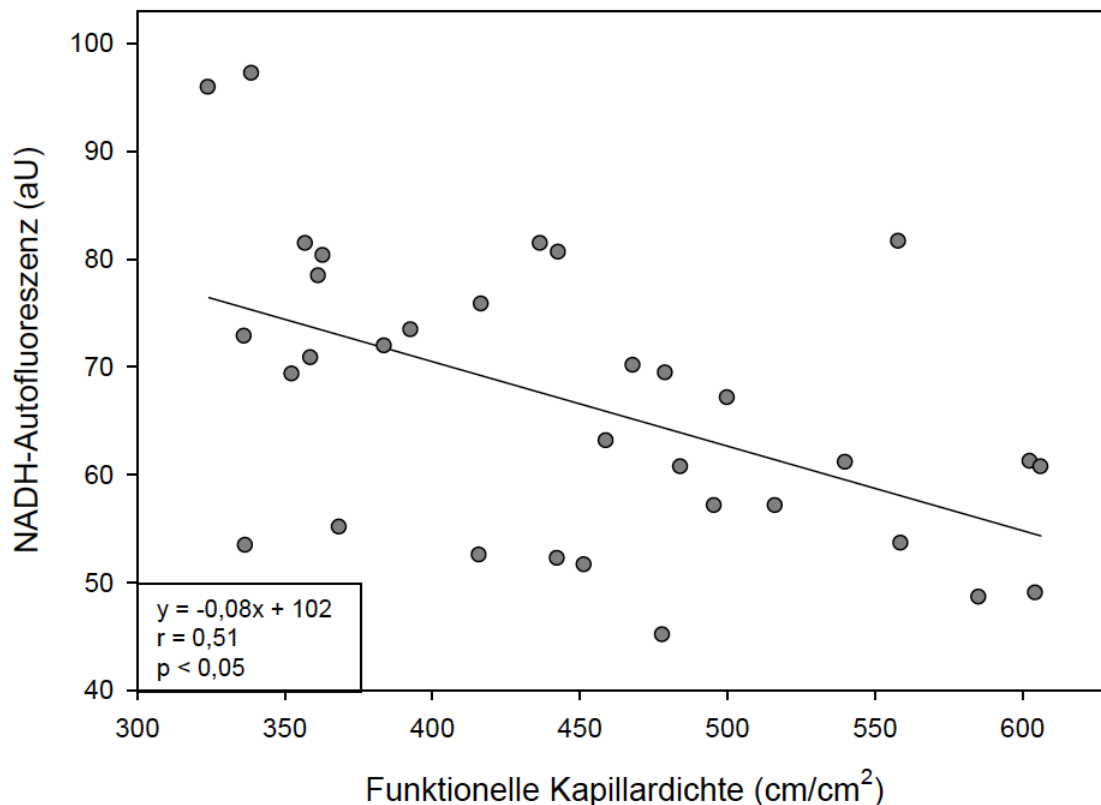


Abb. 14: Regressionsanalyse zwischen den Werten der funktionellen Kapillardichte und der NADH Autofluoreszenz; Lineare Funktion  $y = -0,08x + 102$ ,  $r = 0,51$ ,  $p < 0,05$ .

### 6.2.2 Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Die zelluläre Entzündungsreaktion wurde intravitalmikroskopisch nach quantitativer Analyse Rhodamin 6G gefärbter Leukozyten in ausgewählten Venolen des traumatisierten M. extensor digitorum longus beurteilt.

Das Weichteiltrauma (T) hatte keinen wesentlichen Einfluss auf den Gesamtleukozytenflux und lag mit 37 Leukozyten/30s etwa auf Kontrollniveau. Auch nach ATIII-Applikation (T/Th) lagen die Leukozytenzahlen nur knapp unter denen der Kontrolle (K). Die Endotoxinämie (T/E) bewirkte einen etwa 38%igen Anstieg des Ge-

samtleukozytenfluxes, der auch nach ATIII-Therapie (T/E/Th) nicht zurück ging. Nach statistischer Analyse des Gesamtleukozytenfluxes lagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen vor (Abb. 15).

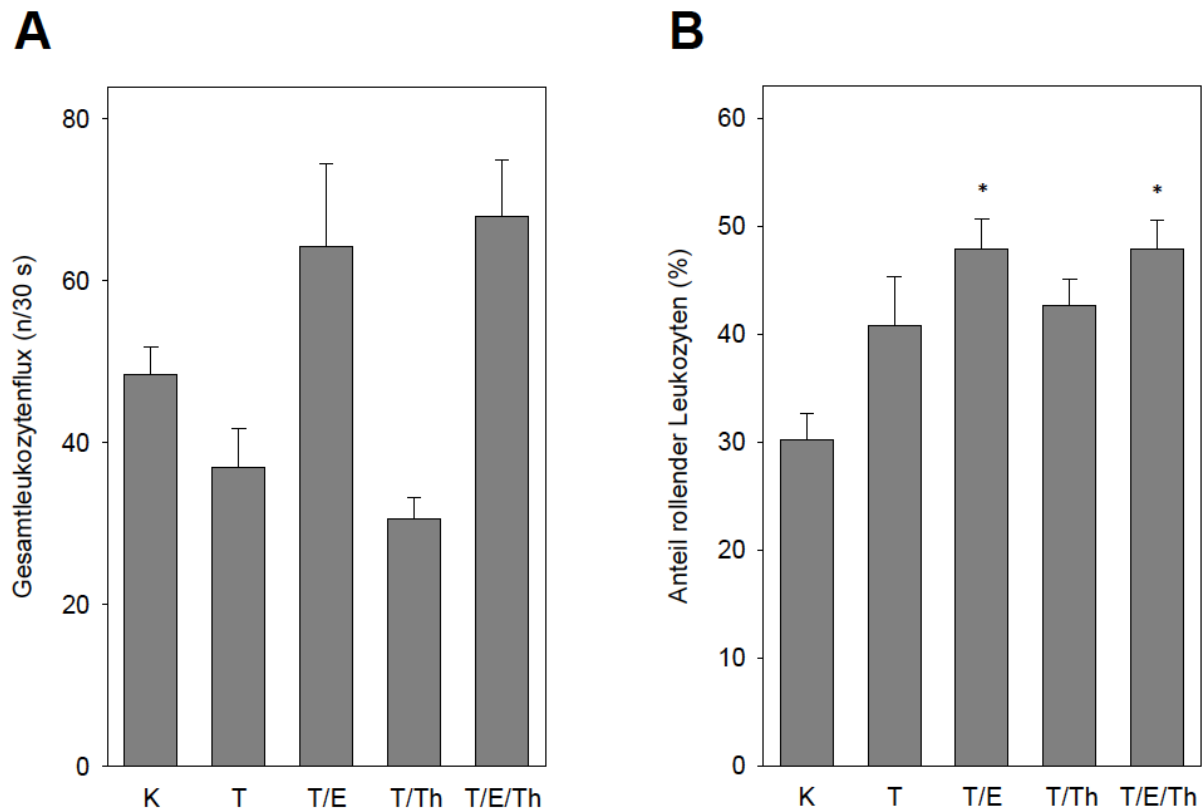


Abb. 15: Quantitative Analyse des Gesamtleukozytenfluxes (A) und des Anteils rollender Leukozyten (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K.

Die Fraktion am Endothel der Venole entlang rollender Leukozyten wurde als prozentualer Anteil am Gesamtleukozytenflux angegeben. Ihr Anteil stieg durch das Trauma (T) auf 41%, bzw. auf 48% bei Endotoxinämie (T/E) an ( $p < 0,05$  vs. Kontrolle: 30%). ATIII führte in keiner der Therapiegruppen zu einer Reduktion des Anteils rollender Leukozyten am Gesamtleukozytenflux (Abb. 15).

Das Trauma bewirkte mit (T/E) und ohne Endotoxinämie (T) einen statistisch signifikanten Anstieg der Zahl permanent am venulären Endothel adhärenenten Leukozyten auf etwa 360% der Kontrolle ( $204 \pm 20/\text{mm}^2$ ). Nach Therapie (T/Th und T/E/Th)

sanken die Zahlen wieder auf Kontrollniveau und unterschieden sich statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) von den nicht-therapierten Gruppen (T und T/E).

Zusammenfassend bestätigt sich, dass ATIII die Leukozyten-Endothelzellinteraktion und hierbei im Besonderen die Anzahl der permanent am Gefäßendothel adhärenenten Leukozyten nach schwerem Weichteiltrauma auf Kontrollniveau reduzierte (Abb. 16). Die Wirkung der ATIII-Therapie wurde durch eine begleitende Endotoxämie nicht beeinträchtigt.

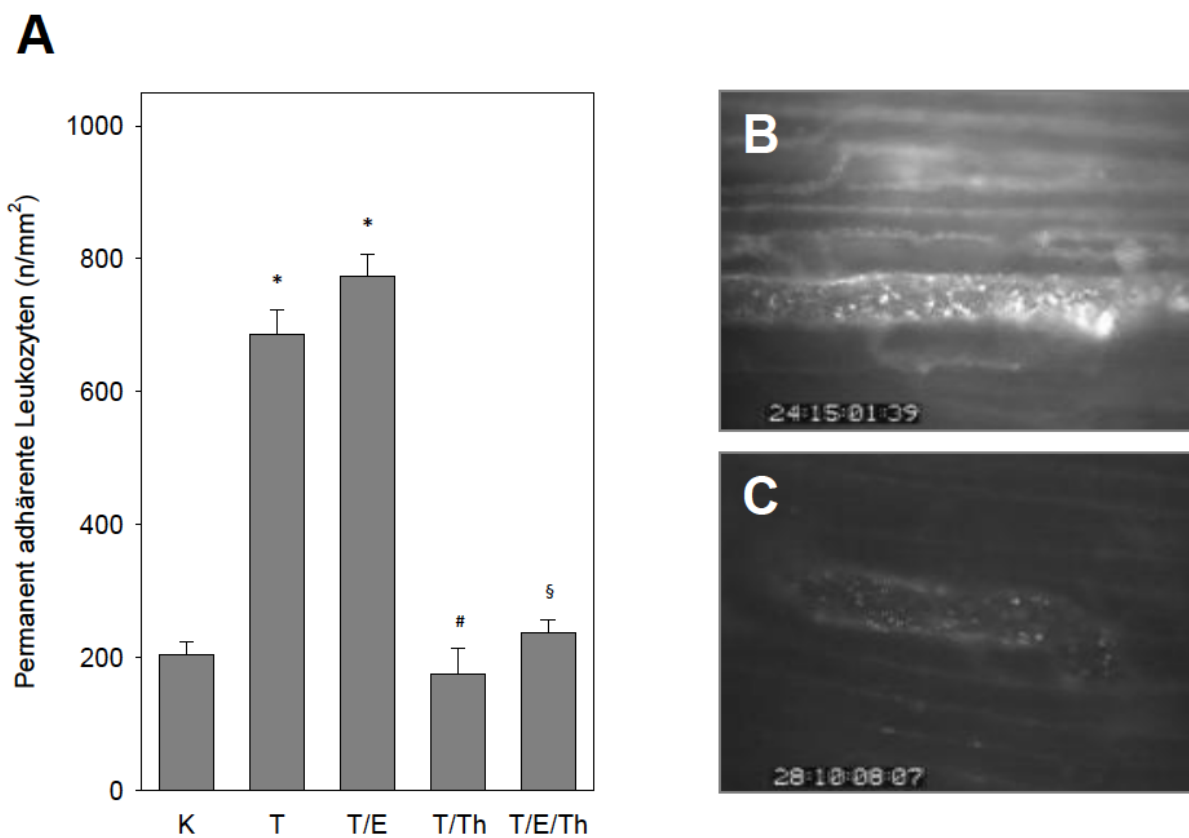


Abb. 16: Quantitative Analyse der permanent adhärenenten Leukozyten (A) und repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen aus den Untersuchungsgruppen T/E (B) und T/E/Th (C). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0,05$  vs. K, #  $p < 0,05$  vs. T, §  $p < 0,05$  vs. T/E.

### 6.2.3 Gefäßpermeabilität

Nach Endothelschädigung kann das hochmolekulare FITC-Dextran vermehrt aus Blutgefäßen nach extravasal austreten und dort durch seine Fluoreszenz nach-

gewiesen werden. Die Gefäßpermeabilität wurde für die vorliegende Studie densitometrisch über extravasal und im Blutplasma gemessene Grauwerte und den daraus errechneten Quotienten (extravasal/intravasal) bestimmt. Je größer der Quotient ausfällt, desto ausgeprägter ist bei entsprechendem Endothelschaden die Gefäßpermeabilität.

Das Trauma (T) steigerte die Gefäßpermeabilität im Muskel signifikant ( $p < 0,05$ ) um etwa 30%. Die Endotoxinämiegruppe (T/E) wies ähnliche Werte auf (Abb. 17).

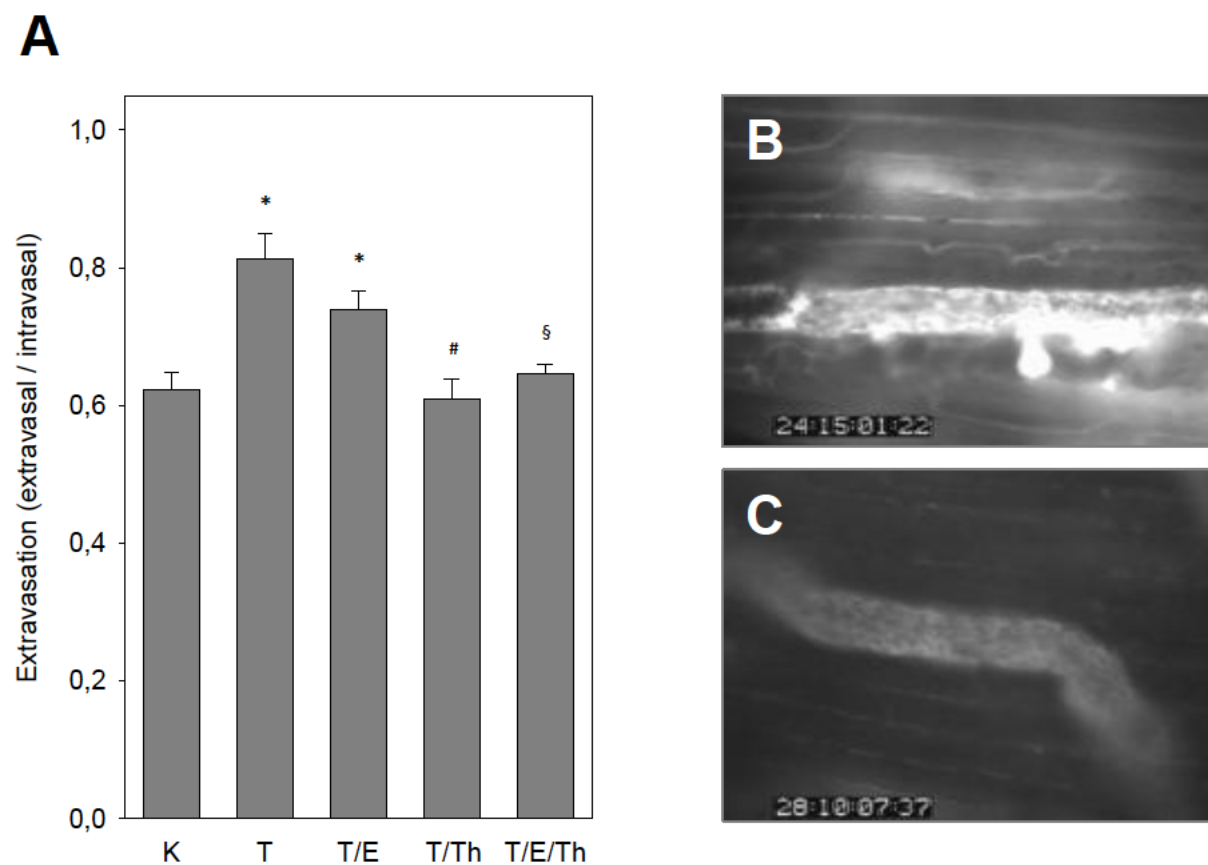


Abb. 17: Quantitative Analyse der Gefäßpermeabilität anhand der Extravasation von FITC-Dextran (A) und repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen aus den Untersuchungsgruppen T/E (B) und T/E/Th (C). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0,05$  vs. K, #  $p < 0,05$  vs. T, t-Test: §  $p < 0,05$  vs. T/E.

ATIII revidierte den traumatisch bedingten Anstieg der Gefäßpermeabilität auf Werte um  $\sim 0,6$  (extravasal / intravasal), welche den Kontrollwerten entsprachen. Die therapierten (T/Th und T/E/Th) unterschieden sich somit statistisch signifikant von

den nicht-therapierten Versuchsgruppen (T und T/E). Die signifikante Wirkung von ATIII auf die Gefäßpermeabilität nach schwerem Weichteiltrauma wurde durch die Endotoxinämie nicht beeinträchtigt.

#### 6.2.4 Gefäßdurchmesser und Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die intravitalmikroskopisch untersuchten Parameter mittlere kapillare Weite ( $\mu\text{m}$ ), mittlerer venulärer Gefäßdurchmesser und Erythrozytenfließgeschwindigkeit (EFG) zeigten zwischen den einzelnen Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede (Tab. 2).

Die mittleren kapillaren Durchmesser lagen zwischen 4,9 und 5,3  $\mu\text{m}$ , die mittleren venulären Durchmesser zwischen 35,7 und 40,2  $\mu\text{m}$ . Bei der venulären Erythrozytenfließgeschwindigkeit wurden Messwerte zwischen 216 und 329  $\mu\text{m/s}$  ermittelt.

	<i>K</i>	<i>T</i>	<i>T/E</i>	<i>T/Th</i>	<i>T/E/Th</i>
<b>Kapillare Gefäßdurchmesser (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	5,0 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,2	5,1 $\pm$ 0,2	4,9 $\pm$ 0,2	5,3 $\pm$ 0,2
<b>Venuläre Gefäßdurchmesser (<math>\mu\text{m}</math>)</b>	35,7 $\pm$ 4,3	39,6 $\pm$ 3,4	40,1 $\pm$ 2,5	40,2 $\pm$ 4,4	36,0 $\pm$ 2,4
<b>Venuläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit (<math>\mu\text{m/s}</math>)</b>	299 $\pm$ 47	312 $\pm$ 31	294 $\pm$ 41	216 $\pm$ 18	329 $\pm$ 16

Tab. 2: Quantitative Analyse der kapillaren und venulären Gefäßdurchmesser und der Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Dargestellt sind die Versuchsgruppen *K* (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), *T* (Trauma), *T/E* (Trauma und Endotoxinämie), *T/Th* (Trauma und ATIII als Therapie), *T/E/Th* (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM.

#### 6.2.5 Apoptose

Nach Trauma (T) stieg die Zahl Bisbenzimid-gefärbter apoptotischer Zellkerne statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) von 0,5 auf ca. 4 Zellen/GF an. Die Endotoxinämie (T/E) veränderte die Zahl apoptotischer Zellen nicht, sodass beide Gruppen etwa das gleiche Niveau an Zelltod aufwiesen.

ATIII reduzierte die Zahl apoptotischer Zellkerne in den Gruppen T/Th und T/E/Th um etwa 38%, was statistisch der Rückführung auf das Kontrollniveau entsprach (Abb. 18). Hierbei konnte kein negativer Einfluss der Endotoxinämie auf die Wirkung der ATIII-Therapie festgestellt werden.



**A**

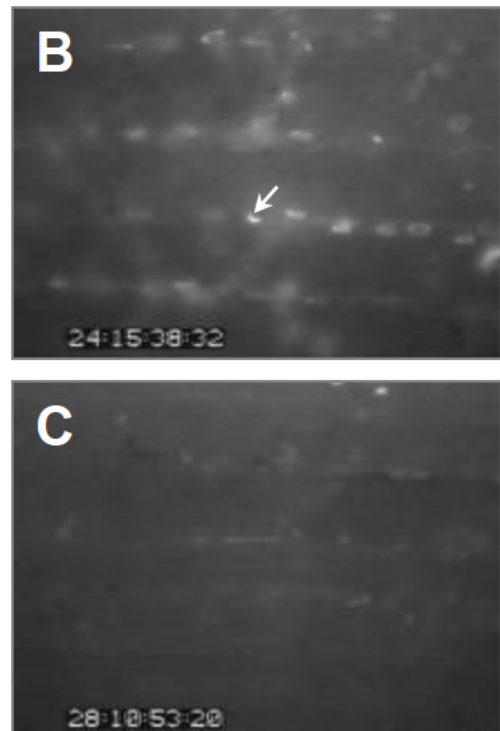
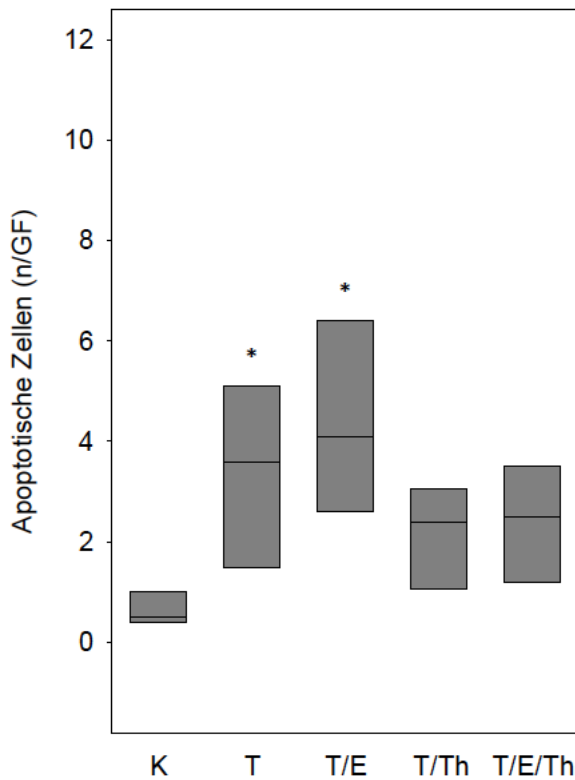


Abb. 18: Quantitative Analyse apoptotischer Zellen (A) und repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen aus den Untersuchungsgruppen T/E (B) und T/E/Th (C). Der Pfeil (B) markiert einen apoptotischen Zellkern mit typischer intensiver Fluoreszenz. Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist aufgrund fehlender Normalverteilung der Median (25. Perzentile/75.Perzentile), Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Post-Hoc Vergleich, Dunn's Test: \*  $p < 0.05$  vs. K.

**6.3 Blutuntersuchungen**

6.3.1 Blutgasanalyse

Zur Optimierung der maschinellen Beatmung wurden je nach Notwendigkeit im Verlauf der Untersuchung z.T. mehrere arterielle Blutgasanalysen durchgeführt.

Beim pH-Wert und der Basenabweichung (BE) zeigten sich zwischen den Versuchsgruppen keine statistisch signifikanten Unterschiede. Beide Parameter lagen durchweg innerhalb des vorgesehenen Toleranzbereiches. Der mittlere arterielle Kohlendioxidpartialdruck ( $pCO_2$ ) lag in den meisten untersuchten Gruppen im Referenzbereich, einzig die Versuchsgruppe T/E zeigte im Mittel hypokapnische Werte, die sich statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) zu denen der Kontrollgruppe unterschieden.

Der mittlere arterielle Sauerstoffpartialdruck entsprach durchgehend physiologischen Werten ohne statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen (Tab. 3).

	<i>K</i>	<i>T</i>	<i>T/E</i>	<i>T/Th</i>	<i>T/E/Th</i>
<b>pH</b>	7,41 (7,38 / 7,43)	7,51 (7,46 / 7,53)	7,47 (7,43 / 7,49)	7,53 (7,42 / 7,56)	7,48 (7,42 / 7,50)
<b>BE (mmol/l)</b>	3,2 ± 0,5	4,5 ± 0,8	3,3 ± 1,2	5,2 ± 1,1	3,0 ± 0,5
<b>pCO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	44 ± 2,1	36,9 ± 2,2	31,2 ± 2,4 *	36,5 ± 2,3	35,2 ± 2,5
<b>pO<sub>2</sub> (mmHg)</b>	80,7 ± 3,8	86,0 ± 4,3	83,9 ± 5,4	92,2 ± 3,9	82,2 ± 2,4
<b>Hb (mmol/l)</b>	8,4 (8,4 / 9,3)	8,3 (7,9 / 8,6)	8,8 (8,2 / 9,1)	8,5 (8,3 / 8,5)	8,0 (7,5 / 8,4)
<b>Hkt (%)</b>	43,4 ± 1,5	41,6 ± 1,1	42,2 ± 1,0	41,3 ± 0,4	39,2 ± 1,3
<b>Na<sup>+</sup> (mmol/l)</b>	139,1 ± 1,1	139,4 ± 0,8	139,9 ± 0,7	139,8 ± 1,0	138,9 ± 1,3
<b>K<sup>+</sup> (mmol/l)</b>	3,9 ± 0,1	3,9 ± 0,05	4,0 ± 0,3	4,1 ± 0,1	3,8 ± 0,2

Tab. 3: Quantitative Analyse von Blutgasanalyseparametern und Elektrolyten. Dargestellt sind die Versuchsgruppen *K* (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), *T* (Trauma), *T/E* (Trauma und Endotoxinämie), *T/Th* (Trauma und ATIII als Therapie), *T/E/Th* (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist im Falle fehlender Normalverteilung der Median (25. Perzentile/75.Perzentile), ansonsten der Mittelwert ± SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. *K*.

Der Hämoglobingehalt (Hb) des Blutes lag in allen Gruppen ohne statistisch signifikante Unterschiede im unteren Normbereich. Auch die Hämatokritwerte (Hkt) waren ohne statistisch relevante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen normwertig. Ebenso lagen die Natrium- und Kaliumkonzentrationen im Mittel ohne statistisch signifikanten Unterschied in allen Versuchsgruppen im Normbereich (Tab 3).

### 6.3.2 Kleines Blutbild

Erythrozyten-, Thrombozyten- und Leukozytenzahlen wurden automatisiert in arteriellem EDTA-Blut gezählt.

Die Erythrozytenzahlen lagen im Mittel in allen Versuchsgruppen zwischen 6,5 und 7,2 x 10<sup>12</sup>/l. Statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor.

Die Thrombozytenzahlen der nicht endotoxinämischen Versuchsgruppen (T und T/Th) entsprachen mit etwa  $750 \cdot 10^9/l$  denen der Kontrolle. Endotoxinämie bewirkte in den Gruppen T/E und T/E/Th einen Abfall der Thrombozytenzahlen auf ~20% des Ausgangswertes und damit eine signifikante ( $p < 0,05$ ) Thrombozytopenie (Abb.19).

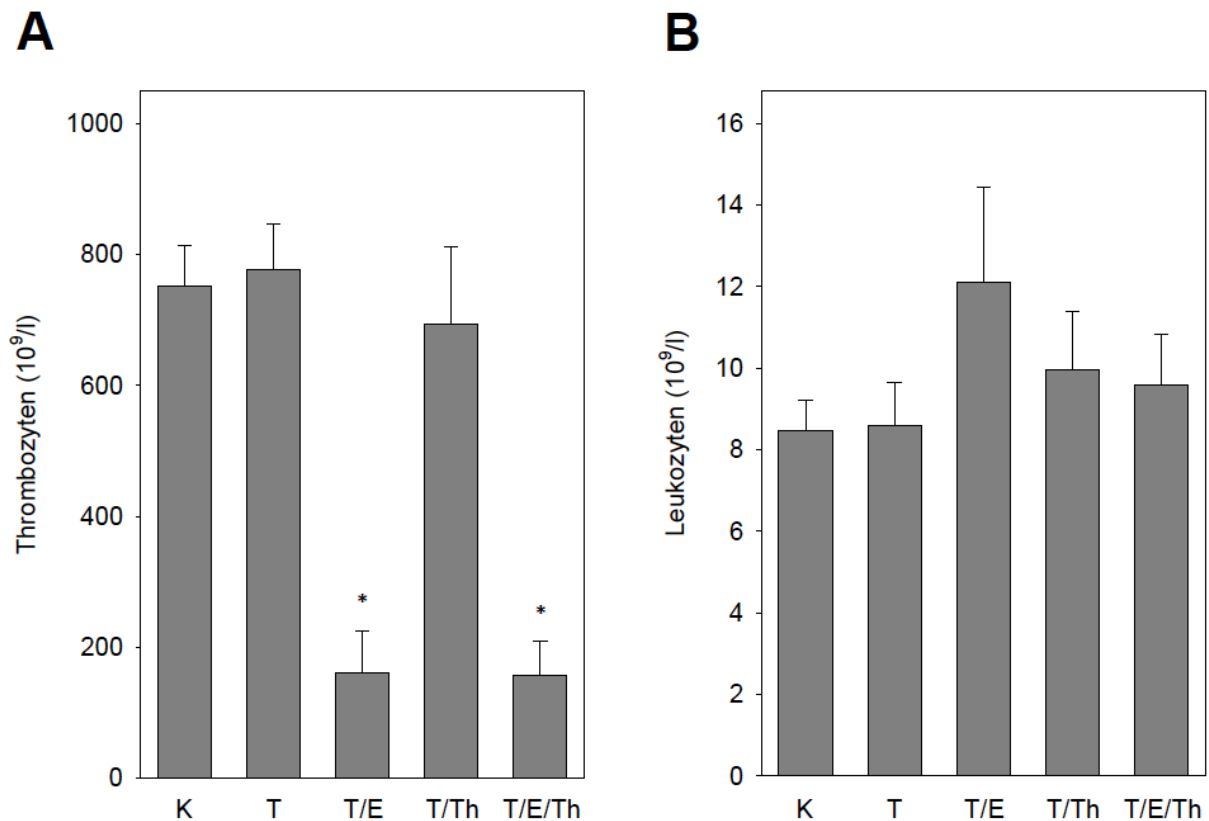


Abb. 19: Quantitative Analyse systemischer Thrombozyten- (A) und Leukozytenzahlen (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K.

Die Leukozytenzahlen aller Versuchsgruppen waren im Mittel auf Kontrollniveau, statistisch signifikante Unterschiede lagen nicht vor. Ausschließlich in der nicht therapierten Endotoxinämiegruppe (T/E) zeigte sich ein Anstieg der Leukozytenzahl um etwa 30%. Nach ATIII-Therapie war dieser Anstieg rückläufig (Abb. 19).

### 6.3.3 Interleukin-6

Interleukin-6 (IL-6) ist ein im Rahmen akuter Entzündungsreaktionen vor allem von Monozyten und Makrophagen frühzeitig freigesetztes Zytokin. Es hat eine besonders kurze Halbwertszeit von etwa 20 Minuten und ist an der Induktion der Synthese klassischer Akute-Phase-Proteine beteiligt.

Um die systemische Entzündungsreaktion in der vorliegenden experimentellen Studie umfangreicher charakterisieren zu können, wurde der IL-6-Plasmaspiegel aller Versuchstiere bestimmt. Die Messungen fanden im Zentrallabor des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock statt und erfolgten mittels ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) aus tiefgefrorenem EDTA-Plasma. Das Blut für die entsprechenden Proben wurde 18h nach intraperitonealer Applikation von LPS entnommen, zentrifugiert und sofort eingefroren.

Die mittleren Spiegel lagen mit  $<2$  pg/ml in allen Versuchsgruppen im physiologischen Bereich ( $< 5,4$  pg/ml) und unterhalb der Nachweisgrenze. Die Ergebnisse der IL6-Bestimmung flossen entsprechend nicht weiter in die Ergebnisdarstellung ein.

### 6.3.4 Blutgerinnung

Die Bestimmung der Gerinnungsparameter aus Citratplasma wurden im Zentrallabor des Institutes für Klinische Chemie und Laboratoriumsmedizin der Universität Rostock durchgeführt. Folgende Parameter wurden untersucht:

Thromboplastinzeit (TPZ, Quick) (%)

Partielle Thromboplastinzeit (PTT) (s)

Fibrinogen (g/l)

Antithrombin (ATIII) – Aktivität (%).

Die Thromboplastinzeit (Quick) lag in allen untersuchten Gruppen im Median zwischen 135 und 150% und wurde durch keine der experimentellen Interventionen statistisch signifikant beeinflusst (Abb. 20).

Die partielle Thromboplastinzeit (PTT) veränderte sich unter dem Einfluss des Traumas (T) nicht, bei Endotoxinämie verlängerte sie sich um etwa fünf Sekunden. Nach ATIII-Gabe (T/Th) war die Verlängerung um eine weitere Sekunde zu beobach-

ten. Die Versuchsgruppen T und T/Th unterschieden sich bei einer PTT-Verlängerung von etwa 30% statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) voneinander. Beide Therapiegruppen (T/Th und T/E/Th) lagen mit einer PTT von 30s auf etwa dem gleichen Niveau. Bei Endotoxinämie war die Verlängerung der PTT nach ATIII-Applikation nicht statistisch signifikant (Abb. 20).

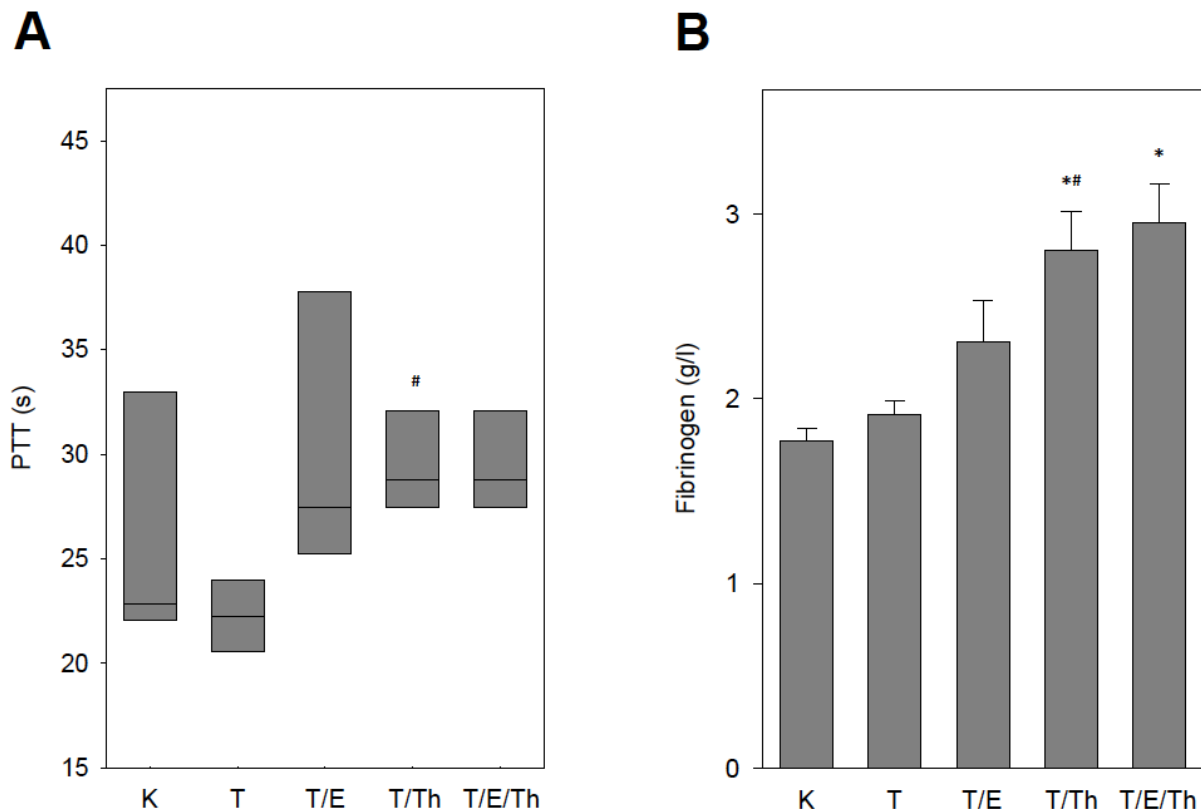


Abb. 20: Quantitative Analyse der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) (A) und der systemischen Fibrinogenkonzentrationen (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). A: Angegeben ist aufgrund fehlender Normalverteilung der Median (25. Perzentile/75.Perzentile), Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Post-Hoc Vergleich, t-Test: #  $p = 0,003$  vs. T; B: Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K, #  $p < 0.05$  vs. T.

Während der Fibrinogen-Blutspiegel in der Kontrollgruppe (K) sowie nach Trauma (T) unbeeinflusst blieb, stieg er unter dem Einfluss der Endotoxinämie (T/E) leicht und nach ATIII-Therapie in beiden behandelten Gruppen signifikant ( $p < 0,05$ ) um etwa 60% auf Werte um 2,9 g/l an (Abb. 20).

In der ATIII-Aktivität unterschieden sich die Versuchsgruppen statistisch nicht signifikant. ATIII ist ein bekannter Sepsismarker, dessen Plasmaaktivität (%) bei sys-

temischer Inflammation sinkt. Während das Trauma (T) keinen bedeutenden Einfluss auf die ATIII-Konzentration (88%) hatte, fiel diese bei Endotoxinämie (T/E) deutlich von 98% (K) auf 78% ab. Durch Gabe von ATIII stieg die Plasmaaktivität mit Werten von 114% (T/Th) und 104% (T/E/Th) deutlich auf supranormale Konzentrationen an.

#### **6.4 Histologie und Feucht-Trockengewicht Ratio des Muskels**

Verglichen mit den Präparaten der Kontrollgruppe (K) zeigten Präparate traumatisierter Muskulatur (T) ein auffällig scholliges Auseinanderweichen von Muskelfasern mit deutlicher Verbreiterung des Interstitiums im Sinne eines Gewebeödems. Die Behandlung mit ATIII hatte nach Trauma (T/Th) keinen Einfluss auf die interstitielle Schwellung. Nach Trauma und Endotoxinämie (T/E) fanden sich ebenso verbreiterte Interstitien, die die umliegenden Muskelfasern auseinander weichen und verschmälert erscheinen ließen. Nach ATIII-Gabe (T/E/Th) zeigte sich ein deutlicher Rückgang der interstitiellen Schwellung, die Muskelfasern schienen normal breit zu sein. Durch die ATIII-Therapie ähnelten die Präparate morphologisch denen der Kontrollgruppe.

Die nach CAE-Färbung quantitativ erfassten Leukozyten wurden ihrer Lokalisation in verschiedenen Kompartimenten des Präparates zugeordnet. Hierbei wurden Leukozyten innerhalb von Gefäßanschnitten und extravasierte Leukozyten im Muskelgewebe unterschieden. Aus den Zahlen der Leukozyten beider Kompartimente wurde schließlich die Summe aller im Präparat erfasster Leukozyten errechnet.

Die Population innerhalb von Gefäßanschnitten liegender Leukozyten (n/GF) zeigte keine statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Dennoch war im Mittel ein deutlicher zahlenmäßiger Anstieg von ~60% nach Trauma (T) und von ~130% nach Endotoxinämie (T/E) zu erkennen. Die Leukozytenzahlen lagen zwischen 1 und 2,3 Zellen/GF. ATIII senkte die Leukozytenzahl der ausschließlich traumatisierten Gruppe (T/Th) nur leicht. Die nach Endotoxinämie (T/E) stärker erhöhte Leukozytenzahl sank unter ATIII (T/E/Th) um etwa 45% ab.

Die innerhalb des Muskelgewebes quantifizierte Leukozytenpopulation wies einen ähnlichen Trend auf. Hier stiegen die Leukozytenzahlen nach Trauma (T) im Median auf etwa das Zweifache des Kontrollwertes 0,78 (0,76/0,81)/GF an. Unter

Endotoxinämie (T/E) verdreifachte sich der Wert knapp und unterschied sich statistisch signifikant ( $p < 0,05$ ) von der Kontrolle (K). ATIII bewirkte besonders bei Endotoxinämie (T/E/Th) eine Senkung der Leukozytenzahl um etwa 30%. Die ATIII-Therapie bei alleinigem Traumas (T/Th) zeigte kaum eine Wirkung (Abb. 21).

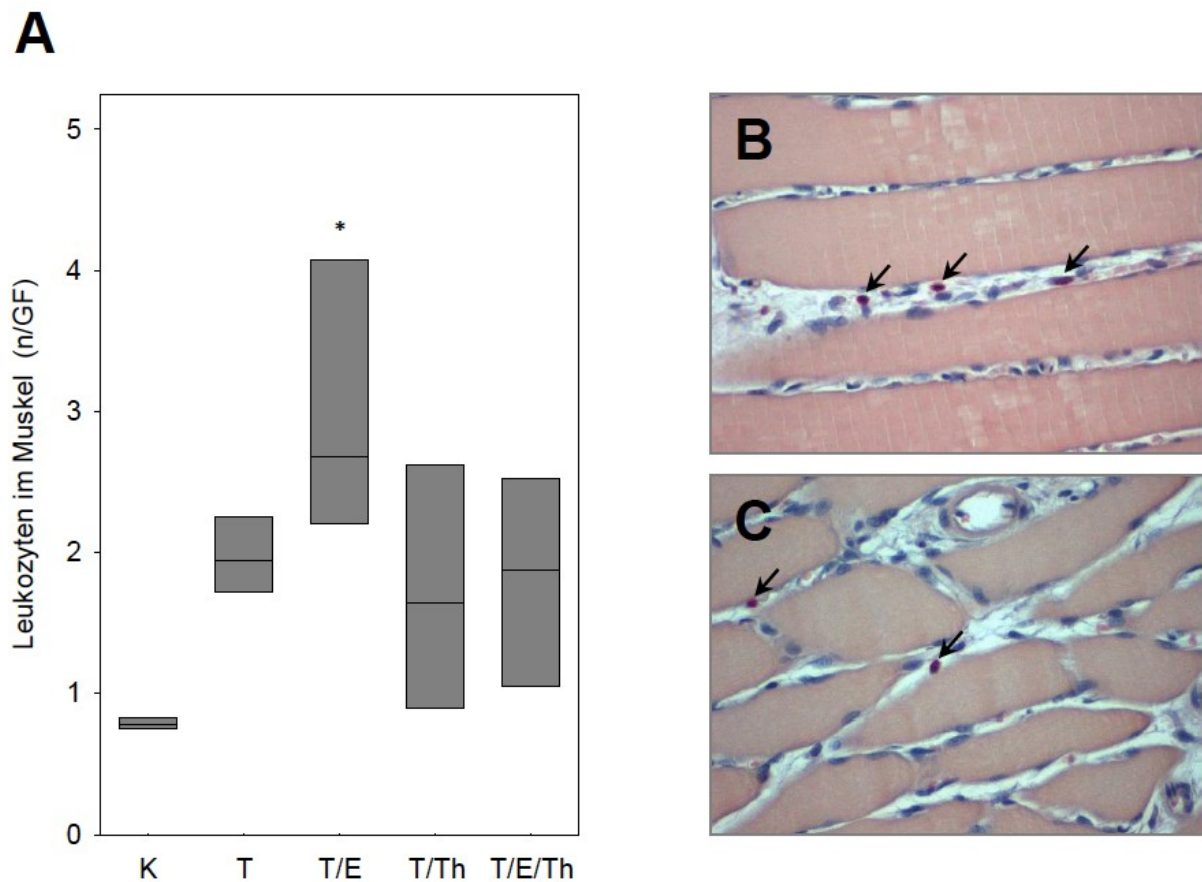


Abb. 21: Quantitative Analyse von extravasierten Leukozyten im Muskelgewebe (A) und repräsentative histologische Abbildungen aus den Untersuchungsgruppen T/E (B) und T/E/Th (C). Die Pfeile (B und C) markieren quantitativ erfasste Leukozyten im Muskelgewebe. Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist aufgrund fehlender Normalverteilung der Median (25. Perzentile/75.Perzentile), Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Post-Hoc Vergleich, Tukey-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K.

Die Gesamtsumme aller histologisch quantifizierten Leukozyten verdoppelte sich nach Trauma (T). Bei zusätzlicher Endotoxinämie (T/E) verdreifachte sie sich, was einem statistisch signifikanten ( $p < 0,05$ ) Unterschied zur Kontrolle entsprach.

ATIII senkte die Leukozytenzahl der ausschließlich traumatisierten Gruppe (T/Th) in nur unbedeutendem Ausmaß. Die Leukozytenzahl bei Endotoxinämie (T/E/Th) wurde durch ATIII um etwa 35% abgesenkt. Die damit erreichte Anzahl von

~3,4 Leukozyten/GF entspricht der Anzahl von Leukozyten im Muskel der ausschließlich traumatisierten Gruppe. ATIII hob also, gemessen anhand der histologisch erfassten Leukozytenzahlen, die Wirkung der Endotoxinämie nach schwerem Trauma auf.

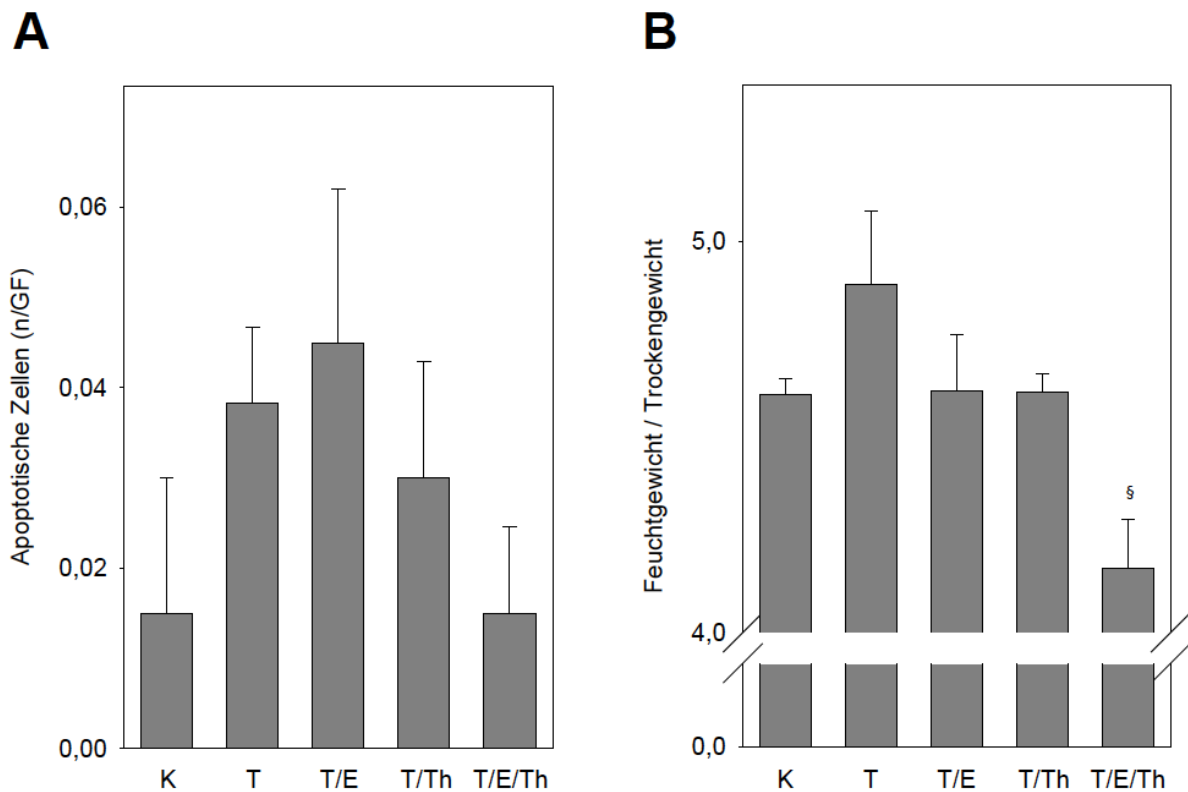


Abb. 22: Quantitative Analyse apoptotischer Zellen (A) und der Ratio aus muskulärem Feucht- und Trockengewicht (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, t-Test: §  $p < 0,05$  vs. T/E.

Apoptotische Zellkerne wurden in den histologischen Präparaten durch Anwendung der TUNEL-Methode rostbraun gefärbt und waren so leicht von anderen Zellstrukturen innerhalb des Muskelgewebes abgrenzbar. Bei einer insgesamt sehr geringen Zahl apoptotischer Zellen (0,015 – 0,045/GF) in allen untersuchten Gruppen sind die Ergebnisse dieser Untersuchung in der Zusammenschau aller Untersuchungsergebnisse mit hoher Zurückhaltung zu interpretieren.

Sowohl das Trauma (T) als auch die Kombination aus Trauma und Endotoxinämie (T/E) bewirkten eine Zunahme an Apoptose. Nach Endotoxinämie war der An-



stieg noch etwas stärker ausgeprägt, verglichen mit der Kontrollgruppe (K) verdreifachte sich die Anzahl apoptotischer Zellkerne (Abb. 22).

ATIII reduzierte die Zahl apoptotischer Zellkerne in beiden therapierten Versuchsgruppen (T/Th und T/E/Th) deutlich. In der Endotoxinämiegruppe (T/E/Th) wurde durch ATIII eine Absenkung auf die Anzahl apoptotischer Zellkerne der Kontrollgruppe (0,015/GF) erreicht (Abb. 22).

Zur Feststellung eines Muskelödems wurde die Ratio aus Feucht- und Trockengewicht von Muskelgewebe errechnet.

Nach Trauma fiel ein gering verstärktes Muskelödem auf, das durch die Applikation von Endotoxin nicht zusätzlich verstärkt wurde. Es waren keine statistischen Signifikanzen auszumachen.

ATIII bewirkte in beiden therapierten Versuchsgruppen einen deutlichen Rückgang des Ödems. Die Gruppe T/Th erreichte Kontrollniveau, T/E/Th zeigte ebenso eine statistisch signifikante ( $p < 0,05$ ) Reduktion des Gewebeödems (Abb. 22).

## 7 DISKUSSION

### 7.1 Diskussion von Material und Methodik

Zur Durchführung chirurgischer Maßnahmen an Versuchstieren wird ein geeignetes Narkoseverfahren benötigt. Das mittellang (4-8 h) wirkende Barbiturat Pentobarbital wird in tierexperimentellen Studien häufig verwendet (*SONG et al. 2011*). Nach intraperitonealer Injektion wird es resorbiert und hepatisch verstoffwechselt (*HOETZEL et al. 2006*). Auf Rezeptorebene sind an der Wirkung aktivierte GABA<sub>A</sub>- sowie gehemmte Glutamat-Rezeptoren (AMPA) und Tetrodotoxin-empfindliche Na<sup>+</sup>-Kanäle beteiligt, aus deren Zusammenspiel eine allgemeine zentrale Dämpfung resultiert (*KAROW & LANG-ROTH 2008*).

Aufgrund der geringen therapeutischen Breite von Pentobarbital ist bei Nachdosierungen die Gefahr einer Akkumulation zu beachten (*KAROW & LANG-ROTH 2008*). Weitere mögliche Komplikationen sind Atemsuppression und hämodynamische Instabilität (*BLEDSOE & KRAMER 2008*). In der vorliegenden Studie wurden der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz kontinuierlich aufgezeichnet und durch eine ausreichende Narkosetiefe und Flüssigkeitssubstitution innerhalb physiologischer Grenzen konstant gehalten.

Bei systemischen Narkoseverfahren kann es zu starker Vasodilatation kommen, die neben einer möglichen Kreislaufdysregulation auch die Körpertemperatur reduziert (*LENHARDT 2010*). Um dem Auskühlen und der konsekutiven Beeinträchtigung der Mikrozirkulation vorzubeugen, wurden die Versuchstiere während der Experimente auf einer Wärmeplatte gelagert.

Durch die kontinuierliche Überwachung von Kreislaufparametern und Wärmeapplikation ist eine Beeinflussung der Mikrozirkulation der peripheren Skelettmuskulatur von Seiten der Narkose unwahrscheinlich.

Bedingt durch den langsameren hepatischen Metabolismus weiblicher gegenüber männlichen Ratten, erhöht sich bei ihnen durch die in kurzen Zeitabständen wiederholte Gabe von Pentobarbital das Narkoserisiko (*HOLCK et al. 1937, WESTENBERG & BOLAM 1982, ZAMBRICKI & DALECY 2004*). Aus diesem Grund wurden ausschließlich männliche Sprague Dawley Ratten verwendet, die sich nach Einschätzung unserer eigenen und anderer Arbeitsgruppen gut für Untersuchungen

der Mikrozirkulation eignen (*GIERER et al. 2010, WANG et al. 2011, KAMBUROĞLU et al. 2011, SMOLOCK et al. 2011*).

Nach aktueller Studienlage hat sich das standardisierte geschlossene Kontusionstrauma für Untersuchungen der angeborenen Immunantwort auf mechanische Weichteiltraumatisierung besonders bewährt (*SMITH et al. 2008*). In der vorliegenden Studie wurde das Trauma mit dem für Hochrasanzverletzungen am Hinterlauf der Ratte modifizierten „Controlled impact device“ appliziert (*SCHASER et al. 1999*). Die Vorrichtung diente ursprünglich der Untersuchung schwerer Schädelhirnverletzungen (*LIGHTHALL et al. 1989, DIXON et al. 1991*).

Verglichen mit anderen experimentellen Traumastudien verursachten die in der vorliegenden Studie gewählten Anprallparameter ein besonders schweres Weichteiltrauma, ohne jedoch ein Kompartmentsyndrom zu induzieren (*SCHASER et al. 1999*). Letzteres musste vermieden werden, da eine Erhöhung des Gewebedrucks die Mikrozirkulation stark beeinträchtigen und deren intravitalmikroskopische Beurteilbarkeit einschränken könnte (*KIAER & KRISTENSEN 1988, SHRIER & MAGDER 1995*).

Andere für Untersuchungen von Muskelverletzungen verwendete Techniken sind beispielsweise die „drop-mass-technique“, „crush injury“ oder Federhammermodelle (*JÄRVINEN & SORVARI 1975, SMITH et al. 1993, CRISCO et al. 1994*), welche jedoch relativ moderate Muskelverletzungen erzielen und sich daher nur bedingt eignen, die Folgen eines schweren Weichteiltraumas adäquat zu simulieren. Aus der Traumatisierung mit dem „Controlled impact device“ hingegen resultieren signifikante Beeinträchtigungen der Mikrozirkulation mit einer ausgeprägten posttraumatischen Entzündungsreaktion. Der Vergleich mit Studien, die das gleiche Traumamodell genutzt haben, verdeutlicht die Reproduzierbarkeit der herbeigeführten Verletzung durch die posttraumatisch entsprechend gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (*SCHASER et al. 1999, GIERER et al. 2005, GIERER et al. 2007, GIERER et al. 2008, GIERER et al. 2010*).

In der vorliegenden Studie wurde gezielt die anatomische Region des M. extensor digitorum longus verletzt. Dieser verläuft lateral, gemeinsam mit dem M. tibialis anterior und dem M. extensor hallucis longus, im anterioren Muskelkompartiment des Unterschenkels. Diese Traumaregion wurde ausgewählt, da traumatische Verletzungen des (anteriolateralen) Unterschenkels klinisch besonders häufig auftreten

(SCHASER *et al.* 1999, STALP *et al.* 2002). Auch das Kompartmentsyndrom des anterioren Unterschenkel-Kompartments ist als Komplikation traumatischer Extremitätenverletzungen das häufigste (GOURGIOTIS *et al.* 2007).

Auf eine offene Traumatisierung oder Fraktur wurde verzichtet, da diese zu erheblichen Einblutungen führen können, die eine intravitalmikroskopische Untersuchung unmöglich machen würden. Der Grund hierfür ist das Absorptionsmaximum von Hämoglobin für blaues Licht, durch das Erythrozyten schwarz erscheinen, andere Strukturen überdecken und so deren Beurteilbarkeit einschränken bis hin zu unmöglich machen (ZIJLSTRA *et al.* 1991).

Als „second hit“ wurde bei den Versuchstieren eine Endotoxinämie hervorgerufen, welche die systemische Ausbreitung der zunächst lokal begrenzten posttraumatischen Entzündungsreaktion zu einem systemischen Inflammationssyndrom (SIRS) simulieren sollte. Dieses kann fortschreiten und zu Organdysfunktionen (MODS) oder Multiorganversagen (MOF) führen (LENZ *et al.* 2007, TSCHOEKE *et al.* 2007). Auch die Progression des SIRS zur Sepsis ist möglich (BONE *et al.* 1992).

Trotz eines seit Jahrzehnten immer bedeutender werdenden und mittlerweile führenden Anteils (multiresistenter) grampositiver Sepsiserreger stellt die gramnegative Sepsis auch weiterhin eine lebensgefährliche Komplikation postoperativer und posttraumatischer Intensivpatienten dar (GIERER *et al.* 2008, DUSZYŃSKA 2010, BASSETTI *et al.* 2011, LIVORSI *et al.* 2011). Erhöhte plasmatische Endotoxinkonzentrationen stellen einen Prädiktor für die Entwicklung einer Sepsis und der damit verbundenen erhöhten Mortalität dar (HURLEY 2003).

Der durch Endotoxin hervorgerufene septische „second hit“ ist einfach durchzuführen, gut reproduzierbar, standardisiert und kostengünstig (DEITCH 2005). In Studien zur Analyse von SIRS und Sepsis wird Endotoxin schon seit langem eingesetzt (O'REILLY *et al.* 1999, KOIKE *et al.* 2003). Dieser Einsatz wird mit einer partiellen pathophysiologischen Übereinstimmung zwischen Endotoxinämie und Sepsis begründet (REMICK *et al.* 2000). Die Endotoxinämie aktiviert verschiedene Akute-Phase-Reaktionen und Kaskadensysteme, wie das Komplementsystem, die Blutgerinnung, die Hämatopoese und das Kallikrein-Kinin-System (McCUSKEY *et al.* 1996). Durch Mediatorfreisetzung werden auch zelluläre Adhäsionsmoleküle aktiviert (McCUSKEY *et al.* 1996), sodass schließlich das klinische Bild eines SIRS resultiert.

Die Versuchstiere zeigten bei Endotoxinämie einen Zustand, der im weitesten Sinn der Definition eines SIRS entsprach (*BONE et al. 1992*). So führte die Endotoxinämie zu einem signifikanten ( $p < 0,05$ ) Anstieg der Herzfrequenz, zu einer Hypokapnie und einer Leukozytose.

Diese systemischen Veränderungen zeigen, dass die Endotoxinämie geeignet ist, die im experimentellen Setting der vorliegenden Studie geforderte Sequenz von chirurgischem Trauma und nachfolgender systemischer Entzündung reproduzierbar und adäquat zu simulieren.

In der vorliegenden Studie wurde ATIII als Hochdosis-Monotherapie (250 IE/kg KG i.v.) appliziert. Frühere tierexperimentelle Studien, die sich mit ATIII bei Endotoxinämie beschäftigten, haben bei dieser Dosierung gute Therapieerfolge gezeigt (*UCHIBA et al. 1998, HARADA et al. 1999, HAGIWARA et al. 2009*). Nach Herstellerangaben erhöht eine IE die ATIII-Aktivität um ca. 1%, wobei der Anstieg bei starkem Verbrauch auch geringer ausfallen kann. In der vorliegenden Studie sollte die Applikation einer hohen Dosis die ATIII-Konzentration auf über 80% des Normwertes erhöhen, woraus laut Hersteller eine ausreichende Wirkung resultieren soll. Die Messungen der ATIII-Aktivitäten bestätigten, dass dieses Ziel erreicht wurde. Sie stiegen deutlich an und erreichten in beiden Therapiegruppen supranormale Aktivitäten größer 100%. Die Applikationsform erwies sich zusätzlich als sicher und einfach handhabbar.

In einer Vielzahl tierexperimenteller Studien, welche die antiinflammatorische Wirksamkeit von ATIII bei Endotoxinämie untersuchten, wurde von einer Verringerung der Mortalität berichtet (*TAYLOR et al. 1988, DICKNEITE & PÂQUES 1993, KESSLER et al. 1997, FOURRIER et al. 1998, DICKNEITE & LEITHÄUSER 1999, NEVIÈRE et al. 2001*). Zudem wurden verschiedene organprotektive Effekte nachgewiesen, ohne dass ATIII zu einer vermehrten Blutungsneigung führte (*HARADA et al. 1999, UCHIBA et al. 1998, DICKNEITE & KROEZ 2001*).

Der Einsatz von ATIII in der antiinflammatorischen Therapie von Sepsis und anderen entzündlichen Erkrankungen wird schon seit langem kontrovers diskutiert. Aktuell wird ATIII in der Therapie der Sepsis nicht empfohlen (*DELLINGER 2008, REINHART et al. 2010*).

Die Ergebnisse diverser klinischer Studien zur ATIII-Therapie bei Sepsis zeigten über Jahre verringerte Mortalitäten, verkürzte Verläufe schwerer Gerinnungsstörungen (DIC), verbesserte Organfunktionen an Lunge, Leber und Niere, erniedrigte IL-6-Spiegel sowie kürzere Verweildauern auf Intensivstationen (*FOURRIER et al. 1993, INTHORN et al. 1997, INTHORN et al. 1998, BAUDO et al. 1998, EISELE et al. 1998*). Aufgrund zu geringer Patientenzahlen konnte jedoch keine Einzelstudie signifikante Ergebnisse erzielen. Von 1997 bis 2001 wurde schließlich die internationale Phase III „KyberSept“ Studie durchgeführt, welche placebokontrolliert an 2314 Patienten die Wirksamkeit von ATIII bei schwerer Sepsis untersuchte. Ziel dieser Studie war die Reduktion von Todesfällen bei schwerer Sepsis nach 28 Tagen durch Anhebung der ATIII-Aktivität. Hierzu wurden den Patienten insgesamt 30.000 IE ATIII über einen Zeitraum von 4 Tagen verabreicht (*WARREN et al. 2001*). Am 28. Tag der Studie unterschied sich die Mortalität zwischen der ATIII-behandelten Gruppe und der Placebogruppe (ATIII 38,9% vs. Placebo 38,7%) jedoch nicht signifikant ( $p=0,94$ ) (*WARREN et al. 2001*).

Zur Vermeidung thromboembolischer Komplikationen war während der Studie eine begleitende Therapie mit niedermolekularem Heparin gestattet. Offenbar wurde durch das Heparin eine Bindung von ATIII an endotheliale HSPG verhindert, wodurch die PGI<sub>2</sub>-abhängige antiinflammatorische Wirkung nicht oder nur eingeschränkt zustande kommen konnte (*PULLETZ et al. 2000, WARREN et al. 2001*). Verglichen mit der Placebogruppe trat bei ATIII- und zugleich Heparin-behandelten Patienten zudem eine signifikant ( $p<0,05$ ) erhöhte Blutungshäufigkeit auf (ATIII + Heparin 23,8% vs. Kontrolle 13,5%) (*WARREN et al. 2001*). Eine Subpopulation des Studienkollektivs erhielt ATIII, jedoch kein zusätzliches Heparin. Patienten dieses Kollektivs zeigten nach 90 Tagen eine signifikant ( $p=0,03$ ) reduzierte Mortalität (ATIII 44,9% vs. Kontrolle 52,5%), was auf die o.g. Interferenz von Heparin mit der ATIII-Bindung an HSPG hinweist (*WARREN et al. 2001*).

Die Fragestellung der vorliegenden Arbeit gründete auf den genannten Teilergebnissen der KyberSept-Studie. Diese implizieren, dass sich ATIII in Monotherapie durch einen nicht unerheblichen antiinflammatorischen Effekt auszeichnet, der selbst bei schwersten inflammatorischen Krankheitsbildern Therapieerfolge verspricht.

Aus diesem Grund ist der adjuvante therapeutische Einsatz von ATIII weiterhin Gegenstand aktueller Forschung. So haben Taoka und Kollegen z.B. nach ATIII-

Therapie eine signifikante Besserung von Verletzungen des Rückenmarks an der Ratte beschrieben (*TAOKA et al. 2004*). In einer ähnlichen Studie wurde nach ATIII-Therapie von einer verringerten Gewebeschädigung nach Ischämie/Reperfusion des Rückenmarks berichtet (*HIROSE et al. 2004*). Eine andere Arbeitsgruppe zeigte, dass ATIII die stressbedingte Immunreaktion während eines experimentellen Hitzeschlags der Ratte reduzierte. Auch der entzündliche Verlauf einer experimentellen Pankreatitis konnte durch ATIII verbessert werden (*HAGIWARA et al. 2009, HAGIWARA et al. 2010*).

Die Wirkung der ATIII-Monotherapie auf den traumatisch geschädigten Skelettmuskel wurde bisher nicht untersucht. Die vorliegende Studie entstand auf der Annahme, dass die beschriebene antiinflammatorische Wirkung von ATIII den immunologisch bedingten Sekundärschaden im Muskel reduzieren und dadurch zu einer verbesserten posttraumatischen Muskelperfusion beitragen könnte. Diese Wirkungen könnten zu einer schnelleren und komplikationsärmeren Wundheilung nach geschlossenem Weichteiltrauma führen.

Um den intravitalmikroskopischen Zugang zum traumatisierten *M. extensor digitorum longus* zu ermöglichen, erfolgte zunächst dessen mikrochirurgische Präparation (*TYML & BUDREAU 1991*). Bei unvorsichtiger Präparation können im Muskel Zeichen der Inflammation, wie eine lokale Leukozytenakkumulation oder Muskelzellapoptose hervorgerufen werden. Ein sorgfältiges mikrochirurgisches Vorgehen hingegen erlaubt die Darstellung des Muskels für die nachfolgende IVM ohne wesentliche entzündliche Einflüsse (*TYML & BUDREAU 1991*).

Die Multifluoreszenzmikroskopie ist eine etablierte und aufgrund ihrer hohen Spezifität und Sensitivität verbreitete Methode zur Visualisierung von zellulären Kompartimenten und Strukturen in biologischen Proben (*ZIMMERMANN 2002*). Sie bietet dem Untersucher die Möglichkeit zur Beurteilung von Mikrozirkulation und Zellfunktion eines Gewebes und stellt gleichzeitig die Brücke zwischen *in vitro* Ergebnissen und deren Überprüfung *in vivo* dar (*MENGER & LEHR 1993, MENGER et al. 1999*). Mit statischen Methoden, wie Laborparametern und histologischen Schnitten, lassen sich lediglich Momentaufnahmen des aktuellen Geschehens innerhalb eines Gewebes abbilden. Die IVM hingegen ermöglicht die Beobachtung dynamischer Prozesse im zeitlichen Verlauf (*MENGER & LEHR 1993*). In der vorliegenden Studie wurde die

Intravitalmikroskopie als Multifluoreszenz-IVM durchgeführt, andere Varianten sind die Durchlicht- oder die Multiphotonen-IVM (*LEY et al. 2008*).

Mit Hilfe der IVM wurden bereits verschiedenste physiologische und pathophysiologische Phänomene, wie Inflammation, Sepsis, Schock, Ischämie/Reperfusion, Angiogenese, Verbrennung, Transplantation und Wundheilung charakterisiert (*MENGER et al. 1999, MENGER et al. 2002*). Häufig wurde die Multifluoreszenz-IVM zur Untersuchung dynamischer Prozesse der Mikrozirkulation, insbesondere der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, genutzt. Zu den untersuchten Geweben und Organen gehören unter anderem periphere Lymphknoten (*von ANDRIAN 1996*), das zentrale Nervensystem (*COMIM et al. 2011*), das Herz (*VOLLMAR et al. 1995, SCHRAMM et al. 2010*), das Pankreas (*VOLLMAR et al. 1994, SORG et al. 2008*), die Leber (*EIPEL et al. 2007a, ROLLER et al. 2010*), der Skelettmuskel (*GRADL et al. 2005, GIERER et al. 2010*), der Darm (*SANTEN et al. 2010*) und die großen Gefäße (*SCHRAMM et al. 2004*).

Die weite Verbreitung der Methode bestätigt ihre universale Anwendbarkeit bei diversen Fragestellungen. Mittlerweile wird sie auch klinisch, z.B. bei Sepsis und Schock, zur einfachen und flexiblen Untersuchung von Anatomie und Funktion der Mikrozirkulation eingesetzt (*YANG et al. 2009*).

Neben der IVM gibt es viele weitere Methoden zur Untersuchung der Mikrozirkulation. Diese, zu denen beispielsweise die Laser-Doppler-Flowmetrie (*TURNER et al. 2008, KOLLMAR et al. 2010*), die Gewebe-Sauerstoffpartialdruckmessung (*CONZEN et al. 1988, VOLLMAR et al. 1992*), die Mikrosphärentechnik (*ZWISSLER et al. 1991, VOLLMAR et al. 1992*), die Thermographie (*SAUMET et al. 1986, LANGE et al. 2011*) und die Xenon-Clearance-Technik (*FRASER et al. 1987*) gehören, lassen jedoch nur indirekte Aussagen über Abläufe innerhalb der Mikrozirkulation zu, was ihre Aussagekraft gegenüber der IVM deutlich einschränkt.

In der vorliegenden Studie wurde die IVM zur quantitativen Analyse mikrozirkulatorischer Parameter in Kapillaren und postkapillaren Venolen innerhalb des geschädigten Skelettmuskels eingesetzt. Durch Ausnutzung von muskulärer Autofluoreszenz und durch den Einsatz spezifischer Fluoreszenzfarbstoffe wurden die nutritive Perfusion und Gewebeoxygenierung des Muskels sowie die venuläre Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und zelluläre Apoptose erfasst.



Zur Messung der Gewebeoxygenierung wurde die NADH-Autofluoreszenz im Muskel genutzt. Bei dieser Untersuchung ist zu beachten, dass die Fluoreszenzintensität von NADH über einen Epiilluminationszeitraum von 30 bis 60s um etwa 8 bis 14% nachlässt (VOLLMAR *et al.* 1997). Um trotz dieses „Fadings“ vergleichbare Ergebnisse zu erzielen, wurde die Datenerhebung standardisiert erst nach einer Belichtungszeit von zwei Sekunden begonnen (VOLLMAR *et al.* 1997, GIERER *et al.* 2007).

Es gibt weitere, unspezifische Autofluoreszenzen, die als Störfaktor die Beurteilung mikrozirkulatorischer Parameter einschränken können. Zu den verschiedenen autofluoreszierenden Stoffen, deren Einflüsse zu berücksichtigen sind, zählen primär Flavine und NADH (AUBIN 1979, BENSON *et al.* 1979, LOHMANN *et al.* 1989, ANDERSSON-ENGELS *et al.* 1997). Weiterhin wurden Autofluoreszenzen von Tryptophan, Kollagen und Elastin beschrieben (LAIFER *et al.* 1989, BARAGA *et al.* 1990). Im Skelettmuskel gibt es eine grüne Autofluoreszenz, für die in erster Linie Flavine verantwortlich gemacht werden, deren Emissionsmaximum zwischen 520 und 560 nm liegt (JACKSON *et al.* 2004). Sie kommen vermehrt in Muskelzellen vor, da diese eine große Zahl flavingekoppelter mitochondrialer Enzyme enthalten (JACKSON *et al.* 2004). Im Fall der vorliegenden Studie wurde das Gewebe für die Intensitätsmessung der NADH-Autofluoreszenz mit UV-Licht bestrahlt, das für flavinhaltige Proteine jedoch keine Autofluoreszenz auslöst. Das Mikroskop war während der Untersuchung zudem über einen Filter auf den Emissionswellenlängenbereich von NADH eingestellt, was die Fluoreszenz aus anderen Bereichen des Farbspektrums weitgehend ausblenden konnte. Damit ist der Einfluss von unerwünschter Autofluoreszenz auf die vorliegenden Untersuchungsergebnisse sehr unwahrscheinlich.

Ein wesentlicher Vorteil von Fluoreszenzfarbstoffen ist die verbesserte intravitalmikroskopische Darstellbarkeit zellulärer Objekte in dreidimensionalen Geweben. Der gezielte Einsatz von Färbungen kann die Sensitivität und Spezifität der IVM entscheidend verbessern, da ausschließlich markierte Strukturen fluoreszieren und bei guter Auflösung und entsprechender Vergrößerung selbst einzelne Fluorophore erkennbar sind.

Verglichen mit der Multifluoreszenz-IVM kann sich die Durchlicht-IVM der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion abhängig vom untersuchten Gewebe als schwierig

erweisen, da Leukozyten durch ihren Fluss innerhalb der Gefäße den optischen Fokus verlassen können (LEY *et al.* 2008). Die spezifische Fluoreszenzfärbung von Leukozyten verbessert die Erfassung auch solcher Zellen, die zum Zeitpunkt der Aufzeichnung gerade nicht optimal im Fokus stehen. Die Färbung der Leukozyten wurde in der vorliegenden Studie mit Rhodamin 6G durchgeführt, das in Mitochondrien akkumuliert und zur Färbung weißer Blutzellen verwendet wird (BAATZ *et al.* 1995). Mithilfe durchflusszytometrischer und intravitalmikroskopischer Messungen wurde gezeigt, dass Rhodamin 6G nach intravasaler Applikation die meisten Leukozyten (99%) und Monozyten (97%) im Blut von Ratten für die intravitalmikroskopische Beurteilung adäquat anfärbt (BAATZ *et al.* 1995). Aufgrund dieser Ergebnisse ist davon auszugehen, dass auch im vorliegenden Modell der Großteil aller Leukozyten visualisiert wurde. Ergänzend zur intravitalmikroskopischen Analyse wurden Leukozyten auch anhand histologischer Gewebepreparate quantitativ untersucht. Dazu wurden CAE-Färbungen angefertigt, die das Zellplasma neutrophiler Granulozyten spezifisch und leuchtend rot färbten.

Die Darstellung des mikrovaskulären Netzwerkes gelang durch Anfärbung des Blutplasmas mit hochmolekularem FITC-Dextran. Niedermolekulares Dextran ist biochemisch als Radikalfänger bekannt, der in Studien z.B. nach Ischämie/Reperfusion protektive Effekte auf die Gewebepерfusion und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion gezeigt hat (STEINBAUER *et al.* 1997, STEINBAUER *et al.* 1998). Diese Wirkungen treten ausschließlich bei niedermolekularem Dextran auf, weshalb davon auszugehen ist, dass die Anwendung von hochmolekularem Dextran in der vorliegenden Arbeit keinen besonderen Einfluss auf die Mikrozirkulation und die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion hatte. Zudem sind Veränderungen der Blutviskosität bei niedrigen Dextran-Dosierungen, wie der in der vorliegenden Studie, eher unwahrscheinlich (STEINBAUER *et al.* 1997).

Die Muskelzellapoptose wurde intravitalmikroskopisch nach systemischer Applikation von Bisbenzimid nachgewiesen, das an Adenin-Thymin-reiche DNA-Regionen bindet. Apoptotische Zellkerne zeichnen sich durch typische morphologische Kernveränderungen, wie Chromatinkondensation und nukleäre Fragmentation, aus, die nach der Färbung mit Bisbenzimid gut erkennbar waren (WESTERMANN *et al.* 1999, GRADL *et al.* 2004). Ergänzend wurde die Zellapoptose histologisch mit der TUNEL-Methode nachgewiesen, welche mittels einer über die Terminale

Deoxynucleotidyl-Transferase (TdT) vermittelten Reaktion die 3'OH-Enden von DNA-Fragmenten mit biotinylierten Polydesoxyuridylnukleotiden markiert - „TdT-mediated dUTP-biotin nick end labeling“ (GAVRIELI *et al.* 1992). Ein Nachteil dieser Methode ist ihre geringe Sensitivität und Spezifität. Der Grund dafür ist die starke Abhängigkeit der Färbekinetik von der Reagenzienkonzentration, von der Art der Fixierung des Präparates und vom individuellen Ausmaß nukleärer Proteolyse (SARASTE 1999). Zusätzlich werden apoptotische Zellen erfasst (VOLLMAR & MENGER 2009). Zur Verbesserung der Spezifität wird daher empfohlen, die TUNEL-Methode, wie in der vorliegenden Studie, mit anderen Techniken zum Nachweis von Apoptose zu kombinieren (SARASTE 1999).

## 7.2 Diskussion der Ergebnisse

Im Folgenden werden die tierexperimentell gewonnenen Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Studie diskutiert und im Lichte aktueller Literatur dargestellt. Als Leitfaden für den Aufbau des folgenden Paragraphen dienen die Eingangsfragestellungen aus dem Kapitel „Ziel der Studie“ (siehe S. 20).

Das schwere geschlossene Weichteiltrauma führt - ausgehend von einer traumatisch induzierten zellulären Entzündungsreaktion - zu diversen Veränderungen im Skelettmuskel (TOUMI & BEST 2003, SCHASER *et al.* 2006, GIERER *et al.* 2007). Die quantitative Analyse dieser zellulären Abläufe lässt Aussagen über die Verletzungsschwere, die traumatische Gewebeschädigung und das Outcome von Patienten zu (HIETBRINK *et al.* 2006). In der vorliegenden Studie wurde durch ein standardisiertes Muskeltrauma eine typische Immunreaktion im Skelettmuskel provoziert.

Nach alleinigem Muskeltrauma kam es zu keinen signifikanten makrohämodynamische Veränderungen. Die Herzfrequenz und der Blutdruck aller Versuchstiere blieben normwertig. Bei schweren Einzelverletzungen oder Polytraumatisierungen können jedoch auch hämodynamische Veränderungen auftreten. Die häufigsten Ursachen von Frühletalität nach Polytrauma sind ZNS-Verletzungen und Massenblutungen (MANN *et al.* 2010). Sie manifestieren sich klinisch als neurologische Dysregulation oder Volumenmangelschock und stellen hohe Anforderungen an die Akutversorgung von Patienten (OMAR & HELAL 2010). In der vorliegenden Studie

wurde aus technischen Gründen auf eine knöcherne Begleitverletzung verzichtet. Schwere Weichteiltraumatisierungen mit Fraktur können blutungsbedingt Störungen der Makrohämodynamik hervorrufen. Insbesondere Becken- und Femurfrakturen bergen die Gefahr erheblicher Blutverluste mit Schockfolge (STEIN *et al.* 2007, LÖGTERS *et al.* 2009). Im vorliegenden Experiment traten nach einfacher Muskelverletzung ohne Fraktur keine kreislaufwirksamen Blutungen auf.

Die an der nutritiven Perfusion der Skelettmuskulatur entscheidend beteiligte funktionelle Kapillardichte war posttraumatisch infolge der Gewebeschädigung signifikant reduziert. Schwere Muskeltraumatisierungen in anderen experimentellen Studien zeigten vergleichbare Ergebnisse (SZCZESNY *et al.* 2001, ROTTER *et al.* 2008). Aus dem signifikanten Anstieg der NADH-Autofluoreszenz ließ sich ableiten, dass infolge der eingeschränkten Gewebepfusion auch die muskuläre Sauerstoffversorgung signifikant verringert war (VOLLMAR *et al.* 1997, HOGAN *et al.* 2005).

Innerhalb der muskulären Mikrozirkulation führte das Muskeltrauma zu einer ausgeprägten zellulären Entzündungsreaktion. Während der Gesamtleukozytenflux von der Traumawirkung nahezu unbeeinträchtigt blieb, vergrößerte sich der Anteil rollender Leukozyten nach Trauma um ~25%. Die permanent am Gefäßendothel adhärenen Leukozyten stiegen signifikant auf etwa das 3,5-fache des Kontrollwertes an. Achtzehn Stunden nach Trauma war die Zahl der fest adhärenen Leukozyten am mikrovaskulären Endothel am größten.

Neutrophile Granulozyten nehmen besonders während der frühen posttraumatischen Entzündungsreaktion eine Schlüsselrolle ein (KIMURA *et al.* 2010). Sie akkumulieren nach dem entzündungsauslösenden Ereignis bereits nach 1-2 Stunden im Muskel (TOUMI & BEST 2003). Dieses Phänomen konnte in diversen intravital-mikroskopischen Studien beobachtet werden (HOFFMANN *et al.* 2000, SCHASER *et al.* 2006, GIERER *et al.* 2008). Zu einer schnellen Akkumulation trägt unter anderem die besonders rasche Expression von Adhäsionsmolekülen, wie E-Selektin auf dem Endothel bei, das z.B. nach TNF- $\alpha$ -Stimulation *in vitro* und *in vivo* schon nach 1-2 h nachzuweisen ist (KANSAS 1996). Bereits 48 h nach Trauma werden Makrophagen zum dominierenden Zelltyp lokaler Entzündungsreaktionen (CHARGÉ & RUDNICKI 2004). Dieser rasche Austausch der vorherrschenden Zellart während einer Entzündung weist darauf hin, dass die lokale Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in der vorliegenden Studie 18 h nach Trauma bereits weit fortgeschritten ist, was auch der

Grund für den großen Anteil der bereits fest am Endothel adhärennten Leukozyten sein könnte. Die histochemischen Untersuchungen (CAE-Färbung) der Leukozytenzahlen in asserviertem Muskelgewebe zeigten, dass die intravasal liegenden Leukozyten im Vergleich zur Kontrolle um ~60% zunahmen, sowie dass sich die Zahl der im Muskelparenchym liegenden Leukozyten verdoppelte. Diese Angaben sprechen ebenfalls dafür, dass 18 h nach Trauma bereits ein großer Anteil der Leukozyten kurz vor der Migration ins Muskelparenchym steht oder sich bereits dort befindet.

Das Ausmaß der traumatischen Schädigung der Mikrozirkulation wurde neben der verstärkten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zusätzlich durch eine signifikant gesteigerte Gefäßpermeabilität postkapillärer Venolen von ~30% deutlich. Die extravasiierte Flüssigkeit konnte ergänzend mithilfe der Ratio aus Feucht- und Trockengewicht des traumatisierten Muskelgewebes quantifiziert werden. Diese deutete mit einer ~6%igen Zunahme auf das Vorliegen eines Muskelödems hin, das außerdem histologisch in HE-gefärbten Gewebeschnitten nachgewiesen wurde. Studien, die das gleiche Traumamodell nutzten, zeigten ähnliche posttraumatische Ödemausmaße (*SCHASER et al. 2006*, *GIERER et al. 2010*). In einer zur Quantifizierung des Gewebeödems nach traumatischer Muskelverletzung durchgeführten Studie wurde ebenfalls die Feucht-Trockengewicht-Ratio berechnet. Auch diese Studie zeigte nach Traumatisierung des M. rectus abdominis der Ratte eine ~6%ige Zunahme des Muskelödems (*BANSCH et al. 2010*).

Das alleinige Trauma hatte in der vorliegenden Studie keinen wesentlichen Einfluss auf die Gefäßdurchmesser von Kapillaren und Venolen. Die Erythrozytenfließgeschwindigkeit blieb verglichen mit der Kontrollgruppe nahezu unverändert. In anderen experimentellen Traumastudien wurde von signifikanten Veränderungen dieser Parameter im Rahmen von posttraumatischen muskulären Entzündungsreaktionen berichtet. So waren z.B. nach geschlossener Tibiafraktur im M. extensor digitorum longus signifikant erhöhte kapillare und venuläre Durchmesser bei gleichzeitig signifikant reduzierter Erythrozytenfließgeschwindigkeit nachweisbar (*ZHANG et al. 2003*). Andererseits zeigten Studien, die das gleiche Traumamodell wie die vorliegende Studie nutzten, auch keine signifikanten Veränderungen der genannten Parameter (*GIERER et al. 2007*, *GIERER et al. 2010*). In der Etablierungsstudie zum vorliegenden Modell wurde nach 72 h eine signifikante kapillare Dilatation beschrieben, die 24 h nach Trauma jedoch noch nicht vorlag (*SCHASER et al. 1999*). Demzufolge

könnte das Fehlen posttraumatischer Veränderungen der kapillaren und venulären Gefäßdurchmesser sowie der Erythrozytenfließgeschwindigkeit neben der Traumaschwere auch von zeitlichen Faktoren abhängen.

Zur Quantifizierung durch Trauma bedingten Apoptose wurden in der vorliegenden Studie die IVM (Bisbenzimidfärbung) und eine histologische Untersuchung (TUNEL-Färbung) genutzt. Aufgrund der geringen Sensitivität der TUNEL-Methode wird sie häufig mit einer zweiten Methode zur Apoptosedetektion kombiniert (*SHIMOMURA et al. 2003, GLAWE et al. 2005, EIPEL et al. 2007b*). Beide Methoden zeigten nach Trauma eine Zunahme zellulärer Apoptose im Skelettmuskel. Dieses Ergebnis ist in verschiedenen experimentellen Traumamodellen gut reproduzierbar und konnte bereits in diversen Studien der eigenen und anderer Arbeitsgruppen nachgewiesen werden (*KNAPPE et al. 2005, GIERER et al. 2007, STRATOS et al. 2012*).

Die Blutuntersuchungen und die Blutgasanalyse zeigten nach Trauma erwartungsgemäß keine signifikanten Veränderungen, da Einzelverletzungen vorwiegend lokale jedoch keine systemischen Reaktionen verursachen. Durch überschießende Freisetzung inflammatorischer Mediatoren können polytraumatisierte Patienten aber im Rahmen eines posttraumatischen SIRS Veränderungen des weißen Blutbildes im Sinne einer akuten reaktiven Leukozytose oder Koagulopathien entwickeln (*IBA et al. 2007, MANN et al. 2010*).

Im folgenden Abschnitt wird die Eingangsfragestellung nach dem Einfluss der als „second hit“ induzierten Endotoxinämie auf das Ausmaß der (lokalen) Entzündungsreaktion nach geschlossenem Weichteiltrauma diskutiert. Nach schwerem Trauma erfolgt eine überschießende Freisetzung inflammatorischer Mediatoren. In einer zweiten Phase entwickelt sich aus der daraus resultierenden immunologischen Imbalance eine Immunparalyse, welche das Risiko von Infektion, Entzündung und Sepsis deutlich erhöht (*ROTSTEIN 2003, KEEL & TRENTZ 2005, TSCHOEKE & ERTEL 2007, TSCHOEKE et al. 2007*). Um den Einfluss eines solchen posttraumatischen entzündlichen „second hit“ zu simulieren, wurde zusätzlich zum geschlossenen Weichteiltrauma eine sublethale Endotoxinämie induziert.

Der Gefäßtonus wird während systemischer Entzündungsreaktionen sowohl vom Endothel als auch von nicht-endothelialen Mechanismen reguliert. Zu den

endothelial produzierten vasoaktiven Mediatoren gehören die Vasodilatoren Stickstoffmonoxid (NO) und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) sowie die Vasokonstriktoren Endothelin, Thromboxan A<sub>2</sub> und Plättchenaktivierender Faktor (*WANECEK et al. 2000, ARAÚJO et al. 2011*). Im Rahmen systemischer Entzündungen wird das Gleichgewicht zwischen diesen Faktoren nach Induktion der iNOS (induzierbare NO-Synthase) durch Entzündungsmediatoren, wie IL-1 und TNF- $\alpha$ , zugunsten von NO verschoben. Daraufhin erfolgt aus Endothelzellen, glatten Muskelzellen und Monozyten eine vermehrte Freisetzung von NO, was zu teils schwer therapierbarer Vasodilatation mit konsekutivem Abfall des arteriellen Blutdrucks führen kann (*WORT & EVANS 1999, TAYLOR & GELLER 2000, HACK & ZEERLEDER 2001, FORTIN et al. 2010*).

In der vorliegenden Studie sollte der hämodynamische Einfluss der Endotoxinnämie möglichst moderat ausfallen, um trotz vorhandener Kreislaufveränderungen eine intravitalmikroskopische Beurteilbarkeit mikrozirkulatorischer Parameter zu gewährleisten. Die Endotoxinämie in sublethaler Dosis eignet sich besonders für die Untersuchung von Mikrozirkulationsstörungen und anti-inflammatorischer Therapiestrategien (*HOFFMANN et al. 1999*). Während der mittlere arterielle Blutdruck bei limitierter Flüssigkeitssubstitution konstant blieb, stieg die Herzfrequenz signifikant um ~15% an. Es ist anzunehmen, dass dieser Anstieg stressbedingt oder im Rahmen einer kompensatorischen Tachykardie bei drohendem Blutdruckabfall aufgetreten ist. Die Endotoxinämie führt bei Versuchstieren und beim Menschen zu einer vorübergehenden kardiovaskulären Hyperdynamik, die schließlich durch eine verminderte Herzfunktion und gleichzeitig verringerten peripheren Gefäßwiderstand in ein hypodynames Stadium übergeht (*McCUSKEY et al. 1996*).

Im Vergleich zum alleinigen Trauma waren bei zusätzlicher Endotoxinämie weder die funktionelle Kapillardichte noch die NADH-Autofluoreszenz signifikant verändert. Dies weist darauf hin, dass Veränderungen dieser Parameter vorwiegend traumatisch bedingt auftreten. Es ist bekannt, dass jedes schwere Trauma Mikrozirkulationsstörungen hervorruft, durch welche die Gewebepfusion und Sauerstoffversorgung beeinträchtigt werden können (*De BACKER et al. 2002, SCHASER et al. 2006*). Die Ergebnisse früherer Studien unserer Arbeitsgruppe zeigten gegensätzliche Veränderungen der nutritiven Perfusion und NADH-Autofluoreszenz nach sublethaler Endotoxinämie (*GIERER et al. 2007, GIERER et al. 2008*). In diversen Tiermodellen anderer Arbeitsgruppen konnte demonstriert werden, dass eine Endo-

toxinämie je nach Dosierung teils ausgeprägte mikrozirkulatorische Veränderungen hervorruft (*CRYER et al. 1987, DRAZENOVIC et al. 1992, De BACKER et al. 2002*).

Systemische Entzündungsreaktionen wie SIRS oder Sepsis führen über eine vermehrte endotheliale und leukozytäre Expression von Adhäsionsmolekülen zu einer gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (*AIRD 2003, KOLODJASCHNA et al. 2004*). Typischerweise findet die endotheliale Expression in den postkapillären Venolen vor der Migration von Leukozyten in nicht-lymphatisches Gewebe statt (*PETRI et al. 2008*). Die Endotoxinämie in der vorliegenden Studie ließ den Gesamtleukozytenflux um 38% ansteigen, wobei die Fraktion rollender Leukozyten nach Endotoxinämie ~20% über der nach alleinigem Trauma lag. Die Zahl der permanent am Gefäßendothel adhärenen Leukozyten stieg um ~13% an. Die laborchemisch ermittelte Leukozytenzahl im Plasma war bei Endotoxinämie verglichen mit der Kontrolle und der ausschließlich traumatisierten Gruppe um ~50% gestiegen. Auch die histologischen Untersuchungen des traumatisierten Muskelgewebes lieferten entsprechende Ergebnisse. Während der Endotoxinämie stieg die Zahl innerhalb venulärer Gefäßanschnitte liegender Leukozyten verglichen mit der Kontrollgruppe durchschnittlich um 130% an. Die Zahl gewebeinfiltrierender Leukozyten verdreifachte sich. Diese Ergebnisse spiegeln die während der Endotoxinämie auftretende systemische Entzündungsantwort und deren verstärkenden Einfluss auf die lokale muskuläre, traumatisch ausgelöste Inflammation wider. Durch die reaktive systemische Zunahme neutrophiler Granulozyten stehen diese vermehrt für die lokale Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und die Migration in das Zielgewebe zur Verfügung.

Die vaskuläre Hyperpermeabilität ist eines der wesentlichen Probleme während der endothelialen Entzündungsreaktion und kann durch unterschiedliche Auslöser, wie Trauma, Ischämie/Reperfusion, Sepsis, ARDS oder onkologische Erkrankungen, begünstigt werden (*KUMAR et al. 2009*). Bei septischen Krankheitsbildern korreliert die Mortalitätsrate stark mit der Beeinträchtigung der Blutversorgung lebenswichtiger Organe als Konsequenz aus einer gestörten Kapillarperfusion bei vaskulärer Leckage (*HENRICH et al. 2010*). Die Regulation der vaskulären Permeabilität wird durch den Einfluss septischer Mediatoren maßgeblich gestört (*CHAPPELL et al. 2009*). Molekulare Untersuchungen zeigten unterschiedliche zugrunde liegende Mechanismen, zu denen Phosphorylierungen, Internalisierungen, und Dissoziationen junctionaler Moleküle gehören (*ESSER et al. 1998*). Der Austritt von intravasaler



Flüssigkeit und Albumin in das umliegende Gewebe führt zu einer Verminderung des onkotischen Drucks, wodurch sich der hydrostatische Druck relativ erhöht und die Ödembildung weiter unterstützt (*DORMEHL et al. 1992, CHAPPELL et al. 2009*). Diese kritischen Veränderungen treten in der Pathophysiologie von SIRS und Sepsis regelmäßig auf (*AIRD 2003, ZHOU et al. 2011*). In der vorliegenden Studie lag bei Endotoxinämie intravitalmikroskopisch eine nur geringgradig erhöhte Gefäßpermeabilität vor. Dieses Ergebnis wurde durch die Untersuchung der Ratio aus Feucht- und Trockengewicht des traumatisierten Muskels bei Endotoxinämie und durch die histologische Untersuchung HE-gefärbter Muskelschnitte bestätigt. Die Endotoxinämie hatte im vorliegenden Model somit eher einen nachrangigen Einfluss auf die lokal bereits durch das Trauma signifikant erhöhte Gefäßpermeabilität. Im Gegensatz dazu eignet sich die von uns genutzte Endotoxindosis ohne vorhergehendes Weichteiltrauma gut zur Untersuchung inflammatorisch bedingter mikrovaskulärer Permeabilitätsstörungen (*LANGHEINRICH & RITMAN 2006*).

Die kapillaren und venulären Gefäßdurchmesser zeigten in der vorliegenden Studie nach Endotoxinämie nur leichte, statistisch nicht signifikante Veränderungen im Sinne einer moderaten Vasodilatation. Diese ist am ehesten auf durch Inflammation gesteigerte NO-Ausschüttung zurückzuführen (*HANGAI-HOGER et al. 2006*).

Die Apoptose ist ein physiologisch regulierter zellulärer Prozess, dem eine wichtige Bedeutung in der Gewebemöostase zukommt (*STRATOS et al. 2012*). Verschiedene bakterielle Virulenzfaktoren können bei Sepsis und lokaler Entzündungsreaktion Muskelzellapoptose induzieren (*PINHEIRO DA SILVA & NIZET 2009*). Die posttraumatisch erhöhte Zahl apoptotischer Muskelzellkerne wurde in der vorliegenden Studie durch die Endotoxinämie leicht erhöht. Dies zeigte sich sowohl in der IVM als auch histochemisch in TUNEL-gefärbten Muskelpräparaten. Der apoptotische Zelltod kann über verschiedene intrinsische und extrinsische Wege eingeleitet werden, die biochemisch hochspezifische intrazelluläre Proteasen, sog. Caspasen, aktivieren (*PINHEIRO DA SILVA & NIZET 2009*). Diese Aktivierung führt über proteolytische Kaskaden zur Fragmentierung der DNA, zur Aufspaltung regulatorischer Schlüsselproteine und schließlich zum Zelltod (*BANNERMAN & GOLDBLUM 2003*). Im vorliegenden Modell erklärt sich die vermehrte Apoptose durch verschiedene, gleichzeitig einwirkende Faktoren. Einerseits resultieren aus dem Trauma muskuläre Zellschäden, andererseits eine gestörte Gewebeintegrität. Beide Mecha-

nismen können die zelluläre Selbstzerstörung durch Apoptose einleiten (*ASHKENAZI & DIXIT 1998*). Bei Endotoxinämie trägt vermutlich die extrinsische Aktivierung sog. Todesrezeptoren aus der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie zur vermehrten Apoptose bei (*TARTAGLIA et al. 1993*). Die bekanntesten Todesrezeptoren sind CD95 (Fas, Apo1) und TNFR1 (p55, CD120a) (*ASHKENAZI & DIXIT 1998*). Die Bindung verschiedener Liganden, wie z.B. TNF- $\alpha$  oder IL1- $\beta$ , an Todesrezeptoren sowie die Detektion von LPS durch den TLR-4 aktiviert die Apoptosekaskade (*BANNERMAN & GOLDBLUM 2003*).

Die Endotoxinämie bewirkte in der vorliegenden Studie wesentliche Veränderungen der Blutgase, Gerinnungsparameter und des kleinen Blutbildes. So sank der durchschnittliche pCO<sub>2</sub> signifikant unter den Kontrollwert ab. Diese Hypokapnie ist mit einer Hyperventilation zur adäquaten Sauerstoffversorgung bei Endotoxinämie zu begründen. Der pCO<sub>2</sub>-Wert repräsentiert die Balance zwischen produzierter und eliminerter CO<sub>2</sub>-Menge im Organismus (*CURLEY et al. 2010*). Hypokapnie geht mit einer Vielzahl von Erkrankungen wie Pneumonien, Azidosen, Tumoren des ZNS oder Sepsis einher, stellt eine häufige Dysregulation des Säure-Basen-Haushaltes dar und ist Kriterium für das SIRS (*BONE et al. 1992, CURLEY et al. 2010*). Zusammen mit der Leukozytose und der signifikanten Erhöhung der Herzfrequenz werden somit im vorliegenden Modell drei der vier Kriterien für SIRS erfüllt (*BONE et al. 1992*).

Die bei Endotoxinämie aufgetretene signifikante Thrombozytopenie kann auf das Vorliegen einer Gerinnungsstörung gedeutet werden (*OGURA et al. 2007*). Die SIRS-induzierte Koagulopathie, die häufig mit einem Abfall der Thrombozytenzahl einhergeht, steht vermutlich in Verbindung mit diversen Organdysfunktionen bei systemischer Entzündung (*OGURA et al. 2007*). Offenbar besteht ein Zusammenhang zwischen systemischer Entzündung und thromboembolischen Ereignissen bei post-traumatischer DIC, die gemeinsam zur Entstehung von Multiorganversagen beitragen könnten (*GANDO et al. 2002*).

Auf eine endotoxinämisch bedingte DIC könnte die in der vorliegenden Studie um ~24% verlängerte PTT hinweisen. In anderen experimentellen Studien wurde im Rahmen der DIC ein Abfall von Fibrinogen beobachtet (*YOSHIKAWA et al. 1981*). Da Fibrinogen jedoch zu den Akute-Phase-Proteinen gehört, welche bei systemischer Entzündung vermehrt freigesetzt werden, ist denkbar, dass ein Abfall des Fibrinogenwertes erst bei fortgeschrittener DIC stattfindet. In der vorliegenden Studie

stieg der Fibrinogenwert bei Endotoxinämie leicht an. Die genannten Gerinnungsparameter PTT und Fibrinogen werden in der Spätphase der DIC primär zur Verlaufskontrolle eingesetzt, da sie weniger eine Aussage über die aktuelle Aktivität des prokoagulativen Systems, sondern vielmehr über Verbrauchsvorgänge zulassen (YU *et al.* 2000). Die Thrombozytopenie tritt bei der DIC erst spät auf, ist ein unspezifischer, indirekter Indikator für eine systemische Fibringerinnbildung und wird häufig bei Sepsis beobachtet (YU *et al.* 2000). ATIII ist ein Sepsismarker, der bei systemischer Entzündungsreaktion stark abfällt (LAUTERBACH *et al.* 2006). In der vorliegenden Studie wurde bei Endotoxinämie ein Absinken des ATIII-Levels von ~20% beobachtet, was durch schnelle Komplexbildungen mit aktivierten Gerinnungsfaktoren erklärt werden kann (FOURRIER *et al.* 1992).

In Analyse des antiinflammatorischen Einflusses von ATIII auf die Entzündungsreaktion nach schwerem Weichteiltrauma mit und ohne Endotoxinämie wurde ein Teil der Versuchstiere nach Trauma mit ATIII therapiert.

Die ATIII-Therapie hatte keinen bedeutenden Einfluss auf die untersuchten makrohämodynamischen Parameter. Die endotoxinämisch gesteigerte Herzfrequenz wurde durch ATIII nicht reduziert. Auch in anderen Endotoxinämiestudien wurde nach ATIII-Therapie keine Verbesserung der Makrohämodynamik nachgewiesen (FOURRIER *et al.* 1998, MINNEMA *et al.* 2000). In Kombination mit aktiviertem Protein C konnten jedoch hämodynamische Beeinträchtigungen signifikant verbessert werden (FOURRIER *et al.* 1998).

In der vorliegenden Studie steigerte ATIII die vorwiegend nach Trauma reduzierte Gewebepfusion deutlich. Bei Endotoxinämie bewirkte ATIII einen signifikanten Anstieg der nutritiven Perfusion um ~24%. ATIII ist bekannt für die Verbesserung der Mikrozirkulation bei Endotoxinämie und Sepsis (HOFFMANN *et al.* 2002b, MAKSAN *et al.* 2005, WIEDERMANN *et al.* 2006, DILLER *et al.* 2009). Infolge der günstigeren Gewebepfusion wurde die durch Trauma und Endotoxinämie signifikant gesteigerte NADH-Autofluoreszenz nach ATIII-Therapie auf Kontrollniveau reduziert. Diese signifikante Revertierung der NADH-Autofluoreszenz spricht für eine deutliche Verbesserung der Gewebeoxygenierung durch ATIII (VOLLMAR *et al.* 1997).

Die ATIII-Therapie hatte sehr unterschiedliche Auswirkungen auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion der verschiedenen intravitalmikroskopisch analysierten Leukozytenpopulationen. Weder der in erster Linie durch die Endotoxinämie gesteigerte Gesamtleukozytenflux, noch die traumatisch und endotoxinämisch bedingte erhöhte Fraktion an rollenden Leukozyten wurden durch die ATIII-Therapie reduziert. Besonders ausgeprägt hingegen war die Wirksamkeit der ATIII-Therapie auf die Zahl permanent am Gefäßendothel adhärenter Leukozyten, die durch ATIII auf Kontrollniveau reduziert wurde. Die Ursache dieser von uns beobachteten selektiven Wirksamkeit von ATIII lässt sich aus den vorliegenden Untersuchungsergebnissen nicht endgültig erklären.

Die antiinflammatorische Wirkung von ATIII wird in erster Linie über die Induktion der endothelialen Prostazyklinproduktion nach Interaktion mit endothelzellständigen Heparansulfatproteoglykanen erklärt (*YAMAUCHI et al. 1989, HORIE et al. 1990, HARADA et al. 1999*). Nach den Ergebnissen verschiedener Studien kommt der eigentliche antiinflammatorische Effekt über eine Abnahme des Rollens und der permanenten Adhärenz von Leukozyten am Gefäßendothel zustande (*OSTROVSKY et al. 1997, HOFFMANN et al. 2000, NEVIÈRE et al. 2001*). Es gibt Hinweise darauf, dass das Heparansulfatproteoglykan Syndecan-4 auf Endothelzellen als direkter ATIII-Rezeptor fungiert und auf diese Weise die antiinflammatorische Wirkung von ATIII vermittelt (*WIEDERMANN et al. 2006*). Syndecan-4 wurde auch auf Leukozyten nachgewiesen, was darauf hindeutet, dass ATIII möglicherweise über diesen Rezeptor direkt auf das Migrationsverhalten von Entzündungszellen einwirken kann (*KANEIDER et al. 2001, DUNZENDORFER et al. 2001*). Weiterhin wurde gezeigt, dass ATIII die LPS-TLR4-getriggerte Aktivierung von NF- $\kappa$ B inhibiert und somit die NF- $\kappa$ B-abhängige Transkription von Genen, die für Entzündungsmediatoren codieren, verhindert (*MANSELL et al. 2001, OELSCHLÄGER et al. 2002*). Eine durch TNF- $\alpha$  hervorgerufene endotheliale Produktion von E-Selektin konnte ebenfalls über die Interaktion von ATIII mit NF- $\kappa$ B und weiteren intrazellulären Signalmolekülen unterbunden werden. Diese Wirkung kommt vermutlich ebenfalls nach Interaktion von ATIII mit endothelialen Heparansulfatproteoglykanen zustande (*UCHIBA et al. 2004*). Eine in vitro Studie zeigte, dass ATIII in der Lage ist, die Expression von  $\beta_2$ -Integrinen (CD11b/CD18) in aktivierten neutrophilen Granulozyten und Monozyten zu verhindern (*GRITTI et al. 2004*).

In der Zusammenschau der beschriebenen Wirkweisen von ATIII ist am ehesten unter den zuletzt genannten Mechanismen nach der Ursache für die anti-adhäsive Wirkung von ATIII zu suchen. Die vorliegende Studie liefert einen weiteren eindeutigen Nachweis für die antiinflammatorische Wirkung von ATIII in entzündlich veränderten Geweben.

Diese Wirkung konnte auch in der histochemischen Untersuchung CAE-gefärbter Muskelschnitte nachvollzogen werden: die Gesamtleukozytenzahl verdoppelte sich nach Trauma und verdreifachte sich bei zusätzlicher Endotoxinämie. Während die ATIII-Therapie lediglich einen geringen Einfluss auf die posttraumatische Leukozytenzahl hatte, wurde diese unter der Endotoxinämie auf das Niveau der traumatisierten Gruppe reduziert. Auch wenn nach ATIII-Therapie kein vollständiger Rückgang der histologisch ermittelten Leukozytenzahlen auf Kontrollniveau erkennbar war, so scheint ATIII doch eine Art Kontrolle gegenüber einer massiven Entzündung durch Leukozyten zu leisten. Diese Vermutung wird auch durch die quantitative Untersuchung der systemischen Leukozytenzahl gestützt. Zwar wurde posttraumatisch keine Zunahme von Entzündungszellen beobachtet, doch die Endotoxinämiebedingte Steigerung von ~30% wurde nach ATIII-Therapie ebenfalls auf Kontrollniveau reduziert.

Die intravitalmikroskopischen Experimente zeigten weiterhin nach ATIII-Therapie eine Reduktion der traumatisch und endotoxinämisch signifikant erhöhten Gefäßpermeabilität auf Kontrollniveau. Histologisch bestätigte sich dieser Rückgang besonders in der Untersuchungsgruppe nach Trauma und Endotoxinämie, die morphologisch der Kontrollgruppe glich. Auch die Messung der Ratio aus Feucht- und Trockengewicht des ebenfalls traumatisierten M. tibialis anterior bestätigt die Wirksamkeit von ATIII auf das posttraumatisch und endotoxinämisch bedingte Weichteilödem, welches in beiden Gruppen auf Kontrollniveau lag. In der Endotoxinämiegruppe war der Therapieerfolg statistisch signifikant. Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass ATIII das posttraumatisch und endotoxinämisch entstandene Gewebeödem positiv beeinflusst und die mikrovaskuläre Permeabilität deutlich reduziert. Andere experimentelle Studien, die sich mit dem therapeutischen Einsatz von ATIII bei Endotoxinämie beschäftigten, zeigten ebenfalls eine Reduktion der endotoxinämisch gesteigerten Gefäßpermeabilität (*DICKNEITE & KROEZ 2001, LEITHÄUSER et al. 2002, CZABANKA et al. 2006*). Diese Wirkung steht vermutlich

in engem Zusammenhang mit der durch ATIII reduzierten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, da die gesteigerte mikrovaskuläre Leckage vor allem als Folge der leukozytären Freisetzung von Proteasen und Sauerstoffradikalen mit konsekutiver Störung der endothelialen Barrierefunktion angesehen wird (*WELBOURN et al. 1992, KIRKPATRICK et al. 1996*).

Infolge der geringen, nicht signifikanten Veränderungen der kapillaren und venulären Gefäßdurchmesser sowie der Erythrozytenfließgeschwindigkeit nach Trauma und Endotoxinämie waren auch nach ATIII-Applikation keine wesentlichen Veränderungen zu beobachten. Neben der Flüssigkeitssubstitution und der Gabe von vasodilatatorischen Substanzen wie Nitroglyzerin haben verschiedene in Sepsisstudien getestete Medikamente zur Verbesserung der Mikrozirkulation beigetragen. Zu den experimentell und klinisch erfolgreich eingesetzten Substanzen gehören - neben ATIII - auch das aktivierte Protein C, Steroide und Vitamin C (*HOFFMANN et al. 2002a, GIERER et al. 2007, MARECHAL et al. 2008, De BACKER et al. 2011*).

Die ATIII-Therapie sorgte im Rahmen der vorliegenden Studie für einen deutlichen Rückgang apoptotischer Myozyten nach Trauma und nach Endotoxinämie, was auch histochemisch mithilfe der TUNEL-Methode bestätigt wurde. Dieser antiapoptotischen Wirkung liegt vermutlich ein großer Teil der bereits diskutierten antiinflammatorischen Wirkungen von ATIII zugrunde. Es ist anzunehmen, dass die durch ATIII maßgeblich verbesserte Gewebepfusion mit konsekutiver Steigerung der Gewebeoxygenierung der Hauptgrund für die Reduktion der Muskelzellapoptose ist.

Die Endotoxinämie führte zu einer signifikanten ( $p < 0,05$ ) Thrombozytopenie, die durch die ATIII-Therapie nicht behoben wurde. Da ATIII keine direkte Wirkung auf die Thrombozytenaktivierung hat, könnte eine Gegenregulation nur über seine antiinflammatorische Wirkung zustande kommen. Eine solche indirekte Gegenregulation nimmt vermutlich mehr Zeit in Anspruch als der entzündungsbedingte Thrombozytenabfall.

ATIII wird in der Intensivmedizin als Marker zur Detektion der pathologischen Gerinnungsaktivierung verwendet (*JOHANSSON et al. 2011*). Die ATIII-Aktivität fiel nach Trauma und Endotoxinämie erwartungsgemäß stark ab (*GANDO et al. 2011*). Durch die intravenöse ATIII-Substitution kam es zur gewünschten supranormalen ATIII-Aktivität, was für eine sichere Applikationsart und die Wirksamkeit des genutzten Präparates spricht (*FOURRIER 1998*).

Fibrinogen ist neben seiner Eigenschaft als Akute-Phase-Protein auch ein geeigneter Marker zur Detektion eines erhöhten Verbrauchs an Gerinnungsfaktoren, z.B. im Rahmen einer DIC nach Trauma oder bei systemischer Entzündungsreaktion (JOHANSSON *et al.* 2011). Der laborchemisch gemessene signifikante Anstieg von Fibrinogen nach ATIII-Gabe unterstreicht die sichere Applikation von ATIII und dessen gerinnungsmodulierende Wirkung (OPAL *et al.* 2002)

Der folgende Absatz dient der Klärung der eingangs formulierten Frage nach etwaig aufgetretenen Blutungskomplikationen bei der Muskelpräparation ATIII-behandelter Versuchstiere. Die Blutungsneigung während der Präparation hing primär vom Vorliegen einer Endotoxinämie ab. Während endotoxinämische Tiere ohne ATIII-Behandlung aufgrund vermehrter, jedoch gut beherrschbarer Blutungen auffielen, bestand nach ATIII-Gabe keine relevante Blutungsneigung. In diesen Fällen gestaltete sich die Präparation ähnlich unkompliziert wie in der Kontrollgruppe.

Eine experimentelle Studie, die ATIII als antithrombotische Alternative zu Heparin und Hirudin untersuchte, zeigte eine vergleichbar gute antithrombotische Effektivität (SORG *et al.* 2006). In einer Folgestudie wurde dieser Effekt unter endotoxinämischen Bedingungen bestätigt. Obwohl ATIII die Blutungszeit signifikant erhöhte, kam es unter diesen experimentellen Bedingungen zu keinen Blutungskomplikationen (SORG *et al.* 2007). Bei hingegen zeitgleicher Anwendung von ATIII und Heparin sind in der Literatur schwere Blutungskomplikationen beschrieben worden (WARREN *et al.* 2001). Der komplikationslose Einsatz von ATIII als Monotherapie wäre ein entscheidender kausaler Ansatz in der Therapie geschlossener Weichteilverletzungen, die bislang in den meisten Fällen ausschließlich symptomatisch behandelt werden.

### **7.3 Klinische Perspektiven**

Insgesamt zeigten die Untersuchungsergebnisse der vorliegenden Studie durchgehend positive Auswirkungen der experimentellen ATIII-Therapie auf das schwere geschlossene Weichteiltrauma bei Endotoxinämie. Es ist zu bemerken, dass die protektive ATIII-Wirkung ohne schwerwiegende Blutungen oder andere Nebenwirkungen blieb. Die Endotoxinämie stellte experimentell keine Kontraindikation zur

therapeutischen Anwendung von ATIII nach Weichteiltrauma dar. Einige antiinflammatorische Effekte von ATIII waren bei Endotoxinämie sogar besonders ausgeprägt.

Die antiinflammatorische Wirksamkeit von ATIII ist seit Jahren bekannt (*YAMAUCHI et al. 1989, OKAJIMA & OCHIBA 1998, HOFFMANN et al. 2000*). Zunächst war in erster Linie ein adjuvanter Einsatz in der Sepsistherapie von wissenschaftlichem Interesse. Im Zuge dessen wurden diverse experimentelle und klinische Endotoxinämie- und Sepsisstudien durchgeführt (*BAUDO et al. 1998, EISELE et al. 1998, FOURRIER et al. 1998, INTHORN et al. 1998, DICKNEITE & LEITHÄUSER 1999, NEVIÈRE et al. 2001*). Im Rahmen der internationalen Phase III Studie „KyberSept“ zeigte sich, dass Heparin, welches eine übliche Komedikation bei Sepsis darstellt, die antiinflammatorische Wirksamkeit von ATIII aufhebt und bei gleichzeitiger Anwendung mit ATIII zu schwerwiegenden Blutungen führen kann (*WARREN et al. 2001*).

Auch wenn ATIII zur adjuvanten Therapie der Sepsis aktuell nicht empfohlen wird, ist aus den Ergebnissen der „KyberSept“ Studie die Idee entstanden, ATIII als Monotherapeutikum bei unterschiedlichen entzündlichen Erkrankungen einzusetzen.

Unlängst wurde ATIII in verschiedenen Studien unter der Zielsetzung einer antiinflammatorischen Therapie angewendet. Diller und Kollegen setzten ATIII zur Verbesserung der Anastomosenheilung nach Kolonoperationen bei Endotoxinämie ein und erzielten damit gute Therapieergebnisse (*DILLER et al. 2009*). Im Rahmen entzündlicher Darmerkrankungen kommt es regelhaft zu einer Verschlechterung der Mukosadurchblutung und zu vermehrter Leukozytenadhärenz in der Leber. Die aus diesen Veränderungen hervorgehende Leberschädigung konnte durch ATIII-Gabe verhindert werden (*MAKSAN et al. 2005*). Nach Gefäßverletzungen wurde an Mäusen gezeigt, dass ATIII sowohl der lokalen Thrombusformation, als auch einer übermäßigen zellulären Entzündungsreaktion entgegenwirkt, ohne die neointimale Proliferation zu stören (*MAEDA et al. 2011*). Erst kürzlich wurde von einer ausgeprägten antiinflammatorischen und antiapoptotischen Wirkung von ATIII auf die Leber nach Ischämie/Reperfusion berichtet (*ISIK et al. 2012*). Auch in der Traumatologie ist ATIII bereits angewendet worden: nach schwerem Schädel-Hirn-Trauma der Ratte hat ATIII positive Auswirkungen auf die beobachteten Parametern Zelltod, Entzündung, Blutung und Apoptose gezeigt (*SEN et al. 2011*). Die beschriebene positive Wirkung von ATIII auf das zentrale Nervensystem wird auch von Studien bestätigt, in denen



traumatische Verletzungen des Rückenmarkes mit ATIII behandelt wurden (*HIROSE et al. 2004, TAKOA et al. 2004*).

Setzt man die Übertragbarkeit der vorliegenden Studienergebnisse in die klinische Situation voraus, so wäre mittelfristig ein therapeutischer Einsatz von ATIII in der Versorgung des schweren Muskeltraumas überlegenswert. Ein solcher Therapieansatz bedarf einer entsprechenden klinischen Testung in Studien sowie einer klaren Indikationsstellung. Es wäre beispielsweise denkbar, ATIII bei Patienten mit erhöhtem Risiko für einen entzündlichen „second hit“ nach schwerem Trauma einzusetzen.

## 8 LITERATURVERZEICHNIS

- Adams DH, Shaw S. Leucocyte-endothelial interactions and regulation of leucocyte migration. *Lancet*. 1994; 343:831–836.
- Aird WC. The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome. *Blood*. 2003; 101:3765–3777.
- Andersson-Engels S, Klinteberg C, Svanberg K, Svanberg S. In vivo fluorescence imaging for tissue diagnostics. *Phys Med Biol*. 1997; 42:815–824.
- Andrian UH von. Intravital microscopy of the peripheral lymph node microcirculation in mice. *Microcirculation*. 1996; 3:287–300.
- Angstwurm M, Hoffmann J, Ostermann H, Frey L, Spannagl M. Severe sepsis and disseminated intravascular coagulation. Supplementation with antithrombin. *Anaesthesist*. 2009; 58:171–179.
- Araújo AV, Ferezin CZ, Rodrigues GJ, Lunardi CN, Vercesi JA, Grando MD, Bonaventura D, Bendhack LM. Prostacyclin, not only nitric oxide, is a mediator of the vasorelaxation induced by acetylcholine in aortas from rats submitted to cecal ligation and perforation (CLP). *Vascul Pharmacol*. 2011; 54:44–51.
- Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science*. 1998; 281:1305–1308.
- Aubin JE. Autofluorescence of viable cultured mammalian cells. *J Histochem Cytochem*. 1979; 27:36–43.
- Baatz H, Steinbauer M, Harris AG, Krombach F. Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1995; 15:85–91.
- Backer D de, Creteur J, Preiser J, Dubois M, Vincent J. Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis. *Am J Respir Crit Care Med*. 2002; 166:98–104.
- Backer D de, Donadello K, Taccone FS, Ospina-Tascon G, Salgado D, Vincent J. Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy. *Ann Intensive Care*. 2011; 1:27.
- Bannerman DD, Goldblum SE. Mechanisms of bacterial lipopolysaccharide-induced endothelial apoptosis. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2003; 284:899–914.
- Bansch P, Lundblad C, Grände P, Bentzer P. A model for evaluating the effects of blunt skeletal muscle trauma on microvascular permeability and plasma volume in the rat. *Shock*. 2010; 33:399–404.
- Baraga JJ, Rava RP, Taroni P, Kittrell C, Fitzmaurice M, Feld MS. Laser induced fluorescence spectroscopy of normal and atherosclerotic human aorta using 306–310 nm excitation. *Lasers Surg Med*. 1990; 10:245–261.
- Bassetti M, Ginocchio F, Giacobbe DR. New approaches for empiric therapy in Gram-positive sepsis. *Minerva Anesthesiol*. 2011; 77:821–827.
- Baudo F, Caimi TM, Cataldo F de, Ravizza A, Arlati S, Casella G, Carugo D, Palareti G, Legnani C, Ridolfi L, Rossi R, D'Angelo A, Crippa L, Giudici D, Gallioli G, Wolfler A, Calori G. Antithrombin III (ATIII) replacement therapy in patients with sepsis and/or postsurgical complications: a controlled double-blind, randomized, multicenter study. *Intensive Care Med*. 1998; 24:336–342.
- Beiner JM, Jokl P, Cholewicki J, Panjabi MM. The effect of anabolic steroids and corticosteroids on healing of muscle contusion injury. *Am J Sports Med*. 1999; 27:2–9.
- Benson RC, Meyer RA, Zaruba ME, McKhann GM. Cellular autofluorescence - is it due to flavins? *J Histochem Cytochem*. 1979; 27:44–48.
- Bhatia R, Dent C, Topley N, Pallister I. Neutrophil priming for elastase release in adult blunt trauma patients. *J Trauma*. 2006; 60:590–596.
- Bleakley C, McDonough S, MacAuley D. The use of ice in the treatment of acute soft-tissue injury: a systematic review of randomized controlled trials. *Am J Sports Med*. 2004; 32:251–261.
- Bledsoe KA, Kramer AH. Propylene glycol toxicity complicating use of barbiturate coma. *Neurocrit Care*. 2008; 9:122–124.

- Bombeli T, Mueller M, Haeberli A. Anticoagulant properties of the vascular endothelium. *Thromb Haemost.* 1997; 77:408–423.
- Bone RC. Sir Isaac Newton, sepsis, SIRS, and CARS. *Crit Care Med.* 1996; 24:1125–1128.
- Bone RC, Balk RA, Cerra FB, Dellinger RP, Fein AM, Knaus WA, Schein RM, Sibbald WJ. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee. American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine. *Chest.* 1992; 101:1644–1655.
- Brickson S, Ji LL, Schell K, Olabisi R, St Pierre Schneider B, Best TM. M1/70 attenuates blood-borne neutrophil oxidants, activation, and myofiber damage following stretch injury. *J Appl Physiol.* 2003; 95:969–976.
- Broze GJ. Tissue factor pathway inhibitor and the revised theory of coagulation. *Annu Rev Med.* 1995; 46:103–112.
- Calvano JE, Agnese DM, Um JY, Goshima M, Singhal R, Coyle SM, Reddell MT, Kumar A, Calvano SE, Lowry SF. Modulation of the lipopolysaccharide receptor complex (CD14, TLR4, MD-2) and toll-like receptor 2 in systemic inflammatory response syndrome-positive patients with and without infection: relationship to tolerance. *Shock.* 2003; 20:415–419.
- Chandler WL. Procoagulant activity in trauma patients. *Am J Clin Pathol.* 2010; 134:90–96.
- Chappell D, Westphal M, Jacob M. The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol.* 2009; 22:155–162.
- Chargé SBP, Rudnicki MA. Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev.* 2004; 84:209–238.
- Chavakis E, Choi EY, Chavakis T. Novel aspects in the regulation of the leukocyte adhesion cascade. *Thromb Haemost.* 2009; 102:191–197.
- Chierago M, Verdant C, Backer D de. Microcirculatory alterations in critically ill patients. *Minerva Anesthesiol.* 2006; 72:199–205.
- Comim CM, Vilela MC, Constantino LS, Petronilho F, Vuolo F, Lacerda-Queiroz N, Rodrigues DH, da Rocha JL, Teixeira AL, Quevedo J, Dal-Pizzol F. Traffic of leukocytes and cytokine up-regulation in the central nervous system in sepsis. *Intensive Care Med.* 2011; 37:711–718.
- Conzen PF, Hobbhahn J, Goetz AE, Habazettl H, Granetzny T, Peter K, Brendel W. Splanchnic oxygen consumption and hepatic surface oxygen tensions during isoflurane anesthesia. *Anesthesiology.* 1988; 69:643–651.
- Cooper RN, Tajbakhsh S, Mouly V, Cossu G, Buckingham M, Butler-Browne GS. In vivo satellite cell activation via Myf5 and MyoD in regenerating mouse skeletal muscle. *J Cell Sci.* 1999; 112:2895–2901.
- Crisco JJ, Jokl P, Heinen GT, Connell MD, Panjabi MM. A muscle contusion injury model. Biomechanics, physiology, and histology. *Am J Sports Med.* 1994; 22:702–710.
- Cryer HM, Garrison RN, Kaebnick HW, Harris PD, Flint LM. Skeletal microcirculatory responses to hyperdynamic Escherichia coli sepsis in unanesthetized rats. *Arch Surg.* 1987; 122:86–92.
- Curley G, Laffey JG, Kavanagh BP. Bench-to-bedside review: carbon dioxide. *Crit Care.* 2010; 14:220.
- Czabanka M, Martin E, Walther A. Role of antithrombin and factor XIII in leukocyte-independent plasma extravasation during endotoxemia: an intravital-microscopic study in the rat. *J Surg Res.* 2006; 136:219–226.
- Damus PS, Hicks M, Rosenberg RD. Anticoagulant action of heparin. *Nature.* 1973; 246:355–357.
- Deal DN, Tipton J, Rosencrance E, Curl WW, Smith TL. Ice reduces edema. A study of microvascular permeability in rats. *J Bone Joint Surg Am.* 2002; 84:1573–1578.
- Deitch EA. Rodent models of intra-abdominal infection. *Shock.* 2005; 24:19–23.

- Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J, Gea-Banacloche J, Keh D, Marshall JC, Parker MM, Ramsay G, Zimmerman JL, Vincent J, Levy MM. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med*. 2004; 32:858–873.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC, Brun-Buisson C, Beale R, Calandra T, Dhainaut J, Gerlach H, Harvey M, Marini JJ, Marshall J, Ranieri M, Ramsay G, Sevransky J, Thompson BT, Townsend S, Vender JS, Zimmerman JL, Vincent J. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. *Crit Care Med*. 2008; 36:296–327.
- Dentener MA, Bazil V, Asmuth EJ von, Ceska M, Buurman WA. Involvement of CD14 in lipopolysaccharide-induced tumor necrosis factor-alpha, IL-6 and IL-8 release by human monocytes and alveolar macrophages. *J Immunol*. 1993; 150:2885–2891.
- Dickneite G, Kroez M. Treatment of porcine sepsis with high-dose antithrombin III reduces tissue edema and effusion but does not increase risk for bleeding. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2001; 12:459–467.
- Dickneite G, Leithäuser B. Influence of antithrombin III on coagulation and inflammation in porcine septic shock. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 1999; 19:1566–1572.
- Dickneite G, Pâques EP. Reduction of mortality with antithrombin III in septicemic rats: a study of *Klebsiella pneumoniae* induced sepsis. *Thromb Haemost*. 1993; 69:98–102.
- Diller R, Stratmann U, Minin E, Eiff C von, Bäumer G, Huismans H, Helmschmied T, Becker K, Spiegel H. ATIII attenuates endotoxemia induced healing impairment in the colon. *J Surg Res*. 2009; 157:4–13.
- Dixon CE, Clifton GL, Lighthall JW, Yaghamai AA, Hayes RL. A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods*. 1991; 39:253–262.
- Dormehl IC, Hugo N, Pretorius JP, Redelinghuys IF. In vivo assessment of regional microvascular albumin leakage during *E. coli* septic shock in the baboon model. *Circ Shock*. 1992; 38:9–13.
- Drazenovic R, Samsel RW, Wylam ME, Doerschuk CM, Schumacker PT. Regulation of perfused capillary density in canine intestinal mucosa during endotoxemia. *J Appl Physiol*. 1992; 72:259–265.
- Dunbar NM, Chandler WL. Thrombin generation in trauma patients. *Transfusion*. 2009; 49:2652–2660.
- Dunzendorfer S, Kaneider N, Rabensteiner A, Meierhofer C, Reinisch C, Römisch J, Wiedermann CJ. Cell-surface heparan sulfate proteoglycan-mediated regulation of human neutrophil migration by the serpin antithrombin III. *Blood*. 2001; 97:1079–1085.
- Durham RM, Moran JJ, Mazuski JE, Shapiro MJ, Baue AE, Flint LM. Multiple organ failure in trauma patients. *J Trauma*. 2003; 55:608–616.
- Duszyńska W. Antimicrobial therapy in severe infections with multidrug-resistant Gram-negative bacterias. *Anestezjol Intens Ter*. 2010; 42:160–166.
- Dziarski R, Gupta D. Role of MD-2 in TLR2- and TLR4-mediated recognition of Gram-negative and Gram-positive bacteria and activation of chemokine genes. *J Endotoxin Res*. 2000; 6:401–405.
- Eipel C, Bordel R, Nickels RM, Menger MD, Vollmar B. Impact of leukocytes and platelets in mediating hepatocyte apoptosis in a rat model of systemic endotoxemia. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2004; 286:769–776.
- Eipel C, Kidess E, Abshagen K, Leminh K, Menger MD, Burkhardt H, Vollmar B. Antileukoproteinase protects against hepatic inflammation, but not apoptosis in the response of D-galactosamine-sensitized mice to lipopolysaccharide. *Br J Pharmacol*. 2007b; 151:406–413.
- Eipel C, Hirschmann M, Abshagen K, Menger MD, Vollmar B. Local interaction of apoptotic hepatocytes and Kupffer cells in a rat model of systemic endotoxemia. *Hepatol Res*. 2007a; 37:863–871.
- Eisele B, Lamy M, Thijs LG, Keinecke HO, Schuster HP, Matthias FR, Fourrier F, Heinrichs H, Delves U. Antithrombin III in patients with severe sepsis. A randomized, placebo-controlled, double-blind multicenter trial plus a meta-analysis on all randomized, placebo-controlled, double-blind trials with antithrombin III in severe sepsis. *Intensive Care Med*. 1998; 24:663–672.

- Eriksson EE, Xie X, Werr J, Thoren P, Lindbom L. Importance of primary capture and L-selectin-dependent secondary capture in leukocyte accumulation in inflammation and atherosclerosis in vivo. *J Exp Med*. 2001; 194:205–218.
- Esmon CT. The protein C pathway. *Chest*. 2003; 124:26–32.
- Esser S, Lampugnani MG, Corada M, Dejana E, Risau W. Vascular endothelial growth factor induces VE-cadherin tyrosine phosphorylation in endothelial cells. *J Cell Sci*. 1998; 111:1853–1865.
- Fortin CF, McDonald PP, Fülöp T, Lesur O. Sepsis, leukocytes, and nitric oxide (NO): an intricate affair. *Shock*. 2010; 33:344–352.
- Fourrier F. Therapeutic applications of antithrombin concentrates in systemic inflammatory disorders. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998; 9:39–45.
- Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A, Marey A, Lestavel P. Septic shock, multiple organ failure, and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C, and protein S deficiencies. *Chest*. 1992; 101:816–823.
- Fourrier F, Chopin C, Huart JJ, Runge I, Caron C, Goudemand J. Double-blind, placebo-controlled trial of antithrombin III concentrates in septic shock with disseminated intravascular coagulation. *Chest*. 1993; 104:882–888.
- Fourrier F, Jourdain M, Tournoys A, Gosset P, Mangalaboyi J, Chopin C. Effects of a combined antithrombin III and protein C supplementation in porcine acute endotoxic shock. *Shock*. 1998; 10:364–370.
- Fraser IS, McCarron G, Hutton B, Macey D. Endometrial blood flow measured by xenon 133 clearance in women with normal menstrual cycles and dysfunctional uterine bleeding. *Am J Obstet Gynecol*. 1987; 156:158–166.
- Gando S, Kameue T, Matsuda N, Hayakawa M, Ishitani T, Morimoto Y, Kemmotsu O. Combined activation of coagulation and inflammation has an important role in multiple organ dysfunction and poor outcome after severe trauma. *Thromb Haemost*. 2002; 88:943–949.
- Gando S, Sawamura A, Hayakawa M. Trauma, shock, and disseminated intravascular coagulation: lessons from the classical literature. *Ann Surg*. 2011; 254:10–19.
- Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol*. 1992; 119:493–501.
- Ghaly A, Marsh DR. Ischaemia-reperfusion modulates inflammation and fibrosis of skeletal muscle after contusion injury. *Int J Exp Pathol*. 2010; 91:244–255.
- Gierer P, Hoffmann JN, Mahr F, Menger MD, Mittlmeier T, Gradl G, Vollmar B. Activated protein C reduces tissue hypoxia, inflammation, and apoptosis in traumatized skeletal muscle during endotoxemia. *Crit Care Med*. 2007; 35:1966–1971.
- Gierer P, Hoffmann JN, Mahr F, Menger MD, Mittlmeier T, Gradl G, Vollmar B. Sublethal trauma model with systemic endotoxemia for the study of microcirculatory disorders after the second hit. *J Surg Res*. 2008; 147:68–74.
- Gierer P, Mittlmeier T, Bordel R, Schaser K, Gradl G, Vollmar B. Selective cyclooxygenase-2 inhibition reverses microcirculatory and inflammatory sequelae of closed soft-tissue trauma in an animal model. *J Bone Joint Surg Am*. 2005; 87:153–160.
- Gierer P, Röther J, Mittlmeier T, Gradl G, Vollmar B. Ebselen reduces inflammation and microvascular perfusion failure after blunt skeletal muscle injury of the rat. *J Trauma*. 2010; 68:853–858.
- Glawe C, Emmrich J, Sparmann G, Vollmar B. In vivo characterization of developing chronic pancreatitis in rats. *Lab Invest*. 2005; 85:193–204.
- Goetsch SC, Hawke TJ, Gallardo TD, Richardson JA, Garry DJ. Transcriptional profiling and regulation of the extracellular matrix during muscle regeneration. *Physiol Genomics*. 2003; 14:261–271.
- Gourgiotis S, Villias C, Germanos S, Foukas A, Ridolfini MP. Acute limb compartment syndrome: a review. *J Surg Educ*. 2007; 64:178–186.

- Gradl G, Gaida S, Finke B, Lindenblatt N, Gierer P, Menger MD, Mittlmeier T, Vollmar B. Supernatant of traumatized muscle induces inflammation and pain, but not microcirculatory perfusion failure and apoptotic cell death. *Shock*. 2005; 24:219–225.
- Gradl G, Gaida S, Gierer P, Mittlmeier T, Vollmar B. In vivo evidence for apoptosis, but not inflammation in the hindlimb muscle of neuropathic rats. *Pain*. 2004; 112:121–130.
- Gritti D, Malinverno A, Gasparetto C, Wiedermann CJ, Ricevuti R. Attenuation of leukocyte beta 2-integrin expression by antithrombin-III. *Int J Immunopathol Pharmacol*. 17:27–32.
- Gustilo RB, Anderson JT. Prevention of infection in the treatment of one thousand and twenty-five open fractures of long bones: retrospective and prospective analyses. *J Bone Joint Surg Am*. 1976; 58:453–458.
- Hack CE, Zeerleder S. The endothelium in sepsis: source of and a target for inflammation. *Crit Care Med*. 2001; 29:21–7.
- Hagiwara S, Iwasaka H, Shingu C, Matsumoto S, Uchida T, Noguchi T. Antithrombin III prevents cerulein-induced acute pancreatitis in rats. *Pancreas*. 2009; 38:746–751.
- Hagiwara S, Iwasaka H, Shingu C, Matsumoto S, Uchida T, Noguchi T. High-dose antithrombin III prevents heat stroke by attenuating systemic inflammation in rats. *Inflamm Res*. 2010; 59:511–518.
- Hangai-Hoger N, Nacharaju P, Manjula BN, Cabrales P, Tsai AG, Acharya SA, Intaglietta M. Microvascular effects following treatment with polyethylene glycol-albumin in lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *Crit Care Med*. 2006; 34:108–117.
- Harada N, Okajima K, Kushimoto S, Isobe H, Tanaka K. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion injury of rat liver by increasing the hepatic level of prostacyclin. *Blood*. 1999; 93:157–164.
- Harada N, Okajima K, Uchiba M, Kushimoto S, Isobe H. Antithrombin reduces ischemia/reperfusion-induced liver injury in rats by activation of cyclooxygenase-1. *Thromb Haemost*. 2004; 92:550–558.
- Haziot A, Chen S, Ferrero E, Low MG, Silber R, Goyert SM. The monocyte differentiation antigen, CD14, is anchored to the cell membrane by a phosphatidylinositol linkage. *J Immunol*. 1988; 141:547–552.
- Henrich M, Gruss M, Weigand MA. Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalyx. *Scientific World Journal*. 2010; 10:917–923.
- Heumann D, Roger T. Initial responses to endotoxins and Gram-negative bacteria. *Clin Chim Acta*. 2002; 323:59–72.
- Hietbrink F, Koenderman L, Rijkers G, Leenen L. Trauma: the role of the innate immune system. *World journal of emergency surgery*. 2006; 1:15.
- Hirose K, Okajima K, Uchiba M, Nakano K, Utoh J, Kitamura N. Antithrombin reduces the ischemia/reperfusion-induced spinal cord injury in rats by attenuating inflammatory responses. *Thromb Haemost*. 2004; 91:162–170.
- Hochachka PW. Defense strategies against hypoxia and hypothermia. *Science*. 1986; 231:234–241.
- Hoetzel A, Leitz D, Schmidt R, Tritschler E, Bauer I, Loop T, Humar M, Geiger KK, Pannen BHJ. Mechanism of hepatic heme oxygenase-1 induction by isoflurane. *Anesthesiology*. 2006; 104:101–109.
- Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. *Shock*. 1999; 12:355–364.
- Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. Antithrombin reduces leukocyte adhesion during chronic endotoxemia by modulation of the cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol, Cell Physiol*. 2000; 279:98–107.
- Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Kaneider NC, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ, Römisch J, Schildberg FW, Menger MD. Adverse effect of heparin on antithrombin action during endotoxemia: microhemodynamic and cellular mechanisms. *Thromb Haemost*. 2002b; 88:242–252.

- Hoffmann JN, Vollmar B, Römisch J, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. Antithrombin effects on endotoxin-induced microcirculatory disorders are mediated mainly by its interaction with microvascular endothelium. *Crit Care Med*. 2002a; 30:218–225.
- Hogan MC, Stary CM, Balaban RS, Combs CA. NAD(P)H fluorescence imaging of mitochondrial metabolism in contracting *Xenopus* skeletal muscle fibers: effect of oxygen availability. *J Appl Physiol*. 2005; 98:1420–1426.
- Holck HGO, Kanan MA, Mills LM, Smith EL. Studies upon the sex-difference in rats in tolerance to certain barbiturates and to nicotine. *J Pharmacol Exp Ther*. 1937; :323–346.
- Horie S, Ishii H, Kazama M. Heparin-like glycosaminoglycan is a receptor for antithrombin III-dependent but not for thrombin-dependent prostacyclin production in human endothelial cells. *Thromb Res*. 1990; 59:895–904.
- Hubbard TJ, Denegar CR. Does Cryotherapy Improve Outcomes With Soft Tissue Injury? *J Athl Train*. 2004; 39:278–279.
- Huda R, Solanki DR, Mathru M. Inflammatory and redox responses to ischaemia/reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Sci*. 2004; 107:497–503.
- Hurley JC. Endotoxemia and Gram-negative bacteremia as predictors of outcome in sepsis: a meta-analysis using ROC curves. *J Endotoxin Res*. 2003; 9:271–279.
- Hurme T, Kalimo H. Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*. 1992; 24:197–205.
- Hurme T, Kalimo H, Lehto M, Järvinen M. Healing of skeletal muscle injury: an ultrastructural and immunohistochemical study. *Med Sci Sports Exerc*. 1991; 23:801–810.
- Iba T, Gando S, Murata A, Kushimoto S, Saitoh D, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, Mayumi T, Ikeda T, Ishhikura H, Ueyama M, Ogura Y, Endo S, Shimazaki S. Predicting the severity of systemic inflammatory response syndrome (SIRS)-associated coagulopathy with hemostatic molecular markers and vascular endothelial injury markers. *J Trauma*. 2007; 63:1093–1098.
- Ilias W, List W, Decruyenaere J, Lignian H, Knaub S, Schindel F, Keinecke HO, Heinrichs H, Thijs LG. Antithrombin III in patients with severe sepsis: a pharmacokinetic study. *Intensive Care Med*. 2000; 26:704–715.
- Ince C. The microcirculation is the motor of sepsis. *Crit Care*. 2005; 9:13-9.
- Inthorn D, Hoffmann JN, Hartl WH, Mühlbayer D, Jochum M. Antithrombin III supplementation in severe sepsis: beneficial effects on organ dysfunction. *Shock*. 1997; 8:328–334.
- Inthorn D, Hoffmann JN, Hartl WH, Mühlbayer D, Jochum M. Effect of antithrombin III supplementation on inflammatory response in patients with severe sepsis. *Shock*. 1998; 10:90–96.
- Isik S, Tuncyurek P, Zengin NI, Demirbag AE, Atalay F, Yilmaz S, Orug T. Antithrombin prevents apoptosis by regulating inflammation in the liver in a model of cold ischemia/warm reperfusion injury. *Hepato gastroenterology*. 59:453–457.
- Jackson KA, Snyder DS, Goodell MA. Skeletal muscle fiber-specific green autofluorescence: potential for stem cell engraftment artifacts. *Stem Cells*. 2004; 22:180–187.
- Järvinen MJ, Lehto MU. The effects of early mobilisation and immobilisation on the healing process following muscle injuries. *Sports Med*. 1993; 15:78–89.
- Järvinen M, Sorvari T. Healing of a crush injury in rat striated muscle. 1. Description and testing of a new method of inducing a standard injury to the calf muscles. *Acta Pathol Microbiol Scand A*. 1975; 83:259–265.
- Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Aärimaa V, Vaittinen S, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: optimising recovery. *Best Pract Res Clin Rheumatol*. 2007; 21:317–331.
- Järvinen TAH, Järvinen TLN, Kääriäinen M, Kalimo H, Järvinen M. Muscle injuries: biology and treatment. *Am J Sports Med*. 2005; 33:745–764.

- Johansson PI, Sørensen AM, Perner A, Welling KL, Wanscher M, Larsen CF, Ostrowski SR. Disseminated intravascular coagulation or acute coagulopathy of trauma shock early after trauma? An observational study. *Crit Care*. 2011; 15:272.
- Kam PC, Kavanagh R, Yoong FF, Kavanaugh R. The arterial tourniquet: pathophysiological consequences and anaesthetic implications. *Anaesthesia*. 2001; 56:534–545.
- Kamburoğlu HO, Uzun H, Bitik O, Ersoy US, Ocal E, Caliş M, Sönmez E, Safak T, Pinar A, Atilla P. The effects of hyperhomocysteinemia on the microcirculation of skin flaps. *Plast Reconstr Surg*. 2011; 128:124–130.
- Kaneider NC, Egger P, Dunzendorfer S, Wiedermann CJ. Syndecan-4 as antithrombin receptor of human neutrophils. *Biochem Biophys Res Commun*. 2001; 287:42–46.
- Kansas GS. Selectins and their ligands: current concepts and controversies. *Blood*. 1996; 88:3259–3287.
- Karlander LE, Gustavsson U, Lidman D, Sjöberg F. Severe contusion of the femoral vessels in rats alters tissue oxygenation and microvascular blood flow regulation in the skeletal muscles of the limb. *J Trauma*. 2000; 48:286–291.
- Karow T, Lang-Roth R. 2008; Allgemeine und Spezielle Pharmakologie und Toxikologie 2008. Vorlesungsorientierte Darstellung und klinischer Leitfaden: Thomas Karow Verlag.
- Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury*. 2005; 36:691–709.
- Kessler CM, Tang Z, Jacobs HM, Szymanski LM. The suprapharmacologic dosing of antithrombin concentrate for Staphylococcus aureus-induced disseminated intravascular coagulation in guinea pigs: substantial reduction in mortality and morbidity. *Blood*. 1997; 89:4393–4401.
- Kiaer T, Kristensen KD. Intracompartmental pressure, PO<sub>2</sub>, PCO<sub>2</sub> and blood flow in the human skeletal muscle. *Arch Orthop Trauma Surg*. 1988; 107:114–116.
- Kieb M, Lorbach O, Engelhardt M. Muskelverletzungen: Diagnostik und Behandlungen. *Orthopäde*. 2010; 39:1098–1107.
- Kimpe SJ de, Kengatharan M, Thiemermann C, Vane JR. The cell wall components peptidoglycan and lipoteichoic acid from Staphylococcus aureus act in synergy to cause shock and multiple organ failure. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1995; 92:10359–10363.
- Kimura F, Shimizu H, Yoshidome H, Ohtsuka M, Miyazaki M. Immunosuppression following surgical and traumatic injury. *Surg Today*. 2010; 40:793–808.
- Kirkpatrick CJ, Bittinger F, Klein CL, Hauptmann S, Klosterhalfen B. The role of the microcirculation in multiple organ dysfunction syndrome (MODS): a review and perspective. *Virchows Arch*. 1996; 427:461–476.
- Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H. Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed Tech (Berl)*. 1997; 42:168–175.
- Knappe T, Mittlmeier T, Eipel C, Amon M, Menger MD, Vollmar B. Effect of systemic hypothermia on local soft tissue trauma-induced microcirculatory and cellular dysfunction in mice. *Crit Care Med*. 2005; 33:1805–1813.
- Koike K, Sekine K, Endo T, Nomura R, Shinozawa Y. Animal models for sepsis. *Nippon Geka Gakkai Zasshi*. 2003; 104:800–804.
- Kollmar O, Corsten M, Scheuer C, Vollmar B, Schilling MK, Menger MD. Tumor growth following portal branch ligation in an experimental model of liver metastases. *Br J Surg*. 2010; 97:917–926.
- Kolodjaschna J, Berisha F, Lung S, Schaller G, Polska E, Jilma B, Wolzt M, Schmetterer L. LPS-induced microvascular leukocytosis can be assessed by blue-field entoptic phenomenon. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2004; 287:691-694.
- Kumar P, Shen Q, Pivetti CD, Lee ES, Wu MH, Yuan SY. Molecular mechanisms of endothelial hyperpermeability: implications in inflammation. *Expert Rev Mol Med*. 2009; 11:19.
- Laifer LI, O'Brien KM, Stetz ML, Gindi GR, Garrand TJ, Deckelbaum LI. Biochemical basis for the difference between normal and atherosclerotic arterial fluorescence. *Circulation*. 1989; 80:1893–1901.



- Lange KHW, Jansen T, Asghar S, Kristensen PL, Skjønnemand M, Nørgaard P. Skin temperature measured by infrared thermography after specific ultrasound-guided blocking of the musculocutaneous, radial, ulnar, and median nerves in the upper extremity. *Br J Anaesth*. 2011; 106:887–895.
- Langheinrich AC, Ritman EL. Quantitative imaging of microvascular permeability in a rat model of lipopolysaccharide-induced sepsis: evaluation using cryostatic micro-computed tomography. *Invest Radiol*. 2006; 41:645–650.
- Lauterbach R, Pawlik D, Radziszewska R, Woźniak J, Rytlewski K. Plasma antithrombin III and protein C levels in early recognition of late-onset sepsis in newborns. *Eur J Pediatr*. 2006; 165:585–589.
- Le Grand F, Rudnicki M. Satellite and stem cells in muscle growth and repair. *Development*. 2007; 134:3953–3957.
- Leithäuser B, Schumacher J, Lendemans S, Tillmanns H, Matthias FR. Antithrombin attenuates microvascular leakage and leukocyte-endothelial interaction in response to endotoxin. *Semin Thromb Hemost*. 2002; 28:87–94.
- Lenhardt R. The effect of anesthesia on body temperature control. *Front Biosci*. 2010; 2:1145–1154.
- Lenz A, Franklin GA, Cheadle WG. Systemic inflammation after trauma. *Injury*. 2007; 38:1336–1345.
- Levi M, Cate H. Disseminated intravascular coagulation. *N Engl J Med*. 1999; 341:586–592.
- Ley K. The role of selectins in inflammation and disease. *Trends Mol Med*. 2003; 9:263–268.
- Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat Rev Immunol*. 2007; 7:678–689.
- Ley K, Mestas J, Pospieszalska MK, Sundd P, Groisman A, Zarbock A. Chapter 11. Intravital microscopic investigation of leukocyte interactions with the blood vessel wall. *Meth Enzymol*. 2008; 445:255–279.
- Lighthall JW, Dixon CE, Anderson TE. Experimental models of brain injury. *J Neurotrauma*. 1989; 6:83–97.
- Livorsi DJ, Stenehjem E, Stephens DS. Virulence factors of gram-negative bacteria in sepsis with a focus on *Neisseria meningitidis*. *Contrib Microbiol*. 2011; 17:31–47.
- Lögters T, Windolf J, Flohé S. Femurschafffrakturen. *Unfallchirurg*. 2009; 112:635-50; quiz 651.
- Lohmann W, Mussmann J, Lohmann C, Künzel W. Native fluorescence of the cervix uteri as a marker for dysplasia and invasive carcinoma. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1989; 31:249–253.
- Maeda A, Ohta K, Ohta K, Nakayama Y, Hashida Y, Toma T, Saito T, Maruhashi K, Yachie A. Effects of antithrombin III treatment in vascular injury model of mice. *Pediatr Int*. 2011; 53:747–753.
- Maksan S, Ulger Z, Gebhard MM, Schmidt J. Impact of antithrombin III on hepatic and intestinal microcirculation in experimental liver cirrhosis and bowel inflammation: an in vivo analysis. *World J Gastroenterol*. 2005; 11:4997–5001.
- Mammen EF. Clinical relevance of antithrombin deficiencies. *Semin Hematol*. 1995; 32:2–6.
- Mann V, Mann S, Szalay G, Hirschburger M, Röhrig R, Dictus C, Wurmb T, Weigand MA, Bernhard M. Polytraumaversorgung auf der Intensivstation. *Anaesthesist*. 2010; 59:739–761.
- Mansell A, Reinicke A, Worrall DM, O'Neill LA. The serine protease inhibitor antithrombin III inhibits LPS-mediated NF- $\kappa$ B activation by TLR-4. *FEBS Lett*. 2001; 508:313–317.
- Mansouri A, Goudreau G, Gruss P. Pax genes and their role in organogenesis. *Cancer Res*. 1999; 59:1707–1709.
- Marechal X, Favory R, Joulin O, Moutaigne D, Hassoun S, Decoster B, Zerimech F, Neviere R. Endothelial glycocalyx damage during endotoxemia coincides with microcirculatory dysfunction and vascular oxidative stress. *Shock*. 2008; 29:572–576.
- Maroto M, Reshef R, Münsterberg AE, Koester S, Goulding M, Lassar AB. Ectopic Pax-3 activates MyoD and Myf-5 expression in embryonic mesoderm and neural tissue. *Cell*. 1997; 89:139–148.

- Massignon D, Lepape A, Bienvenu J, Barbier Y, Boileau C, Coeur P. Coagulation/fibrinolysis balance in septic shock related to cytokines and clinical state. *Haemostasis*. 1994; 24:36–48.
- Matzinger P. The danger model: a renewed sense of self. *Science*. 2002; 296:301–305.
- McCuskey RS, Urbaschek R, Urbaschek B. The microcirculation during endotoxemia. *Cardiovasc Res*. 1996; 32:752–763.
- Menger MD, Lehr HA. Scope and perspectives of intravital microscopy - bridge over from in vitro to in vivo. *Immunol Today*. 1993; 14:519–522.
- Menger MD, Richter S, Yamauchi JI, Vollmar B. Intravital microscopy for the study of the microcirculation in various disease states. *Ann Acad Med Singap*. 1999; 28:542–556.
- Menger MD, Vollmar B. Role of microcirculation in transplantation. *Microcirculation*. 2000; 7:291–306.
- Menger MD, Laschke MW, Vollmar B. Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res*. 2002; 34:83–91.
- Minnema MC, Chang AC, Jansen PM, Lubbers YT, Pratt BM, Whittaker BG, Taylor FB, Hack CE, Friedman B. Recombinant human antithrombin III improves survival and attenuates inflammatory responses in baboons lethally challenged with *Escherichia coli*. *Blood*. 2000; 95:1117–1123.
- Miyake K. Endotoxin recognition molecules MD-2 and toll-like receptor 4 as potential targets for therapeutic intervention of endotoxin shock. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*. 2004; 3:291–297.
- Morton DB, Jennings M, Buckwell A, Ewbank R, Godfrey C, Holgate B, Inglis I, James R, Page C, Sharman I, Verschoyle R, Westall L, Wilson AB. Refining procedures for the administration of substances. Report of the BVA/WF/FRAME/RSPCA/UFWA Joint Working Group on Refinement. British Veterinary Association Animal Welfare Foundation/Fund for the Replacement of Animals in Medical Experiments/Royal Society for the Prevention of Cruelty to Animals/Universities Federation for Animal Welfare. *Lab Anim*. 2001; 35:1–41.
- Murano G, Williams L, Miller-Andersson M, Aronson DL, King C. Some properties of antithrombin-III and its concentration in human plasma. *Thromb Res*. 1980; 18:259–262.
- Nevière R, Tournoy A, Mordon S, Maréchal X, Song FL, Jourdain M, Fourrier F. Antithrombin reduces mesenteric venular leukocyte interactions and small intestine injury in endotoxemic rats. *Shock*. 2001; 15:220–225.
- Oelschläger C, Römisch J, Staubitz A, Stauss H, Leithäuser B, Tillmanns H, Hölschermann H. Antithrombin III inhibits nuclear factor kappaB activation in human monocytes and vascular endothelial cells. *Blood*. 2002; 99:4015–4020.
- Ogura H, Gando S, Iba T, Eguchi Y, Ohtomo Y, Okamoto K, Koseki K, Mayumi T, Murata A, Ikeda T, Ishikura H, Ueyama M, Kushimoto S, Saitoh D, Endo S, Shimazaki S. SIRS-associated coagulopathy and organ dysfunction in critically ill patients with thrombocytopenia. *Shock*. 2007; 28:411–417.
- Okajima K, Uchiba M. The anti-inflammatory properties of antithrombin III: new therapeutic implications. *Semin Thromb Hemost*. 1998; 24:27–32.
- Olds RJ, Lane DA, Mille B, Chowdhury V, Thein SL. Antithrombin: the principal inhibitor of thrombin. *Semin Thromb Hemost*. 1994; 20:353–372.
- Omar HR, Helal EM. A cause of circulatory collapse that should be considered following trauma. *Int Arch Med*. 2010; 3:17.
- Opal SM, Kessler CM, Roemisch J, Knaub S. Antithrombin, heparin, and heparan sulfate. *Crit. Care Med*. 2002; 30:325–331.
- O'Reilly M, Newcomb DE, Remick D. Endotoxin, sepsis, and the primrose path. *Shock*. 1999; 12:411–420.
- Osterud B. Tissue factor expression by monocytes: regulation and pathophysiological roles. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 1998; 9:9–14.
- Osterud B, Rapaport SI. Activation of factor IX by the reaction product of tissue factor and factor VII: additional pathway for initiating blood coagulation. *Proc Natl Acad Sci U.S.A.* 1977; 74:5260–5264.

- Ostrovsky L, Woodman RC, Payne D, Teoh D, Kubes P. Antithrombin III prevents and rapidly reverses leukocyte recruitment in ischemia/reperfusion. *Circulation*. 1997; 96:2302–2310.
- Pape H, Giannoudis PV, Krettek C, Trentz O. Timing of fixation of major fractures in blunt polytrauma: role of conventional indicators in clinical decision making. *J Orthop Trauma*. 2005; 19:551–562.
- Pasquale MD, Cipolle MD, Monaco J, Simon N. Early inflammatory response correlates with the severity of injury. *Crit Care Med*. 1996; 24:1238–1242.
- Pattwell D, Ashton T, McArdle A, Griffiths RD, Jackson MJ. Ischemia and reperfusion of skeletal muscle lead to the appearance of a stable lipid free radical in the circulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2003; 284:2400–2404.
- Petri B, Phillipson M, Kubes P. The physiology of leukocyte recruitment: an in vivo perspective. *J Immunol*. 2008; 180:6439–6446.
- Pinheiro da Silva F, Nizet V. Cell death during sepsis: integration of disintegration in the inflammatory response to overwhelming infection. *Apoptosis*. 2009; 14:509–521.
- Pries AR. A versatile video image analysis system for microcirculatory research. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1988; 7:327–345.
- Prisk V, Huard J. Muscle injuries and repair: the role of prostaglandins and inflammation. *Histol Histopathol*. 2003; 18:1243–1256.
- Pulletz S, Lehmann C, Volk T, Schmutzler M, Ziemer S, Kox WJ, Scherer RU. Influence of heparin and hirudin on endothelial binding of antithrombin in experimental thrombinemia. *Crit Care Med*. 2000; 28:2881–2886.
- Rahman A, Fazal F. Hug tightly and say goodbye: role of endothelial ICAM-1 in leukocyte transmigration. *Antioxid Redox Signal*. 2009; 11:823–839.
- Rantanen J, Hurme T, Lukka R, Heino J, Kalimo H. Satellite cell proliferation and the expression of myogenin and desmin in regenerating skeletal muscle: evidence for two different populations of satellite cells. *Lab Invest*. 1995; 72:341–347.
- Rao LV, Nordfang O, Hoang AD, Pendurthi UR. Mechanism of antithrombin III inhibition of factor VIIa/tissue factor activity on cell surfaces. Comparison with tissue factor pathway inhibitor/factor Xa-induced inhibition of factor VIIa/tissue factor activity. *Blood*. 1995; 85:121–129.
- Reinhart K, Brunkhorst FM, Bone H, Bardutzky J, Dempfle C, Forst H, Gastmeier P, Gerlach H, Gründling M, John S, Kern W, Kreymann G, Krüger W, Kujath P, Marggraf G, Martin J, Mayer K, Meier-Hellmann A, Oppert M, Putensen C et al. Prevention, diagnosis, treatment, and follow-up care of sepsis. First revision of the S2k Guidelines of the German Sepsis Society (DSG) and the German Interdisciplinary Association for Intensive and Emergency Care Medicine (DIVI). *Anaesthesist*. 2010; 59:347–370.
- Remick DG, Newcomb DE, Bolgos GL, Call DR. Comparison of the mortality and inflammatory response of two models of sepsis: lipopolysaccharide vs. cecal ligation and puncture. *Shock*. 2000; 13:110–116.
- Roemisch J, Gray E, Hoffmann JN, Wiedermann CJ. Antithrombin: a new look at the actions of a serine protease inhibitor. *Blood Coagul Fibrinolysis*. 2002; 13:657–670.
- Roller J, Laschke MW, Scheuer C, Menger MD. Heme oxygenase (HO)-1 protects from lipopolysaccharide (LPS)-mediated liver injury by inhibition of hepatic leukocyte accumulation and improvement of microvascular perfusion. *Langenbecks Arch Surg*. 2010; 395:387–394.
- Rosenberg JS, McKenna PW, Rosenberg RD. Inhibition of human factor IXa by human antithrombin. *J Biol Chem*. 1975; 250:8883–8888.
- Rosenberg RD. Biochemistry of heparin antithrombin interactions, and the physiologic role of this natural anticoagulant mechanism. *Am J Med*. 1989; 87:2–9.
- Rotstein OD. Modeling the two-hit hypothesis for evaluating strategies to prevent organ injury after shock/resuscitation. *J Trauma*. 2003; 54:203–6.

- Rotter R, Menshykova M, Winkler T, Matziolis G, Stratos I, Schoen M, Bittorf T, Mittlmeier T, Vollmar B. Erythropoietin improves functional and histological recovery of traumatized skeletal muscle tissue. *J Orthop Res*. 2008; 26:1618–1626.
- Ruchholtz S, Nast-Kolb D, Waydhas C, Schweiberer L. The injury pattern in polytrauma. Value of information regarding accident process in clinical acute management. *Unfallchirurg*. 1996; 99:633–641.
- Rüedi TP (Hg.). 2008; AO principles of fracture management. 2. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme (AO publishing).
- Ruoslahti E. Integrins. *J Clin Invest*. 1991; 87:1–5.
- Saluk-Juszczak J, Wachowicz B. The proinflammatory activity of lipopolysaccharide. *Postepy Biochem*. 2005; 51:280–287.
- Santen S, Wang Y, Laschke MW, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. Rho-kinase signalling regulates CXC chemokine formation and leukocyte recruitment in colonic ischemia-reperfusion. *Int J Colorectal Dis*. 2010; 25:1063–1070.
- Saraste A. Morphologic criteria and detection of apoptosis. *Herz*. 1999; 24:189–195.
- Saumet JL, Dittmar A, Leftheriotis G. Non-invasive measurement of skin blood flow: comparison between plethysmography, laser-Doppler flowmeter and heat thermal clearance method. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1986; 5:73–83.
- Schaser KD, Stover JF, Melcher I, Lauffer A, Haas NP, Bail HJ, Stöckle U, Puhl G, Mittlmeier TW. Local cooling restores microcirculatory hemodynamics after closed soft-tissue trauma in rats. *J Trauma*. 2006; 61:642–649.
- Schaser KD, Vollmar B, Menger MD, Schewior L, Kroppenstedt SN, Raschke M, Lübke AS, Haas NP, Mittlmeier T. In vivo analysis of microcirculation following closed soft-tissue injury. *J Orthop Res*. 1999; 17:678–685.
- Schmalbruch H, Lewis DM. Dynamics of nuclei of muscle fibers and connective tissue cells in normal and denervated rat muscles. *Muscle Nerve*. 2000; 23:617–626.
- Schmidt RF (Hg.). 2007; Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie ; mit 77 Tabellen ; + IMPP-Fragen Physiologie online. Robert F. Schmidt (Hrsg.) ; Florian Lang (Hrsg.). 30. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch).
- Schramm R, Menger MD, Schaeffers H, Thorlacius H. Leukocyte adhesion in aorta and femoral artery in vivo is mediated by LFA-1. *Inflamm Res*. 2004; 53:523–527.
- Schramm R, Kirsch S, Schäfers H, Langer F, Scheuer C, Nickels R, Harder Y, Menger MD. Erythropoietin inhibits post-ischemic leukocyte adhesion but does not affect rejection in murine cardiac allografts. *J Heart Lung Transplant*. 2010; 29:1185–1192.
- Schreuder HA, Boer B de, Dijkema R, Mulders J, Theunissen HJ, Grootenhuis PD, Hol WG. The intact and cleaved human antithrombin III complex as a model for serpin-proteinase interactions. *Nat Struct Biol*. 1994; 1:48–54.
- Schumann RR, Leong SR, Flaggs GW, Gray PW, Wright SD, Mathison JC, Tobias PS, Ulevitch RJ. Structure and function of lipopolysaccharide binding protein. *Science*. 1990; 249:1429–1431.
- Schwabe P, Haas NP, Schaser KD. Extremitätenfrakturen mit schwerem offenem Weichteilschaden. Initiales Management und rekonstruktive Versorgungsstrategien. *Unfallchirurg*. 2010; 113:647-70.
- Seale P, Sabourin LA, Girgis-Gabardo A, Mansouri A, Gruss P, Rudnicki MA. Pax7 is required for the specification of myogenic satellite cells. *Cell*. 2000; 102:777–786.
- Sen O, Sonmez E, Cekinmez M, Ozen O, Caner H. Antithrombin III and enoxaparin treatment inhibit contusion-triggered cell death, inflammation, hemorrhage and apoptosis after severe traumatic brain injury in rats. *Turk Neurosurg*. 2011; 21:203–209.
- Shimomura A, Nomura R, Senda T. Lithium inhibits apoptosis of mouse neural progenitor cells. *Neuroreport*. 2003; 14:1779–1782.
- Shrier I, Magder S. Pressure-flow relationships in in vitro model of compartment syndrome. *J Appl Physiol*. 1995; 79:214–221.

- Smith CW. Endothelial adhesion molecules and their role in inflammation. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993; 71:76–87.
- Smith C, Kruger MJ, Smith RM, Myburgh KH. The inflammatory response to skeletal muscle injury: illuminating complexities. *Sports Med*. 2008; 38:947–969.
- Smith TL, Curl WW, Smith BP, Holden MB, Wise T, Marr A, Koman LA. New skeletal muscle model for the longitudinal study of alterations in microcirculation following contusion and cryotherapy. *Microsurgery*. 1993; 14:487–493.
- Smith-Erichsen N, Aasen AO, Gallimore MJ, Amundsen E. Studies of components of the coagulation systems in normal individuals and septic shock patients. *Circ Shock*. 1982; 9:491–497.
- Smolock AR, Mishra G, Eguchi K, Eguchi S, Scalia R. Protein kinase C upregulates intercellular adhesion molecule-1 and leukocyte-endothelium interactions in hyperglycemia via activation of endothelial expressed calpain. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 2011; 31:289–296.
- Song P, Wang N, Wang H, Xie Y, Jia J, Li H. Pentobarbital anesthesia alters neural responses in the precedence effect. *Neurosci Lett*. 2011; 498:72–77.
- Sorg H, Hoffmann JN, Menger MD, Lindenblatt N, Goehring P, Vollmar B. Antithrombin is as effective as heparin and hirudin to prevent formation of microvascular thrombosis in a murine model. *Thromb Haemost*. 2006; 96:371–377.
- Sorg H, Hoffmann JN, Rumbaut RE, Menger MD, Lindenblatt N, Vollmar B. Efficacy of antithrombin in the prevention of microvascular thrombosis during endotoxemia: an intravital microscopic study. *Thromb Res*. 2007; 121:241–248.
- Sorg H, Lorch B, Jaster R, Fitzner B, Ibrahim S, Holzhueter S, Nizze H, Vollmar B. Early rise in inflammation and microcirculatory disorder determine the development of autoimmune pancreatitis in the MRL/Mp-mouse. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2008; 295:1274–1280.
- Spooner CE, Markowitz NP, Saravolatz LD. The role of tumor necrosis factor in sepsis. *Clin Immunol Immunopathol*. 1992; 62:11–17.
- Stalp M, Koch C, Ruchholtz S, Regel G, Panzica M, Krettek C, Pape H. Standardized outcome evaluation after blunt multiple injuries by scoring systems: a clinical follow-up investigation 2 years after injury. *J Trauma*. 2002; 52:1160–1168.
- Stead N, Kaplan AP, Rosenberg RD. Inhibition of activated factor XII by antithrombin-heparin cofactor. *J Biol Chem*. 1976; 251:6481–6488.
- Stein DM, O'Toole R, Scalea TM. Multidisciplinary approach for patients with pelvic fractures and hemodynamic instability. *Scand J Surg*. 2007; 96:272–280.
- Steinbauer M, Harris AG, Leiderer R, Abels C, Messmer K. Impact of dextran on microvascular disturbances and tissue injury following ischemia/reperfusion in striated muscle. *Shock*. 1998; 9:345–351.
- Steinbauer M, Harris AG, Messmer K. Effects of dextran on microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle. *Am J Physiol*. 1997; 272:1710–1716.
- Stratos I, Li Z, Rotter R, Herlyn P, Mittlmeier T, Vollmar B. Inhibition of caspase mediated apoptosis restores muscle function after crush injury in rat skeletal muscle. *Apoptosis*. 2012; 17:269–277.
- Strohm PC, Bannasch H, Helwig P, Momeni A, Stark GB, Südkamp NP. Offene Fraktur und Weichteilschaden. *Z Orthop Unfall*. 2010; 148:95–111.
- Südkamp NP. 2008; Soft tissue injury: pathophysiology and its influence on fracture management. Evaluation/classification of closed and open injuries. In: Rüedi TP (Hg.): AO principles of fracture management. 2. Aufl. Stuttgart, New York, NY: Thieme (AO publishing).
- Szczesny G, Veihelmann A, Nolte D, Messmer K. Changes in the local blood and lymph microcirculation in response to direct mechanical trauma applied to leg: in vivo study in an animal model. *J Trauma*. 2001; 51:508–517.
- Takala TE, Virtanen P. Biochemical composition of muscle extracellular matrix: the effect of loading. *Scand J Med Sci Sports*. 2000; 10:321–325.

- Tanaka Y, Adams DH, Hubscher S, Hirano H, Siebenlist U, Shaw S. T-cell adhesion induced by proteoglycan-immobilized cytokine MIP-1 beta. *Nature*. 1993; 361:79–82.
- Taoka Y, Okajima K, Uchiba M. Antithrombin reduces compression-induced spinal cord injury in rats. *J Neurotrauma*. 2004; 21:1818–1830.
- Tartaglia LA, Ayres TM, Wong GH, Goeddel DV. A novel domain within the 55 kd TNF receptor signals cell death. *Cell*. 1993; 74:845–853.
- Taylor BS, Geller DA. Molecular regulation of the human inducible nitric oxide synthase (iNOS) gene. *Shock*. 2000; 13:413–424.
- Taylor FB, Emerson TE, Jordan R, Chang AK, Blick KE. Antithrombin-III prevents the lethal effects of *Escherichia coli* infusion in baboons. *Circ Shock*. 1988; 26:227–235.
- Toumi H, Best TM. The inflammatory response: friend or enemy for muscle injury? *Br J Sports Med*. 2003; 37:284–286.
- Triantaphyllopoulos DC. Effects of human antithrombin III on mortality and blood coagulation induced in rabbits by endotoxin. *Thromb Haemost*. 1984; 51:232–235.
- Tscherne H, Oestern HJ. Die Klassifizierung des Weichteilschadens bei offenen und geschlossenen Frakturen. *Unfallheilkunde*. 1982; 85:111–115.
- Tschoeke SK, Ertel W. Immunoparalysis after multiple trauma. *Injury*. 2007; 38:1346–1357.
- Tschoeke SK, Hellmuth M, Hostmann A, Ertel W, Oberholzer A. The early second hit in trauma management augments the proinflammatory immune response to multiple injuries. *J Trauma*. 2007; 62:1396–1403.
- Turner J, Belch JFF, Khan F. Current concepts in assessment of microvascular endothelial function using laser Doppler imaging and iontophoresis. *Trends Cardiovasc Med*. 2008; 18:109–116.
- Tymk K, Budreau CH. A new preparation of rat extensor digitorum longus muscle for intravital investigation of the microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp*. 1991; 10:335–343.
- Tymk K. Critical role for oxidative stress, platelets, and coagulation in capillary blood flow impairment in sepsis. *Microcirculation*. 2011; 18:152–162.
- Uchiba M, Okajima K, Murakami K. Effects of various doses of antithrombin III on endotoxin-induced endothelial cell injury and coagulation abnormalities in rats. *Thromb Res*. 1998; 89:233–241.
- van den Buuse M. Circadian rhythms of blood pressure and heart rate in conscious rats: effects of light cycle shift and timed feeding. *Physiol Behav*. 1999; 68:9–15.
- Vervloet MG, Thijs LG, Hack CE. Derangements of coagulation and fibrinolysis in critically ill patients with sepsis and septic shock. *Semin Thromb Hemost*. 1998; 24:33–44.
- Vincent J, Backer D de. Microvascular dysfunction as a cause of organ dysfunction in severe sepsis. *Crit Care*. 2005; 9:S9–12.
- Vollmar B, Burkhardt M, Minor T, Klauke H, Menger MD. High-resolution microscopic determination of hepatic NADH fluorescence for in vivo monitoring of tissue oxygenation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Microvasc Res*. 1997; 54:164–173.
- Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K. Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart. *Anesth Analg*. 1995; 80:249–255.
- Vollmar B, Conzen PF, Kerner T, Habazettl H, Vierl M, Waldner H, Peter K. Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg*. 1992; 75:421–430.
- Vollmar B, Preissler G, Menger MD. Hemorrhagic hypotension induces arteriolar vasomotion and intermittent capillary perfusion in rat pancreas. *Am J Physiol*. 1994; 267:1936–1940.
- Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev*. 2009; 89:1269–1339.
- Voss R, Matthias FR, Borkowski G, Reitz D. Activation and inhibition of fibrinolysis in septic patients in an internal intensive care unit. *Br J Haematol*. 1990; 75:99–105.

- Wanecek M, Weitzberg E, Rudehill A, Oldner A. The endothelin system in septic and endotoxin shock. *Eur J Pharmacol.* 2000; 407:1–15.
- Wang WZ, Fang X, Stephenson LL, Zhang X, Williams SJ, Baynosa RC, Khiabani KT, Zamboni WA. Nitrite attenuates ischemia-reperfusion-induced microcirculatory alterations and mitochondrial dysfunction in the microvasculature of skeletal muscle. *Plast Reconstr Surg.* 2011; 128:279–287.
- Warren BL, Eid A, Singer P, Pillay SS, Carl P, Novak I, Chalupa P, Atherstone A, Péntzes I, Kübler A, Knaub S, Keinecke HO, Heinrichs H, Schindel F, Juers M, Bone RC, Opal SM. Caring for the critically ill patient. High-dose antithrombin III in severe sepsis: a randomized controlled trial. *JAMA.* 2001; 286:1869–1878.
- Waynforth HB, Flecknell PA. 1992; *Experimental and Surgical Techniques in the Rat*: Elsevier Science & Technology.
- Welbourn CR, Young Y. Endotoxin, septic shock and acute lung injury: neutrophils, macrophages and inflammatory mediators. *Br J Surg.* 1992; 79:998–1003.
- Westenberg IS, Bolam JM. Duration of response to pentobarbital of female vs male albino and pigmented rats. *Pharmacol Biochem Behav.* 1982; 16:815–818.
- Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD. Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leukocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery.* 1999; 126:881–889.
- Wick M, Ekkernkamp A, Muhr G. The epidemiology of multiple trauma. *Chirurg.* 1997; 68:1053–1058.
- Wiedermann CJ, Hoffmann JN, Juers M, Ostermann H, Kienast J, Briegel J, Strauss R, Keinecke H, Warren BL, Opal SM. High-dose antithrombin III in the treatment of severe sepsis in patients with a high risk of death: efficacy and safety. *Crit Care Med.* 2006; 34:285–292.
- Wilson RF, Farag A, Mammen EF, Fujii Y. Sepsis and antithrombin III, prekallikrein, and fibronectin levels in surgical patients. *Am Surg.* 1989; 55:450–456.
- Wilson RF, Mammen EF, Tyburski JG, Warsaw KM, Kubinec SM. Antithrombin levels related to infections and outcome. *J Trauma.* 1996; 40:384–387.
- Wort SJ, Evans TW. The role of the endothelium in modulating vascular control in sepsis and related conditions. *Br Med Bull.* 1999; 55:30–48.
- Wright SD, Ramos RA, Tobias PS, Ulevitch RJ, Mathison JC. CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science.* 1990; 249:1431–1433.
- Yamauchi T, Umeda F, Inoguchi T, Nawata H. Antithrombin III stimulates prostacyclin production by cultured aortic endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1989; 163:1404–1411.
- Yang Z, Zeng Q, Ma Z, Wang Y, Xu X. Tracking dynamics of muscle engraftment in small animals by in vivo fluorescent imaging. *J Vis Exp.* 2009; 981:6–7.
- Yoshikawa T, Furukawa Y, Murakami M, Takemura S, Kondo M. Experimental model of disseminated intravascular coagulation induced by sustained infusion of endotoxin. *Res Exp Med.* 1981; 179:223–228.
- Yu M, Nardella A, Pechet L. Screening tests of disseminated intravascular coagulation: guidelines for rapid and specific laboratory diagnosis. *Crit Care Med.* 2000; 28:1777–1780.
- Zambricki EA, Dalecy LG. Rat sex differences in anesthesia. *Comp Med.* 2004; 54:49–53.
- Zelle BA, Brown SR, Panzica M, Lohse R, Sittaro NA, Krettek C, Pape HC. The impact of injuries below the knee joint on the long-term functional outcome following polytrauma. *Injury.* 2005; 36:169–177.
- Zhang L, Bail H, Mittlmeier T, Haas NP, Schaser K. Immediate microcirculatory derangements in skeletal muscle and periosteum after closed tibial fracture. *J Trauma.* 2003; 54:979–985.
- Zhou J, Schmidt M, Johnston B, Wilfart F, Whynot S, Hung O, Murphy M, Cerný V, Pavlovic D, Lehmann C. Experimental endotoxemia induces leukocyte adherence and plasma extravasation within the rat pial microcirculation. *Physiol Res.* 2011; 60:853–859.

Zijlstra WG, Buursma A, Meeuwse-van der Roest WP. Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin. *Clin Chem.* 1991; 37:1633–1638.

Zimiani K, Guarnier FA, Miranda HC, Watanabe MAE, Cecchini R. Nitric oxide mediated oxidative stress injury in rat skeletal muscle subjected to ischemia/reperfusion as evaluated by chemiluminescence. *Nitric Oxide.* 2005; 13:196–203.

Zimmerman GA, Prescott SM, McIntyre TM. Endothelial cell interactions with granulocytes: tethering and signaling molecules. *Immunol Today.* 1992; 13:93–100.

Zimmermann B. Neue Wege in der konfokalen Multifluoreszenzmikroskopie. Emission Fingerprinting mit dem LSM 510 META. *BIOforum Forschung & Entwicklung.* 2002; Sonderheft Zellbiologie *spezial*:40–42.

Zwissler B, Schosser R, Weiss C, Iber V, Weiss M, Schwickert C, Spengler P, Messmer K. Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med.* 1991; 191:47–63.



## 9 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: Schematische Darstellung der hierarchischen Organisation im Bauplan der Skelettmuskulatur. Gezeigt sind die drei Bindegewebsblätter in ihrer anatomischen Anordnung. In der Muskelfaser liegen die Myofibrillen. Muskelfasern werden zu Muskelfaserbündeln zusammengefasst, deren Gesamtheit den Skelettmuskel bildet. Quelle: modifiziert nach Schmidt & Lang 2007; Physiologie des Menschen. Mit Pathophysiologie. 30. Aufl. Heidelberg: Springer (Springer-Lehrbuch). ..... 6

Abb. 2: Schematische Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Nach Selektin-vermitteltem „Capture“ von Leukozyten aus dem Blutfluss erfolgt deren Chemokin-vermittelte Aktivierung. Das Rolling entlang des Endothels erfolgt durch Selektine. In der Folge kommt es über die Wirkung von  $\beta_2$ -Integrinen auf Leukozyten und deren Interaktion mit ICAM-1 auf dem Endothel zum Arrest und zur festen Adhäsion am Endothel. Zuletzt findet die trans- oder parazelluläre Transmigration in das umliegende Gewebe statt. Die an den jeweiligen Prozessen beteiligten Schlüssel-moleküle sind in den entsprechenden Kästen angegeben. ESAM (endothelial cell-selective adhesion molecule), ICAM1 (intercellular adhesion molecule 1), JAM (junctional adhesion molecule), LFA1 (lymphocyte function-associated antigen 1), MAC1 (macrophage antigen 1), MADCAM1 (mucosal vascular addressin cell-adhesion molecule 1), PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand 1), PECAM1 (platelet/endothelial-cell adhesion molecule 1), PI3K (Phosphoinositid-3-Kinase), VCAM1 (vascular cell-adhesion molecule 1), VLA4 (very late antigen 4). Quelle: Ley et al. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. Nat. Rev. Immunol. 2007;7:678–689. .... 11

Abb. 3: Entzündungsmodulierende Wirkung von ATIII am Endothel. Die Bindung von ATIII an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) induziert zelluläre Signalwege, die ihrerseits biochemische und funktionelle Reaktionen auf entzündliche Reize, z.B. bakterielle Lipopolysaccharide (LPS), modifizieren. Diese Modifikationen umfassen eine verminderte Freisetzung von Entzündungs- und prokoagulatorischen Mediatoren (z.B. IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ , tissue factor (TF), Adenosindiphosphat (ADP) und zellulären Adhäsionsmolekülen (AM)) sowie eine vermehrte Freisetzung von antikoagulatorischem Prostazyklin und CD36 (Glykoprotein IIIb). Quelle: modifiziert nach Wiedermann. Clinical review: molecular mechanisms underlying the role of antithrombin in sepsis. Crit Care. 2006;10:209. .... 18

Abb. 4: Platzierung der narkotisierten Ratte im „Controlled impact device“ zur Applikation des schweren geschlossenen Weichteiltraumas. A: Das Tier liegt auf der Auflagefläche. Der linke Hinterlauf ist mit Pflasterstreifen in der Kunststoffschale fixiert. B: Nahaufnahme des fixierten linken Hinterlaufs der Ratte. Die Lokalisation des Traumas ist farblich markiert und der Schlagbolzen über ein Gewinde auf die vorgesehene Eindringtiefe eingestellt worden. .... 22

Abb. 5: Originalaufnahmen des Aufbaus der Schlagvorrichtung (A; „Controlled impact device“) und deren Steuerelemente (B). A: „Controlled impact device“ mit Schlagbolzen, Druckluftanschluss und manuellem Auslöser. Am hinteren Ende der Auflagefläche ist die an die Form des linken Hinterlaufs der Ratte angepasste Kunststoffschale zu sehen; B: computergesteuerte Schnittstelle. .... 23

Abb. 6: Mikrochirurgische Präparation der Ratte. A: Originalaufnahme der narkotisierten Ratte nach erfolgter Präparation der Halsregion mit Tracheotomie und liegender Kanüle zur späteren maschinellen Beatmung sowie nach Katheterisierung der rechten A. carotis communis. B: Skizze der Präparation des M. extensor digitorum longus sinister. C: Originalaufnahme des präparierten M. extensor digitorum longus sinister nach Retraktion des M. soleus mithilfe einer Haltenaht. .... 25

Abb. 7: Originalaufnahmen des Versuchsaufbaus vor Durchführung der Intravitalmikroskopie. A: Das Versuchstier liegt in physiologischer Neutralstellung der Gelenke in Bauchlage auf einer Wärmeplatte vor dem Mikroskop. Der linke Hinterlauf ist auf einer gefalteten Mullkompressen gelagert. Retraktionszügel helfen bei der Darstellung des zu mikroskopierenden Muskels. Das Wundgebiet ist mit physiologischer Kochsalzlösung benetzt worden und von einem Deckglas bedeckt. Neben den Beatmungsschläuchen ist der arterielle Zugang mit 3-Wege-Hahn und einer aufgesetzten Spritze zu erkennen (Pfeil). B: Detailreichere Darstellung des präparierten linken Hinterlaufes und der benutzten Objektiv. .... 26

Abb. 8: Schematische Darstellung der experimentellen Gruppen. Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als

Therapie). In der statistischen Auswertung wurden alle Gruppen mit K verglichen, weiterhin wurden die Gruppen T und T/Th sowie T/E und T/E/Th miteinander verglichen. .... 27

Abb. 9: Schematische Darstellung des zeitlichen Versuchsablaufs. Zum Zeitpunkt 0 erfolgte die geschlossene Weichteiltraumatisierung, nach sechs Stunden die intraperitoneale Applikation von Endotoxin (LPS) und die intravenöse Injektion von Antithrombin III (ATIII). 24 Stunden nach Trauma wurden die mikrochirurgische Muskelpräparation und intravitalmikroskopische Untersuchung (IVM) des traumatisierten M. extensor digitorum longus durchgeführt. .... 28

Abb. 10: Schematische Darstellung der Stokes-Verschiebung (Stokes-shift), welche als die Differenz zwischen Anregungs- und Abstrahlungswellenlänge bezeichnet wird. .... 30

Abb. 11: Schematische Darstellung des prinzipiellen Aufbaus eines Auflichtfluoreszenzmikroskops mit seiner typischen Spiegel- und Filteranordnung. .... 31

Abb. 12: Schematische Darstellung des Aufbaus der zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie notwendigen Apparaturen. Die Anordnung umfasst das Mikroskop mit einer CCD-Kamera, die über einen Echtzeitgenerator (EZG) mit einem Monitor und einen Videorekorder (VR) zur Aufzeichnung der Untersuchungsergebnisse für die spätere Offline-Auswertung gekoppelt ist. .... 33

Abb. 13: Quantitative Analyse der funktionellen Kapillardichte (A) und der NADH Autofluoreszenz (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K, #  $p < 0.05$  vs. T, §  $p < 0.05$  vs. T/E..... 43

Abb. 14: Regressionsanalyse zwischen den Werten der funktionellen Kapillardichte und der NADH Autofluoreszenz; Lineare Funktion  $y = -0,08x + 102$ ,  $r = 0,51$ ,  $p < 0,05$ . .... 44

Abb. 15: Quantitative Analyse des Gesamtleukozytenfluxes (A) und des Anteils rollender Leukozyten (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K..... 45

Abb. 16: Quantitative Analyse der permanent adhärenenten Leukozyten (A) und repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen aus den Untersuchungsgruppen T/E (B) und T/E/Th (C). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K, #  $p < 0.05$  vs. T, §  $p < 0.05$  vs. T/E..... 46

Abb. 17: Quantitative Analyse der Gefäßpermeabilität anhand der Extravasation von FITC-Dextran (A) und repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen aus den Untersuchungsgruppen T/E (B) und T/E/Th (C). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K, #  $p < 0.05$  vs. T, t-Test: §  $p < 0.05$  vs. T/E. .... 47

Abb. 18: Quantitative Analyse apoptotischer Zellen (A) und repräsentative intravitalmikroskopische Abbildungen aus den Untersuchungsgruppen T/E (B) und T/E/Th (C). Der Pfeil (B) markiert einen apoptotischen Zellkern mit typischer intensiver Fluoreszenz. Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist aufgrund fehlender Normalverteilung der Median (25. Perzentile/75.Perzentile), Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Post-Hoc Vergleich, Dunn's Test: \*  $p < 0.05$  vs. K. .... 49

Abb. 19: Quantitative Analyse systemischer Thrombozyten- (A) und Leukozytenzahlen (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K..... 51

Abb. 20: Quantitative Analyse der partiellen Thromboplastinzeit (PTT) (A) und der systemischen Fibrinogenkonzentrationen (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne

Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). A: Angegeben ist aufgrund fehlender Normalverteilung der Median (25. Perzentile/75.Perzentile), Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Post-Hoc Vergleich, t-Test: # p=0,003 vs. T); B: Angegeben ist der Mittelwert ± SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \* p<0.05 vs. K, # p<0.05 vs. T..... 53

Abb. 21: Quantitative Analyse von extravasierten Leukozyten im Muskelgewebe (A) und repräsentative histologische Abbildungen aus den Untersuchungsgruppen T/E (B) und T/E/Th (C). Die Pfeile (B und C) markieren quantitativ erfasste Leukozyten im Muskelgewebe. Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist aufgrund fehlender Normalverteilung der Median (25. Perzentile/75.Perzentile), Kruskal-Wallis ANOVA on Ranks, Post-Hoc Vergleich, Tukey-Test: \* p<0.05 vs. K..... 55

Abb. 22: Quantitative Analyse apoptotischer Zellen (A) und der Ratio aus muskulärem Feucht- und Trockengewicht (B). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert ± SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, t-Test: § p<0,05 vs. T/E. .... 56

## 10 TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: Quantitative Analyse des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) und der Herzfrequenz (HF). Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben sind der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test : \*  $p < 0.05$  vs. K. .... 42

Tab. 2: Quantitative Analyse der kapillaren und venulären Gefäßdurchmesser und der Erythrozytenfließgeschwindigkeit. Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist der Mittelwert  $\pm$  SEM..... 48

Tab. 3: Quantitative Analyse von Blutgasanalyseparametern und Elektrolyten. Dargestellt sind die Versuchsgruppen K (Kontrolle: Kontrolltiere ohne Intervention), T (Trauma), T/E (Trauma und Endotoxinämie), T/Th (Trauma und ATIII als Therapie), T/E/Th (Trauma, Endotoxinämie und ATIII als Therapie). Angegeben ist im Falle fehlender Normalverteilung der Median (25. Perzentile/75.Perzentile), ansonsten der Mittelwert  $\pm$  SEM, ANOVA, Post-Hoc Vergleich, Holm-Sidak-Test: \*  $p < 0.05$  vs. K..... 50

## **11 LEBENS LAUF**



## 12 DANKSAGUNG

An dieser Stelle möchte ich einigen lieben Menschen meinen herzlichen Dank für die Hilfe bei der Erstellung der vorliegenden Arbeit aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Brigitte Vollmar, der Leiterin des Institutes für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock, in dessen Räumlichkeiten ich meine Experimente durchführen und die Dissertation, unter Inanspruchnahme unzähliger Hilfestellungen und Ermutigungen, verfassen durfte.

Weiterhin danke ich sehr PD Dr. med. Philip Gierer, meinem Betreuer aus der Abteilung für Unfall- und Wiederherstellungschirurgie der Universitätsklinik Rostock, der mir als wissenschaftlicher Mentor stets erster Ansprechpartner war.

Ich bedanke mich für eine gute Betreuung und die ständige Hilfsbereitschaft bei vielen Fragen, die sich mir während der Bearbeitung des Themas stellten. Durch Kritik und Ermutigung zu Eigeninitiative haben meine beiden wichtigsten Begleiter meine Motivation sowie mein wissenschaftliches Interesse gestärkt und außerordentlich gefördert. Das Institut für Experimentelle Chirurgie der Universität Rostock bot mir in seinen Räumlichkeiten mit seiner guten Ausstattung und seinen Mitarbeitern optimale Arbeitsbedingungen in einem Umfeld, das ich mir für den Einstieg in die wissenschaftliche Arbeit nicht besser hätte vorstellen können. Ich bedanke mich bei allen Institutsmitarbeitern, insbesondere den Medizinisch Technischen Assistentinnen Berit Blendow, Doris Butzlaff und Dorothea Frenz, für die unermüdliche und stets freundliche Hilfe rund um die vorliegende Arbeit. Den Tierpflegern der Zentralen Versuchstierhaltung danke ich sehr für die Aufzucht und Betreuung der für diese Arbeit notwendigen Tiere.

Für die langjährige Begleitung und großes Interesse an der Entstehung meiner Arbeit bedanke ich mich bei meiner Mitdotorandin Julia Röther - mit der ich lange das Labor teilen durfte - und bei meinen Kommilitonen Leon Müller und Mirko Rehberg.

Sehr danke ich meiner Familie, meinen Eltern und meinem Bruder Dominik Laue.

Zuletzt möchte ich mich bei meiner liebsten Verena Lemke für ihre Geduld und Unterstützung, immer neue ermutigende Worte, viele Korrekturen und Hilfestellungen bedanken.

## THESEN ZUR DISSERTATION

### Thema:

### **Der Einfluss von Antithrombin III auf das geschlossene Weichteiltrauma bei Endotoxinämie**

1. Bei einem Großteil traumatischer Verletzungen im Sport- und Freizeitbereich sowie bei Arbeits- und Verkehrsunfällen ist die Skelettmuskulatur beteiligt.
2. Die Schwere der Weichteilbeteiligung ist bei Extremitätenverletzungen von besonderer prognostischer Bedeutung.
3. Der traumatische Muskelschaden geht von einer akuten Störung der Gewebeategrität aus und führt auf zellulärer Ebene zu einer Vielzahl pathologischer Reaktionen, aus denen die Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren resultiert.
4. An der initialen, unspezifischen Immunantwort sind in erster Linie rasch rekrutierbare neutrophile Granulozyten beteiligt, durch deren Degranulationsprodukte die beginnende Entzündungsreaktion zusätzlich verstärkt wird.
5. Die resultierende Trias aus vaskulärem Endothelzellschaden, Leukozytenakkumulation und Mikrozirkulationsstörung führt nach Muskeltrauma schließlich zu Apoptose und Nekrose von Parenchymzellen und zur Exazerbation des traumatisch bedingten Weichteilschadens.
6. Ein koordinierter Heilungsverlauf mit entsprechender Balance zwischen Bindegewebs- und Muskelzellregeneration ist entscheidend für die funktionell optimale Wiederherstellung von Muskelarchitektur und -funktion.
7. Das Ziel der Therapieoptimierung nach Muskeltrauma ist folglich die Förderung der Muskelzellregeneration bei möglichst geringer Gewebefibrosierung.
8. Die Therapie des geschlossenen Weichteiltraumas wurde lange ausschließlich symptomatisch durchgeführt und bestand aus den Komponenten Immobilisation, Kryotherapie, Kompression und Hochlagerung.
9. Ergänzend werden heute antiinflammatorische Therapiestrategien diskutiert, um den Circulus vitiosus aus Inflammation und daraus resultierenden Sekundärfolgen kausal zu unterbrechen.



10. ATIII ist ein Plasmaglykoprotein aus der Familie der Serpine, das sowohl gerinnungsmodulierende als auch anti-inflammatorische Wirkungen aufweist.
11. Die anti-inflammatorische Wirkung von ATIII wird in erster Linie über die Induktion der endothelialen Prostazyklinproduktion nach Interaktion mit endothelzellständigen Heparansulfatproteoglykanen erklärt.
12. Hieraus resultiert eine Verringerung der lokalen Leukozyten-Endothelzell-Interaktion mit Reduktion inflammatorisch bedingter Gewebeschädigungen.
13. ATIII wurde experimentell in der Therapie verschiedener entzündlicher Krankheitsbilder an Darm, Pankreas, Leber, Gefäßsystem, ZNS und anderen Organen erfolgreich eingesetzt.
14. Es wurden teils ausgeprägte anti-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkungen beschrieben.
15. Die pleiotrope anti-inflammatorische Wirkung von ATIII nach experimentellem geschlossenem Weichteiltrauma und Endotoxinämie als „second hit“ wurde bislang nicht analysiert.
16. Mittels hochauflösender intravitale Multifluoreszenzmikroskopie, histologischer Untersuchungen und laborchemischer Parameter wurden erstmals traumatisch, inflammatorisch und durch ATIII therapeutisch bedingte Veränderungen an der Skelettmuskulatur der Ratte untersucht.
17. Intravitale mikroskopische Untersuchungen demonstrierten lokale perfusionsverbessernde, anti-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkungen von ATIII im entzündlichen peripheren Skelettmuskel.
18. ATIII verbesserte die nutritive Blutversorgung und Gewebeoxygenierung im Skelettmuskel nach Trauma und Endotoxinämie signifikant.
19. Bezogen auf die lokale Leukozyten-Endothelzell-Interaktion zeigte ATIII eine signifikante antiadhäsive Wirkung.
20. In der histochemischen Untersuchung des leukozytären Entzündungsgeschehens zeigte sich, dass ATIII eine Art Kontrolle einer überschießenden Entzündung durch Leukozyten nach Trauma und Endotoxinämie hatte.
21. ATIII reduzierte die traumatisch und endotoxinämisch signifikant erhöhte Gefäßpermeabilität und das resultierende Weichteilödem signifikant.

22. Fluoreszenzmikroskopische und histochemische Untersuchungen zeigten eine deutliche Reduktion der nach Trauma und Endotoxinämie gesteigerten Apoptoserate unter ATIII-Einfluss.
23. Nach schwerem Muskeltrauma und Endotoxinämie hatte die ATIII-Therapie durchgehend positive Wirkungen auf die untersuchten Parameter.
24. Die Endotoxinämie stellte keine Kontraindikation für die antiinflammatorische Anwendung nach Trauma dar.
25. Nach ATIII-Therapie bestanden während der Muskelpräparation keine gesteigerte Blutungsneigung oder andere Nebenwirkungen.
26. Bei angenommener Übertragbarkeit der Studienergebnisse in die klinische Patientenversorgung ist mittelfristig ein therapeutischer Einsatz von ATIII in der Versorgung des schweren Muskeltraumas, z.B. bei erhöhtem Risiko für einen entzündlichen „second hit“, überlegenswert.
27. ATIII ist ein bekanntes, langjährig im Rahmen von Gerinnungsstörungen verwendetes Medikament, das eine vielversprechende, kausale therapeutische Option zur Verbesserung der posttraumatischen Skelettmuskelheilung darstellen könnte.

## EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

Ich, Fabian Laue, geboren am 23.09.1980 in Bad Oldesloe, erkläre an Eides statt, dass die vorliegende Dissertation:

**„Der Einfluss von Antithrombin III auf das geschlossene Weichteiltrauma bei Endotoxinämie“**

von mir selbständig 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.

Rostock, Mai 2012

Fabian Laue

