

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik - Großhadern
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. K.W. Jauch)

**L-Arginin verbessert die
Wundheilung nach
traumatisch-hämorrhagischem Schock**

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Florian Wittmann

aus
München

2006

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: PD Dr. med. M.K. Angele

Mitberichterstatter: Prof. Dr. F. X. Beck

Prof. Dr. Dr. h.c. mult. K. Meßmer

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. med. M.K. Angele

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Juli 2006

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG	5
1.1 Einfluss von Trauma und Schock auf die zellvermittelte Immunantwort.....	5
1.2 Trauma, Blutverlust und Schock führen zu einer erhöhten Inzidenz von Wundinfektionen und Wundheilungsstörungen.....	7
1.3 Effekt von L-Arginin nach Trauma, Blutverlust und Schock	9
1.4 Fragestellung	10
2. HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG.....	11
2.1 L-Arginin verbessert die Hydroxyprolinsynthese nach Trauma und Schock	11
2.2 L-Arginin verbessert die Kollagen I und III sowie die TGF- β Synthese nach Trauma und Schock	11
2.3 L-Arginin verbessert die Wundreißfestigkeit nach Trauma und Schock	11
3. MATERIAL UND METHODEN	12
3.1 Verwendete Tiere	12
3.2 Versuchsgruppen	12
3.3 Traumatisch-hämorrhagisches Schockmodell.....	13
3.3.1 Weichteiltrauma, Laparotomie und Schwämmchenimplantation	13
3.3.2 Durchführung des hämorrhagischen Schocks	14
3.3.3 Durchführung der Kontrolloperation.....	16
3.3.4 L-Arginin Administration.....	16
3.3.5 Zeitpunkte der Probengewinnung	16
3.4 Probengewinnung.....	17
3.4.1 Gewinnung der Wundflüssigkeit.....	17
3.4.2 Gewinnung des Wundgewebes	18
3.5 Bestimmung der Versuchsparameter	18
3.5.1 Hydroxyprolinbestimmung	18
3.5.2 Kollagen I und III sowie TGF- β Bestimmung	18
3.5.3 Reißfestigkeit der Wundhaut.....	20

4. ERGEBNISSE	22
4.1 Körpergewicht der Tiere	22
4.2 Hydroxyprolin in der Wundflüssigkeit	22
4.3 TGF- β in der Wunde	23
4.4 Kollagen I und III in der Wunde	25
4.5 Reißfestigkeit der Wunde.....	28
5. DISKUSSION	31
5.1 Störung der Wundheilung nach Trauma und hämorrhagischem Schock	31
5.2 Relevanz des verwendeten Tiermodells	32
5.3 Relevanz der bestimmten Parameter und verwendeten Methoden	33
5.3.1 Gewicht der Tiere im Versuchsverlauf	33
5.3.2 Hydroxyprolin, Kollagen I und III Bestimmung.....	34
5.3.3 TGF- β Bestimmung.....	35
5.3.4 Reißfestigkeit der Wunde.....	37
5.3.5 Grenzen der Studie	38
5.4 Mögliche Mechanismen und Effekte von L-Arginin	38
5.4.1 L-Arginin als Substrat der Stickstoffmonoxidsynthesen.....	38
5.4.2 Potentielle Mechanismen von L-Arginin	40
5.5 Klinische Relevanz.....	41
6. ZUSAMMENFASSUNG	43
7. LITERATURVERZEICHNIS	44
8. DANKSAGUNG	59
9. TABELLARISCHER LEBENS LAUF	60

ABBKÜRZUNGSVERZEICHNIS

Abb.....	Abbildung
ACD.....	Arginin-Decarboxylase
bzw.....	beziehungsweise
cm.....	Zentimeter
CO ₂	Kohlendioxid
°C.....	Grad Celsius
DNA.....	Desoxyribonukleinsäure
ECM.....	extrazelluläre Matrix
EDRF.....	endothelium-derived relaxing factor
EGF.....	epidermal growth factor
et al.....	et altera
g.....	Gramm
häm.....	hämorrhagischer Schock
IgA.....	Immunglobulin A
IgG.....	Immunglobulin G
IgM.....	Immunglobulin M
i.v.....	intravenös
IL-1,-2,-3,-6,-10.....	Interleukin-1,-2,-3,-6,-10
kg.....	Kilogramm
l.....	Liter
M.....	Molar
MODS.....	Multi-Organ-Dysfunction-Syndrom
MOV.....	Multiorganversagen
µl.....	Mikroliter
min.....	Minute
ml.....	Milliliter
mmHg.....	Millimeter Quecksilbersäule
NaCl.....	Natriumchlorid
NO.....	Stickstoffmonoxid
NOS.....	Stickstoffmonoxidsynthase
eNOS.....	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
iNOS.....	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
OHP.....	Hydroxyproline
Pro.....	Prolin
PDGF.....	platelet derived growth factor
RNA.....	Ribonukleinsäure
sek.....	Sekunden

SEM.....	Standard Error of the Mean (Standardfehler)
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
Std.....	Stunde
Tab.....	Tabelle
T-H	traumatisch-hämorrhagischer Schock
TNF	tumour-necrosis-factor
TGF- β	transforming growth factor- β
U	Unit
vgl.....	vergleiche
Vol.....	Volumen
z.B	zum Beispiel

1. EINLEITUNG

1.1 Einfluss von Trauma und Schock auf die zellvermittelte Immunantwort

Der traumatisch-hämorrhagische Schock mit entsprechenden metabolischen Veränderungen und einer damit verbundenen Unterdrückung der Immunantwort ist gegenwärtig eine der häufigste Todesursachen junger Menschen in der westlichen Welt[4;18;31;40;49;100;118;124]. Trotz der in den letzten Jahrzehnten erfolgten großen Fortschritte im Bereich der diagnostischen Möglichkeiten, der Anwendung modernster operativer Versorgung sowie neuer Erkenntnisse auf dem Gebiet der intensivmedizinischen Therapie sind die Komplikations- und Letalitätsraten immer noch relativ hoch. Einen beträchtlichen Anteil an diesen Komplikationen stellen nicht oder schlecht heilende Wundverhältnisse dar. Dies gilt vor allem für polytraumatisierte Patienten sowie für Patienten nach großen chirurgischen Eingriffen mit hohem Blutverlust[23;27;41;48;54;59;66] (Abb. 1).

Abb. 1

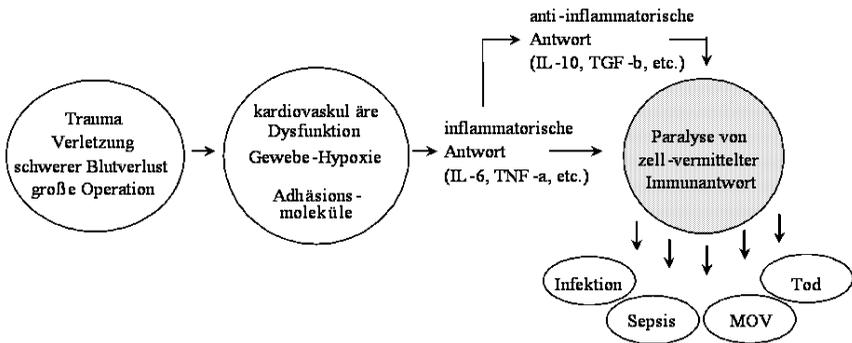


Abb. 1: Schematische Darstellung der Folgen von schweren Verletzungen und großen chirurgischen Eingriffen, die bis hin zum Tod reichen können.

Ausgehend von einer physikalischen, chemischen oder thermischen Verletzung entsteht zunächst eine lokal begrenzte, nicht-bakterielle Entzündungsreaktion am Ort der Integritätsverletzung. Durch diese primär lokale Freisetzung von Entzündungsmediatoren wird über verschiedene Wechselwirkungen mit reaktionsfähigen Zellsystemen ein Reparaturprozess am Ort der Schädigung induziert[26]. Im Rahmen schwerer Weichteilschäden, Operationen oder Infektionen können die Entzündungsmediatoren jedoch

systemisch in die Zirkulation eingeschwemmt werden[110].

Insbesondere die Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-1, IL-6 und TNF- α scheint in der Frühphase nach Trauma bzw. großen chirurgischen Eingriffen eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der Entzündungskaskade zu spielen. Im Plasma ist anfangs eine vorübergehende Zunahme der TNF- α -Konzentration nachzuweisen, gefolgt von einem Anstieg der IL-1 β und IL-6 Spiegel[110]. Diese Zytokine führen sowohl zur Produktion als auch zur Hemmung anderer Zytokine und Mediatoren, die ihrerseits an der Aufrechterhaltung der entzündlichen Reaktion beteiligt sind. Es konnte bereits gezeigt werden, dass bis zum dritten posttraumatischen Tag nach hämorrhagischem Schock eine Unterdrückung der Wundimmunzellfunktion dominiert[8]. Diese Anergie der Wundimmunzellen in den ersten Tagen nach Schock wird abgelöst durch eine massive inflammatorische Reaktion der Wunde am fünften postoperativen Tag[6;7]. *In vitro* zeigte sich, dass die Konzentration von IL-1 β und IL-6 in der Wundflüssigkeit und in Zellüberständen nach Kultivierung von Wundimmunzellen ohne Zusatz von Stimulanzen am fünften postoperativen Tag nach Blutverlust im Vergleich zu Kontrolltieren signifikant erhöht war[6;7]. Im Gegensatz dazu war die Ausschüttung des antiinflammatorischen Zytokins TGF- β vermindert[6;7]. Nachdem erhöhte Mengen an proinflammatorischen Zytokinen[6;7;8] und erniedrigte Konzentrationen an TGF- β [69;70;121;125] zu einer Verschlechterung der Wundheilung führen, erscheint die Störung der Wundimmunzellfunktion für die verminderte Kollagenanreicherung im Wundgebiet und somit für die Verringerung der Reißfestigkeit und Stabilität der Wunde nach hämorrhagischem Schock verantwortlich zu sein[6;7].

In einer Reihe von klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass kontinuierlich erhöhte Konzentrationen der proinflammatorischen Zytokine im Plasma in Folge eines septischen Schocks, sowie nach Verbrennungen, Trauma und großen operativen Eingriffen mit höheren Mortalitätsraten im weiteren Verlauf der Erkrankung verbunden sind und dessen Plasmaspiegel als prognostische Marker bei diesen Patienten herangezogen werden können[38;45;90;127]. Diese entzündliche Reaktion nach Trauma und Blutverlust hat neben anderen pathophysiologischen Veränderungen eine Störung der spezifischen Immunantwort zur Folge, die mit einer erhöhten Infektions- und Mortalitätsrate einhergeht[82] und bis zum generalisierten Entzündungssyndrom (SIRS) reichen kann[74;82;110].

Der dadurch verursachte Endothelschaden führt über die Expression endothelialer Adhäsionsrezeptoren zur Leukozyten-Endothelinteraktion[91], die eine Neutrophileninfiltration als initialen pathophysiologischen Mechanismus nach sich zieht. Vasoaktive Mediatoren führen zu einer erhöhten Kapillarpermeabilität und erleichtern die Invasion von

Granulozyten[30]. Über diese Adhäsion und Transmigration aktivierter Granulozyten in das Gewebe, die primär der Ausgrenzung zerstörten Gewebes des selbigen dienen sollen[30], können sich, wenn sie diese physiologische Schutz- und Reparationsfunktion übersteigen, ursächlich Membran- und Gewebeschäden verstärken und damit die Entzündungsreaktion vorantreiben und ein Organversagen bedingen[91]. Die Neutrophileninfiltration führt ihrerseits selbst zu inflammatorischen Reaktionen und über eine erneute proinflammatorische Zytokinsekretion zu einem *circulus vitiosus*.

Eine ebenfalls, sehr weittragende Komplikation des traumatisch-hämorrhagischen Schocks stellt die Minderperfusion des betroffenen Gewebes dar. So können verschiedene Mechanismen, wie z.B. Permeabilitäts- oder Mikrozirkulationsstörungen, zur Entwicklung eines Multiorganversagens beitragen[113]. Wang et al. zeigte, dass der hämorrhagische Schock zu Mikrozirkulationsstörungen führt, was als Auslöser der herabgesetzten Funktion von Wundimmunzellen zu sehen ist, die wiederum entscheidend an den pathophysiologischen Veränderungen beteiligt sind[132].

1.2 Trauma, Blutverlust und Schock führen zu einer erhöhten Inzidenz von Wundinfektionen und Wundheilungsstörungen

Die durch Trauma und Schock hervorgerufene Funktionseinschränkungen der Wundimmunzellen und der damit verbundenen Verschlechterung der Wundheilung stellt trotz großer Forschungsanstrengungen nach wie vor eine gefürchtete Spätkomplikation des hämorrhagischen Schocks dar. So konnte sowohl in klinischen, als auch in experimentellen Studien eine Störung der Wundimmunzell-Funktion sowie der Wundheilung an sich nach Trauma und Blutverlust nachgewiesen werden[7;8;43;63;86;95].

Ferner konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass ein hoher Blutverlust beim polytraumatisierten Patienten und nach großen chirurgischen Eingriffen mit einer signifikant erhöhten Rate an Wundkomplikationen einhergeht[29;62;63;88;95;97;103;106;138]. Insbesondere stellen die Dauer des Schockzustandes sowie der Umfang des Blutverlustes entscheidende Risikofaktoren für die Entwicklung von postoperativen Wundinfektionen dar, so dass auch Tage nach dem Initialtrauma noch eine zelluläre Dysfunktion vorliegen kann[108;133;138]. Auch konnte eine deutliche Verzögerung der Wundheilung nach Blutverlust und Trauma nachgewiesen werden. In diesem Zusammenhang fand sich eine verringerte Kollagenanreicherung in Wunden von Patienten mit gleichzeitig bestehendem

großen Trauma und Blutverlust[43]. So zeigte sich bei Patienten, die sich aufgrund eines Ulkus ventriculi einer operativen Therapie unterziehen mussten, eine erhöhte postoperative Dehnsenrate der Laparotomiewunde, wenn es sich hierbei um ein blutendes Ulkus ventriculi handelte[63;95]. In tierexperimentellen Studien konnte vergleichbar nachgewiesen werden, dass eine Beeinträchtigung der Wundheilung nach thermischer Verletzung, Frakturen oder polymikrobieller Sepsis auftritt[29;37;62;63;95].

Der komplexe Vorgang der Zellproliferation und Gefügewiederherstellung in der Wunde scheint entscheidend durch verschiedene Zytokine beeinflusst zu werden[63;95]. In verschiedenen Tiermodellen wurde die zeitliche Abfolge des Auftretens von Zytokinen in der Wunde und die Zytokinsekretion durch Wundimmunzellen untersucht[46;53;63;77;92;95]. Hierbei scheinen proinflammatorische Zytokine die Produktion von Kollagen zu verringern, wohingegen das antiinflammatorische Zytokin TGF- β (*transforming growth factor-beta*) die Kollagenanreicherung steigert[28;43;78;80]. Diese lokalen immunologischen Veränderungen waren mit einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Wundinfektionen verbunden[88] und begünstigten die Entstehung von postoperativen Wundinfektionen die selbst wiederum Ausgangspunkt einer Sepsis sein können[58;71].

TGF- β hat Einfluss auf unterschiedliche zelluläre Funktionen. Dies kommt im Wundheilungsprozess zum Ausdruck, in dem es mehrere wichtige Funktionen übernimmt. Zum einen ist es in der frühen Phase in die Chemotaxis von Neutrophilen und Makrophagen involviert, um die Wunde von Bakterien, Zelldebris u.a. zu klären[130]. Außerdem ermöglicht eine autokrine Expression von TGF- β durch Leukozyten und Fibroblasten die Ausschüttung weiterer Zytokine, was zu einer Potenzierung der inflammatorischen Antwort führt[32;94]. Weiterhin unterstützt TGF- β die proteolytische Aktivität von Leukozyten. Auch das Ende einer Immunantwort wird unter anderem durch TGF- β eingeleitet, da die inflammatorischen Zellen nach ihrer Aktivierung für eine TGF- β vermittelte Suppression empfänglich werden[94;128]. Weiterhin ist TGF- β auch in den späteren Phasen des Wundheilungsprozesses von Bedeutung, indem es zum Beispiel die Migration von Keratinozyten in den Wundbereich beeinflussen kann[16] sowie die Rekrutierung und Proliferation von Fibroblasten stimuliert. Diese Fibroblasten beginnen nach ihrer Einwanderung in den Wundbereich mit der für die Bildung eines neuen Gewebes wichtigen Produktion von Typ I Kollagen, Typ III Kollagen, Fibronectin und anderen wichtigen ECM-Komponenten, was ebenfalls durch TGF- β stimuliert wird[15;129].

Als aussagekräftiger Parameter der Wundheilung gilt das Kollagen. Kollagen ist ein fibrilläres Protein, das als wichtigstes Strukturprotein der extrazellulären Matrix der Dermis gilt und überwiegend aus Monoamino-säuren besteht. Die Kollagenfasern bestimmen die mechanische

Stabilität des Bindegewebes[73]. Durch epidermale Wachstumsfaktoren werden Lymphokine vermehrt zur Proliferation und Proteinsynthese angeregt. Dabei wird zunächst Prokollagen produziert[87]. Im Rahmen der nachfolgenden Kollagensynthese entsteht in der proliferativen Phase zunächst Typ-III-Kollagen[24;111]. Gleichzeitig wird in den Fibroblasten die Glykosaminoglykansynthese angeregt, wobei überwiegend Hyaluronsäure gebildet wird. Im Vordergrund der reparativen Phase steht die gesteigerte Synthese der DNA und RNA von Kollagen und Glykosaminoglykanen. Normofibroblasten bilden im Verlauf Dermatansulfat und Typ-I-Kollagen. Daraus entstehen Chondro-Protein-Komplexe. Die Kollagenfibrillen werden verfestigt. Nach 10- bis 14 Tagen kommt es zum Wundverschluß. Anfangs überwiegen noch Kollagen Typ III und Hyaluronsäure. Erst nach längerer Zeit werden während der Narbenbildung die embryonalen Typen durch längere und feste Fasern des Kollagen Typ I ersetzt[24;87;111].

1.3 Effekt von L-Arginin nach Trauma, Blutverlust und Schock

Obwohl die exakten Mechanismen, die der Störung der Wundimmunzellfunktion nach Schock zugrunde liegen noch weitgehend unbekannt sind, scheint eine Minderperfusion durch eine Schädigung der Endothelzellfunktion für diese Beobachtung verantwortlich zu sein. In dieser Beziehung konnte eine verminderte Perfusion der Haut und der Muskulatur nach hämorrhagischem Schock nachgewiesen werden[13]. Die Behandlung von Versuchstieren nach Blutverlust während der Flüssigkeitssubstitution mit der Aminosäure L-Arginin hatte jedoch eine Normalisierung der unterdrückten Organperfusion in der Haut und einer Vielzahl anderer Organe wie z.B. Leber, Herz, Lunge, Milz, Dick- und Dünndarm in den ersten vier Stunden nach hämorrhagischem Schock zur Folge[12;13]. Diese Verbesserung der Organdurchblutung war mit einer Normalisierung der Immunantwort in der Leber, Milz und Peritonealmakrophagen[12] und einer Verringerung des normalerweise nach Blutverlust zu beobachtenden Leberschadens verbunden[5]. Eine direkte Verbesserung der Wundimmunzellfunktion durch den Einfluss von L-Arginin konnte Angele et al. zeigen[10].

Zahlreiche Studien weisen auf die Schlüsselrolle, die dem in der Endothelzelle aus L-Arginin synthetisierten Molekül Stickstoffmonoxid (NO) zukommt, in der Entwicklung des beschriebenen Organversagens und der Unterdrückung der Immunfunktion nach traumatisch-hämorrhagischem Schock hin. Von der Endothelzelle ausgeschüttetes NO führt zu einer Gefäßdilatation[55], hemmt die Ausbildung von Thrombozytenaggregaten[135] und verringert die massive Infiltration von Neutrophilen ins Gewebe[93]. Nach traumatisch-

hämorrhagischem Schock kommt es zu einer Hemmung der Endothelzellfunktion, die wahrscheinlich zu einer geringeren Aktivität des Enzyms konstitutive NO-Synthetase (cNOS) und damit zu einer verringerten NO-Ausschüttung führt[42;84]. Die daraus resultierende Gefäßkonstriktion bedingt eine Organminderperfusion und damit im weiteren Verlauf einen Organschaden[132]. In verschiedenen experimentellen Schockmodellen, die mit einer Hemmung der Endothelzellfunktion einhergehen, konnte eine Verringerung des Organschadens sowie des Entzündungssyndroms durch die Gabe von L-Arginin nachgewiesen werden[11-13;64;96;101;105]. So konnte in diesem Zusammenhang gezeigt werden, dass L-Arginin nach Endotoxinschock die Schädigung der Lunge und die Expression von proinflammatorischen Zytokinen verringert[96]. Moore et al. zeigte in einer prospektiven Multicenterstudie eine Reduzierung der Entwicklung abdomineller Abszesse in Patienten, die vor einer abdominellen Operation mit L-Arginin reicher Diät behandelt wurden[98]. Vergleichbar dazu konnte nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine Normalisierung der Organdurchblutung und der Immunantwort sowie eine Verminderung der Organschädigung durch die Gabe von L-Arginin nachgewiesen werden[136]. Vergleichbare therapeutische Effekte konnten nach Gabe des biologisch inaktiven optischen Antipoden von L-Arginin, D-Arginin, nicht erzielt werden[12;13]. Diese Daten weisen daraufhin, dass die Effekte von L-Arginin durch die Metabolisierung der Aminosäure verursacht werden.

Nach aktueller Studienlage ist bisher jedoch nicht bekannt, ob L-Arginin zu einer Verbesserung der Wundheilung führt und somit eine Reduzierung der Wundkomplikationsraten nach Trauma und Schock mit sich bringen würde.

1.4 Fragestellung

Trotz des protektiven Effekts von L-Arginin auf die Wundimmunzellfunktion ist der Einfluss dieser Aminosäure auf die Wundheilung nach Blutverlust unbekannt. Ziel dieser Arbeit war es festzustellen, ob die Aminosäure L-Arginin im Rahmen der Flüssigkeitstherapie nach Trauma und Schock einen positiven Effekt auf den komplexen Prozess der Wundheilung hat. Die Wundheilung wurde durch die Messung des Kollagen I und III sowie dessen biochemischer Vorstufe, dem Hydroxyprolin (OHP), in der Wunde quantifiziert. Ferner wurde der Einfluss von L-Arginin auf die TGF- β Synthese im Wundsekret quantifiziert. Weiterhin wurde der Effekt von L-Arginin auf die herabgesetzte Wundreißfestigkeit nach Trauma und Schock untersucht.

Durch die Ergebnisse dieser Arbeit könnte eine neuartige Therapie zur Reduzierung von Wundkomplikationen nach Trauma und großem Blutverlust erarbeitet werden und so gegebenenfalls die Mortalität und Morbidität dieser Patienten zu verringert werden.

2. HYPOTHESE UND ZIELSETZUNG

2.1 L-Arginin verbessert die Hydroxyprolinsynthese nach Trauma und Schock

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden C3H/HeN Mäuse laparotomiert und einem hämorrhagischen Schock oder einer Kontrolloperation unterzogen. Eine Versuchsgruppe erhielt dabei L-Arginin im Rahmen der Flüssigkeitstherapie. Aus subkutan im Wundgebiet implantierten Polyvinylschwämmchen wurde Wundflüssigkeit isoliert und darin mittels Gaschromatographie Hydroxyprolin bestimmt.

2.2 L-Arginin verbessert die Kollagen I und III sowie die TGF- β Synthese nach Trauma und Schock

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden C3H/HeN Mäuse laparotomiert und einem hämorrhagischen Schock oder einer Kontrolloperation unterzogen. Eine Versuchsgruppe erhielt dabei L-Arginin im Rahmen der Flüssigkeitstherapie. Bei allen Versuchstieren wurde Haut aus dem Bereich der Laparotomie-Wunde gewonnen und mittels Western Blot-Analyse Kollagen I und III sowie TGF- β bestimmt.

2.3 L-Arginin verbessert die Wundreißfestigkeit nach Trauma und Schock

Zur Untersuchung dieser Hypothese wurden C3H/HeN Mäuse laparotomiert und einem hämorrhagischen Schock oder einer Kontrolloperation unterzogen. Bei allen Versuchstieren wurde ein Haut-Muskelpräparat aus dem Bereich der Laparotomie-Wunde gewonnen. Anschließend wurde die Reißfestigkeit der Wunde untersucht.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Verwendete Tiere

Für die tierexperimentellen Studien am Institut für Chirurgische Forschung des Klinikums Großhadern, Ludwig-Maximilians Universität München, wurden männliche C3H/HeN Mäuse von Charles River (Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Mäuse hatten bei der Versuchsdurchführung ein Alter von ca. 6-7 Wochen und ein Gewicht von 24-26 g. C3H/HeN Mäuse wurden für die Studien benutzt, da diese Tiere über eine ausgewogene Th1–Th2 Immunantwort verfügen[17]. Diese Immunreaktion ist vergleichbar mit der bei Patientenstudien zu beobachtenden Immunantwort[47].

Alle Experimente wurden in Übereinstimmung mit den Gesetzen des „*Animal Welfare Act*“ und dem „*Guide for the Care and Use of Laboratory Animal*“s der National Institutes of Health sowie dem Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland[1] vorgenommen. Die Untersuchungen, die am Institut für Chirurgische Forschung des Klinikums Großhadern durchgeführt wurden, waren von der Regierung von Oberbayern und der Ludwig-Maximilians Universität bewilligt und genehmigt.

3.2 Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden in drei Versuchsgruppen randomisiert (n=6-8/Gruppe). Die Tiere der ersten Gruppe wurden als Kontrolle verwendet (Kontrolle). Sie wurden lediglich einer Laparotomie und einer Kontrolloperation unterzogen. Die Tiere der zweiten Gruppe wurden einem hämorrhagischem Schock und einer Kontrolloperation unterzogen, die Flüssigkeitssubstitution erfolgte ausschließlich durch Ringer Laktat Gabe (Hämorrhagischer Schock, Hem). Die Tiere der dritten Gruppe wurden ebenfalls dem hämorrhagischem Schock und einer Kontrolloperation unterzogen, jedoch erfolgte hier die Flüssigkeitssubstitution zusätzlich mit 300 mg pro kg Körpergewicht L-Arginin zu Beginn der Flüssigkeitstherapie über einen Zeitraum von 20 Minuten (Hämorrhagischer Schock und L-Arginin, Hem+L-Arginin)[10].

3.3 Traumatisch-hämorrhagisches Schockmodell

3.3.1 Weichteiltrauma, Laparotomie und Schwämmchenimplantation

Bei den Mäusen wurden eine Inhalationsnarkose mit Isofluran (Forene®) sowie einem Sauerstoff-Lachgasgemisch unter Spontanatmung eingeleitet wodurch eine ausreichende Analosedierung gewährt war. Die Tiere wurden in Rückenlage in einer gestreckten Position fixiert. Die Bauchwand wurde rasiert und mit 75% Alkohol desinfiziert.

Anschließend wurde eine Mittellinienlaparotomie (ca. 2,5 cm) unter reinen Operationsbedingungen vorgenommen. Die Muskelschicht wurde mit einem 6-0 Ethilon Faden (Ethicon, Inc., Somerville, NJ) verschlossen. Zur Gewinnung von Wundflüssigkeit erfolgte vor Hautnaht die aseptische Implantation von Polyäthylenschwämmchen (0,5 cm Durchmesser; M-Pact; Eudora). Dazu wurden lateral des Hautschnittes zwei subkutane Taschen präpariert, in die dann unter sterilen Bedingungen die Schwämmchen (vier Stück pro Tier) eingesetzt wurden. Der Hautverschluss erfolgte mit einem 5-0 Ethilon Faden (Ethicon, Inc., Somerville, NJ) und zusätzlichen mit chirurgischen Clips (MikRon Autoclip) (Abb. 2).

Zur Ermittlung der Hautreißfestigkeit wurden keine Schwämmchen in die Tiere implantiert. Dadurch konnte eine Störung der Wundheilung aufgrund der Fremdkörper vermieden werden.

Abb. 2

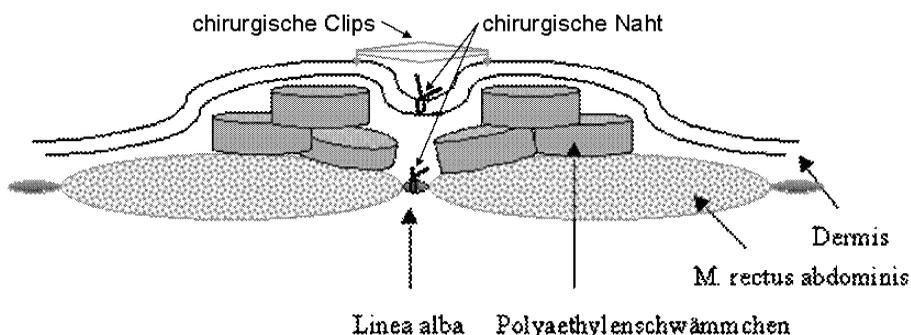


Abb. 2: Schematischer Querschnitt des Versuchsaufbaus nach Durchführung der Laparotomie und Einlage der Polyäthylenschwämmchen zur Gewinnung der Wundflüssigkeit.

3.3.2 Durchführung des hämorrhagischen Schocks

Zur Induktion des hämorrhagischen Schocks wurde ein seit vielen Jahren etabliertes Schockmodell verwendet. Es handelt sich hierbei um ein blutdruckkontrolliertes Modell [7-9;11;120], dass in den bisherigen Studien keine signifikante Mortalität aufwies (Abb. 3).

Abb. 3

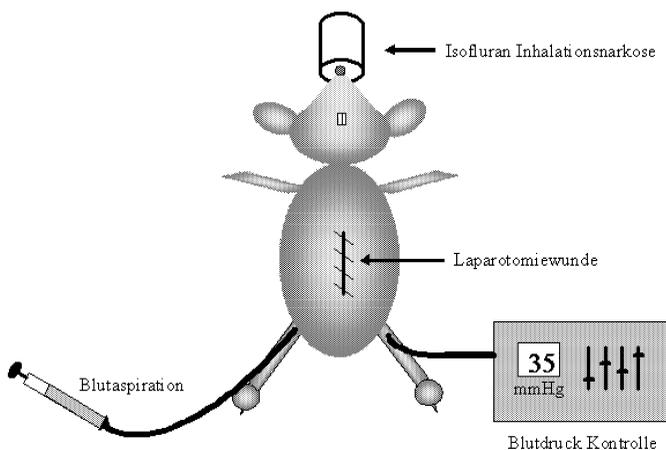


Abb. 3: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus.

Unter Weiterführung der Inhalationsnarkose nach Mittellinienlaparotomie wurde die Haut der Mäuse in beiden Leisten auf ca. 0,5 cm Länge eingeschnitten. Anschließend wurde durch stumpfe Präparation die Femoralarterie beidseitig unter dem Operationsmikroskop dargestellt und distal ligiert. In beide Femoralarterien wurde aseptisch ein 10-Polyäthylen Katheter (Clay-Adams, Parsippany, NJ) eingelegt. Einer der beiden Katheter wurde zur intravasalen Blutdruckmessung mittels eines computergestützten Messverfahrens genutzt (Digi-Med, Louisville, Ky). Vor Beginn des Schockzustandes wurde die Inhalationsnarkose beendet und die Tiere aus der Rückenlage auf dem Bauch fixiert. Anschließend erfolgte die Aspiration von Blut über den zweiten Katheter, um den mittleren Blutdruck von ca. 90 ± 5 mmHg (Normaldruck einer Maus) auf ca. 35 ± 5 mmHg zu senken. Dieser Blutdruck wurde über einen Zeitraum von 90 min. konstant gehalten (Abb.4). Um eine hämodynamische Beeinflussung durch Analgetika und Sedativa zu vermeiden und somit eine standardisierte

Versuchsdurchführung (Blutdruck kontrolliertes Schockmodell) zu gewähren, wurden den Tieren für den Zeitraum des hämorrhagischen Schocks keine weiteren Medikamente zugeführt. Das Körpergewicht der Tiere wurde sowohl präoperativ als auch täglich postoperativ gemessen. Es erfolgte zweimal täglich eine Kontrolle der Wunde.

Abb. 4

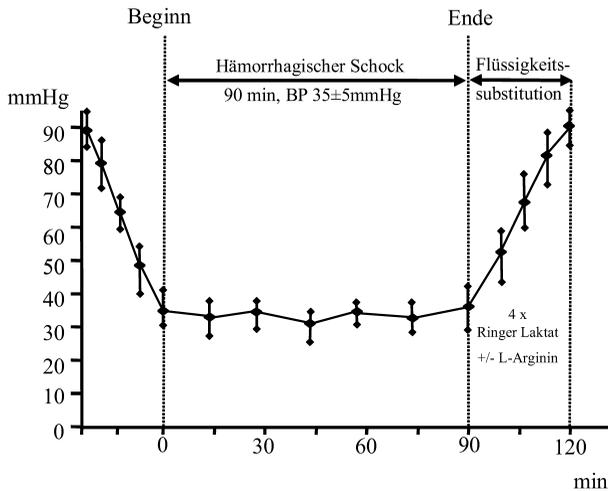


Abb. 4: Darstellung des zeitlichen Verlaufs der Blutdruckkurve während der Durchführung des traumatisch-hämorrhagischen Schocks und der anschließenden Flüssigkeitssubstitution mit oder ohne L-Arginin.

Im Anschluss an die hypotone Schockphase wurde den Tieren das vierfache Volumen der abgenommenen Blutmenge über einen Zeitraum von 30 Minuten als Ringer Laktat Lösung substituiert. Nach Beendigung der Flüssigkeitssubstitution erfolgte eine erneute Fixierung auf dem Rücken der Tiere sowie eine Auftragung des Lokalanästhetikum Lidocain (Xylocain®) auf die Leistenschnitte. Die Femoralarterienkatheter wurden entfernt und die Femoralarterien ligiert. Der Hautschnitt wurde mittels 5-0 Ethilon Faden verschlossen. Die bilaterale Ligatur der Femoralarterie wurde von den Tieren gut toleriert. Postoperativ stellte sich keine Einschränkung der Durchblutung und Bewegung der unteren Extremität ein. Nach Beendigung der Schock-Prozedur erhielten die Tiere Metamizol (Novaminsulfon-ratiopharm®) als orales Analgetikum.

3.3.3 Durchführung der Kontrolloperation

Bei den Kontrolltieren wurden ebenfalls alle chirurgischen Interventionen unter Inhalationsnarkose mit Isofluran durchgeführt. Zunächst wurde wiederum eine Mittellinien-laparotomie und anschließend eine Hautinzision in der Leiste vorgenommen, die Femoralarterien beiderseits dargestellt und punktiert sowie Polyäthylen 10 Katheter eingelegt und schließlich die Femoralarterien ligiert. Zuletzt wurde das Lokalanästhetikum Lidocain im Wundbereich aufgetragen und die Haut mit einem 5-0 Ethilon Faden verschlossen. Es wurde jedoch weder blutdruckwirksam Blut aspiriert noch im Anschluss eine Flüssigkeits-substitution durchgeführt. Auch die Tiere der Kontrollgruppe erhielten als postoperatives Analgetikum Metamizol oral appliziert.

3.3.4 L-Arginin Administration

Zu Beginn der Flüssigkeitstherapie wurde den Tieren der dritten Versuchsgruppe L-Arginin (300 mg/kg Körpergewicht) über den Femoralarterienkatheter gelöst in 1 ml Ringer-Laktat-Lösung über eine Zeit von 20 Minuten konstant infundiert. Diese Dosierung wurde in Anlehnung an frühere Studien gewählt, bei denen sich protektive Effekte auf Wundimmunzellen zeigten[10;10-12].

Die Menge von 300 mg L-Arginin pro kg Körpergewicht scheint auch klinische Relevanz zu haben, da bei vergleichbaren Dosen in Patientenstudien keinerlei unerwünschte Nebeneffekte auftraten[107].

3.3.5 Zeitpunkte der Probengewinnung

Zur Bestimmung von Hydroxyprolin (OHP) und TGF- β in der Wundflüssigkeit, sowie Kollagen I und III in der Wunde wurde der siebte postoperative Tag festgelegt.

Bei den separaten Tieren, die in den Hautreißversuch eingingen wurde der zehnte postoperative Tag zur Probengewinnung gewählt (Abb. 5).

Abb. 5

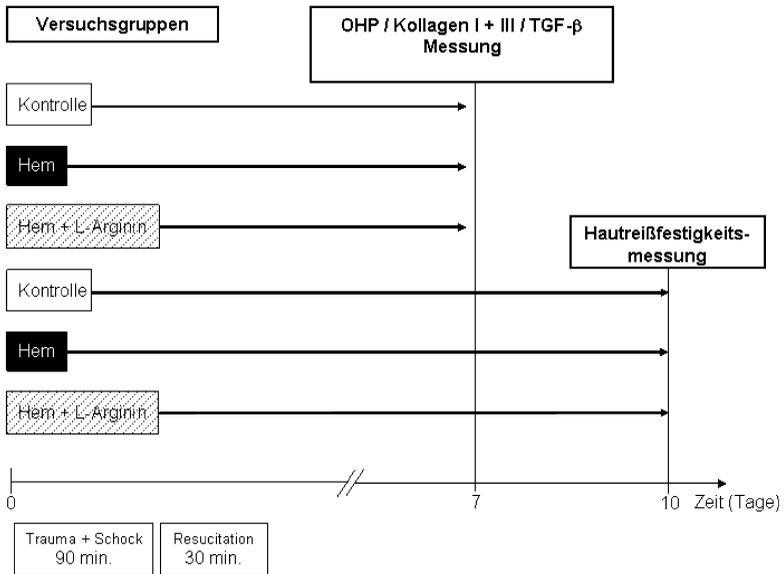


Abb. 5: Darstellung der unterschiedlichen Zeitpunkte der Probengewinnung der einzelnen Versuchsreihen.

3.4 Probengewinnung

3.4.1 Gewinnung der Wundflüssigkeit

Aus den euthanisierten Versuchstieren wurden die Polyethylschwmmchen aseptisch entfernt und von umgebendem Granulationsgewebe mit Hilfe chirurgischer Methoden befreit. Sie wurden in 5 ml Plastikspritzen gebracht, die dann jeweils in ein 10 ml Polypropylen-Röhrchen gesteckt wurden. Diese Spritzen-Röhrchen Kombination wurde anschließend bei 400 g und 4° C für 5 Minuten zentrifugiert. Der zellfreie Überstand wurde nach Zentrifugation aliquotiert und bis zur Hydroxyprolin Messung bei -80° C gelagert.

3.4.2 Gewinnung des Wundgewebes

In der ca. 2,5 cm langen dorsalen Hautwunde wurden zunächst die chirurgischen Clips und der Faden aseptisch entfernt. Anschließend wurde die Wunde mit 75% Alkohol desinfiziert. Die Hautwunde wurde in vier etwa gleich große Anteile zerlegt. Diese wurden zunächst in Flüssigstickstoff gebracht und anschließend bei -80°C gelagert.

3.5 Bestimmung der Versuchsparameter

3.5.1 Hydroxyprolinbestimmung

Hydroxyprolin ist eine Aminosäure, die als ein Metabolit der Kollagensynthese nur im Kollagen in nennenswerter Menge zu finden ist[111]. Aufgrund dieses spezifischen Vorkommens gilt Hydroxyprolin und kann als repräsentativer Parameter für den Kollagengehalt des Gewebes[33;139].

Als Methode wurde hier ein chromatographisches Verfahren gewählt[3;36;139]. Um die Menge von Hydroxyprolin in der Wundflüssigkeit zu bestimmen, wurde das Wundsekret zunächst verdünnt und nach internem Standard mit Centifree Säulen vom Protein befreit. Die weitere Vorgehensweise wurde nach einer variierten Methode der Firma BioRad (München) durchgeführt. Das wässrige Eluat wurde nach pH-Wert Einstellung 30 Minuten bei 70°C Celsius derivatisiert. Die Trennung erfolgte anschließend über eine 150 mm C18 Trennsäule. Die Detektion wurde bei 471 nm durchgeführt. Dabei wurden folgende Leistungsdaten festgelegt: Intraassay V_k 1,80%, Nachweisgrenze 0,10 mg/l, Bestimmungsgrenze 0,30 mg/l, Linearität bis 50 mg/l, Richtigkeit 97%.

3.5.2 Kollagen I und III sowie TGF- β Bestimmung

Kollagen I und III wurde in dieser Arbeit durch Western Blot-Analyse in der Wunde bestimmt. Zunächst wurde die bei -80°C gelagerte Wunde lysiert und homogenisiert. Zur Herstellung des Lysepuffers wurde zunächst folgende Stocklösung hergestellt: 5,96g Hepes (50mM/FW 238,3g/H-7523, pH auf 7,2 eingestellt), 4,39g NaCl (150mM/FW 58,5g/S-7653), 0,19g EGTA (1mM/FW 380g/E-0396), 0,42g NaF (20mM/FW 42,0g/S-7920), 5,0ml Triton X 100 (1%/T-9284) sowie 50ml Glycerol (10%/G-6279). Zu 4,75ml dieser Stocklösung wurden dann kurz vor Gebrauch folgende Lösungen gegeben: 50 μl β -Glycerophosphat (500mM/FW

216g/G-6251; Lösung: 50ml Aqua dest.+5,4g), 50µl PMSF (100mM/FW 174,2g/P-7626; Lösung: 50ml Ethanol+0,87g), 100µl Sodium Orthovanadate (100mM/FW 183,9g/S-6508; Lösung: 50ml Aqua dest.+0,92g, pH 10) sowie 50µl Aprotinin.

Es wurde nun das gewonnene Wundstück mit 1 ml des Lysepuffers in einem 1ml-Eppendorfröhrchen lysiert. Anschließend wurde mit einem Ultraschallhomogenizer (Bandelin, Sonoplus HD2070, Berlin, Deutschland) das Gewebe vollständig aufgelöst. Das so gewonnene Lysat wurde weiter für die Western Blot-Analyse verwendet.

Unter Verwendung eines standardisierten kolometrischen Protein Assays (Protein Detektion Kit, Bio Rad, München, Deutschland) wurde zunächst die Gesamtproteinmenge im Lysat nach der Beschreibung des Herstellers ermittelt. Somit konnte eine uniforme Beladung der Western Blot Gele sichergestellt werden. 15 µg Protein wurden zusammen mit einem Sample Reducing Agent (Invitrogen, NuPage®, CA, USA) in einem Bis-Tris-Gel (Invitrogen, NuPage®, Imm x 12 Bahnen) geladen und in einem Elektrophoresesystem der Firma Novex (Xcell, Sure lock, Power Ease 500) bei 125 V und 35 mA für 90 Minuten bei Raumtemperatur separiert. Anschließend wurden die Proteine auf eine Nylonmembran (Invitrogen, Nitrocellulose Membran, Filter Paper Sandwich, 0,2µm Porengröße) übertragen. Als Stromspannung und -stärke wurden dabei 25V, 125mA für 90 Minuten bei Raumtemperatur gewählt. Für die immunologische Detektion der Proteine wurde ein Western Blot Chemoluminescence Kit (ECL™,western blotting analysis system, Amersham, NJ, USA) verwendet. Die unspezifischen Bindungen wurden anschließend mit einem Blockpuffer 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

Die Membranen wurden über Nacht bei 4°C und einer Verdünnung von 1:1500 mit einem monoklonalen Anti-Kollagen I und Anti-Kollagen III (DPC Biermann, Deutschland) Antikörper inkubiert. Anschließend wurden die Membranen mit einem sekundären Peroxidase gebundenen Anti-Kaninchen Antikörper vom Esel (horseradish, peroxidase linked whole antibody from donkey, Ig, ECL™, Amersham, NJ, USA) für 90 Minuten bei einer Verdünnung von 1:1000 inkubiert. Für die Detektion der gebundenen Antikörper wurde ein Chemo-luminescence Kid (Amersham, Life Science, NJ, USA) verwendet und die Lichtemission wurde mit einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Als Standard wurde dabei ein prestained Standard der Firma Bio Rad (Precision Protein™ Standard, Bio Rad, München, Deutschland) verwendet. Als Positivkontrolle wurde Kollagen I und III der Firma DPC Biermann benutzt. Für die Quantifizierung der Kollagenbanden wurde Sigma-Gel- software™ verwendet.

Die Bestimmung von TGF-β in der Wundflüssigkeit erfolgte identisch mit der Bestimmung

von Kollagen I und III mittels Western Blot-Analyse. Als primärer Antikörper wurde dabei anti-TGF- β (DPC Biermann, Deutschland) verwendet. Alle weiteren verwendeten Materialien waren mit denen der Kollagenbestimmung kongruent.

3.5.3 Reißfestigkeit der Wundhaut

Die Wundreißfestigkeit gilt in der Wundheilungsforschung als objektiv messbarer, mechanischer Parameter der Wundheilung[19;60;117;126]. Mittels eines Tensiometers wird diejenige Zugkraft bestimmt, die erforderlich ist, um eine in der Heilungsphase befindliche, lineare Schnittwunde auseinander zu reißen. Die Messung der mechanischen Reißfestigkeit ist ein grobes, aber auch direktes Maß der Wundfestigkeit und Wundadaptation und spiegelt so die klinische Auswirkung der Wundheilungsstörung wider[24].

Zur Untersuchung der Reißfestigkeit wurden die Versuchstiere am zehnten Tag nach Trauma und hämorrhagischem Schock mittels Isofluran euthanasiert. Im Anschluss wurden in einem definierten Abstand von 1 cm parallel zur Wunde verlaufende Linien auf die Haut aufgetragen. Entlang dieser Vorgaben wurde schließlich ein Haut-Muskelpreparat gewonnen. Zur Standardisierung des Versuches wurde dieses Präparat mittels einer Schablone in exakt 1 cm breite sowie ca. 3 cm lange Streifen unterteilt. Die Dicke dieser Präparate betrug ungefähr 2 mm. Die so gewonnenen Wundpräparate wurden auf Eis in den Untersuchungsraum gebracht. Jedes einzelne Präparat wurde anschließend an den zuvor markierten Abstandslinien in die vorgesehenen Klemmvorrichtungen eingespannt (Abb. 6). Dies wurde unter spannungsfreien Bedingungen vorgenommen. Nach der Fixierung wurde die Wundhaut mit einer Vorspannung von 0,5 Newton (N) gedehnt, so dass sie die Ausgangslänge von 2 cm erreichte. Jede Gewebeprobe wurde mit einer Kraftzunahme von 2 mm/s sowie bis zu einem Maximum von 30 mm untersucht. Es wurden die Dehnungskurven und die maximale Reißfestigkeit bestimmt, die dann graphisch in einem Diagramm aufgezeichnet wurden.

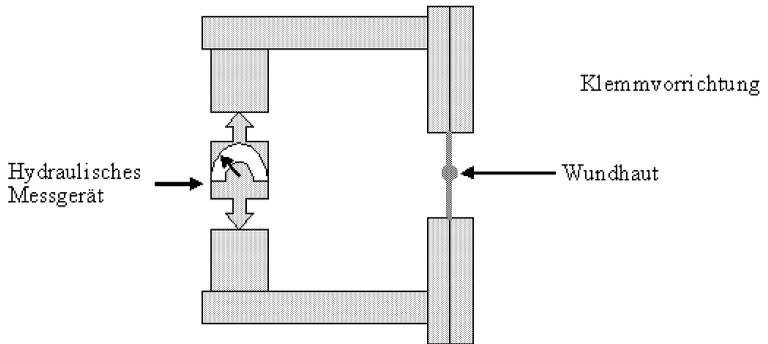
Abb. 6

Abb. 6: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Bestimmung der Reißfestigkeit der Wundhaut.

4. ERGEBNISSE

4.1 Körpergewicht der Tiere

Das Körpergewicht der Versuchstiere wurde sowohl präoperativ als auch am zweiten und siebten postoperativen Tag bestimmt. Zu keinem dieser Zeitpunkte zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tab.1). Insbesondere war die Veränderung des Körpergewichts bei schockierten und kontrollierten Tieren nicht verschieden. L-Arginin hatte keinen signifikanten Einfluss auf die Veränderung des Körpergewichtes.

Tab. 1

	präoperativ	zweiter postoperativer Tag	siebter postoperativer Tag
Kontrolle	26.9 ± 0.9 g	26.5 ± 1.0 g	26.3 ± 1.6 g
Schock	27.4 ± 2.7 g	26.5 ± 1.3 g	26.9 ± 2.4 g
Schock+L-Arginin	27.9 ± 1.7 g	26.6 ± 0.9 g	27.4 ± 1.1 g

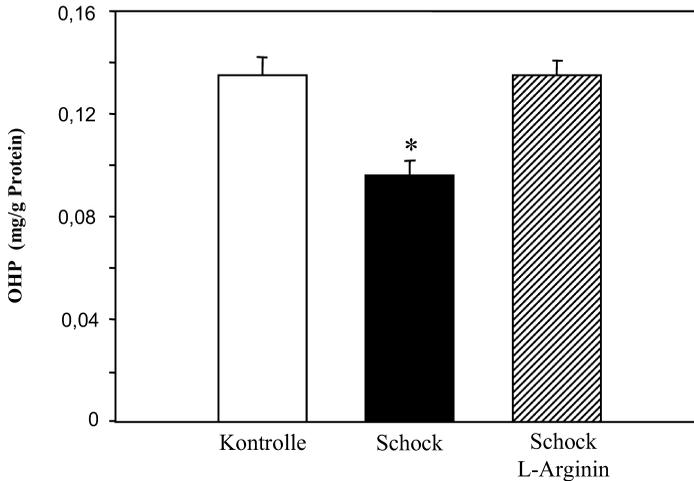
Tab. 1: Männliche C3H/HeN Mäuse wurden nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation mit Placebo oder mit L-Arginin (300 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Das Gesamtkörpergewicht wurde präoperativ, am zweiten und am siebten postoperativen Tag in Gramm (g) gemessen. N=6/Gruppe. Die Werte bezeichnen Durchschnittswerte ± Standardabweichung, Daten wurden mittels ANOVA analysiert.

4.2 Hydroxyprolin in der Wundflüssigkeit

Aus den in die Wunde eingelegten Polyvinylschwämmchen wurde die Wundflüssigkeit isoliert. Zur Bestimmung der Kollagensynthese wurde zunächst Hydroxyprolin am siebten postoperativen Tag bestimmt. Dieser war in geschockten Tieren signifikant erniedrigt verglichen mit der Kontrollgruppe (-28%; $p < 0,05$). Die Behandlung geschockter Tiere mittels L-Arginin in der postoperativen Phase führte zu einer Normalisierung des Hydroxyprolins in der Wunde. Es stellte sich kein signifikanter Unterschied in der Menge an Hydroxyprolin zwischen der Kontrollgruppe und den mit L-

Arginin behandelten Tieren nach hämorrhagischen Schocks dar (Abb. 7). L-Arginin führte somit zu einer Steigerung der Expression von Hydroxyprolin in der Wunde, was ein Hinweis auf eine Verbesserung der Wundheilung darstellen könnte. Die Einheit an Hydroxyprolin wurde in mg/g Protein angegeben.

Abb. 7



*Abb. 7: Männliche C3H/HeN Mäuse wurden nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation mit Placebo oder mit L-Arginin (300 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Sieben Tage nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation wurde die Menge an Hydroxyprolin (OHP) in der Wundflüssigkeit aus subkutanen Schwämmchen mittels Gaschromatographie bestimmt. N=6/Gruppe. *p<0.05 vs. Placebo behandelte Kontrolltiere. Die Balken bezeichnen Durchschnittswerte±Standardabweichung. Daten wurden mittels ANOVA analysiert.*

4.3 TGF- β in der Wunde

Um den Einfluss des Zytokins TGF- β , das an der Kontrolle der Wundheilung beteiligt ist, zu ermitteln wurde dessen Expression in der Wundflüssigkeit mittels Western Blot-Analyse bestimmt. Die Ergebnisse zeigten keinen signifikanten Unterschied von TGF- β in geschockten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die Substitution von L-Arginin nach hämorrhagischem Schock führte zu keiner signifikanten Veränderung der Menge an

TGF- β in der Wundflüssigkeit (Abb. 8 A, B).

Abb. 8

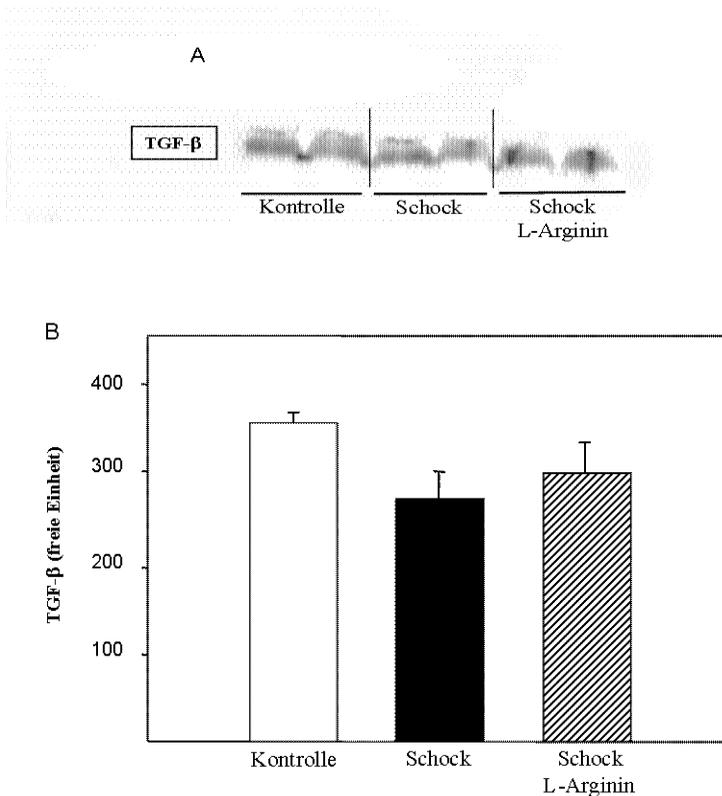
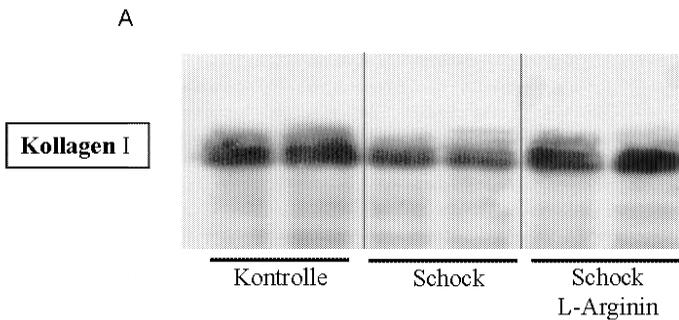


Abb. 8: Männliche C3H/HeN Mäuse wurden nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation mit Placebo oder mit L-Arginin (300 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Sieben Tage nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation wurde die Menge an TGF- β in der Wunde mittels Western Blot-Analyse bestimmt (A). N=6/Gruppe. Absolute Werte wurden mit Sigma Gel Software bestimmt (B). Die Balken bezeichnen Durchschnittswerte \pm Standardabweichung, Daten wurden mittels ANOVA analysiert.

4.4 Kollagen I und III in der Wunde

Als weiterer Marker der Wundheilung wurde Kollagen I und III in der Wundflüssigkeit mittels Western Blot-Analyse ermittelt. Dadurch sollte festgestellt werden, ob L-Arginin nicht nur zu einer Steigerung der Hydroxyprolinmenge in der Wunde führt, sondern auch eine Steigerung der Kollagen I und III Synthese zur Folge hat. In den Ergebnissen stellte sich eine signifikante Reduktion von Kollagen I in geschockten Tieren im Vergleich zur Kontrollgruppe dar (-30,3%; $p < 0,05$). Die Substitution von L-Arginin nach hämorrhagischem Schock hingegen führte zu einer Normalisierung dieses Defizits. Im Vergleich zur Kontrollgruppe konnte bei den Tieren, die in der postoperativen Phase L-Arginin im Rahmen der Flüssigkeitstherapie erhielten, kein signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe festgestellt werden (Abb. 9 A, B). Die L-Arginin Gabe scheint somit zu einer Steigerung des Kollagen I Gehalts in der Wunde zu führen.

Abb. 9



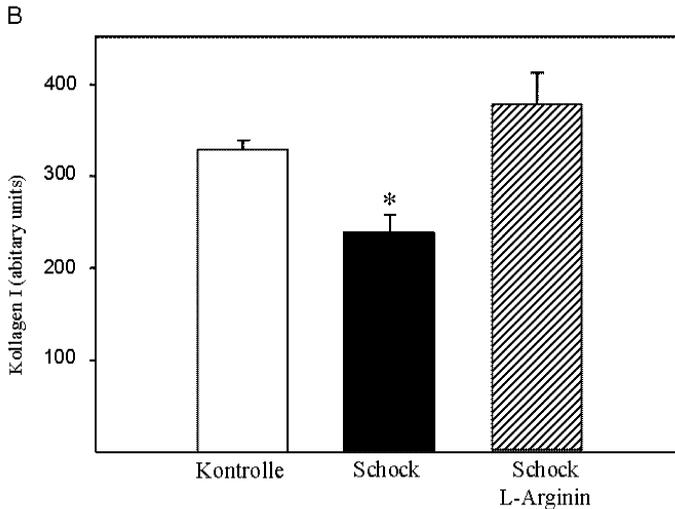


Abb. 9: Männliche C3H/HeN Mäuse wurden nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation mit Placebo oder mit L-Arginin (300 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Sieben Tage nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation wurde die Menge an Kollagen I in der Wunde mittels Western Blot-Analyse bestimmt (A). $N=6$ /Gruppe. Absolute Werte wurden mit Sigma Gel Software bestimmt (B). $*p<0.05$ vs. Placebo behandelte Kontrolltiere. Die Balken bezeichnen Durchschnittswerte \pm Standardabweichung, Daten wurden mittels ANOVA analysiert.

Um festzustellen, ob L-Arginin ebenfalls zu einer Steigerung des Kollagen III in der Wunde führt, wurde dieses mittels Western Blot-Analyse aus der Wundflüssigkeit bestimmt. Bei der Kollagen III-Menge nach hämorrhagischem Schock stellte sich keine signifikante Verringerung im Vergleich zur Kontrollgruppe dar ($p>0,05$). Jedoch wiesen die erhobenen Daten die deutliche Tendenz auf, dass Blutverlust und Schock zu einer Minimierung von Kollagen III in der Wunde führen. L-Arginin konnte diese Verminderung kompensieren, so dass annähernd gleiche Werte wie in der Kontrolle erreicht werden konnten (Abb. 10 A, B). Ob nun L-Arginin einen signifikanten Einfluss auf die Kollagen III-Synthese als späte Phase der Wundheilung hat, bleibt für zukünftige Studien offen.

Abb. 10

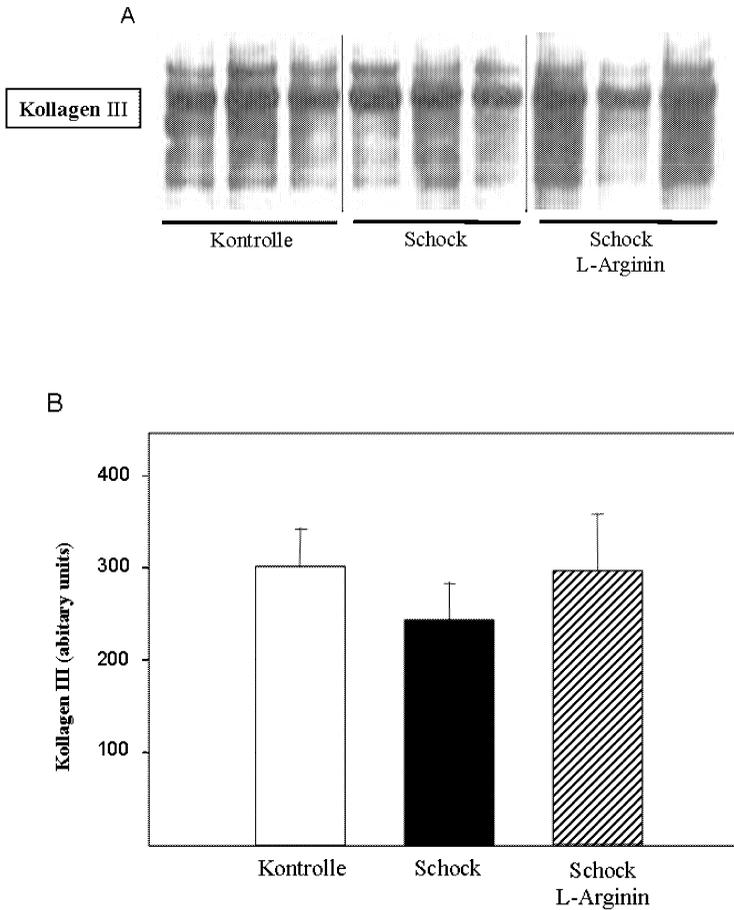


Abb. 10: Männliche C3H/HeN Mäuse wurden nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation mit Placebo oder mit L-Arginin (300 mg/kg Körpergewicht) behandelt. Sieben Tage nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation wurde die Menge an Kollagen III in der Wunde mittels Western Blot Analyse bestimmt (A). $N=6$ /Gruppe. Absolute Werte wurden mit Sigma Gel Software bestimmt (B). Die Balken bezeichnen Durchschnittswerte \pm Standardabweichung, Daten wurden mittels ANOVA analysiert.

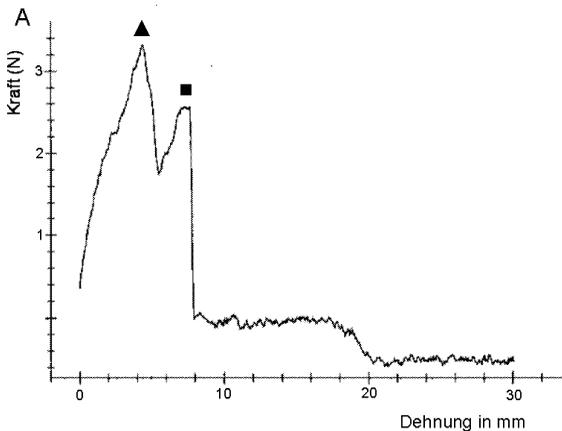
4.5 Reißfestigkeit der Wunde

Die Reißfestigkeit der Wunde wurde zehn Tage nach hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation bestimmt. Hierfür wurden aus dem Bereich der Laparotomiewunde Hautstücke entnommen, wobei die Haut nicht von der darunter liegenden Muskelschicht getrennt wurde, da dies eine fehlerhafte Instabilität der Wunde mit sich gebracht hätte.

Die Abbildung 11 A, B, C zeigt die typischen Hautreißkurven der einzelnen Versuchsgruppen. Dargestellt ist auf der y-Achse die Kraft in Newton (N) und auf der x-Achse das Auseinanderweichen des Tensiometers in mm. Die typischen Kraft-Weg Kurven der Abdominalwand zeigen eine Doppelspitze. Die erste Spitze zeigt das Zerreißen der Haut (▲), die zweite das Zerreißen der darunter liegenden Muskelschicht (■) an. Es sollte bei den Graphen beachtet werden, dass sich die Skalierungen der y-Achse der Abbildungen 11 A-C unterscheiden. Zur Auswertung wurde die maximale Kraft (Zerreißen der Haut) von je sechs Versuchstieren pro Gruppe verwendet.

Die Maximale Reißfestigkeit der Abdominalwundhaut war zehn Tage nach hämorrhagischem Schock signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe verringert (-23,1%; $p < 0,05$). L-Arginin nach traumatisch-hämorrhagischem Schock verbessert diese herabgesetzte Reißfestigkeit, so dass kein Unterschied in der Reißfestigkeit der geschockten Tiere mit L-Arginin Substitution und der Kontrollgruppe feststellbar war (Abb. 12).

Abb. 11



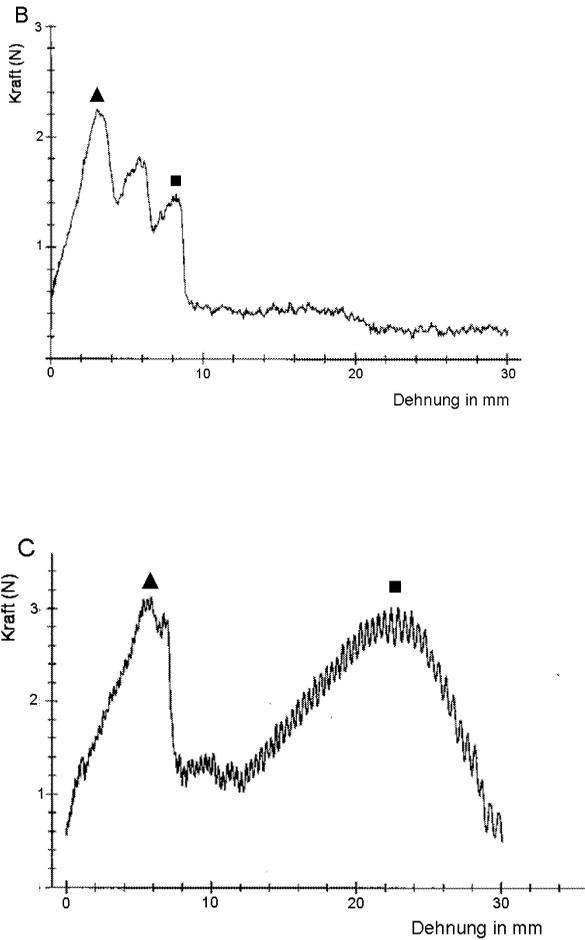


Abb. 11: Repräsentative Reißkurven der Abdominalhaut von männliche C3H/HeN Mäusen. Diese wurden nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation (A) mit Placebo (B) oder mit 300 mg/kg Körpergewicht L-Arginin (C) behandelt. Zehn Tage nach traumatisch hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation wurde die Reißfestigkeit der Abdominalhaut bestimmt. Die erste Spitze zeigt das Zerreißen der Haut (▲), die zweite das Zerreißen der darunter liegenden Muskelschicht (■) an.

Abb. 12

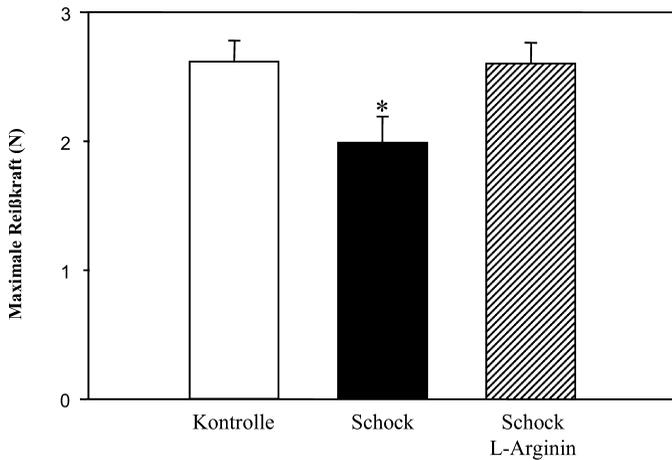


Abb. 12: Männliche C3H/HeN Mäuse wurden nach traumatisch-hämorrhagischem Schock oder Kontrolloperation mit Placebo oder mit L-Arginin (300 mg/kg Körpergewicht) behandelt. N=6/Gruppe. Nach zehn Tagen wurde die maximale Reißfestigkeit der Abdominalwand mittels Tensiometrie bestimmt. * $p < 0.05$ vs. Placebo behandelte Kontrolltiere. Die Balken bezeichnen Durchschnittswerte \pm Standardabweichung, Daten wurden mittels ANOVA analysiert.

5. DISKUSSION

5.1 Störung der Wundheilung nach Trauma und hämorrhagischem Schock

Eine Vielzahl von klinischen und experimentellen Studien demonstrieren eine schlechte bzw. beeinträchtigte Wundheilung nach Trauma, wie großen Operationen, Frakturen, Verbrennungen oder großen Bauchtraumata die mit hohem Blutverlust assoziiert sind[37;43;63;95]. Die nicht heilende Wunde stellt aufgrund späterer Gewebsentzündung und –Infektion eine entscheidende Quelle für eine beachtliche Morbidität- und Mortalitätsrate dar. Dieses Ereignis kann bei kritisch kranken Patienten insbesondere beobachtet werden, bei denen eine eingeschränkte Immunfunktion sowie eine schlechte Wundheilung vorliegt.

Eine funktionsfähige Wundheilung im eigentlichen Sinne erfordert eine Reihe von synchronisierten Vorgängen in denen unterschiedliche Zelltypen erfolgreich zusammenarbeiten müssen, um die Einheit des Gewebes wieder herzustellen. Zu diesen Reparaturvorgängen durch die einzelnen Zelltypen gehören unter anderem die Freisetzung von Zytokinen, Wachstumsfaktoren und anderer bioaktiver Molekülen, was durch die Interaktion der einzelnen Zellen gesteuert und geregelt wird.

In der Folge eines Traumas mit hämorrhagischem Schock kann es zur Ausbildung eines generalisierten Entzündungssyndroms kommen, das mit erhöhten Plasmakonzentrationen proinflammatorischer Zytokine einhergeht und einen wesentlichen Faktor in der Pathogenese des posttraumatischen Organversagens darstellt[38;45;90;127]. Dabei scheinen proinflammatorische Zytokine die Produktion von Kollagen und damit die Wundheilung negativ zu beeinflussen, wohingegen antiinflammatorische Zytokine die Kollagenanreicherung steigern[28;43;78;80]. Insbesondere die Ausschüttung von IL-1, IL-6 und TNF- α scheint in der Frühphase nach Trauma eine wesentliche Rolle bei der Aktivierung der Entzündungskaskade zu spielen. Diese lokalen immunologischen Veränderungen im Bereich der Wunde führen in ihrer Gesamtheit zu einer erhöhten Anfälligkeit gegenüber Wundinfektionen[88] und begünstigten die Entstehung von postoperativen Wundinfektionen die selbst wiederum Ausgangspunkt einer Sepsis sein können[58;71]. In diesem Zusammenhang stellte sich heraus, dass kontinuierlich erhöhte Konzentrationen dieser proinflammatorischen Zytokine im Plasma in Folge eines septischen Schocks, sowie nach Verbrennungen, Traumen und großen Operationen mit höheren Mortalitätsraten im weiteren Verlauf der Erkrankung verbunden sind.[82]

Die verminderte Funktion der Wundimmunzellen hat zur Folge, dass die anschließende

Wundheilung deutlich beeinträchtigt ist. Experimentell konnte dies in einer Studie an Mäusen belegt werden, die nach traumatisch-hämorrhagischem Schock eine deutlich herabgesetzte Wundfestigkeit zeigten[9].

In einigen neueren Studien stellte sich heraus, dass durch die Gabe der Aminosäure L-Arginin im Rahmen der Flüssigkeitssubstitution nach Trauma und Schock dieses Wundimmunzellfunktionsdefizit verbessert werden konnte[10]. Es blieb jedoch offen, ob diese lokale Immunantwort in der Wunde durch die Gabe von L-Arginin auch zu einer tatsächlichen Verbesserung des Wundheilungsprozesses nach Trauma und Schock führt.

Daher war das Ziel dieser Arbeit in einem blutdruckkontrolliertem Schockmodell an Mäusen festzustellen, ob die Behandlung mit L-Arginin im Rahmen der Flüssigkeitstherapie nach Trauma und Schock zu einer Verbesserung der Wundheilung führt. Als Kriterien der Wundheilung wurden die Kollagensynthese in der Wunde sowie die Wundreißfestigkeit als funktionelle Marker herangezogen.

5.2 Relevanz des verwendeten Tiermodells

Um die auftretenden pathophysiologischen Vorgänge der Wundheilung im Einzelnen genauer zu untersuchen und zu verstehen sowie um mögliche neue, effektivere Therapiestrategien zu entwickeln wurden deshalb zahlreiche Tiermodelle etabliert. Die experimentellen Studien, die den Effekt von Schock und schweren Trauma auf das Immunsystem untersuchten, verwendeten häufig Kleintiermodelle[112]. Bei dem im Rahmen unserer Studien angewandten Modell handelt es sich um das seit vielen Jahren im Labor von Dr. Chaudry bewährte traumatisch-hämorrhagische Schockmodell, welches ein Blutdruck kontrolliertes Verfahren darstellt. Dies ist ein nicht-letales Modell, welches deutliche immunologische Auswirkungen auf die Versuchstiere besitzt, ohne klinische Parameter, wie Nahrungsaufnahme, Putzverhalten etc. entscheidend zu beeinflussen. Blutdruck kontrollierte Schockmodelle erlauben im Gegensatz zu Volumen kontrollierten Versuchen eine Aussage über den entscheidenden Blutdruckverlauf, was die Standardisierung und Reproduzierbarkeit dieser Modelle erhöht[2].

Die Untersuchungen im Rahmen dieser tierexperimentellen Arbeit wurden an männlichen C3H/HeN Mäusen mit einem durchschnittlichen Alter von 4- bis 6 Wochen und einem Gewicht von etwa 24 - bis 27 g durchgeführt. Es wurde insbesondere darauf geachtet, dass die Tiere in ihrer physiologischen Konstellation identisch waren sowie keinerlei anderweitige Verletzungen bzw. Infektionen aufwiesen. Somit konnte sichergestellt werden, dass keine

zusätzlichen Störfaktoren die Ergebnisse beeinflussen. Die Versuchstiere wurden zunächst randomisiert und in drei Versuchsgruppen eingeteilt. An den Tieren der Kontrollgruppe wurde lediglich eine Laparotomie mit Schwämmchenimplantation durchgeführt. Die Tiere der Versuchsgruppen wurden zusätzlich zum Weichteiltrauma und Schwämmchenimplantation einem blutdruckkontrollierten, hämorrhagischen Schock mit anschließender Flüssigkeitstherapie unterzogen. Dabei erhielt ein Teil der Tiere zusätzlich 300 mg/kg Körpergewicht L-Arginin zu Beginn der Flüssigkeitstherapie. Die Menge an L-Arginin beruhte dabei auf den Ergebnissen früherer Studien und macht daher eine Vergleichbarkeit mit diesen möglich.[10;11]

Das Körpergewicht der Mäuse wurde sowohl präoperativ als auch in der postoperativen Phase bestimmt. Es wurden ausschließlich Tiere gleichen Alters, Gewichts und Ernährungszustands verwendet. Um auszuschließen, dass sich die Unterschiede in der Wundheilung aufgrund unterschiedlicher Ernährungszustände ergaben, wurden die Tiere nach Trauma und Schock bzw. Kontrolloperation täglich gewogen. Dabei stellte sich heraus, dass der durchgeführte hämorrhagische Schock keine Auswirkung auf den Verlauf des Körpergewichtes mit sich brachte.

Sieben Tage nach Trauma und hämorrhagischem Schock wurde Kollagen I und III in der Wunde mittels Western Blot-Analyse gemessen. Hydroxyprolin, ein Metabolit der Kollagensynthese, wurde ebenfalls am siebten Tag mittels eines gaschromatographischen Verfahrens in der Wundflüssigkeit bestimmt. Die Reißfestigkeit der Bauchwunde (abdominale Wunde) wurde in separaten Tieren zehn Tage nach Trauma und Schock gemessen.

5.3 Relevanz der bestimmten Parameter und verwendeten Methoden

5.3.1 Gewicht der Tiere im Versuchsverlauf

Sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen führt eine protein- und kalorienarme Diät, die mit einer katabolen Stoffwechsellage und einem Gewichtsverlust verbunden ist, zu signifikanten Wundheilungsstörungen[21;65;116]. In unseren Studien wurden die Versuchstiere prä- und postoperativ gewogen und mit keiner speziellen Diät ernährt. Es fanden sich keine Unterschiede im Körpergewicht zwischen den Versuchsgruppen als Hinweis auf eine vergleichbare Nahrungsaufnahme bei den Versuchstieren. Die Tiere boten keine katabole Stoffwechsellage, die die Wundheilung unabhängig von Trauma und Schock

hätte beeinträchtigen können. Diese Daten deuten daraufhin, dass unterschiedliche Nahrungsaufnahme nicht für die beobachteten Unterschiede in der Wundheilung zwischen den Versuchsgruppen verantwortlich ist.

5.3.2 Hydroxyprolin, Kollagen I und III Bestimmung

Die Aminosäure Hydroxyprolin wird im Organismus fast ausschließlich im Kollagen gefunden und kann als ein Metabolit der Kollagensynthese gesehen werden. Eine Reihe von Studien quantifiziert die Kollagensynthese anhand des Hydroxyprolingehaltes eines Gewebes, da hier eine Korrelation nachgewiesen werden kann[33;139]. Das Granulationsgewebe wurde mittels Zentrifugation aus den implantierten Polyethylenschwämmchen gewonnen und enthält alle in der Wunde vorkommenden Strukturen und Zellen. Aus dieser Wundflüssigkeit wurde Hydroxyprolin mittels Gaschromatographie bestimmt, was eine modifizierte Variante der Methode von Woessner et al. darstellt[139]. Da die gewonnene Wundflüssigkeit eine sehr geringe Menge darstellte (ca. 50 bis 100µl), war eine rein spektral-photometrische Analyse wie in der von Woessner et al. beschriebenen Methode nicht möglich.

In dieser Studie konnte ein signifikanter Abfall des Hydroxyprolingehaltes in der Wunde nach hämorrhagischem Schock nachgewiesen werden. Die im Rahmen der Flüssigkeitstherapie verabreichte Aminosäure L-Arginin hingegen führte zu einer signifikanten Verbesserung dieses Defizits. So konnte gezeigt werden, dass nach L-Arginin Behandlung eine vergleichbare Menge an Hydroxyprolin in der Wunde wie nach Kontrolloperation nachweisbar ist. Allerdings soll darauf hingewiesen werden, dass die Hydroxyprolinbestimmung ausschließlich am siebten postoperativen Tag erfolgte. Weitere Studien sind nötig, um eine Aussage über den zeitlichen Verlauf des Hydroxyprolins in der Wunde treffen zu können.

Kollagene bilden eine Gruppe von Proteinen, die als wichtigster faseriger Bestandteil von Haut, Knochen, Sehnen, Knorpel, Blutgefäßen und Zähnen das quantitativ häufigste Protein bei Säugetieren darstellen, und im Mittel etwa ein Viertel des Gesamtproteingewichtes ausmachen. Bei den Kollagenen werden verschiedene Arten unterschieden, die durch Modifizierungen ihrem jeweiligen Aufgabenfeld angepasst sind. Allen Kollagenen gemeinsam ist die Anordnung in einer Tripel-Helix durch drei, jeweils etwa 1000 Aminosäuren langen, sogenannte alpha-Ketten[24;111]. Diese zeigen eine sehr charakteristische Grundstruktur; sie bestehen zu einem Drittel aus Glyzin, etwa 10% Prolin, 10% Hydroxyprolin und variablen Mengen Hydroxylysin. Die Menge des Kollagens in der

Wunde korreliert gleichsinnig mit der Wundreißfestigkeit[114;126].

Die Explantation der Polyvinylschwämmchen und Asservierung der Hautproben erfolgte am siebten postoperativen Tag. Zu diesem Zeitpunkt steht im Wundbereich die Bildung des Granulationsgewebes, die Angiogenese und Synthese der extrazellulären Matrix im Vordergrund[67;115;119].

Es zeigte sich in dieser Studie eine signifikant verringerte Kollagenmenge nach hämorrhagischem Schock in der Wunde. In diesem Sinne konnte bereits in einer Reihe von Studien eine unterdrückte Kollagensynthese nach Trauma und Schock nachgewiesen werden. So stellte Diegelmann et al. eine Verringerung des Kollagens in experimentell verursachten Wunden bei polytraumatisierten Patienten im Vergleich zu gesunden Freiwilligen dar[43].

Der protektive Effekt von L-Arginin auf den Kollagengehalt sowie die Hydroxyprolinsynthese wird durch weitere Studien erhärtet, die zeigen, dass der verminderte Kollagengehalt in Wunden von chirurgischen Patienten durch die Ergänzung mit L-Arginin verbessert werden kann[20]. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die kontinuierliche Behandlung mit L-Arginin von Patienten mit einem implantierten polytetrafluoroethylen Katheter das subkutane Hydroxyprolin und die Kollagensynthese verbessert[76;137].

In dieser Studie wurde zunächst die asservierte Wundhaut mechanisch homogenisiert und mittels Lysepuffer lysiert. Kollagen I und III wurde mittels Western Blot-Analyse in der Wunde bestimmt. Diese Methode stellt ein sehr sensibles Verfahren dar und ermöglicht es, auch geringe Mengen des Proteins nachzuweisen. Bereits in einer früheren Arbeit konnte Angele et al. eine unterdrückte Kollagenexpression in der Wunde nach Trauma und Schock histochemisch nachweisen[9]. Die histochemische Darstellung von Strukturproteinen wie dem Kollagen stellt allerdings eine reine qualitative Methode dar. Um eine genauere Aussage über tatsächliche Menge an Kollagen in der Wunde machen zu können wurde in dieser Studie die semiquantitative Methode des Western Blot verwendet. Um allerdings genauere Aussagen über den Verlauf des Kollagengehalts in der Wunde machen zu können, sind weitere Studien nötig, da sich diese Studie nur auf einen Zeitpunkt der Kollagenbestimmung konzentrierte.

5.3.3 TGF- β Bestimmung

TGF- β (*transforming growth factor-beta*) ist einer der Schlüsselfaktoren der epithelialen Wundheilung und im Entzündungsgeschehen[141]. In vitro-Studien konnten an IEC-6-Monolayern zeigen, dass bei einer Verletzung eine Reihe von Zytokinen und Wachstumsfaktoren (TGF, EGF, IL-1 β) die Produktion von TGF- β erhöhen und somit zu einer beschleunigten Zellrestitution führen[44;57]. Auf der einen Seite erhöht TGF- β die

Restitution von intestinalen Epithelien, andererseits inhibiert es jedoch gleichzeitig ihre Proliferation[34].

Die Wirkungen einzelner Wachstumsfaktoren bei der komplexen Wundheilung im menschlichen Körper sind letztlich nicht erforscht. Bislang wurden verschiedene Aktivitäten erst durch *in vitro* Experimente bestimmt. Wachstumsfaktoren können eine Reihe unterschiedlicher Prozesse in verschiedenen Phasen der Wundheilung sowohl initiieren als auch terminieren. Weil Thrombozyten unter anderem Wachstumsfaktoren wie PDGF, TGF und EGF produzieren können, sind sie essentieller Baustein der Wundheilung. Zu Beginn der Wundheilung (innerhalb der ersten 48 Stunden) werden Wachstumsfaktoren primär von Thrombozyten freigesetzt. Im weiteren Verlauf sind auch andere Zellen - vor allem Makrophagen - in der Lage, Wachstumsfaktoren zu produzieren. Neben der Hämostase und Proliferation spielen Wachstumsfaktoren (EGF, TNF, IL-1 und PDGF) auch bei der Reifung des Bindegewebes eine Rolle, indem sie die Kollagenasen stimulieren.

Die Expression von TGF- β wurde in der vorliegenden Studie mittels Western Blot-Analyse bestimmt, da in früheren Arbeiten gezeigt werden konnte, dass dieser Wachstumsfaktor die Kollagensynthese in Fibroblasten *in vitro* induziert[122]. In diesen Studien wurde nachgewiesen, dass die exogene Verabreichung von TGF- β *in vivo* zu einer gesteigerten Kollagenansammlung in der Wunde führt. Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass die TGF- β Freisetzung durch Wundexsudatzellen *in vitro* bis zum dritten Tag nach Trauma und Schock herabgesetzt war[9]. Daher kann angenommen werden, dass eine herabgesetzte TGF- β Synthese in der Wunde unmittelbar nach stattgefundenem Trauma den Prozess der Wundheilung beeinflusst. Ob nun L-Arginin die TGF- β Freisetzung innerhalb der ersten drei Tage nach Trauma und Schock beeinflusst, bleibt weiterhin offen.

In dieser Studie stellte sich kein signifikanter Unterschied der TGF- β Synthese bei den unterschiedlichen Versuchsgruppen dar. Erst in zukünftigen Studien, bei denen Tiere nach Trauma und Schock TGF- β sowohl ausschließlich mit Flüssigkeit als auch in Kombination mit L-Arginin erhalten (mit/ohne Antikörper), wird geklärt werden können, welche Rolle dieser Mediator bei der Regulation der Wundheilung nach Schock spielt. Ob L-Arginin die unterdrückte TGF- β Synthese innerhalb der ersten 3 Tage nach Schock beeinflusst und so die Wundheilung zu einem anderem Zeitpunkt verbessert konnte mit der jetzigen Studie nicht untersucht werden.

5.3.4 Reißfestigkeit der Wunde

Die Reißfestigkeit der Wunde ist ein direktes Maß der Wundfestigkeit und korreliert gleichsinnig mit dem Kollagengehalt der Wunde[19;60;117;126]. Die Wundfestigkeit wird durch das Ausmaß der Kollagenablagerung und –Formation sowie der Wundmodulation im verletzten Gewebe bestimmt[51]. Neben dem quantitativen Ausmaß der Kollagenablagerung spielt auch die Quervernetzung der Kollagenfibrillen eine wichtige Rolle bei der Stabilität und Zugfestigkeit der Kollagenfasern[87].

In vorangegangenen Studien unserer Arbeitsgruppe konnte bereits gezeigt werden, dass Trauma und hämorrhagischer Schock zu einer herabgesetzten Reißfestigkeit der Wunde führt[9;104]. Dies konnte bisher nicht nur in tierexperimentellen Studien belegt werden. So war es Guiney et al.[63] und Mc Ginn et al.[95] gelungen zu zeigen, dass Patienten, die notfallmäßig laparotomiert wurden und einen größeren Blutverlust erlitten hatten eine herabgesetzte Wundstabilität aufwiesen. Diese stellte sich klinisch bei diesen Patienten in erster Linie als postoperativer Platzbauch dar.

Die Messung der Hautreißfestigkeit wurde in dieser Studie mittels eines Tensiometers ausschließlich am zehnten postoperativen Tag durchgeführt. Dieser Zeitpunkt wurde gewählt, da in den biochemischen Abläufen der Wundheilung am zehnten Tag nach Trauma ein Maximum an Kollagen I Synthese stattfindet und Kollagen I unmittelbar für die Festigkeit des neu entstehenden Gewebes verantwortlich scheint[67;115;119]. Die Messung erfolgte an einem definierten präparierten Wundstück, bei dem die Haut nicht von der darunter liegenden Muskulatursschicht getrennt wurde. Damit konnte eine Verschlechterung der Wundfestigkeit durch chirurgische Präparation vermieden werden. Gemessen wurde die maximale Kraft, die aufgewendet werden muss, um die Wunde zu zerreißen. Dabei zeigt sich in der Auswertung ein zwei gipfelter Graph, wobei der erste die Kraft darstellt, die nötig ist um die Haut, der zweite die um die darunter liegenden Muskelschicht zu zerreißen.

Die Ergebnisse dieser Messung zeigten, dass Trauma und Schock zu einer makroskopisch verifizierbaren Verschlechterung der Wundstabilität führt. Bei den Tieren, die dem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden stellte sich ein signifikant geringerer Kraftaufwand dar, der nötig ist um die Haut zu zerreißen. Die Substitution der Aminosäure L-Arginin hingegen konnte dieses Defizit ausgleichen, so dass sich bei diesen Tieren ähnlich stabile Wundverhältnisse wie bei der Kontrollgruppe darstellten.

5.3.5 Grenzen der Studie

Aus dieser Studie lässt sich nicht ableiten, ob die Ergebnisse auf eine Verzögerung oder eine bleibende Störung der Wundheilung hinweisen. Hierzu müsste man die Parameter über einen wesentlich längeren Zeitraum hinweg zu mehreren Zeitpunkten bestimmen und untersuchen, ob eine mögliche Wundheilungsverzögerung wieder aufgeholt werden kann. In diesem Zusammenhang konnte Levenson et al. in histologischen Studien zeigen, dass sieben Tage nach Brandverletzung eine gestörte Wundheilung vorlag, wohingegen vierzehn Tage nach Trauma sich ein völlig normales histologisches Bild darstellte, dass keine Anzeichen einer gestörten Wundheilung aufwies[85]. Weiterhin wiesen Tiere, die einer polymikrobiologischen Sepsis ausgesetzt wurden, eine herabgesetzte Wundfestigkeit bis zu vierzehn Tagen nach Infektion auf[62]. Drei bis fünf Wochen nach Infektion konnte allerdings kein Unterschied mehr in der Wundreißfestigkeit von infizierten und nicht-infizierten Tieren festgestellt werden[62].

Daher muss die Überlegung angestellt werden, dass die Wundheilung auch bei Tieren, die nicht mit L-Arginin behandelt wurden zu einem späteren Zeitpunkt völlig normal und ungestört sein kann. Unabhängig davon ist der Schutz vor einer gestörten Wundheilung unmittelbar nach dem traumatischen Ereignis von herausragender Bedeutung, da das Risiko von co-morbiden Ereignissen deutlich gesenkt werden kann und damit potentiell katastrophale Effekte wie z.B. eine Wundinfektion vermindert werden können.

5.4 Mögliche Mechanismen und Effekte von L-Arginin

5.4.1 L-Arginin als Substrat der Stickstoffmonoxidsynthasen

1980 entdeckten Furchgott und Zawadski, dass ein intaktes Endothel für die acetylcholininduzierte Dilatation glatter Gefäßmuskulzellen notwendig ist. Es wurde postuliert, dass vom Endothel eine Substanz synthetisiert wird, die für diesen Effekt verantwortlich ist. Zunächst wurde diese Substanz als *endothelium derived relaxing factor* (EDRF) bezeichnet[56]. 1987 identifizierten nahezu zeitgleich mehrere Gruppen, dass EDRF mit Stickstoffmonoxid (NO) identisch ist[52;75;89;131]. Seitdem ist der L-Arginin-/NO-Stoffwechsel ein in der medizinischen Forschung intensiv bearbeitetes Gebiet. Die semi-essentielle Aminosäure L-Arginin wird durch NO-Synthasen (NOS) zu L-Citrullin und NO verstoffwechselt[35;79] (Abb.13).

Abb. 13

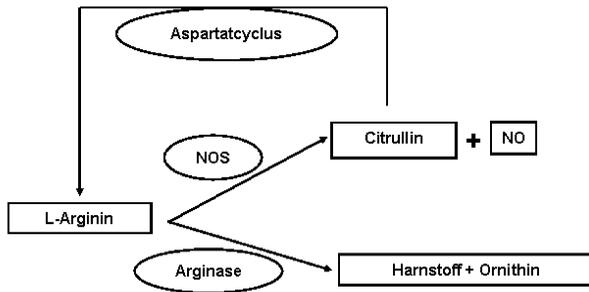


Abb. 13: Abbau von L-Arginin zu NO und Citrullin via NOS sowie zu Harnstoff und Ornithin via Arginase. Citrullin wird dabei über den Aspartatcyclus zu Arginin regeneriert.

Diese Reaktion wird durch Stickstoffmonoxidsynthasen katalysiert, wobei L-Arginin dabei das einzige physiologische Substrat der Reaktion darstellt, das den Stickstoff für die NO-Synthese liefert. Bisher werden zwei Typen der NO-Synthasen unterschieden, die induzierbare NO-Synthase (iNOS) und die konstitutive NO-Synthase (cNOS), zu der die endotheliale NOS (eNOS) und die neuronale NOS (nNOS) zählen[72].

Der grundsätzliche biologische Unterschied der NOS-Unterformen scheint darin zu bestehen, dass die konstitutiven NOS durch biologische Stimuli für einen begrenzten Zeitraum im Bereich von Sekunden NO in der Größenordnung von 10 picomolaren Konzentrationen synthetisieren können, während die iNOS nach Induktion in der Lage ist, für Stunden bis Tage NO in nanomolaren, also drei bis vier Zehnerpotenzen höheren, Konzentrationen zu produzieren.

Neben den verschiedenen NOS-Isoformen mit den oben beschriebenen Wirkungen dient L-Arginin auch anderen Enzymen als Substrat[3]. So spaltet das Enzym Arginase L-Arginin in L-Ornithin und Harnstoff (Abb.13). Der Arginase-Weg stellt einen wichtigen biochemischen Pfad dar, von dem bekannt ist, dass er unter Umständen mit der durch die NO Synthasen katalysierten Reaktion um das Substrat L-Arginin in Konkurrenz stehen oder eine Regelfunktion auf diese ausüben[81;83].

Das bei der Arginase-Reaktion bereitgestellte Ornithin wird durch das Enzym Ornithin-Decarboxylase (ODC) zu Putrescin und dieses weiter zu Spermin und Spermidin verstoffwechselt. Diese drei Substanzen spielen als sogenannte Polyamine bei der DNA- und Proteinsynthese und damit im Bereich von Zellwachstum und -reparatur eine wichtige Rolle[142]. Außerdem wird L-Ornithin über einen parallelen Enzymschritt von der Ornithinaminotransferase (OAT) zu L-Prolin weitersynthetisiert[25], das bekanntermaßen

eine wichtige Bedeutung für die Kollagensynthese und damit für die Bindegewebsbildung hat, da ca. 12% des Kollagenmoleküls aus hydroxyliertem L-Prolin bestehen. Im Rahmen von fibrosierenden Prozessen könnte vor diesem Hintergrund das Ausmaß der Prolinbiosynthese bedeutsam sein. Ein weiteres Enzym, das L-Arginin abbaut, ist die Arginin-Decarboxylase (ADC). Bei diesem Schritt entstehen Agmatin und CO₂, wobei die Bedeutung von Agmatin noch weitgehend unklar ist[68;99].

5.4.2 Potentielle Mechanismen von L-Arginin

Im Schockgeschehen kommt es zu einer Dysfunktion der Endothelzellen, was zu einem gesteigertem Gefäßwiderstand, gesteigerter Plättchenaggregation sowie Neutrophileninfiltration und somit zu einer Verminderung der Organdurchblutung führt welche zur Gewebsschädigung bis hin zum Gewebsuntergang des betroffenen Organs führt. Eine Vielzahl von aktuellen Studien weisen darauf hin, dass hier NO eine entscheidende Rolle bei der Regulation des Gefäßtonus, der Inflammation, der Immunfunktion, der Endothelzellfunktion und der Zelladäsion spielt[22;123;142] (Abb.14).

Die genauen zugrunde liegenden Mechanismen, die nun den protektiven Effekt von L-Arginin auf die Wundheilung erklären könnten, sind nach wie vor unbekannt. Biochemisch kann angenommen werden, dass durch die Metabolisierung des L-Arginins mittels der endothelständige Stickstoffmonoxidase (eNOS) sowohl Stickstoffmonoxid (NO) als auch Citrullin entstehen. Das freie NO wiederum führt als Vasodilatator zu einer Relaxierung der Gefäßmuskulatur was sich als Steigerung der Gewebepfusion auswirkt. Die Organperfusion wird aufgrund der stattfindenden Vasodilatation erhöht, die Wundzellfunktion wird gesteigert, lokale Inflammation unterdrückt und schließlich die Wundheilung aufgrund der gesteigerten Kollagensynthese verbessert. Dieser Mechanismus könnte für die Steigerung der Durchblutung in der Wunde verantwortlich sein. So konnte in experimentellen Studien eine Normalisierung der unterdrückten Organdurchblutung durch L-Arginin nach Trauma und Schock erreicht werden[10;13]. Weiterhin stellte sich im Tierexperiment heraus, dass L-Arginin zu einer Verbesserung des outcomes von Tieren mit Sepsis, Trauma, ischämischen Reperfusionstörungen und Verbrennungen führt[142].

Ein ebenfalls wichtiger Aspekt ist die Halbwertszeit von L-Arginin. In dieser Hinsicht konnte Angele et al. zeigen, dass L-Arginin nur für wenige Stunden nach der Administration im Plasma verfügbar ist und als Substrat der Stickstoffmonoxidsynthasen zur Verfügung steht[11-13]. Hier sind weitere Studien erforderlich um die genaue Kinetik und Dynamik von L-Arginin im Organismus zu verifizieren, in denen die L-Arginin Gabe nicht auf einen

Zeitpunkt beschränkt bleibt.

Abb. 14

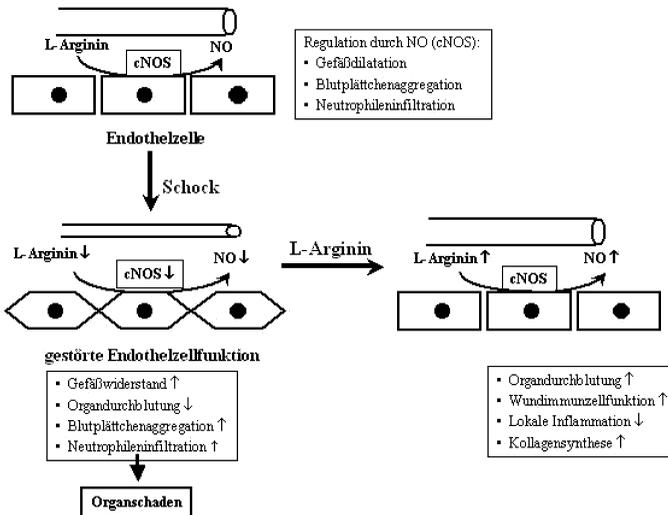


Abb.14: Mögliche Wirkmechanismus von L-Arginin

5.5 Klinische Relevanz

Wie in dieser tierexperimentellen Arbeit gezeigt werden konnte, führt L-Arginin im akuten Schockgeschehen zu einer Verbesserung der Wundheilung. Auch in einigen klinischen Studien gibt es Hinweise auf einen protektiven Effekt von L-Arginin auf die Wundheilung[39;96;102;134;140]. So stellt unter anderem die schlechte postoperative Wundheilung eine gefürchtete Komplikation des operierten Magenkarzinoms dar. Hier konnte nachgewiesen werden, dass die frühe postoperative Nahrungsergänzung unter anderem mit Arginin nach Gastrektomie die Hydroxyprolinsynthese in der Operationswunde steigert und somit eine Verbesserung der Wundheilung erzielt wird[50].

Ein in der klinischen Praxis immer häufiger angewendetes Verfahren stellt die lokale

Applikation von Aminosäuren dar. So stellte sich heraus, dass L-Arginin als lokale Anwendung bei chronischen Wunden zu einer Verbesserung des Outcomes führt[61]. Auch konnte klinisch ein positiver Effekt von L-Arginin auf das chronische diabetische Fußulkus gezeigt werden[14]. Hier erfolgte die Verabreichung der Aminosäure subkutan am Wundrand des Ulcus. Die verbesserte Wundheilung konnte durch Wundbiopsien lichtmikroskopisch, histo- und immunhistochemisch nachgewiesen werden.

Die aufgeführten klinischen Studien lassen in ihrer Gesamtheit auf zahlreichen positive Effekte und Anwendungsmöglichkeiten der Aminosäure L-Arginin schließen. Dieser Bereich der medizinischen Forschung steht derzeit im Mittelpunkt zahlreicher Studien. Allerdings bedarf es noch weit reichender Forschungsaktivitäten, sowohl im experimentellen wie auch im klinischen Bereich, um die potentiellen Effekte dieser einfachen Aminosäure auf den Organismus in ihrer Komplexität zu verstehen und daraus Konsequenzen für die klinische Therapie von Traumen und Krankheiten zu ziehen.

Zusammenfassend zeigt die gegenwärtige Studie, dass die Aminosäure L-Arginin während der frühen Phase der Flüssigkeitstherapie nach traumatisch-hämorrhagischem Schock den verschlechterten Wundheilungsprozess zu verbessern scheint indem es möglicherweise die unterdrückte Kollagensynthese in der Wunde verbessert. Da bereits seit langem bekannt ist, dass eine verzögerte und verschlechterte Wundheilung mit einer erhöhten Rate an Wundkomplikationen einhergeht, lassen die Ergebnisse dieser Studie annehmen, dass die Gabe der Aminosäure L-Arginin die Zahl der Wundinfektionen nach schwerem Blutverlust verringern könnte.

Deshalb könnte der Ansatz, die Wundheilung durch die Verabreichung der physiologischen Aminosäure L-Arginin zu verbessern, einen hilfreichen und nützlichen Weg darstellen, die Häufigkeit von post operativen Wundkomplikationen chirurgischer Patienten und Traumapatienten nach schwerem Blutverlust zu verringern.

6. ZUSAMMENFASSUNG

Eine Reihe von klinischen und experimentellen Studien deutet auf eine verschlechterte Wundheilung nach Trauma und Schock hin. Dafür scheint die verminderte Funktion der Wundimmunzellen verantwortlich zu sein. Wie bereits in klinischen und experimentellen Studien gezeigt werden konnte, führt eine Verabreichung der Aminosäure L-Arginin zu einer Normalisierung der Wundimmunzellfunktion unter diesen Bedingungen. Es blieb jedoch unbekannt, ob die Aminosäure auch die Wundheilung nach traumatisch hämorrhagischem Schock verbessert. Um dies zu untersuchen wurde an männliche C3H/HeN Mäuse einer Mittellinienlaparotomie durchgeführt, um so ein Weichteiltrauma zu induzieren. Anschließend wurden Polyvinyl-Schwämmchen subkutan an der Wunde implantiert und die Tiere wurden einem blutdruckkontrollierten hämorrhagischen Schock unterzogen. Dabei wurde der mittlere arterielle Blutdruck von ursprünglich 90 ± 5 mmHg für 90 Minuten auf 35 ± 5 mmHg gesenkt. Die Kontrollgruppe erhielt lediglich eine Laparotomie. Während der anschließenden Phase der Flüssigkeitstherapie erhielten die Tiere die vierfache Menge des abgenommenen Blutvolumens entweder in Form von reiner Ringer Lactat Lösung oder zusätzlich mit 300 mg / kg Körpergewicht L-Arginin.

Sieben Tage später wurde in der Wundflüssigkeit die Menge an Hydroxyprolin, einem Metabolit der Kollagensynthese, mittels Gaschromatographie gemessen. Ebenso wurde Kollagen I und III sowie TGF- β in der Wunde mittels Western Blot Analyse bestimmt. Zusätzlich wurde an separaten Tieren, zehn Tage nach hämorrhagischem Schock die Reißfestigkeit der Wunde mittels eines Tensiometers festgestellt.

Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass Hydroxyprolin nach hämorrhagischem Schock signifikant erniedrigt war. L-Arginin hingegen vermochte dieses Defizit an Hydroxyprolin auszugleichen. Ebenfalls zeigte sich durch L-Arginin eine Normalisierung des unterdrückten Kollagen I und III Gehalts in der Wunde nach Schock. TGF- β war sieben Tage nach Schock nicht signifikant verändert. Ferner konnte nachgewiesen werden, dass die Verminderung der Reißfestigkeit der Wunde nach Trauma und Schock durch L-Arginin verbessert werden kann. Zusammenfassend konnte deutet diese Arbeit darauf hin, dass die Verabreichung der Aminosäure L-Arginin nach hämorrhagischem Schock zu einer Verbesserung der Wundheilung führt. L-Arginin könnte somit eine neue und effektive Methode zur Ergänzung der Flüssigkeitssubstitution nach Trauma und Blutverlust darstellen, um die Rate an Wundkomplikationen zu reduzieren.

7. LITERATURVERZEICHNIS

1. *Tierschutzgesetz der Bundesrepublik Deutschland: Bundesgesetzblatt Teil 1*. 1998.
2. Abraham, E., Richmond, J. N., and Chang, Y. H. Effects of hemorrhage on interleukin-1 production. *Circ. Shock* **25**:33-40, 1988.
3. Albina, J. E., Mills, C. D., Henry, W. L., Jr., and Caldwell, M. D. Regulation of macrophage physiology by L-arginine: Role of the oxidative L-arginine deiminase pathway. *J. Immunol.* **143**:3641-3646, 1989.
4. Angele, M. K. and Faist, E. Immunosuppression with injury and operation and increased susceptibility to infection. In A. E. Baue, E. Faist, and D. Fry (Eds.), *SIRS, MODS and MOF - Systemic inflammatory response syndrome, multiple organ failure - pathophysiology, prevention and therapy*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer Verlag, 2000. Pp. 134-142.
5. Angele, M. K., Fitzal, F., Smail, N., Knoferl, M. W., Schwacha, M. G., Ayala, A., Wang, P., and Chaudry, I. H. L-Arginine attenuates trauma-hemorrhage induced liver injury. *Crit Care Med* **28**:3242-3248, 2000.
6. Angele, M. K., Knoferl, M. G., Schwacha, M. G., and et.al. Increased proinflammatory cytokines at the wound site following trauma-hemorrhage: A potential mechanism for delayed wound healing. *Surgery* **126**:279-285, 1999.
7. Angele, M. K., Knoferl, M. W., Ayala, A., Albina, J. E., Cioffi, W. G., Bland, K. I., and Chaudry, I. H. Trauma-hemorrhage delays wound healing potentially by increasing proinflammatory cytokines at the wound site. *Surgery* **126**:279-285, 1999.
8. Angele, M. K., Knoferl, M. W., Schwacha, M. G., Ayala, A., Bland, K. I., Cioffi, W. G., Josephson, S. L., and Chaudry, I. H. Hemorrhage decreases macrophage inflammatory protein-2 (MIP-2) and IL-6 release: A possible mechanism for increased wound infection. *Ann Surg* **229**:651-661, 1999.

9. Angele, M. K., Knoferl, M. W., Schwacha, M. G., Ayala, A., Cioffi, W. G., Bland, K. I., and Chaudry, I. H. Decreased collagen deposition at the wound site following hemorrhage: A potential mechanism for impaired wound healing. *Crit Care Shock* 3, 49-56. 2000.
10. Angele, M. K., Nitsch, S. M., Hernandez-Richter, T., Angele, P., Hatz, R. A., Wichmann, M. W., and Schildberg, F. W. L-Arginine: A unique amino acid for improving depressed wound immune function following hemorrhage. *Eur Surg Research* 34, 53-60. 2002.
11. Angele, M. K., Smail, N., Ayala, A., Cioffi, W. G., Bland, K., and Chaudry, I. H. L-arginine: a unique amino acid for restoring the depressed immune functions after trauma-hemorrhage. *J Trauma* 46:34-41, 1998.
12. Angele, M. K., Smail, N., Knoferl, M. W., Ayala, A., Cioffi, W. G., and Chaudry, I. H. L-arginine restores splenocyte functions after trauma-hemorrhage potentially by improving splenic blood flow. *Am J Physiol* 276:C145-C151, 1999.
13. Angele, M. K., Smail, N., Wang, P., Cioffi, W. G., Bland, K. I., and Chaudry, I. H. L-Arginine restores the depressed cardiac output and regional perfusion following trauma-hemorrhage. *Surgery* 124:394-401, 1998.
14. Arana, V., Paz, Y., Gonzalez, A., Mendez, V., and Mendez, J. D. Healing of diabetic foot ulcers in L-arginine-treated patients. *Biomed. Pharmacother.* 58:588-597, 2004.
15. Arsura, M., Wu, M., and Sonenshein, G. E. TGF beta 1 inhibits NF-kappa B/Rel activity inducing apoptosis of B cells: transcriptional activation of I kappa B alpha. *Immunity*. 5:31-40, 1996.
16. Ashcroft, G. S. Bidirectional regulation of macrophage function by TGF-beta. *Microbes. Infect.* 1:1275-1282, 1999.

17. Ayala, A., Deol, Z. K., Lehman, D. L., Herdon, C. D., and Chaudry, I. H. Polymicrobial sepsis but not low dose endotoxin infusion causes decreased splenocyte IL-2/IFN-gamma release while increasing IL- 4/IL-10 production. *J. Surg. Res.* **56**:579-585, 1994.
18. Baldwin, A. S. The NF-kB and Ikb proteins: New discoveries and insights. *Ann. Rev. Immunol.* **14**:649-681, 1996.
19. Barbul, A., Fishel, R. S., Shimazu, S., Wasserkrug, H. L., Yoshimura, N. N., Tao, R. C., and Efron, G. Intravenous hyperalimentation with high arginine levels improves wound healing and immune function. *J. Surg. Res.* **38**:328-334, 1985.
20. Barbul, A., Lazarou, S. A., Efron, D. T., Wasserkrug, H. L., and Efron, G. Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans. *Surgery* **108**:331-336, 1990.
21. Barbul, A. and Purtil, W. A. Nutrition in wound healing. *Clin Dermatol* **12**:133-140, 1994.
22. Basu, H. N. and Liepa, G. U. Arginine: a clinical perspective. *Nutr Clin Pract.* **17**:218-225, 2002.
23. Baue, A. E. Multiple Organ Failure. In A. E. Baue (Ed.), *Multiple Organ Failure: Patient Care and Prevention*. St. Louis,MO: Mosby Year Book, 1990. Pp. 421-470.
24. Bernstein, E. F., Salomon, G. D., Harisiadis, L., Talbot, T., Harrington, F., Russo, A., and Uitto, J. Collagen gene expression and wound strength in normal and radiation-impaired wounds. *J. Dermatol. Surg. Oncol.* **19**:564-570, 1993.
25. Bertolo, R. F., Brunton, J. A., Pencharz, P. B., and Ball, R. O. Arginine, ornithine, and proline interconversion is dependent on small intestinal metabolism in neonatal pigs. *Am J Physiol Endocrinol. Metab* **284**:E915-E922, 2003.

26. Biffl, W. L., Moore, E. E., Moore, F. A., Barnett, J. C. C., Carl, V. S., and Peterson, V. M. Interleukin-6 (IL-6) delays neutrophil (PMN) apoptosis via a mechanism involving platelet-activating factor (PAF). *Journal of Trauma* 39, 163. 1995.
27. Bone, R. C. Toward an epidemiology and natural history of SIRS (systemic inflammatory response syndrome). *JAMA* 268:3452-3455, 1992.
28. Brown, G. L., Curtsinger, L. J., White, M., Mitchell, R. O., Pietsch, J., Nordquist, R., von, F. A., and Schultz, G. S. Acceleration of tensile strength of incisions treated with EGF and TGF- beta. *Ann Surg* 788-794, 1988.
29. Buck, M., Houglum, K., and Chojkier, M. Tumor necrosis factor-alpha inhibits collagen alpha I(I) gene expression and wound healing in a murine model of cachexia. *Am. J Pathol.* 149:195-204, 1996.
30. Bühren, V. Pathophysiologie des Schocks. *Unfallchirurg* 99:207-220, 1996.
31. Chaudry, I. H. and Ayala, A. *Immunological Aspects of Hemorrhage*. Austin, TX: Medical Intelligence Unit; R.G. Landes Company, 1992.
32. Christ, M., McCartney-Francis, N. L., Kulkarni, A. B., Ward, J. M., Mizel, D. E., Mackall, C. L., Gress, R. E., Hines, K. L., Tian, H. and Karlsson, S. Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J. Immunol.* 153:1936-1946, 1994.
33. Chyun, J. H. and Griminger, P. Improvement of nitrogen retention by arginine and glycine supplementation and its relation to collagen synthesis in traumatized mature and aged rats. *J. Nutr.* 114:1697-1704, 1984.
34. Ciacci, C., Lind, S. E., and Podolsky, D. K. Transforming growth factor beta regulation of migration in wounded rat intestinal epithelial monolayers. *Gastroenterology* 105:93-101, 1993.
35. Crawford, N. M. Mechanisms for nitric oxide synthesis in plants. *J Exp. Bot.* 57: 471-478, 2006.

36. Creemers, L. B., Jansen, D. C., van Hennessey, P., Ko, F., and Robson, M. C. Microassay for the assessment of low levels of hydroxyproline. *Biotechniques* **22**:656-658, 1997.
37. Crowley, L. V., Seifter, E., Kriss, P., Rettura, G., Nakao, K., and Levenson, S. M. Effects of environmental temperature and femoral fracture on wound healing in rats. *J Trauma* **17**:436-445, 1977.
38. Damas, P., Reuter, A., Gysen, P., Demonty, J., Lamy, M., and Franchimont, P. Tumor necrosis factor and interleukin-1 serum levels during severe sepsis in humans. *Crit. Care Med.* **17**:975-978, 1989.
39. de Luis DA, Izaola O, Cuellar L, Terroba MC, and Aller R Randomized clinical trial with an enteral arginine-enhanced formula in early postsurgical head and neck cancer patients. *Eur J Clin Nutr.* **58**:1505-1508, 2004.
40. DeCamp, M. M. and Demling, R. H. Post-traumatic multisystem organ failure. *JAMA* **260**:530-534, 1988.
41. Deitch, E. A. *Multiple organ failure: pathophysiology and basic concepts of therapy.* New York: Thieme Medical Publishers, Inc., 1990.
42. Deitch, E. A., Xu, D., Franko, L., Ayala, A., and Chaudry, I. H. The role of the gut as a cytokine generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* **1**:141-145, 1994.
43. Diegelman, R. F., Lindblad, W. J., and Cohen, I. K. A subcutaneous implant for wound healing studies in humans. *J Surg Res* **40**:229-237, 1986.
44. Dignass, A. U. and Podolsky, D. K. Cytokine modulation of intestinal epithelial cell restitution: central role of transforming growth factor beta. *Gastroenterology* **105**:1323-1332, 1993.
45. Dinarello, C. A. Biology of interleukin 1. *The FASEB J.* **2**:108-115, 1988.

-
46. Fahey, T. J., III, Sherry, B., Tracey, K. J., van Deventer, S., Jones, W. G., II, Minei, J. P., Morgello, S., Shires, G. T., and Cerami, A. Cytokine production in a model of wound healing: the appearance of MIP-1, MIP-2, cachectin/TNF and IL-1. *Cytokine* **92-99**, 1990.
 47. Faist, E., Meakins, J., and Schildberg, F. W. e. *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1993.
 48. Faist, E. and Wichmann, M. W. Immunologie bei Schwerverletzten. *Chirurg* **68**:1066-1070, 1997.
 49. Faquin, W. C., Schneider, T. J., and Goldberg, M. A. Effect of inflammatory cytokines on hypoxia-induced erythropoietin production. *Blood* **70**:1987-1994, 1992.
 50. Farreras, N., Artigas, V., Cardona, D., Rius, X., Trias, M., and Gonzalez, J. A. Effect of early postoperative enteral immunonutrition on wound healing in patients undergoing surgery for gastric cancer. *Clin Nutr* **24**:55-65, 2005.
 51. Fleischmajer, R., Perish, J. S., and Timpl, J. S. Collagen fibrillogenesis in human skin. *Ann NY Acad Sci* **460**:246-257, 1985.
 52. Fleming, I. and Busse, R. NO: the primary EDRF. *J Mol Cell Cardiol.* **31**:5-14, 1999.
 53. Ford, H. R., Hoffman, R. A., Wing, E. J., Magee, D. M., McIntyre, L., and Simmons, R. L. Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model. *Arch Surg* **124**:1422-1428, 1989.
 54. Fry, D. E. Diagnosis and epidemiology of multiple organ failure. In E. A. Deitch (Ed.), *Multiple organ failure - Pathophysiology and basic concepts of therapy*. New-York - Stuttgart: Thieme, 1990. Pp. 13-25.
 55. Furchgott, R. F. Studies on endothelium-dependent vasodilation and the endothelium-derived relaxing factor. *Acta Physiol Scand* **139**:257-270, 1990.

-
56. Furchgott, R. F. Introduction to EDRF research. *J Cardiovasc. Pharmacol.* **22 Suppl** 7:S1-S2, 1993.
 57. Goke, M. and Podolsky, D. K. Regulation of the mucosal epithelial barrier. *Baillieres Clin Gastroenterol.* **10**:393-405, 1996.
 58. Goris, R., Te Boekhorst, T., and Nuytinck, J. Multiple-organ failure: Generalized autodestructive inflammation. *Arch Surg* **120**:1109, 1985.
 59. Goris, R. J. A. Sepsis and multiple organ failure: The result of whole body inflammation. In E. Faist, J. Meakins, and F. W. Schildberg (Eds.), *Host Defense Dysfunction in Trauma, Shock and Sepsis*. Berlin-Heidelberg: Springer-Verlag, 1993. Pp. 161-170.
 60. Gorodetsky, R., McBride, W. H., and Withers, H. R. Assay of radiation effects in mouse skin as expressed in wound healing. *Radiat. Res.* **116**:135-144, 1988.
 61. Gosselink, M. P., Darby, M., Zimmerman, D. D., Gruss, H. J., and Schouten, W. R. Treatment of chronic anal fissure by application of L-arginine gel: a phase II study in 15 patients. *Dis. Colon Rectum* **48**:832-837, 2005.
 62. Greenhalgh, D. G. and Gamelli, R. L. Is impaired wound healing caused by infection or nutritional depletion? *Surgery* **102**:306-312, 1987.
 63. Guiney, D. J., Morris, P. J., and Donaldson, G. A. Wound dehiscence. A continuing problem in abdominal surgery. *Arch. Surg 1966. Jan.* **92**:47-51.
 64. Harbrecht, B. G., Wu, B., Watkins, S. C., Billiar, T. R., and Peitzman, A. B. Inhibition of nitric oxide synthesis during severe shock but not after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats. *Shock* **8**:415-421, 1997.
 65. Haydock, G. A. and Hill, G. L. Impaired wound healing in surgical patients with varying degrees of malnutrition. *J Parenter Enter Nutr* **10**:550-556, 1986.

66. Hoeck, W. and Groner, B. Hormone-dependent phosphorylation of the glucocorticoid receptor occurs mainly in the amino-terminal transactivation domain. *J Biol Chem* **265**:5403-5408, 1990.
67. Hofstädter, H. Pathologie der Wundheilung. *Chirurg* **66**:174-181, 1995.
68. Horyn, O., Luhovyy, B., Lazarow, A., Daikhin, Y., Nissim, I., Yudkoff, M., and Nissim, I. Biosynthesis of agmatine in isolated mitochondria and perfused rat liver: studies with ¹⁵N-labelled arginine. *Biochem J* **388**:419-425, 2005.
69. Hotchkiss, R. S. and Karl, I. E. Calcium: A regulator of the inflammatory response in endotoxemia and sepsis. *New Horizons* **4**:58-71, 1996.
70. Hotchkiss, R. S., Osborne, D. F., Lappas, G. D., and Karl, I. E. Calcium antagonists decrease plasma and tissue concentrations of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-1 beta, and interleukin-1 alpha in a mouse model of endotoxin. *Shock* **3**:337-342, 1995.
71. Hunt, T. K., Knighton, D., and Goodson, W. Wound healing in current surgical diagnosis and treatment. *Crit. Care Med.* **16**:86-98, 1988.
72. Jones, R. J., Gao, Y. T., Simone, T. M., Salerno, J. C., and Smith, S. M. NADPH analog binding to constitutive nitric oxide activates electron transfer and NO synthesis. *Nitric. Oxide.* **14**:228-237, 2006.
73. Jung, E. G. *Dermatologie. Hippokrates Verlag, Stuttgart.* 1998.
74. Kato, M., Honda, I., Suzuki, H., Murakami, M., Matsukawa, S., and Hashimoto, Y. Interleukin-10 production during and after upper abdominal surgery. *J Clin Anesth* **10**:184-188, 1998.
75. Kelly, E., Morris, S. M., Jr., and Billiar, T. R. Nitric oxide, sepsis, and arginine metabolism. *JPEN J Parenter Enteral Nutr* **19**:234-238, 1995.

76. Kirk, S. J., Hurson, M., Regan, M. C., Holt, D. R., Wasserkrug, H. L., and Barbul, A. Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings. *Surgery* **114**:155-159, 1993.
77. Kondo, T. and Ohshima, T. The dynamics of inflammatory cytokines in the healing process of mouse skin wound: A preliminary study for possible wound age determination. *Int J Legal Med* **108**:231-236, 1996.
78. Ksander, G. A., Ogawa, Y., Chu, G. H., McMullin, H., Rosenblatt, J. S., and McPherson, J. M. Exogenous transforming growth factor-beta 2 enhances connective tissue formation and wound strength in guinea pig dermal wounds healing by secondary intent. *Ann Surg* **211**:288-294, 1990.
79. Kvasnicka, T. [NO (nitric oxide) and its significance in regulation of vascular homeostasis]. *Vnitr. Lek.* **49**:291-296, 2003.
80. Laato, M. and Heino, J. Interleukin 1 modulates collagen accumulation by rat granulation tissue cells both in vivo and in vitro. *Experientia* **44**:32-34, 1988.
81. Langer, D. A. and Shah, V. H. A gas, an amino acid, and an imposter: the story of nitric oxide, L-arginine, and ADMA in portal hypertension. *Hepatology* **42**:1255-1257, 2005.
82. Lederer, J. A., Rodrick, M. L., and Mannick, J. A. The effects of injury on the adaptive immune response. *Shock* **11**:153-159, 1999.
83. Lee, A. J., Noon, K. R., Jianmongkol, S., Lau, M., Jenkins, G. J., and Osawa, Y. Metabolism of Aminoguanidine, Diaminoguanidine, and N(G)-Amino-l-arginine by Neuronal NO-Synthase and Covalent Alteration of the Heme Prosthetic Group. *Chem Res Toxicol.* **18**:1927-1933, 2005.
84. Lefer, A. M. Endotoxin, cytokines, and nitric oxide in shock: an editorial comment. *Shock* **1**:79-80, 1994.

-
85. Levenson, S. M., Geever, E. F., and Crowley, L. V. The healing of rat skin wounds. *Ann Surg* **161**:293-308, 1965.
 86. Levenson, S. M., Upjohn, H. L., and Preston, J. A. Effect of thermal burns on wound healing. *Ann Surg* **146**:357-368, 1957.
 87. Light, N. D. and Bailey, A. J. The chemistry of the collagen cross-links. *Biochem J* **185**:373-381, 1980.
 88. Livingston, D. H. and Malangoni, M. A. An experimental study of susceptibility to infection after hemorrhagic shock. *Surg Gynecol Obstet* **168**:138-142, 1989.
 89. Lorente, J. A., Landin, L., De Pablo, R., Renes, E., and Liste, D. L-arginine pathway in the sepsis syndrome. *Crit Care Med* **21**:1287-1295, 1993.
 90. Marks, J. D., Marks, C. B., Luce, J. M., Montgomery, B., Turner, J., Metz, C. A., and Murray, J. F. Plasma tumor necrosis factor in patients with septic shock. *Am. Rev. Respir. Dis.* **141**:94-97, 1990.
 91. Marzi, I. Der hämorrhagische Schock. *Anaesthesist* **45**:976-992, 1996.
 92. Mateo, R. B., Reichner, J. S., and Albina, J. E. Interleukin-6 activity in wounds. *Am J Physiol* **266**:R1840-R1844, 1994.
 93. McCall, T. B., Broughton-Smith, N. K., Palmer, R. M., Whittle, B. J., and Moncada, S. Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils: release and interaction with superoxide anion. *Biochem J* **261**:293-296, 1989.
 94. McCartney-Francis, N., Mizel, D., Wong, H., Wahl, L., and Wahl, S. TGF-beta regulates production of growth factors and TGF-beta by human peripheral blood monocytes. *Growth Factors* **4**:27-35, 1990.
 95. McGinn, F. P. Effects of hemorrhage upon surgical operations. *Br J Surg* **63**:742-746, 1976.

-
96. Meldrum, D. R., McIntyre, R. C., Jr., Sheridan, B. C., Cleveland, Jr. J. C., Fullerton, D. A., and Harken, A. H. L-arginine decreases alveolar macrophage proinflammatory monokine production during acute lung injury by a nitric oxide synthase-dependent mechanism. *J Trauma* **43**:888-893, 1997.
 97. Miles, A. A. Nonspecific defense reactions in bacterial infections. *Ann N Y Acad Sci* **66**:356-369, 1956.
 98. Moore, F. A., Moore, E. E., Kudsk, K. A., Brown, R. O., Brown, R. H., Koruda, M. J., Baker, C. C., and Barbul, A. Clinical benefits of immune-enhancing diet for early postinjury enteral feeding. *J Trauma* **37**:607-613, 1994.
 99. Morris, S. M., Jr. Enzymes of arginine metabolism. *J Nutr* **134**:2743S-2747S, 2004.
 100. Mutschler, W., Marzi, I., and Ziegenfuss, T. [Perspectives of polytrauma management]. *Zentralbl Chir* **121**:979-984, 1996.
 101. Nakanishi, K., Vinten-Johansen, J., Lefer, D. J., Zhao, Z., Fowler, W. C., McGee, D. S., and Johnston, W. E. Intracoronary L-arginine during reperfusion improves endothelial function and reduces infarct size. *Am J Physiol* **263**:H1650-H1658, 1992.
 102. Neiva RF, Al-Shammari K, Nociti FH Jr, Soehren S, and Wang HL Effects of vitamin-B complex supplementation on periodontal wound healing. *J. Periodontol.* **76**:1084-1091, 2005.
 103. Nichols, R. L. Surgical wound infection. *Am J Med* **91**:54S-64S, 1991.
 104. Nitsch, S. M., Wittmann, F., Angele, P., Wichmann, M. W., Hatz, R. A., Hernandez-Richter, T., Chaudry, I. H., Jauch, K. W., and Angele, M. K. Physiological levels of 5-dihydrotestosterone depress wound immune function and impair wound healing following trauma-hemorrhage. *Arch Surg.* **139**:157-163, 2004.

105. Nuedling, S., Kahlert, S., Loebbert, K., Meyer, R., Vetter, H., and Grohe, C. Differential effects of 17beta-estradiol on mitogen-activated protein kinase pathways in rat cardiomyocytes. *FEBS Lett* **454**:271-276, 1999.
106. O'Keefe, G. E., Maier, R. V., Diehr, P., Grossman, D., Jurkovich, G. J., and Conrad, D. The complications of trauma and their associated costs in a level I trauma center. *Arch Surg* **132**:920-924, 1997.
107. Piatti, P., Fragasso, G., Monti, L. D., and et al. Acute intravenous L-arginine infusion decreases endothelin-1 levels and improves endothelial function in patients with angina pectoris and normal coronary arteriograms: correlation with asymmetric dimethylarginine levels. *Circulation* **107**:429-436, 2003.
108. Polk, H. C. Jr. Factors influencing the risk of infection after trauma. *Am J Surg* **165**:2s-7s, 1993.
109. Pratt, W. B., Scherrer, L. C., Hutchison, K. A., and et.al. A model of glucocorticoid receptor unfolding and stabilization by a heat shock protein complex. *J Steroid Biochem Mol Biol* **41**:223-229, 1992.
110. Pruitt, J. H., Copeland III, E. M., and Moldawer, L. L. Interleukin-1 and interleukin-1 antagonism in sepsis, systemic inflammatory response syndrome, and septic shock [editorial]. *Shock* **3**:235-251, 1995.
111. Ramachandran, G. N. Structure of collagen at the molecular level. *Treatise on collagen, Vol. 1, 103; Academic Press, New York.* 1967.
112. Redl, H., Dinges, H. P., Buurman, W. A., van der Linden, G. J., Pober, J. S., Cotran, R. S., and Schlag, G. Expression of endothelial leukocyte adhesion molecule-1 in septic but not traumatic/hypovolemic shock in the baboon. *Am. J. Pathol.* **139**:461-466, 1991.
113. Rose, S. and Marzi, I. Pathophysiologie des Polytraumas. *Zentralbl Chir* **121**:896-913, 1996.

114. Sandberg, N. and Zederfeldt, B. The tensile strength of healing wounds and collagen formation in rats and rabbits. *Acta Chir Scand* **126**:187-196, 1963.
115. Schaeffer, M. R. and Becker, H. D. Immunregulation der Wundheilung. *Chirurg* **70**:897-908, 1999.
116. Schaeffer, M. R., Tantry, U., Ahrendt, G. M., Wasserkrug, H. L., and Barbul, A. Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: a possible role of decrease wound nitric oxide synthesis. *J Am Coll Surg* **184**:37-43, 1997.
117. Seifter, E., Rettura, G., Barbul, A., and Levenson, S. M. Arginine: an essential amino acid for injured rats. *Surgery* **84**:224-230, 1978.
118. Shires, G. T. Principles and management of hemorrhagic shock. In G. T. Shires (Ed.), *Principles of Trauma Care*. New York: McGraw-Hill, 1985. Pp. 3-42.
119. Singer, A. J. and Clark, R. A. F. Cutaneous wound healing. *N Engl J Med* **341**:738-746, 1999.
120. Snyder, S. H. and Bredt, D. S. Stickstoffmonoxid-Regulator biologischer Signale. *Spektrum der Wissenschaft* **7**:72-80, 1992.
121. Tai, P.-K. K., Albers, M. W., Chang, H., Faber, L. E., and Schreiber, S. L. Association of a 59-kilodalton immunophilin with the glucocorticoid receptor complex. *Science* **256**:1315-1318, 1992.
122. Thornton, F. J. and Barbul, A. Cytokines and the abdominal operative wound. In M. Schein and L. Wise (Eds.), *Cytokines and the abdominal surgeon*. Austin, TX: R.G. Landes Company, 1998. Pp. 35-52.
123. Tong, B. C. and Barbul, A. Cellular and physiological effects of arginine. *Mini. Rev. Med Chem* **4**:823-832, 2004.

124. Trunkey, D. D. Trauma. *Sci. Amer.* **249**:28-35, 1983.
125. van der Poll, T. and Lowry, S. F. Tumor necrosis factor in sepsis: Mediator of multiple organ failure or essential part of host defense? *Shock* **3**:1-12, 1995.
126. Viljanto, J. Biochemical basis of tensile strength and wound healing. *Acta Chir. Scand.* 1964.
127. Waage, A., Brandtzaeg, P., Halstensen, A., Kierulf, P., and Espevik, T. The complex pattern of cytokines in serum from patients with meningococcal septic shock. Association between interleukin 6, interleukin 1, and fatal outcome. *J. Exp. Med.* **169**:333-338, 1989.
128. Wahl, S. M. Transforming growth factor beta: the good, the bad, and the ugly. *J. Exp. Med.* **180**:1587-1590, 1994.
129. Wahl, S. M. TGF-beta in the evolution and resolution of inflammatory and immune processes. Introduction. *Microbes. Infect.* **1**:1247-1249, 1999.
130. Wahl, S. M., Hunt, D. A., Wakefield, L. M., McCartney-Francis, N., Wahl, L. M., Roberts, A. B., and Sporn, M. B. Transforming growth factor type beta induces monocyte chemotaxis and growth factor production. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **84**:5788-5792, 1987.
131. Wallis, J. P. Nitric oxide and blood: a review. *Transfus. Med* **15**:1-11, 2005.
132. Wang, P., Ba, Z. F., and Chaudry, I. H. Endothelial cell dysfunction occurs very early following trauma- hemorrhage and persists despite fluid resuscitation. *Am. J. Physiol.* **265**:H973-H979, 1993.
133. Weigelt, J. A., Haley, R. W., and Seibert, B. Factors which influence the risk of wound infection in trauma patients. *J Trauma* **27**:774-781, 1987.

134. Wessagowit V, Mallipeddi R, McGrath JA, and South AP. Altered expression of L-arginine metabolism pathway genes in chronic wounds in recessive dystrophic epidermolysis bullosa. *C* **29**:664-668, 2004.
135. Weyrich, A. S., Ma, X., and Lefer, A. M. The role of L-arginine in ameliorating reperfusion injury after myocardial ischemia in the cat. *Circulation* **86**:279-288, 1992.
136. Wichmann, M. W., Angele, M. K., Ayala, A., Cioffi, W. G., and Chaudry, I. Flutamide: A novel agent for restoring the depressed cell-mediated immunity following soft-tissue trauma and hemorrhagic shock. *Shock* **8**:1-7, 1997.
137. Williams, J. Z., Abumrad, N., and Barbul, A. Effect of a specialized amino acid mixture on human collagen deposition. *Ann Surg* **236**:369-374, 2002.
138. Wimmer, C., Gluch, H., Franzreb, M., and Ogon, M. Predisposing factors for infection in spine surgery: a survey of 850 spinal procedures. *J Spinal. Disord.* 1998. *Apr.* **11**:124-128.
139. Woessner, J. F. The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of the imino acid. *Arch Biochem Biophys* **93**:440-447, 1961.
140. Wu, G., Meininger, C. J., Knabe, D. A., Bazer, F. W., and Rhoads, J. M. Arginine nutrition in development, health and disease. *Curr. Opin. Clin Nutr. Metab Care* **3**:59-66, 2000.
141. Yanaka, A., Muto, H., Fukutomi, H., Ito, S., and Silen, W. Role of transforming growth factor-beta in the restitution of injured guinea pig gastric mucosa in vitro. *Am J Physiol* **271**:G75-G85, 1996.
142. Zaloga, G. P., Marik, P. E., Terry, C., and Siddiqui, R. Arginine: mediator or modulator of sepsis? *Nutr. Clin. Pract.* **19**:201-215, 2004.

8. DANKSAGUNG

Meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Privatdozent Dr. med. Martin K. Angele möchte ich für die Überlassung dieses Themenbereiches zur Anfertigung meiner Dissertation und für die freundschaftliche Betreuung bei der Durchführung danken. Mein besonderer Dank gilt ihm auch für die Einführung in die wissenschaftliche Tätigkeit, insbesondere im Hinblick auf die Verfassung wissenschaftlicher Arbeiten sowie deren Präsentation im Rahmen von Kongressen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Stefan Nitsch und Frau Dr. med. Simone Eisenmenger für die Unterstützung und Einweisung in die oft mühsame Laborarbeit.

Des Weiteren danke ich Frau Natasja van den Engel für ihre ständige Hilfsbereitschaft und kompetente Unterstützung.

Ebenso möchte ich Herrn Niclas J. Prix danken, der mich während seiner Beschäftigung als Zivildienstleistender im Labor bei der Versuchsdurchführung unterstützt hat.

Meinen Mitdoktoranden Stefan Mayr, Markus Frantz, Sebastian Brechenmacher und Johannes Dietz danke ich für die gute kollegiale Zusammenarbeit.

Meinen Eltern möchte ich diese Arbeit widmen und möchte ihnen für die langjährige Unterstützung während des Studiums von ganzem Herzen danken.

9. TABELLARISCHER LEBENS LAUF

Eltern:	Dr. Helmut Wittmann Eva Wittmann, geb. Widman
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Geburtsdatum:	21.12.1977
Geburtsort:	München
Konfession:	römisch-katholisch

AKTUELLE TÄTIGKEIT

2005 – 2006:	Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesie, Intensivmedizin und Schmerztherapie Klinikum Traunstein, Akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians Universität München
seit 1.03.06:	Assistenzarzt in der Abteilung für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie Klinikum Traunstein, Akademisches Lehrkrankenhaus der Ludwig-Maximilians Universität München

SCHULAUSSBILDUNG

1984 - 1988:	Grundschule Seeon
1988 - 1997:	Annette-Kolb-Gymnasium, Traunstein
1997:	Abitur

ERSATZDIENST

1997 - 1998:	Zivildienstleistender im Klinikum Traunstein
--------------	--

STUDIUM

1998 - 2000:	Studium der Humanmedizin an der medizinischen Fakultät der Semmelweis Universität Budapest, Ungarn
2000:	Ärztliche Vorprüfung
2000 - 2005:	Studium der Humanmedizin an der Ludwig- Maximilians-Universität München
2005:	Approbation als Arzt