

Aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar
(Direktor: Professor Dr. med. M. D. Menger)

Präkonditionierung mit Erythropoietin bei kritisch perfundiertem Gewebe

Eine intravitalmikroskopische Untersuchung an der Maus

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

der Medizinischen Fakultät

der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES

2011

vorgelegt von: Eva Metzkow

geb. am: 13.07.1981 in Homburg/Saar

meiner Familie

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung	5
1.1. Präkonditionierung mit Erythropoietin reduziert die Ischämie-bedingte Nekrose in kritisch perfundiertem Gewebe.....	5
2. Abstract	7
2.1. Preconditioning with erythropoietin reduces ischemic necrosis in critically perfused tissue.....	7
3. Einleitung	9
3.1. Ischämie, Nekrose und Apoptose.....	9
3.2. Präkonditionierung.....	10
3.3. Erythropoietin.....	11
3.4. In vivo-Modell.....	15
3.5. Lappenchirurgie.....	15
4. Ziel der Studie	16
4.1. Fragestellung.....	16
5. Material und Methoden	18
5.1. Versuchstiere.....	18
5.2. Modell.....	18
5.2.1. Anästhesie.....	18
5.2.2. Präkonditionierung.....	19

5.2.2.1 Substanz.....	19
5.2.2.2 Vorgehen.....	19
5.2.3. Chirurgische Präparation.....	19
5.2.3.1. Präparation der Hautkammer (chamber).....	19
5.2.3.2. Präparation des Hautlappens (flap).....	20
5.3. Untersuchungstechniken.....	22
5.3.1. Fluoreszenzfarbstoffe.....	22
5.3.1.1. Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC).....	22
5.3.1.2. Rhodamin 6G.....	22
5.3.1.3. Bisbenzimid H 33342 (Hoechst).....	22
5.3.2. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie.....	23
5.3.3. Analyse der Mikrozirkulation.....	24
5.3.4. Blutanalyse.....	27
5.4. Experimentelles Protokoll.....	27
5.5. Datenerfassung und Statistik.....	29
6. Ergebnisse.....	30
6.1. Hautkammer (chamber).....	30
6.1.1. Fließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venulen.....	30
6.1.1.1. Arteriolen Fließgeschwindigkeit.....	30
6.1.1.2. Venuläre Fließgeschwindigkeit.....	32
6.1.2. Gefäßdurchmesser in Arteriolen und Venulen.....	33
6.1.2.1. Arteriolen Gefäßdurchmesser.....	33
6.1.2.2. Venulärer Gefäßdurchmesser.....	35
6.1.3. Mikrozirkulation in Kapillaren.....	36
6.1.3.1. Kapilläre Fließgeschwindigkeit.....	36

6.1.3.2. Kapillardurchmesser.....	37
6.1.3.3. Funktionelle Kapillardichte.....	39
6.1.4. Apoptotischer Zelltod.....	41
6.1.5. Leukozyten-Endothelzellinteraktion.....	42
6.1.5.1. Rollende Leukozyten in Arteriolen	42
6.1.5.2. Adhärenente Leukozyten in Arteriolen.....	44
6.1.5.3. Rollende Leukozyten in Venulen	45
6.1.5.4. Adhärenente Leukozyten in Venulen.....	46
6.2. Hautlappen (flap).....	47
6.2.1. Nekrosefläche.....	47
6.2.2. Fließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venulen.....	48
6.2.2.1. Arteriolenäre Fließgeschwindigkeit.....	48
6.2.2.2. Venuläre Fließgeschwindigkeit.....	50
6.2.3. Gefäßdurchmesser in Arteriolen und Venulen.....	51
6.2.3.1. Arteriolenärer Gefäßdurchmesser.....	51
6.2.3.2. Venulärer Gefäßdurchmesser.....	53
6.2.4. Mikrozirkulation in Kapillaren.....	54
6.2.4.1. Kapilläre Fließgeschwindigkeit.....	54
6.2.4.2. Kapillardurchmesser.....	56
6.2.4.3. Funktionelle Kapillardichte.....	57
6.2.5. Apoptotischer Zelltod.....	58
6.2.6. Leukozyten-Endothelzellinteraktion.....	59
6.2.6.1. Rollende Leukozyten in Arteriolen	60
6.2.6.2. Adhärenente Leukozyten in Arteriolen.....	61
6.2.6.3. Rollende Leukozyten in Venulen	62
6.2.6.4. Adhärenente Leukozyten in Venulen	63
6.2.7. Hämatokrit.....	64

6.2.8. Angiogenese.....	65
7. Diskussion.....	66
7.1. Material und Methodik.....	66
7.2. Diskussion der Ergebnisse.....	67
7.2.1. Gefäßdurchmesser, Vasodilataion.....	67
7.2.2. Fließgeschwindigkeit.....	68
7.2.3. Kapilläre Perfusion.....	69
7.2.4. Apoptotischer Zelltod	69
7.2.5. Leukozyten-Endothelzellinteraktion.....	70
7.2.6. Nekrose.....	71
7.2.7. Hämatokrit.....	71
7.2.8. Angiogenese.....	72
7.3. Schlussfolgerung.....	73
8. Verzeichnis der Abkürzungen.....	74
9. Literaturverzeichnis.....	77
10. Danksagung.....	85
11. Lebenslauf.....	86

1. Zusammenfassung

1.1. Präkonditionierung mit Erythropoietin reduziert die Ischämie-bedingte Nekrose in kritisch perfundiertem Gewebe

Die Entwicklung wirksamer Strategien zur Gewebeprekonditionierung, um ischämische Gewebeerstörung an kritisch perfundierten Lappen zu verhindern, stellt in der Forschung nach wie vor eine Herausforderung dar.

Kürzlich konnten bei dem körpereigenen Hormon Erythropoietin (EPO), dem Hauptregulator der Erythropoese, nicht-blutbildende, antiischämische, antiapoptotische und angiogene Eigenschaften in neuronalem und myokardialem Gewebe nachgewiesen werden.

Das Ziel der vorliegenden Studie war daher zu untersuchen, ob eine Gewebeprekonditionierung mit EPO in einem chronischen in vivo Modell an der Maus den ischämischen Zelltod und die Lappennekrose vermindert.

Als Versuchstiere verwendeten wir C57BL/6-Mäuse, die mit einer intraperitonealen Injektion von Erythropoietin vorbehandelt wurden, beginnend 24h vor der Lappenpräparation. Die Versuchstiere erhielten entweder 500IU/kg KG (EPO 500) oder 5000IE/kg KG (EPO 5000). Danach wurde ein „Random Pattern Flap“ (randomisiert perfundierter Lappen) präpariert und in einer Hautrückenkammer fixiert. Die systemische Verabreichung von EPO wurde über weitere 3 Tage täglich fortgeführt. Als Kontrolle diente eine Gruppe von Mäusen mit oben beschriebenem Lappen ohne medikamentöse Behandlung (CON). Hier erfolgte lediglich die Gabe von Kochsalz intraperitoneal. An den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 wurden wiederholt intravitale fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Diese beinhalteten mikrozirkulatorische und inflammatorische Parameter, einschließlich Gewebeüberleben bzw. Lappennekrose, Durchmesser in Arteriolen, Venulen und Kapillaren, Hämatokrit, Blutzellfließgeschwindigkeit, funktionelle Kapillardichte, Leukozyten-Endothelzellinteraktion und apoptotischer Zelltod. Die Daten wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Zur statistischen Analyse verwendeten wir die einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) und anschließend den entsprechenden post hoc Test.

Im distalen Bereich des Lappens verbesserte EPO 500 signifikant die Gewebepерfusion, während die Verabreichung von EPO 5000 im Vergleich zur Kontrolle nur zu einem mäßigen Anstieg der funktionellen Kapillardichte führte (CON: $9\pm 7\text{cm/cm}^2$; EPO 500: $116\pm 32\text{cm/cm}^2$; EPO 5000: $44\pm 26\text{cm/cm}^2$; $p<0,05$; Tag 10). In beiden vorbehandelten Gruppen konnte die ischämisch induzierte Entzündungsreaktion durch Leukozyten signifikant vermindert werden (CON: $3780\pm 1301\text{rollers/min/mm}$; EPO 500: $493\pm 192\text{rollers/min/mm}$; EPO 5000: $962\pm 184\text{rollers/min/mm}$; $p<0,05$; Tag 10). Darüber hinaus reduzierte die Präkonditionierung mittels EPO den apoptotischen Zelltod im ischämischen Bereich des Hautlappens (CON: $311\pm 40\text{Zellen/mm}^2$; EPO 500: $114\pm 22\text{Zellen/mm}^2$; EPO 5000: $208\pm 30\text{Zellen/mm}^2$; $p<0,05$; Tag 10) und verringerte signifikant die Gesamtnekrosefläche des Lappens (CON: $52\pm 4\%$ der gesamten Lappenoberfläche; EPO 500: $15\pm 4\%$; EPO 5000: $40\pm 4\%$; $p<0,01$; Tag 10). Interessanterweise konnte während des gesamten 10-tägigen Beobachtungszeitraumes keine Angiogenese registriert werden.

Die systemische Präkonditionierung von Hautmuskellappen mit EPO verringerte die Gewebenekrose signifikant. Dies ist primär eine Folge einer aufrechterhaltenen Mikrozirkulation im kritisch perfundierten Gewebe, d.h. einer Hyperperfusion und erhaltener funktioneller Kapillardichte (FCD), sowie einer verminderten Entzündungsreaktion und vermindertem apoptotischem Zelltod. In dem verwendeten Modell konnte EPO keine Neovaskularisation induzieren. Da die niedrig dosierte Behandlung ausreichend war, um einen signifikanten Schutz hervorzurufen, könnte diese Methode möglicherweise eine vielversprechende Strategie in der Behandlung ischämiebezogener Komplikationen im Rahmen klinischer Lappenchirurgie darstellen.

2. Abstract

2.1. Preconditioning with erythropoietin reduces ischemic necrosis in critically perfused tissue

It is still a major research goal to search for effective strategies for tissue preconditioning to limit ischemic damage in critically perfused flaps. Erythropoietin (EPO), the primary regulator of erythropoiesis, has recently been shown to have anti-ischemic and anti-apoptotic properties in neuronal and myocardial tissue. The aim of the present study was therefore to analyze whether tissue preconditioning with EPO confines ischemic cell death and tissue necrosis in a chronic *in vivo* mouse random pattern flap model.

Different groups of C57BL/6-mice were pretreated with EPO ip, starting 24h prior to surgery, receiving either 500IU/kg bw (EPO 500) or 5000IU/kg bw erythropoietin (EPO 5000). Thereafter, a random pattern flap was elevated in the back of anaesthetized mice and fixed into a dorsal skinfold chamber. The systemic EPO-treatment was continued for 3 consecutive days. Flap elevation in animals without treatment served as control (CON). Repetitive intravital fluorescence microscopic analyses were performed at days 1, 3, 5, 7, and 10. These analyses included the diameter of arterioles, venules and capillaries, the functional capillary density (FCD), leukocyte-endothelial cell interactions, apoptotic cell death, hematocrit, red blood cell velocity (RBCV) and area of tissue necrosis. Data are given as means \pm SEM. Statistics included one way analysis of variance (ANOVA), followed by an appropriate post hoc comparison.

In the distal part of the flap EPO 500 significantly improved nutritive perfusion, while administration of EPO 5000 only moderately increased FCD when compared to untreated controls (CON: 9 ± 7 cm/cm²; EPO 500: 116 ± 32 cm/cm²; EPO 5000: 44 ± 26 cm/cm²; $p < 0,05$; day 10).

The ischemia-induced leukocytic inflammatory response was markedly attenuated in both treatment groups (CON: 3780 ± 1301 rollers/min/mm; EPO 500: 493 ± 192 rollers/min/mm; EPO 5000: 962 ± 184 rollers/min/mm; $p < 0,05$; day 10).

Furthermore, EPO pretreatment significantly decreased apoptotic cell death in the ischemic part of the flap (CON: 311 ± 40 cells/mm²; EPO: 500 114 ± 22 cells/mm²; EPO 5000: 208 ± 30 cells/mm²; $p < 0,05$; day 10), and was effective in markedly reducing the overall area of tissue necrosis (CON: $52 \pm 4\%$ of total flap surface; EPO 500: $15 \pm 4\%$; EPO 5000 $40 \pm 4\%$; $p < 0,01$; day 10). Of interest, no angiogenic response was observed over the 10-day observation period. Despite the lack of neovascularization, systemic preconditioning of flaps using EPO reduced tissue necrosis by maintaining adequate nutritive perfusion within flap areas of critical ischemia. The maintenance of an adequate microcirculation was associated with a reduced inflammatory response and a decreased apoptotic cell death. As the low-dose treatment was sufficient to elicit a significant protection, this approach might represent a promising strategy to reduce ischemia-related complications in clinical flap surgery.

3. Einleitung

3.1. Ischämie, Nekrose und Apoptose

Eine Ischämie oder Blutleere bewirkt eine Unterversorgung von Gewebe (bzw. eines Organs) mit Sauerstoff. Hierdurch wird der zelluläre Stoffwechsel behindert oder kommt gar zum Erliegen. Bei entsprechender Dauer dieser Unterversorgung, d.h. nach Überschreiten der gewebespezifischen Ischämietoleranz, kann es zum Absterben (Nekrose) von Zellen kommen („Infarkt“). Die Ursachen sind meist Veränderungen von Blutgefäßen in Form einer Verengung (Stenose), z.B. bei Arteriosklerose, arterieller Verschlusskrankheit mit Thrombose oder Embolie, kälteinduzierter Vasospasmus (Raynaud-Syndrom) oder auch im Rahmen eines Kreislaufschocks. Gewebeischämie kann auch auftreten, wenn gesundes Gewebe unterversorgt wird, weil dessen Blutversorgung aufgrund einer chirurgischen Präparation vermindert oder unterbrochen wird.

Eine Ischämie kann vorübergehend (passager) und ohne Folgen für das minderversorgte Gewebe auftreten. Dauert die Ischämie länger an als vom Gewebe toleriert wird oder ist das Maß der Minderversorgung so hoch, dass eine dauerhafte Gewebsschädigung droht, so wird dieser Zustand als kritische Ischämie bezeichnet.

Die Zeitspanne, die als Dauer der Ischämie (Ischämiezeit) ohne dauerhaften Gewebeschaden toleriert wird, ist von Organ zu Organ unterschiedlich. Sie beträgt für das Gehirn nur wenige Minuten, für viele transplantierbare Organe wie Herz oder Nieren je nach Temperierung und Nährlösung einige Stunden und für die Haut bis zu 12 Stunden.

Im Rahmen der Ischämie wird der aerobe Stoffwechsel auf die weniger effiziente anaerobe Glykolyse umgestellt und energiereiche Substrate werden verbraucht. Es kommt in der Folge zu einer Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte, die durch die fehlende Perfusion nicht mehr abtransportiert werden können. Die entstehende Azidose schädigt die Membranstruktur der Zellen, was letztlich zu einem Verlust der Zellfunktion führt. Die für die Aufrechterhaltung des Membranpotentials zuständige Na⁺/K⁺-Pumpe kommt aufgrund von Energiemangel zum Erliegen. Natrium- und Chloridionen strömen in die Zelle ein und ziehen Wasser mit sich, was zum Entstehen eines intrazellulären Ödems mit nachfolgendem Zelltod führen kann.

Unter einer Nekrose versteht man in der Biologie und Medizin den am lebenden Organismus stattfindenden, pathologischen Untergang einzelner oder mehrerer Zellen. Der Begriff der Apoptose wird dagegen als physiologischer Untergang einzelner Zellen oder bestimmter Zellpopulationen definiert und wird darum auch als programmierter Zelltod bezeichnet.

Schädigende Einflüsse wie z.B. exogene Gifte, Bakterien, Radioaktivität, Nährstoff- und vor allem Sauerstoffmangel können Zellen unter Umständen zum Zelltod führen. Die Folge ist eine Entzündungsreaktion des umliegenden Gewebes. Durch die Entzündungsreaktion werden Makrophagen angelockt, die entzündliche Botenstoffe wie Tumornekrosefaktor (TNF- α) ausschütten. Je nach Gewebeart heilt die Nekrose durch Nachwachsen von Zellen komplett ab (z.B. Darmzellen nach Virusinfektion) oder der nekrotische Anteil wird durch eine bindegewebige Narbe mit entsprechendem Funktionsverlust ersetzt (z.B. Myokard nach Infarkt).

In der plastischen Chirurgie, speziell der Lappenchirurgie, stellt neben der Infektion die Gewebenekrose im Rahmen einer möglichen postoperativen Minderperfusion eine der Hauptkomplikationen dar.

3.2. Präkonditionierung

Unter Präkonditionierung versteht man in der Medizin einen Mechanismus, bei dem kurze Reize (zum Beispiel Sauerstoffmangel, physikalischer Stress wie Hyper- oder Hypothermie, Medikamente) vor den Auswirkungen eines späteren ischämie- oder reoxygenationsbedingten Gewebes Schadens schützen, indem diese unspezifischen Stressoren im supraphysiologischen Bereich für die Zelle angewendet werden.

Am Beispiel der ischämischen Präkonditionierung des Herzmuskels führten im Tierversuch kurzzeitige Minderdurchblutungen des Myokards zu Sauerstoffmangel im Gewebe (präkonditionierender Reiz). Durch Umbauprozesse in der Muskelzelle war das Herz nun für eine gewisse Zeit gegen Auswirkungen eines Herzinfarktes geschützt. Dieser Schutz machte sich dadurch bemerkbar, dass bei einem später auftretenden Myokardinfarkt weniger Herzmuskelgewebe abstarb und weniger Herzrhythmusstörungen auftraten (MURRAY C.E. et al., 1986).

Über verschiedene Signaltransduktionswege führt die Präkonditionierung zu einer Zellantwort, welche die Zelle widerstandsfähiger gegenüber nachfolgenden Stresssituationen

wie z.B. dem IRS (inflammatory response syndrome) macht. Endogener Schutz gegen Ischämie manifestiert sich in zwei verschiedenen Zeitfenstern. Die klassische Präkonditionierung oder auch frühe Phase der Präkonditionierung zeigt ihren größten Effekt innerhalb von Minuten nach der Präkonditionierung und dauert 1-3 Stunden an. Dieses Zeitfenster wird auch „critical interval“ genannt. Die späte Phase der Präkonditionierung, das sog. „second window of protection“ (SWOP) oder „delayed preconditioning“, erscheint ungefähr 24 Stunden nach dem ersten Stimulus und hält 72-96 Stunden an. Der Schutz ist jedoch schwächer ausgeprägt als in der frühen Phase. Die Präkonditionierung hat gezeigt, dass sie Gewebe sowohl vor anhaltender Ischämie ohne Reoxygenierung, als auch vor Ischämie/Reperfusion schützen kann.

3.3. Erythropoietin

Erythropoietin (EPO) ist ein Glykoprotein-Hormon, das die Bildung der Erythrozyten (Erythropoese) aus Vorläuferzellen im Knochenmark steuert. EPO gehört phylogenetisch zu einer Zytokinfamilie, die neben EPO auch Somatotropin, Prolaktin, die Interleukine 2–7 sowie die sogenannten „Colony Stimulating Factors“ (granulocyte(G)-CSF, macrophage(M)-CSF und GM-CSF) umfasst. Der menschliche Körper bildet EPO etwa zu 85–90 % in der Niere durch die Endothelzellen der um die Nierenkanälchen gelegenen Kapillaren und zu 10–15 % durch die Hepatozyten der Leber. Zudem konnte eine geringe Syntheseaktivität im Gehirn, in der Gebärmutter, im Hoden, in der Milz und sogar in Haarfollikel-Zellen (BODO E. et al., 2007) nachgewiesen werden. Das EPO-Gen im Menschen befindet sich auf dem Chromosom 7 (Position 7q21-7q22). Die Synthese von EPO wird stimuliert durch eine verminderte Sauerstoffsättigung (Hypoxie) des Blutes oder Gewebes (Abb. 1).

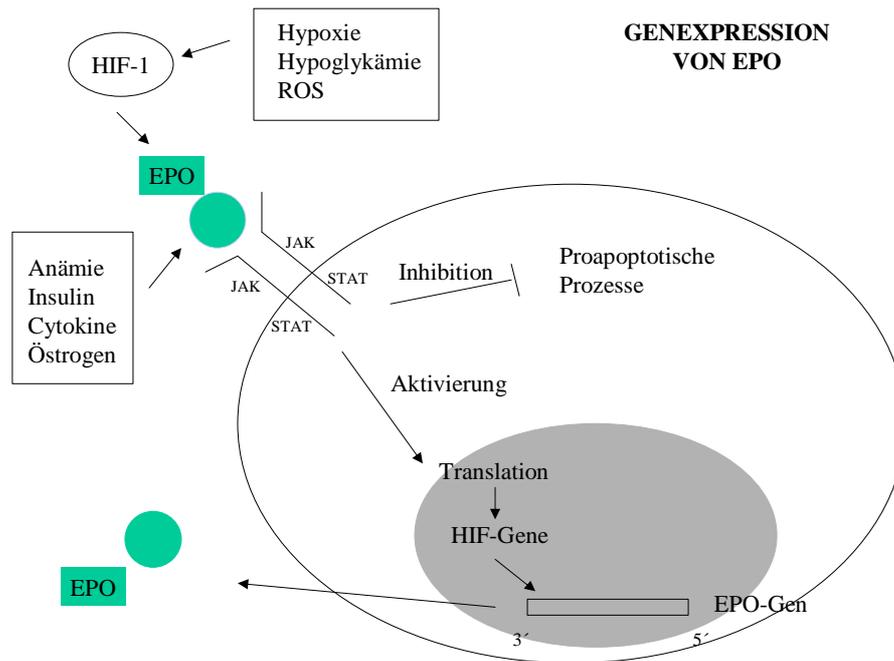


Abbildung 1: Schematische Darstellung der Genexpression von Erythropoietin; HIF (Hypoxie-induzierender Faktor), EPO (Erythropoietin), JAK (Janus-Kinase), STAT (signal transducers and activators of transcription), ROS (reactive oxygen species).

Bei der Erythropoese bindet EPO im Knochenmark an den transmembranen Erythropoietin-Rezeptor der Vorläuferzellen des Typs BFU-E (Erythroid Burst Forming Unit), die zunächst zu den reiferen Vorläuferzellen des Typs CFU-E (Erythroid Colony Forming Unit) und schließlich zu Erythrozyten ausdifferenzieren (Abb. 1).

Der Epo-Rezeptor (EpoR) gehört zur Familie der Zytokin-Rezeptoren, deren strukturelle Gemeinsamkeiten in zwei oder mehr Immunglobulin-ähnlichen Domänen, vier gleich angeordneten Cystein-Resten und der extrazellulären Sequenz WSXWS (Trp-Ser-variable Aminosäure-Trp-Ser) bestehen. Die Bindung von EPO führt zu einer Homodimerisierung des Rezeptors, welche wiederum via Transphosphorylierung das rezeptorgekoppelte Enzym Janus Kinase 2 (JAK-2) aktiviert. Dabei werden spezifische, intrazellulär rezeptorassoziierte Tyrosin-Reste phosphoryliert und dienen hierdurch als Kopplungsstation für das Signaltransduktionsprotein STAT-5, wodurch verschiedene Signaltransduktionskaskaden in Gang gesetzt werden. Insgesamt sind daran 94 Proteine beteiligt (Abb. 1).

Pro Tag werden circa 200 Milliarden Erythrozyten gebildet. Zusätzlich zur eigentlichen Erythropoese wirkt EPO bei der Differenzierung der Vorläuferzellen als Apoptosehemmer

und stimuliert in geringem Maße auch die Bildung von Megakaryozyten. Akute und chronische Insuffizienzen infolge degenerativer Erkrankungen der Niere führen zur verminderten EPO-Bildung und damit zur renalen Anämie. Die Aufgabe von EPO im Organismus ist nicht allein auf die Bildung neuer Erythrozyten beschränkt. Immunzytochemische Hybridisierungsversuche haben gezeigt, dass der EPO-Rezeptor auf den unterschiedlichsten somatischen Zellen zu finden ist. Dazu gehören Neurone, Astrozyten, Mikroglia-, Herzmuskel-, Haut-, Darm-, Knochen- und Skelettmuskelzellen. EPO/EpoR-Interaktionen wurden entsprechend in den verschiedensten nicht-blutbildenden Geweben in Zusammenhang mit Zellteilungsvorgängen, Chemotaxis, Apoptose- und Entzündungshemmung, Geweberemodellierung und Angiogenese nachgewiesen.

Die klassische EPO-Therapie zielt darauf ab, die Bildung roter Blutkörperchen, d.h. die Erythropoese bei Patienten mit renaler oder Tumoranämie, Anämien als Folge von Chemotherapien oder aber nach systemisch wirksamem Blutverlust zu stimulieren oder zu unterstützen (LAPPIN T.R. 2002, KRUPP N.L. 2003, KENDALL R.G. 2001). Zudem gilt mittlerweile als gesichert, dass die Ansprechrate von hypoxischen Tumoren auf eine Radio- oder Chemotherapie durch die Zunahme der Tumoroxygenierung nach EPO-Applikation gesteigert werden kann (BAKER J.E. 2005).

Diese zytoprotektiven Eigenschaften von EPO in Zellkultur- und Tiermodellen machen dieses Molekül zu einem interessanten Kandidaten für die Behandlung von akuten neurologischen Erkrankungen wie beispielsweise dem Schlaganfall, aber auch neurodegenerativen Erkrankungen (VILLA P. 2003, SIREN A.-L. 2001, PRASS K. 2003, MALHOTRA S. 2005). Des Weiteren findet EPO Einsatz bei der Autoimmunenzephalopathie (SAVINO C. 2006), entzündlichen ZNS-Erkrankungen (VILLA P. 2003, MAIESE K. 2004) und Schädel-Hirn-Traumata. EPO vermindert in diesem Zusammenhang die Apoptosezahl (SIREN A.-L.2001, MARTI H.H. 2004) und stimuliert die Angio- und Neurogenese (WANG L. 2004).

Die zytoprotektiven Eigenschaften von EPO sind nicht allein auf neuronales Gewebe beschränkt. Auch Herzmuskelzellen sind nach einer Behandlung mit EPO deutlich unempfindlicher gegenüber ansonsten letalen Stressfaktoren, wie sie z.B. bei einem Herzinfarkt durch eine mangelhafte Sauerstoffversorgung (Hypoxie) auftreten (TADA H. 2006, PARSA C.J. 2003, PARSA C.J. 2004, NISHIHARA M. 2006, MAIESE K. 2005). Somit könnte EPO bei entsprechenden Risikopatienten vorbeugend verabreicht werden

(JOYEUX-FAURE M. 2007). Doch auch noch nach Auftreten eines ischämischen Infarktes kann die Anwendung von EPO hilfreich sein, da die Herzmuskelzellen bei der Reperfusion des Organs vor der sonst üblichen weiteren Schädigung bewahrt werden (BOGOYEVITCH M.A. 2004). EPO zeigt auch hier einen antiapoptotischen Effekt (TRAMONTANO A.F. 2003, PARSA C.J. 2003, MOON C. 2003), fördert die Angiogenese (JAQUET K. 2002) und führt zudem zu einem Remodeling der Ventrikelmyozyten (PARSA C.J. 2004, MIKI T. 2006).

An der Niere führt eine Präkonditionierung mit EPO bei Ischämie und Reperfusion zu einer Verminderung der Zahl auftretender Nierenversagen (PATEL N.S. 2004), zu einer Verbesserung der tubulären Epithelregeneration sowie zu einer Verbesserung der Funktion (JOHNSON D.W. 2006).

Eine Studie über die Präkonditionierung mit EPO vor Lungenischämie zeigte eine Abnahme des postischämischen alveolären Ödems, eine verringerte Neutrophileninfiltration sowie eine Reduktion der mikrovaskulären Permeabilität. Des Weiteren kam es unter EPO-Therapie zu einer Verbesserung der pulmonalen Oxygenierung, einer Reduktion der Myeloperoxidaseaktivität sowie zu einer verringerten Expression von TNF-alpha (WU H. 2006).

Auch am Auge zeigt EPO, v.a. an der Retina, zellprotektive sowie regenerative Eigenschaften (JUNK A.K. 2002, GRIMM C. 2002, GRIMM C. 2004, GRIMM C. 2005, GRIMM C. 2006, BÖCKER-MEFFERT S. 2002).

Galeano et al. konnten bei diabetischen Mäusen unter EPO-Therapie eine verbesserte Wundheilung sowie angiogene Eigenschaften des Moleküls feststellen (GALEANO M. 2004).

An der Haut fand sich nach EPO-Behandlung bzw. -Präkonditionierung eine verbesserte Wundheilung, eine Zunahme der Kapillardichte sowie eine vermehrte Expression von VEGF (BUEMI M. 2004). Darüber hinaus konnten Saray et al. in ihrem Modell eines Hautlappens bei Ratten eine dosisabhängige Wirkung von Erythropoietin feststellen (SARAY A. 2003). Kurzfristige und niedrigdosierte EPO-Anwendung führte zu einer Verminderung der Lappenschämie, wohingegen chronische, längerfristige Gaben zu einer Ischämiezunahme im Gewebe führten.

3.4. In Vivo-Modell

„In vivo“ bedeutet „im Lebendigen“ und bezeichnet in der Wissenschaft Prozesse, die im lebendigen Organismus ablaufen. In einem In-vivo-Modell können folglich Reaktionen im und am lebendigen Modell untersucht werden. Unter diesen Umständen können Nachweise und Entwicklungen über einen gewissen Zeitraum festgehalten werden, insbesondere wenn das Modell über mehrere Tage gar Wochen analysiert werden kann. Des Weiteren können im Verlauf verschiedene Zeitpunkte miteinander verglichen werden und zusätzlich dynamische Bilder aufgezeichnet werden.

3.5. Lappenchirurgie

Als Lappen bezeichnet man die Einheit aus Haut, subkutanem Fettgewebe und ggf. weiterem Gewebe (Muskel, Knochen, etc.) mit eigenständiger Blutversorgung.

Als Lappenplastiken werden operative plastisch-chirurgische Techniken bezeichnet, die (Haut-)Gewebe von einer (entbehrlichen) Stelle des gleichen Individuums an eine neue gewünschte Stelle bringen.

Diese Lappen können mit oder ohne Haut, sowohl gestielt (also mit seinen zugehörigen blutversorgenden Gefäßen und Nerven), als auch frei (d.h. mit Anschluss der Blutgefäße an die Blutversorgung der neuen Umgebung) verpflanzt werden.

Zu den häufigsten Komplikationen in der Lappenchirurgie gehören die Lappenminderperfusion mit nachfolgender Lappennekrose, Infektionen, Hämatome, die Thrombosierung zuführender Lappengefäße oder eine Lappenlösung. Aus diesen Gründen ist es dringend erforderlich, und hier liegt auch einer der Forschungsschwerpunkte, neue Methoden und Strategien zur Verringerung der aufgeführten Komplikationen zu entwickeln.

4. Ziel der Studie

4.1. Fragestellung

Im Rahmen der folgenden Studie wurde die systemische Verwendung von Erythropoietin zur Präkonditionierung kritisch perfundierten (d.h. anhaltende akute Ischämie, die unbehandelt zur Nekrose führt) Gewebes an einem Mausmodell in vivo analysiert.

Dabei waren folgende Fragestellungen von Interesse:

- Welche Auswirkungen hat Erythropoietin auf die Nekrosefläche des Hautlappens?
Gibt es dosisabhängige Unterschiede?
- Welchen Einfluss haben unterschiedliche wiederholt intraperitoneal verabreichte Erythropoietin-Dosierungen auf den Hämatokrit-Wert?
- Wie beeinflusst Erythropoietin die Fließgeschwindigkeit des Blutes innerhalb der Mikrozirkulation des Lappens?
Ist eine mögliche Hämatokritveränderung dabei von Bedeutung?
- Welchen Einfluss hat Erythropoietin auf den Durchmesser der venulären, bzw. arteriolären Gefäße?
- Welchen direkten oder indirekten Einfluss hat die Erythropoietin-Präkonditionierung auf die kapilläre Durchblutung?
- Verringert Erythropoietin den apoptotischen Zelltod?
Falls ja, ist diese Verringerung dosisabhängig?

- Welche Auswirkungen hat Erythropoietin auf das Verhalten von Leukozyten?
Gibt es einen entzündungshemmenden Einfluss insbesondere im Rahmen einer Ischämie-induzierten Leukozyten-Endothelzellreaktion?
- Induziert die Erythropoietin-Präkonditionierung im ischämischen Gewebe eine Neovaskularisation, also eine Neubildung von Blutgefäßen?

5. Material und Methoden

5.1. Versuchstiere

Die Tierversuche wurden nach den Bestimmungen des deutschen Tierschutzgesetzes durchgeführt und von der regionalen Tierschutzbehörde genehmigt. In die Studie wurden insgesamt 40 weibliche und männliche Mäuse (C57BL/6J, Charles River Labor, Zuchtinstitut, Sulzfeld) aufgenommen. Das Alter der Tiere lag zwischen 12 und 24 Wochen bei einem Gewicht von 22 bis 29g. Die Tiere wurden in Einzelkäfigen in der Versuchstierhaltung des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes Homburg/Saar (Tierschutzbeauftragte Fr. Dr. med. vet. M. Frings) unter klimatisierten Bedingungen (Lufttemperatur: 22-24°C, relative Luftfeuchtigkeit: 60-65%) untergebracht. Die Tiere hatten Zugang zu Wasser ad libitum und Standardlaborfutter (Firma Altromin, Lage).

5.2. Modell

5.2.1. Anästhesie

Für die chirurgische Präparation sowie die nachfolgenden intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden die Tiere mit einer intraperitonealen Injektion, bestehend aus 90 mg/kg KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet; Parke Davis, Freiburg) und 25 mg/kg KG Xylazinhydrochlorid (Rompun; Bayer, Leverkusen) narkotisiert.

5.2.2. Präkonditionierung

5.2.2.1 Substanz

Epoetin β (rekombinantes humanes Erythropoietin, NeoRecormon, Roche, Basel, Schweiz) wurde zur Verdünnung in 0,3ml NaCl 0,9% gelöst, um eine endgültige Dosis von 500IE/kg Körpergewicht (KG) bzw. 5000IE/kg KG zu erreichen. Die Lösung wurde bis zu einer Maximaltemperatur von höchstens 8°C vor Anwendung aufbewahrt.

5.2.2.2 Vorgehen

Vier von sechs Versuchsgruppen wurden mit EPO intraperitoneal (ip) vorbehandelt. Die ip-Verabreichung erfolgte 24h vor Lappenhebung und wurde an den folgenden 3 Tagen täglich fortgesetzt.

5.2.3. Chirurgische Präparation

Nach erfolgter Narkose wurde den Tieren mittels Rasur und Auftragen von Enthaarungscreme das Fell entfernt. Zum Schutz vor Austrocknung und möglicher Keratitisbildung wurde während der Operation Bepanthen-Augensalbe auf die Augen der Tiere aufgetragen.

Auf dem sterilen Operationstisch wurde der Rücken der Tiere mit Desinfektionsspray benetzt. In den sechs Versuchsgruppen wurden zwei verschiedene Operationsverfahren angewandt, nämlich das Anbringen einer Rückenhautkammer (chamber) und die Präparation eines Hautmuskellappens (flap).

5.2.3.1. Präparation der Hautkammer (chamber)

Durch Hochziehen der dehnbaren Rückenhaut wurden mit Hilfe einer auf der Gegenseite positionierten Kaltlichtlampe die Rückenhautgefäße dargestellt. Nachdem diese in eine symmetrische Lage gebracht wurden, konnte die eine Seite der Kammer fixiert werden. Dies erfolgte basal mittels zweier durch kleine Hautlöcher geführter Schrauben und am äußeren Rand mittels Nähten. In Höhe der mittigen runden Öffnung der Kammer wurde nun auf der

Gegenseite ein entsprechendes rundes Hautareal mit einem Durchmesser von 20mm entfernt. Dadurch erhielt man Sicht auf die darunter liegende Haut der anderen Seite, bestehend aus Epidermis, subkutanem Gewebe und gestreifter Muskulatur (panniculus carnosus). Diese wurde beidseitig von der DCIA (deep circumflex iliac artery) und der LTA (lateral thoracic artery) versorgt. Unter mikroskopischer Aufsicht konnte mittels 16-facher Vergrößerung die auf der Gefäßschicht befindliche „Gallertschicht“ (loose areolar tissue) bei ständiger Befeuchtung des Operationsgebietes mikrochirurgisch abpräpariert werden. Nun wurde das Gegenstück der Kammer an drei verschiedenen Stellen durch Schrauben fixiert und ein Tropfen Bisbenzimid H33342 (Hoechst; Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) auf das Beobachtungsfenster appliziert. Dieses wurde nun noch mit einem Deckglas zum Schutz vor Austrocknung, äußeren Einflüssen und zur weiteren *in vivo*-Mikroskopie versehen. Das Deckglas wurde mittels eines Sprengringes in der Öffnung fixiert. Die Kammern wogen insgesamt etwa 3g und wurden von den Tieren gut toleriert. Dies war unter anderem daran zu erkennen, dass sie keine Veränderungen im Schlaf- oder Fressverhalten zeigten.

5.2.3.2. Präparation des Hautlappens (flap)

Der Beginn der Präparation erfolgte wie oben bereits bei der Präparation der Hautkammer beschrieben. Nach der Montage der ersten Kammerhälfte wurde diese wieder abgenommen und der Hautlappen auf dem Rücken des Tieres eingezeichnet (Abb. 2A). Seine Größe betrug 11x15mm. Bei der nachfolgenden Präparation des Hautlappens wurden die beiden versorgenden Gefäße, die DCIA (deep circumflex iliac artery) und die LTA (left thoracic artery) durchtrennt (Abb. 2B). Nun wurde der präparierte Lappen wieder auf den vorher abmontierten Titaniumrahmen aufgespannt und dort mit Nähten und Schrauben fixiert (Abb. 2C). Nachfolgend wurde er mit der umgebenden Haut vernäht (Nahtmaterial 6-0), was Adhäsion und Zusammenhalt der Kammer garantierte (Abb. 2D). Erneut erfolgte die Abtragung der „Gallertschicht“ (loose areolar tissue) wie oben bereits beschrieben. Nach Montage des Gegenstücks des Kammerrahmens, der mit einem Dichtungsgummi versehen war, erfolgten auch hier, wie unter der Präparation der Hautkammer bereits beschrieben, die Applikation von Bisbenzimid H33342 (Hoechst; Sigma) eines Deckglases und eines Sprengringes (Abb. 2E-F).

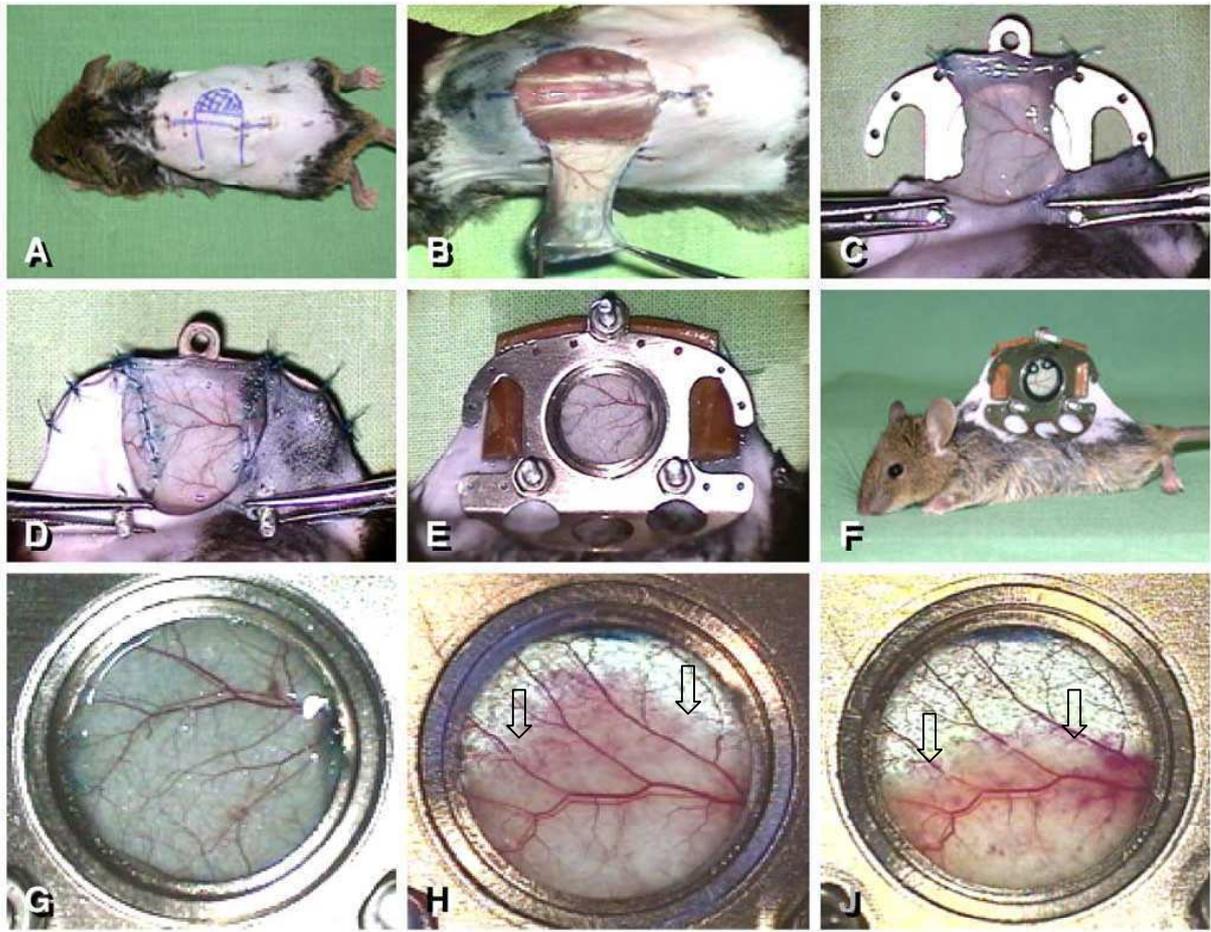


Abbildung 2: Darstellung der oben beschriebenen Präparation des Hautlappens (A-F). Darstellung des Beobachtungsfensters unterschiedlicher Versuchstiere an Tag 0 (G), Tag 1 (H) und Tag 3 (I) nach Lappenhebung in der Versuchsgruppe ohne Vorbehandlung (Gabe von Kochsalz i.p.). Zu sehen ist eine zunehmende Demarkationslinie ↓ als Grenze zwischen perfundiertem und nicht-perfundiertem Gewebe.

5.3. Untersuchungstechniken

5.3.1. Fluoreszenzfarbstoffe

5.3.1.1. Fluoreszein-Isothiozyanat (FITC)

Fluoreszein-Isothiozyanat ist ein fluoreszierender Farbstoff, bei dem Fluoreszein an Dextran gebunden ist (FITC-Dextran; Molekulargewicht 150000Da; Sigma Chemical Co., Deisenhofen). Der intravenös verabreichte Farbstoff dient zur Kontrastverstärkung von Blutgefäßen und findet somit Anwendung bei intravitalem Perfusionsstudien am Tiermodell. Das Exzitationsmaximum dieses Fluorochroms liegt bei 490 nm.

5.3.1.2. Rhodamin 6G

Rhodamin (Sigma Chemical Co., Deisenhofen) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der zur in-vivo-Anfärbung von Leukozyten dient. Die Anfärbung entsteht durch Bindung der Substanz im Zellkern. Hierdurch sind Leukozyten und Thrombozyten, im Gegensatz zu den kernlosen Erythrozyten, fluoreszierend und können ausgewertet werden.

5.3.1.3. Bisbenzimid H 33342 (Hoechst)

Bisbenzimid H 33342 (Hoechst) ist ein DNA-bindender Fluoreszenzfarbstoff mit dessen Hilfe Zellkerne und Chromatin direkt an lebenden Zellen markiert werden können. Im Zuge des apoptotischen Zelltodes kommt es zur Kondensation, Fragmentierung und Margination des Zellkerns. So kann eine Akkumulation des Farbstoffes eine hohe Fluoreszenz auslösen und lässt sich von unversehrten Kernen gut unterscheiden. Durch die spezifische Bindung an zellulärer DNA kann die Zahl apoptotischer Zellen pro mm² bestimmt und innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen verglichen werden. Das Exzitationsmaximum liegt bei 530 nm.

5.3.2. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Um eine mikroskopische Analyse *in vivo* durchführen zu können, wurden die narkotisierten Mäuse in Seitenlage auf einer Plexiglasplatte an der Kammer mit Fäden immobilisiert. Nach Entfernen des Sprengrings und Kontrolle der Narkosetiefe wurden die Farbstoffe Fluorescein-Isothiozyanat (FITC)-Dextran (Molekulargewicht 150000, Sigma Aldrich, Deishofen) und Rhodamin-6G (Sigma Aldrich), in einem Verhältnis von 1:1 zu je 0,05ml retrobulbär intravenös injiziert. Danach wurden die Tiere unter einem Zeiss-Axiotech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen) positioniert, welches an eine 100 Watt Lampe angeschlossen war, die über ein Filtersystem zur Auflichtbeleuchtung diente (Abb. 3). Unterschiedliche Filterblöcke für blaues (Anregungswellenlänge: 450-490nm; Emissionswellenlänge: >520nm), grünes (Anregungswellenlänge: 530-560nm; Emissionswellenlänge: >580nm) und ultraviolettes Licht (Anregungswellenlänge 330-390nm; Emissionswellenlänge: >430nm) konnten je nach Verwendungszweck in den Strahlengang eingebracht werden. Mikroskopische Bilder wurden mit einer hochempfindlichen CCD (charge coupled device)-Videokamera (FK6990; Pieper, Schwerte) auf Videoband (Panasonic AG-7350-SVHS; Matasushita, Tokyo, Japan) für spätere offline Auswertungen aufgenommen (Abb. 3).

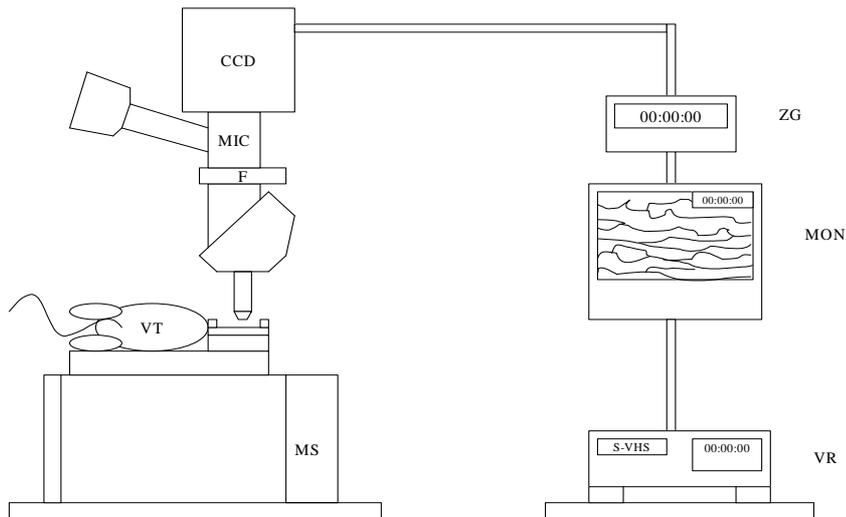


Abbildung 3: Schematische Darstellung des Arbeitsplatzes zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie. Das Versuchstier (VT) befindet sich narkotisiert in Seitenlage auf einer Plexiglasplatte, worauf die Kammer mit Fäden fixiert ist. Das zu mikroskopierende Areal ist mit einem Deckglas versehen. Das verstellbare Magnetstativ (MS) erlaubt eine exakte Einstellung der zu untersuchenden Oberfläche, um ein scharfes Bild auf dem Monitor (MON) zu erzeugen. Eine Aufzeichnung der bewegten Bilder erfolgt mit einem Videorekorder (VR). MIC = Mikroskop, CCD = CCD-Videokamera, ZG = Video-Zeitgenerator.

5.3.3. Analyse der Mikrozirkulation

Die mikroskopischen Untersuchungen wurden bei einer konstanten Raumtemperatur von etwa 23°C an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 postoperativ durchgeführt. Zur Aufnahme wurden verschiedene Objektive (x4, NA (numerische Apertur) 0.16; x10, NA 0.30; x20 long distance, NA 0.32; x63 Wasserimmersion, NA 0.90) verwendet.

Zu jedem Beobachtungszeitpunkt wurde zunächst die gesamte Fläche (mm²) des Hautgewebes im Kammerfenster mit dem x4 Objektiv systematisch abgefahren (gescannt). Dies ermöglicht, das Ausmaß des nicht-perfundierten bzw. nekrotischen Gewebes von perfundiertem Gewebe zu unterscheiden. Die Angabe der nicht-perfundierten Lappenanteile bzw. der Nekrosefläche erfolgte in % der Gesamtlappenfläche.

Des Weiteren wurden mit dem x4 und x20 Objektiv Arteriolen 2. und 3. Ordnung mit den begleitenden Venulen im proximalen, mittleren und distalen Areal des Hautgewebes aufgesucht. Zur Wiedererkennung bei nachfolgenden Untersuchungen sollten diese Gefäßbündel markante Abgangsmuster zeigen. Ein Bild der Videoaufnahmen wurde zur Reorientierung auf Fotopapier ausgedruckt. Aus der Aufnahme der Gefäßbündel ließen sich später die Parameter arterioläre und venuläre Fließgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) und der jeweilige Durchmesser des Gefäßes (μm) im Verlauf mit Hilfe eines dynamischen Bildanalyse-Systems (Cap Image, Zeintl Software; Heidelberg) bestimmen.

Des Weiteren wurden mit dem x20 Objektiv je 3 Kapillarfelder aus den proximalen, mittleren und distalen Lappenabschnitten aufgenommen, um wiederum die kapillare Fließgeschwindigkeit ($\mu\text{m/s}$) und den kapillaren Durchmesser (μm) sowie die funktionelle Kapillardichte (cm/cm^2), welche die Gesamtlänge perfundierter Kapillaren pro analysiertem Gesichtsfeld angibt, zu bestimmen (Abb. 4).

Die Analyse des Fließverhaltens der Leukozyten beinhaltete zwei Parameter; zum einen die am Endothel entlang rollenden, zum anderen die fest adhärenen Leukozyten. Beobachtungen wurden sowohl in Venolen als auch in Arteriolen durchgeführt. Die am Gefäßendothel adhärenen Leukozyten wurden definiert als sich innerhalb von 30 sec nicht bewegende Zellen. Die Angaben erfolgten in Zellen pro mm^2 Endotheloberfläche (Zellen/mm^2). Rollende Leukozyten passierten innerhalb von 30 sec eine vorher im Gefäß quer festgelegte Referenzlinie. Die Angabe erfolgte in diesem Fall in Zellen/min/mm Referenzlinie (Abb. 5).

Unter Verwendung des DNA-bindenden Fluorochroms Bisbenzimid H33342 (Sigma Aldrich) wurden charakteristische apoptotische Zellen (n/mm^2) mit Zeichen nukleärer Kondensation, Fragmentation und Margination identifiziert. Die Aufnahmen erfolgten mit dem x63 Wasserimmersionsobjektiv (Abb. 6).

Während der gesamten Mikroskopie wurde besondere Aufmerksamkeit auf morphologische Veränderungen im Rahmen einer Angiogenese, wie mikrovaskuläres Remodelling, sowie Gefäßsprossung und -knospung, gelegt.

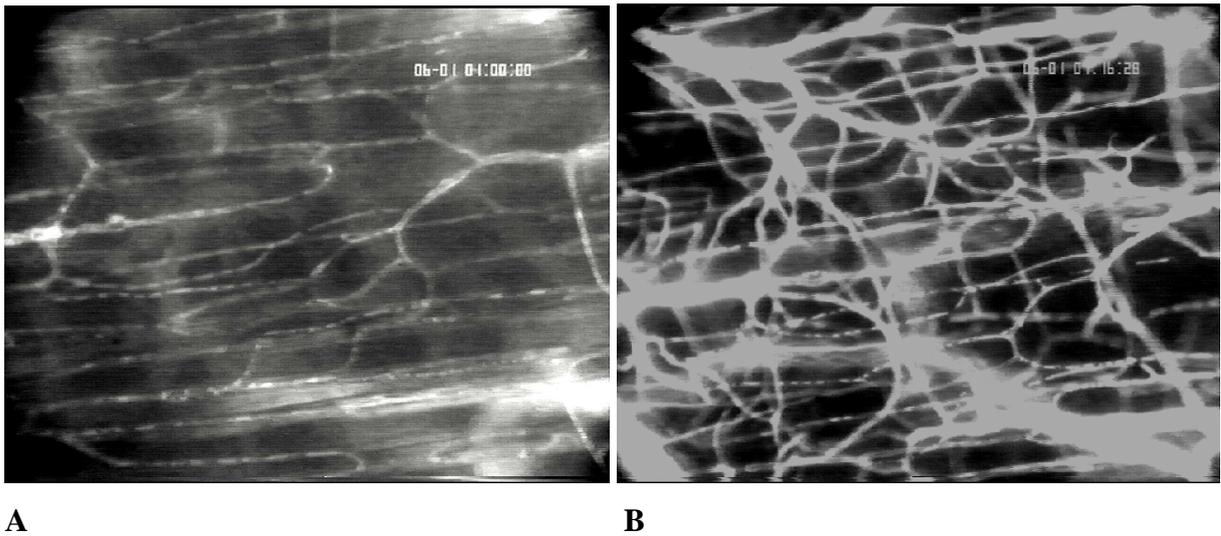


Abbildung 4a, 4b: In vivo Bilder der Kapillarfelder im proximalen Hautlappenareal eines mit Erythropoietin präkonditionierten Versuchstieres. Abbildung 2a zeigt eine Aufnahme an Tag 1, Abbildung 2b an Tag 7. Aufnahme mit x20 Objektiv.

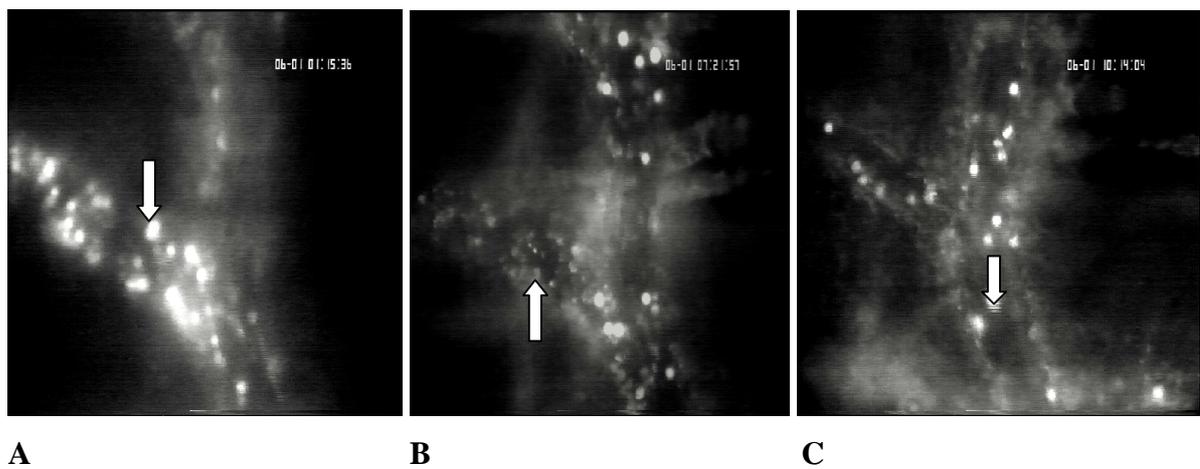


Abbildung 5a, 5b, 5c: In vivo Bilder von Leukozyten ↓ in einer Arteriole im mittleren Abschnitt eines mit Erythropoietin 500 vorbehandelten Hautlappens. Vereinzelt und deutlich kleiner sind Thrombozyten ↑ zu erkennen. Abbildung 3a zeigt eine Aufnahme an Tag 1, Abbildung 3b an Tag 7 und Abbildung 3c an Tag 10. Aufnahme mit x20 Objektiv.

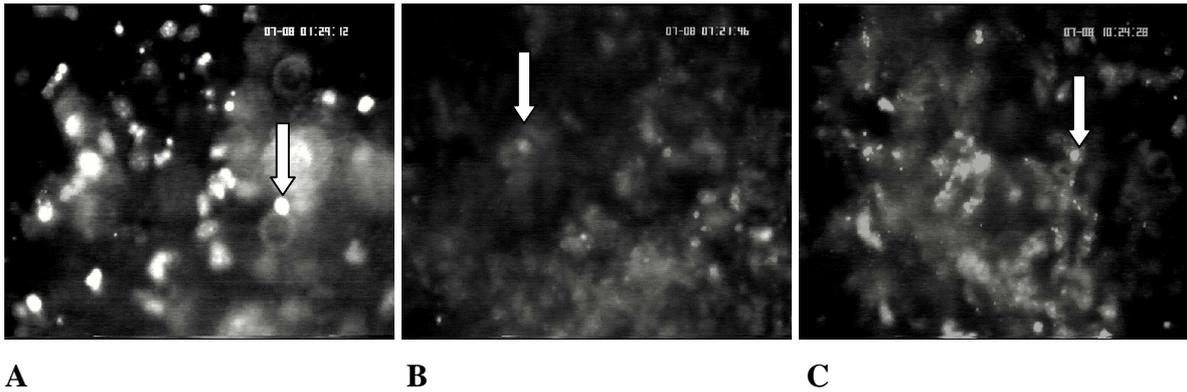


Abbildung 6a, 6b, 6c: *In vivo* Bilder des apoptotischen Zelltodes ↓ im mittleren Lappenabschnitt eines mit Erythropoietin 500 vorbehandelten Hautlappens. Abbildung 6a zeigt eine Aufnahme an Tag 1, Abbildung 6b an Tag 7 und Abbildung 6c an Tag 10.

5.3.4. Blutanalyse

Die Entnahme einer Blutprobe (ca. 150µl) erfolgte aus der Schwanzvene von 6 Versuchstieren pro Gruppe an Tag -1 (ein Tag vor Lappenpräparation) und an Tag 10. Dies diente der Analyse und Verlaufskontrolle des Hämatokritwertes mit und ohne EPO-Einwirkung. Für sofortige Messungen wurde ein speziell für Mausblut entworfenes Gerät benutzt (OSM3, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark).

5.4. Experimentelles Protokoll

Ziel der Untersuchung war eine detaillierte Analyse der Effekte einer Gewebepreparation mit Erythropoietin bei anhaltender Ischämie im Hautmuskulgewebe durchzuführen. Im Detail untersucht wurden die Auswirkungen auf

- a) Nekrosefläche (% der Lappengesamtfläche)
- b) Fließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen (RBCV, mm/s)
- c) Durchmesser von Arteriolen und Venolen (µm)
- d) Fließgeschwindigkeit in Kapillaren (mm/s)
- e) Kapillardurchmesser (µm)

- f) Funktionelle Kapillardichte (FCD, cm/cm²)
- g) Apoptose (Zellen/mm²)
- h) Entzündung (Leukozyten-Endothelzellinteraktion)
- i) Angiogenese
- j) Hämatokrit (%).

Insgesamt gab es 6 Versuchsgruppen mit je 9 bis 13 Versuchstieren:

- Gruppe 1: Rückenhautkammer (RHK) ohne Präkonditionierung (RHK Kontrolle)
- Gruppe 2: RHK mit EPO-Verabreichung (500IE/kg KG) (RHK EPO 500)
- Gruppe 3: RHK mit EPO-Verabreichung (5000IE/kg KG) (RHK EPO 5000)
- Gruppe 4: Lappen und RHK ohne Präkonditionierung (flap Kontrolle)
- Gruppe 5: Lappen und RHK mit EPO-Präkonditionierung (flap EPO 500)
- Gruppe 6: Lappen und RHK mit EPO-Präkonditionierung (flap EPO 5000)

EPO behandelte Gruppen erhielten 24h vor OP, am OP-Tag selbst und an den Tagen 1 bis 3 täglich eine ip-Verabreichung der jeweiligen Dosis, um insgesamt 5 Injektionen zu erhalten. Die nicht behandelten Tiere der Gruppen „RHK Kontrolle“ und „Flap Kontrolle“ erhielten zeitgleich eine ip-Injektion mit einer äquivalenten Menge Kochsalzlösung.

An den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 nach OP erfolgte die intravitale Fluoreszenzmikroskopie (siehe auch Kapitel 5.3.2.).

Am Ende des Experiments wurden die Versuchstiere mit einer Überdosis des Anästhetikums getötet, Gewebeproben zur weiteren Untersuchung asserviert und die Tiere danach sachgerecht entsorgt.

5.5. Datenerfassung und Statistik

Die primäre Datenerfassung erfolgte während der Auswertung der Videobänder am Cap Image auf eigens angefertigten Bögen. Die aufgenommenen Daten wurden über einen analogen und digitalen Framegrabber eingelesen und mit Hilfe der Cap Image Software ausgewertet. Dies ermöglichte eine von der Mikroskopie zeitlich unabhängige Auswertung der Daten. Die gewonnenen Daten wurden in einem zweiten Schritt in einem Tabellenkalkulationsprogramm (Excel, Microsoft Corporation, Unterschleißheim) zur elektronischen Datenverarbeitung eingegeben und gespeichert. Für die statistische Auswertung und graphische Darstellung kamen die beiden Programme SigmaStat, bzw. SigmaPlot (Jandel Corporation, San Rafael, California, USA) zur Anwendung.

Alle Werte wurden als SEM (standard error of the mean) angegeben. Zum Vergleich einzelner Untersuchungszeitpunkte innerhalb einer jeweiligen Gruppe und der Gruppe untereinander wurde eine one way Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen angewandt. Darüber hinaus wurden post hoc-Tests durchgeführt. Mit Hilfe der Bonferroni Methode wurde der Alphafehler korrigiert. Unterschiede wurden ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,05$ als signifikant, ab einer Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 0,001$ als hoch signifikant betrachtet.

6. Ergebnisse

6.1. Kontrolle, Hautkammer (Chamber)

6.1.1. Fließgeschwindigkeit

6.1.1.1. Arteriöläre Fließgeschwindigkeit

Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigte über den Versuchszeitraum von 10 Tagen eine weitgehend konstante arteriöläre Fließgeschwindigkeit, ebenso die mit EPO 500 und EPO 5000 präkonditionierten Gruppen (Abb. 7). Allerdings war die arteriöläre Fließgeschwindigkeit bei den Kontrolltieren in allen 3 Kammerabschnitten signifikant höher als nach Präkonditionierung. Die Fließgeschwindigkeit zeigte innerhalb der beiden mit EPO 500 und EPO 5000 präkonditionierten Gruppen über den 10tägigen Beobachtungszeitraum keinen Unterschied (Abb. 7).

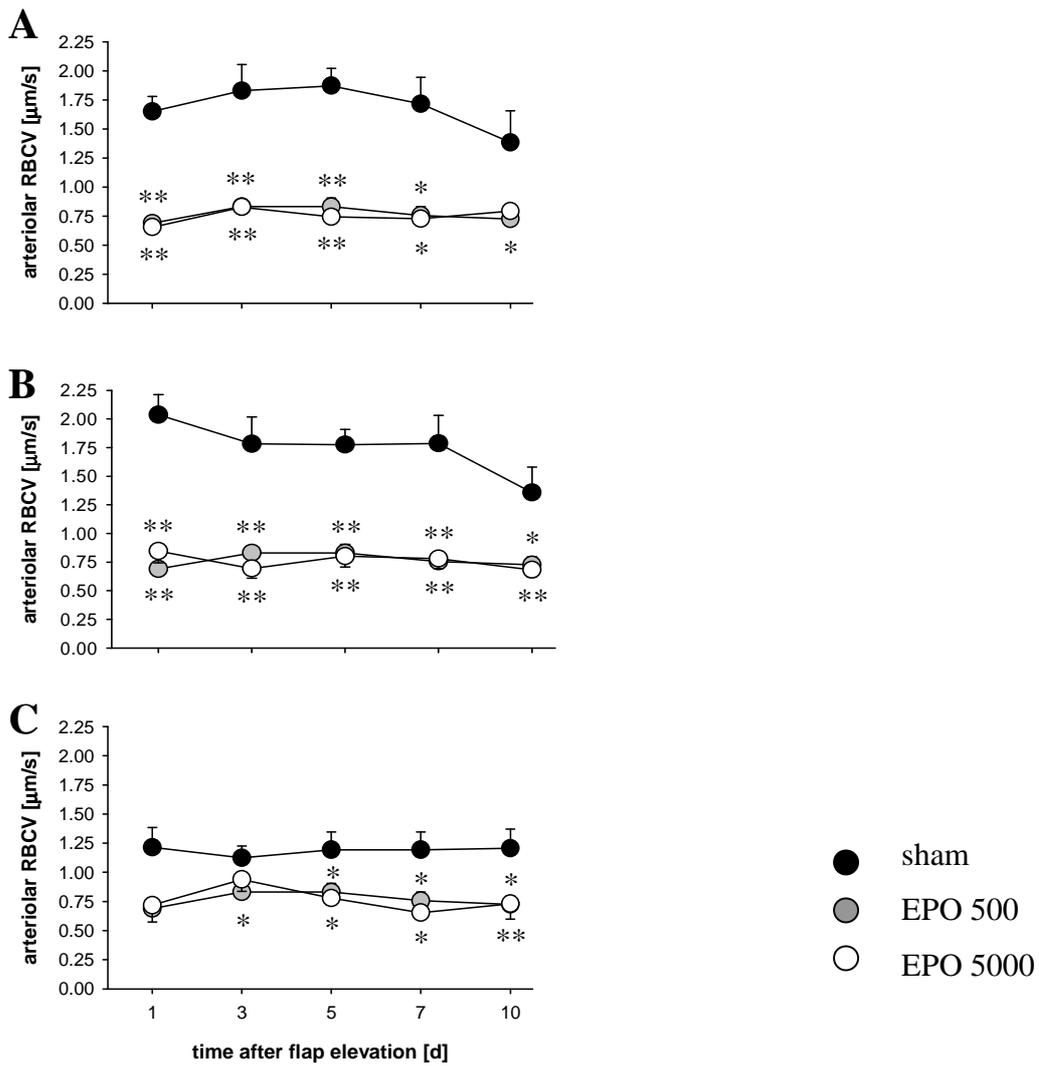


Abbildung 7: Arteriöläre Fließgeschwindigkeit (arteriolar RBCV, $\mu\text{m/s}$) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs sham.

6.1.1.2. Venuläre Fließgeschwindigkeit

Die Kontrollgruppe zeigte über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen einen kontinuierlichen Anstieg der venulären Fließgeschwindigkeit, wohingegen die mit EPO 500 behandelte Gruppe im Verlauf der Beobachtungsperiode einen Abfall der venulären Fließgeschwindigkeit zeigte (Abb. 8). Im Gegensatz dazu zeigte die mit EPO 5000 präkonditionierte Gruppe eine konstante Fließgeschwindigkeit. Außer gegen Ende der Beobachtungszeit, anlässlich welcher die unbehandelten Tiere eine erhöhte venuläre Fließgeschwindigkeit aufwiesen, beobachteten wir keine Unterschiede (Abb. 8).

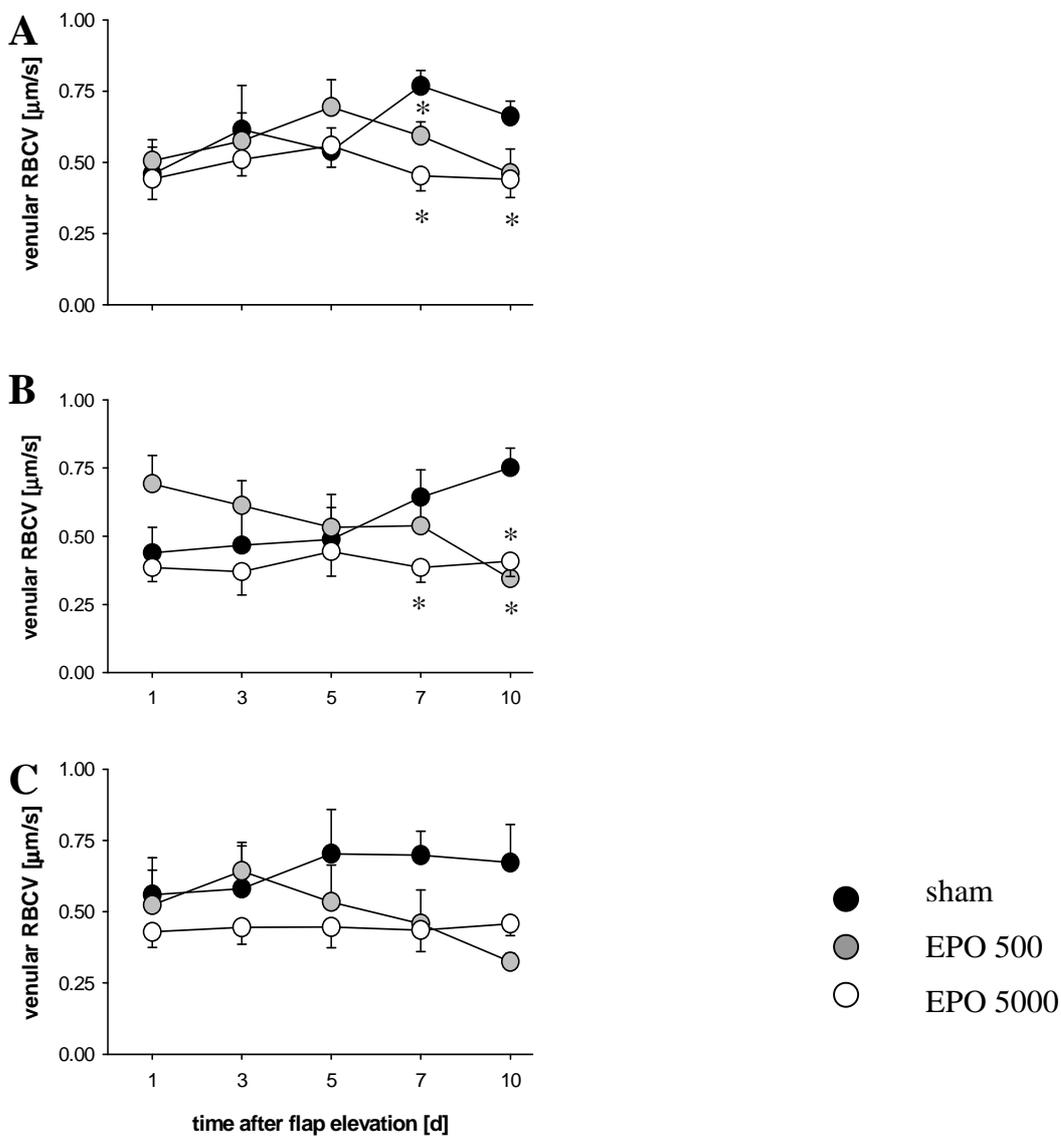


Abbildung 8: Venuläre Fließgeschwindigkeit (venular RBCV, $\mu\text{m/s}$) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0.05$ vs sham.

6.1.2. Gefäßdurchmesser in Arteriolen und Venulen

6.1.2.1. Arteriöler Gefäßdurchmesser

Die arteriölen Gefäßdurchmesser in der Kammer zeigten sich in allen 3 Versuchsgruppen im Verlauf der 10 Tage annähernd konstant (Abb. 9). Eine Ausnahme beobachteten wir im distalen Kammeranteil, wo der Gefäßdurchmesser in den mit EPO vorbehandelten Tieren eine arteriöle Dilatation aufwies, insbesondere nach Vorbehandlung mit 5000 IE EPO/kg KG (Abb. 9).

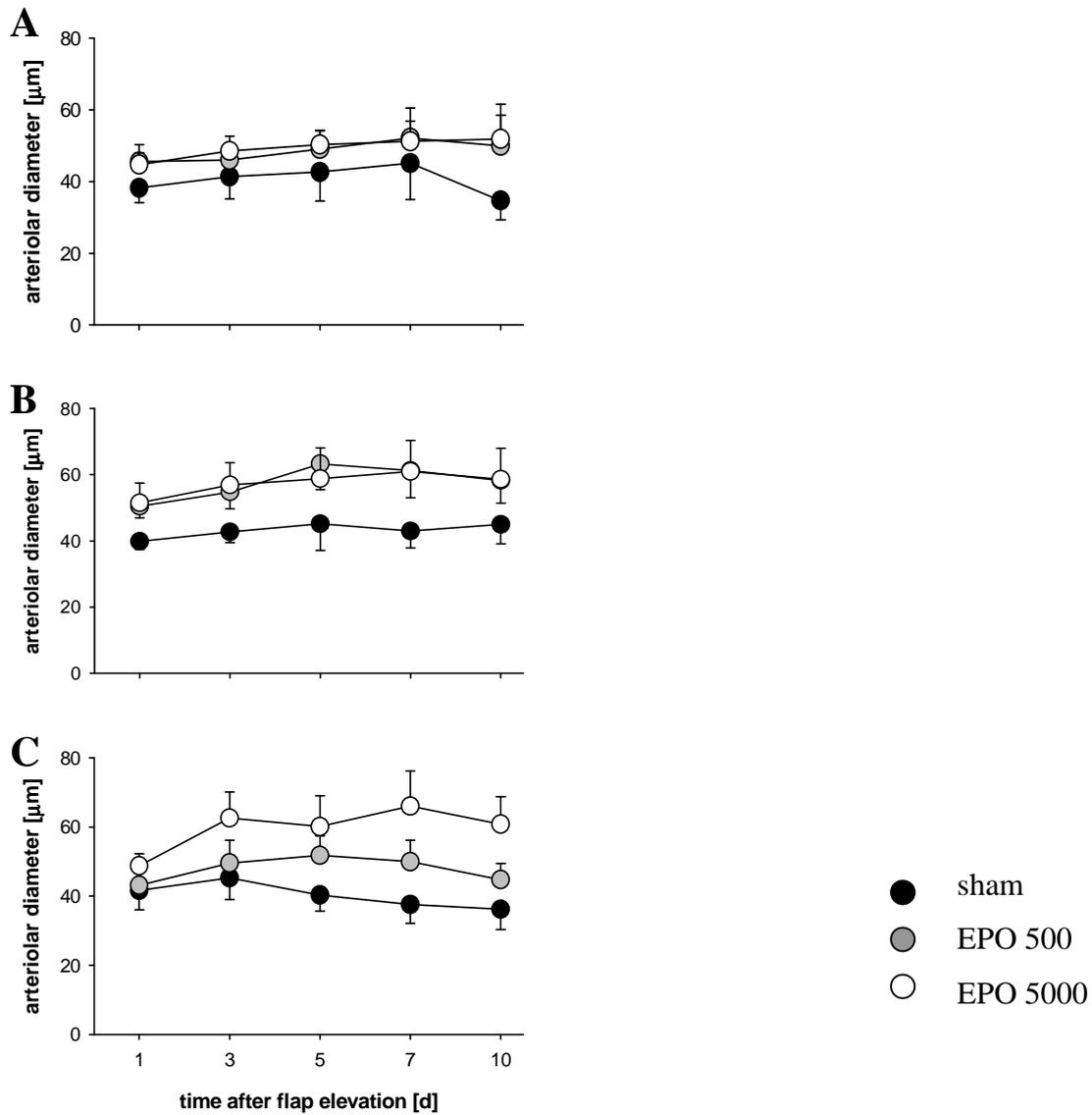


Abbildung 9: Arteriöler Gefäßdurchmesser (arteriolar diameter, μm) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation.

6.1.2.2. Venulärer Gefäßdurchmesser

Der venuläre Gefäßdurchmesser der Kontrollgruppe zeigte sich über den gesamten Beobachtungszeitraum in allen Kammeranteilen mit Werten um etwa 35 μm konstant. Im Vergleich hierzu zeigte die mit EPO 500 präkonditionierte Gruppe sowohl im proximalen wie auch im zentralen Drittel der Kammer ab Tag 3 eine signifikante venuläre Dilatation ($p < 0,05$ vs. sham) (Abb.10). Die Vorbehandlung mit der hohen EPO-Dosis führte zu einer nicht-signifikanten Erweiterung des Gefäßdurchmessers, die im kritisch perfundierten mittleren Kammerdrittel über die ersten 7 Tage rund 50% betrug. Die Gefäßdurchmesser waren im Gegensatz zur EPO 500 Gruppe über die Zeit sehr konstant (Abb.10).

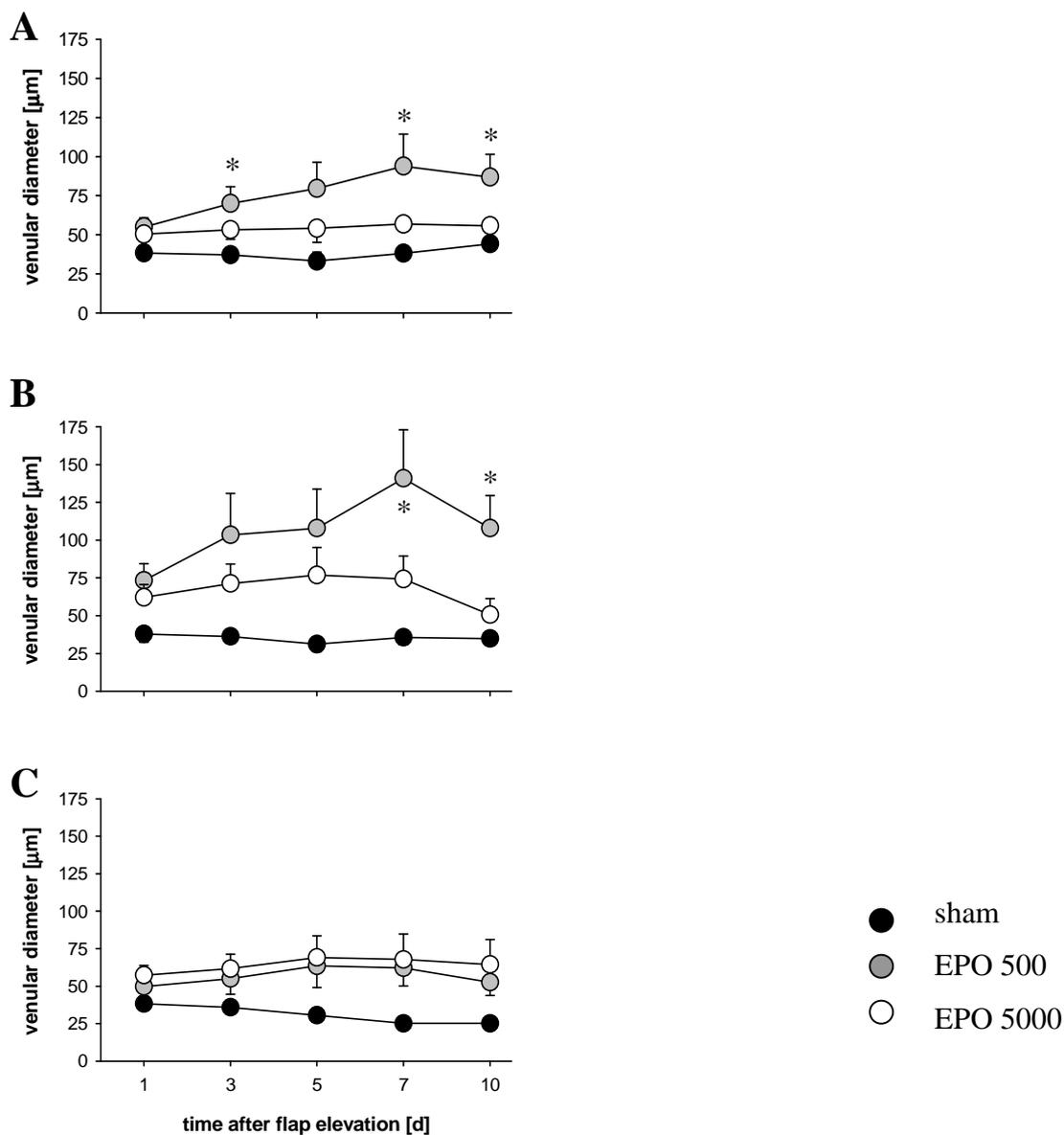


Abbildung 10: Venulärer Gefäßdurchmesser (venular diameter, μm) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0.05$ vs sham.

6.1.3. Mikrozirkulation in Kapillaren

6.1.3.1. Kapilläre Fließgeschwindigkeit

Die kapilläre Fließgeschwindigkeit war in den mit EPO vorbehandelten Gruppen über die 10 Tage in allen Kammeranteilen weitgehend konstant (Abb. 11). Demgegenüber zeigten die unbehandelten Tiere einen leichten Anstieg der kapillären Fließgeschwindigkeit von rund 15% gegenüber dem Ausgangswert, der in den 3 Versuchsgruppen annähernd gleich war (Abb. 11). Dieser Anstieg der Fließgeschwindigkeit entwickelte sich in Analogie zu der vorher beschriebenen Fließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venulen.

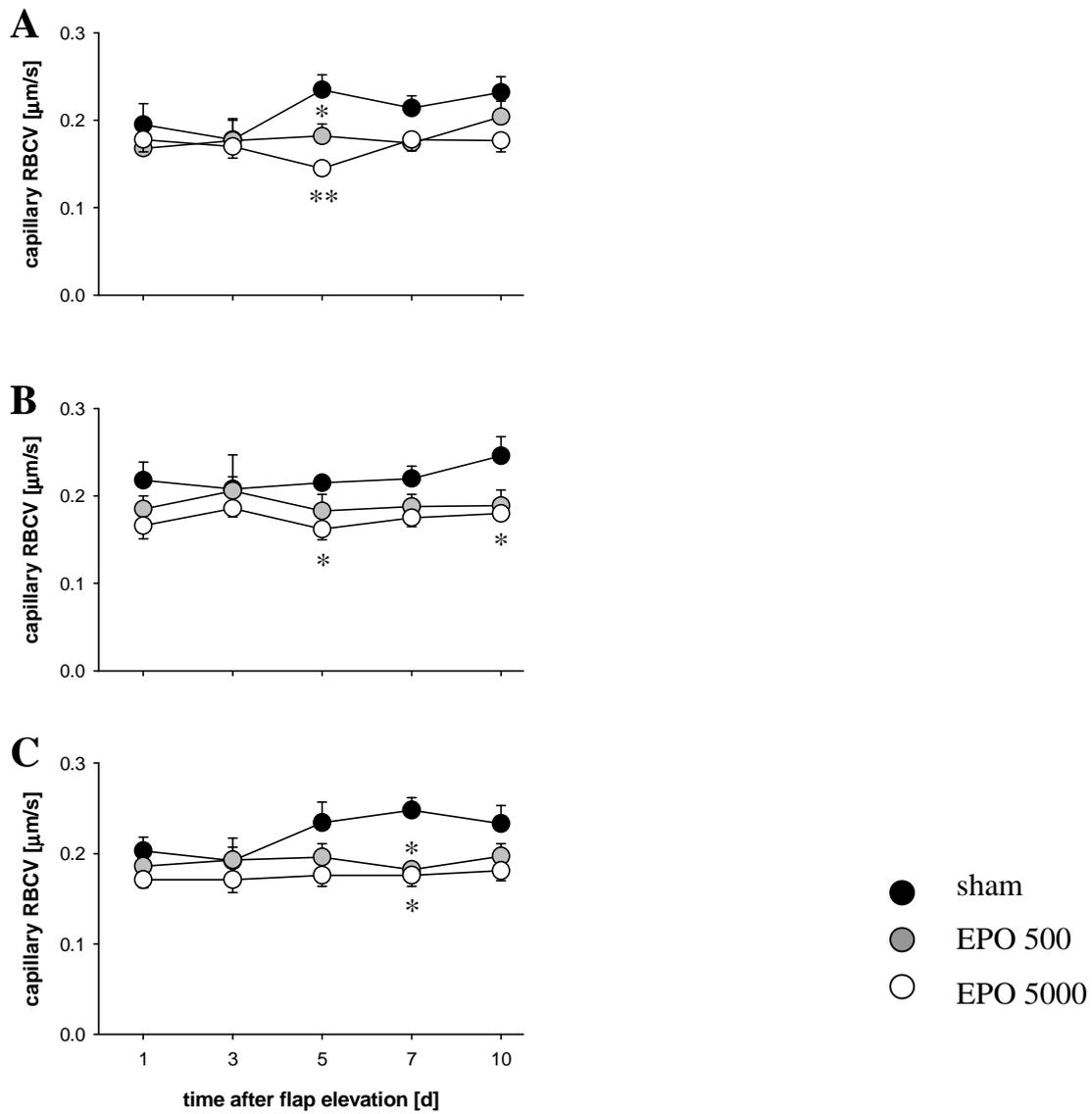


Abbildung 11: Kapilläre Fließgeschwindigkeit (capillary RBCV, $\mu\text{m/s}$) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs sham.

6.1.3.2. Kapillardurchmesser

Der kapilläre Durchmesser zeigte im proximalen Teil der Hautkammer keinen signifikanten Unterschied zwischen den einzelnen Versuchsgruppen, dies obwohl die niedrige EPO Dosierung ab Tag 7 im mittleren Anteil zu einer eindeutigen Dilatation der Kapillaren führte (Abb. 12). In den kritisch perfundierten mittleren und distalen Kammerarealen zeigte die EPO Vorbehandlung unabhängig von ihrer Dosierung eine signifikante Dilatation der Kapillaren ab Tag 5 ($p < 0,05$). Es ist hervorzuheben, dass EPO 5000 bereits am 1.Tag nach Kammerpräparation zu einer signifikanten Kapillardilatation führte ($p < 0,05$) (Abb. 12).

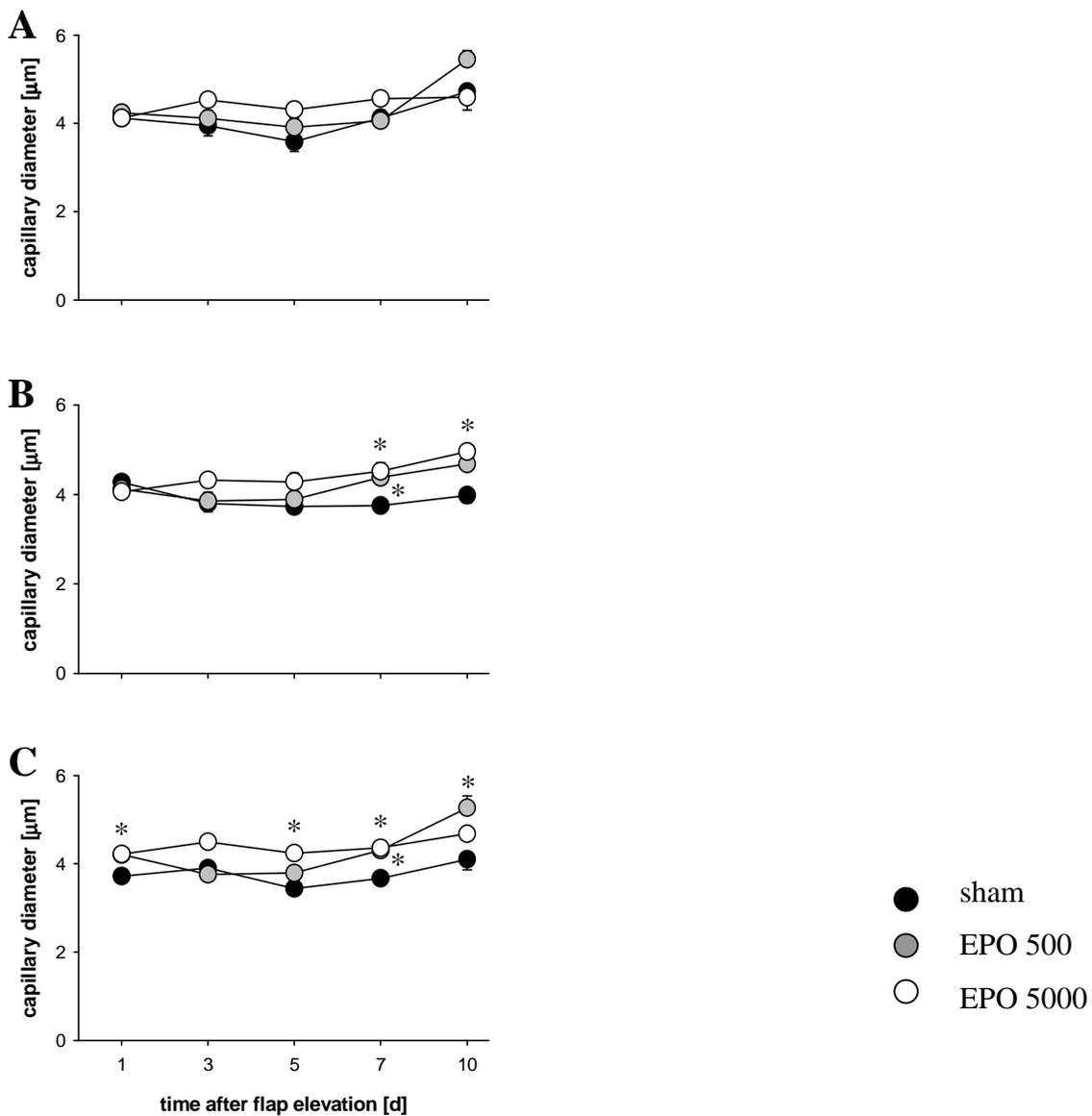


Abbildung 12: Kapillardurchmesser (capillary diameter, μm) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation.

* $p < 0.05$ vs sham

6.1.3.3. Funktionelle Kapillardichte

Die Kapillardichte zeigte in allen Kammerarealen konstant hohe Werte über die 10 Tage (Abb. 13). Eine Ausnahme beobachteten wir im mittleren Kammerdrittel, wo die mit EPO vorbehandelten Tiere im Gegensatz zur unbehandelten Kontrollgruppe einen signifikanten Abfall der funktionellen Kapillardichte, gepaart mit einem leichten Anstieg der nutritiven Perfusion bei den sham Mäusen, aufwiesen (Abb. 13).

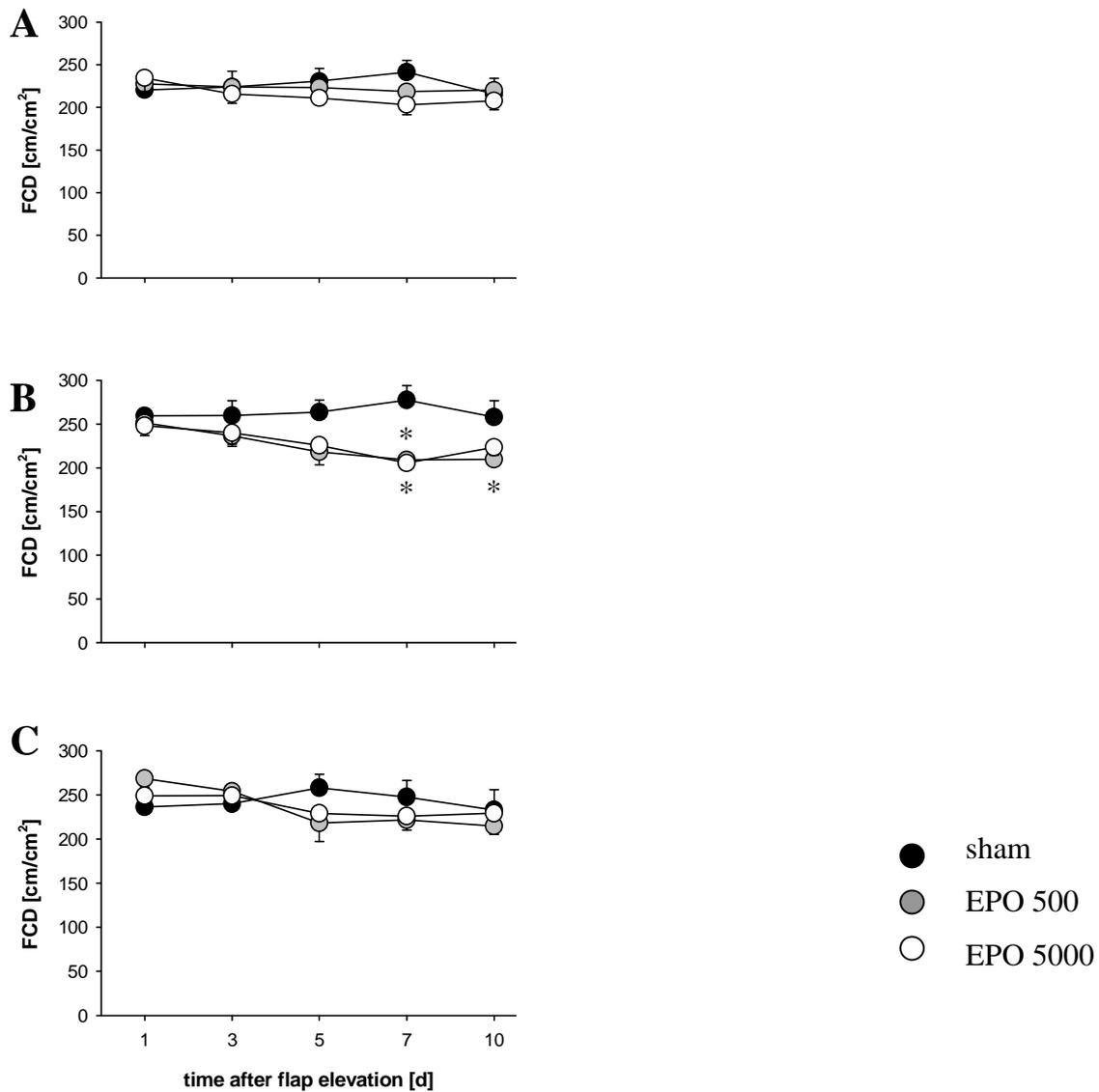


Abbildung 13: Funktionelle Kapillardichte (FCD, cm/cm²) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0.05$ vs sham.

6.1.4. Apoptotischer Zelltod

Die EPO Vorbehandlung hatte lediglich im zentralen Kammerabschnitt an Tag 3 einen Einfluss auf den apoptotischen Zelltod, indem eine signifikante dosisunabhängige Verminderung der Apoptosen zu beobachten war ($p < 0,05$) (Abb. 14). Darüberhinaus zeigten sich in den 3 Versuchsgruppen keine Unterschiede im zeitlichen Verlauf (Abb. 14).

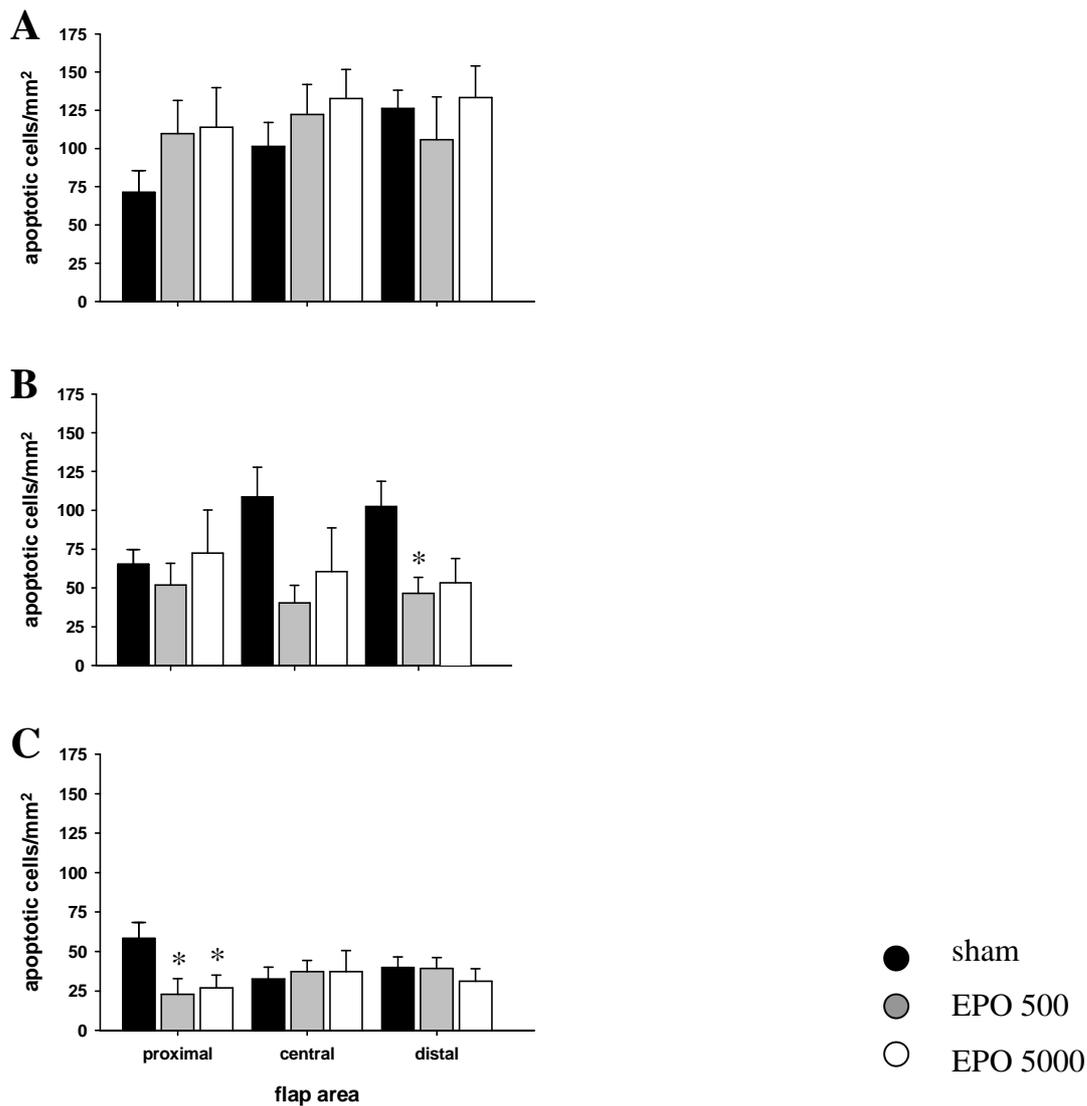


Abbildung 14: Anzahl apoptotischer Zellen (apoptotic cells/mm²) im proximalen , zentralen und distalen Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1 (A), 3(B), und 5(C) Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0,05$ vs sham

6.1.5. Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Wir beobachteten in der gesamten Kammer von unbehandelten Tieren eine entzündliche Reaktion, welche durch die chirurgische Präparation hervorgerufen wurde. Diese war über 10 Tage vorhanden, zeigte jedoch gegen Ende der Beobachtungsperiode eine deutliche Verminderung. Interessanterweise führte die Vorbehandlung mit EPO zu einer dosisunabhängigen Reduktion der Entzündung, gekennzeichnet durch einen Rückgang bzw. eine nicht mehr messbare Interaktion zwischen Leukozyten und arteriolärem Gefäßendothel ($p < 0,05$). Diese Beobachtung weist auf einen antiinflammatorischen Effekt hin, der direkt oder indirekt durch EPO vermittelt wird. Diese Beobachtung machten wir in Bezug auf rollende und adhärente Leukozyten. Die antiinflammatorische Wirkung war in Arteriolen und postkapillären Venulen über den gesamten Beobachtungszeitraum in allen drei Kammeranteilen vergleichbar (Abb. 15-18).

6.1.5.1. Rollende Leukozyten in Arteriolen

In den Tagen nach der Kammerpräparation kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der Zahl rollender Leukozyten in Arteriolen (Abb. 15). Insbesondere die mit EPO behandelten Versuchsgruppen zeigten gegenüber der mit Kochsalz präkonditionierten Gruppe einen signifikanten Abfall der Leukozytenzahl (Abb. 15). Innerhalb der beiden EPO-Gruppen zeigte die EPO 5000 Reihe etwas niedrigere rollende Leukozytenzahlen als die EPO 500 Reihe (Abb. 15).

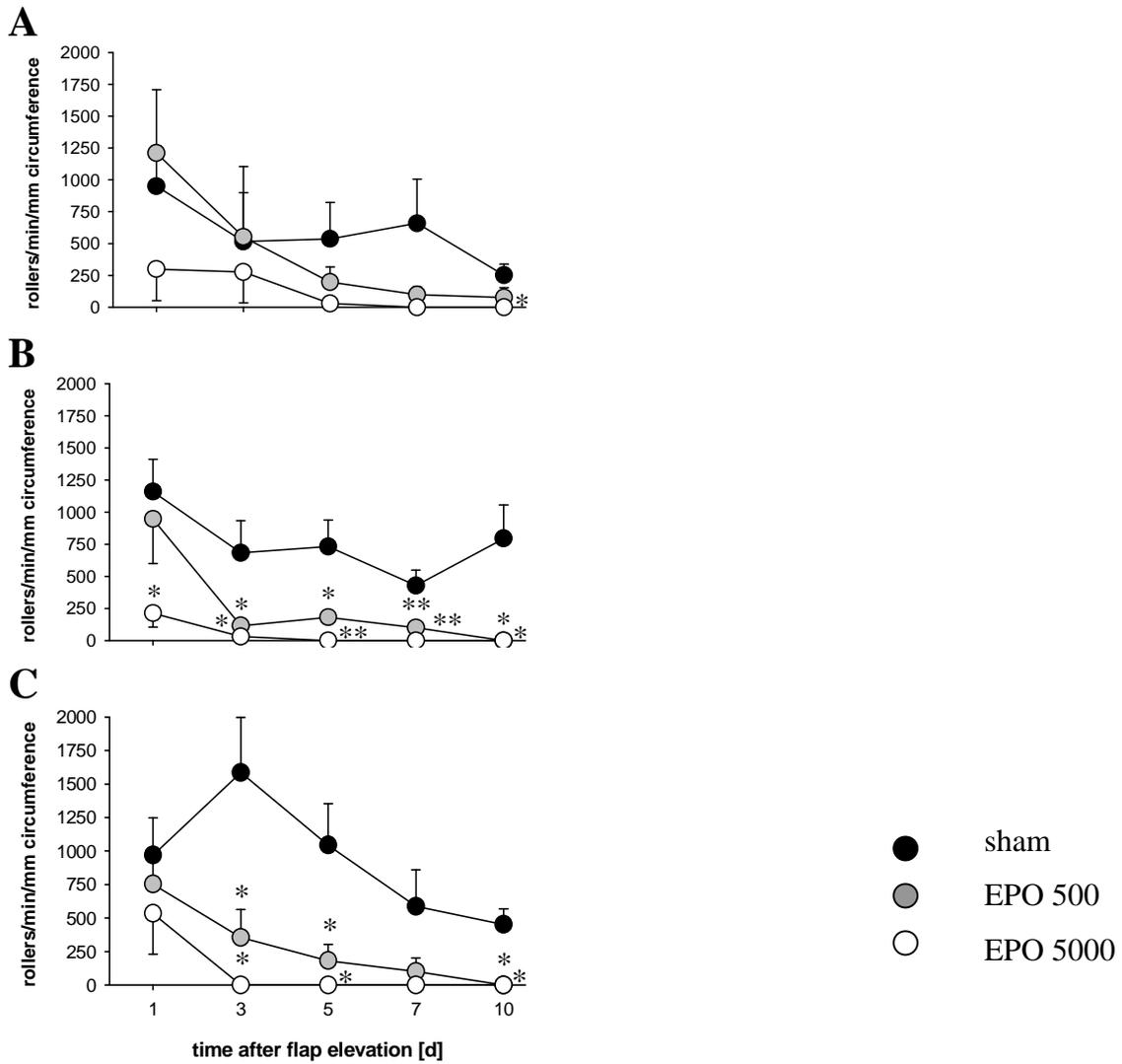


Abbildung 15: Anzahl rollender Leukozyten in Arteriolen (rollers/min/mm circumference) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham), sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs sham.

6.1.5.2. Adhärenente Leukozyten in Arteriolen

Analog zu den Beobachtungen in Kap. 6.1.5.1. zeigten auch die adhärenente Leukozyten in den Arteriolen einen deutlichen Rückgang der inflammatorischen Zellen in den mit EPO präkonditionierten Gruppen gegenüber der Kontrolle (sham) (Abb. 16).

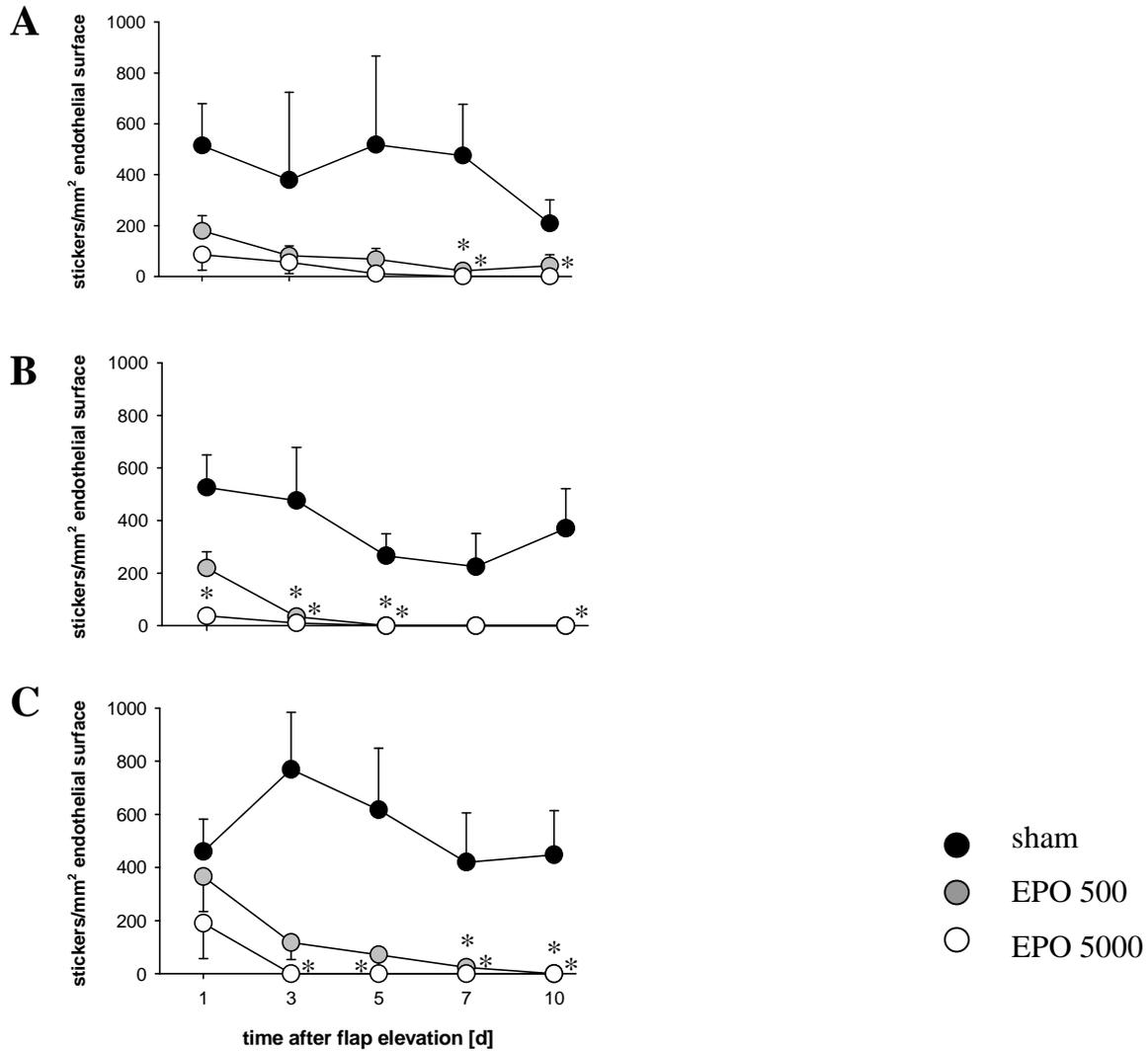


Abbildung 16: Anzahl adhärenente Leukozyten in Arteriolen (stickers/mm² endothelial surface) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0.05$ vs sham.

6.1.5.3. Rollende Leukozyten in Venulen

Im Vergleich zu den vorangegangenen Ergebnissen im Bereich der Arteriolen zeigt sich im venulären System eine deutlich höhere Gesamtzahl an Leukozyten (Abb. 17). Des Weiteren zeigt sich auch hier erneut eine niedrigere Zahl an rollenden Leukozyten in den EPO Gruppen im Vergleich zu der unbehandelten Kontrolle (Abb. 17).

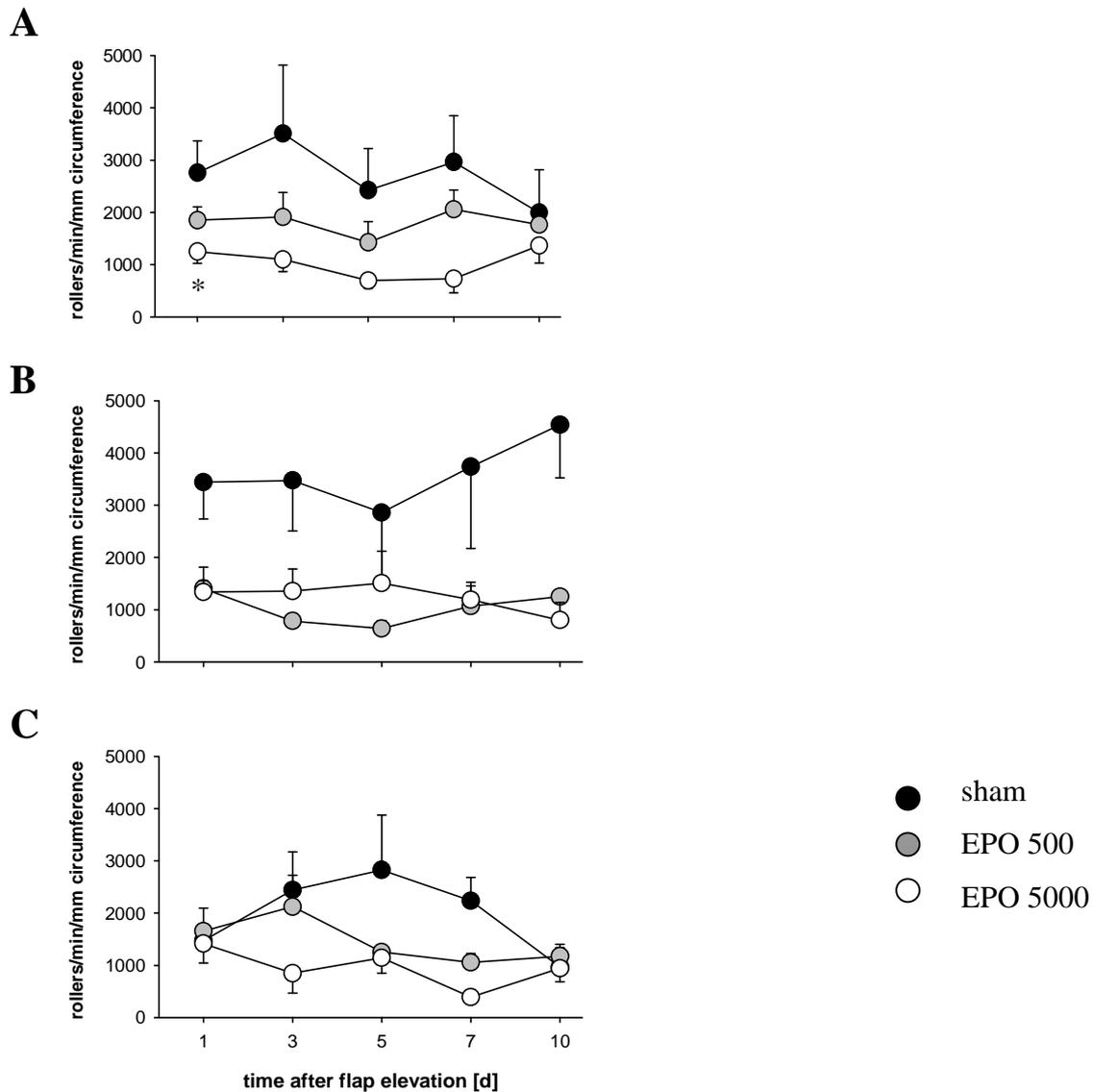


Abbildung 17: Anzahl rollender Leukozyten in Venulen (rollers/min/mm circumference) in proximalem (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0.05$ vs sham.

6.1.5.4. Adhärenente Leukozyten in Venulen

Im Bereich der adhärenente Leukozyten ist der bestehende Unterschied unter den einzelnen Gruppen deutlicher (Abb. 18). Es zeigt sich ein signifikanter ($p < 0,05$), teils hoch signifikanter ($p < 0,001$) Abfall der adhärenente Leukozyten in den Epo Gruppen gegenüber der unbehandelten Kontrolle (Abb. 18).

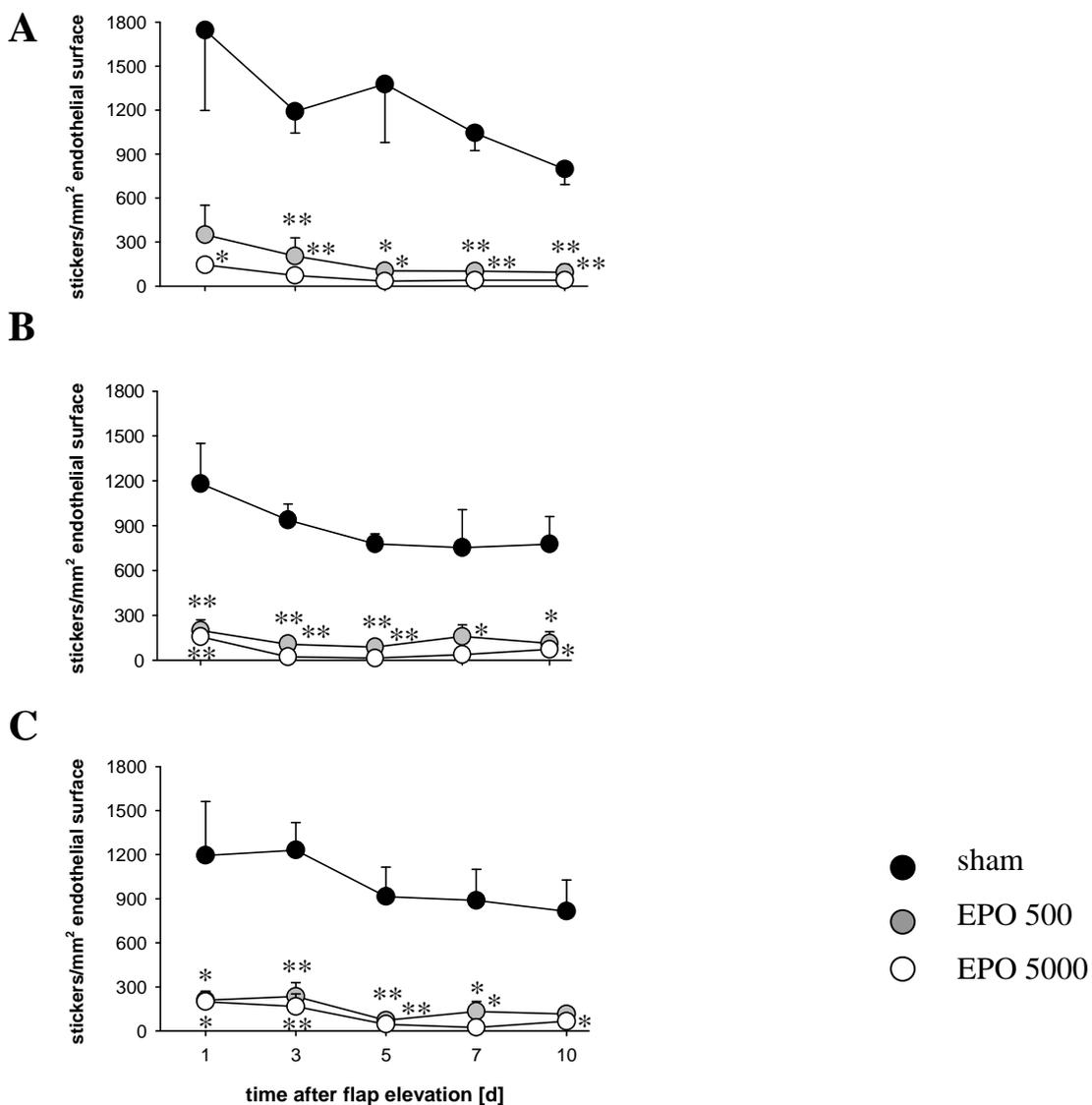


Abbildung 18: Anzahl adhärenente Leukozyten in Venulen (stickers/mm² endothelial surface) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautkammer (chamber) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Kammerpräparation. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ vs sham.

6.2. Hautlappen (Flap)

6.2.1. Nekrosefläche

Die unbehandelte Gruppe zeigte am 1. Tag nach Lappenhebung einen Perfusionsausfall von rund 40% (Abb. 19). Die anhaltende Ischämie führte schließlich zu einer Lappennekrose von rund 50% an Tag 10. Im Gegensatz dazu beobachteten wir in beiden mit EPO vorbehandelten Gruppen bereits am 1. Tag nach Induktion der Ischämie (Lappenhebung) eine signifikante Verringerung des Perfusionsausfalls von ca. 25% (Abb.19). Während die EPO 500 Gruppe eine weitere Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion verzeichnete und an Tag 10 eine Lappennekrose von lediglich 15% ($p < 0,05$) aufwies, beobachteten wir nach wiederholter EPO 5000 Gabe eine Verschlechterung der mikrovaskulären Durchblutung, die an Tag 10 schließlich in einer Lappennekrose von 46% endete (n.s. vs. sham) (Abb. 19).

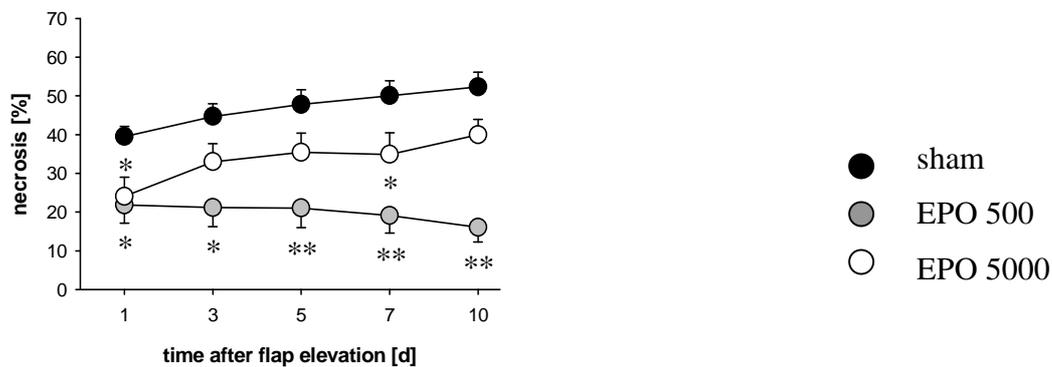


Abbildung 19: Nekrosefläche in %-Angabe der gesamten Lappenfläche von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs sham.

6.2.2. Fließgeschwindigkeit in Arteriolen und Venulen

6.2.2.1. Arteriolen Fließgeschwindigkeit

Die arteriolen Fließgeschwindigkeit zeigte sich im proximalen Drittel des Hautlappens (flap) an Tag 1 im Vergleich zu den EPO-Gruppen signifikant, teils hoch signifikant, erhöht ($p < 0,05$, $p < 0,001$) (Abb. 20). Im Verlauf kam es in der Kontrollgruppe zu einem kontinuierlichen Abfall der arteriolen Fließgeschwindigkeit, bis fast zum Erliegen im distalen, kritisch perfundierten Gewebe. Der Verlauf der arteriolen Fließgeschwindigkeit im proximalen, sowie zentralen Anteil des Lappens, zeigte sich bei den beiden mit EPO vorbehandelten Gruppen annähernd gleich. Bemerkenswerterweise trat hier im Bereich des distalen Lappens ein signifikanter Unterschied zwischen den beiden EPO Dosierungen auf (Abb. 20). Die EPO 500 Gruppe zeigte eine deutlich verbesserte arteriolen Fließgeschwindigkeit im Vergleich zur EPO 5000 Gruppe. Im Bereich der kritischen Perfusion im distalen Lappendrittel hatte EPO 5000 keinen Vorteil gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Die geringere EPO 500 Dosierung hatte v.a. im kritisch perfundierten Bereich zu einer signifikanten Verbesserung der Fließgeschwindigkeit geführt (Abb. 20).

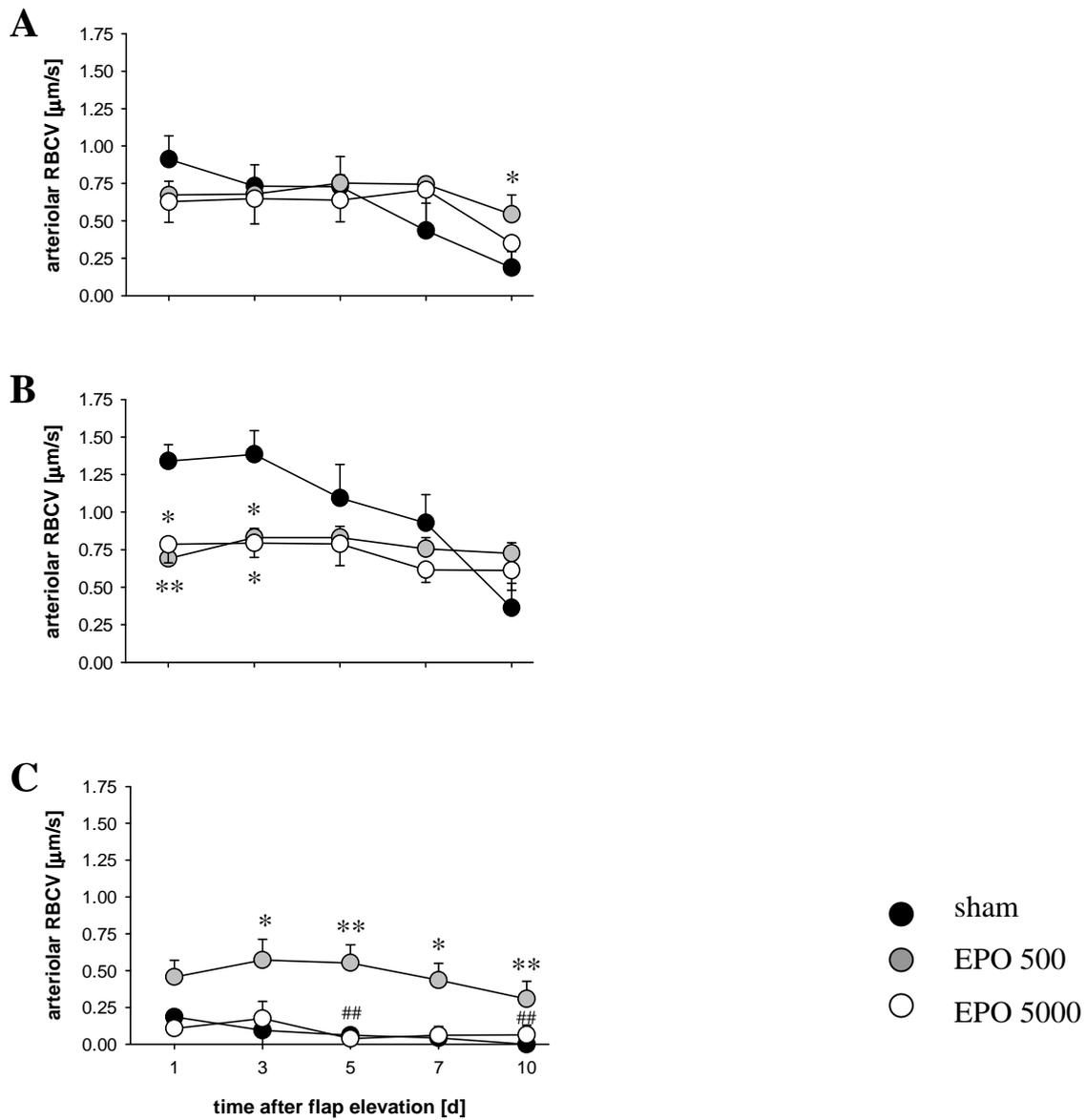


Abbildung 20: Arteriöläre Fließgeschwindigkeit (arteriolar RBCV, $\mu\text{m/s}$) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil des Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation. * $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs sham; ## $p < 0.001$ vs EPO 500.

6.2.2.2. Venuläre Fließgeschwindigkeit

Die venuläre Fließgeschwindigkeit zeigte analog zu der arteriolen Fließgeschwindigkeit im distalen Lappenbereich gegen Ende der Verlaufsbeobachtung signifikante bis hoch signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen (Abb. 21). Es fand sich ein Erhalt, bzw. sogar ein Anstieg der venulären Fließgeschwindigkeit in der mit EPO 500 präkonditionierten Gruppe, der sich gegenüber der Kontrolle als signifikant ($p < 0,05$) und gegenüber der mit EPO 5000 präkonditionierten Gruppe als hoch signifikant ($p < 0,001$) erwies (Abb. 21).

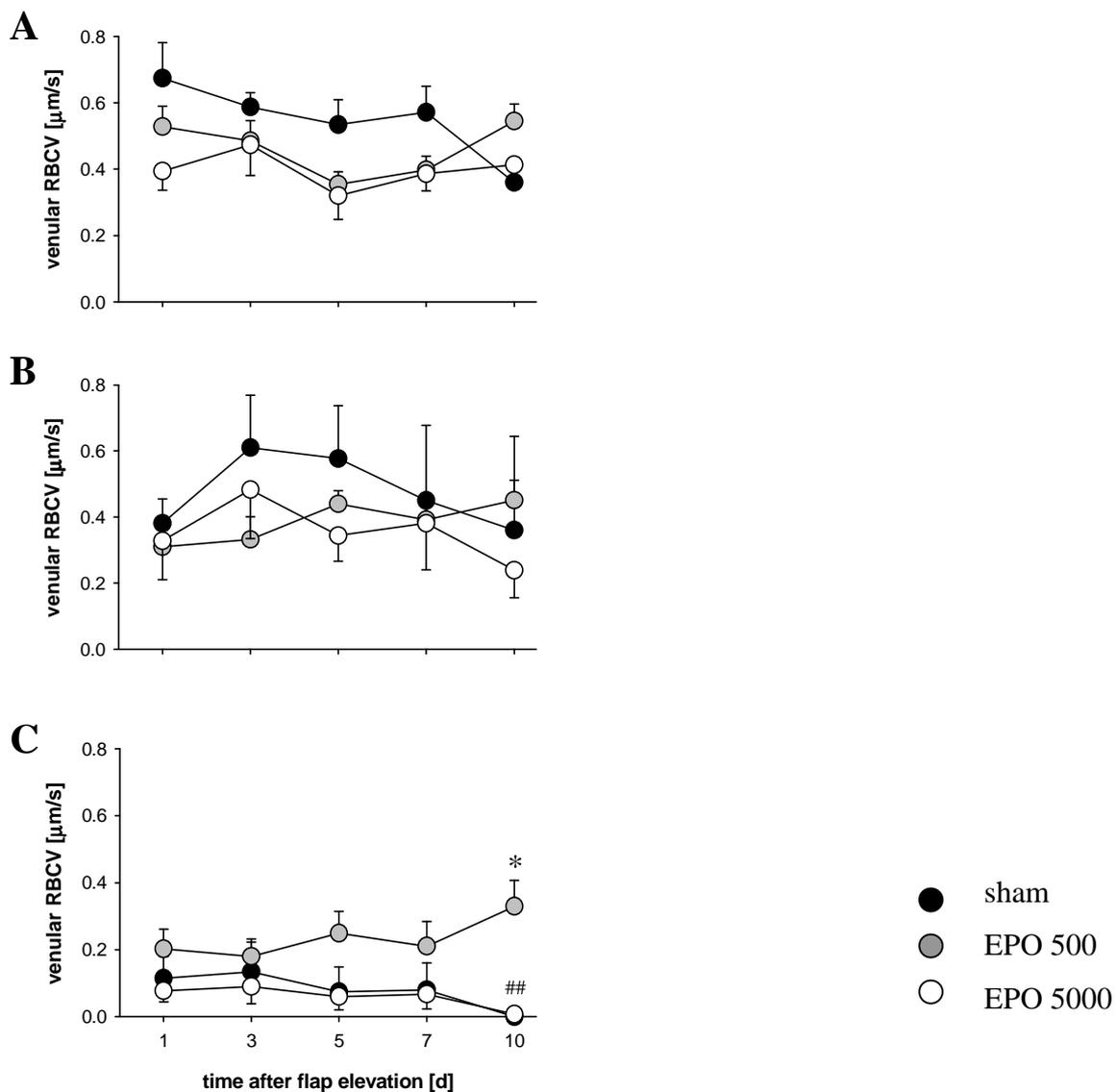


Abbildung 21: Venuläre Fließgeschwindigkeit (venular RBCV, $\mu\text{m/s}$) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil des Hautlappen (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation. * $p < 0.05$ vs sham; ## $p < 0.001$ vs EPO 500.

6.2.3. Gefäßdurchmesser in Arteriolen und Venulen

6.2.3.1. Arteriöler Gefäßdurchmesser

Die mit EPO behandelten Gruppen zeigten eine arteriöle Gefäßdilatation gegenüber der Kontrolle (Abb. 22). Innerhalb der beiden EPO Gruppen zeigte sich lediglich im mittleren Bereich des Hautlappens sowie im distalen gegen Ende der Beobachtungen eine Zunahme des arteriölen Gefäßdurchmessers in der EPO 500 Gruppe gegenüber der EPO 5000 Gruppe (Abb.22).

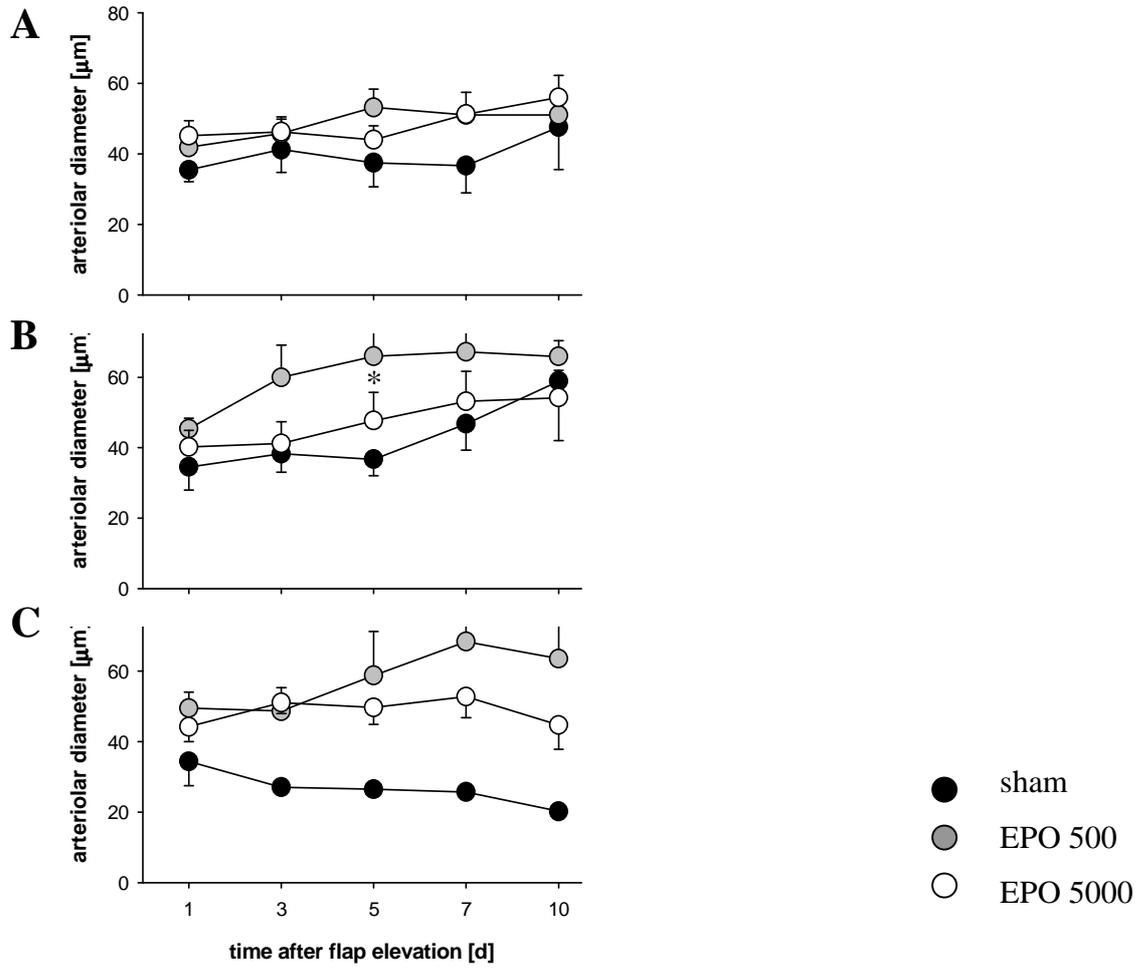


Abbildung 22: Arteriöler Gefäßdurchmesser (arteriolar diameter, μm) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (c) Teil des Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation.

6.2.3.2. Venulärer Gefäßdurchmesser

In den mit EPO vorbehandelten Versuchsgruppen zeigten die Venulen im proximalen und zentralen Lappenabschnitt eine Durchmessererhöhung gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$) (Abb. 23). Im mittleren Lappendrittel kam es hier im Vergleich der beiden EPO Gruppen untereinander zu einer verstärkten Gefäßdilatation bei der Anwendung der EPO 5000 Dosierung. Im distalen Bereich konnte kein Unterschied zwischen EPO und Kontrolle nachgewiesen werden. Hier zeigten sich die Kurvenverläufe annähernd gleich (Abb. 23).

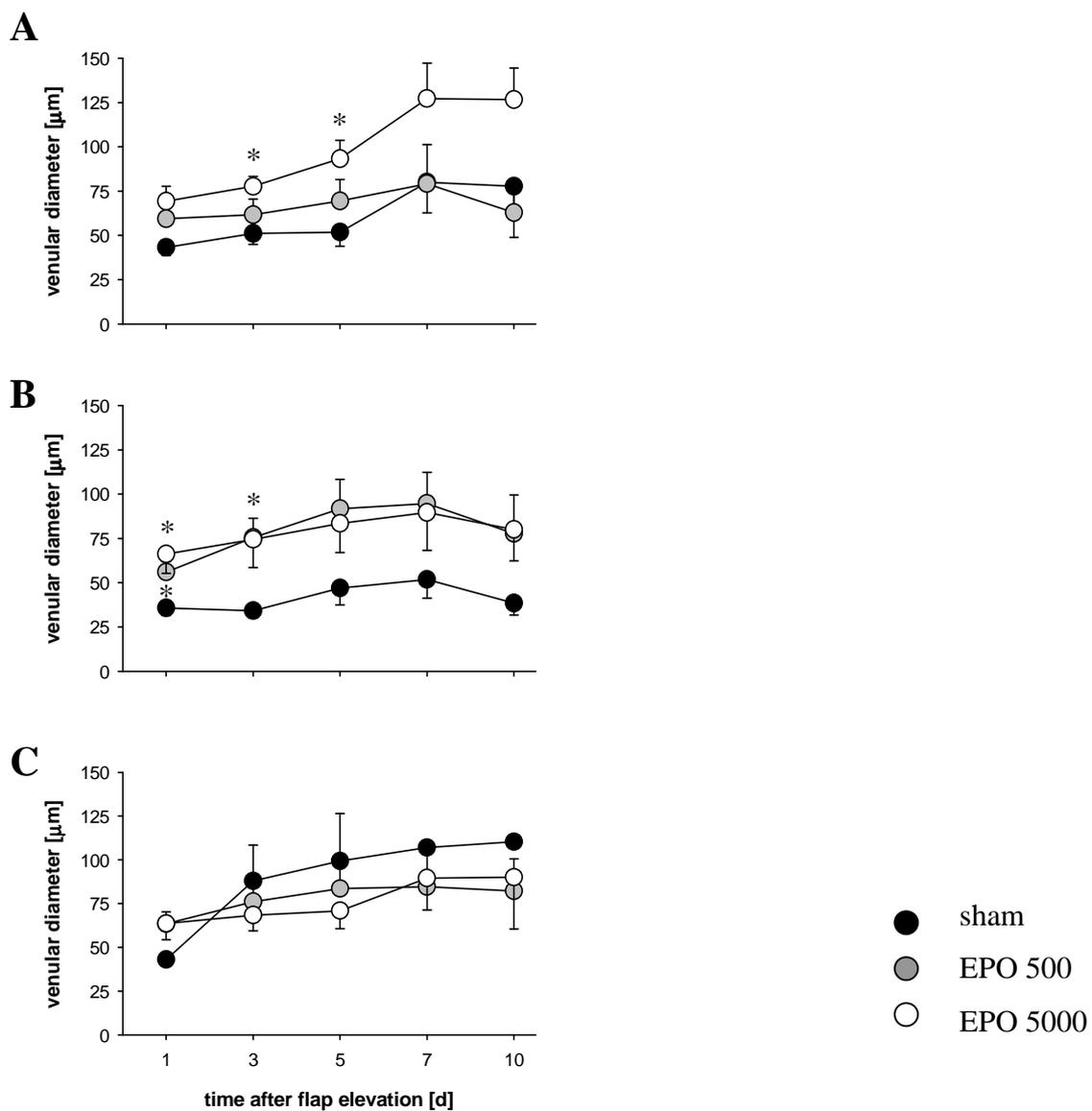


Abbildung 23: Venulärer Gefäßdurchmesser (venular diameter, μm) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil des Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation. * $p < 0.05$ vs sham.

6.2.4. Mikrozirkulation in Kapillaren

6.2.4.1. Kapilläre Fließgeschwindigkeit

Im proximalen Abschnitt des Lappens ergaben sich innerhalb der einzelnen Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede bei der kapillären Fließgeschwindigkeit (Abb. 24). Im mittleren Drittel zeigten zu Beginn des Beobachtungszeitraums die beiden mit EPO präkonditionierten Gruppen eine signifikante Erhöhung der kapillären Fließgeschwindigkeit gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$). Im distalen Bereich des Hautlappens ergaben sich dann durchgehend signifikante Unterschiede zwischen der mit EPO 500 behandelten Versuchsgruppe und der mit EPO 5000 behandelten Gruppe sowie der Kontrolle (Abb.24). Die mit EPO 500 behandelten Versuchstiere zeigten eine signifikante Steigerung der Fließgeschwindigkeit in den Kapillaren gegenüber der Kontrolle ($p < 0,05$) und ebenso gegenüber den mit EPO 5000 behandelten Tieren ($p < 0,05$). Zwischen der Kontrolle und der EPO 5000 Gruppe ergaben sich hier keine signifikanten Unterschiede (Abb. 24).

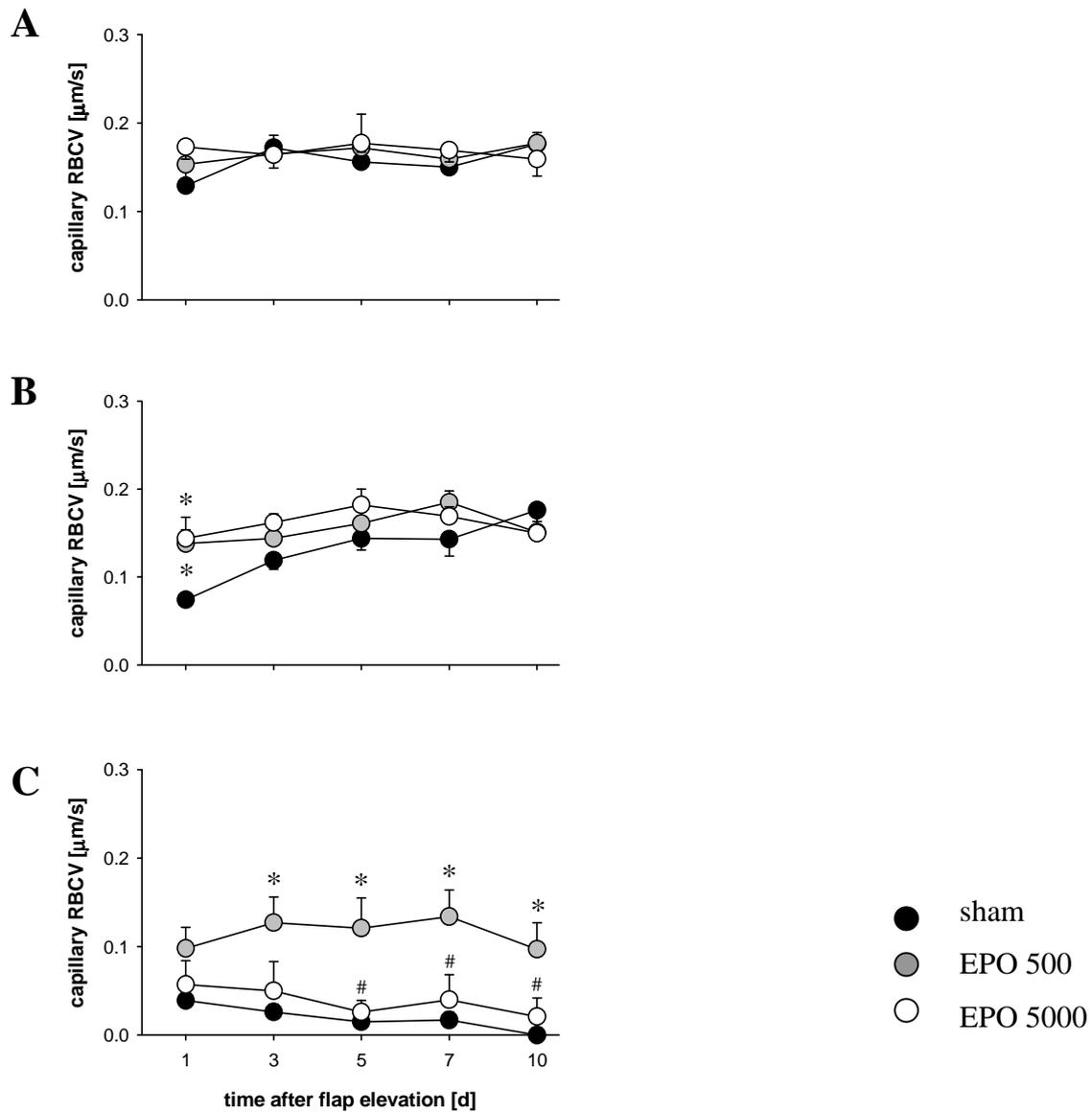


Abbildung 24: Kapilläre Fließgeschwindigkeit (capillary RBCV, $\mu\text{m/s}$) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil des Hautlappen (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation. * $p < 0.05$ vs sham; # $p < 0.05$ vs EPO 500

6.2.4.2. Kapillardurchmesser

Der Kapillardurchmesser zeigte sich innerhalb des Hautlappens in allen 3 Versuchsgruppen im Verlauf über 10 Tage annähernd konstant. Es ergaben sich beim Vergleich der Versuchsgruppen keine signifikanten Unterschiede (Abb. 25).

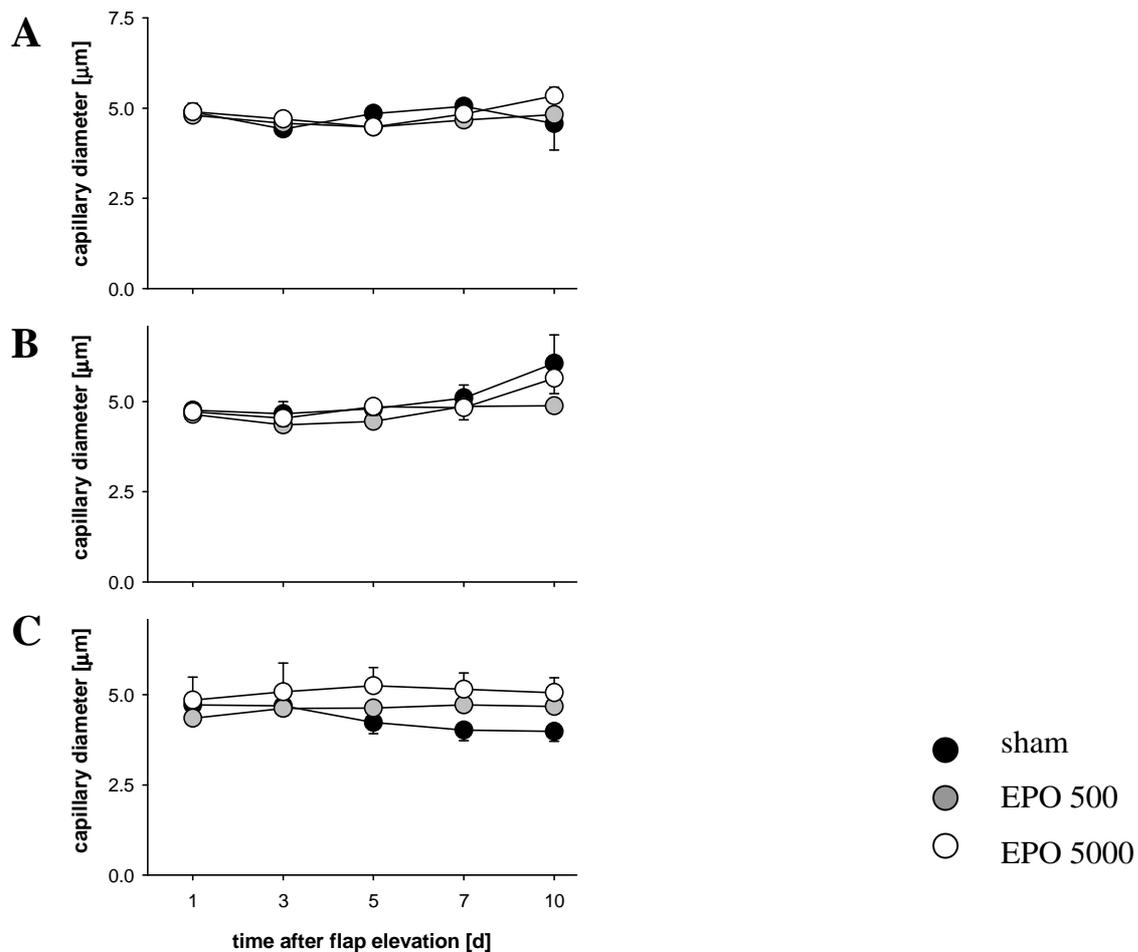


Abbildung 25: Kapillardurchmesser (capillary diameter, μm) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil des Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation.

6.2.4.3. Funktionelle Kapillardichte

Im proximalen und mittleren Bereich des Hautlappens konnten für die funktionelle Kapillardichte über den Beobachtungszeitraum von 10 Tagen keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Versuchsgruppen festgestellt werden (Abb. 26). Im distalen Bereich des Lappens zeigte sich eine signifikant höhere Kapillardichte in der mit EPO 500 vorbehandelten Versuchsgruppe gegenüber der Kontrolle und auch der EPO 5000 Gruppe ($p < 0,05$) (Abb. 26).

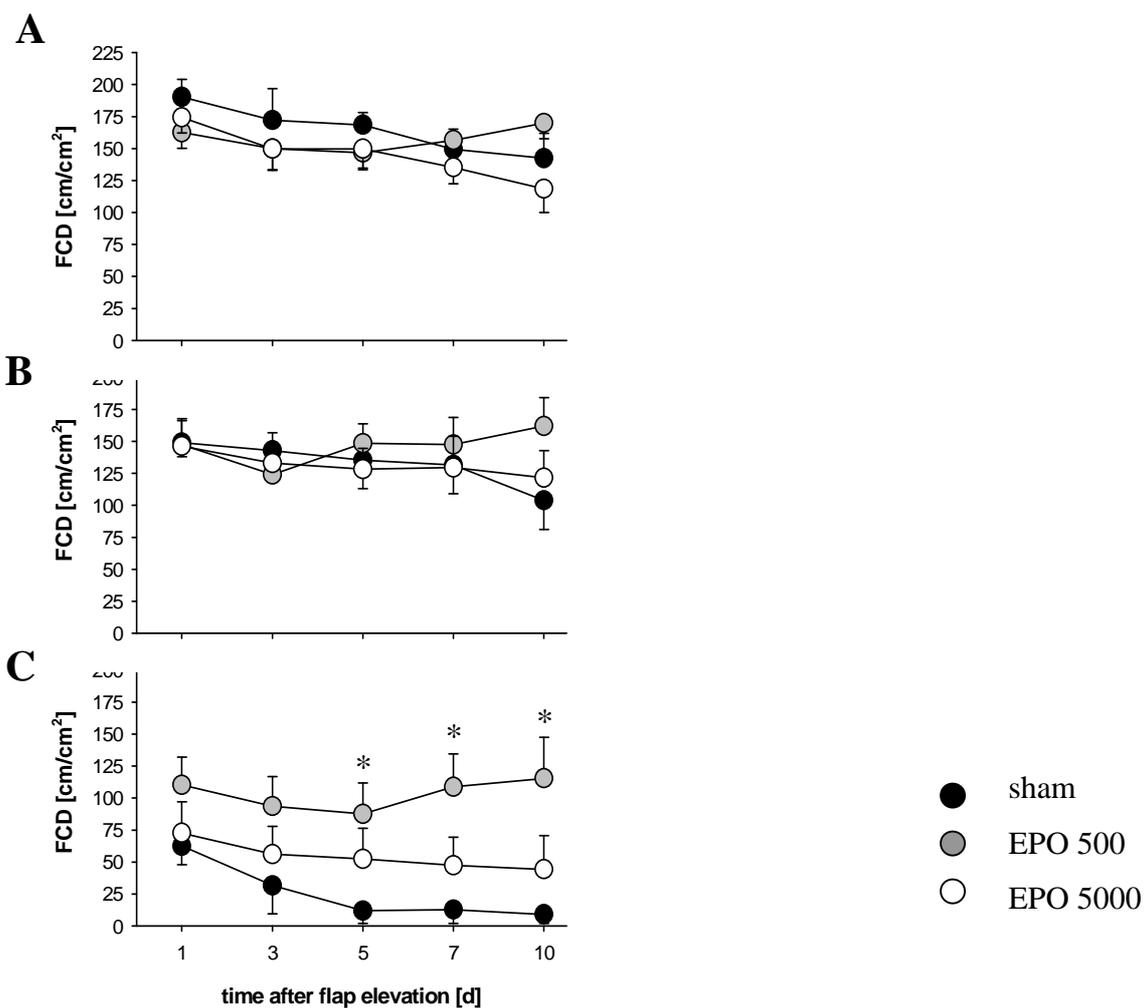


Abbildung 26: Funktionelle Kapillardichte (FCD, cm/cm^2) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil des Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation.

* $p < 0.05$ vs sham

6.2.5. Apoptotischer Zelltod

Im Flapmodell zeigte sich eine dosisunabhängige signifikante Reduktion der Anzahl apoptotischer Zellen unter EPO Präkonditionierung, beginnend bereits an Tag 1 (Abb. 27). Insgesamt zeigte sich die Zahl apoptotischer Zellen im Gewebe über die Zeit rückläufig. Dies war in allen 3 Gruppen gleich (Abb. 27).

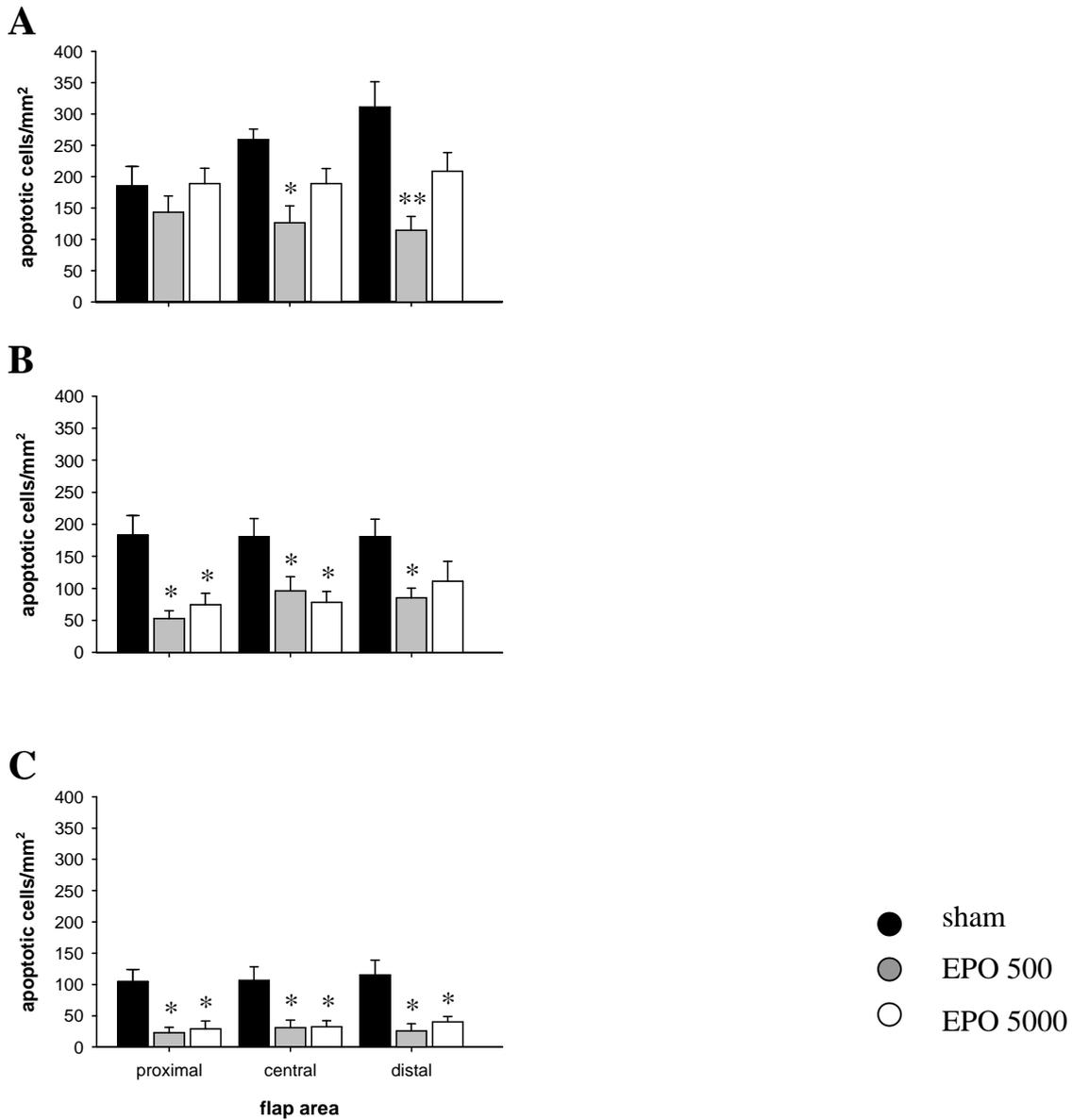


Abbildung 27: Anzahl apoptotischer Zellen (apoptotic cells/mm²) im proximalen , zentralen und distalen Teil der Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1 (A), 3(B), und 5(C) Tage nach Lappenpräparation.

* $p < 0.05$, ** $p < 0.001$ vs sham.

6.2.6. Leukozyten-Endothelzellinteraktion

Die Beobachtungen über die Gewebsentzündung innerhalb des Hautlappens entsprachen innerhalb der drei Gruppen etwa den Ergebnissen, die wir bereits in der Hautkammer feststellen konnten. Die unbehandelten Versuchstiere zeigten postoperativ eine entzündliche Reaktion mit Aktivierung der Leukozyten und entsprechender Leukozytose, welche im Verlauf abklang. Auch hier zeigte EPO eine dosisunabhängige Reduktion der Interaktion zwischen Leukozyten und arteriolärem Gefäßendothel ($p < 0,05$). Diese Beobachtung machten wir für rollende Leukozyten (rollers) und adhärente Leukozyten (stickers). Die antiinflammatorische Wirkung war in Arteriolen und postkapillären Venulen über den gesamten Versuchszeitraum in allen drei Kammeranteilen vergleichbar (Abb. 28-31).

6.2.6.1. Rollende Leukozyten in Arteriolen

Die Zahl rollender Leukozyten in Arteriolen zeigte sich besonders im proximalen sowie mittleren Lappenabschnitt in den EPO Gruppen signifikant ($p < 0,05$), teils v.a. zu Beginn der Untersuchungen hoch signifikant ($p < 0,001$) vermindert gegenüber der unbehandelten Kontrollgruppe (Abb. 28).

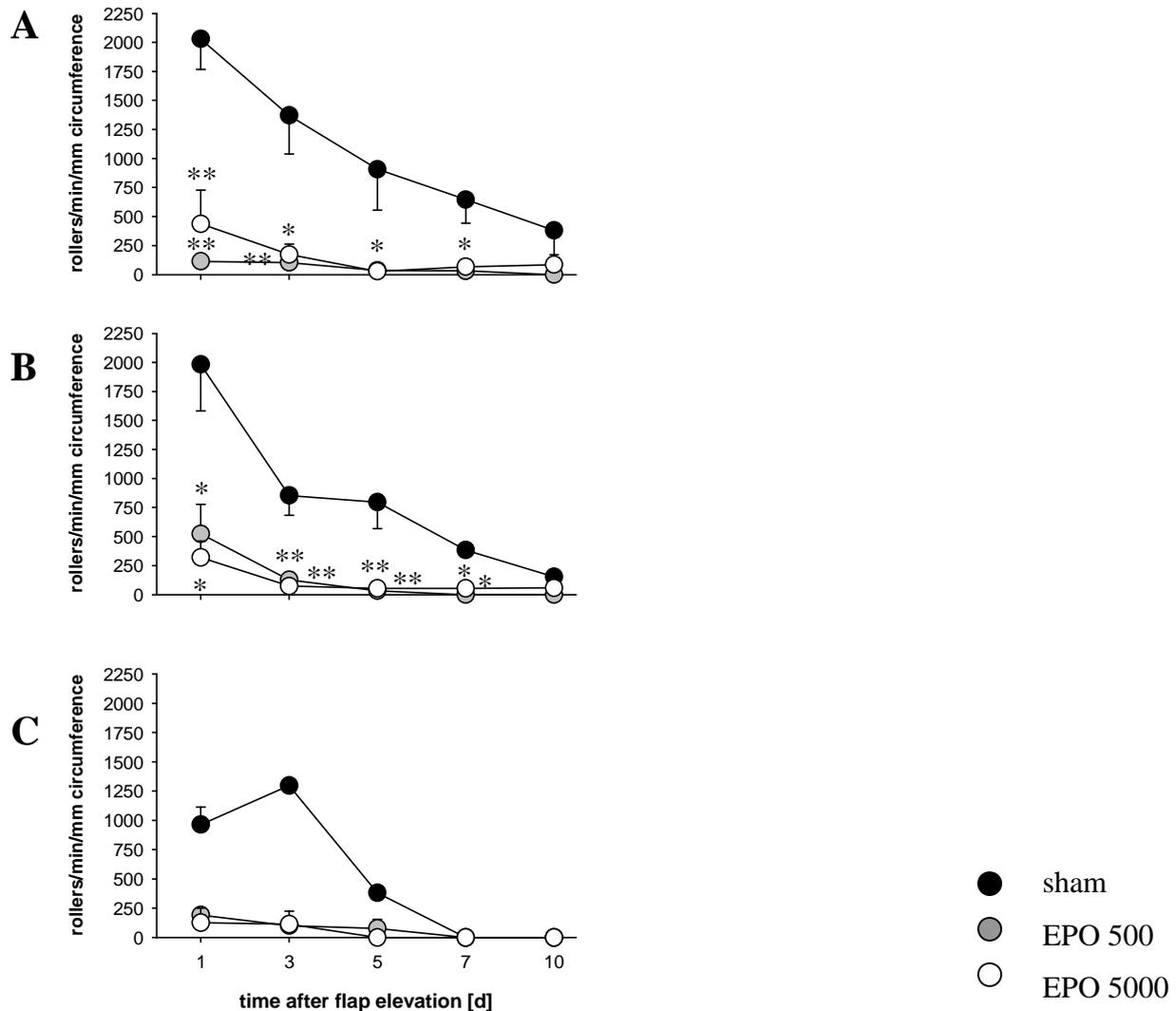


Abbildung 28: Anzahl rollender Leukozyten in Arteriolen (rollers/min/mm circumference) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil des Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ vs. sham.

6.2.6.2. Adhärenente Leukozyten in Arteriolen

Die Zahl adhärenente Leukozyten lag insgesamt niedriger als die Zahl rollender Leukozyten in Arteriolen (Abb. 29). Allerdings ließ sich auch hier v.a. im proximalen Lappenabschnitt die verringerte Anzahl von Leukozyten in den EPO Gruppen im Vergleich zur Kontrolle darstellen, wengleich nicht so ausgeprägt wie bei den rollenden Leukozyten (Abb. 29).

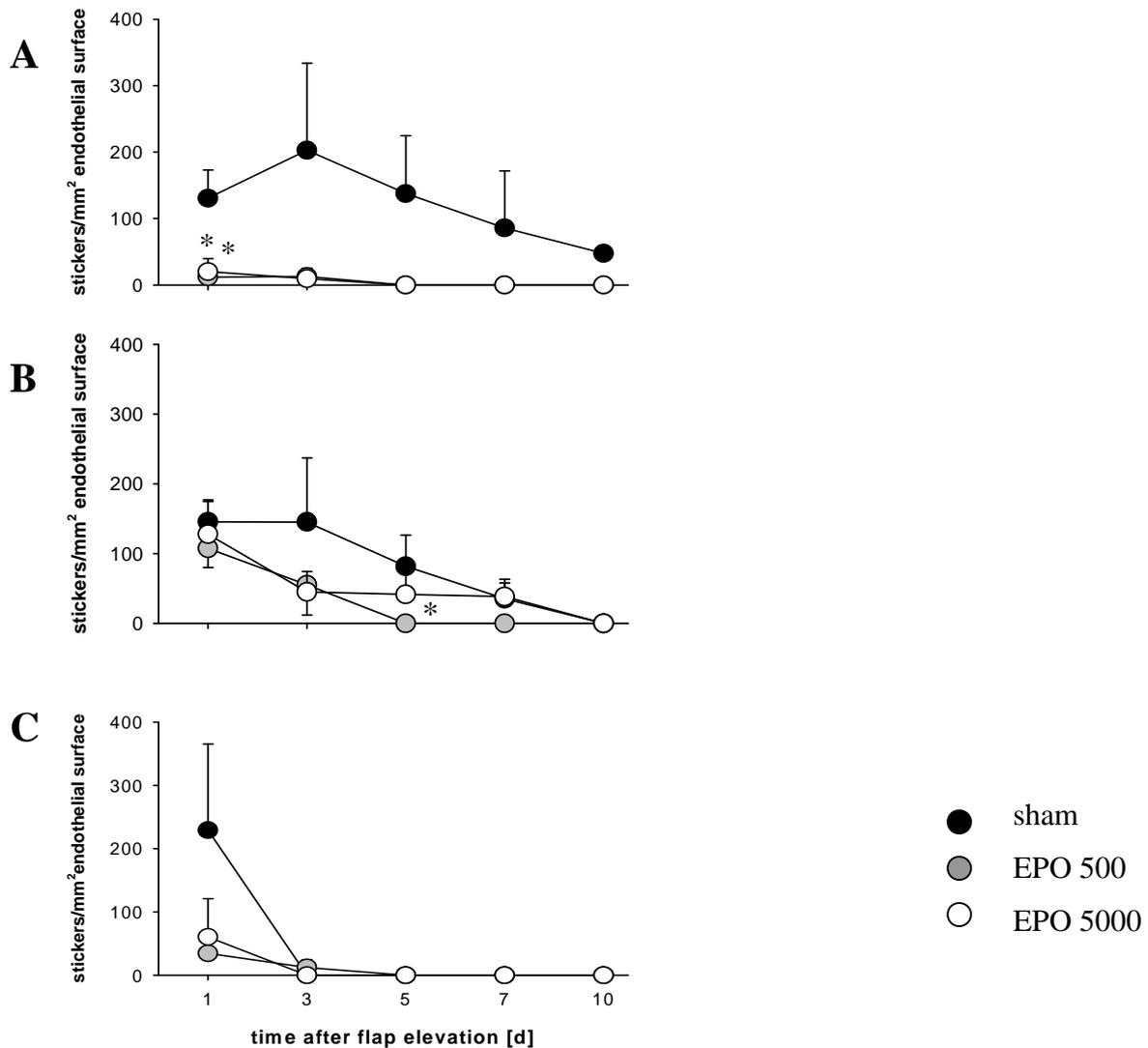


Abbildung 29 : Anzahl adhärenente Leukozyten in Arteriolen (stickers/mm² endothelial surface) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil des Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation. * $p < 0.05$ vs sham.

6.2.6.3. Rollende Leukozyten in Venulen

Insgesamt war die absolute Zahl an Leukozyten in den Venulen höher als in den Arteriolen (Abb. 30). Auch hier waren v.a. im proximalen und mittleren Drittel des Lappens in der Kontrollgruppe höhere Leukozytenzahlen zu verzeichnen als in den mit EPO präkonditionierten Gruppen (Abb. 30). Innerhalb der beiden verschiedenen EPO Dosierungen gab es keine relevanten Unterschiede (Abb. 30).

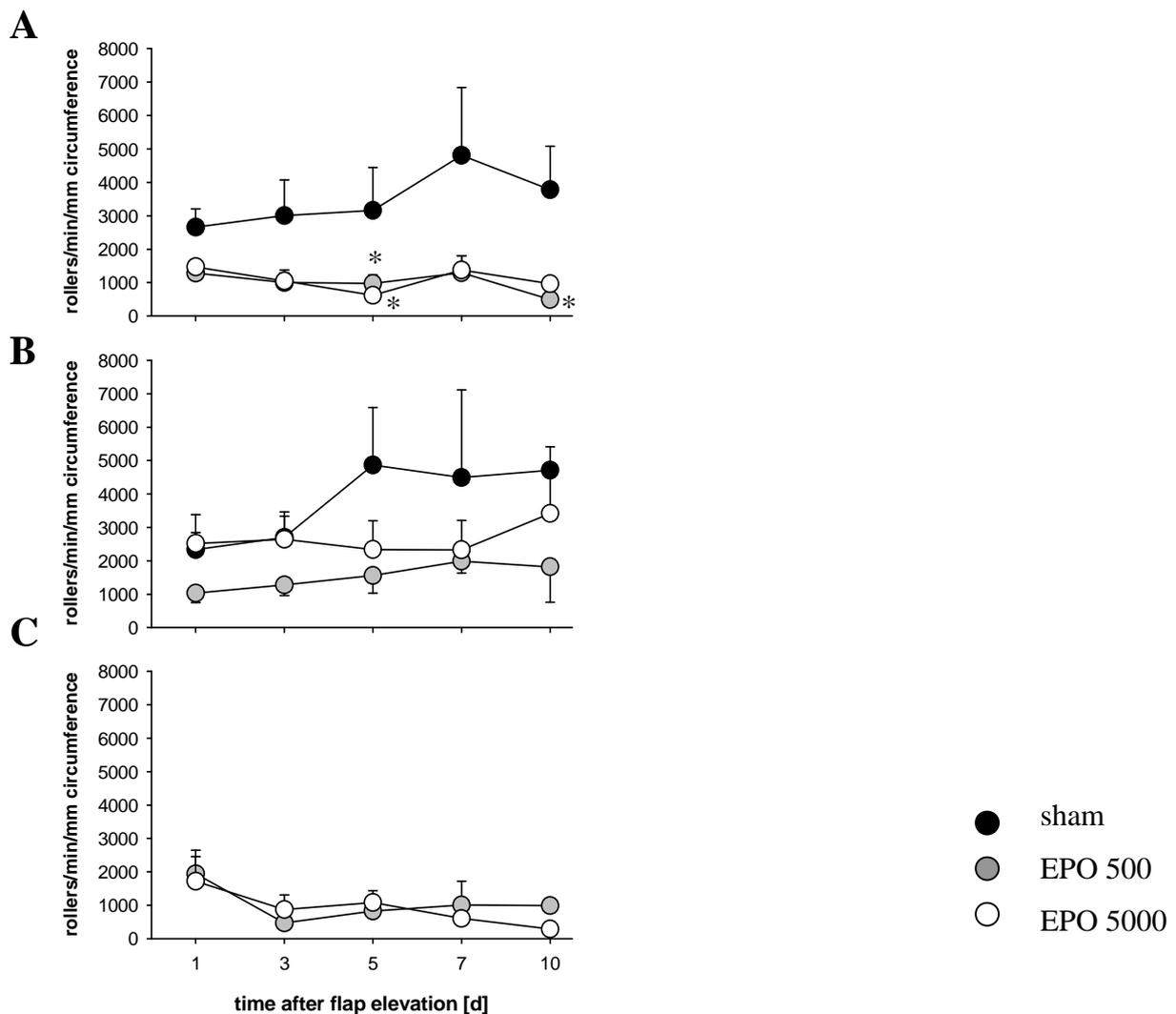


Abbildung 30: Anzahl rollender Leukozyten in Venulen (rollers/min/mm circumference) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil der Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation. * $p < 0.05$ vs sham.

6.2.6.4. Adhärenente Leukozyten in Venulen

Im proximalen sowie mittleren Abschnitt des Hautlappens zeigten beide EPO Gruppen signifikant ($p < 0,05$) niedrigere Zahlen an adhärenenten Leukozyten in Venulen als die Kontrollgruppe (Abb. 31). Die EPO 5000 Gruppe konnte teils sogar eine hoch signifikante ($p < 0,001$) Verringerung der Leukozyten aufweisen (Abb. 31).

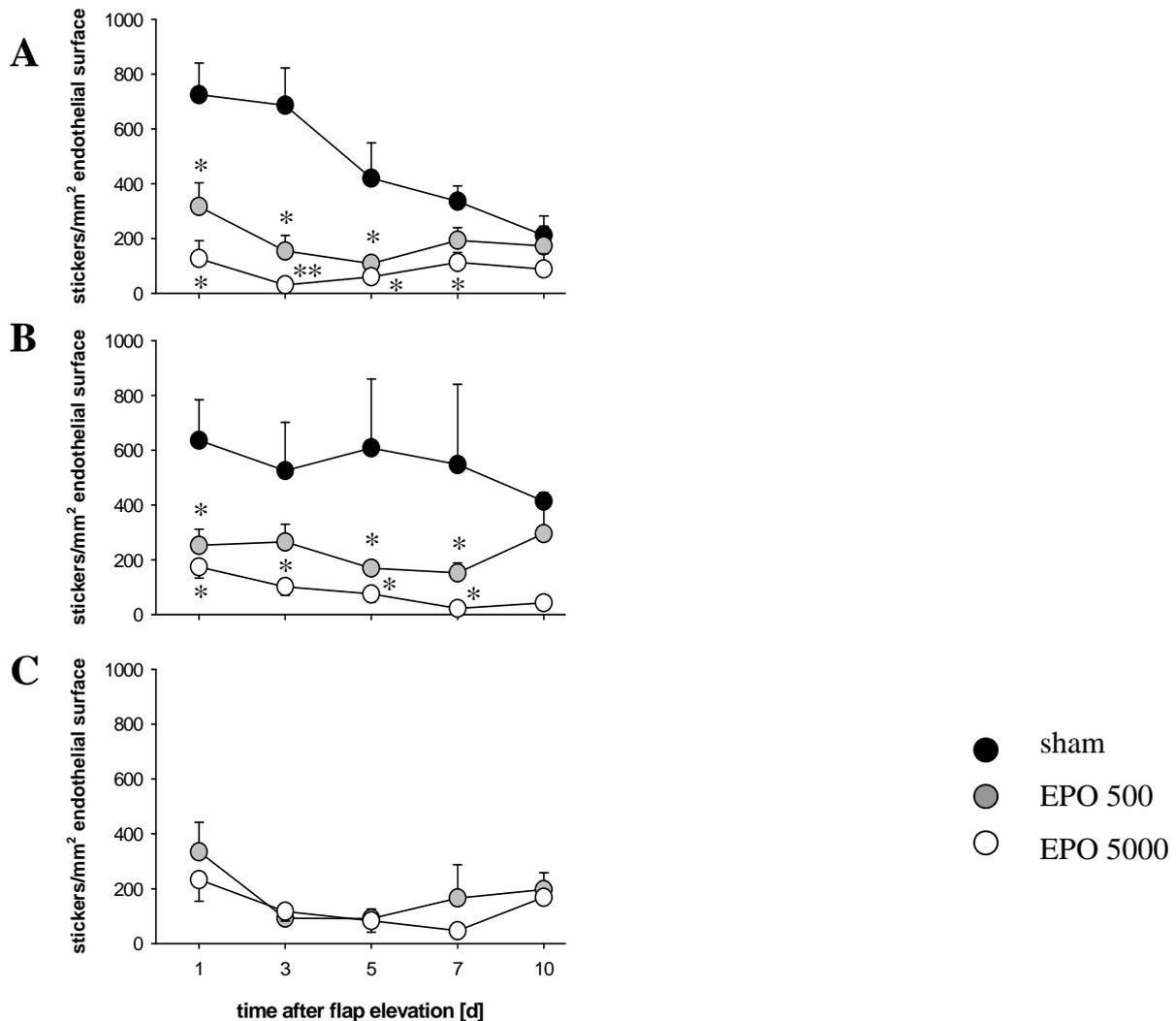


Abbildung 31: Anzahl adhärenenter Leukozyten in Venulen (stickers/mm² endothelial surface) im proximalen (A), zentralen (B) und distalen (C) Teil des Hautlappens (flap) von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000) 1, 3, 5, 7 und 10 Tage nach Lappenpräparation. * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ vs sham.

6.2.7. Hämatokrit

Ein Tag vor dem chirurgischen Eingriff, d.h. anlässlich der ersten EPO-, bzw. NaCl-Injektion, beobachteten wir in den drei Versuchsgruppen keine Unterschiede den Hämatokrit betreffend (Abb. 32). Die über 4 Tage alle 24h 5mal wiederholte EPO-Verabreichung führte im Verlauf jedoch zu einer Erhöhung des Hämatokrits. EPO 500 zeigte eine marginale Hämatokriterhöhung, wohingegen die 10fache Dosierung zu einer hochsignifikanten Erhöhung des Hämatokrits im Vergleich zu den beiden anderen Versuchsgruppen, insbesondere der Kontrollgruppe, im Blut führte ($p < 0,001$ vs sham, $p < 0,05$ vs EPO500) (Abb. 32).

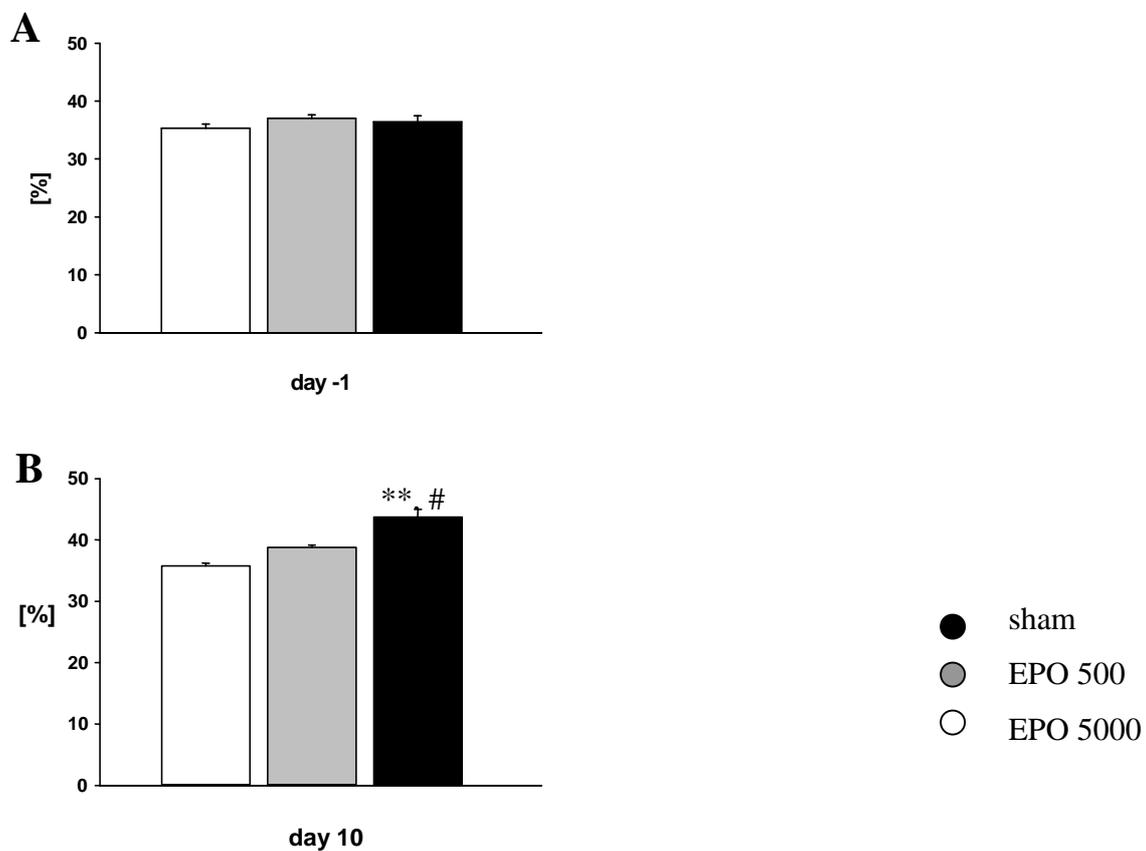


Abbildung 32: Hämatokrit (in %) einen Tag vor (A, day -1) und 10 Tage nach (B, day 10) Lappenpräparation von unbehandelten Tieren (sham) sowie Tieren nach Verabreichung von 500 IE EPO/kg KG (EPO 500) und 5000 IE EPO/kg KG (EPO 5000). ** $p < 0,001$ vs sham; # $p < 0,05$ vs EPO 500

6.2.8. Angiogenese

Während der gesamten Verlaufsbeobachtung von 10 Tagen wurde bei den Mikroskopien besonderes Augenmerk auf morphologische Veränderungen, wie mikrovaskuläres Remodelling, Gefäßsprossungen (sprouting) und Gefäßknospungen (budding) gelegt. Interessanterweise konnten jedoch über den gesamten Zeitraum in keiner Versuchsgruppe morphologische Hinweise auf Angiogenese nachgewiesen werden, weder in der nicht ischämischen Kammer, noch im akut ischämischen Lappen und das unabhängig davon, ob EPO verabreicht wurde oder nicht.

7. Diskussion

Die vorliegende Studie dient der detaillierten Analyse der Auswirkungen von Erythropoietin (EPO), systemisch verabreicht vor der Präparation eines Hautlappens an Mäusen, als Präkonditionierungsmaßnahme mit dem Ziel, das kritisch perfundierte oder ischämische Gewebe vor Nekrotisierung zu bewahren.

7.1. Material und Methodik

Das angewandte Modell, ein randomisiert durchbluteter Hautlappen (Hautmuskellappen) (HARDER Y. 2004), ermöglicht in einfacher und komplikationsarmer Weise die Untersuchung von kritisch perfundiertem, ischämischem Gewebe, das unbehandelt rund 50% Nekrose entwickelt. Das Modell erlaubt über mehrere Tage (Beobachtungszeitraum der Studie 10 Tage) das Zusammenspiel zwischen Ischämie, mikrozirkulatorischer Dysfunktion und Gewebnekrose in vivo mikroskopisch wiederholt zu beobachten. So erfolgten an den Tagen 1, 3, 5, 7 und 10 standardisierte mikroskopische Untersuchungen der Nekrosefläche, Fließgeschwindigkeit und Durchmesser in Arteriolen und Venulen, Fließgeschwindigkeit in Kapillaren, Kapillardurchmesser, funktionelle Kapillardichte, Apoptose, Leukozyten-Endothelzellinteraktion und Neubildung von Gefäßen. Unabhängig davon wurden laborchemisch der Hämatokrit- und Hb-Wert bestimmt.

In einer Vielzahl von tierexperimentellen Modellen ermöglicht die Intravitalmikroskopie die Untersuchung von Ischämie und Reperfusion an unterschiedlichen Organsystemen. Als Beispiele wären hier zu nennen: Mesenterialgefäße (ZWEIFACH B.W. 1954), Leber (Vollmar B. 2009), Muskulatur (SZCZESNY G. 2000), Haut und Knochen (RÜCKER M. 1999, BARKER J.H. 1999).

Die Anwendung unterschiedlicher fluoreszierender Farbstoffe ermöglicht die Darstellung von Gefäßen, Fließgeschwindigkeit und Blutfluss, Zell- und Gewebemorphologie. Darüber hinaus können Zell-Zellinteraktionen wie Leukozyten mit Endothelzellen (MENGER M.D. 2002, LEHR H.A. 1993) oder einzelne Zellen wie Thrombozyten (VOLLMAR B. 2003) oder

apoptotische Zellen (WESTERMANN S. 1999) dargestellt werden. Die Erkenntnisse der Intravitalmikroskopie und der makroskopischen Auswertung des Lappens im Rückenhautkammermodell der Maus erlaubten detaillierte Aussagen über die einzelnen Wirkungen von Erythropoietin auf das kritisch perfundierte, ischämische Hautmuskelgewebe, welche im nachfolgenden Kapitel diskutiert werden.

7.2. Diskussion der Ergebnisse

7.2.1. Gefäßdurchmesser, Vasodilatation

Die mit EPO 5000 vorbehandelten Tiere zeigten v.a. im distalen Hautkammeranteil, eine frühzeitige und über 10 Tage anhaltende Gefäßdilatation, welche in diesem Ausmaß weder in der unbehandelten, noch in der EPO 500 Gruppe nachzuweisen war. Im venösen Bereich dieser beiden zuletzt genannten Versuchsgruppen zeigte sich die höchste Rate an Gefäßdilatation in der mit EPO 500 vorbehandelten Gruppe. Die mit EPO 5000 vorbehandelte Gruppe erreicht diese Dilatation nur vergleichsweise im distalen Bereich der Kammer.

Die arterioläre Dilatation, die den arteriolären Inflow in den Lappen reguliert, zeigte eine Dosisabhängigkeit, d.h. EPO 5000 führte zu einer ausgeprägteren und ausgedehnteren Dilatation als EPO 500 im Hautlappenmodell.

Diesen Sachverhalt konnten Rezaeian et al. in einem ähnlichem Mausmodell mit EPO-Anwendung ebenfalls nachweisen. Kritisch perfundiertes Gewebe zeigte unter EPO-Einwirkung eine gesteigerte Produktion des Enzyms NO-Synthase, welches signifikant mit einer Zunahme des Gefäßdurchmessers einherging. Als Folge hieraus konnte die funktionelle Kapillardichte auch unter Ischämie erhalten werden (REZAEIAN F. 2008, 2010).

7.2.2. Fließgeschwindigkeit

Die Versuchsgruppe Hautkammer ohne anhaltende Ischämie (d.h. Kammerpräparation ohne Lappenplastik) zeigte in der ganzen Kammer, sowohl in Arteriolen, wie auch in Venulen hohe Fließgeschwindigkeiten.

Im Gegensatz hierzu stehen die Werte der unbehandelten Lappentiere, bei denen proximal eine hohe Fließgeschwindigkeit, medial eine verlangsamte und distal keine Fließgeschwindigkeit nachgewiesen werden konnte. Interessanterweise zeigte die Vorbehandlung mit der niedrigeren Dosierung von 500 IE EPO/kg KG v.a. im distalen Bereich des Lappens, welches dem kritisch perfundierten Bereich des Gewebes entspricht, eine signifikante Erhöhung der arteriolen sowie venulären Fließgeschwindigkeit, die in diesem Ausmaß nach 10-facher EPO-Dosierung (EPO 5000) nicht zu beobachten war. Zwischen der unbehandelten Lappengruppe und EPO-5000-Gruppe bestehen keine signifikanten Unterschiede. EPO scheint in diesem Zusammenhang in der niedrigeren Dosierung und auch aufgrund der Gefäßdilatation zu einer Aufrechterhaltung des Blutflusses zu führen. Dies kann auch damit zusammenhängen, dass die 5000-Dosierung zu einer Zunahme der roten Blutzellen führte und somit die Fließeigenschaften des Blutes verschlechtert waren und die Fließgeschwindigkeit reduziert wurde (siehe auch 7.2.7).

Ähnliches konnten bereits Wiessner et al. 2001 im Tierversuch bei 2 Arten von transgenen Mäusen feststellen. Bei Versuchsgruppe 1 bestand lediglich eine EPO-Überexpression im Gehirn, in Gruppe 2 bestand eine zerebrale sowie systemische Überexpression von EPO, die in dieser Gruppe zu Hämatokritwerten bis über 80% führten (WIESSNER C. 2001). Des Weiteren diskutieren mehrere Arbeiten der Literatur einen thrombogenen Effekt von Erythropoietin im Sinne einer Stimulation der Thrombopoese, die die verminderte Fließgeschwindigkeit ebenfalls begünstigen kann. Stohlawetz et al. konnten an menschlichen gesunden Probanden unter anhaltender EPO-Gabe eine erhöhte Thrombozytenzahl sowie eine erhöhte Thrombozytenreaktivität feststellen (STOHLAWETZ P.J. 2000). Eine direkte Einwirkung von EPO auf das Endothel mit nachfolgender Aktivierung einer Signalkaskade, die letztendlich ebenfalls zu einer erhöhten Thrombozytenaktivität führt, konnten Fuste et al. 2002 nachweisen (FUSTE B. 2002).

Lindenblatt et al. verabreichten in einem Mausmodell über 4 Wochen das EPO-Analogon Darbepoetin-alpha. Interessanterweise kam es im Verlauf zu einem parallelen Anstieg der NO-Produktion, so dass das Risiko für thrombembolische Ereignisse unter Darbepoetin nicht

erhöht war. Lediglich in einer zweiten Gruppe von gentechnisch veränderten Mäusen mit fehlender Stickstoffmonoxid-Synthase konnten vermehrt thrombembolische Ereignisse verzeichnet werden (LINDENBLATT N. 2007).

7.2.3. Kapilläre Perfusion

Verhält sich die kapilläre Fließgeschwindigkeit in den Hautkammergruppen noch nahezu in allen 3 Arealen gleich und über die Zeit konstant, so zeigen sich doch deutliche Unterschiede zwischen den unbehandelten und behandelten Lappen. In den durchbluteten Kapillaren der mit EPO 500 vorbehandelten Tiere zeigten die Kapillaren eine signifikante Erhöhung der Fließgeschwindigkeit im distalen Lappenabschnitt. Die mit EPO 5000 vorbehandelte Gruppe zeigte im Vergleich zu den unbehandelten Tieren ebenfalls eine erhöhte Fließgeschwindigkeit, deren Ausmaß jedoch geringer ausfiel als bei der EPO 500-Gruppe. Diese analogen Veränderungen, die wir in den Arteriolen und Venulen beobachten konnten, können folgendermaßen erklärt werden: In der niedrig dosierten Gruppe konnten ca. 65% des Hautlappens erhalten werden, in der hochdosierten etwa 30%, wohingegen die kapilläre Perfusion der unbehandelten Gruppen im distalen Bereich fast vollständig zum Erliegen kam. Die Aufrechterhaltung einer adäquaten Kapillardichte geht folglich mit der Aufrechterhaltung einer kapillären Perfusion einher, die damit als Hauptfaktoren für die Prävention von Gewebnekrose durch chronische Ischämie anzusehen ist (siehe auch 7.2.2)

7.2.4. Apoptotischer Zelltod

In der Versuchsreihe mit Hautkammern ohne anhaltende Ischämie zeigten sich bezüglich der Apoptose kaum Unterschiede zwischen den Tieren, die EPO erhielten und der unbehandelten Gruppe. Die Zahl der apoptotischen Zellen zeigte keinen signifikanten Unterschied. Im Gegensatz hierzu zeigte die unterschiedliche Verabreichung von EPO in dem Hautlappenmodell eine signifikante Verminderung der Apoptosezahl, die dosisunabhängig ist. Analog zu unseren Beobachtungen an kritisch durchbluteten Haut-Muskel-Gewebe zeigen andere Arbeiten ebenfalls einen EPO-bedingten antiapoptotischen Effekt, wie z.B. eine Apoptoseminderung in neuronalem Gewebe (GORIO A. 2002, DIGICAYLIOGLU M. 2004,

VILLA P. 2003, MARTI H. H: 2004), in der Retina des Auges (JUNK A.. 2002, GRIMM C. 2002), am Herzen (JOYEUX-FAURE M. 2005, CAI Z. 2003, BOGOYEVITCH M. A. 2004, TRAMONTANO A. F. 2003) und an der Niere (JOHNSON DW 2006).

Dieser protektive Effekt auf den apoptotischen Zelltod kann ein weiterer Grund sein, warum EPO zu einer Gewebeprotektion führt, die nicht nur auf einem Erhalt des Blutflusses beruht.

7.2.5. Leukozyten-Endothelzellinteraktion, Inflammation

Bereits in der ersten Versuchsreihe mit den Hautkammern ohne Ischämie konnte die ausgeprägte antiinflammatorische Wirkung von EPO auf das Hautgewebe nachgewiesen werden. In der gesamten Kammer konnte bei den unbehandelten Tieren eine postinterventionelle, durch die Kammerimplantation induzierte, Entzündungsreaktion beobachtet werden, die erst gegen Ende des Beobachtungszeitraums wieder abklang. Im Gegensatz hierzu zeigte sich in den mit EPO behandelten Versuchsgruppen analog zum apoptotischen Zelltod dosisunabhängig eine signifikante Verminderung der Entzündungsreaktion, die durch einen Rückgang bzw. eine nicht mehr messbare Interaktion zwischen Leukozyten und Gefäßendothel gekennzeichnet war. Diese Beobachtungen, die in den unbehandelten Lappentieren nicht auftraten, weisen auf einen antiinflammatorischen Effekt hin, der direkt oder indirekt durch EPO vermittelt wird. Dieser Effekt stellt eine weitere wichtige Säule im Rahmen des verbesserten Lappenüberlebens durch EPO-Vorbehandlung bei anhaltender Ischämieexposition dar.

In diesem Zusammenhang konnten Villa et al. in einem Rattenmodell diesen Effekt in neuronalem Gewebe feststellen. Hier erfolgte experimentell die Okklusion einer der beiden Karotisarterien sowie die nachfolgende Messung von verschiedenen Zytokinen mit und ohne EPO-Einfluss. Als Ergebnis zeigte sich eine signifikante Reduktion der Astrozytenaktivierung sowie eine Reduktion von Leukozyten- und Mikrogliaansammlung im Infarktgewebe. Des Weiteren kam es unter EPO-Behandlung zu einem Abfall von proinflammatorischen Zytokinen, wie TNF-alpha und Interleukin 6 (VILLA P. 2003).

7.2.6. Nekrose

Die makroskopische Analyse des Hautlappens nach 10 Tagen anhaltender Ischämie zeigte im zentralen und auch distalen Bereich massive Veränderungen der Mikrozirkulation. Bei den unbehandelten Versuchstieren entwickelte sich eine klare Demarkationslinie, die vitales Gewebe von dem weiter distal gelegenen bereits nekrotisierten Gewebe abtrennte. Diese Demarkationslinie verlief bei den beiden mit EPO vorbehandelten Gruppen weiter distal, was auf einen Rückgang der Nekrosefläche unter EPO-Therapie hinweist. Interessanterweise zeigte sich auch hier die niedrigere Dosierung von 500IE der höheren Dosis von 5000IE überlegen. In den unbehandelten Gruppen war festzustellen, dass zu Beginn der Beobachtungsphase an Tag 1 postoperativ eine durchschnittliche nicht perfundierte Gewebefläche von etwa 40% bestand, welche nach 10 Tagen auf ca. 52% anstieg. In beiden mit EPO präkonditionierten Gruppen zeigte sich zu Beginn an Tag 1 postoperativ eine signifikante Reduktion der nicht perfundierten Gewebefläche gegenüber der unbehandelten Gruppe von 23%. Im Verlauf erholte sich das Gewebe der EPO 500-Versuchsreihe sogar. Im Gegensatz dazu stieg die Nekrosefläche im Verlauf bei der EPO 5000-Gruppe auf etwa 40% an. Dies deutet erneut auf eine zentrale Rolle des EPOs bei der Prävention anhaltender Ischämie-induzierter Gewebsnekrosen hin. Auch hier besteht, wie bei der Fließgeschwindigkeit und der Aufrechterhaltung der kapillären Perfusion, eine Dosisabhängigkeit, bei der die niedrigere EPO-Dosierung der höheren deutlich überlegen ist. Dies liegt wohl wiederum darin begründet, dass der höhere Hämatokrit der EPO 5000 Gruppe mit der schlechteren nutritiven Perfusion eher zur Nekrose führt.

7.2.7. Hämatokrit

Der Anfangshämatokritwert der einzelnen Versuchstiere vor systemischer medikamentöser Vorbehandlung zeigte keine Unterschiede innerhalb der verschiedenen Versuchsgruppen. Auch nach 10 Tagen zeigen die unbehandelten Tiere keine Hämatokritveränderung im Vergleich zum Ausgangshämatokritwert. Im Gegensatz dazu beobachteten wir in den Versuchsgruppen mit Vorbehandlung folgende Veränderungen: Die EPO 500 Gruppe zeigte über die 10 Tage lediglich einen geringfügigen Hämatokritanstieg von maximal 1-2%. Im

Gegensatz hierzu zeigte die 10-fache EPO Dosierung einen signifikanten Anstieg des Hämatokrits von über 5%.

Dieser erhebliche Unterschied zwischen den beiden EPO-Vorbehandlungen kann folgendes bewirken: Die Viskosität des Blutes nimmt zu, die Fließeigenschaften des Blutes verschlechtern sich und die an der Gewebsnutrition beteiligten Kapillaren sind trotz arteriolärer Dilatation und verbessertem Inflow weniger gut durchblutet, was letztlich eine entscheidende Wirkung auf das Überleben des Gewebes hat. Inwieweit Thrombosierungen zusätzlich an der Gewebsnekrose beteiligt waren, wurde in diesem Modell nicht untersucht. Dies wurde allerdings von Coleman et al. 2006 als Nebenwirkung einer hochdosierten EPO-Therapie neben dem Auftreten von Hypertonie beschrieben (COLEMAN TR, 2006).

7.2.8. Angiogenese

Um Hinweise auf Angiogenese, d.h. Neubildung von funktionellen Gefäßstrukturen, festzuhalten, wurden die Kapillaren eines jeden Hautlappens zu jedem Zeitpunkt mikroskopiert und besonderes Augenmerk auf Gefäßaussprossungen, sog. „sprouts“, und Gefäßknospen, sog. „buds“, im Übergangsbereich zwischen vitalem und avitalem Gewebe gelegt. Während des 10-tägigen Untersuchungszeitraums konnten keine morphologischen Gefäßveränderungen, die auf Angiogenese hingewiesen hätten, nachgewiesen. Vasoproliferative Effekte des Erythropoietins, wie sie Buemi et al. (BUEMI M. 2002) oder Crivellato et al. (CRIVELLATO E. 2004) dokumentiert haben, konnten in dem in der vorliegenden Studie verwendeten Ischämiemodell nicht nachgewiesen werden. Buemi et al. konnten am Rattenmodell einen Rückgang der Neutrophilenzahl (siehe auch 7.2.5) sowie eine vermehrte Vaskularisation nachweisen. Dies gelang auch Crivellato et al. am Rattenmodell in vitro und an der Chorioallantoismembran von Kükenembryos in vivo. Obwohl VEGF, der wichtigste angiogene Faktor im Rahmen der Ischämie, stets früh nach deren Induktion hochreguliert wird, dauert es in der Regel einige Tage bis Gefäße entstehen. Da das distale Lappengewebe in diesem Modell spätestens nach 3 Tagen einer irreversiblen Nekrose unterlegen ist, kann wohl eine erst dann einsetzende angiogene Antwort mit Gefäßneubildungen nicht stattfinden.

7.3. Schlussfolgerung

Abschließend kann angenommen werden, dass das verbesserte Lappenüberleben nach EPO-Präkonditionierung (Gabe vor Ischämie) auf 3 Mechanismen beruht:

- Erhalt der Kapillarperfusion aufgrund verbessertem arteriolärem Blutfluss im Lappen
- Reduktion des apoptotischen Zelltodes
- Verminderung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion/Inflammation.

Die Verminderung der Lappennekrose zeigte eine Dosisabhängigkeit. Die hämatokritirrelevante Dosis EPO 500, welche vor Induktion der Ischämie verabreicht wurde, führte zu einer signifikanten Verringerung des Perfusionsausfalles von 50% (unbehandelte Kontrolle) auf 16%, wohingegen die 10-fache EPO-Dosierung zu keiner signifikanten Verbesserung des Lappenüberlebens führte. Dies ist höchstwahrscheinlich auf die rasche und signifikante Hämatokriterhöhung zurückzuführen, welche die Rheologie des Blutes verschlechtert und somit die notwendige Perfusion in den Kapillaren verhindert. Anhand dieser Erkenntnis wäre es entsprechend sinnvoll, niedrig dosiertes Erythropoietin oder aber modifiziertes Erythropoietin zu verwenden, welches keinen erythropoietischen Effekt besitzt. Diese Alternativen werden bereits in der Literatur diskutiert. So gibt es zum einen das Asialo-EPO, welches zwar an den klassischen EPO-Rezeptor bindet, aber nur eine sehr kurze Halbwertszeit besitzt und so auf diesem Wege die erythropoietischen Eigenschaften nicht zum Tragen kommen (ERBAYRAKTAR S, 2003). Ein weiteres gentechnisch abgewandeltes Molekül, das C-EPO (Carbamylerythropoietin), entfaltet seine Wirkung unabhängig von dem klassischen EPO-Rezeptor. Es geht keine Bindung mit ihm ein, wodurch es auch keinen Effekt auf die Erythropoese hat (MENNINI T, 2006).

Insgesamt stellt sich ein sehr breites Anwendungsspektrum für Erythropoietin als wirksame Substanz zur Verhinderung von Gewebnekrose verschiedenster Organe dar. Besonders in der plastischen Chirurgie findet die Substanz großes Anwendungspotential, wie z.B. bei Lappenpräparationen, Verbrennungswunden oder dem diabetischen Fußsyndrom.

8. Verzeichnis der Abkürzungen

ANOVA	-	analysis of variance
BFU-E	-	erythroid burst forming unit
bw	-	body weight
bzw.	-	beziehungsweise
C	-	Celsius
ca.	-	circa
CCD	-	charge coupled device
C-EPO	-	Carbamylerythropoietin
CFU-E	-	erythroid colony forming unit
cm	-	Zentimeter
cm ²	-	Quadratcentimeter
CON	-	untreated control group
CSF	-	colony stimulating factor
d	-	Tag
Da	-	Dalton
DCIA	-	deep circumflex iliac artery
d.h.	-	das heisst
DNA	-	Desoxyribonukleinsäure
etc.	-	et cetera
EPO	-	Erythropoietin
EPO-R	-	Erythropoietinrezeptor
FCD	-	functional capillary density
FITC	-	Fluoreszein-Isothiozyanat
g	-	Gramm
ggf.	-	gegebenenfalls
h	-	Stunde
HIF	-	Hypoxie induzierender Faktor
IE	-	internationale Einheiten
i.p.	-	intraperitoneal
IRS	-	inflammatory response syndrome

IU	-	international units
JAK	-	Janus Kinase
K	-	Kalium
kg	-	Kilogramm
KG	-	Körpergewicht
LTA	-	lateral thoracic artery
mg	-	Milligramm
MIC	-	Mikroskop
min	-	Minuten
ml	-	Milliliter
mm	-	Millimeter
mm ²	-	Quadratmillimeter
MON	-	Monitor
MS	-	Magnetstahl
μl	-	Mikroliter
μm	-	Mikrometer
n	-	Anzahl
Na	-	Natrium
NA	-	numerische Apertur
NaCl	-	Natriumchlorid
nm	-	Nanometer
NO	-	Stickstoffmonoxid
n.s.	-	nicht signifikant
p	-	Irrtumswahrscheinlichkeit
RBCV	-	red blood cell velocity
RHK	-	Rückenhautkammer
ROS	-	reactive oxygen species
s	-	Sekunde
sec	-	Sekunde
SEM	-	standard error of the mean
sog.	-	sogenannt
STAT	-	signal transducers and activators of transcription
SWOP	-	second window of protection
TNF	-	Tumornekrosefaktor

v.a.	-	vor allem
VEGF	-	vascular endothelial growth factor
VR	-	Videorekorder
vs	-	versus (gegenüber)
VT	-	Versuchstier
z.B.	-	zum Beispiel
ZG	-	Zeitgenerator
ZNS	-	zentrales Nervensystem

9. Literaturverzeichnis

1. Baker JE (2005) Erythropoietin mimics ischemic preconditioning. *Vascul Pharmacol.* 42:233-241
2. Barker JH, Frank J, Bidiwala SB, Stengel CK, Carroll SM, Carroll CM, van Aalst V, Anderson GL (1999) An animal model to study microcirculation changes associated with vascular delay. *Br J Plast Surg.* 52:133-142
3. Bodó E, Kromminga A, Funk W, Laugsch M, Duske U, Jelkmann W, Paus R (2007) Human hair follicles are an extrarenal source and a nonhematopoietic target of erythropoietin. *FASEB J.* 21:3346-3354
4. Böcker-Meffert S, Rosenstiel P, Röhl C, Warneke N, Held-Feindt J, Sievers J, Lucius R (2002) Erythropoietin and VEGF promote neural outgrowth from retinal explants in postnatal rats. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 43:2021-2026
5. Bogoyevitch MA (2004) An update on the cardiac effects of erythropoietin cardioprotection by erythropoietin and the lessons learnt from studies in neuroprotection. *Cardiovasc Res.* 63:208-216
6. Buemi M, Galeano M, Sturiale A, Ientile R, Crisafulli C, Parisi A, Catania M, Calapai G, Impala P, Aloisi C, Squadrito F, Altavilla D, Bitto A, Tuccari G, Frisina N (2004) Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and healing of ischemic skin wounds. *Shock* 22:169-173
7. Buemi M, Vaccaro M, Sturiale A, Galeano MR, Sansotta C, Cavallari V, Floccari F, D'Amico D, Torre V, Calapai G, Frisina N, Guarneri F, Vermiglio G (2002) Recombinant human erythropoietin influences revascularization and healing in a rat model of random ischaemic flaps. *Acta Derm Venereol.* 82:411-417

8. Cai Z, Manalo DJ, Wei G, Rodriguez ER, Fox-Talbot K, Lu H, Zweier JL, Semenza GL (2003) Hearts from rodents exposed to intermittent hypoxia or erythropoietin are protected against ischemia-reperfusion injury. *Circulation* 108:79-85
9. Coleman TR, Westenfelder C, Tögel FE, Yang Y, Hu Z, Swenson L, Leuvenink HG, Ploeg RJ, d'Uscio LV, Katusic ZS, Ghezzi P, Zanetti A, Kaushansky K, Fox NE, Cerami A, Brines M (2006) Cytoprotective doses of erythropoietin or carbamylated erythropoietin have markedly different procoagulant and vasoactive activities. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:5965-5970
10. Crivellato E, Nico B, Vacca A, Djonov V, Presta M, Ribatti D (2004) Recombinant human erythropoietin induces intussusceptive microvascular growth in vivo. *Leukemia* 18:331-336
11. Digicaylioglu M, Garden G, Timberlake S, Fletcher L, Lipton SA (2004) Acute neuroprotective synergy of erythropoietin and insulin-like growth factor I. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:9855-9860
12. Ebrayraktar S, Grasso G, Sfacteria A, Xie QW, Coleman T, Kreilgaard M, Torup L, Sager T, Ebrayraktar Z, Gokmen N, Yilmaz O, Ghezzi P, Villa P, Fratelli M, Casagrande S, Leist M, Helboe L, Gerwein J, Christensen S, Geist MA, Pedersen LO, Cerami-Hand C, Wuerth JP, Cerami A, Brines M (2003) Asialoerythropoietin is a nonerythropoietic cytokine with broad neuroprotective activity in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:6741-6746.
13. Fuste B, Serradell M, Escolar G, Cases A, Mazzara R, Castillo R, Ordinas A, Diaz-Ricart M (2002) Erythropoietin triggers a signaling pathway in endothelial cells and increases the thrombogenicity of their extracellular matrices in vitro. *Thromb Haemost.* 88:678-685
14. Galeano M, Altavilla D, Cucinotta D, Russo GT, Calo M, Bitto A, Marini H, Marini R, Adamo EB, Seminara P, Minutoli L, Torre V, Squadrito F (2004) Recombinant human erythropoietin stimulates angiogenesis and wound healing in the genetically diabetic mouse. *Diabetes* 53:2509-2517

15. Gorio A, Gokmen N, Erbayraktar S, Yilmaz O, Madaschi L, Cichetti C, Di Giulio AM, Vardar E, Cerami A, Brines M (2002) Recombinant human erythropoietin counteracts secondary injury and markedly enhances neurological recovery from experimental spinal cord trauma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:9450-9455
16. Grimm C, Hermann DM, Bogdanova A, Hotop S, Kilic U, Wenzel A, Kilic E, Gassmann M (2005) Neuroprotection by hypoxic preconditioning: HIF-1 and erythropoietin protect from retinal degeneration. *Semin Cell Dev Biol.* 16:531-538
17. Grimm C, Wenzel A, Acar N, Keller S, Seelinger M, Gassmann M (2006) Hypoxic preconditioning and erythropoietin protect retinal neurons from degeneration. *Adv Exp Med Biol.* 588:119-131
18. Grimm C, Wenzel A, Groszer M, Mayser H, Seelinger M, Samardzija M, Bauer C, Gassmann M, Reme CE (2002) HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat Med.* 8:718-724
19. Grimm C, Wenzel A, Stanescu D, Samardzija M, Hotop S, Groszer M, Naash M, Gassmann M, Reme C (2004) Constitutive overexpression of human erythropoietin protects the mouse retina against induced but not inherited retinal degeneration. *J Neurosci.* 24:5651-5658
20. Harder Y, Amon M, Erni D, Menger MD (2004) Evolution of ischemic tissue injury in a random pattern flap: a new mouse model using intravital microscopy. *J Surg Res.* 121:197-205
21. Jaquet K, Krause K, Tawakol-Khodai M, Geidel S, Kuck KH (2002) Erythropoietin and VEGF exhibit equal angiogenic potential. *Microvasc Res.* 64:326-333
22. Johnson DW, Forman C, Vesey DA (2006) Novel renoprotective actions of erythropoietin: new uses for an old hormone. *Nephrology (Carlton)* 11:306-312

23. Johnson DW, Pat B, Vesey DA, Guan Z, Endre Z, Gobe GC (2006) Delayed administration of darbepoietin or erythropoietin protect against ischemic acute renal injury and failure. *Kidney Int.* 69:1806-1813
24. Joyeux-Faure M, Godin-Ribuot D, Ribuot C (2005) Erythropoietin and myocardial protection: what's new? *Fundam Clin Pharmacol.* 19:439-446
25. Joyeux-Faure M (2007) Cellular protection by erythropoietin: new therapeutic implications? *J Pharmacol Exp Ther.* 323:759-762
26. Junk AK, Mammis A, Savitz SI, Singh M, Roth S, Malhotra S, Rosenbaum PS, Cerami A, Brines M, Rosenbaum DM (2002) Erythropoietin administration protects retinal neurons from acute ischemia-reperfusion injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99:10659-10664
27. Kendall RG (2001) Erythropoietin. *Clin Lab Haematol.* 23:71-80
28. Krupp NL, Weinstein G, Calian A, Berlin JA, Wolf P, Weber RS (2003) Validation of a transfusion prediction model in head and neck cancer surgery. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 129:1297-1302
29. Lappin TR, Maxwell AP, Johnston PG (2002) EPO's alter ego: erythropoietin has multiple actions. *Stem Cells.* 20:485-492
30. Lindenblatt N, Menger MD, Klar E, Vollmar B (2007) Darbepoetin-alpha does not promote microvascular thrombus formation in mice: role of eNOS-dependent protection through platelet and endothelial cell deactivation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 27:1191-1198
31. Maiese K, Li F, Chong ZZ (2004) Erythropoietin in the brain: can the promise to protect be fulfilled? *Trends Pharmacol Sci.* 25:577-583
32. Maiese K, Li F, Chong ZZ (2005) New avenues of exploration for erythropoietin *JAMA* 293:90-95

33. Malhotra S, Savitz SI, Ocava L, Rosenbaum DM (2006) Ischemic preconditioning is mediated by erythropoietin through PI-3 kinase signaling in an animal model of transient ischemic attack. *J Neurosci Res.* 83:19-27
34. Marti HH (2004) Erythropoietin and the hypoxic brain. *J Exp Biol.* 207:3233-3242
35. Menger MD, Laschke MW, Vollmar B (2002) Viewing the microcirculation through the window: some twenty years experience with the hamster dorsal skinfold chamber. *Eur Surg Res.* 34:83-91
36. Mennini T, De Paola M, Bigini P, Mastrotto C, Fumagalli E, Barbera S, Mengozzi M, Viviani B, Corsini E, Marinovich M, Torup L, Van Beek J, Leist M, Brines M, Cerami A, Ghezzi P (2006) Nonhematopoietic erythropoietin derivatives prevent motoneuron degeneration in vitro and in vivo. *Mol Med.* 12:153-160
37. Miki T, Miura T, Yano T, Takahashi A, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, Ikeda Y, Nishihara M, Naitoh K, Ohori K, Shimamoto K (2006) Alteration in erythropoietin-induced cardioprotective signaling by postinfarct ventricular remodeling. *J Pharmacol Exp Ther.* 317:68-75
38. Moon C, Krawczyk M, Ahn D, Ahmet I, Paik D, Lakatta EG, Talan MI (2003) Erythropoietin reduces myocardial infarction and left ventricular functional decline after coronary artery ligation in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:11612-11617
39. Murray CE, Jennings RB, Reimer KA (1986) Preconditioning with ischemia: a delay of lethal cell injury in ischemic myocardium. *Circulation* 74:1124-1136
40. Nishihara M, Miura T, Miki T, Sakamoto J, Tanno M, Kobayashi H, Ikeda Y, Ohori K, Takahashi A, Shimamoto K (2006) Erythropoietin affords additional cardioprotection to preconditioned hearts by enhanced phosphorylation of glycogen synthase kinase-3 beta. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 291:748-755

41. Parsa CJ, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Thompson RB, Petrofski JA, Matsumoto A, Stamler JS, Koch WJ (2004) Cardioprotective effects of erythropoietin in the reperfused ischemic heart: a potential role for cardiac fibroblasts. *J Biol Chem.* 279:20655-20662
42. Parsa CJ, Matsumoto A, Kim J, Riel RU, Pascal LS, Walton GB, Thompson RB, Petrofski JA, Annex BH, Stamler JS, Koch WJ (2003) A novel protective effect of erythropoietin in the infarcted heart. *J Clin Invest.* 112:999-1007
43. Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, Thiemermann C (2004) Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse Kidney in vivo. *Kidney Int.* 66:983-989
44. Prass K, Scharff A, Ruscher K, Löwl D, Muselmann C, Victorov I, Kapinya K, Dirnagl U, Meisel A (2003) Hypoxia-induced stroke tolerance in the mouse is mediated by erythropoietin. *Stroke* 34:1981-1986
45. Rezaeian F, Wettstein R, Amon M, Scheuer C, Schramm R, Menger MD, Pittet B, Harder Y (2008) Erythropoietin protects critically perfused flap tissue. *Ann Surg.* 248:919-929
46. Rezaeian F, Wettstein R, Egger JF, Sandmann F, Rucker M, Tobalem M, Vollmar B, Menger MD, Harder Y (2010) Erythropoietin-induced upregulation of endothelial nitric oxide synthase but not vascular endothelial growth factor prevents musculocutaneous tissue from ischemic damage. *Lab Invest.* 90:40-51
47. Rucker M, Roesken F, Schäfer T, Spitzer WJ, Vollmar B, Menger MD (1999) In vivo analysis of the microcirculation of osteomyocutaneous flaps using fluorescence microscopy. *Br J Plast Surg.* 52:644-652
48. Saray A, Ozakpinar R, Koc C, Serel S, Sen Z, Can Z (2003) Effect of chronic and short-term erythropoietin treatment on random flap survival in rats: an experimental study. *Laryngoscope* 113:85-89

49. Savino C, Pedotti R, Baggi F, Ubiali F, Gallo B, Nava S, Bigini P, Barbera S, Fumagalli E, Mennini T, Vezzani A, Rizzi M, Coleman T, Cerami A, Brines M, Ghezzi P, Bianchi R (2006) Delayed administration of erythropoietin and its non-erythropoietic derivatives ameliorates chronic murine autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 172:27-37
50. Schüder G, Vollmar B, Richter S, Pistorius G, Fehring M, Feifel G, Menger MD (1999) Epi-illumination fluorescent light microscopy for the in vivo study of rat hepatic microvascular response to cryothermia. *Hepatology* 29:801-808
51. Siren AL, Ehrenreich H (2001) Erythropoietin-a novel concept for neuroprotection. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci.* 251:179-184
52. Siren AL, Knerlich F, Poser W, Gleiter CH, Brück W, Ehrenreich H (2001) Erythropoietin and erythropoietin receptor in human ischemic/hypoxic brain. *Acta Neuropathol.* 101:271-276
53. Stohlawetz PJ, Dzirlo L, Hergovich N, Lackner E, Mensik C, Eichler HG, Kabrna E, Geissler K, Jilma B (2000) Effects of erythropoietin on platelet reactivity and thrombopoiesis in humans. *Blood* 95:2983-2989.
54. Szczesny G, Nolte D, Veihelmann A, Messmer K (2000) A new chamber technique for intravital microscopic observations in the different soft tissue layers of mouse hindleg. *J Trauma* 49:1108-1115
55. Tada H, Kagaya Y, Takeda M, Ohta J, Asami Y, Satoh K, Ito K, Karibe A, Shirato K, Minegishi N, Shimokawa H (2006) Endogenous erythropoietin system in non-hematopoietic lineage cells plays a protective role in myocardial ischemia/reperfusion. *Cardiovasc Res.* 71:466-477
56. Tramontano AF, Muniyappa R, Black AD, Blendea MC, Cohen I, Deng L, Sowers JR, Cutaia MV, El-Sherif N (2003) Erythropoietin protects cardiac myocytes from hypoxia-induced apoptosis through an Akt-dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun.* 308:990-994

57. Villa P, Bigini P, Mennini T, Agnello D, Laragione T, Cagnotto A, Viviani B, Marinovich M, Cerami A, Coleman TR, Brines M, Ghezzi P (2003) Erythropoietin selectively attenuates cytokine production and inflammation in cerebral ischemia by targeting neuronal apoptosis. *J Exp Med.* 198:971-975
58. Vollmar B, Menger MD (2009) The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 89(4):1269-1339
59. Vollmar B, Slotta JE, Nickels RM, Wenzel E, Menger MD (2003) Comparative analysis of platelet isolation techniques for the in vivo study of the microcirculation. *Microcirculation* 10:143-152
60. Wang L, Zhang Z, Wang Y, Zhang R, Chopp M (2004) Treatment of stroke with erythropoietin enhances neurogenesis and angiogenesis and improves neurological function in rats. *Stroke* 35:1732-1737
61. Westermann S, Vollmar B, Thorlacius H, Menger MD (1999) Surface cooling inhibits tumor necrosis factor-alpha-induced microvascular perfusion failure, leucocyte adhesion, and apoptosis in the striated muscle. *Surgery* 126:881-889
62. Wiessner C, Allegrini PR, Ekatodramis D, Jewell UR, Stallmach T, Gassmann M (2001) Increased cerebral infarct volumes in polyglobulic mice overexpressing erythropoietin. *J Cereb Blood Flow Metab.* 21:857-864
63. Wu H, Ren B, Zhu J, Dong G, Xu B, Wang C, Zheng X, Jing H (2006) Pretreatment with recombinant human erythropoietin attenuates ischemia-reperfusion-induced lung injury in rats. *Eur J Cardiothorac Surg.* 29:902-907
64. Zweifach BW (1954) Direct observation of the mesenteric circulation in experimental animals. *Anat Rec.* 120:277-291

10. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei denjenigen ganz herzlich bedanken, ohne deren Hilfe und Unterstützung die Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Ein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger, Direktor des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, für die Überlassung des interessanten Themas und Ermöglichung des wissenschaftlichen Arbeitens. Hier zeigte er Hilfsbereitschaft, Geduld und Verständnis und schaffte es immer wieder neue Anregungen, Begeisterung und Motivation zu vermitteln.

Ein ebenso großer Dank geht an meinen direkten Betreuer PD Dr. med. Yves Harder, der mich während der gesamten Zeit vorbildlich durch die Arbeit leitete. Bei der fast täglichen Zusammenarbeit während der experimentellen Phase zeigte er sich stets überaus hilfsbereit, geduldig und motivierend. Durch seine Freundlichkeit und umfangreichen Fachkenntnisse bereitete mir die Arbeit sehr viel Freude. Selbst als Herr Dr. Harder die Universität des Saarlandes wieder verließ, war trotz der Entfernung nach Genf eine wunderbare, kompetente Zusammenarbeit möglich. Hierfür möchte ich mich bei ihm herzlich bedanken.

Des Weiteren bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern und Angestellten des Instituts für Klinisch-Experimentelle Chirurgie für deren freundliche und tatkräftige Unterstützung.

Ein ganz herzliches Dankeschön gehört meinen Lieben zu Hause für die ständige Unterstützung und stetige Motivation zur Fertigstellung dieser Arbeit, für ein offenes Ohr, Rücksicht und Verständnis während dieser Zeit.

11. Lebenslauf

Name: Metzkow
Vorname: Eva
Geburtsdatum: 13. Juli 1981
Geburtsort: Homburg
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig
Konfession: katholisch
Adresse: Karlsberstr. 111
66424 Homburg/Saar
Tel.: 0176-23181089, 06841-9596130

Bildungsweg

Schule

1988-1992 Grundschole Sonnenfeld, Homburg
1992-2001 Saarpfalzgymnasium, Homburg, Abitur

Universität

2001-2007 Universität des Saarlandes, Medizinische Fakultät
Homburg/Saar
09/2003 Physikum
11/2007 2. Teil der ärztlichen Prüfung nach neuer Approbationsordnung

Famulaturen

03/2004	Gemeinschaftspraxis für Kinder- und Jugendmedizin Drs. Wahlen, Büttner, Richter, Reichart, Homburg
09/2004	Herz-Thorax-Chirurgie, Universitätsklinikum des Saarlandes
09/2005	Neurologie, Universitätsklinikum des Saarlandes
03/2006	Innere Medizin, Knappschafts Krankenhaus Püttlingen

Praktisches Jahr

08/2006-12/2006	Neurologie, Knappschafts Krankenhaus Püttlingen
12/2006-03/2007	Innere Medizin, Knappschafts Krankenhaus Püttlingen
03/2007-07/2007	Chirurgie, Knappschafts Krankenhaus Püttlingen

Weiterer beruflicher Werdegang

01/2008-12/2008	Assistenzärztin für Neurologie, Knappschafts Krankenhaus Püttlingen
seit 01/2009	Assistenzärztin für Innere Medizin, Knappschafts Krankenhaus Püttlingen

Forschung

2004-2011	Experimentelle Arbeit am Institut für Klinisch- Experimentelle Chirurgie, Universität des Saarlandes (Direktor: Prof. Dr. M. D. Menger), Dissertationsarbeit: „Präkonditionierung mit Erythropoietin bei kritisch perfundiertem Gewebe“
-----------	---

Publikationen

04/2009

Harder Y, Amon M, Schramm R, Contaldo C, Metzkow E,
Matzen A, Rücker M, Vollmar B, Menger MD

Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic
myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-
dependent manner.

Surgery 2009 Apr;145(4):372-383

Fremdsprachen

Englisch, Französisch, Spanisch