

## 4. Diskussion

### 4.1 Etablierung und Analyse des Modells zur standardisierten Erzeugung eines geschlossenen Weichteiltraumas

Schwere traumatische Weichteilschäden und deren Folgezustände bestimmen das weitere Frakturmanagement, erhöhen das Infektrisiko und determinieren die Prognose komplexer Extremitätenverletzungen (39, 51, 53, 61, 83, 95, 96, 98, 120, 178). Klinisch sind schwere traumatische Weichteilschäden durch einen progressiven Verlauf mit protrazierter Ausbildung eines erheblichen Sekundärschadens und ausgedehnten Myonekrosen initial vitaler, nicht vom Trauma betroffener Skelettmuskelareale gekennzeichnet (83, 97, 98, 120, 178).

Aufgrund von Ähnlichkeiten im pathophysiologischen Reaktionsmuster und klinischen Verlauf mit dem postischämischen Reperfusionsschaden der Skelettmuskulatur (2, 111, 113, 115) sollte zunächst geklärt werden, inwieweit vergleichbare, jedoch traumatisch-induzierte mikrovaskuläre Perfusionsstörungen die Basis für die Ausbildung des Sekundärschadens schwerer geschlossener Weichteilverletzungen darstellen.

Die meisten bislang existierenden tierexperimentellen Modelle zur traumatischen Weichteilschädigung setzen entweder einen durch Federkraft angetriebenen

Metallbolzen oder ein durch die Schwerkraft beschleunigtes Guillotine-artig herabfallendes Gewicht definierter Größe und Fallhöhe ein (28, 40, 67, 108, 172). In Anbetracht der Tatsache, dass die auf das Gewebe übertragene kinetische Energie in erster Linie von der Geschwindigkeit zum Zeitpunkt des Impacts abhängt (Ableitung des NEWTON'schen Grundgesetzes:  $E_{KIN}=1/2mv^2$ ), wird hierdurch jedoch nur ein „low energy trauma“ erreicht. Um die Mikrozirkulation im traumatisierten Muskel beobachten und analysieren zu können, wurde in anderen Studien als Zielorgan auch die quergestreifte Hautmuskulatur und die Präparation der Rückenhautkammer angewendet (31, 118, 161, 193).

In den vorliegenden Studien (123, 150) konnten wir durch Modifikation der Computer-assoziierten Controlled-Impact-Injury-Technik (33, 100) eine standardisierte geschlossene Skelettmuskelverletzung im Sinne eines Hochrasanztraumas (7m/s) der Extremitäten erzeugen, die realitätsnah einen

geschlossenen Weichteilschaden simuliert. Unter Zuhilfenahme dieser Technik können mehrere Impactparameter, (Geschwindigkeit, Kontaktfläche des Impactors, Kontaktzeit und Eindringtiefe mit dem Gewebe) entsprechend der Art und Schwere des Traumas verändert werden. Weiterhin kann der Kontusionsvorgang, über eine Zeit/Weg-Änderungskurve aufgezeichnet, nachvollzogen werden (33, 100).

Der Vorteil von Rückenhautkammermodellen zur Analyse der Mikrozirkulation quergestreifter Muskulatur nach Ischämie oder Trauma liegt in der Möglichkeit der Durchführung von sequentiellen und Verlaufsuntersuchungen bis zu mehreren Wochen am wachen und nicht-anästhesierten Tier (93, 112, 117, 132, 175). Dies ist insofern von besonderem Interesse, da für bestimmte Anästhetika eine Leukozytenaktivierung und Beeinflussung der peripheren Mikrozirkulation bekannt ist (66, 127, 130, 161).

Aus klinischer Perspektive bestehen jedoch auch Nachteile in der Anwendung der Rückenhautkammermodelle. Einerseits ist der zu untersuchende Hautmuskel zwar quergestreift, aber nicht ein Muskel des lokomotorischen Systems. Zudem weist er eine im Vergleich zum Muskel der Extremitäten differente Kontraktilität, Kapillardichte und Zusammensetzung an Muskelfasertypen auf (93, 117, 180). Andererseits liegt er nicht in einem abgeschlossenen Kompartiment oder osteofaszialen Raum. Daher führt eine posttraumatische interstitielle Ödemmanifestation nicht zwangsläufig zu erhöhtem Kompartimentdruck. Anstiege im intramuskulären Druck nach Extremitätenverletzungen besitzen jedoch enorme klinische Bedeutung und sind nicht selten mit sekundären Mikrozirkulationsstörungen bis hin zum totalen mikrovaskulären Perfusionsversagen und Gewebeuntergang (manifestes Kompartmentsyndrom) vergesellschaftet (27, 61, 73, 77, 157).

Die in dem von uns entwickelten Modell nachgewiesenen signifikanten Anstiege des Kompartimentdruckes bis an die Grenze zum Präkompartmentsyndrom nach geschlossenem Weichteiltrauma unterstreichen diesen Punkt und weisen auf eine differente Situation im Vergleich zur Rückenhautkammer hin (123, 150).

Um diesen Besonderheiten Rechnung zu tragen, wurden erste Versuche unternommen, ein Kammermodell am Hinterlauf der Maus zu etablieren, das es erlaubt, nach moderatem Trauma serielle intravitalmikroskopische Analysen auch am Skelettmuskel der Extremitäten durchzuführen (172).

## **4.2 In-vivo-Analyse der mikrovaskulären Perfusion des Skelettmuskels nach geschlossenem Weichteiltrauma**

In den ersten Studien konnten wir durch direkte intravitalmikroskopische Darstellung der Mikrozirkulation im traumatisierten Skelettmuskel nachweisen, dass der traumatische Weichteilschaden zu einer drastischen und lang anhaltenden nutritiven Perfusionsstörung führt. Andere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe am identischen Tiermodell haben auch eine inverse Korrelation von kapillärer Perfusion und NADH-Fluoreszenz im traumatisierten Skelettmuskel der Ratte nachweisen können (45, 46). Die erhöhte NADH-Autofluoreszenz als Zeichen einer reduzierten oxidativen Phosphorylierung innerhalb der Atmungskette (64) reflektiert dabei lokale Hypoxie und stützt die intravitalmikroskopischen Ergebnisse des kapillären Perfusionsversagens.

Weiterhin bewirkte das geschlossene Weichteiltrauma eine Aktivierung und Akkumulation von Leukozyten am mikrovaskulären Endothel. Diese Veränderungen waren mit einer signifikanten Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität (makromolekulare Leakage) als Anzeichen eines sich progressiv entwickelnden Endothelzellschadens vergesellschaftet.

In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen haben Menth-Chiari et al. in einem Modell an der Rückenhautkammer der Ratte gezeigt, dass eine Kontusion zu ausgeprägter endothelialer Leukozytenadhärenz führt (118). Die gleiche Arbeitsgruppe (31) hatte auch nach Kontusion quergestreifter Muskulatur eine Zunahme der transendothelialen Leakage von Makromolekülen beobachtet und diese als Ausdruck einer traumatisch induzierten Permeabilitätsstörung und des Verlustes der endothelialen Barrierefunktion diskutiert. In diesem Zusammenhang konnten wir eine über einen Zeitraum von 3-5 Tagen signifikant erhöhte mikrovaskuläre Permeabilität (Leakage) und Kompartimentdrücke in ventralen und dorsalen Muskelkompartimenten des Rattenhinterlaufes als weitere Faktoren identifizieren, welche die Qualität der mikrovaskulären Perfusion negativ beeinflussen. Die Dynamik und der zeitliche Verlauf dieser mikrovaskulären Veränderungen mit maximalen Werten für kapilläres Perfusionsversagen, endotheliale Dysfunktion und Leukozytenaktivierung nicht vor 24-72h post Trauma lassen zusätzliche, sekundäre Ursachen als die primäre Trauma-induzierte Gewebedestruktion vermuten.

Die massive, über den gesamten Untersuchungszeitraum gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in postkapillären Venolen bewirkt offenbar eine unspezifische inflammatorische Reaktion. Diese geht dann gleichsam einem Circulus vitiosus mit konsekutiver endothelialer Permeabilitätsstörung, interstitieller Ödemmanifestation, intramuskulärer Drucksteigerung mit kapillarem Kollaps, mikrovaskulären Thrombosen und dadurch initiiertes sekundärer Perfusionsstörung und ultimativen Myonekrosen einher. Als Initiatoren dieser autodestruktiven Sekundärschäden nach einer unspezifischen Noxe wie dem Weichteiltrauma sind in erster Linie durch Zytokine aktivierte neutrophile Granulozyten anzusehen (192). Als Ursachen dieser anhaltenden kapillären Dysfunktion und gesteigerten endothelialen Leukozytenadhärenz kommen neben einer wiederum Zytokin-vermittelten sequentiellen Expression verschiedener Zelladhäsionsmoleküle auch sekundäre Einschränkungen im mikrovaskulären Flussverhalten in Frage. In diesem Zusammenhang berichteten Bagge et al. bereits in den frühen 80er Jahren über eine Zunahme des mikrovaskulären Flußwiderstandes durch am Endothel adhärenente Leukozyten (4).

Für eine kausale Rolle aktivierter Leukozyten in der Pathogenese und Eskalation des Sekundärschadens spricht auch die Beobachtung, dass vermehrte Leukozytenaktivierung, Permeabilitätsstörung und „no-reflow“-ähnliches kapilläres Perfusionsversagen hauptsächlich in den an die Schadensareale angrenzenden Übergängen zu unverletzten Muskelarealen zu beobachten war.

Aus den Ergebnissen dieser Versuche kann abschließend gefolgert werden, dass biologisch-kausal wirksame Therapiekonzepte mit der Zielsetzung der Minimierung des Sekundärschadens diesen Mikrozirkulationsstörungen früh und effektiv entgegenwirken müssen.

### **4.3 Die Mikrozirkulation des Periostes bei traumatischem Weichteilschaden**

Die Resultate dieser Untersuchungen haben gezeigt, dass ein isolierter traumatischer Weichteilschaden zu einer anhaltenden Reduktion der nutritiven periostalen und damit auch ossären Perfusion führt. Darüber hinaus war diese kapilläre Dysfunktion ferner mit einer massiven endothelialen Permeabilitätsstörung und deutlicher Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den periostalen Venolen assoziiert, was als Zeichen einer durch ein isoliertes Weichteiltrauma induzierten periostalen Entzündungsreaktion interpretiert werden kann.

Verschiedene klinische und experimentelle Studien haben das Verhältnis der Perfusion von Skelettmuskel und Periost untersucht (11, 18, 52, 53, 78, 83, 140, 141, 182, 183, 194). Dabei zeigte sich, dass ein erheblicher Anteil der normalen periostalen Perfusion durch die umliegenden Weichteile und weniger von intraossär und endostal erfolgt. Die Tatsache der extraossären Kollateralperfusion des Periostes aus dem Skelettmuskel könnte somit die reduzierte periostale Durchblutung nach isoliertem Weichteiltrauma teilweise erklären.

Ferner deutet die Beobachtung einer Verringerung des volumetrischen Blutflusses in den Kapillaren bei gleichzeitiger Erhöhung in den periostalen Venolen auf zusätzliche, von der Skelettmuskelperfusion unabhängige Faktoren hin. So kommt es offensichtlich zu einem „bypass-ähnlichen“ partiellen Shunt zwischen dem präkapillären Segment und den postkapillären Venolen mit Minderperfusion des periostalen Kapillarbettes.

Als weitere Ursachen dieser kapillären Dysfunktion im Periost kommen neben ausgedehnten Kapillarthrombosen auch Auswirkungen des erhöhten Kompartimentdruckes nach geschlossener Weichteilverletzung in Frage. So bilden die in der Präparation dargestellten und intravitalmikroskopisch analysierten meta- und diaphysären Periostabschnitte eine Begrenzung des traumatisierten Muskelkompartiments (M. tibialis anterior). Relevante Druckerhöhungen in diesem abgeschlossenen osteofaszialen Raum werden somit direkt auf die der tibialen Kortikalis unmittelbar aufliegenden periostalen Kapillaren übertragen und führen dort zu den entsprechenden Einschränkungen wie Kapillarkollaps und Erhöhung des kapillären Flusswiderstandes. Die Entwicklung des periostalen Perfusionsversagens folgt dabei im zeitlichen Verlauf einem ähnlichen Profil wie

die mikrovaskulären Veränderungen und Kompartimentdruckanstiege der traumatisierten Skelettmuskulatur.

Andere Faktoren wie ischämie-induzierte endothelin-abhängige Konstriktion periostaler Kapillaren, wurden von Wolfard et al. diskutiert (198). Die Autoren konnten in einem Ischämie-Reperusionsmodell nach Inhibition von Endothelin durch entsprechende Antagonisten neben einer kapillären Vasodilatation auch eine deutliche Verbesserung der kapillären periostalen Durchblutung und Entzündungsreaktion in Form von gesteigerter Kapillardichte und reduzierter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nachweisen (198). Diese Resultate lassen eine kausale Rolle des Endothelinsystems in der posttraumatischen periostalen Mikrozirkulationsstörung vermuten und weisen auf eine potentielle therapeutische Nutzung durch dessen Antagonisierung hin.

Das ähnliche mikrovaskuläre Reaktionsmuster und zeitliche Profil der Manifestation mikrovaskulärer Veränderungen nach geschlossenem Weichteilschaden im Periost und Skelettmuskel spricht für vergleichbare Pathomechanismen. Diese Mikrozirkulationsstörungen in Skelettmuskel und Periost könnten ein möglicher kausal-pathogenetischer Faktor für die klinisch bekannte verzögerte periostale Kallusbildung und Frakturheilung sein (39, 83, 88, 119, 142, 182, 183). Inwieweit es nach einer einfachen Fraktur ohne nennenswerten Weichteilschaden zu vergleichbaren periostalen Mikrozirkulationsstörungen kommt und ob sich das mikrovaskuläre Reaktionsmuster bei Kombination beider Verletzungen, d.h. Fraktur mit schwerem geschlossenem Weichteilschaden, weiter verschlechtert, war das Ziel der nachfolgenden Untersuchungen.

#### **4.4 Die Mikrozirkulation des Skelettmuskels und Periostes bei geschlossener Fraktur**

Die Resultate dieser Studien konnten zeigen, dass eine einfache Fraktur bereits sehr früh zu einer ausgeprägten fraktur-induzierten Störung der nutritiven kapillären Perfusion und zu einer erhöhten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion sowohl im Periost als auch im Skelettmuskel führt. Das Ausmaß dieser Mikrozirkulationsstörungen nach Fraktur war auf Ebene des Periostes vergleichbar zu denen, wie sie nach geschlossenem Weichteilschaden ohne assoziierte Fraktur beobachtet wurden.

Diese Untersuchungen konnten außerdem nachweisen, dass die kapillären Durchblutungsstörungen auch mit einer entsprechenden Akkumulation und Aktivierung von Leukozyten in postkapillären periostalen Venolen einhergehen. Diese vermehrte Leukozyten-Endothelzellinteraktion war auch in den vom diaphysären Frakturspalt entfernt gelegenen metaphysären Periostabschnitten zu beobachten. Eine zu den Resultaten unserer Experimente vergleichbare globale Störung der Periostperfusion fand sich auch in Untersuchungen, die die kortikale/periostale Durchblutung nach Fraktur mittels Laser-Doppler-Flowmetrie untersuchten (78, 80). Weiterhin kommt es durch die nach Fraktur erhöhte Sympathikusaktivität zu einer Inhomogenität der Perfusion, die insbesondere im Periost auch durch endogene Katecholaminfreisetzung reguliert wird (42).

Die geschlossene Fraktur bewirkte auch eine unterschiedliche Reaktion und damit wohl Regulation der kapillären Perfusion der Skelettmuskulatur und des Periostes nach Fraktur, da der volumetrische Blutfluss im Skelettmuskel eine Abnahme, im Periost jedoch eine Zunahme zeigte. Diese Ergebnisse legen nahe, dass es bei vergleichbaren Defiziten in der funktionellen Kapillardichte in Periost und Skelettmuskel zu einer partiellen Verschiebung des Blutflussvolumens zugunsten des Periostes kommt. Außerdem konnten diese Untersuchungen eine deutliche Vasodilatation im Bereich der postkapillären Venolen sowohl im Periost als auch im umliegenden Skelettmuskel 2h nach Fraktur belegen. Diese Dilatation postkapillärer Venolen mit konsekutiv erhöhtem venösen Blutflussvolumen bewirkt über eine Abnahme des kapillären Ausflusswiderstandes und Filtrationsdruckes auch eine entsprechend verringerte interstitielle Ödembildung. Dieses mikrovaskuläre Reaktionsmuster könnte als körpereigener Kompensationsmechanismus auf Fraktur-induzierte Störungen der nutritiven Perfusion des Periostes und Weichteilmantels interpretiert werden.

Demgegenüber haben weitere Untersuchungen zeigen können, dass eine limitierte und transiente Ischämie der periostalen Zirkulation, wie sie im Falle einer Fraktur mit partieller Zerreißung des Periostes auftritt, zu einer Hyperplasie und osteogenen Differenzierung der periostalen Zellen führt. Dieses Phänomen bzw. die Fähigkeit des Periostes, auf Minderperfusion und Ischämie mit Hyperplasie und zytomorphologisch osteogener Differenzierung zu reagieren, wurde als wichtiger Faktor für die Induktion der Frakturheilung diskutiert (159, 171, 184). Die genaue *In-vivo*-Reaktion der periostalen Mikrozirkulation auf Fraktur und zusätzlichen

Weichteilschaden sowie der quantitative Einfluß periostaler Ischämie, der zu osteogener Zelldifferenzierung und somit zur Stimulierung und nicht Inhibition der Frakturheilung führt, war jedoch bislang unbekannt.

Durch Visualisierung dieser Veränderungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie und etablierter Modelle zur mikrochirurgischen Präparation des Periostes und des Skelettmuskels wurden erstmalig in vivo diese frakturbedingten Änderungen in der Mikrozirkulation der muskuloskeletalen Weichteile quantitativ erfasst. Die getrennte quantitative Mikrozirkulationsanalyse in Periost und Skelettmuskel erlaubt ferner eine Beurteilung der fraktur-spezifischen Interaktion von Skelettmuskelperfusion einerseits und periostaler und damit ossärer Durchblutung andererseits.

Die detaillierte Kenntnis dieser Interaktion und mikrovaskulärer Faktoren in der Pathogenese von Frakturheilungsstörungen bieten neue Ansatzpunkte für das therapeutische Frakturmanagement, die neben einer Protektion des Periostes auch eine Normalisierung der umgebenden Skelettmuskelperfusion beinhalten sollte.

#### **4.5 Die Mikrozirkulation des Skelettmuskels nach Fraktur und Weichteiltrauma und ihre Bedeutung für die Biomechanik der Frakturheilung**

Zahlreiche experimentelle Untersuchungen haben versucht, die Reaktion des Weichteilmantels sowie des Periostes auf eine Fraktur und die Veränderungen durch Isolation des Periostes vom umliegenden Skelettmuskel (Einlage von Kunststoffbarrieren) oder Loslösung von der kortikalen Oberfläche (Deperiostierung) auf histologischer und zellulärer Ebene zu charakterisieren (37, 143, 182, 183, 194). Übereinstimmend zeigen diese Studien, dass die Erhaltung der muskulo-periostalen Verbindung zu gesteigertem periostalen Blutfluß und zur verbesserten Frakturheilung führt.

Die entscheidende Rolle des intakten Weichteilmantels für die Frakturheilung des kortikalen Knochens wird durch Studien unterstützt, welche Störungen der mikrovaskulären und nutritiven Funktion des umliegenden Skelettmuskels und des Periostes als einen Ansatzpunkt für die erfolgreiche experimentelle Etablierung einer Pseudarthrose-/„non-union“-Situation im Tiermodell genutzt haben. In diesen Arbeiten führte eine Ablösung der die Frakturregion umgebenden Weichteile und ein langstreckiges Stripping des Periostes zu einer atrophischen Situation mit

unzureichender und qualitativ minderwertiger Kallusbildung (5, 62). Andere tierexperimentelle Erfahrungen zeigten, dass Ablösung des Weichteilmantels und Periostes mit einer signifikanten Reduktion der Laser-Doppler-Flowmetrisch gemessenen kortikalen-ossären Perfusion vergesellschaftet ist (78).

Im Vergleich zum isolierten Weichteilschaden oder zur einfachen Fraktur führte in unseren Studien eine Kombination von Weichteiltrauma und Fraktur zu einer weiteren Akzentuierung der Mikrozirkulationsstörungen mit zunehmender Leukozytenaktivierung im Skelettmuskel. Die Zunahme der kapillären Perfusionsstörung und endothelialen Leukozytenadhärenz war vor allem zu den frühen Untersuchungszeitpunkten ausgeprägt. Jedoch zeigte sich bis zu 3 Wochen post Trauma eine Tendenz zu stärkerer Ausprägung nach kombinierter Fraktur und Weichteilschaden im Vergleich zu einfacher Fraktur. In diesem Zusammenhang und unter dem Aspekt einer reduzierten biomechanischen torsionalen Versagenslast und Energieabsorption zu 3 Wochen nach Fraktur und Weichteilschaden im Vergleich zu einfacher Fraktur lassen eine prognostische Bedeutung initialer Perfusionsstörungen hauptsächlich in der Frühphase der Frakturheilung vermuten. Unterstützt wird diese Annahme durch die Korrelation von funktioneller Kapillardichte des Skelettmuskels zum Zeitpunkt 2h nach Trauma und totaler biomechanischer Energieabsorption des Knochens zu 3 Wochen nach Trauma. Dieser funktionelle Zusammenhang spricht für eine direkte Abhängigkeit der späteren biomechanischen Stabilität des Knochens vom Ausmaß früher Mikrozirkulationsstörungen im Skelettmuskel.

Übereinstimmend mit diesen Ergebnissen wurde von Utvag et al. in einem Tiermodell einer graduell unterschiedlichen Weichteilschädigung an der Rattentibia (kein Weichteiltrauma, lokale Quetschung und segmentaler Defekt durch Exzision) eine verminderte Kallusbildung, Versagenslast und Energieabsorption 4 Wochen nach Fraktur berichtet (181). Darüber hinaus konnten die Autoren mittels Mikrosphärentechnik eine gleichzeitig verringerte Muskeldurchblutung nachweisen, ohne jedoch eine Korrelation zu den biomechanischen Parametern der Frakturheilung aufzeigen zu können.

Zusammenfassend lassen unsere Ergebnisse (154, 155) und die Resultate von Utvag und Mitarbeitern (181, 184) auf eine protrahierte Manifestation einer Mikrozirkulationsstörung und Leukozytenaktivierung in den Weichteilen als kausale

und prognostische Determinanten für die verzögerte Heilung von Frakturen mit schweren Weichteilschäden schließen.

#### **4.6 Therapie des Weichteiltraumas mit hypertonen-hyperonkotischen Lösungen**

Die unmittelbar nach Trauma einsetzende Therapie mittels hyperonkotischer-hyperosmolarer Lösungen führte im Skelettmuskel der Ratte nach geschlossener Weichteilverletzung zu einer Reduktion der nach Trauma gestörten mikrovaskulären Perfusion sowie zu einer signifikanten Abnahme der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und mikrovaskulären Permeabilität (124, 156).

In der Primärtherapie des traumatisch-hämorrhagischen Schocks haben sich hypertone-hyperonkotische Lösungen als sehr attraktiv und wirkungsvoll erwiesen (79, 81, 82, 188). Sie führen schon in relativ kleinen Mengen (4ml/kg/KG, d.h. ca. 250 ml beim Erwachsenen) zu einer sehr schnellen, jedoch vorübergehenden Wiederherstellung der Makro- und Mikrozirkulation. Die spezifischen Wirkmechanismen dieser Lösungen beim geschlossenen Weichteilschaden beruhen hauptsächlich auf einer Umverteilung des Blutflusses auf der Mikrozirkulationsebene. Infolge der Erzeugung eines osmotischen Gradienten an Zellmembranen kommt es zu einer endogenen Flüssigkeitsverschiebung aus dem interstitiellen, intrazellulären Raum (vornehmlich subendothelialen Raum, Endothelzellen und Erythrozyten) nach intravasal. Dies wird durch die signifikante Abnahme des Hämatokrits in den vorliegenden Arbeiten unterstrichen (125).

Neben einer Abnahme des Hämatokrits bei gleichzeitigem schnellem Anstieg des Plasmavolumens und der Blutfluidität kommt es vor allem zu einer Reduktion des Zellvolumens der nach traumatischer Ischämie und Schock deutlich angeschwollenen Endothelzellen mit Reduktion des hydraulischen Fließwiderstandes (105) in den Kapillaren, was wiederum durch eine signifikante Steigerung der posttraumatisch reduzierten funktionellen Kapillardichte belegt wird. Diese endogene Flüssigkeitsmobilisation konnte von Mazzoni et al. an einem Computermodell berechnet und an einem Tiermodell validiert und bestätigt werden (104).

Mit Hilfe intravitalmikroskopischer Techniken konnte darüber hinaus eine weitergehende Aussage über den Einfluss der hypertonen/hyperonkotischen

Lösungen auf die postischämische Leukozytenadhärenz am Endothel postkapillärer Venolen getroffen werden. So konnten Vollmar et al. in tierexperimentellen Untersuchungen einen Hemmeffekt hypertoner/ hyperonkotischer Lösung auf die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in den Lebersinusoiden von Ratten mit hämorrhagischem Schock nachweisen (189). Nolte et al. zeigten, dass es im Skelettmuskel nach postischämischer Reperfusion und anschließender Therapie mit hypertoner/hyperonkotischer Lösung neben einer Verminderung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion auch zu einer Abnahme der gesteigerten mikrovaskulären Permeabilität sowie einer Zunahme der funktionellen Kapillardichte als Ausdruck einer signifikanten Verbesserung der nutritiven Perfusion kommt (131).

Während für Dextran dieser anti-inflammatorische Hemmeffekt bereits in Konzentrationen, welche nicht zu einer Hämodilution führen, gezeigt werden konnte, ließ sich für Hydroxyethylstärke (HAES) bisher kein spezifischer pharmakologischer Hemmeffekt auf die Leukozytenadhärenz nachweisen (116, 164, 165). Vergleichbar der Situation nach Ischämie und Reperfusion könnte jedoch die durch hypertone Hydroxyethylstärke (HAES)-Lösungen verminderte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach Weichteiltrauma auch Folge der induzierten Hämodilution mit einer reduzierten "Margination" von Leukozyten im mikrovaskulären Fluss und konsekutiv verringertem Endothelzellkontakt sein (4, 116).

Darüber hinaus wurde untersucht, inwiefern hyperosmolare Kochsalzlösungen auch zu einer eventuellen Hemmung der Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und/oder Endothelzellen führen. *In-vitro*-Studien zeigten, dass eine Exposition von Leukozyten gegenüber hypertone Medium eine signifikante Herabregulation sowohl der L-Selectine als auch der  $\beta_2$ -Integrine bewirkt (174). Ferner könnten die durch hyperosmolare Kochsalzlösungen induzierten Veränderungen in der Flüssigkeitsverteilung und der biophysikalischen Membraneigenschaft auch an einer von der Membranfluidität abhängigen Expression bestimmter Zelladhäsionsmoleküle, wie z.B. CD 11b (148) beteiligt sein. Diese Beobachtungen könnten einen weiteren Hinweis für die in vivo beobachtete Reduktion der posttraumatischen Leukozytenadhärenz nach Applikation hypertoner/hyperosmolarer Infusionen darstellen.

Wie weitere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe haben zeigen können, bewirkt ein zusätzlicher hämorrhagischer Schock bei vorliegendem geschlossenem Weichteilschaden eine weitere Steigerung der Mikrozirkulationsstörungen. Obgleich es im Schock zu einem Abfall des Hämatokrits kommt, könnte die Steigerung der mikrovaskulären Permeabilität mit konsekutiver Hämokonzentration und nachfolgend gestörter Kapillarpassage von Erythrozyten und Leukozyten das pathomorphologische Korrelat der Zunahme des posttraumatischen kapillären Perfusionsversagens darstellen. Unabhängig von diesen, durch transendotheliale Flüssigkeitsdysbalance induzierten rheologischen Einschränkungen führt der Schock im Skelettmuskel über eine erhöhte Sympathikusaktivität zu einer Umverteilung und Inhomogenität der mikrovaskulären Perfusion (25).

Die Applikation von „small volume resuscitation“ mittels hypertoner Hydroxyethylstärke (Hyper-HAES) konnte eine teilweise Reduktion des Schock- und Weichteiltrauma-bedingten Perfusionsversagens bewirken. Als Ursache der im Schock beobachteten Immobilisation von Leukozyten im postkapillaren Segment wird, wie bei Ischämie und Reperfusion, eine gesteigerte Expression von Adhäsionsmolekülen auf Leukozyten und Endotheloberfläche angenommen (10, 169). In diesem Zusammenhang konnten Sun et al. eine Reduktion der ICAM-1-Protein-Expression nach Applikation von hypertoner Lösung im Vergleich zu konventioneller Ringer-Lactat-Lösung nachweisen. Demgegenüber fanden Pascual et al. jedoch im Cremastermuskel der Maus nach Schock und Behandlung mit hypertoner Lösung keine Abnahme der ICAM-1-Expression im Vergleich zu Ringer-Lactatlösungen (137).

Diese zum Teil divergenten Ergebnisse und die Tatsache, dass in unseren Untersuchungen nur marginale Veränderungen der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und keine komplette Restitution der Skelettmuskelmikrozirkulation und wie nach isoliertem Weichteilschaden (124) oder hämorrhagischen Schock ohne Weichteiltrauma (189, 190) erreicht werden konnten, impliziert die wesentliche Beteiligung zusätzlicher Faktoren.

#### **4.7 Reduktion des Sekundärschadens nach geschlossenem Weichteiltrauma durch N-Acetylcystein**

Mit dem Radikalfänger, Glutathionprecursor und NO-Donator S-Nitroso-N-Acetylcystein (23) konnte mit Hilfe intravitalmikroskopischer und Laser-Doppler-Flowmetrischer Techniken eine komplette Restitution der posttraumatisch gestörten nutritiven Perfusion und eine signifikante Verminderung der mikrovaskulären Permeabilität, der Leukozytenadhärenz sowie des Ödems erreicht werden. Diese Reduktion der Mikrozirkulationsstörung war mit einer signifikanten Reduktion der posttraumatisch erhöhten Kreatinkinase und einer Zunahme der Desmin-Immunreaktivität als weiteren Zeichen einer verminderten sekundären Muskelschädigung vergesellschaftet (151).

Zusätzlich zu seiner Wirkung als Sauerstoffradikalfänger sind die protektiven Effekte von N-Acetylcystein auf die Kapillarperfusion möglicherweise auch auf die Inhibition der Thrombozytenaggregation (163) zurückzuführen. Hierdurch könnte eine mikrovaskuläre Thrombusbildung gehemmt oder aber eine Reperfusion thrombosierter Kapillaren ermöglicht werden. Darüber hinaus könnte die mikrovaskuläre Perfusionsverbesserung auch über die Bereitstellung von Cystein und Disulfid-Gruppen für die Glutathionsynthese mit nachfolgender antioxidativer Protektion endothelialer Zellmembranen erreicht werden (147). Experimentelle Untersuchungen, die eine Gewebeschädigung über Lipidperoxidation durch reaktive Sauerstoffmetabolite und Proteasen aus Leukozyten im Weichteilschaden (186), Kompartmentsyndrom (139) oder nach Ischämie/Reperfusion (35, 41, 43) nachweisen, stützen diese Hypothese. In Übereinstimmung mit unseren Untersuchungen konnten van der Laan et al. nach N-Acetylcystein-Applikation eine Normalisierung der mikrovaskulären Permeabilität in einer durch freie Radikale-induzierten Skelettmuskelschädigung beobachten (186).

Weiterhin wirkt N-Acetylcystein direkt anti-inflammatorisch, da eine reduzierte Chemotaxis und Leukozytenextravasation/-migration nachgewiesen werden konnte (68, 72). Diese Eigenschaften, zusammen mit der beobachteten Reduktion der Expression von Zelladhäsionsmolekülen, sind mögliche N-Acetylcystein-spezifische Wirkmechanismen, die der reduzierten endothelialen Leukozytenadhärenz in unseren Untersuchungen zu Grunde liegen. Die kausale Bedeutung dieser

Leukozytenaktivierung für die Ausbildung des Sekundärschadens in Form von irreversiblen Myonekrosen wird durch die signifikante Korrelation der permanenten Leukozytenadhärenz und reduzierten Desmin-Immunreaktivität in unseren Untersuchungen belegt.

Es gibt weitere Hinweise dafür, dass Stickstoffmonoxid (nitric oxide; NO-System) bei der Entwicklung der posttraumatischen Mikrozirkulationsstörungen im verletzten Skelettmuskel beteiligt ist (1, 75, 121, 146). Die im Rahmen der durch Ischämie-/Reperfusion verursachten Reduktion der NO-Synthese ist eines der ersten Anzeichen endothelialer Dysfunktion.

In Untersuchungen von Lefer et al. führte die verminderte Freisetzung von aktivem NO aus dem mikrovaskulären Endothel zu einer Zunahme der Leukozytenadhärenz und zur Produktion von Superoxidradikalen (90). Diese Ergebnisse konnten bestätigt werden durch Experimente, in denen die Applikation von NO-Donatoren zu einer Verminderung (89), die Hemmung des NO-Synthetasesystems (84) dagegen zu einer Zunahme der postischämischen Leukozytenadhärenz und Freisetzung von Radikalen führte. In Übereinstimmung hiermit konnten Rubinstein et al. zeigen, dass im weiteren Verlauf die geschlossenen traumatischen Skelettmuskelverletzungen mit einer Aktivierung der induzierbaren NO-Synthetase und konsekutiv gesteigerter NO-Synthese vergesellschaftet sind (146). Diese Untersuchungen, aber auch die Studien von Chen et al., die im Skelettmuskel eine Reduktion des postischämischen Reperfusionsschadens mit Verbesserung der kontraktilen Funktion nach Applikation von N-Acetylcystein dokumentieren (23), stützen unsere Ergebnisse.

#### **4.8 Selektive Cyclooxygenase (COX)-2-Inhibition zur Therapie des geschlossenen Weichteiltraumas**

In diesen Untersuchungen führte die systemische Applikation des Cyclooxygenase (COX)-2-Hemmers Parecoxib sowohl vor als auch nach geschlossenem Weichteiltrauma zu einer effektiven Reduktion der mikrovaskulären Dysfunktion und Leukozyten-/Thrombozyten-vermittelten Entzündungsreaktion. Weiterhin konnte mittels Western-Blot-Proteinanalyse und immunhistochemischer Techniken eine temporäre Hochregulation der COX-1/ und -2-Proteinexpression nachgewiesen werden (45). Die erhöhte Expression beider COX-Isoformen nach

Weichteilverletzung spricht dabei gegen die gängige Auffassung einer vorrangigen und isolierten Steigerung der Expression der induzierbaren COX-2 bei Verletzungen (187).

Die von uns aufgezeigten protektiven Effekte nach COX-2-Inhibition auf die Thrombozytenadhärenz und -aggregation im traumatisierten Skelettmuskel stehen dabei zum Teil in Kontrast zu Studien, die keine Beeinflussung der Thrombozytenaggregation demonstrierten (133). Ergebnisse anderer Studien ließen den Verdacht einer Erhöhung des thrombogenen Risikos durch selektive COX-2-Inhibition aufkommen (8, 158). Pathophysiologischer Hintergrund ist die Verschiebung des Gleichgewichts der pro- und antithrombotischen Eikosanoide Thromboxan (TXA<sub>2</sub>) und Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>). Obwohl durch selektive COX-2-Hemmung die endotheliale Synthese des aggregationshemmenden Prostazyklin gehemmt wird, konnten weder unsere noch andere Studien (22, 65, 133, 170) vermehrt mikrovaskulär wirksame thrombogene Eigenschaften der COX-2-Inhibition nachweisen. Die zum Teil kontroversen Berichte über die Therapieeffektivität der COX-2-Inhibition weisen auf die Beteiligung anderer, von der Art der Verletzung und Zielorgan/Gewebetyp-abhängigen Faktoren hin (22, 38, 47, 65, 129, 162, 170).

Neben der Verbesserung der Durchblutung konnte die COX-2-Inhibition der durch Weichteiltrauma-induzierten Leukozytenaktivierung und Thrombozytenadhärenz entgegenwirken, die NADH-Autofluoreszenz reduzieren und die Anzahl der COX-2-exprimierenden Zellen im traumatisierten Muskel senken. Die Effektivität hinsichtlich der Reduktion der Leukozyten-/Thrombozytenadhärenz könnte Folge der bereits demonstrierten antiadhäsiven Eigenschaften der COX-2-Inhibition in Form reduzierter ICAM-1-Expression sein (70). Verminderte Immobilisation von Leukozyten im postkapillären Segment führt dann über eine Zunahme der luminalen Querschnittsfläche in den Venolen zu einer Abnahme des Abflusswiderstandes. Dadurch kommt es zu einer Reduktion des kapillären Filtrationsdruckes und damit sekundär zu verminderter Ödembildung und Mikrozirkulationsstörung.

Ausgehend von diesen Untersuchungsergebnissen sollten zukünftige Therapieschemata des geschlossenen Weichteilschadens auch selektive COX-2-Inhibition berücksichtigen. Diese Ansätze könnten einem Anstieg inflammatorisch und letztlich auch mikrovaskulär wirksamer Prostaglandine (z.B. PGE<sub>2</sub>) entgegenwirken. Die Effektivität dieser Behandlungskonzepte muss sowohl

bezüglich ihres Einflusses auf die Regeneration und resultierende Funktion des verletzten Skelettmuskels als auch hinsichtlich unerwünschter kardiovaskulärer, pulmonaler und gastrointestinaler Nebenwirkungen in experimentellen und klinischen Studien geprüft werden.