

Aus der Chirurgischen Universitätsklinik Tübingen  
Abteilung für Allgemeine Chirurgie und Poliklinik  
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. H. D. Becker

Tierexperimentelle Untersuchung zur  
Bedeutung des Stickstoffmonoxids  
bei strahleninduzierten  
Wundheilungsstörungen

**INAUGURAL-DISSERTATION**  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizin

der  
**MEDIZINISCHEN FAKULTÄT**  
der Eberhard-Karls-Universität  
zu Tübingen

vorgelegt von  
**WIEBKE WEIMER**  
aus Böblingen

2003

Dekan: Professor Dr. C. D. Claussen  
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. R. Schäffer  
2. Berichterstatter: Professor Dr. W. Budach

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>Stand der Forschung</b>	<b>3</b>
2.1.	Wundheilung	3
2.2.	Strahlentherapie	7
2.3.	Stickstoffmonoxid (NO)	9
2.3.1.	Biochemie und Physiologie des Stickstoffmonoxids	9
2.3.2.	Stickstoffmonoxidsynthasen (NO-Synthasen, NOS)	12
<b>3.</b>	<b>Fragestellung</b>	<b>17</b>
<b>4.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>18</b>
4.1.	Material	18
4.1.1.	Versuchstiere	18
4.1.2.	Chemikalien, Materialien und Geräte	18
4.2.	Methoden	18
4.2.1.	Bestrahlung	18
4.2.2.	Operation	20
4.2.3.	Materialgewinnung und Materialverarbeitung	21
4.2.4.	Messung der mechanischen Reißfestigkeit der Wunde	23
4.2.5.	Hydroxyprolinbestimmung	24
4.2.6.	Bestimmung von Nitrit und Nitrat in der Wundflüssigkeit	27
4.2.7.	Immunhistochemische Färbung	30
4.2.8.	Differentialblutbild	33
4.3.	Datenverarbeitung	33
4.3.1.	Software	33
4.3.2.	Statistische Auswertung	33

---

<b>5.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>35</b>
5.1.	Einfluss der Elektronenstrahlung und Operation auf das Körpergewicht	35
5.2.	Einfluss der Elektronenstrahlung auf das Differentialblutbild	37
5.3.	Einfluss der Elektronenstrahlung auf die Wundheilungsparameter	38
	5.3.1. Wundreißfestigkeit der frischen Hautproben	38
	5.3.2. Wundreißfestigkeit der formalinfixierten Hautproben	40
	5.3.3. Hydroxyprolinegehalt des Granulationsgewebes	42
5.4.	Einfluss der Elektronenstrahlung auf die Nitrat- und Nitritkonzentration in der Wundflüssigkeit	44
5.5.	Immunhistochemische Färbung	46
<b>6.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>50</b>
6.1.	Wundmodell	50
6.2.	Bestrahlung	52
6.3.	Gewicht im Versuchsverlauf	54
6.4.	Diagnostik des Stickstoffmonoxidstoffwechsels	55
6.5.	Stickstoffmonoxidsynthese in der Wunde	55
6.6.	Stickstoffmonoxid und seine Bedeutung in der Wundheilung	57
6.7.	Stickstoffmonoxid bei Wundheilungsstörungen	61
6.8.	Schlussfolgerung	62
<b>7.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>64</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>66</b>
<b>9.</b>	<b>Bezugsquellenverzeichnis</b>	<b>82</b>
9.1.	Versuchstiere	82
9.2.	Chemikalien und Material	82
9.3.	Operationsmaterialien	86
9.4.	Bestrahlung	87

9.5.	Laborgeräte	87
<b>10.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>89</b>
<b>11.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>92</b>
<b>12.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>93</b>

# 1. Einleitung

Die grundlegenden Aufgaben der Haut bestehen in der Aufnahme von Sinnesreizen, der Wärmeregulation und der Sicherstellung einer Schutzbarriere gegenüber Umwelteinflüssen. Kommt es zu einer Verletzung der Haut und somit zu einem Verlust ihrer Integrität, setzt der Organismus eine Kaskade von biochemischen und zellulären Reaktionen in Gang, die eine koordinierte Wundheilung erlauben.

Der Wundheilungsprozess beinhaltet eine initiale Entzündungsreaktion mit Beseitigung eingedrungener Erreger und nekrotischer Gewebeanteile sowie dem Wiederaufbau des verletzten Gewebes. Er umfasst eine komplexe Interaktion zwischen biochemischen Mediatoren (unter anderen Wachstumsfaktoren, Zytokine, Matrixmetalloproteinasen, Radikale), der extrazellulären Matrix, den Entzündungszellen und weiteren Zellpopulationen wie den Fibroblasten, Keratinozyten und Thrombozyten [56, 118, 125].

Die biochemischen Mediatoren regulieren eine Vielzahl der Abläufe des Heilungsprozesses. Eine Imbalance oder Verminderung dieser Botenstoffe kann zu Wundheilungsstörungen und chronischen Wunden führen [80].

Zu den zahlreichen Transmittern, die eine funktionale Rolle im Wundheilungsprozess tragen, wird zunehmend auch das Stickstoffmonoxid (NO) gezählt. Während die genauen Wirkmechanismen des NO bei der Wundheilung bisher ungeklärt sind, ist bekannt, dass es in Wundzellen zu einer gesteigerten Synthese des Stickstoffmonoxids kommt [3, 21, 109]. Spezifische Hemmstoffe der NO-Synthese verzögern die Wundheilung, NO-freisetzende Substanzen hingegen beschleunigen diesen Prozess [19, 58, 109, 122]. Wundheilungsstörungen infolge eines Diabetes mellitus oder einer Steroidtherapie gehen mit einer verminderten Expression des NO-bildenden Enzyms und einer herabgesetzten NO-Produktion in der Wunde einher [19, 113].

Diese Untersuchungen weisen darauf hin, dass dem Stickstoffmonoxid möglicherweise eine wichtige Bedeutung bei der Regulation der Wundheilung zukommt.

Eine prä- oder postoperative Strahlentherapie bei der Behandlung onkologischer Patienten kann Einfluss auf die normalen Mechanismen der Wundheilung nehmen, etwa durch eine Veränderung der Durchblutung oder Auswirkungen auf verschiedene Wundzellen und ihrer biochemischen Mediatoren [15, 85, 136]. Das Ausmaß der strahleninduzierten Veränderungen ist unter anderem von der Größe des chirurgischen Eingriffs und radiologischen Faktoren wie der Strahlenart, der Energiedosis oder Fraktionierung der Strahlung abhängig [119].

In der vorliegenden Arbeit soll in einer tierexperimentellen Untersuchung die Auswirkung einer präoperativen Partialkörperbestrahlung auf die Wundheilung im Zusammenhang mit der Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase und NO-Produktion in der Wunde untersucht werden.



## 2. Stand der Forschung

### 2.1. Wundheilung

Das Modell der normalen Wundheilung beinhaltet 3 Phasen: die Entzündungsphase, die Proliferationsphase und die Wundmodulation. Sie überlappen sich zeitlich in ihren Ereignissen und lassen sich daher nicht strikt voneinander trennen. Der gesamte Heilungsprozess dauert bei einem normalen Verlauf bis zu zwei Jahre.

Die Entzündungsphase umfasst die ersten drei bis vier Tage nach Verletzung. In ihr kommt es zur Entzündung der Wunde und zur Mobilisierung der Zellen, die das Granulationsgewebe bilden. Der eigentlichen Entzündungsphase geht die Blutgerinnung voraus. Blut und Plasma treten aus den verletzten Gefäßen aus. Die Freisetzung von Gewebsthromboplastin und die Thrombozytenadhäsion an freigelegte Kollagenfasern aktivieren die Gerinnungskaskade. Es kommt zur Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation und -degranulation. Das gebildete Blutgerinnsel schützt die Wunde vor weiterer Kontamination und Flüssigkeitsverlust. Fibrin verklebt und deckt das Wundareal ab und dient einwandernden Wundzellen als Leitschiene. Die Wunde erreicht in dieser Phase weniger als 5% der Reißfestigkeit eines normalen Gewebes [72].

Die Thrombozytendegranulation bewirkt die Freisetzung von chemotaktischen Wachstumsfaktoren wie PDGF (Platelet-derived growth factor), IGF-1 (Insulin-like growth factor-1), EGF (Epidermal growth factor) und TGF- $\beta$  (Transforming growth factor- $\beta$ ).

Lokale Hyperämie, gesteigerte Permeabilität der Kapillarendothelien und chemotaktische Faktoren bewirken eine ödematöse Durchtränkung und das Einwandern von neutrophilen Granulozyten, Monozyten bzw. Makrophagen und Lymphozyten in das traumatisierte Gewebe.

Als erster Zelltyp wandern die neutrophilen Granulozyten in das Wundgebiet ein. Sie produzieren proinflammatorische Zytokine wie TNF- $\alpha$  (Tumour necrosis factor- $\alpha$ ) und

Interleukine (II), inaktivieren eingedrungene Erreger und setzen Proteasen frei (z.B. Elastase, Kollagenase), die nekrotisches Wundmaterial abbauen.

Ihnen folgen die im Blutkreislauf zirkulierenden Monozyten, die beispielsweise durch TGF- $\beta$  chemotaktisch angezogen in das Wundareal einwandern und zu aktivierten Makrophagen differenzieren. Die Makrophagen spielen eine entscheidende Rolle im Wundheilungsprozess [69]. Sie setzen ebenfalls proinflammatorische Zytokine (TNF- $\alpha$ , Il-1, Il-6, Il-8, Il-10) frei, sind an der Abwehr von Mikroorganismen beteiligt und sorgen für den Abbau nekrotischen Gewebes. Zusätzlich synthetisieren und sezernieren sie zahlreiche Wachstumsfaktoren wie TGF- $\beta$ , PDGF, EGF, bFGF (Basic fibroblast growth factor), VEGF (Vascular endothelial growth factor) und andere Faktoren wie das Stickstoffmonoxid.

Nach den neutrophilen Granulozyten und Makrophagen wandern schließlich die Lymphozyten in das Wundareal ein. Sie produzieren Interleukine, TNF- $\alpha$  und IFN- $\gamma$  (Interferon- $\gamma$ ) und nehmen an der Regulation der Synthese der Extrazellulärmatrix teil [8, 33, 117].

Die Wachstumsfaktoren üben häufig nicht nur einen spezifischen Effekt aus, sondern haben vielfältige, konzentrationsabhängige Funktionen und Auswirkungen auf die Zellen und die extrazelluläre Matrix [147]. Sie stimulieren Fibroblasten, Epithel- und Gefäßendothelzellen zur Proliferation und Migration in den verletzten Bereich.

Bereits in der Entzündungsphase wird mit der Synthese einer provisorischen extrazellulären Matrix begonnen, die überwiegend aus Fibrin, Fibronectin und Glykosaminoglykanen besteht.

Die Entzündungsphase stellt den Abschnitt der Wundheilung dar, der am sensibelsten auf eine Chemotherapie oder Strahlentherapie reagiert [31].

Die Proliferationsphase beginnt etwa am dritten Tag nach der Gewebeerstörung. Während der Proliferationsphase steht die Bildung des Granulationsgewebes im Vordergrund. Sie steht ebenfalls unter der Regulation der Makrophagen und ihrer zahlreichen Botenstoffe.

Die Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen proliferieren verstärkt und können dabei ihren Phänotyp verändern. Die Wundfibroblasten zeigen gegenüber normalen

Hautfibroblasten eine gesteigerte Kollagenbildung und erhöhte Fähigkeit zur Wundkontraktion, gleichzeitig aber eine Abnahme der Proliferationstätigkeit [100]. Die Fibroblasten steigern ihre Kollagensynthese, die Kollagenfasern beginnen auszureifen und es kommt zur Herstellung einer ersten Kontinuität des Bindegewebes. Die basalen Keratinozyten des Wundrandes proliferieren verstärkt und wandern in Richtung Zentrum des Defektes, bis die Wiederherstellung einer geschlossenen Epidermis erreicht ist. Die Angiogenese und die Formation der Kapillaren schreitet voran. Myofibroblasten erscheinen im Wundbild und produzieren kontraktile Elemente, welche die Wundkontraktion stimulieren und die Distanz des Gewebedefektes verringern. Die Zahl der Entzündungszellen nimmt ab. Fibroblasten, Endothelzellen und Keratinozyten beginnen nun ihrerseits eine Vielzahl an Wachstumsfaktoren zu synthetisieren, die die Proliferation, die Matrixsynthese und die Angiogenese weiter stimulieren [80].

Vier Wochen nach Verletzung erreicht die Wundreißfestigkeit ungefähr 30% des Normalwertes [72].

Der Entzündungs- und Proliferationsphase schließt sich die Wundmodulation an, die mehrere Monate andauern kann.

Diese Phase ist gekennzeichnet durch eine Zunahme der Wundfestigkeit und Bildung des definitiven Narbengewebes. Die Zelldichte und die Vaskularisation der Wunde nehmen allmählich ab. Die Keratinozyten differenzieren vollständig aus. Die Kollagenfasern reifen durch zusätzliche Quervernetzungen und richten sich entsprechend der Zugkraft im Gewebe aus [31]. Der anfänglich in der Wunde dominierende Kollagen-Typ III weicht zugunsten des Typ I-Kollagen, das in älteren Wunden und normalem Gewebe etwa 90 % des Gesamtkollagens ausmacht. Es stellt sich ein Gleichgewicht zwischen Synthese der Komponenten des Narbengewebes und ihrem Abbau durch Proteasen ein. Die Matrixmetalloproteinasen (MMP, z.B. Kollagenasen, Gelatinasen, Stromelysine) nehmen unter den Proteasen die wichtigste Rolle in der Wundheilung ein [90].

Zwei Jahre nach Verletzung erreicht die Wundreißfestigkeit ungefähr 80 % der Stärke eines normalen Gewebes [72].

Das komplizierte Zusammenspiel von Botenstoffen, Wundzellen und extrazellulärer Matrix bei der normalen Wundheilung lässt die große Angriffsfläche erkennen, die dieser Prozess für pathologische Veränderungen bietet. Den Wundheilungsstörungen scheint ein Ungleichgewicht stimulierender und hemmender Faktoren zugrunde zu liegen. Anhaltende Transsudation, Infiltration und Proliferation führen zu einem Entzündungsreiz und nachfolgend zu einer kompromittierten Heilung. Intakte Stoffwechselbedingungen sind eine Voraussetzung für den erfolgreichen Heilungsvorgang. Kommt es zu einer Beeinträchtigung des Stoffwechsels, etwa bei arteriellen und venösen Durchblutungsstörungen oder Neuropathien der Extremitäten, entstehen Wundheilungsstörungen, die unbehandelt häufig zu chronischen Wunden führen. Weitere Risikofaktoren stellen Eiweißmangelzustände, Tumorerkrankungen, der Diabetes mellitus, die Immunsuppression, Glukokortikoid- und Zytostatikatherapien sowie die Strahlentherapie in der onkologischen Behandlung dar.

## 2.2. Strahlentherapie

Vor über 100 Jahren begann die Geschichte der Radiologie und Strahlentherapie, als 1895 Wilhelm Conrad Röntgen die nach ihm benannten Strahlen entdeckte. Bereits kurze Zeit nach der Entdeckung erfolgten die ersten Anwendungen ionisierender Strahlen in der Therapie von Erkrankungen. Heute gehört die Strahlentherapie neben der Chirurgie und Chemotherapie zu den wichtigsten Behandlungsmodalitäten der kurativen und palliativen Krebsbehandlung [131]. Ziele der präoperativen Radiotherapie sind die Verbesserung der Abgrenzbarkeit und Verkleinerung des Tumors, die Zerstörung bereits vorhandener Tumorausläufer, die Devitalisierung der Tumorzellen sowie eine Verminderung der intraoperativen Tumorzellverschleppung [108].

Die Strahlenauswirkung auf ein Gewebe ist von einer Vielzahl an Faktoren abhängig [102, 132]. Neben der verwendeten Strahlenart und ihrer relativen biologischen Wirksamkeit (RBW) sind auf zellulärer Ebene der Differenzierungsgrad, die Proliferationsaktivität und die Zellzyklusphase von Bedeutung. Die G<sub>2</sub>-Phase und die Mitose des Zellzyklus gelten neben einer hohen Proliferationsaktivität und einem geringen Differenzierungsgrad der Zellen als besonders strahlensensibel. Ein steigender Sauerstoffgehalt des Gewebes erhöht seine Anfälligkeit gegenüber ionisierender Strahlung. Zudem entscheidet das Ursprungsgewebe, die Gefäßversorgung und die Zahl der zu inaktivierenden Zellen über die Strahlenempfindlichkeit eines Tumors.

Infolge des Eindringens ionisierender Strahlung in ein Gewebe kommt es zur Wechselwirkung mit der durchstrahlten Materie. Die strahlenbiologische Wirkung entfaltet sich über die Anregung und Ionisation von Molekülen, die direkt oder indirekt zu Molekülschäden führen. Die direkte Strahlenwirkung an organischen Molekülen wie den Proteinen und Nukleinsäuren entsteht durch den strahlenbedingten Verlust von Bindungselektronen und der damit verbundenen Freisetzung von Energie, was zu einem lokalen Zellschaden führen kann. Die indirekte Strahlenwirkung wird durch die Entstehung von Radikalen oder Peroxyden verursacht, die ihrerseits mit organischen Makromolekülen reagieren und lockere Elektronenbindungen aufbrechen können.

Die direkte und indirekte Strahlenwirkung kann in Proteinen Molekülbrüche, Dekarboxylierungen, Desaminisierungen und Änderungen der Sekundär- und Tertiärstruktur bewirken. Durch hohe Bestrahlungsdosen kann eine Enzymaktivierung hervorgerufen werden. Die bedeutsamsten Veränderungen der Nukleinsäuren stellen die Einzel- und Doppelstrangbrüche dar [75]. In der Folge treten morphologische und funktionelle Veränderungen wie Mutationen, Chromosomenaberrationen, eine Beeinträchtigung des Stoffwechsels und die Induktion maligner Tumoren oder des Zelltodes auf [102].

Zu den frühen Strahlenreaktionen der Haut wird das Strahlenerythem und die trockene oder feuchte Hautschuppung gezählt. Mögliche Komponenten der späten Strahlenreaktion sind eine verminderte oder gesteigerte Pigmentierung der Haut und die Entstehung von Teleangiectasien. Weiterhin kann es zu einer Fibrose und Atrophie des Gewebes, schlimmstenfalls zu Nekrosen und einer Tumorinduktion kommen [15].

Die Wundheilung kann durch Bestrahlung grundlegend beeinträchtigt werden [14, 18, 142]. Eine radiogen induzierte Verletzung der Haut und des subkutanen Gewebes führt zu einer Veränderung der Vaskularisation und Beeinträchtigung der proliferativen und synthetischen Leistungen von Hautparenchymzellen wie den Fibroblasten [136]. Wundheilungsstörungen infolge einer Radiotherapie sind das Resultat eines multifaktoriellen, pathologischen Prozesses, der bisher nur ungenügend verstanden wird.

## 2.3. Stickstoffmonoxid (NO)

1980 entdeckten Furchgott und Zawadzki, dass Acetylcholin nur dann zu einer Gefäßrelaxation führt, wenn intakte Endothelzellen vorhanden sind. Sie folgerten daraus, dass die Kontraktion der Gefäßmuskelzellen durch ein Signalmolekül des Endothels reguliert wird und benannten diesen unbekanntes Botenstoff „endothelium-derived relaxing factor“, kurz EDRF [40]. Erst 1987 konnte bewiesen werden, dass das zuvor nur als Umweltgift bekannte Gas Stickstoffmonoxid (NO) in den Zellen von Säugetieren produziert wird. Zwei voneinander unabhängige Forschungsgruppen identifizierten den körpereigenen, gefäßerweiternden Stoff EDRF als Stickstoffmonoxid [57, 91]. Kurz darauf wurde die Bedeutung des NO als Regulator der Thrombozytenaggregation [41], als Neurotransmitter [44] und Effektormolekül der Immunabwehr [55, 82, 134] bekannt. Studien konnten belegen, dass die Aminosäure L-Arginin und molekularer Sauerstoff ( $O_2$ ) im Organismus mittels des Enzyms Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) zu gasförmigem NO und L-Citrullin reagieren [92, 106]. Seitdem ist eine Vielzahl an physiologischen und pathophysiologischen Prozessen im Organismus bekannt geworden, in die NO involviert ist. So kann nicht nur ein NO-Mangel, sondern auch eine NO-Überproduktion an der Pathogenese von Krankheiten beteiligt sein. Die Erkenntnis, dass ein gasförmiges Radikal als Botenstoff fungiert, löste eine Welle von neuen wissenschaftlichen Erkenntnissen und therapeutischen Interventionen in zahlreichen Teilgebieten der Medizin aus, die bis heute anhält.

### 2.3.1. Biochemie und Physiologie des Stickstoffmonoxids

Stickstoffmonoxid ist in den Zellen der Säugetiere weit verbreitet und weist ein großes Repertoire an Eigenschaften und Funktionen auf [1]. Es ist ein strukturell einfach gebautes Molekül aus einem Sauerstoff- und einem Stickstoffatom, das unter Atmosphärendruck gasförmig ist. NO ist ein Radikal mit einem ungepaarten Elektron und hat aufgrund seiner Reaktionsfreudigkeit, z.B. mit Sauerstoff und Metallionen, eine Lebensdauer von nur wenigen Sekunden. Aus diesem Grund wirkt NO als auto- oder parakriner Mediator vor allem am Ort seiner Entstehung. Im Gewebe oxidiert es rasch

zu Nitrat ( $\text{NO}_3^-$ ), Nitrit ( $\text{NO}_2^-$ ) und Peroxynitrit ( $\text{ONOO}^-$ ). Neben seiner Reaktionsfreudigkeit wird die Wirkung von Stickstoffmonoxid durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus limitiert, wobei das gebildete NO die Aktivität der NO-Synthase auf Proteinebene hemmt [6]. Außerdem kann die NO-Produktion durch einen Mangel an Substraten der Reaktion (z.B. L-Arginin, NADPH) eingeschränkt sein.

Stickstoffmonoxid bindet im Plasma an Albumin oder Glutathion in Form von stabilen Nitrothiolgruppen und wird so vor der vorzeitigen Inaktivierung geschützt [130]. Zudem kann es nach Bindung an Hämoglobin in Form von S-Nitrosohämoglobin im Blutkreislauf zirkulieren, ohne vorzeitig deaktiviert zu werden [59, 139].

Aufgrund seiner geringen Molekulargröße und Löslichkeit sowohl in Wasser als auch in Fett kann Stickstoffmonoxid ungehindert durch Zellmembranen diffundieren [1] und seine Wirkung schnell und unabhängig von Membrankanälen und Rezeptoren entfalten. Eine Zusammenfassung wichtiger, bisher erforschter Schlüsselenzyme, die durch NO reguliert werden, und seiner molekularen Wirkmechanismen zeigt die Tabelle 1.

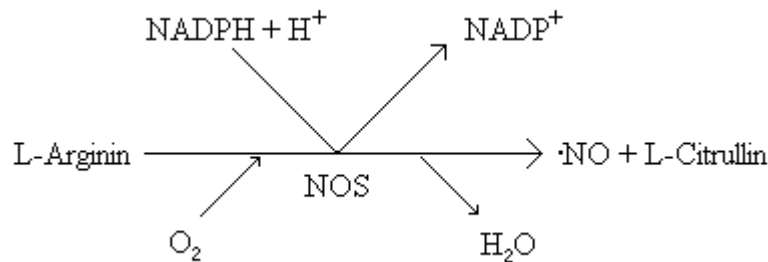


ZIELMOLEKÜL	WIRKUNG	FOLGE
<b>1. Eisenhaltige Proteine</b>		
- <i>Lösliche Guanylatzyklase</i>	Erhöhung der Enzymaktivität	cGMP-Produktion erhöht, dadurch Vasodilatation, Hemmung der Thrombozytenaggregation, Neurotransmission.
- <i>Enzyme der Atemkette und des Zitratzyklus</i>	Hemmung des Energiestoffwechsels	Zytotoxizität/Bakterizidie
- <i>Zyclooxygenasen</i>	Erhöhung der Enzymaktivität	Gesteigerte Prostaglandinsynthese
- <i>Hämoglobin</i>	Bildung von Met-Hb Bildung von S-Nitroso-Hb	Bei Met-Hb-Bildung: Inaktivierung von NO durch Oxidation zu Nitrat/Nitrit. S-Nitroso-Hämoglobin: Endogener NO-Donator
- <i>Ribonukleotid-Reduktase</i>	Hemmung der Enzymaktivität	Hemmung der DNS-Synthese Zytotoxizität/Bakterizidie
- <i>ADP-Ribosyltransferase</i>	Erhöhung der Enzymaktivität	Hemmung der Glykolyse
- <i>Ferritin</i>	Freisetzung von Eisenionen	Bildung von Sauerstoffradikalen begünstigt
<b>2. Superoxid-Anionen</b>	Bildung von Peroxynitrit	Inaktivierung von Sauerstoffradikalen, andererseits Entstehung von Hydroxyl-Radikalen Zytotoxizität/Bakterizidie
<b>3. Nukleinsäuren</b>	Nitrosylierung der Nukleinsäuren	Mutagenität Zytotoxizität/Bakterizidie
<b>4. Schwefelhaltige Aminosäuren und Proteine</b>	Bildung von S-Nitroso-Aminosäuren bzw. Proteinen	Endogene NO-Donatoren

**Tab. 1:** Übersicht der NO-regulierten Schlüsselenzyme und Wirkmechanismen des Stickstoffmonoxids im Organismus.

### 2.3.2. Stickstoffmonoxidsynthasen (NO-Synthasen, NOS)

Endogen wird Stickstoffmonoxid (NO) aus der Aminosäure L-Arginin unter Verbrauch von molekularem Sauerstoff ( $O_2$ ) und Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat ( $NADPH + H^+$ ) gebildet. Dabei entsteht neben NO auch L-Citrullin.



**Abb.1:** Die Reaktion der NO-Synthase

Diese Reaktion wird durch Stickstoffmonoxidsynthasen katalysiert, von denen bis heute 3 Isoformen bekannt sind. L-Arginin ist dabei das einzige physiologische Substrat der Reaktion, das den Stickstoff für die NO-Synthese liefert. Die enzymatische Reaktion besteht in einem Transport von fünf Elektronen. Die NO-Synthasen benötigen Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat (NADPH), Flavinmononucleotid (FMN), Flavinadenin-dinucleotid (FAD), Tetrahydrobiopterin ( $BH_4$ ) und Protoporphyrin IX als Kofaktoren. Der Bereich der NO-Synthase, der die Bindungsstellen für FAD, FMN und NADPH trägt, hat große Ähnlichkeit mit der Struktur des Enzyms Cytochrom P-450 [16].

Bisher unterscheidet man zwei Typen der Stickstoffmonoxidsynthase, die induzierbare NO-Synthase (iNOS, Typ II) und die konstitutive NO-Synthase (cNOS), zu der die endotheliale NOS (eNOS, Typ III) und die neuronale NOS (nNOS, Typ I) zählen.

Die drei Isoformen der NO-Synthase (nNOS, iNOS, eNOS) sind unterschiedliche Proteine, die verschiedenen Genloci zugeordnet werden können. Beim Menschen ist die eNOS auf Chromosom 7 [79], die nNOS auf dem Chromosom 12 [87] und die iNOS auf Chromosom 17 [22] lokalisiert. Die Isoformen gleichen sich in ihrer Aminosäuresequenz in nur 52-58 %.

Bei der eNOS und nNOS verschiedener Spezies beträgt die Übereinstimmung der Aminosäuresequenz über 90 %, bei der iNOS über 80 % [36].

Die NO-Synthasen werden zellspezifisch exprimiert und unterscheiden sich in der Art ihrer Aktivierung und Regulation [36].

Die Aktivität dieser Enzyme lässt sich kompetitiv durch Strukturanaloga des L-Arginin, z.B. L-NMMA (L-N<sup>G</sup>-Monomethyl-Arginin), hemmen. Andererseits können NO-freisetzende Substanzen (z.B. Molsidomin, S-Nitroso-N-Acetyl-Pencillamin) zur Erhöhung der Stickstoffmonoxidkonzentration *in vivo* eingesetzt werden. Das natürliche Substrat L-Arginin kann zur Stimulation der endogenen NO-Produktion substituiert werden.

#### **2.3.2.1. Die konstitutiven Stickstoffmonoxidsynthasen (cNOS)**

Die NO-Freisetzung der konstitutiven NO-Synthasen (cNOS) wird durch Beeinflussung der Enzymaktivität gesteuert. Die konstitutiven NO-Synthasen sind permanent in den Zellen vorhanden und werden durch Erhöhung der zytoplasmatischen Kalziumkonzentration aktiviert. Das Kalzium bindet sich an das Protein Calmodulin, welches die Wirkung von intrazellulärem Ca<sup>2+</sup> als Second messenger vermittelt. Dieser Ca<sup>2+</sup>-Calmodulin-Komplex lagert sich an die NO-Synthase an und initiiert damit die Produktion von Stickstoffmonoxid. Die cNOS bildet im Vergleich zur iNOS relativ geringe Mengen Stickstoffmonoxid (piko- bis nanomolarer Bereich) und die Produktion hält nur für den Zeitraum der Kalziuserhöhung im Zytoplasma an (Sekunden bis Minuten) [114]. Die konstitutiven NO-Synthasen haben u.a. homöostatische Regulationsaufgaben für die Durchblutung, die Thrombozytenfunktion und die Signalübertragung im Nervensystem.

Die Aktivierung der eNOS in den Gefäßendothelzellen kann durch unterschiedliche Faktoren wie Acetylcholin, Bradykinin, Histamin und Adenosindiphosphat (ADP) sowie Hypoxie und Endothelzelldehnung [88, 151] erfolgen. Der Kalziueinstrom führt zur Synthese von NO, welches in den benachbarten Gefäßmuskeln über die Aktivierung der löslichen Guanylatzyklase die Bildung von zyklischem Guanosinmonophosphat (cGMP) auslöst. cGMP seinerseits aktiviert Proteinkinasen, die

durch Senkung der intrazellulären Kalziumkonzentration die Relaxation der Gefäßmuskelzellen induzieren und eine Vasodilatation bewirken [1].

Im ZNS wirkt NO als sekundärer Neurotransmitter. Das durch Aktionspotentiale freigesetzte Glutamat bindet an den postsynaptischen N-Methyl-D-Aspartat-(NMDA)-Rezeptor. Dies führt zu einem Kalziumeinstrom, der die Bildung von Stickstoffmonoxid durch die neuronale NO-Synthase induziert. NO diffundiert zu benachbarten Zielzellen mit Guanylatzyklase-Aktivität und kann hier zum Anstieg des cGMP-Spiegels führen [127].

#### **2.3.2.2. Die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS)**

In der vorliegenden Arbeit wurde die induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS, Typ II) untersucht.

Die Enzymaktivität der induzierbaren NO-Synthase ist praktisch unabhängig von der intrazellulären Kalziumkonzentration, da Calmodulin bereits fest an die iNOS gebunden ist. Sie wird erst nach Stimulation, etwa durch Exo- und Endotoxine oder Zytokine (z.B. Lipopolysaccharid, TNF- $\alpha$ , INF- $\gamma$ , IL-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$  und IL-2), durch de-novo-Proteinsynthese gebildet. Damit ist die Regulation der iNOS von der Rate der Enzymneubildung und den Konzentrationen des Arginins sowie der verfügbaren Kofaktoren abhängig. Die iNOS bildet Stickstoffmonoxid in wesentlich höheren Mengen (nano- bis mikromolarer Bereich) und über einen längeren Zeitraum hinweg (Stunden bis Tage) als die konstitutiven NO-Synthasen [114]. Glukokortikoide und Zytokine wie TGF- $\beta$ , Interleukin-4 und Interleukin-10 hemmen die Expression der induzierbaren NO-Synthase. Gebildet werden kann sie in fast allen Körperzellen. Hervorzuheben sind hier die Monozyten/Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und Fibroblasten.

Die induzierbare NO-Synthase weist je nach Herkunftszelle Unterschiede auf. So fand man in humanen Hepatozyten eine induzierbare NO-Synthase, die teilweise Ca<sup>2+</sup>-abhängig ist [45] und in Kaninchen-Chondrozyten eine Ca<sup>2+</sup>-abhängige iNOS, die zudem nicht durch Glukokortikoide supprimierbar ist [93]. Die bisher beschriebenen induzierbaren NO-Synthasen haben eine Übereinstimmung der Aminosäuresequenz von ca. 80 % [45].

Im Rahmen der Immunabwehr wird Stickstoffmonoxid in relativ hohen Mengen durch die iNOS in Makrophagen gebildet. Die zyto- und bakteriotoxischen Wirkungen des NO beruhen hierbei auf einer Inaktivierung der Enzyme des Energiestoffwechsels, der Schädigung der Nukleinsäuren und der Bildung von Peroxynitrit und Hydroxyl-Radikalen.

Infolge einer Gewebsverletzung kommt es zu einer gesteigerten Expression der induzierbaren NO-Synthase und Produktion von Stickstoffmonoxid in Entzündungszellen, Fibroblasten, Keratinozyten und Endothelzellen [3, 21, 54, 111, 134]. Die erhöhte lokale Stickstoffmonoxidproduktion scheint den normalen Wundheilungsprozess positiv zu beeinflussen. So verzögern lokal oder systemisch verabreichte NO-Inhibitoren die Heilung chirurgischer Wunden [19, 58, 109], wohingegen lokal applizierte NO-Donatoren diesen Prozess fördern [122]. Bei Wundheilungsstörungen infolge eines Diabetes mellitus oder einer Steroidtherapie ist die NO-Produktion in der Wunde nachweislich supprimiert [19, 113]. Knock-out-Mäuse, welchen das Gen für die induzierbare NO-Synthase fehlt, weisen Wundheilungsstörungen auf, die sich durch einen Transfer des betreffenden Gens aufheben lassen [152]. Gesichert scheint, dass die iNOS-Expression und NO-Produktion zur Kollagensynthese und Steigerung der mechanischen Festigkeit in Wunden beiträgt [109].

Die genauen Mechanismen, durch die das Stickstoffmonoxid auf molekularer Ebene in den Wundheilungsablauf eingreift, sind bislang nicht bekannt. Ebenso ist völlig unklar, ob seine Wirkung direkt oder indirekt über Freisetzung anderer Mediatoren erfolgt.

In den verschiedenen Regulationsmechanismen der NO-Synthasen, den quantitativen Unterschieden der NO-Produktion und dem zellulären Verteilungsmuster der drei Enzym-Isoformen erklärt sich die Vielfältigkeit und manchmal auch scheinbare Widersprüchlichkeit der Wirkung des Stickstoffmonoxids.

ENZYM-TYP	EIGENSCHAFTEN	WIRKUNG UND BEDEUTUNG DES STICKSTOFFMONOXIDS
<b>Konstitutive NOS (cNOS)</b>		
<i>eNOS</i> (Typ III)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zuerst in Endothelzellen identifiziert</li> <li>- konstitutiv</li> <li>- Ca<sup>2+</sup>-abhängig</li> <li>- <b>basale Aktivität:</b> niedrig</li> <li>- <b>stimulierte Aktivität:</b> kurzdauernd, niedrig</li> <li>- <b>Vorkommen:</b> u.a. Endothelzellen, Thrombozyten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Vasodilatation</li> <li>- Antithrombotischer Effekt: Hemmung der Thrombozytenadhäsion, -aggregation, -aktivierung</li> </ul>
<i>nNOS</i> (Typ I)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zuerst in Neuronen identifiziert</li> <li>- konstitutiv</li> <li>- Ca<sup>2+</sup>-abhängig</li> <li>- <b>basale Aktivität:</b> niedrig</li> <li>- <b>stimulierte Aktivität:</b> kurzdauernd, niedrig</li> <li>- <b>Vorkommen:</b> u.a. Neurone, Skelettmuskel, glatte Muskelzellen</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Neurotransmitter im ZNS</li> <li>- Neurotransmitter von nicht-adrenergen, nicht-cholinergen Nervenfasern</li> <li>- Neurotoxizität</li> </ul>
<b>Induzierbare NOS (iNOS)</b>		
<i>iNOS</i> (Typ II)	<ul style="list-style-type: none"> <li>- zuerst in Makrophagen identifiziert</li> <li>- induzierbar durch Exotoxine, Endotoxine und Zytokine</li> <li>- Ca<sup>2+</sup>-<u>un</u>abhängig</li> <li>- <b>basale Aktivität:</b> keine</li> <li>- <b>stimulierte Aktivität:</b> andauernd, hoch</li> <li>- <b>Vorkommen:</b> u.a. Monozyten/ Makrophagen, Hepatozyten, glatte Muskelzellen, Fibroblasten</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>- Unspezifisches Immunsystem: Zytotoxizität, Tumortoxizität und Bakterizidie</li> <li>- Spezifisches Immunsystem: Lymphozytenfunktion</li> <li>- Kreislaufsituation bei der Sepsis</li> <li>- Chronisch-entzündliche Darmerkrankungen</li> <li>- Autoimmunkrankheiten</li> <li>- Regulation der Extrazellulärmatrix bei Reparationsvorgängen der Wundheilung</li> </ul>

**Tab. 2:** Übersichtstabelle der Stickstoffmonoxidsynthasen

### 3. Fragestellung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, im Tierversuch die Auswirkung einer präoperativen Teilkörperbestrahlung durch 4 MeV-Elektronen (in Dosen von 12 Gy bzw. 24 Gy versus scheinbestrahlte Kontrollgruppe) auf die akuten Wundheilungsprozesse, insbesondere den NO-Metabolismus der Wunde, zu untersuchen.

Zunächst wurden zwei Standardparameter der Wundheilung, die mechanische Wundreißfestigkeit und der Hydroxyprolinegehalt des Granulationsgewebes (Index der Kollagensynthese), analysiert. Das Ergebnis der Wundheilung sollte im Zusammenhang mit dem Ausmaß der Stickstoffmonoxidsynthese in der Wunde betrachtet werden. Hierzu wurden die stabilen Oxidationsprodukte des Stickstoffmonoxids, Nitrat und Nitrit, in der Wundflüssigkeit bestimmt. Zusätzlich wurde eine immunhistochemische Färbung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase im Granulationsgewebe der Wunden durchgeführt, um Auskunft über die Expression des NO-bildenden Enzyms in den Zellen zu erhalten.

Die Untersuchungen konzentrierten sich auf den 10. postoperativen Tag.

Im einzelnen wurden folgende Fragen näher untersucht:

- a) Welche Auswirkung hat die Teilkörperbestrahlung auf die mechanische Wundreißfestigkeit und den Hydroxyprolinegehalt des Granulationsgewebes (Index der Kollagensynthese) chirurgischer Wunden?
- b) Welchen Einfluss hat die Partialkörperbestrahlung auf den Nitrat- und Nitritgehalt der Wundflüssigkeit?
- c) Inwieweit lässt die immunhistochemische Untersuchung auf Expression der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) im Granulationsgewebe der Versuchsgruppen Unterschiede erkennen?

## **4. Material und Methoden**

### **4.1. Material**

#### **4.1.1. Versuchstiere**

Der Tierversuch wurde vom Regierungspräsidium Tübingen genehmigt. Als Versuchstiere wurden männliche Albinoratten vom Stamm Sprague-Dawley (Fa. Charles River, Sulzfeld, Deutschland) mit einem Gewicht von 200–250 g verwendet. Die Tiere hatten Zugang zu Wasser und Standard-Trockenfutter und waren zu zweit in einem Käfig unter standardisierten Bedingungen (12 Stunden Tag-Nacht-Zyklus, 22°C Raumtemperatur) untergebracht. Vor Versuchsbeginn ließ man die Tiere eine Woche im Tierstall akklimatisieren und beobachtete und wog sie während des Versuchs regelmäßig. Es wurden drei Versuchsgruppen gebildet, die in einer scheinbestrahlten Kontrollgruppe (n = 11) und zwei bestrahlten Gruppen mit einer Energiedosis D von 12 Gy beziehungsweise 24 Gy (jeweils n = 10) bestanden. Die Tiere wurden den Versuchsgruppen zufällig zugeteilt.

#### **4.1.2. Chemikalien, Materialien und Geräte**

Die verwendeten Chemikalien, Materialien und Geräte sind im Bezugsquellenverzeichnis (Kapitel 9) zusammengestellt.

### **4.2. Methoden**

#### **4.2.1. Bestrahlung**

Die Bestrahlung der Versuchstiere erfolgte in der Abteilung für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Tübingen in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. med. W. Budach. Die Versuchstiere wurden durch intraperitoneale Injektion mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (15 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert und zur Bestrahlung in einen eigens angefertigten Plexiglasbehälter gelegt. Der Behälter war in drei Fächer unterteilt (Maße pro Fach: 5,5 × 18 × 9 cm) und erlaubte somit die



gleichzeitige Bestrahlung von drei Tieren. Man lagerte die Ratten in einem 45°-Winkel auf die rechte Körperseite mit dem Bauch nach unten, um ein Areal lateral der Wirbelsäule unter Aussparung derselben zu bestrahlen und damit das Knochenmark zu schonen. Die Bestrahlung erfolgte durch einen Linearbeschleuniger mit 4 MeV-Elektronen. Zur Eichung der Elektronenstrahlung und Bestimmung der Dosis-Tiefenkurve bei konstantem Abstand von der Strahlenquelle zum Zielobjekt wurden Messungen für ansteigend dicke Plexiglasschichten durchgeführt. Die Aufzeichnungen wurden durch Mikrodensitometrie analysiert. Vor Beginn der Bestrahlung maß man die Arbeitsleistung des Beschleunigers an der Position des zentral gelagerten Tieres und verwandte diese Daten zur Bestimmung der applizierten Energiedosis und Bestrahlungszeit. Der Abstand zwischen Strahlenquelle und Hautoberfläche betrug 100 cm, das Bestrahlungsfeld hatte eine Größe von  $25 \times 25$  cm. Das Bestrahlungsgebiet wurde mit einer Plexiglasplatte von 3 mm Dicke abgedeckt, um den Bereich der Maximaldosis  $D_{\max}$  in der Haut auf 3 mm Tiefe anzuheben. Die Plexiglasplatte hatte dabei direkten Kontakt zur Hautoberfläche. Unter diesen Bedingungen sank die Energiedosis bei einer Tiefe von 11 mm auf 50 % und bei einer Tiefe von 14 mm auf 0 % der ursprünglichen Maximaldosis. Zur weiteren Begrenzung des Bestrahlungsgebietes wurde eine maßgefertigte Bleiplatte von 1,5 cm Dicke aufgelegt, die eine Aussparung von  $4 \text{ cm} \times 10 \text{ cm}$  Größe pro Tier aufwies. Das bestrahlte Areal auf dem Rücken der Tiere wurde für die spätere Operation mit wasserfesten Stiften markiert. Die Partialkörperbestrahlung erfolgte mit einer Dosisrate von 2 Gy/min. Die Einheit Gray (Gy) steht für die absorbierte Energiedosis von einem Joule/kg. Zwei Versuchsgruppen (jeweils  $n=10$ ) wurden bestrahlt und erhielten eine Energiedosis von  $D = 12$  Gy beziehungsweise  $D = 24$  Gy. Die Gesamtbestrahlungszeit variierte je nach erhaltener Gesamtenergiedosis. Eine dritte Versuchsgruppe ( $n=11$ ) wurde scheinbestrahlt und diente als Kontrolle.

Die Hautinzision und Implantation der Polyvinylalkohol-Schwämme erfolgte 5 Tage nach der Bestrahlung. Tierexperimentell wurde gezeigt, dass Bestrahlungen in einem Zeitraum zwischen 2 Monaten vor bis 5 Tagen nach Setzen einer Hautinzision ähnliche Auswirkungen auf die Wundheilung hatten [49].

## **4.2.2. Operation**

### **4.2.2.1. Wundmodell**

Das im Rahmen dieser Arbeit verwandte Wundmodell wurde 1957 von Edwards et al. etabliert und gilt als ein Standardmodell in der Wundheilungsforschung [2, 7, 71, 121]. Es bestand aus einer 7 cm langen dorsalen Hautinzision und einer anschließenden subkutanen Implantation von Polyvinylalkohol-Schwämmen. Die Explantation erfolgte am 10. postoperativen Tag bzw. 15. Tag nach Bestrahlung. Bei normaler Wundheilung hat dann bereits die proliferative und regenerative Phase mit Bildung des Granulationsgewebes, Neovaskularisation und Strukturierung der extrazellulären Matrix eingesetzt [56, 118, 125]. Aus den implantierten Schwämmen kann die Wundflüssigkeit und das neugebildete Granulationsgewebe isoliert und untersucht werden.

### **4.2.2.2. Vorbereitung der Polyvinylalkohol-Schwämme**

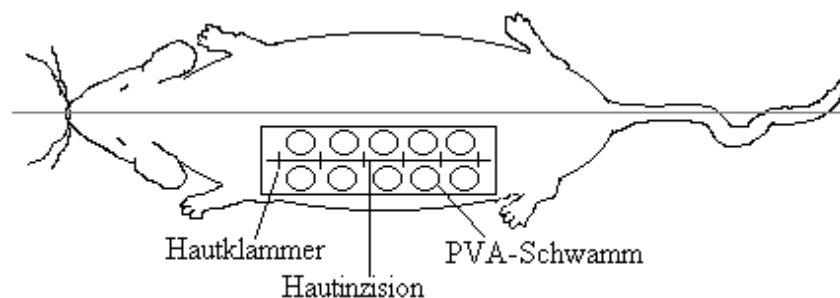
Die Polyvinylalkohol-Schwämme wurden vor der Operation 9 Stunden in fließendem Leitungswasser zur Entfernung des Formalins gespült und bei Raumtemperatur getrocknet. Dann schnitt man sie auf ein Trockengewicht von 24 mg zurecht, um den später analysierten Hydroxyprolinegehalt auf ein definiertes Schwammgewicht beziehen zu können. Vor der Implantation kochte man die Schwämme 20 Minuten zur Desinfektion in steriler Natriumchlorid-Lösung (0,9 %) ab und überführte sie zur Abkühlung und Wahrung eines isotonen Milieus in frische Natriumchlorid-Lösung (0,9 %).

### **4.2.2.3. Operatives Verfahren**

Zu Beginn der Operation wurden alle Tiere gewogen und durch intraperitoneale Injektion mit Ketamin (100 mg/kg Körpergewicht) und Xylazin (15 mg/kg Körpergewicht) narkotisiert. Das Fell wurde mit dem Elektrorasierapparat geschoren und die Rückenhaut mit Povidon-Iodlösung desinfiziert. Die Operation erfolgte unter aseptischen Bedingungen. Eine 7 cm lange Hautinzision wurde dorsal ca. 2 cm lateral der Wirbelsäule in dem markierten, bestrahlten Areal gesetzt. Dann präparierte man stumpf mit einer Präparierschere subkutane Taschen, in die 5 Polyvinylalkohol-

Schwämme auf jeder Seite der Hautinzision implantiert wurden. Die Wunde wurde mit Hautklammern verschlossen.

Bei der Narkose verstarben zwei Tiere der 24 Gy-Gruppe und ein Tier der 12 Gy-Gruppe.



**Abb. 2:** Schematisches Wundmodell:

Ratte mit 10 subkutan implantierten Polyvinylalkohol-(PVA)-Schwämmen im Bestrahlungsgebiet lateral der Wirbelsäule. Das Rechteck kennzeichnet das bestrahlte Areal.

### 4.2.3. Materialgewinnung und Materialverarbeitung

#### 4.2.3.1. Explantation der Polyvinylalkohol-Schwämme

10 Tage nach Implantation der Schwämme wurden die Tiere unter Ketamin-Xylazin-Narkose (intraperitoneal, Ketamin 100 mg/kg Körpergewicht, Xylazin 15 mg/kg Körpergewicht) erneut operiert. Man entfernte die Wundklammern und rasierte den operierten Bereich am Rücken der Tiere. Nach Desinfektion mit Povidon-Iod-Lösung wurde die Rückenhaut mit einem Skalpell in toto entfernt. Danach ließen sich die implantierten Schwämme mit einer Pinzette vom umwachsenden Granulationsgewebe freilegen und entnehmen. Die Tiere wurden in der Narkose durch kardiale Punktion getötet, das Blut in Kalium-EDTA-Monovetten aufgezogen und zur Bestimmung des Differentialblutbildes (siehe 4.2.8.) verwendet.

#### **4.2.3.2. Aufbereitung der Wundflüssigkeit**

Die verbleibenden Schwämme wurden mit Hilfe einer Gewebefaßpinzette („russisches Modell“) ausgedrückt, die dabei anfallende Wundflüssigkeit in einem sterilen Reagenzröhrchen pro Tier gesammelt und auf Eis gekühlt [2]. Die Wundflüssigkeit wurde zur Entfernung von Zellen und Zellresten für 20 Minuten bei 1200 g und 4°C zentrifugiert. Im Anschluß filtrierte man die Wundflüssigkeit durch einen Millipore-Filter (0,45 µm Filtereinheit) und zentrifugierte erneut durch einen Millipore-Ultrafilter Biomax® (Ausschlussgrenze 10000 Da) eine Stunde lang bei 7500 g und 4°C. Das Filtrat wurde zur späteren Nitrat-Nitrit-Bestimmung (siehe 4.2.6.) bei – 80°C eingefroren.

#### **4.2.3.3. Isolierung der Polyvinylalkohol-Schwämme**

##### **a) Hydroxyprolin-Bestimmung:**

Der am weitesten kranial gelegene Schwamm wurde auf Trockeneis schockgefroren und bei – 80°C zur späteren Bestimmung des Hydroxyprolingehalts (siehe 4.2.5.) aufbewahrt. Die Wundheilung erfolgt kranial erfahrungsgemäß rascher als in weiter kaudal gelegenen Arealen.

##### **b) Herstellung der Paraformaldehyd-Lösung (4 %) zur Fixierung der Proben:**

12 g Paraformaldehyd wurden in A. bidest. bei 60° C gelöst. Daraufhin gab man 100 ml 3-fach konzentrierten PBS-Puffer hinzu (24,5 g di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat, 36 g Natriumchlorid, 0,9 g Kaliumchlorid und 0,9 g Kaliumdihydrogenphosphat in 0,5 l A. bidest. gelöst). Anschließend wurde der pH-Wert auf 7,2 eingestellt und die Paraformaldehyd-Lösung mit A. bidest. auf 300 ml aufgefüllt.

##### **c) Immunhistochemie:**

Ein Schwamm wurde in 10 ml gepufferter Paraformaldehyd-Lösung (4 %) aus 4.2.3.3.b überführt und 24 Stunden bei 4°C fixiert (weitere Verarbeitung siehe 4.2.3.5.).

#### **4.2.3.4. Isolierung der Gewebeproben**

Die entnommene Rückenhaut wurde mit einem maßgefertigten Schneidegerät in  $8 \times 80$  mm große Hautstreifen geschnitten, so dass die Narbe zentral in der Mitte, im rechten Winkel zur Länge des Hautstreifens lag. 3 Hautstreifen pro Tier wurden an beiden Enden auf Kartonstreifen befestigt, auf feuchte Kompressen (in NaCl-Lösung 0,9 %) gelegt und die „frische“ Wundreißfestigkeit innerhalb einer Stunde gemessen. 3 weitere Hautstreifen wurden vor der Messung der „formalinfixierten“ Wundreißfestigkeit 72 Stunden in Paraformaldehyd-Lösung 4 % (aus 4.2.3.3.b) belassen (weitere Verarbeitung siehe 4.2.4.).

#### **4.2.3.5. Histologische Aufarbeitung der Polyvinylalkohol-Schwämme**

Nach abgeschlossener Fixierung wurden die Schwämme in Gewebekassetten überführt und die Paraformaldehyd-Lösung 30 Minuten in fließendem Leitungswasser ausgewaschen. Daraufhin brachte man die Kassetten zur stufenweisen Entwässerung in den Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomaten (Ethanol 70 % 1,5 h und 1 h, Ethanol 96 % 1,5 h und 1 h, Ethanol 100 % 1,5 h und 2 x 1 h, Xylol 3 x 1 h, Paraffin 3 x 1,5 h). Man bettete die Proben am Histoembedder in Paraffin ein und stellte für die immunhistochemische Färbung  $4 \mu\text{m}$  dicke Schnitte am Rotationsmikrotom her. Dann zog man die Schnitte auf Objektträger auf, die zuvor mit Poly-L-Lysin-Lösung (Poly-L-Lysin 1:10 mit A. bidest. verdünnt) beschichtet und trocken gelassen wurden. Anschließend fuhr man mit der immunhistochemischen Färbung (siehe 4.2.7.) fort.

#### **4.2.4. Messung der mechanischen Reißfestigkeit der Wunde**

Die Wundreißfestigkeit gilt in der Wundheilungsforschung als objektiv messbarer, mechanischer Parameter der Wundheilung [7, 49, 121, 140]. Mittels eines Tensiometers wird diejenige Zugkraft bestimmt, die erforderlich ist, um eine in der Heilungsphase befindliche, lineare Schnittwunde auseinander zu reißen. Die Messung der mechanischen Reißfestigkeit ist ein grobes, aber auch direktes Maß der Wundfestigkeit und Wundadaptation. Sie spiegelt die klinische Auswirkung der Wundheilungsstörung wider [14]. Die Messung wird sowohl an frisch explantierten, als auch an

formalinfixierten Hautproben durchgeführt. Die Formalinfixierung bewirkt eine vollständige Quervernetzung der Kollagenfibrillen in der Wunde. Dies ermöglicht eine Aussage inwieweit ungleiche Quervernetzung als Ursache von Festigkeitsunterschieden in Frage kommt [71, 72].

Zunächst wurde innerhalb einer Stunde nach Explantation die „frische“ Reißfestigkeit der Hautstreifen geprüft (siehe 4.2.3.4.). Man schnitt den Kartonstreifen, auf dem der Hautstreifen fixiert wurde, ab, spannte ihn zuerst am oberen Backen des Messgeräts ein und eichte das Gerät. Anschließend wurde das untere Ende des Hautstreifens in den unteren Backen eingespannt. Der Abstand der Backen betrug 31,5 mm, die Zuggeschwindigkeit 50 mm/min. Der Tensiometer zeigte den maximalen Wert der Zugkraft (in Newton) an, bei dem der Hautstreifen riss. Diesen Wert notierte man als mechanische Wundreißfestigkeit.

72 Stunden später wurde entsprechend die „formalinfixierte“ Reißfestigkeit der Hautstreifen gemessen, die zuvor 72 Stunden in Paraformaldehyd-Lösung 4 % fixiert worden waren (siehe 4.2.3.4.).

#### **4.2.5. Hydroxyprolinbestimmung**

Kollagen ist ein fibrilläres Protein, das als wichtigstes Strukturprotein der extrazellulären Matrix der Dermis gilt und überwiegend aus Monoaminosäuren besteht. Die Kollagenfasern bestimmen die mechanische Stabilität des Bindegewebes [60]. Hydroxyprolin ist eine Aminosäure, die nur in Kollagen in nennenswerter Menge zu finden ist [99]. Aufgrund dieses spezifischen Vorkommens gilt das Hydroxyprolin als repräsentativer Parameter für den Kollagengehalt des Gewebes [23, 121, 149].

Der Hydroxyprolinegehalt der Polyvinylalkohol-Schwämme wurde spektral-photometrisch mit der Methode nach Woessner [149] bestimmt.

##### **4.2.5.1. Reagenzien**

###### **a) Substratpuffer:**

34 g Natriumhydroxid wurden in 500 ml A. bidest. gelöst und anschließend 50 g Citronensäure-monohydrat, 120 g Natriumacetat-trihydrat und 12 ml Eisessig

(Essigsäure 100%) hinzugegeben und gelöst. Der pH-Wert wurde mittels 1 N Salzsäure bzw. 1 N Natronlauge auf 6,0 eingestellt und die Lösung mit A. bidest. auf 1 l aufgefüllt.

**b) Chloramin-T-Arbeitslösung:**

In 20 ml A. bidest. wurden 1,41 g Chloramin-T-hydrat gelöst und 30 ml Methylcellosolve (Ethylenglycol-monomethyl-ether) und 50 ml Substratpuffer aus a) hinzugegeben und gemischt.

**c) 3,15 M Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>):**

27 ml Perchlorsäure 70 % wurden mit 73 ml A. bidest. verdünnt.

**d) p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung (p-DABA-Lösung):**

20 g p-DABA wurden in 100 ml Methylcellosolve gelöst.

**e) Hydroxyprolin-Stammlösung (2 mg/ml) für die Standardreihe:**

100 mg Trans-4-Hydroxy-L-Prolin wurden in 50 ml 0,001 N Salzsäure gelöst.

**4.2.5.2. Probenvorbereitung**

Die Schwämme wurden vor und nach der Implantation gewogen.

Eine Hydroxyprolin-Standardreihe (0; 100; 250; 500; 750; 1000; 1500; 1750 µg/100 ml; ausgehend von der Hydroxyprolin-Stammlösung aus 4.2.5.1.e weiter mit 0,001 N Salzsäure auf vorangehende Werte verdünnt) wurde unter identischen Bedingungen mitgeführt. Man legte die Standardproben, den Leerwert und die Schwämme der jeweiligen Tiere (aus 4.2.3.3.a) in säurefesten, hitzebeständigen Röhrchen vor, fügte 4 ml 6 N Salzsäure hinzu und hydrolysierte den Ansatz 3 Stunden bei 130°C. Anschließend wurde das Hydrolysat durch angefeuchtete Papierfilter filtriert. Es erfolgte die Zugabe von 30 µl Methylrot (0,01 % in Ethanol) als pH-Indikator und anschließend die Zugabe von 5 N Natronlauge, bis der Farbumschlag von rot nach gelb erfolgte. Mit 0,1 N Salzsäure bzw. 0,1 N Natronlauge stellte man den pH-Wert zwischen 6 und 6,5 ein und füllte die Proben mit A. bidest. auf ein Volumen von 25 ml auf.

#### 4.2.5.3. Probenanalyse

Zu je 50 µl vorbereiteten Standards und Proben wurden 150 µl A. bidest. und 200 µl Chloramin-T-Arbeitslösung hinzugegeben, sorgfältig gemischt und 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 200 µl 3,15 M Perchlorsäure und eine weitere Inkubationszeit von 5 Minuten, um überschüssiges Chloramin-T zu eliminieren. Dann wurden 200 µl p-DABA-Lösung zum Ansatz pipettiert, sorgfältig gemischt und 20 Minuten bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Man ließ die Proben abkühlen und pipettierte 100 µl als Doppelwert in eine unbeschichtete 96-well-Mikrotiter-Platte. Die optische Dichte las man am ELISA-Reader bei 570 nm ab und berechnete die Hydroxyprolin-Konzentrationen mit Hilfe der Eichkurve.

#### 4.2.5.4. Hydroxyprolin-Mikroassay

Für Probenwerte, die unterhalb des niedrigsten Wertes der Standardreihe lagen, wurde der Hydroxyprolin-Mikroassay [25] angewandt. Als Proben wurden die Hydrolysate aus 4.2.5.2. verwendet.

##### a) Reagenzien:

- Puffer-Stammlösung:  
5 g Citronensäure-monohydrat, 11,9 g Natriumacetat-trihydrat, 7,2 g Natriumacetat-anhydrat und 3,4 g Natriumhydroxid wurden in 80 ml A. bidest. gelöst, mit Eisessig auf pH 6,1 eingestellt und auf ein Gesamtvolumen von 100 ml aufgefüllt.
- Assay-Puffer:  
1-Propanol, A. bidest. und der Puffer-Stammlösung wurden 3 : 2 : 10 gemischt.
- Chloramin-T-Lösung:  
0,282 g Chloramin-T-hydrat wurden in 1 ml 1-Propanol, 1 ml A. bidest. und 8 ml Puffer-Stammlösung aufgelöst.
- p-Dimethylaminobenzaldehyd-Lösung (p-DABA-Lösung):  
2 g p-DABA wurden in 1,25 ml Methylcellosolve und 2,75 ml Perchlorsäure (70%) gelöst.



**b) Standardkurve:**

100 mg Trans-4-Hydroxy-L-Prolin wurden in 50 ml 0,001 N Salzsäure verdünnt (Stammlösung: 2 mg/ml). Durch weitere Verdünnung mit 0,001 N Salzsäure wurde die Standardreihe hergestellt (313 ng/ml, 625 ng/ml, 1250 ng/ml, 2500 ng/ml, 5000 ng/ml, 10000 ng/ml, 15000 ng/ml, 20000 ng/ml).

**c) Testansatz:**

Standard und Probe wurden in eine 96-well-Mikrotiterplatte als Doppelwert pipettiert. Zu je 60 µl Hydrolysat wurden 20 µl Assay-Puffer und 40 µl Chloramin-T-Lösung hinzugefügt und bei Zimmertemperatur für 15 Minuten inkubiert. Anschließend gab man 80 µl p-DABA-Lösung hinzu, inkubierte erneut für 20 Minuten bei 60°C im Wasserbad und ließ die Platte dann abkühlen. Am ELISA-Reader las man die optische Dichte bei 570 nm gegen die Referenzwellenlänge 650 nm ab und berechnete die Hydroxyprolin-Konzentration mit Hilfe der Eichkurve.

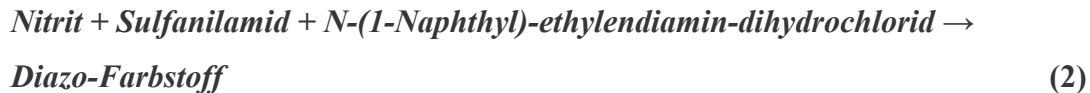
**4.2.6. Bestimmung von Nitrit und Nitrat in der Wundflüssigkeit****4.2.6.1. Prinzip der Bestimmung**

Zur Bestimmung des Nitrit- und Nitratgehalts der Wundflüssigkeit wurde der Nitric Oxide Colorimetric Assay (Nr. 1756281, Boehringer, Mannheim, Deutschland) angewandt [48].

In vivo wird Stickstoffmonoxid (NO) mittels des Enzyms NO-Synthase gebildet, das als Substrat die basische Aminosäure L-Arginin und als Cosubstrat molekularen Sauerstoff (O<sub>2</sub>) benötigt. Stickstoffmonoxid ist ein sehr reaktives, freies Radikal mit einer Lebensdauer von nur wenigen Sekunden. Es reagiert mit physikalisch gelöstem Sauerstoff und Wasser zu Nitrit (NO<sub>2</sub><sup>-</sup>) und Nitrat (NO<sub>3</sub><sup>-</sup>). In der verwendeten Testkombination wurden die stabilen Oxidationsprodukte NO<sub>2</sub><sup>-</sup> und NO<sub>3</sub><sup>-</sup> als Index der Stickstoffmonoxidsynthese im Wundsekret spektralphotometrisch bestimmt [11, 66, 84]. Dazu wurde das in der Wundflüssigkeitsprobe vorhandene Nitrat zunächst durch reduziertes Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat (NADPH) über das Enzym Nitrat-Reduktase (NR) zu Nitrit reduziert (1).



Das Nitrit reagierte mit Sulfanilamid und N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid unter Bildung eines rot-violetten Diazo-Farbstoffes (2).



Der Diazo-Farbstoff stellte die Messgröße dar und wurde bei einer Wellenlänge von 570 nm gemessen.

#### 4.2.6.2. Proben

Im Test wurden Proben der Wundflüssigkeit (aus 4.2.3.2.) eingesetzt.

#### 4.2.6.3. Reagenzien der Testkombination

- Kaliumphosphat-Puffer, pH 7,5, stabilisiert: unverdünnt angewendet.
- Coenzym-Tabletten (0,5 mg NADPH, 0,01 mg FAD u. Stabilisatoren pro Tabl.): 1 Tablette wurde in 333 µl Kaliumphosphat-Puffer aufgelöst.
- Nitrat-Reduktase, lyophilisiert: 4 U wurden in 0,6 ml A. bidest. aufgelöst.
- Farbreagenz I: Sulfanilamid, stabilisiert.
- Farbreagenz II: N-(1-Naphthyl)-ethylendiamin-dihydrochlorid, stabilisiert.
- Kaliumnitrat-Standard (80,0 mM), stabilisiert; der Kaliumnitrat-Standard wird zunächst 1:250 auf 320 µM verdünnt und dann in einer arithmetischen Verdünnungsreihe weiter bis auf 8 µM verdünnt.

#### 4.2.6.4. Inkubations-Ansatz

Für den Inkubations-Ansatz wurden pipettiert:

- |           |   |
|-----------|---|
| Leerwert: | 200 µl A. bidest. und 20 µl Coenzym-Lösung (NADPH, FAD und Stabilisatoren in Kaliumphosphat-Puffer) |
| Probe:    | 200 µl Probelösung und 20 µl Coenzym-Lösung   |
| Standard: | 200 µl Standardlösung und 20 µl Coenzym-Lösung  |

Nach 1 Minute erfolgte die Zugabe von 8  $\mu\text{l}$  Nitrat-Reduktase (lyophilisiert, in A. bidest.) und Inkubation für 30 Minuten bei Raumtemperatur.

#### 4.2.6.5. Messung

Am Ende der Inkubationszeit wurden zu jeweils 100  $\mu\text{l}$  Inkubationslösung des Leerwertes, der Probe und des Standards 50  $\mu\text{l}$  Farbreagenz I und 50  $\mu\text{l}$  Farbreagenz II in die Wells der Mikrotiterplatte hinzupipettiert, 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend die Extinktion am ELISA-Reader bei 570 nm abgelesen.

#### 4.2.6.6. Nitrit-Assay

Die Nitritbestimmung erfolgte mittels der Griess-Reaktion [52].

##### a) Nitrit-Eichkurve:

Zur Erstellung der Nitrit-Eichkurve wurden 69 mg Natriumnitrit (MG 69) in 10 ml HPLC-Wasser eingewogen, 1:100 verdünnt (1000  $\mu\text{M}$ ) und in einer arithmetischen Verdünnungsreihe bis 1,56  $\mu\text{M}$  weiter verdünnt.

##### b) Reagenzien:

- N-(1-Naphthyl)ethylenediamin-dichlorid (NED) 0,1% in Wasser:  
50 mg NED wurden in 50 ml A. bidest. gelöst.
- Sulfanilamid 1% in o-Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 5%:  
500 mg Sulfanilamid wurden in 2,95 ml konzentrierte  $\text{H}_3\text{PO}_4$  (85%) und 47,05 ml A. bidest. gelöst.

##### c) Inkubations-Ansatz:

In eine 96-well-Mikrotiterplatte pipettierte man jeweils 50  $\mu\text{l}$  Wundflüssigkeitsprobe bzw. Nitritstandard, fügte 25  $\mu\text{l}$  Sulfanilamid- und 25  $\mu\text{l}$  NED-Lösung hinzu und inkubierte den Ansatz 10 Minuten bei Raumtemperatur und in Dunkelheit. Im Anschluss las man die Extinktion bei 570 nm am ELISA-Reader ab und berechnete die Nitritkonzentration anhand der Standardkurve.

#### **4.2.6.7. Bestimmung von Nitrat und Nitrit**

Zur Berechnung des Nitratgehalts wurde jeweils der Wert der Messung des Nitrit-Assays (4.2.6.6.) vom Wert der Messung nach Inkubation (4.2.6.5.) abgezogen.

### **4.2.7. Immunhistochemische Färbung**

#### **4.2.7.1. Material und Reagenzien**

##### **a) Proben:**

4 µm dicke Paraffinschnitte der implantierten Polyvinylalkohol-Schwämme (aus 4.2.3.5.).

##### **b) PBS-Puffer (1-fach):**

10-fach konzentrierte Stammlösung (80 g Natriumchlorid, 2 g Kaliumchlorid und 11,5 g di-Natriumhydrogenphosphat-dihydrat in A.bidest. gelöst, auf 1 l mit A.bidest. aufgefüllt und pH 7,4 eingestellt), vor Gebrauch mit A. bidest. 1:10 verdünnt.

##### **c) 10% Rinderserumalbumin in PBS (10% BSA in PBS):**

1 g Rinderserumalbumin (BSA) gelöst in 10 ml PBS 1-fach.

##### **d) Wasserstoffperoxid -Methanol-Ansatz:**

2,7 ml Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%) pro 100 ml Methanol (100%).

##### **e) Antikörper:**

###### **1. Primärantikörper:**

Anti-induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase (Anti-iNOS, Maus Makrophage), polyklonaler Antikörper vom Kaninchen, wurde 1:500 mit 10% BSA in PBS verdünnt.

###### **2. Sekundärantikörper-Rattennormalserum-Komplex:**

Der Sekundärantikörper Anti-Kaninchen-IgG vom Schwein, biotinyliert, wurde mit Rattennormalserum im Verhältnis 1:2 verdünnt, 30 Minuten bei 4°C inkubiert und anschließend 5 Minuten bei 15000 g zentrifugiert.

Der Überstand wurde 1:400 mit 10% BSA in PBS verdünnt.

**f) Streptavidin-Biotin-Komplex:**

Jeweils 1 Tropfen Streptavidin [Avidin in PBS - pH 7,2 (0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl), 15 mM NaN<sub>3</sub>] und 1 Tropfen biotinylierte Meerrettichperoxidase [Biotinylierte Meerrettichperoxidase in PBS - pH 7,2 (0,01 M Phosphat, 0,15 M NaCl), 15 mM NaN<sub>3</sub>] wurden mit 5 ml PBS (1-fach) 30 Minuten vor Gebrauch gemischt.

**g) DAB-Ansatz (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat-Ansatz):**

100 mg 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat (DAB) wurden in 180 ml A. bidest. gelöst und 20 ml Substratpuffer 10-fach (4,2 g Citronensäuremonohydrat, 6,8 g Imidazol und 5,84 g Natriumchlorid in 100 ml A. bidest. gelöst und auf pH 7,0 eingestellt) hinzugegeben. Dann legte man 66,6 µl Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30 %) in einer schwarzen Küvette vor und gab den DAB-Ansatz hinzu. Die Lösung war unter Lichtabschluss 30 Minuten haltbar.

**4.2.7.2. Methodik**

Zur Darstellung der Expression der induzierbaren NO-Synthase in den Zellen des Granulationsgewebes wurde der polyklonale Antikörper Anti-iNOS vom Kaninchen (Fa. Calbiochem, San Diego, USA) eingesetzt und das Färbeprotokoll der Firma Calbiochem verwendet.

Zu Beginn wurden die Paraffinschnitte der Polyvinylalkohol-Schwämme 35 Minuten lang in Xylol (100 %) bei 60°C inkubiert, um die Antigenstellen nach der Formalinfixierung zu demaskieren und das Paraffin herauszulösen. Anschließend wurden die Objektträger in frisches Xylol (100 %) für 2×5 Minuten überführt und in der absteigenden Alkoholreihe (Ethanol 100 % 2×5 Min., Ethanol 96 % 1×5 Min., Ethanol 70 % 1×5 Min., A. bidest. 2×5 Minuten) weiter entparaffiniert. Zur Unterdrückung der endogenen Peroxidaseaktivität inkubierte man die Objektträger im Wasserstoffperoxid-Methanol-Ansatz 25 Minuten bei Raumtemperatur. Nach dem folgenden Waschschrift (3×5 Min. in PBS-Puffer 1-fach) wurden die unspezifischen Bindungsstellen mittels 10 % Rinderserumalbumin (10 % BSA in PBS) für 1 Stunde in der feuchten Kammer bei Raumtemperatur geblockt. Anschließend trug man den

polyklonalen Primärantikörper gegen iNOS (1:500 verdünnt in 10 % BSA in PBS) auf und ließ ihn über Nacht bei 4°C in der feuchten Kammer inkubieren.

Am folgenden Tag wurde nach dreimaligem Waschen im PBS-Puffer 1-fach (je 5 Min.) der Komplex aus Sekundärantikörper (biotinyliert) und Rattennormalserum aufpipettiert und für 30 Minuten bei Raumtemperatur in der feuchten Kammer belassen. Auf einen Waschschrift (3×5 Min. PBS-Puffer) folgte die Inkubation mit dem Streptavidin-Biotin-Komplex (für 30 Minuten, Raumtemperatur, feuchte Kammer). Der Sekundärantikörper war spezifisch gegen den Primärantikörper gerichtet und bildete so eine Brücke zwischen Primärantikörper und dem Streptavidin-Biotin-Komplex. Der Streptavidin-Biotin-Komplex lagerte sich mit seinen freien Bindungsstellen an das Biotin des Sekundärantikörpers an. Nach einem erneuten Waschschrift (3×5 Min. PBS-Puffer) entwickelte man die Färbung mit Hilfe des 3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat-(DAB)-Ansatzes unter Mikroskopkontrolle. In Anwesenheit der Meerrettichperoxidase des Streptavidin-Biotin-Komplexes oxidierte DAB zu einem rötlich-braunen Präzipitat und wirkte somit als Chromogen zur Detektion iNOS-positiver Zellen.

Im letzten Arbeitsschritt wurde mit Hämalaun nach Meyer (Fertiglösung 1:5 mit A. bidest. verdünnt) gegengefärbt, 10 Minuten mit Wasser gespült, in der „Aufsteigenden Reihe“ ( Ethanol 70 %, Ethanol 96 %, Ethanol 100 %, Xylol 100 %) entwässert und eingedeckt.

Auf jedem Objektträger wurde ein Schnitt als Negativkontrolle mitgeführt, der über Nacht mit 10 % BSA in PBS statt des Primärantikörpers (verdünnt in 10 % BSA in PBS) inkubiert wurde. Alle anderen Arbeitsschritte entsprachen denen der iNOS-Färbung.

Als Positivkontrolle wurden Schnitte der Halsgefäße einer Sprague-Dawley-Ratte herangezogen. 24 Stunden vor Probenentnahme wurde dem Tier intraperitoneal Lipopolysaccharid (E.coli-Serotyp 0128 : B12; 10mg/kg Körpergewicht) injiziert. Lipopolysaccharid bewirkt eine Aktivierung der Stickstoffmonoxidsynthese durch die induzierbare NO-Synthase [76, 120, 133].

Die Fotografien wurden mit dem Fotomikroskop „Axiophot“ (Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland) und einem Farbbildfilm hergestellt.

#### **4.2.8. Differentialblutbild**

Zur Bestimmung des Differentialblutbildes wurden Blutproben der Versuchstiere auf einem Objektträger ausgestrichen, trocknen gelassen und anschließend nach der Pappenheim-Färbung gefärbt. Dazu fixierte man die Ausstriche zunächst 3 Minuten in der May-Grünwald-Lösung (Eosin-Methylenblau-Lösung + Methanol), spülte anschließend mit A. bidest. und färbte im Anschluss für 12 Minuten in Giemsa's Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung. Nach dem folgenden Spülschritt in A. bidest. ließ man die Objektträger an der Luft trocknen. Zur Auswertung zählte man die Zellen am Mikroskop aus.

### **4.3. Datenverarbeitung**

#### **4.3.1. Software**

Als Textverarbeitungsprogramm wurde Microsoft® Word 2000 für Windows verwendet. Für die Tabellenkalkulation und Diagrammerstellung kam Microsoft® Excel 97 zur Anwendung und das Statistikprogramm JMP® (JMP 4.0.2., Firma SAS Institute, Cary, NC, USA) wurde zur statistischen Analyse der Versuchsergebnisse eingesetzt.

#### **4.3.2. Statistische Auswertung**

Die statistische Auswertung der Versuchsergebnisse erfolgte nach Beratung durch Herrn A. Rosenberger vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen.

Die Daten wurden auf Normalverteilung und Varianzhomogenität (Bartlett-Test) überprüft und anschließend die Varianzanalyse (Welch ANOVA) durchgeführt.

Bei signifikanter F-Statistik wurde die Dunnett-Methode zur Ermittlung signifikanter Unterschiede zwischen der Kontrollgruppe und der jeweiligen bestrahlten Gruppe (12 Gy, 24 Gy) angewandt. Die zugrunde gelegte Nullhypothese, dass die Differenz zwischen Kontrollgruppe und bestrahlter Gruppe gleich Null sei, wurde mit einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  geprüft.

In den Tabellen sind, soweit nicht anders angegeben, der arithmetische Mittelwert ( $\bar{x}$ ), der Median (Md), der Standardfehler (SEM) und die Anzahl der Werte (n) aufgeführt. Die graphische Darstellung erfolgte durch Punktdiagramme. Die einzelnen Werte der Versuchstiere einer Gruppe wurden durch schwarze, eckige Punkte dargestellt, der arithmetische Mittelwert durch einen blauen, runden Punkt und der Standardfehler durch die blaue, horizontale Linie wiedergegeben. Die Mittelwertkreise, die in jeder graphischen Darstellung im rechten Bildbereich abgebildet wurden, schneiden sich nicht oder schneiden sich in einem spitzen Winkel ( $<90^\circ$ ) im Falle eines statistisch signifikanten Unterschiedes zwischen Kontrollgruppe und entsprechender bestrahlter Gruppe. Schneidet der Mittelwertkreis der Kontrollgruppe den einer bestrahlten Gruppe in einem stumpfen Winkel ( $> 90^\circ$ ), ist der Unterschied mit dem Signifikanzniveau  $p < 0,05$  statistisch nicht signifikant.



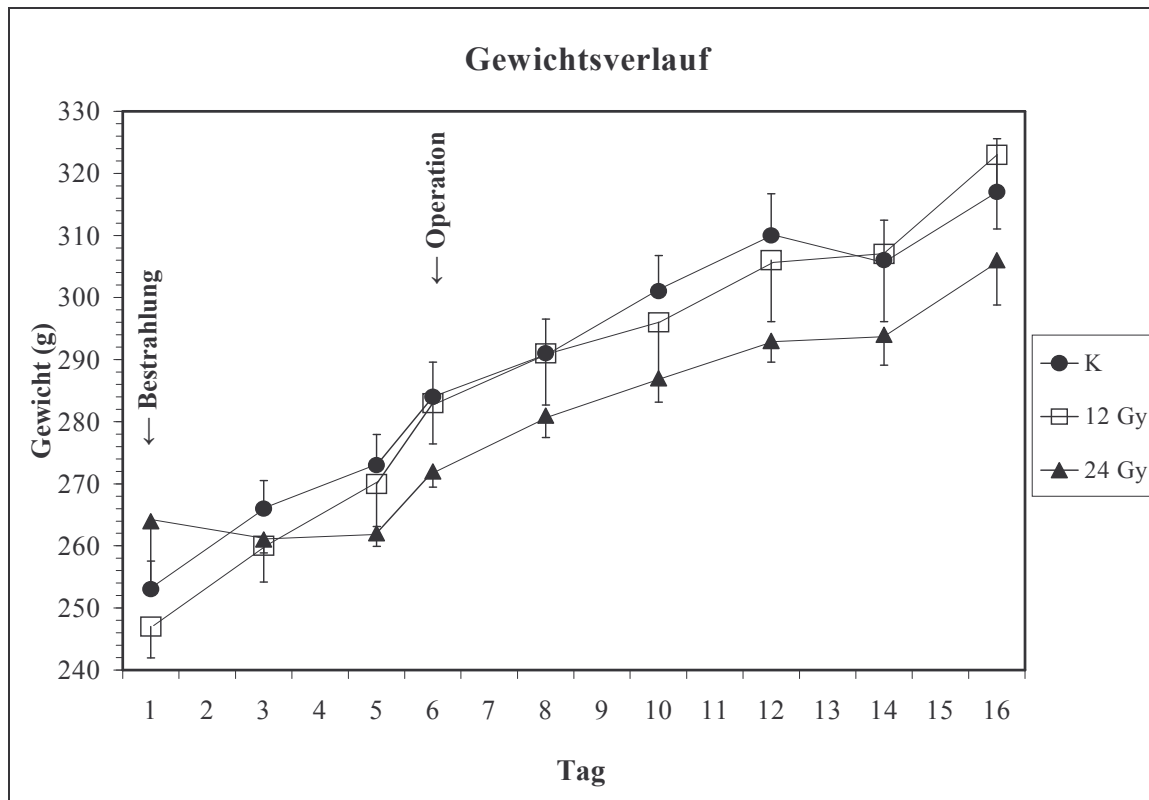
## 5. Ergebnisse

### 5.1. Einfluss der Elektronenstrahlung und Operation auf das Körpergewicht

Die Abbildung 3 zeigt die Entwicklung des Körpergewichts der Gruppen im Versuchsverlauf. Am ersten Tag fand die Partialkörperbestrahlung mit 4 MeV-Elektronen mit einer Energiedosis von  $D = 12$  Gy beziehungsweise  $D = 24$  Gy und die Scheinbestrahlung der Kontrolltiere statt. Am 6. Versuchstag erfolgte die Operation mit Setzen der Hautinzision und Implantation der Polyvinylalkohol(PVA)-Schwämme. Tag 16 stellte das Versuchsende mit Explantation der PVA-Schwämme und Asservierung von Hautproben und Wundflüssigkeit dar. Alle drei Versuchsgruppen konnten ihr Körpergewicht im Durchschnitt bis Versuchsende steigern.

Die relative, prozentuale Gewichtszunahme von Versuchsbeginn bis Versuchsende betrug bei der Kontrollgruppe  $25,6 \pm 2,3$  %. Bei den bestrahlten Versuchsgruppen nahmen die Tiere mit einer Partialkörperbestrahlung von  $D = 12$  Gy  $30,7 \pm 2,6$  % und die Tiere mit einer Energiedosis von  $D = 24$  Gy  $16,7 \pm 6,5$  % zu (Werte: Mittelwert  $\pm$  Standardfehler). Zwischen den untersuchten Gruppen bestand hinsichtlich der relativen, prozentualen Gewichtszunahme kein statistisch signifikanter Unterschied ( $p=0,06$ , F-Test).

Bei der Narkose der ersten Operation verstarben zwei Tiere der 24 Gy-Gruppe und ein Tier der 12 Gy-Gruppe.



**Abb. 3:** Körpergewicht der Kontrolltiere und der bestrahlten Tiere im Versuchsverlauf; Mittelwert (x) + bzw. - Standardfehler (SEM).

Tag 1: Bestrahlung

Tag 6: Setzen der Hautinzision, Implantation der PVA-Schwämme

Tag 16: Explantation der PVA-Schwämme und Asservierung der Hautproben und Wundflüssigkeit

**Abkürzungen:**

K: Kontrollgruppe

12 Gy: Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 12 Gy

24 Gy: Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 24 Gy

## 5.2. Einfluss der Elektronenstrahlung auf das Differentialblutbild

Hinsichtlich der Leukozytengesamtzahl und der prozentualen Verteilung der Leukozytensubpopulationen (Tab. 3) ergab sich kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (F-Test). In der Kontrollgruppe geronnen zwei Blutproben und entzogen sich der Analyse.

Gruppe	n	Leukozyten- gesamtzahl (x 10 <sup>3</sup> /µl)	Neutrophile Granulozyten (%)	Lymphozyten (%)	Monozyten (%)
<b>K</b>	9	12,5 ± 0,8	25,2 ± 0,8	68,2 ± 1,1	6,5 ± 0,3
<b>12 Gy</b>	9	11,2 ± 0,6	25,5 ± 2,0	68,3 ± 3,7	6,3 ± 0,2
<b>24 Gy</b>	8	13,0 ± 1,2	26,2 ± 1,3	66,3 ± 2,2	6,9 ± 0,4
<b>p</b>		0,34	0,89	0,82	0,48

**Tab. 3:** Differentialblutbild der Versuchstiere:

Leukozytengesamtzahl und prozentuale Verteilung der neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten und Monozyten im Blut der Versuchstiere am 10. postoperativen Tag bzw. 15. Tag nach Bestrahlung. Die eosinophilen und basophilen Granulozyten betragen in allen drei Versuchsgruppen jeweils < 1%. Alle Werte sind als arithmetischer Mittelwert (x) ± Standardfehler (SEM) angegeben.

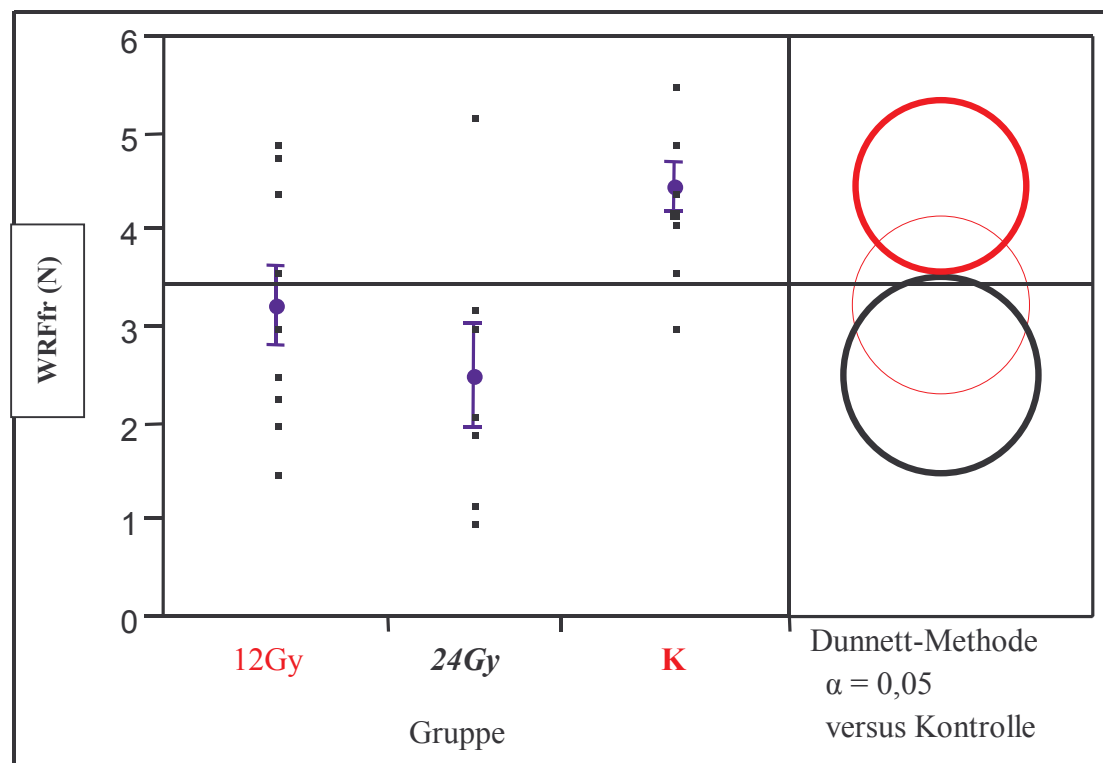
### Abkürzungen:

- K: Kontrollgruppe
- 12 Gy: Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 12 Gy
- 24 Gy: Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 24 Gy

## 5.3. Einfluss der Elektronenstrahlung auf die Wundheilungsparameter

### 5.3.1 Wundreißfestigkeit der frischen Hautproben

Die frische Wundreißfestigkeit wurde als mechanischer Parameter der Wundfestigkeit untersucht. Wie aus der Abb. 4 und Tab. 4 ersichtlich, war die frische Wundreißfestigkeit der Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von 24 Gy gegenüber der Kontrollgruppe am 10. postoperativen Tag statistisch signifikant erniedrigt ( $p < 0,05$ ; versus Kontrolle, Dunnett-Methode). Zwei Hautproben der Kontrollgruppe und eine der 24 Gy-Gruppe waren zur Festigkeitsmessung unbrauchbar.



**Abb. 4:** Frische Wundreißfestigkeit (in Newton) der Versuchsgruppen am 10. postoperativen Tag bzw. 15. Tag nach Bestrahlung. Statistisch signifikante Abnahme der frischen Wundreißfestigkeit bei Partialkörperbestrahlung mit  $D = 24$  Gy gegenüber der Kontrolle.  $p < 0,05$ , Dunnett-Methode.

**Zeichenerklärung:**

Blauer, runder Punkt:	Arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ )
Schwarze, eckige Punkte:	Einzelwerte
Blaue, horizontale Linie:	Standardfehler (SEM)

**Abkürzungen:**

WRFfr:	frische Wundreißfestigkeit
N:	Newton
K:	Kontrollgruppe
12 Gy:	Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von $D = 12$ Gy
24 Gy:	Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von $D = 24$ Gy

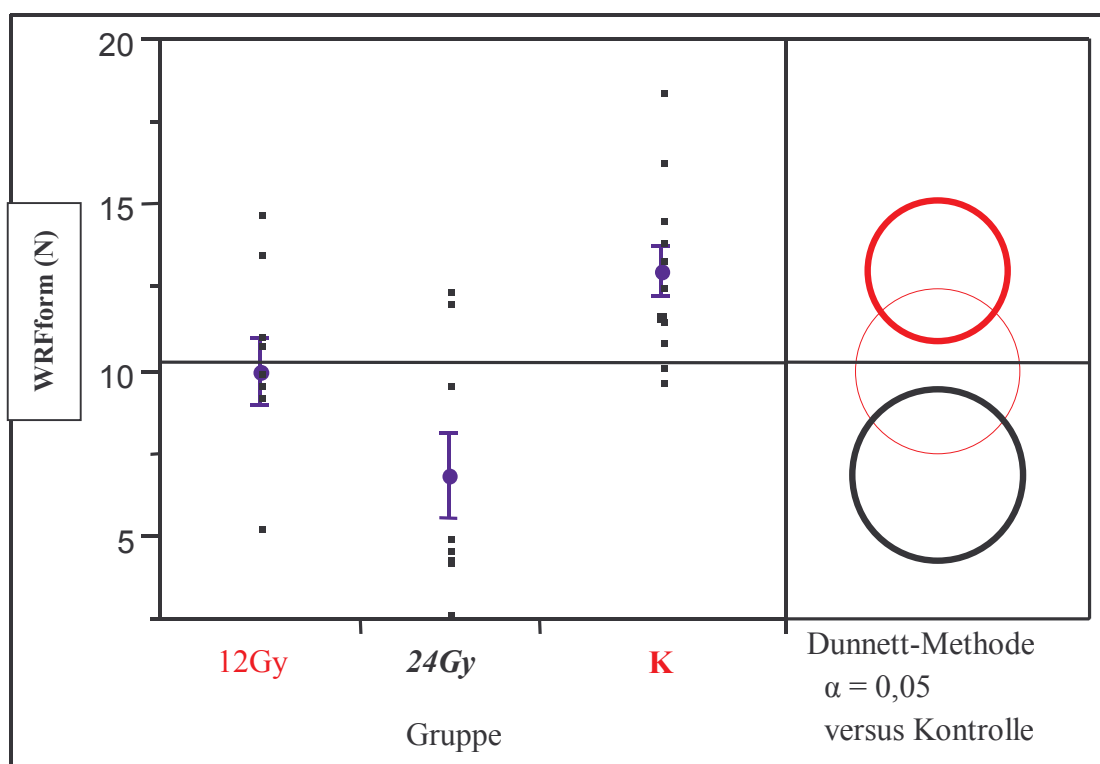
Gruppe	n	$\bar{x} \pm \text{SEM}$	Md
K	9	$4,5 \pm 0,3$	4,4
12 Gy	9	$3,2 \pm 0,4$	3,0
24 Gy	7	$2,5 \pm 0,5$ *	2,1

**Tab. 4:** Stichprobenumfang (n), arithmetischer Mittelwert ( $\bar{x}$ , in Newton)  $\pm$  Standardfehler (SEM) und Median (Md, in Newton) der frischen Wundreißfestigkeit der Versuchsgruppen am 10. postoperativen Tag und 15. Tag nach Bestrahlung.

\* : statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$ ; Dunnett-Methode.

### 5.3.2. Wundreißfestigkeit der formalinfixierten Hautproben

Die formalinfixierte Wundreißfestigkeit ist ein mechanischer Parameter der Wundfestigkeit bei vollständiger Quervernetzung der Kollagenfibrillen. Die Abb. 5 und Tab. 5 zeigen, dass die formalinfixierten Hautproben der 24-Gy-Gruppe am 10. postoperativen Tag eine statistisch signifikante Abnahme der Wundreißfestigkeit gegenüber der Kontrollgruppe verzeichneten ( $p < 0,05$ ; Dunnett-Methode).



**Abb. 5:** Formalinfixierte Wundreißfestigkeit (in Newton) der drei Versuchsgruppen am 10. postoperativen Tag bzw. 15. Tag nach Bestrahlung. Statistisch signifikante Abnahme der formalinfixierten Wundreißfestigkeit in der Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von  $D = 24$  Gy gegenüber der Kontrolle.  $p < 0,05$ , Dunnett-Methode.

**Zeichenerklärung:**

Blauer, runder Punkt:	Arithmetischer Mittelwert (x)
Schwarze, eckige Punkte:	Einzelwerte
Blaue, horizontale Linie:	Standardfehler (SEM)

**Abkürzungen:**

N:	Newton
WRFform:	formalinfixierte Wundreißfestigkeit
K:	Kontrollgruppe
12 Gy:	Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 12 Gy
24 Gy:	Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 24 Gy

Gruppe	n	x ± SEM	Md
<b>K</b>	11	13,1 ± 0,8	12,6
<b>12 Gy</b>	9	10,0 ± 1,1	10,0
<b>24 Gy</b>	8	7,0 ± 1,4 *	4,8

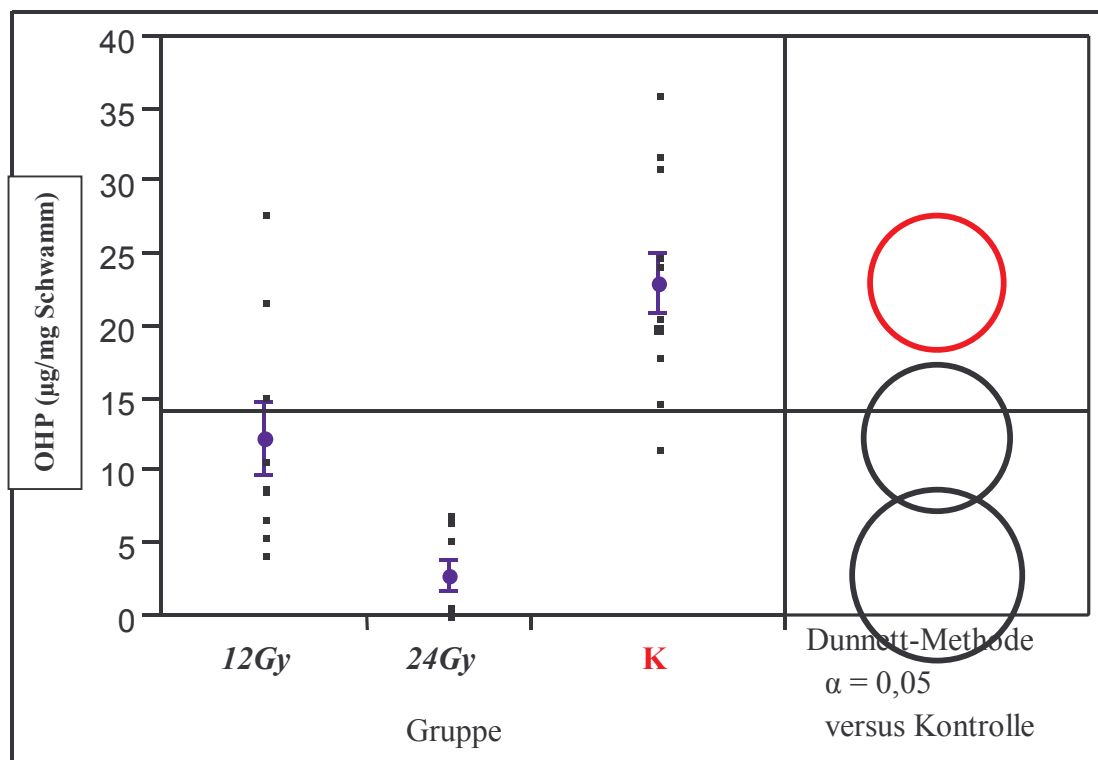
**Tab. 5:** Stichprobenumfang (n), arithmetischer Mittelwert (x; in Newton) ± Standardfehler (SEM) und Median (Md; in Newton) der formalinfixierten Wundreißfestigkeit der Versuchsgruppen am 10. postoperativen Tag bzw. 15. Tag nach Bestrahlung.

\* : statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$ ; Dunnett-Methode.

### 5.3.3. Hydroxyprolingehalt des Granulationsgewebes

Der Hydroxyprolingehalt der subkutan implantierten PVA-Schwämme ist ein Index der reparativen Kollagenbildung in der Wunde. Das Hydroxyprolin wurde im Granulationsgewebe bestimmt, das innerhalb der 10 postoperativen Tage in die Polyvinylalkohol-Schwämme eingewachsen war.

Die Abbildung 6 zeigt, dass die Hydroxyprolinanreicherung am 10. postoperativen Tag sowohl bei einer Partialkörperbestrahlung von  $D = 12$  Gy als auch  $D = 24$  Gy statistisch signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erniedrigt war ( $p < 0,05$ ; Dunnett-Methode). Bei der Energiedosis  $D = 24$  Gy war der Hydroxyprolingehalt am stärksten vermindert. Die Tabelle 6 zeigt die einzelnen Werte der Versuchsgruppen. Eine Probe der 24 Gy-Gruppe ging bei der Bearbeitung für die Analyse verloren.



**Abb. 6:** Hydroxyprolingehalt des Granulationsgewebes (in µg/mg Schwamm) der Versuchsgruppen am 10. postoperativen Tag bzw. 15. Tag nach Bestrahlung. Statistisch signifikante Verminderung des Hydroxyprolingehalts bei Partialkörperbestrahlung mit  $D = 12$  Gy und  $D = 24$  Gy gegenüber der Kontrolle.  $p < 0,05$ ; Dunnett-Methode.



**Zeichenerklärung:**

Blauer, runder Punkt:	Arithmetischer Mittelwert (x)
Schwarze, eckige Punkte:	Einzelwerte
Blaue, horizontale Linie:	Standardfehler (SEM)

**Abkürzungen:**

OHP:	Hydroxyprolin
K:	Kontrollgruppe
12 Gy:	Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 12 Gy
24 Gy:	Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 24 Gy

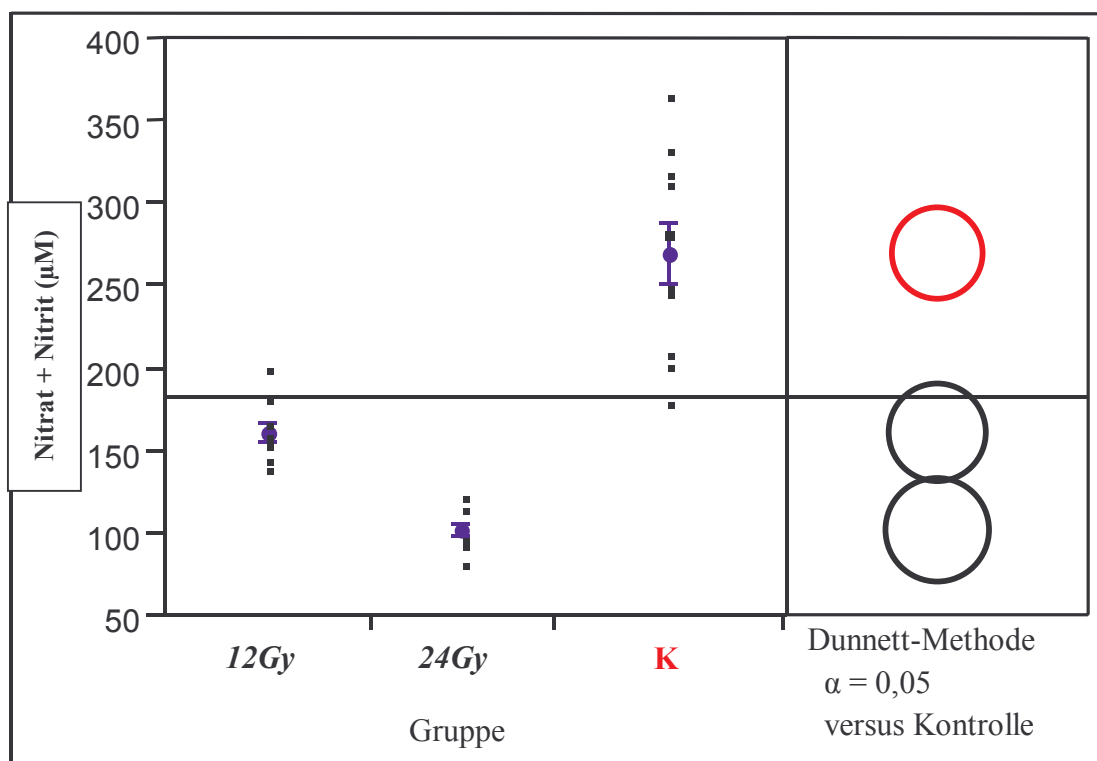
Gruppe	n	x ± SEM	Md
<b>K</b>	11	23,0 ± 2,3	20,7
<b>12 Gy</b>	9	12,3 ± 2,7 *	9,0
<b>24 Gy</b>	7	2,9 ± 1,2 *	0,7

**Tab. 6:** Stichprobenumfang (n), arithmetischer Mittelwert (x; in µg/mg Schwamm) ± Standardfehler (SEM) und Median (Md; in µg/mg Schwamm) des Hydroxyprolinegehalts des Granulationsgewebes der Versuchsgruppen am 10. postoperativen Tag und 15. Tag nach Bestrahlung.

\* : Statistisch signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$ ; Dunnett-Methode.

## 5.4. Einfluss der Elektronenstrahlung auf die Nitrat- und Nitritkonzentration in der Wundflüssigkeit

Als Index der Stickstoffmonoxidsynthese in der Wunde wurde die Summe der Nitrat- und Nitritkonzentration ( $\text{NO}_x$ -Konzentration) im Wundsekret gemessen. Die Abbildung 7 gibt die  $\text{NO}_x$ -Konzentration der Wundflüssigkeit am 10. postoperativen Tag wieder. Die Versuchsgruppen mit einer Partialkörperbestrahlung von  $D = 12 \text{ Gy}$  beziehungsweise  $D = 24 \text{ Gy}$  verzeichneten jeweils eine statistisch signifikante Abnahme der  $\text{NO}_x$ -Konzentration im Wundsekret gegenüber der Kontrollgruppe ( $p < 0,05$ ; Dunnett-Methode). Bei der Versuchsgruppe mit der höchsten Energiedosis ( $D = 24 \text{ Gy}$ ) nahm die  $\text{NO}_x$ -Konzentration am stärksten ab. Die Tabelle 7 zeigt die einzelnen Werte der Gruppen. Eine Probe der Kontrollgruppe ging bei der Verarbeitung verloren.



**Abb. 7:** Nitrat- und Nitritkonzentration im Wundsekret (in  $\mu\text{M}$ ) der Versuchsgruppen am 10. postoperativen Tag bzw. 15. Tag nach Bestrahlung. Statistisch signifikante Reduktion der Nitrat- und Nitritkonzentration in der

Wundflüssigkeit bei Partialkörperbestrahlung mit D = 12 Gy bzw. D = 24 Gy gegenüber der Kontrolle.  $p < 0,05$ ; 12 Gy bzw. 24 Gy versus Kontrolle, Dunnett-Methode.

**Zeichenerklärung:**

Blauer, runder Punkt:	Arithmetischer Mittelwert (x)
Schwarze, eckige Punkte:	Einzelwerte
Blaue, horizontale Linie:	Standardfehler (SEM)

**Abkürzungen:**

NO <sub>x</sub> , Nitrat + Nitrit:	Summe der Nitrat- und Nitritkonzentration im Wundsekret
K:	Kontrollgruppe
12 Gy:	Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 12 Gy
24 Gy:	Versuchsgruppe mit einer Partialkörperbestrahlung von D = 24 Gy

Gruppe	n	x ± SEM	Md
K	10	269,7 ± 19,6	265,4
12 Gy	9	162,2 ± 6,3 *	156,0
24 Gy	8	102,3 ± 5,0 *	97,2

**Tab. 7:** Stichprobenumfang (n), arithmetischer Mittelwert (x; in  $\mu\text{M}$ ) ± Standardfehler (SEM) und Median (Md; in  $\mu\text{M}$ ) der Nitrat- und Nitritkonzentration im Wundsekret der Versuchsgruppen am 10. postoperativen Tag und 15. Tag nach Bestrahlung.

\* : signifikanter Unterschied zur Kontrollgruppe mit  $p < 0,05$ ; Dunnett-Methode.

## 5.5. Immunhistochemische Färbung

Die Abbildungen 8 - 13 zeigen die immunhistochemische Färbung der induzierbaren Stickstoffmonoxidsynthase (iNOS) im Granulationsgewebe der subkutan implantierten PVA-Schwämme am 10. postoperativen Tag. Die iNOS-positiven Zellen sind braun gefärbt (Chromogen: DAB).

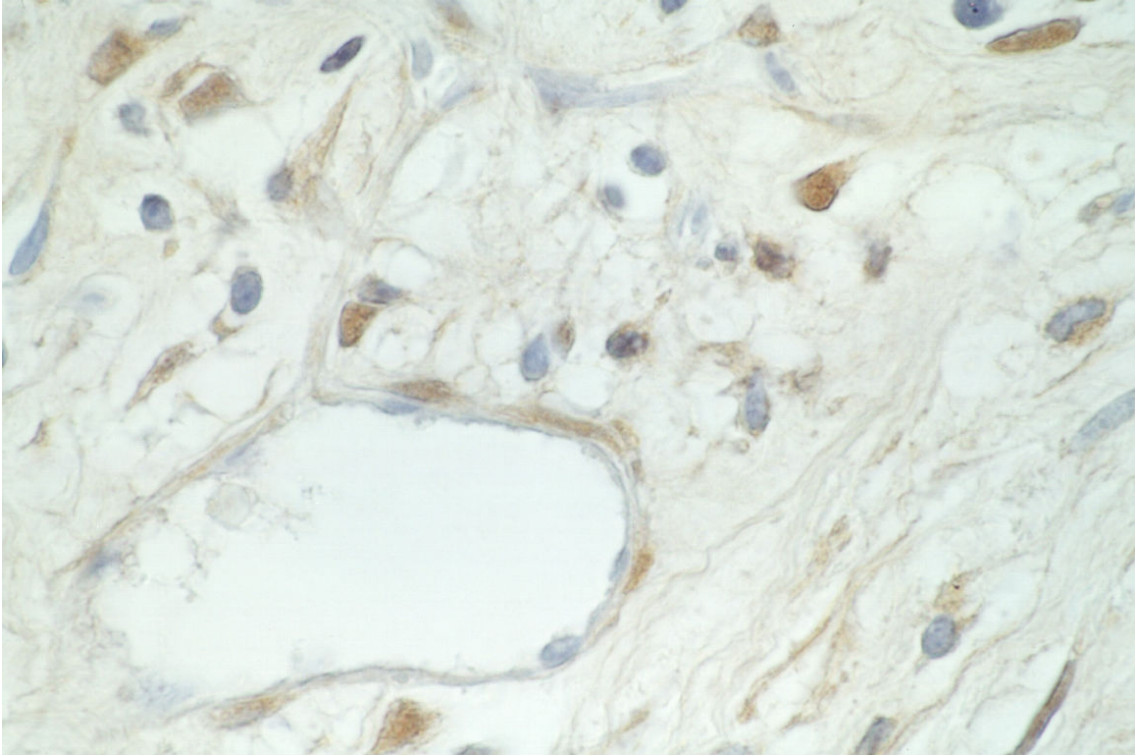
Die Abbildungen 8 und 9 präsentieren das Granulationsgewebe eines Kontrolltieres in unterschiedlichen Vergrößerungen. Man erkennt eine starke Expression der iNOS in zahlreichen Fibroblasten, Makrophagen und Endothelzellen.

Die Abbildung 10 zeigt das Beispiel eines Tieres aus der mit 12 Gy bestrahlten Versuchsgruppe. Im Granulationsgewebe sind nur vereinzelt Zellen iNOS-positiv.

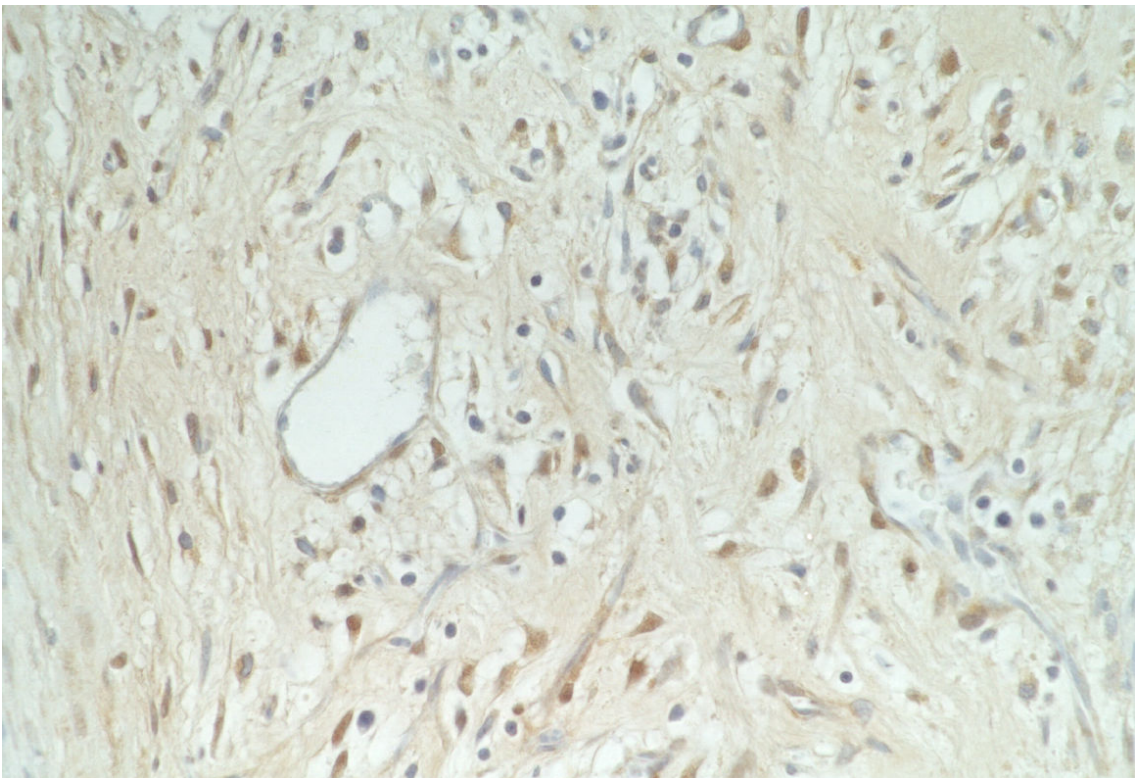
Im Granulationsgewebe der Tiere nach Elektronenbestrahlung mit 24 Gy ist die induzierbare NO-Synthase in kaum einer Zelle nachweisbar (Abb. 11).

Abbildung 12 präsentiert die Positivkontrolle der immunhistochemischen iNOS-Färbung. Es handelt sich um einen histologischen Schnitt der Halsgefäße einer Sprague-Dawley-Ratte, die 24 h zuvor mit Lipopolysaccharid (LPS) behandelt wurde. Man erkennt das iNOS-positive Endothel der Gefäße.

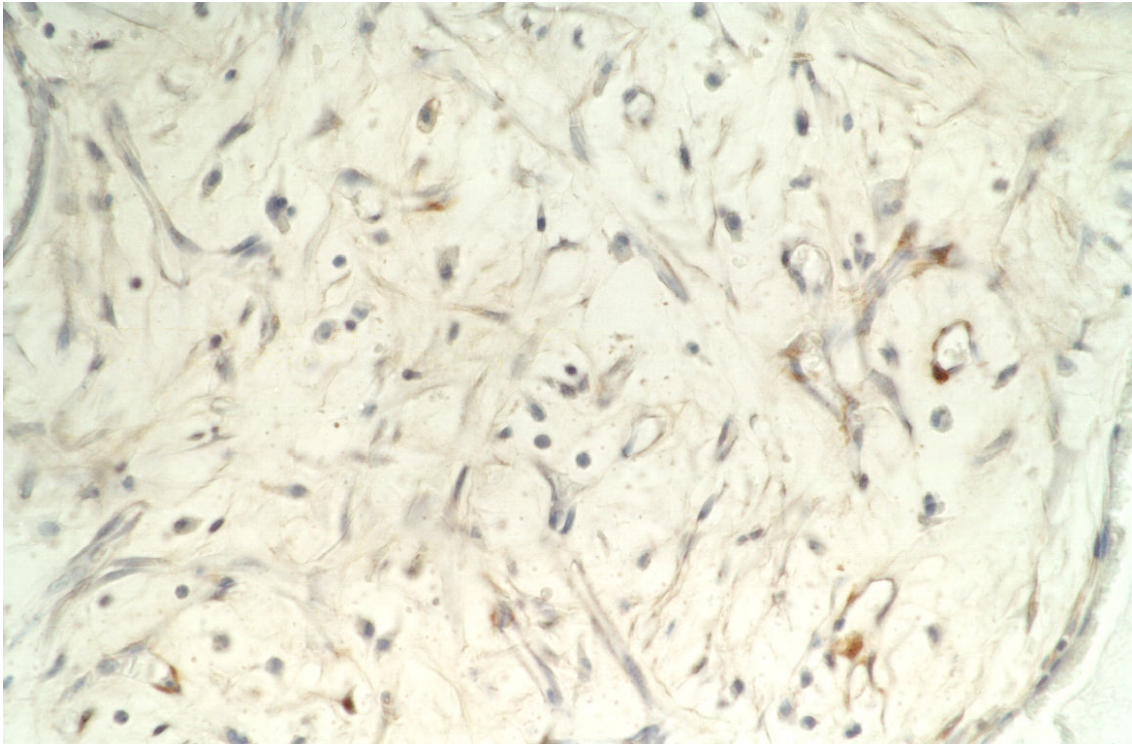
Die Negativkontrolle der immunhistochemischen Färbung eines Kontrolltieres zeigt, dass bei Weglassen des Primärantikörpers anti-iNOS keine der Zellen positiv gefärbt ist (Abb. 13).



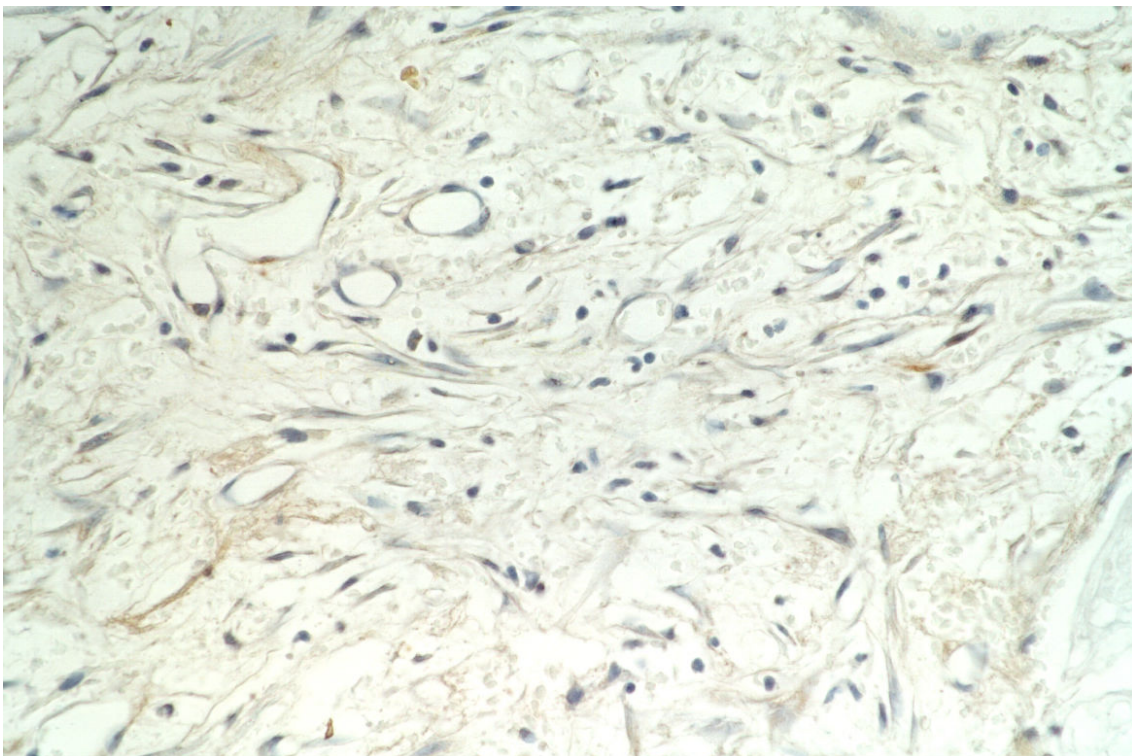
**Abb. 8** Immunhistochemische Färbung der induzierbaren NO-Synthase: Granulationsgewebe eines Kontrolltieres am 10. postoperativen Tag. Die iNOS-positiven Zellen sind braun gefärbt (Chromogen: DAB). 1040-fache Vergrößerung.



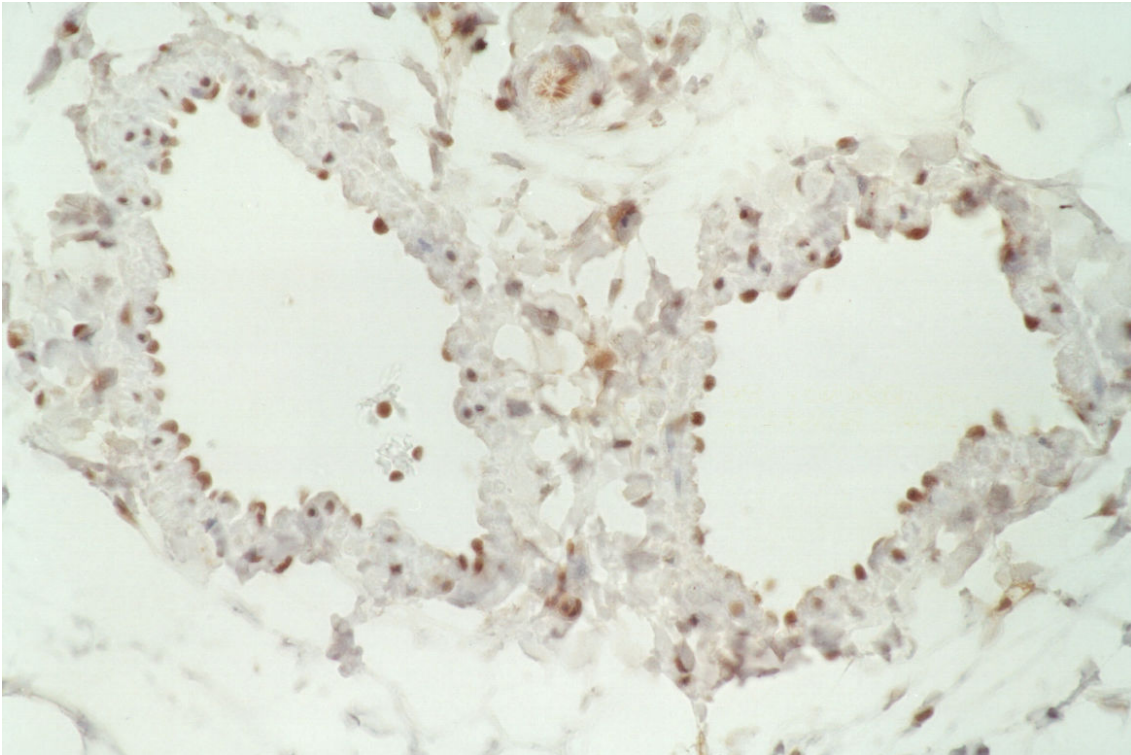
**Abb. 9** Immunhistochemische Färbung der induzierbaren NO-Synthase: Granulationsgewebe eines Kontrolltieres am 10. postoperativen Tag. Die iNOS-positiven Zellen sind braun gefärbt (Chromogen: DAB). 420-fache Vergrößerung.



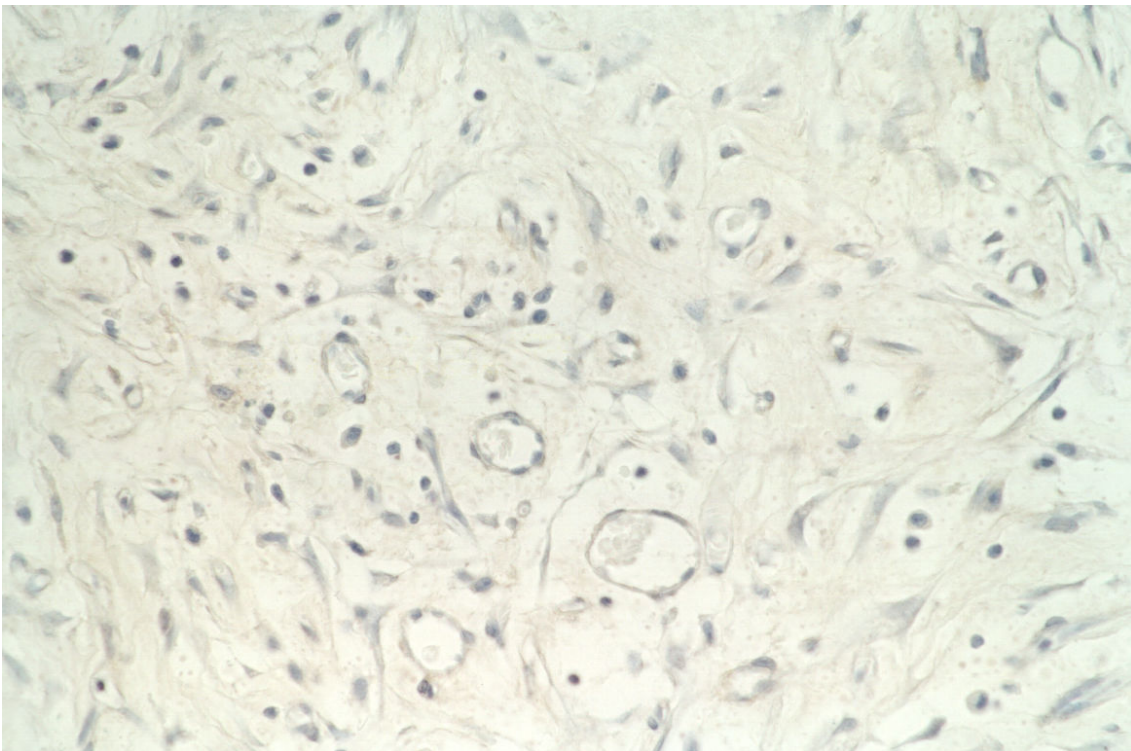
**Abb. 10** Immunhistochemische Färbung der induzierbaren NO-Synthase: Granulationsgewebe eines Tieres der 12 Gy-Gruppe am 10. postoperativen Tag. iNOS-positive Zellen sind braun gefärbt (Chromogen: DAB). 420-fache Vergrößerung.



**Abb.11** Immunhistochemische Färbung der induzierbaren NO-Synthase: Granulationsgewebe eines Tieres der 24 Gy-Gruppe am 10. postoperativen Tag. iNOS-positive Zellen sind braun gefärbt (Chromogen: DAB). 420-fache Vergrößerung.



**Abb. 12** Positivkontrolle: Immunhistochemische Färbung der Halsgefäße einer Ratte 24 Stunden nach intraperitonealer Injektion mit LPS. iNOS-positive Endothelzellen der Gefäße sind braun gefärbt (Chromogen: DAB). 420-fache Vergrößerung.



**Abb. 13** Negativkontrolle: Granulationsgewebe eines Kontrolltieres am 10. postoperativen Tag. Ohne Primärantikörper anti-iNOS ist keine der Zellen positiv gefärbt. 420-fache Vergrößerung.

## 6. Diskussion

Die Kombination aus Strahlentherapie und chirurgischem Eingriff hat in der heutigen Behandlung onkologischer Erkrankungen einen hohen Stellenwert erlangt.

Die Wundheilung stellt einen dynamischen, interaktiven Prozess dar, an dem lösliche Mediatoren, Blut- und Parenchymzellen sowie die extrazelluläre Matrix beteiligt sind. Dies eröffnet eine Vielzahl von Angriffsmöglichkeiten, durch die eine präoperative Bestrahlung den normalen Ablauf der Wundheilung beeinträchtigen kann.

Im besonderen Interesse dieser Arbeit steht die bisher unbekannte Auswirkung der präoperativen Teilkörperbestrahlung durch Elektronen auf die Expression der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) und den Stickstoffmonoxidmetabolismus der Wunde.

Die Teilkörperbestrahlung durch 4 MeV Elektronen beeinträchtigte die Wundheilung der Versuchstiere am 10. postoperativen Tag. Der Hydroxyprolinegehalt im Granulationsgewebe, ein Indexparameter der Kollagensynthese, war bei einer Bestrahlungsdosis von 12 Gy sowie 24 Gy signifikant gegenüber der Kontrolle erniedrigt. Die Teilkörperbestrahlung mit 24 Gy bewirkte eine signifikante Verminderung der frischen sowie der formalinfixierten Wundreißfestigkeit. Zur gleichen Zeit waren die Nitrat- und Nitritkonzentrationen im Wundsekret, die stabilen Oxidationsprodukte des Stickstoffmonoxids, in den bestrahlten Versuchsgruppen signifikant herabgesetzt. Im immunhistochemischen Bild zeigte sich im Wundareal der bestrahlten Tiere eine deutlich verminderte Expression des Stickstoffmonoxid-bildenden Enzyms iNOS gegenüber den Kontrolltieren.

### 6.1. Wundmodell

Um die Vorgänge des normalen Heilungsprozesses und die Faktoren, die Wundheilungsstörungen verursachen können, in vivo kontrolliert und systematisch untersuchen zu können, sind verschiedene Wundheilungsmodelle im Tierversuch



entwickelt worden. In unserer Studie verwendeten wir ein Standardmodell der Wundheilungsforschung [2, 7, 32, 71, 121]. Nach Setzen einer 7 cm langen dorsalen Hautinzision und der subkutanen Implantation von Polyvinylalkohol-Schwämmen erfolgte der Verschluss der Wunde durch Hautklammern. Die Hautinzision der Versuchstiere stellt einen geplanten chirurgischen Eingriff dar und ermöglicht es, durch eine Reihe von Meßmethoden den Grad der Wundheilung unter bestimmten Konditionen zu beurteilen. Die Explantation der PVA-Schwämme und Asservierung der Hautproben erfolgte am 10. postoperativen Tag. Zu diesem Zeitpunkt steht im Wundbereich die Bildung des Granulationsgewebes, die Angiogenese und Synthese der extrazellulären Matrix im Vordergrund [56, 118, 125].

Die mechanische Wundreißfestigkeit ist ein direktes Maß der Wundfestigkeit und korreliert gleichsinnig mit dem Kollagengehalt der Wunden [77]. Die Wundfestigkeit wird durch das Ausmaß der Kollagenablagerung und -formation sowie der Wundmodulation im verletzten Gewebe bestimmt [34]. Neben dem quantitativen Ausmaß der Kollagenablagerung spielt auch die Quervernetzung der Kollagenfibrillen einen wichtigen Beitrag zur Stabilität und Zugfestigkeit der Kollagenfasern [74]. Eine Formalinfixierung der Hautproben führt zu einer Maximierung der Quervernetzung von Kollagenfibrillen. Somit lässt sich eine Aussage treffen, inwiefern ein unterschiedliches Ausmaß der Quervernetzung Festigkeitsunterschiede bedingt [121]. Ein Defizit der Wundreißfestigkeit infolge ionisierender Bestrahlung ist in der Literatur häufig beschrieben worden [14, 28, 49]. Auch unsere Daten zeigten bei einer Dosis von  $D = 24$  Gy eine signifikante Verringerung der frischen und formalinfixierten Wundreißfestigkeit gegenüber den unbestrahlten Kontrollen am 10. postoperativen Tag. Eine zusätzliche Formalinfixierung der Hautstreifen beeinflusste diesen signifikanten Unterschied der frischen Hautproben nicht (Abb. 4 und Abb. 5).

Die Aminosäure Hydroxyprolin wird im Organismus fast ausschließlich im Kollagen gefunden. Daher ist die analysierte Menge im Granulationsgewebe der implantierten Schwämme repräsentativ für die Kollagenablagerung in der Wunde [99, 121]. Die Menge des Kollagens in den implantierten Schwämmen korreliert gleichsinnig mit der Wundreißfestigkeit [107, 140]. Wir konnten eine signifikante Abnahme des Hydroxyprolingehalts im Granulationsgewebes der beiden Bestrahlungsgruppen

D = 12 Gy und D = 24 Gy am 10. postoperativen Tag gegenüber der scheinbestrahlten Kontrolle nachweisen (Abb. 6).

Aus unserem Versuch lässt sich nicht ableiten, ob die Ergebnisse der Wundheilungsparameter auf eine Verzögerung oder eine bleibende Störung der Wundheilung hinweisen. Hierzu müsste man die Parameter über einen wesentlich längeren Zeitraum hinweg zu mehreren Zeitpunkten bestimmen und untersuchen, ob eine mögliche Wundheilungsverzögerung wieder aufgeholt werden kann.

## 6.2. Bestrahlung

Abgesehen von sehr niedrigen Strahlendosen beeinträchtigt eine präoperative Radiotherapie, in Einzel- oder fraktionierten Dosen appliziert, die Wiederherstellung der normalen Hautstruktur und Hautfunktion [14, 18, 128, 142]. Chirurgische Eingriffe, die in chronisch strahlengeschädigtem Gewebe vorgenommen werden, haben eine signifikant erhöhte Komplikationsrate [78, 103, 104].

14 Tage nach der Wundsetzung in vorbestrahlter Haut von Mäusen zeigt sich, dass eine Erhöhung der Strahlendosis eine Herabsetzung der Reißfestigkeit chirurgischer Wunden bedingt. Es ergibt sich ein sigmoider Kurvenverlauf mit einem Schwellenwert von etwa 8 bis 10 Gy Einzeldosis, gefolgt von einer linearen Dosisabhängigkeit bis zu einem Wert von etwa 20 Gy, der die maximale Reduktion der Wundreißfestigkeit erzeugt. Eine Erhöhung der Dosis bis 26 Gy bewirkt keine weitere Verminderung der Wundreißfestigkeit [49]. In unserem Experiment wurden die Tiere in zwei unterschiedlichen Dosen von 12 Gy und 24 Gy bestrahlt.

Die Wahl des Bestrahlungszeitpunktes vor der Operation hat innerhalb einer Zeitspanne von 2 Monaten bis einer Stunde vor der Wundsetzung vergleichbare Auswirkungen auf die Wundreißfestigkeit [49]. Die Operation erfolgte in unserem Experiment 5 Tage nach der Bestrahlung. Dadurch hatten die Tiere Zeit, sich von der Bestrahlung in Narkose zu erholen und die Versuchsdauer wurde überschaubar gehalten. Die Elektronenbestrahlung mit 4 MeV und der Versuchsaufbau des Experiments ermöglichten die Applikation einer Maximaldosis in 3 mm Hauttiefe sowie einen

raschen Dosisabfall in zunehmender Tiefe. Dies gewährleistete eine Schonung darunter gelegener Organe sowie des Knochenmarks und bot folglich eine Minimierung systemischer Auswirkungen [119]. Wir kontrollierten das Differentialblutbild der Versuchstiere, um mögliche systemische Effekte zu erkennen, die zu Beeinträchtigungen der Abwehrlage und Wundheilung der Tiere geführt hätten. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied im Differentialblutbild der bestrahlten Tiere gegenüber der Kontrolle (Tab. 3).

Eine präoperative Strahlenbehandlung steigert die Rate der Wundinfektionen, die mit einem höheren Risiko an Wundheilungsstörungen assoziiert sind [5, 95]. Eine Verminderung der Phagozytose, Superoxidproduktion und MAC-1-Expression durch neutrophile Granulozyten könnte unter anderem die erhöhte Infektanfälligkeit erklären [42]. In unserer Untersuchung wurden nach klinischen Kriterien keine Wundinfektionen dokumentiert.

Die Radiatio führt zu einer Veränderung der Durchblutung. Eine erhöhte Gefäßpermeabilität, Vasodilatation und Ödembildung der Gefäßwände sowie thrombotische Verschlüsse sind Zeichen der Frühphase nach Bestrahlung [15]. In der Spätphase können progressive Gefäßfibrosen und eine Abnahme der Neovaskularisation zu einer Minderdurchblutung des Gewebes führen. Eine herabgesetzte Gewebsinfiltration durch Abwehrzellen und eine eingeschränkte Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff und Nährstoffen sind mögliche Folgen [30].

Die Parenchymzellen des Hautbindegewebes, allen voran die Fibroblasten, werden vorwiegend mit den späten Strahlenfolgen wie der Atrophie, der Kontraktion und Gewebsfibrose sowie chronischen Ulzerationen in Verbindung gebracht [15, 31, 50, 137]. Obwohl die Heilungsparameter in unserem Wundmodell bereits 10 Tage nach der Operation bestimmt wurden, vermag die Untersuchung möglicherweise dennoch chronische Strahlenschäden der betroffenen Zellen zu reflektieren, da die Wundsetzung einen Proliferationsreiz darstellt und die Beeinträchtigung der reproduktiven Integrität der Zellen rascher offen legt [50]. Die synthetische und proliferative Funktion der Fibroblasten kann durch Bestrahlung dauerhaft beeinflusst werden. Die Kollagenproduktion der Fibroblasten und der Kollagengehalt des Granulationsgewebes ist in bestrahlten Wunden herabgesetzt [4, 65]. Die Wundreißfestigkeit ist vermindert

[14, 49, 96] und die Proliferationsaktivität der Fibroblasten nimmt ab [105]. Im Tierversuch kann die Implantation von isogenen Fibroblasten in zuvor bestrahlte Wunden die Wundreißfestigkeit signifikant verbessern [51]. Dies unterstreicht die entscheidende Bedeutung, die eine Verletzung von Fibroblasten bei strahleninduzierten Wundheilungsstörungen einnimmt. In unserer Studie beeinträchtigte eine Einzeldosis tiefenkontrollierter Teilkörperbestrahlung durch Elektronen die Wundheilung am 10. postoperativen Tag. Wir konnten eine signifikante Minderung der frischen und formalinfixierten Wundreißfestigkeit bei einer Dosis von 24 Gy (Abb. 4 und Abb. 5) sowie eine signifikante Reduktion des Hydroxyprolinegehalts bei einer Dosis von 12 Gy und 24 Gy zeigen (Abb. 6).

### **6.3. Gewicht im Versuchsverlauf**

Sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen führt eine protein- und kalorienarme Diät, die mit einer katabolen Stoffwechsellage und einem Gewichtsverlust verbunden ist, zu signifikanten Wundheilungsstörungen [10, 53, 112]. In unserer Studie konnten in den folgenden 5 Tagen nach Bestrahlung die Kontrolltiere und die Bestrahlungsgruppe mit einer Dosis von  $D = 12$  Gy an Gewicht zunehmen, wohingegen die 24 Gy-Gruppe eine leichte Abnahme bzw. einen Stillstand ihres Körpergewichtes verzeichnete. Nach der Operation am 6. Tag steigerten alle 3 Gruppen ihr Gewicht bis zum Versuchsende (Abb. 3). Die relative Gewichtszunahme über den Versuchsverlauf hinweg zeigte keine signifikanten Unterschiede der bestrahlten Gruppen gegenüber der Kontrolle. Dies zeigt, dass die Versuchstiere keine bedeutende Gewichtsabnahme oder katabole Stoffwechsellage boten, was die Wundheilung unabhängig von der Bestrahlung hätte beeinträchtigen können.

## 6.4. Diagnostik des Stickstoffmonoxidstoffwechsels

Aufgrund seiner hohen Reaktionsfreudigkeit und der Halbwertszeit von nur wenigen Sekunden ist die Bestimmung des Stickstoffmonoxids in vivo technisch sehr aufwendig. NO reagiert rasch weiter zu Nitrit und Nitrat und diese Oxidationsprodukte werden über die Niere ausgeschieden. Das endogen synthetisierte Stickstoffmonoxid stellt die Hauptquelle der Nitrit- und Nitratmenge im Serum und Urin dar, abgesehen von einer übermäßigen exogenen Zufuhr über die Nahrung, welche ausgeschlossen werden muss. Aus diesem Grund können die Nitrit- und Nitratwerte als repräsentative Parameter der NO-Diagnostik herangezogen werden [11, 52, 66, 84]. Die Bestimmung von Nitrit und Nitrat im Serum gibt Auskunft über die aktuelle NO-Freisetzung im Körper, während ihre Bestimmung im 24h-Urin einen Anhalt für die NO-Synthese des Körpers im Tagesverlauf gibt. Die Serum- und Urinwerte spiegeln den NO-Metabolismus des gesamten Organismus wieder. Die Analyse der Wundflüssigkeit hingegen ermöglicht eine Aussage über die Synthese an einer bestimmten Lokalisation im Körper, in diesem Fall der untersuchten Wunde. Die Immunhistochemische Färbung der iNOS zeigt die lokale Expression des Enzyms in den Zellen des Gewebeverbandes [86, 150]. Außerdem kann eine Immunoblot-Analyse die iNOS-Proteinexpression feststellen [115] und eine Detektion der iNOS-mRNA ist durch In-situ-Hybridisierung möglich [111].

## 6.5. Stickstoffmonoxidsynthese in der Wunde

Stickstoffmonoxid fungiert als Botenstoff zahlreicher physiologischer Vorgänge im Organismus. Neben der Neurotransmission, der Zellkommunikation und Regulation des Gastrointestinal- und Gefäßtonus wirkt NO bei der Zell-vermittelten Zytotoxizität gegen Erreger und Tumorzellen [1]. Es konnte sowohl im Tierversuch als auch beim Menschen nachgewiesen werden, dass die induzierbare NO-Synthase (iNOS) in chirurgischen Wunden und Verbrennungsverletzungen exprimiert wird und die lokale Stickstoffmonoxidsynthese im Wundareal erhöht ist [3, 21, 38, 94, 101, 111]. Als zellulärer Ort der Stickstoffmonoxidsynthese sind Entzündungszellen (Makrophagen,

Lymphozyten, neutrophile Granulozyten), Thrombozyten, Endothelzellen, Keratinozyten und Fibroblasten identifiziert worden [54, 62, 81, 98, 111, 134, 145, 146]. Die genauen Funktionen und molekularen Wirkungsweisen des Stickstoffmonoxids im Heilungsprozess sind bisher jedoch unbekannt.

Arginin ist das physiologische Substrat der Stickstoffmonoxidsynthese durch die NO-Synthasen. Der Zusatz von Arginin zur Nahrung steigert die Wundheilung sowohl bei gesunden Individuen [9, 121] als auch im Rahmen einer supprimierten Wundheilung [63]. Ein Argininmangel führt zu einer Beeinträchtigung der Wundheilung mit einer herabgesetzten Reißfestigkeit der Wunden und einem erniedrigten Kollagengehalt des Granulationsgewebes [121]. Ein Argininzusatz in der Nahrung von iNOS-knockout-Mäusen bewirkt im Gegensatz zu den Wildtypen keine Steigerung der Heilung in Form einer erhöhten Wundreißfestigkeit oder einer verstärkten Kollagenablagerung [123]. Diese Studien unterstreichen die wichtige Bedeutung des Arginins für den normalen Wundheilungsprozess und weisen auf einen möglichen Zusammenhang mit seiner Funktion als einziges physiologisches Substrat der NO-Synthese hin.

Die stabilen Endprodukte der NO-Synthese, Nitrat und Nitrit, sind in der Wundflüssigkeit chirurgischer Wunden vorübergehend erhöht [3]. Tierexperimentell kommt es infolge von Verbrennungsverletzungen und chirurgischen Wunden zu einer anhaltend gesteigerten Nitratausscheidung über den Urin [12, 21, 126]. Ratten mit einer beeinträchtigten Wundheilung infolge einer Steroidtherapie oder eines Diabetes mellitus zeigen eine verringerte Nitratexkretion über den Urin [19] und eine verminderte NO-Akkumulation im Wundsekret [113]. Die erhöhten Nitrat- und Nitritwerte in der Wundflüssigkeit sprechen für eine gesteigerte NO-Synthese in den Wunden. Die Nitrat- und Nitritausscheidung über den Urin lässt aber im Gegensatz zur Konzentrationsbestimmung der Wundflüssigkeit keine Aussage über den eigentlichen Syntheseort zu.

Die induzierbare NO-Synthase wird bekanntermaßen bei Entzündungsprozessen exprimiert und produziert verglichen zu den konstitutiven NO-Synthasen (nNOS, eNOS) 100- bis 1000-fache Konzentrationen des Stickstoffmonoxids [61]. In vitro zeigen humane Hautfibroblasten in unstimuliertem Zustand die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige NO-Synthaseaktivität der konstitutiven Formen (cNOS), wohingegen durch Interferon- $\gamma$

---

oder Lipopolysaccharid stimulierte Hautfibroblasten sowohl die  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängige Aktivität der eNOS als auch die  $\text{Ca}^{2+}$ -unabhängige Aktivität der iNOS zeigen [143]. Möglicherweise stehen die konstitutiven NO-Synthasen für eine basale Grundaktivität und NO-Synthese in gesundem Gewebe, wohingegen die iNOS bei einschneidenden Ereignissen wie einer Entzündung oder Verletzung des Gewebes mit ihrer wesentlich höheren Syntheseleistung im Vordergrund steht. In Wunden beginnt die gesteigerte NO-Synthese durch die induzierbare NO-Synthase kurz nach der Verletzung und hält für die Dauer des gesamten Heilungsprozesses an [21, 43, 110]. Sie bleibt damit nicht nur auf die entzündliche Phase zu Beginn der Wundheilung begrenzt. Dem Stickstoffmonoxid könnten daher neben einer frühen Bedeutung im Entzündungsprozess auch zu einem späteren Zeitpunkt Funktionen bei der Proliferation und Gewebemodulation zukommen.

## **6.6. Stickstoffmonoxid und seine Bedeutung in der Wundheilung**

Es sind verschiedene Mechanismen denkbar, über die das Stickstoffmonoxid in den Wundheilungsprozess eingreifen könnte. Mögliche Ansatzstellen werden bei der Angiogenese und Gewebsdurchblutung, der unspezifischen Immunabwehr, der Proliferation und Migration von Endothel- und Epithelzellen sowie der Kollagensynthese vermutet.

Die Angiogenese ist eine Schlüsselkomponente der Wundheilung. Sie kann durch NO-Donatoren angeregt werden [153]. In eNOS-knock-out-Mäusen kommt es zu einer herabgesetzten Gefäßneubildung und Beeinträchtigung der Wundheilung [68]. Der angiogenetische Effekt des Stickstoffmonoxids wird möglicherweise direkt oder indirekt über die Stimulation der Endothelzellen zur Proliferation und Migration vermittelt [13, 83, 89]. In Keratinozyten vermittelt NO die Synthese des Angiogenesefaktors VEGF [39]. Zudem konnte gezeigt werden, dass Stickstoffmonoxid für die angiogenetische Aktivität der Makrophagen erforderlich ist [70].

Die Reepithelialisierung von Hautwunden erfordert einen normalen Ablauf der Epithelmigration und -proliferation. Verletzte Keratinozyten exprimieren die iNOS [54].

---

Eine Inhibition der NO-Synthese durch N<sup>6</sup>-Iminoethyl-L-Lysin hemmt die Epithelialisierung [129]. Bei Ratten verzögert die lokale Applikation des NO-Synthase-Inhibitor L-NAME (N<sup>G</sup>-Nitro-L-Arginin-methylhydrochlorid) die Heilung UV-Licht-induzierter Hautnekrosen und vermindert die Zahl der proliferierenden Keratinozyten [13]. NO könnte als Signalmolekül wirken, das die lokalen Epithelzellen direkt oder indirekt zur Proliferation und Migration anregt [13, 89].

Als Transmitter der Gefäßrelaxation kann Stickstoffmonoxid die Blutflussrate im Wundareal erhöhen und somit zu einer vermehrten Sauerstoff- und Nährstoffversorgung und einer gesteigerten zellulären Infiltration des Gewebes führen [17]. Die NO-Synthese infiltrierender Entzündungszellen wiederum kann einen unspezifischen Abwehrmechanismus gegen eingedrungene Erreger darstellen und das Risiko einer Wundinfektion senken [144].

Eine weitere, entscheidende Bedeutung wird dem Stickstoffmonoxid bei der Kollagensynthese der Fibroblasten zugemessen. Unter normalen Bedingungen sind die Fibroblasten für die Gewebsintegrität und den Stoffwechsel der extrazellulären Matrix verantwortlich. Sie synthetisieren strukturelle (z.B. Kollagen) und funktionelle (z.B. Kollagenase) Proteine. Wundfibroblasten sind im Vergleich zu normalen Hautfibroblasten durch eine herabgesetzte Proliferationsrate, erhöhte Kollagenbildung und gesteigerte Fähigkeit zur Wundkontraktion gekennzeichnet [47, 100, 111]. Sie sind selbst zur NO-Synthese fähig und schließen sich damit einer Reihe von Zellen im Wundmilieu an, wie beispielsweise den Makrophagen, Endothelzellen und Keratinozyten. Die Induktion der Fibroblasten zur gesteigerten NO-Synthese erfolgt möglicherweise durch Komponenten des Wundmilieus, denn Wundfibroblasten verlieren die Fähigkeit zur NO-Synthese in der Zellkultur bereits ab der zweiten Passage [111]. Das Wundmilieu enthält eine Vielzahl an Wachstumshormonen und Zytokinen, die Einfluss auf die NO-Produktion der Wundzellen nehmen könnten [24, 26, 37]. So wurde gezeigt, dass INF- $\gamma$ , Il-1 $\alpha$ , Il-2, TNF- $\alpha$  und Lipopolysaccharid in vitro die NO-Synthese in Entzündungszellen, glatten Muskelzellen, Hepatozyten und Fibroblasten induzieren [20, 46, 133, 145]. TGF- $\beta$ , Il-4 und Il-10 hingegen können die NO-Synthese in Makrophagen hemmen [27, 29, 35, 73, 141].



---

In-vitro-Versuche bei Ratten haben gezeigt, dass die Hemmung der NO-Synthese isolierter Wundfibroblasten durch NOS-Inhibitoren zu einer signifikanten Abnahme der Kollagenbildung derselben Zellen führt und die Aktivität der Wundkontraktion senkt. Die Gesamtproteinsynthese und die Proliferationstendenz der Fibroblasten bleiben dabei unbeeinflusst [111, 146]. Das durch Wundfibroblasten synthetisierte NO könnte daher durch einen autokrinen und parakrinen Regulationsmechanismus Einfluss auf die eigene Kollagensynthese dieser Zellpopulation nehmen. Zudem könnte das durch andere Wundzellen produzierte Stickstoffmonoxid parakrin die Kollagensynthese der Fibroblasten regulieren. In vitro kann die NO-freisetzende Substanz S-Nitroso-N-Acetyl-Pencillamin bei isolierten normalen Hautfibroblasten, die spontan kein NO synthetisieren, einen Anstieg der Kollagenbildung hervorrufen [146]. Somit scheint auch exogen zugeführtes NO die Kollagensynthese in vitro beeinflussen zu können.

In vivo verzögert die lokale und systemische Verabreichung von kompetitiven Hemmstoffen der NO-Synthase den Wundheilungsprozess. Dies spiegelt sich in einer verminderten Kollagensynthese und einer herabgesetzten mechanischen Festigkeit der Wunden wieder [19, 109]. Die carageenan-induzierte Bildung von Granulationsgewebe in Wunden kann durch Gabe des NOS-Inhibitors N<sup>G</sup>-Nitro-L-Argininmethylester dosisabhängig vermindert werden [58]. Lokal applizierte NO-Donatoren hingegen beschleunigen den Wundverschluss normaler Ratten [122]. Bei diabetischen Ratten kann die enterale Verabreichung von Molsidomin, das nach Umwandlung in einen aktiven Metaboliten zur NO-Freisetzung führt, zu einer beschleunigten Kollagenbildung führen [148]. Diese Studien zeigen, welche signifikanten Auswirkungen künstlich erzeugte, lokale Mangelzustände oder die Supplementation von NO auf den Heilungsprozess und die Kollagensynthese in vivo haben. Sie sprechen für eine wichtige Mediatorfunktion des Stickstoffmonoxids in diesem Zusammenhang.

Untersuchungen durch Yamasaki et al. zeigen, dass iNOS-knock-out-Mäuse gegenüber dem Wildtyp eine signifikant verzögerte Wundheilung aufweisen. Eine vergleichbare Verzögerung des Wundverschlusses sieht man bei Tieren vom Wildtyp, die mit einer kontinuierlichen Infusion des partiell selektiven iNOS-Inhibitors N<sup>6</sup>-Iminoethyl-L-Lysin behandelt wurden. Die Verzögerung der Wundheilung lässt sich durch eine Transfektion humaner iNOS-cDNA mittels einmaliger lokaler Applikation eines

adenoviralen Vektors zum Zeitpunkt der Wundsetzung aufheben [152]. Im gleichen Wundmodell, das in unserer Studie verwendet wurde, kann in Hautwunden von Ratten nach einer in-vivo-Transfektion humaner iNOS-cDNA eine Steigerung der NO-Synthese gefolgt von einer vermehrten Kollagenablagerung nachgewiesen werden [135]. Diese Untersuchungen heben die funktionale Rolle der induzierbaren NO-Synthase als Stickstoffmonoxidquelle im Heilungsprozess hervor. Sie unterstreichen den Effekt, den eine verminderte oder eine verstärkte NO-Konzentration im Wundmilieu auf den normalen Wundheilungsablauf und insbesondere die Kollagensynthese ausübt.

Andere Untersuchungen ergaben hemmende Effekte des Stickstoffmonoxids auf die Kollagen- und Proteinsynthese [67, 138]. So verursachen die NO-Donatoren S-Nitroso-N-Acetyl-Pencillamin und Nitroprussid in vitro eine dosisabhängige Inhibition der Gesamtprotein- und Kollagensynthese in den glatten Muskelzellen von Kaninchenarterien [67]. Diese gegensätzlichen Befunde könnten durch die Verwendung wesentlich größerer NO-Konzentrationen dieser Studien zustande kommen. Es wäre möglich, dass geringere NO-Konzentrationen, wie sie etwa durch Fibroblasten im Wundsitus synthetisiert werden, eine regulatorische Aufgabe übernehmen. Höhere Stickstoffmonoxid-Konzentrationen durch NO-freisetzende Substanzen könnten bereits toxisch wirken.

Zudem scheinen in den frühen Tagen der Wundheilung gegensätzliche Ergebnisse möglich zu sein. Eine täglich zweimalige, lokale Applikation des NO-Inhibitors NMMA innerhalb der ersten 3 postoperativen Tage führt zu einer vermehrten Kollagenablagerung [64]. Die lokale Verabreichung des NO-Donors Natriumnitroprussid bis zum 5. postoperativen Tag hemmt die Kollagensynthese [124]. Eine mögliche Erklärung dafür ist, dass NO in der frühen Entzündungsphase der Wundheilung hemmende Effekte ausübt und in der späteren Proliferations- und Modulationsphase die Kollagensynthese und Heilung stimuliert. Dem Stickstoffmonoxid könnten in den verschiedenen Zell- und Gewebstypen unterschiedliche Aufgaben zu unterschiedlichen Zeitpunkten der Wundheilung zuteil werden. Der Mechanismus, durch den NO die Kollagenbildung im Wundheilungsprozess stimuliert, ist noch völlig unbekannt. Das Kollagen wird während

---

des Wundheilungsprozesses in verschiedenen Vorgängen alteriert. Die Kollagensynthese, die Quervernetzung des Kollagens und der Abbau des Kollagens durch Matrixmetalloproteinasen könnten direkt durch NO oder indirekt über einen Einfluss auf andere Mediatoren beeinflusst werden.

## 6.7. Stickstoffmonoxid bei Wundheilungsstörungen

Erkrankungen wie der Diabetes mellitus, Therapien mit Kortikosteroiden oder Immunsuppressiva sowie eine akute Protein-Kalorien-Mangelernährung stellen Risikofaktoren zur Entstehung von Wundheilungsstörungen dar und haben eine erhöhte Rate chronischer Wunden zur Folge. Im Tierversuch zeigt sich bei einer Steroidtherapie oder einem induzierten Diabetes mellitus eine verminderte iNOS-Expression und herabgesetzte Stickstoffmonoxidsynthese. Der Wundsitus ist durch eine verringerte Kollagen- und Granulationsbildung gekennzeichnet [19, 113]. Vergleichbare Ergebnisse konnten bei einer Protein-Kalorien-Mangelernährung und der Behandlung mit dem Immunsuppressivum Tacrolimus demonstriert werden [112, 116]. Dies zeigt, dass in diesen Modellen supprimierter Wundheilung der NO-Metabolismus in der Wunde gestört ist und möglicherweise neben einer Beeinträchtigung anderer funktionaler Mechanismen des Heilungsprozesses die Wundheilungsstörungen bedingt.

Eine weitere Risikogruppe für Wundheilungsstörungen stellen Patienten mit einer präoperativen Strahlentherapie dar. In unserer Studie konnten wir zeigen, dass auch hierbei eine Wechselbeziehung zwischen einer gestörten Wundheilung nach Bestrahlung und einer verminderten iNOS-Expression und NO-Synthese im Wundareal besteht. Bei einer präoperativen Strahlendosis von 24 Gy waren die frische und formalinfixierte Wundreißfestigkeit signifikant herabgesetzt (Abb. 4 und Abb. 5). Der Hydroxyprolinegehalt des Granulationsgewebes, gemessen als Indexparameter der Kollagensynthese, zeigte bereits bei einer Dosis von 12 Gy eine signifikante Reduktion (Abb. 6). Parallel zu der Hemmung der Wundheilung war die Synthese der stabilen Oxidationsprodukte des Stickstoffmonoxids Nitrit und Nitrat vermindert (Abb. 7). Im immunhistologischen Bild war eine deutlich herabgesetzte Expression des

Stickstoffmonoxid bildenden Enzyms iNOS nach Bestrahlung erkennbar (Abb. 8-11). Aufgrund unserer Untersuchungen ist keine Aussage über den molekularen Wirkungsmechanismus möglich, durch den die Bestrahlung die NO-Synthese im Wundareal modifiziert. Auf molekulargenetischer Ebene könnte es zu Veränderungen oder einer Zerstörung genetischer Information kommen und konsekutiv eine verminderte Expression des iNOS-Enzyms bedingen. Auf post-transkriptioneller Ebene könnte die herabgesetzte Expression der induzierbaren NO-Synthase durch Veränderungen im Wundmilieu oder beispielsweise einen verstärkten Abbau des Enzyms zustande kommen. Zahlreiche Studien haben dem Stickstoffmonoxid eine wichtige Mediatorfunktion bei der Wundheilung zugeschrieben. NO wurde als autokriner Regulator der Kollagensynthese von Wundfibroblasten identifiziert [111]. Wie die Ergebnisse unserer Studie zeigen, kommt es infolge der Bestrahlung zu einer deutlichen Abnahme der iNOS-Expression und signifikanten Reduktion der NO-Synthese, welche die Verminderung der Kollagensynthese und Wundheilungsstörung bedingen könnte. Die Daten unserer Studie beziehen sich auf den 10. postoperativen Tag. Daher lässt sich keine Aussage treffen, ob es sich um eine dauerhafte Störung der Heilung oder lediglich um eine Wundheilungsverzögerung handelt.

## **6.8. Schlussfolgerung**

Stickstoffmonoxid wird im Heilungsprozess durch Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten der Wunde synthetisiert [19, 111, 152]. In Modellen einer gestörten Wundheilung wird eine verminderte NO-Synthese und iNOS-Expression im Wundareal von einer herabgesetzten Kollagensynthese und Wundfestigkeit begleitet [19, 112, 113]. Experimentell verursacht die lokale oder systemische Verabreichung von NOS-Inhibitoren eine Wundheilungsverzögerung [19, 58, 109], wohingegen NO-Donatoren den Wundverschluss beschleunigen können [122]. iNOS-defiziente Mäuse verzeichnen eine signifikante Wundheilungsstörung, die *in vivo* durch iNOS-Transfektion ausgeglichen werden kann [152]. Die iNOS-Transfektion bei gesunden Tieren führt experimentell zu einer Steigerung der NO-Synthese und Kollagenablagerung [135].

Die Gesamtheit dieser Ergebnisse legt nahe, dass Stickstoffmonoxid eine wichtige Rolle bei der Kollagenablagerung der extrazellulären Matrix spielt und signifikant zum Resultat der Wundheilung und der Festigkeit des Wund- und Narbengewebes beiträgt. In unserer experimentellen Studie konnten wir zeigen, dass bestrahlungsinduzierte Wundheilungsstörungen, die sich durch eine signifikante Abnahme der Wundreißfestigkeit und der Kollagenablagerung auszeichneten, ebenfalls mit einer verminderten NO-Synthese und iNOS-Expression einhergingen. Dies könnte, zumindest teilweise, durch die Störung einer NO-vermittelten Regulation der Wundkollagensynthese durch Fibroblasten hervorgerufen werden [111]. Auch in humanen Wunden konnte die Expression der induzierbaren NO-Synthase immunhistochemisch nachgewiesen werden [94]. So eröffnen die bisherigen Erkenntnisse die Aussicht auf eine Reihe möglicher Therapiestrategien in der Zukunft. Angefangen von einer einfachen Supplementation des Arginins, dem Substrat der induzierbaren NO-Synthase, sind lokale Applikationen von NO-Donatoren bis hin zu Gentherapien bei iNOS-defizienten Zuständen, wie dem Diabetes mellitus oder strahleninduzierten Wundheilungsstörungen, denkbar. Zunächst muss jedoch geklärt werden, ob die experimentell ermittelten Daten auf den Menschen übertragbar sind. Ob die NO-Synthese in humanen Wunden ebenfalls eine entscheidende Rolle für den Heilungsprozess darstellt und sich aus der Modulation des NO-Metabolismus Strategien zur Behandlung chronischer Wunden ableiten lassen, muss gegenwärtig unbeantwortet bleiben.

## 7. Zusammenfassung

Eine Strahlentherapie kann Wundheilungsstörungen induzieren. Die präoperative Radiatio findet in der Behandlung onkologischer Erkrankungen eine immer breitere Anwendung. Damit erhöht sich auch die Rate postoperativer Heilungskomplikationen. Dem Stickstoffmonoxid wird eine wichtige Mediatorfunktion in der Wundheilung, insbesondere bei der Regulation der Kollagensynthese durch Wundfibroblasten, zugeschrieben. Die vorliegende Arbeit untersuchte die bisher unbekannte Wirkung einer präoperativen Bestrahlung auf die Stickstoffmonoxidsynthese und Expression des Stickstoffmonoxid bildenden Enzyms iNOS im Zusammenhang mit ihrer Auswirkung auf die Wundheilung.

Die Versuchstiere wurden randomisiert in 3 Gruppen aufgeteilt (12 Gy, 24 Gy und Kontrollgruppe). Die Teilkörperbestrahlung erfolgte mit 4 MeV Elektronen durch einen Linearbeschleuniger, wobei die Einzeldosen 12 Gy beziehungsweise 24 Gy betragen und die Kontrollgruppe scheinbestrahlt wurde. Fünf Tage später erfolgte die standardisierte Wundsetzung in dem genau definierten, bestrahlten Areal am Rücken der Tiere, gefolgt von einer subkutanen Implantation der Polyvinylalkohol-Schwämme. Die Wunde wurde durch Hautklammern verschlossen. Nach weiteren 10 Tagen fand die Explantation der PVA-Schwämme und die Asservierung der Haut- und Blutproben sowie der Wundflüssigkeit statt.

Die Untersuchung der Wundheilungsparameter am 10. postoperativen Tag ergab eine signifikante Störung der Wundheilung. Die frische und die formalinfixierte Wundreißfestigkeit (mechanische Parameter der Wundheilung) waren infolge einer Bestrahlungsdosis von  $D = 24 \text{ Gy}$  signifikant vermindert ( $\alpha = 0,05$ ). Der Hydroxyprolinegehalt des Wundgranulationsgewebes in den implantierten PVA-Schwämmen, ein Index der Kollagenablagerung, war in beiden Bestrahlungsgruppen ( $D = 12 \text{ Gy}$  bzw.  $24 \text{ Gy}$ ) signifikant herabgesetzt ( $\alpha = 0,05$ ). Gleichzeitig bewirkten die Dosen von 12 Gy und 24 Gy eine signifikante Reduktion der Nitrit- und Nitratkonzentration, den stabilen Oxidationsprodukten des Stickstoffmonoxids, im Wundsekret ( $\alpha = 0,05$ ). Die immunhistochemischen Färbungen zeigten eine starke

Verminderung der Expression der induzierbaren NO-Synthase im Granulationsgewebe der bestrahlten Wunden. Alle 3 Gruppen nahmen bis zum Versuchsende an Gewicht zu und ihre relative Gewichtszunahme ergab keine signifikanten Unterschiede. Dies deutet darauf hin, dass die Tiere die Bestrahlungs- und Operationsprozedur gut tolerierten und dass es zu keiner relevanten Gewichtsabnahme oder katabolen Stoffwechsellage kam, die die Wundheilung der Tiere ihrerseits hätte beeinflussen können. Die Bestrahlung hatte keine signifikante Auswirkung auf die Leukozytenzahlen und das Differentialblutbild, was gegen eine systemische Wirkung der Teilkörperbestrahlung spricht.

Die Ergebnisse unserer Studie zeigen, dass die Bestrahlung neben einer Wundheilungsstörung auch zu einer Beeinträchtigung des NO-Metabolismus im Sinne einer verminderten NO-Synthase und reduzierten iNOS-Expression führt. Die Untersuchungen anderer Autoren ergaben, dass die Hemmung der NO-Synthase oder ein genetischer Mangel des Stickstoffmonoxid bildenden Enzyms iNOS zu Wundheilungsstörungen führt. Dahingegen kann die Verabreichung von NO-Donatoren oder eine in-vivo-iNOS-Transfektion die Wundheilung steigern. In experimentellen Modellen einer gestörten Wundheilung wie dem Diabetes mellitus konnte ebenfalls eine verminderte NO-Synthase gefolgt von einer herabgesetzten Kollagenablagerung und Wundreißfestigkeit beobachtet werden. Es gibt Anhaltspunkte dafür, dass NO eine wichtige, regulatorische Transmitterfunktion bei der Kollagensynthese durch Wundfibroblasten übernimmt und damit entscheidend zur Festigkeit des Wund- und Narbengewebes beiträgt. Die in unserer Studie nachgewiesene Beeinträchtigung der NO-Synthase in bestrahlten Wunden könnte, unter anderen Mechanismen, ursächlich für bestrahlungsinduzierte Wundheilungsstörungen sein. Damit würden sich mögliche Behandlungsstrategien wie beispielsweise eine lokale oder systemische Verabreichung von NO-freisetzenden Substanzen bis hin zu einer Gentherapie bei iNOS-defizienten Zuständen eröffnen. Zunächst gilt es aber, die Kausalität der beschriebenen Befunde zu klären, sowie zu untersuchen, ob die experimentell ermittelten Daten auch auf die Wundphysiologie des Menschen übertragbar sind.

## 8. Literaturverzeichnis

1. Änggård, E. (1994)  
Nitric oxide: mediator, murderer and medicine.  
Lancet 343, 1199-1206
2. Albina, J.E., Mills, C.D., Barbul, A., Thirkill, C.E., Henry, W.L., Mastrofrancesco, B., Caldwell, M.D. (1988)  
Arginine metabolism in wounds.  
Am. J. Physiol. 254, E459-E467
3. Albina, J.E., Mills, C.D., Henry, W.L., Caldwell, M.D. (1990)  
Temporal expression of different pathways of l-arginine metabolism in healing wounds.  
J. Immunol. 144, 3877-3880
4. Archer, R.R., Greenwell, E.J., Ware, T., Weeks, P.M. (1970)  
Irradiation effect on wound healing in rats.  
Radiat. Res. 41, 104-112
5. Ariyan, S., Marfuggi, R.A., Harder, G., Goodie, M.M. (1980)  
An experimental model to determine the effects of adjuvant therapy on the incidence of postoperative wound infection: I. Evaluating preoperative radiation therapy.  
Plast. Reconstr. Surg. 65, 328-337
6. Assreuy, J., Cunha, F.Q., Liew, F.Y., Moncada, S. (1993)  
Feedback inhibition of nitric oxide synthase activity by nitric oxide.  
Br. J. Pharmacol. 108, 833-837
7. Barbul, A., Fishel, R.S., Shimazu, S., Wasserkrug, H.L., Yoshimura, N.N., Tao, R.C., Efron, G. (1985)  
Intravenous hyperalimentation with high arginine levels improves wound healing and immune function.  
J. Surg. Res. 38, 328-334
8. Barbul, A. (1990a)  
Immune aspects of wound repair.  
Clin. Plast. Surg. 17, 433-442
9. Barbul, A., Lazarou, S.A., Efron, D.T., Wasserkrug, H.L., Efron, G. (1990b)  
Arginine enhances wound healing and lymphocyte immune responses in humans.  
Surgery 108, 331-337
10. Barbul, A., Purtill, W.A. (1994)  
Nutrition in wound healing.  
Clin. Dermatol. 12, 133-140



11. Baylis, C., Vallence, P. (1998)  
Measurement of nitrite and nitrate in plasma and urine – what does this measure tell us about the activity of the endogenous nitric oxide?  
*Curr. Opin. Nephro. Hyperten.* 7, 59-62
12. Becker, W.K., Shippee, R.L., McManus, A.T., Mason Jr., A.D., Pruitt Jr., B.A. (1993)  
Kinetics of nitrogen oxide production following experimental thermal injury in rats.  
*J. Trauma.* 34, 855-862
13. Benrath, J., Zimmermann, M., Gillardon, F. (1995)  
Substance P and nitric oxide mediate wound healing of ultraviolet photodamaged rat skin: evidence for an effect of nitric oxide keratinocyte proliferation.  
*Neurosci. Lett.* 200, 17-20
14. Bernstein, E.F., Salomon, G.D., Harisiadis, L., Talbot, T., Harrington, F., Russo, A., Uitto, J. (1993a)  
Collagen gene expression and wound strength in normal and radiation-impaired wounds.  
*J. Dermatol. Surg. Oncol.* 19, 564-570
15. Bernstein, E.F., Sullivan, F.J., Mitchell, J.B., Salomon, G.D., Glatstein, E. (1993b)  
Biology of chronic radiation effect on tissues and wound healing.  
*Clin. Plast. Surg.* 20, 435-453
16. Bredt, D.S., Hwang, P.M., Glatt, C.E., Lowenstein, C., Reed, R.R., Snyder, S.H. (1991)  
Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles cytochrome P-450 reductase.  
*Nature* 351, 714-718
17. Bruch-Gerharz, D., Ruzicka, T., Kolb-Bachhofen, V. (1998)  
Nitric oxide in human skin: current status and future prospects.  
*J. Invest. Dermatol.* 110, 1-7
18. Bujko, K., Suit, H.D., Springfield, D.S., Convery, K. (1993)  
Wound healing after preoperative radiation for sarcoma of soft tissues.  
*Surg. Gynecol. Obstet.* 176, 124-134
19. Bulgrin, J.P., Shabani, M., Chakrovarthy, D., Smith, D.J. (1995)  
Nitric oxide synthesis is suppressed in steroid-impaired and diabetic wounds.  
*Wounds* 7, 48-57
20. Busse, R., Mülsch, A. (1990)  
Induction of nitric oxide synthase by cytokines in smooth muscle cells.  
*FEBS Lett.* 275, 87-92

- 
21. Carter, E.A., Derojas-Walker, T., Tamir, S., Tannenbaum, S.R., Yu, Y.M., Tompkins, R.G. (1994)  
Nitric oxide production is intensely and persistently increased in tissue by thermal injury.  
Biochem. J. 304, 201-204
22. Chartrain, N.A., Geller, D.A., Koty, P.P., Sitrin, N.F., Nussler, A.K., Hoffman, E.P., Billar, T.R., Hutchinson, N.I., Mudgett, J.S. (1994)  
Molecular cloning, structure and chromosomal localization of the human inducible nitric oxide synthase gene.  
J. Biol. Chem. 269, 6765-6772
23. Chyun, J.-H., Griminger, P. (1984)  
Improvement of nitrogen retention by arginine and glycine supplementation and its relation to collagen synthesis in traumatized mature and aged rats.  
J. Nutr. 114, 1697-1704
24. Cooper, D.M., Yu, E.Z., Hennessey, P., Ko, F., Robson, M.C. (1994)  
Determination of endogenous cytokines in chronic wounds.  
Ann. Surg. 219, 688-692
25. Creemers, L.B., Jansen, D.C., van Veen-Reurings, A., van den Bos, T., Everts, V. (1997)  
Microassay for the assessment of low levels of hydroxyproline.  
Biotechniques 22, 656-658
26. Cromack, D.T., Sporn, M.B., Roberts, A.B., Merino, M.J., Dart, L.L., Norton, J.A. (1987)  
Transforming growth factor  $\beta$  levels in rats wound chambers.  
J. Surg. Res. 42, 622-627
27. Cunha, F.Q., Moncada, S., Liew, F.Y. (1992)  
Interleukin-10 inhibits the induction of nitric oxide synthase by interferon- $\gamma$  in murine macrophages.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 186, 1155-1159
28. Devereux, D.F., Kent, H., Brennan, M.F. (1980)  
Time dependent effects of adriamycin and x-ray therapy on wound healing in the rat.  
Cancer 45, 2805-2810
29. Ding, A., Nathan, C.F., Graycar, J., Derynck, R., Stuehr, D.J., Srinivasan, S. (1990)  
Macrophage deactivating factor and transforming growth factors- $\beta$ 1, - $\beta$ 2 and - $\beta$ 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by INF- $\gamma$ .  
J. Immunol. 145, 940-944

- 
30. Doyle, J.W., Li, Y., Salloum, A., Fitzgerald, T.J., Walton, R.L. (1996)  
The effects of radiation on neovascularization in a rat model.  
Plast. Reconstr. Surg. 98, 129-134
31. Drake, D.B., Oishi, S.N. (1995)  
Wound healing considerations in chemotherapy and radiation therapy.  
Clin. Plast. Surg. 22, 31-37
32. Edwards, L.C., Permokas, L.N., Dunphy, J.E. (1957)  
The use of a plastic sponge to sample regenerating tissue in healing wounds.  
Surg. Gynecol. Obstet. 105, 303-309
33. Efron, J.E., Frankel, H.L., Lazarou, S.A., Wasserkrug, H.L., Barbul, A. (1990)  
Wound healing and T-lymphocytes.  
J. Surg. Res. 48, 460-463
34. Fleischmajer, R., Perish, J.S., Timpl, J.S. (1985)  
Collagen fibrillogenesis in human skin.  
Ann. NY Acad. Sci. 460, 246-257
35. Förstermann, U., Schmidt, H.H.H.W., Kohlhaas, L., Murad, F. (1992)  
Induced RAW 264.7 macrophages express soluble and particulate nitric oxide synthase: inhibition by transforming growth factor- $\beta$ .  
Eur. J. Pharmacol. 225, 161-165
36. Förstermann, U., Closs, E.L., Pollock, J.S., Nakane, M., Schwarz, P., Garth, I., Kleinert, H. (1994)  
Nitric oxide isozymes. Characterization, purification, molecular cloning and functions.  
Hypertension 23, 1121-1131
37. Ford, H.R., Hoffmann, R.A., Wing, E.J., Magee, D.M., Mc Intyre, L., Simmons, R.L. (1988)  
Characterization of wound cytokines in the sponge matrix model.  
Arch. Surg. 124, 1422-1428
38. Frank, S., Madlener, M., Pfeilschifter, J., Werner, S. (1998)  
Induction of inducible nitric oxide synthase and its corresponding tetrahydrobiopterin-cofactor-synthesizing enzyme GTP-cyclohydrolase I during cutaneous wound repair.  
J. Invest. Dermatol. 111, 1058-1064
39. Frank, S., Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N., Pfeilschifter, J. (1999)  
Nitric oxide triggers enhanced induction of vascular endothelial growth factor expression in cultured keratinocytes (HaCaT) and during cutaneous wound repair.  
FASEB J. 13, 2002-2014

40. Furchgott, R.F., Zawadzki, J.V. (1980)  
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine.  
*Nature* 288, 373-376
41. Furlong, B., Henderson, A.M., Lewies, M.J., Smith, J.A. (1987)  
Endothelium derived relaxing factor inhibits in vitro platelet aggregation.  
*Br. J. Pharmacol.* 90, 687-692
42. Gabka, C.J., Benhain, P., Mathes, S.J., Scheuenstuhl, H., Chan, A., Fu, K.K., Hunt, T.K. (1995)  
An experimental model to determine the effect of irradiated tissue on neutrophil function.  
*Plast. Reconstr. Surg.* 96, 1676-1688
43. Gamelli, R.L., George, M., Sharp-Pucci, M., Dries, D.J., Radisavljevic, Z. (1995)  
Burn-induced nitric oxide release in humans.  
*J. Trauma.* 39, 869-878
44. Garthwaite, J., Charles, S.L., Chess-Williams, R. (1988)  
Endothelium derived relaxing factor release on activation of NMDA receptors suggests role as intercellular messenger in the brain.  
*Nature* 336, 385-388
45. Geller, D.A., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A. (1993a)  
Molecular cloning and expression of inducible nitric oxide synthase from human hepatocytes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 3491-3495
46. Geller, D.A., Nussler, A.K., Di Silvio, M., Lowenstein, C.J., Shapiro, R.A., Wang, S.C., Simmons, R.L., Billar, T.R. (1993b)  
Cytokines, endotoxin and glucocorticoids regulate the expression of inducible nitric oxide synthase in hepatocytes.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90, 522-526
47. Germain, L., Jean, A., Auger, F.A., Garrel, D.R. (1994)  
Human wound healing fibroblasts have greater contractile properties than dermal fibroblasts.  
*J. Surg. Res.* 57, 268-271
48. Gilliam, M.B., Sherman, M.P., Griscavage, J.M., Ignarro, L.J. (1993)  
A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidaton by *Aspergillus* nitrate reductase.  
*Anal. Biochem.* 212, 259-365

49. Gorodetsky, R., McBride, W.H., Withers, H.R. (1988)  
Assay of radiation effects in mouse skin as expressed in wound healing.  
*Radiat. Res.* 116, 135-144
50. Gorodetsky, R., Mou, X., Fisher, D.R., Taylor, J.M.G., Withers, H.R. (1990)  
Radiation effect in mouse skin: dose fractionation and wound healing.  
*Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 18, 1077-1081
51. Gorodetsky, R., McBride, W.H., Withers, H.R., Miller, G.G. (1991)  
Effect of fibroblast implants on wound healing if irradiated skin: assay of wound strength and quantitative immunohistology of collagen.  
*Radiat. Res.* 125, 181-186
52. Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S., Tannenbaum, S.R. (1982)  
Analysis of nitrate, nitrite and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids.  
*Anal. Biochem.* 126, 131-138
53. Haydock, G.A., Hill, G.L. (1986)  
Impaired wound healing in surgical patients with varying degrees of malnutrition.  
*J. Parenter. Enter. Nutr.* 10, 550-556
54. Heck, D.E., Laskin, D.L., Gardner, C., Laskin, J.D. (1992)  
Epidermal growth factor suppresses nitric oxide and hydrogen peroxide production by keratinocytes. Potential role for nitric oxide in the regulation of wound healing.  
*J. Biol. Chem.* 267, 21277-21280
55. Hibbs, J.B. Jr., Taintor, R.R., Vavrin, Z., Rachlin, E.M. (1988)  
Nitric oxide: a cytotoxic activated macrophage effector molecule.  
*Biochem. Biophys. Res. Commun.* 157, 87-94
56. Hofstädter, H. (1995)  
Pathologie der Wundheilung.  
*Chirurg* 66, 174-181
57. Ignarro, L.J., Buga, G.M., Wood, K.S., Byrns, R.E., Chaudhuri, G. (1987)  
Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide.  
*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84, 9265-9269
58. Iuvone, T., Carnuccio, R., DiRosa, M. (1994)  
Modulation of granuloma formation by endogenous nitric oxide.  
*Eur. J. Pharmacol.* 265, 89-92
59. Jia, L., Bonaventura, C., Bonaventura, J., Stamler, J.S. (1996)  
S-nitrosohemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control.  
*Nature* 380, 221-226

- 
60. Jung, E.G. (1998)  
Dermatologie.  
Hippokrates Verlag, Stuttgart
61. Kibbe, M., Billar, T., Tzeng, E. (1999)  
Inducible nitric oxide synthase and vascular injury.  
Cardiovasc. Res. 43, 650-657
62. Kirk, S.J., Regan, M.C., Barbul, A. (1990)  
Cloned murine T lymphocytes synthesize a molecule with the biological characteristics of nitric oxide.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 173, 660-665
63. Kirk, S.J., Hurson, M., Regan, M.C., Holt, D.R., Wasserkrug, H.L., Barbul, A. (1993a)  
Arginine stimulates wound healing and immune function in elderly human beings.  
Surgery 114, 155-160
64. Kirk, S.J., Regan, M.C., Palmer, R.M.J., Moncada, S., Wasserkrug, H.L., Barbul, A. (1993b)  
The role of nitric oxide in wound collagen deposition.  
Surg. Forum 44, 706-708
65. Kitagawa, T., Glicksman, A.S., Tyree, E.B., Nickson, J.J. (1961)  
Radiation effects on skin and subcutaneous tissue. A quantitative study of collagen content: modification with L-triiodothyronine.  
Radiat. Res. 15, 761-766
66. Knowles, R.G., Moncada, S. (1994)  
Nitric oxide synthases in mammals.  
Biochem. J. 298, 249-258
67. Kolpakov, V., Gordon, D., Kulik, T.J. (1995)  
Nitric oxide-generating compounds inhibit total protein and collagen synthesis in cultured vascular smooth muscle cells.  
Circ. Res. 76, 305-309
68. Lee, P.C., Salyapongse, A.N., Bragdon, G.A., Shears, L.L. 2<sup>nd</sup>, Watkins, S.C., Edington, H.D., Billar, T.R. (1999)  
Impaired wound healing and angiogenesis in eNOS-deficient mice.  
Am. J. Physiol. 277, H1600-1608
69. Leibovich, S.J., Ross, R. (1975)  
The role of macrophage in wound repair. A study with hydrocortisone and anti-macrophage serum.  
Am. J. Pathol. 78, 71-91

70. Leibovich, S.J., Polverini, P.J., Fong, T.W., Harlow, L.A., Koch, A.E. (1994)  
Production of angiogenic activity by human monocytes requires an L-arginine/nitric oxide-synthase-dependent effector mechanism.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 4190-4194
71. Levenson, S.M., Crowley, L.V., Geever, E.F. (1964)  
Some studies on wound healing: experimental methods, effect of ascorbic acid and effect of deuterium oxide.  
J. Trauma 4, 543-566
72. Levenson, S.M., Geever, E.F., Crowley, L.V. (1965)  
The healing of rat skin wounds.  
Ann. Surg. 161, 293-308
73. Liew, F.Y., Li, Y., Severn, A., Millott, S., Schmidt, J., Salter, M., Moncada, S. (1991)  
A possible novel pathway of regulation by murine T helper type-2 (Th<sub>2</sub>) cells of a T<sub>H</sub> 1 cell activity via the modulation of the induction of nitric oxide synthase on macrophages.  
Eur. J. Immunol. 21, 2489-2494
74. Light, N.D., Bailey, A.J. (1980)  
The chemistry of the collagen cross-links.  
Biochem. J. 185, 373-381
75. Lindner, H., Kneschaurek, P. (1996)  
Radioonkologie.  
1. Aufl., Schattauer, Stuttgart, New York
76. Lyons, C.R., Orloff, G.J., Cunningham, J.M. (1992)  
Molecular cloning and functional expression of an inducible nitric oxide synthase from a murine macrophage cell line.  
J. Biol. Chem. 267, 6370-6374
77. Madden, J.W., Peacock, E.E. Jr. (1968)  
Studies on the biology of collagen during wound healing.  
1. Rate of collagen synthesis and deposition in cutaneous wounds of the rat.  
Surgery 64, 288-294
78. Marchetta, F.C., Sako, K., Maxwell, W. (1967)  
Complications after radical head and neck surgery performed through previously irradiated tissues.  
Am. J. Surg. 114, 835-839

- 
79. Mardsen, P.A., Heng, H.H.Q., Scherer, S.W., Stewart, R.J., Hall, A.V., Shi, X.M., Tsue, L.C., Schappert, K.T. (1993)  
Structure and chromosomal localization of the human constitutive endothelial nitric oxide synthase gene.  
J. Biol. Chem. 268, 17478-17488
80. Mast, B.A., Schultz, G.S. (1996)  
Interactions of cytokines, growth factors and proteases in acute and chronic wounds.  
Wound. Rep. Reg. 4, 411-420
81. McCall, T.B., Boughton-Smith, N.K., Palmer, R.M., Whittle, B.J., Moncada, S. (1989)  
Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils. Release and interaction with superoxide anion.  
Biochem. J. 261, 293-296
82. Moncada, S., Palmer, R.M.J., Higgs, E.A. (1991)  
Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.  
Pharmacol. Rev. 43, 109-142
83. Morbidelli, L., Chang, C.H., Douglas, J.G., Granger, H.J., Ledda, F., Ziche, M. (1996)  
Nitric oxide mediates mitogenic effect of VEGF on coronary venular endothelium.  
Am. J. Physiol. 270, H411-H415
84. Moshage, H., Kok, B., Huizenga, J.R., Jansen, P.L. (1995)  
Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation.  
Clin. Chem. 41, 892-896
85. Mustoe, T.A., Porras-Reyes, B.H. (1993)  
Modulation of wound healing response in chronic irradiated tissues.  
Clin. Plast. Surg. 20, 465-472
86. Nagasaki, A., Gotoh, T., Takeya, Y., Takiguchi, M., Matsuzaki, H., Takatsuki, K., Mori, M. (1996)  
Coinduction of nitric oxide synthase, argininosuccinate synthetase and argininosuccinate lyase in lipopolysaccharide-treated rats.  
J. Biol. Chem. 271, 2658-2664
87. Nakane, M., Schmidt, H.H.H.W., Pollock, J.S., Förstermann, U., Murad, F. (1992)  
Cloned human brain nitric oxide synthase is highly expressed in skeletal muscle.  
FEBS Lett. 316, 175-180
88. Nishida, K., Harrison, D., Navas, J., Fisher, A., Dockery, S., Uemarsu, M. (1992)  
Molecular cloning and characterization of the constitutive bovine aortic endothelial cell nitric oxide synthase.  
J. Clin. Invest. 90, 2092-2096



- 89.Noiri, E., Peresleni, T., Srivastava, N., Weber, P., Bahou, W.F., Peunova, N., Goligorsky, M.S. (1996)  
Nitric oxide is necessary for a switch from stationary to locomoting phenotype in epithelial cells.  
Am. J. Physiol. 170, C794-C802
- 90.Nwomeh, B.C., Liang, H.X., Diegelmann, R.F., Cohen, K., Yager, D.R. (1998)  
Dynamics of the matric metalloproteinases MMP-1 and MMP-8 in acute open human dermal wounds.  
Wound Rep. Reg. 6, 127-131
- 91.Palmer, R.M.J., Ferrige, A.G., Moncada, S. (1987)  
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor.  
Nature 327, 524-526
- 92.Palmer, R.M.J., Rees, D.D., Ashton, D.S., Moncada, S. (1988)  
L-arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in endothelium-dependent relaxation.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 153, 1251-1256
- 93.Palmer, R.M.J., Andrews, T., Foxwell, N.A., Moncada, S. (1992)  
Glucocorticoids do not affect the induction of a novel calcium-dependent nitric oxide synthase in rabbit chondrocytes.  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 188, 209-215
- 94.Paulsen, S.M., Wurster, S.H., Nanney, L.B. (1998)  
Expression of inducible nitric oxide synthase in human burn wounds.  
Wound Rep. Reg. 6, 142-148
- 95.Phillips, T.L., Fu, K.K. (1976)  
Quantification of combined radiation therapy and chemotherapy effects on critical normal tissue.  
Cancer 37, 1186-1200
- 96.Portnoy, W.M., Moscatello, A.L., Alfieri, A., Hilaris, B.S., Tchelebi, A., Pelton-Henrion, K., McCormick, S.A. (1993)  
Wound repair after fractionated external beam radiation therapy and concomitant hyperthermia in an experimental rat model.  
Cancer 71, 3779-3782
- 97.Quaglino, D., Nanney, L.B., Kennedy, R., Davidson, J.M. (1990)  
Transforming growth factor- $\beta$  stimulates wound healing and modulates extracellular matrix gene expression in pig skin.  
Lab. Invest. 63, 307-319

- 
98. Radomski, M.W., Palmer, R.M., Moncada, S. (1990)  
Characterization of the L-arginine / nitric oxide pathway in human platelets.  
Br. J. Pharmacol. 101, 325-328
99. Ramachandran, G.N. (1967)  
Structure of collagen at the molecular level.  
in: Ramachandran, G.N.: Treatise on collagen, Vol. 1, 103  
Academic Press, New York
100. Regan, M.C., Kirk, S.J., Wasserkrug, H.L., Barbul, A. (1991)  
The wound environment as a regulator of fibroblast phenotype.  
J. Surg. Res. 50, 442-448
101. Reichner, J.S., Meszaros, A.J., Louis, C.A., Henry, W.L., Mastrofrancesco, B.,  
Martin, B.-A., Albina, J.E. (1999)  
Molecular and metabolic evidence for the restricted expression of inducible nitric  
oxide synthase in healing wounds.  
Am. J. Pathol. 154, 1097-1104
102. Richter, E., Feyerabend, T. (1996)  
Grundlagen der Strahlentherapie.  
1. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York
103. Robinson, D.W. (1975)  
Surgical problems in the excision and repair of radiated tissue.  
Plast. Reconstr. Surg. 55, 41-49
104. Rudolph, R. (1982)  
Complications of surgery for radiotherapy skin damage.  
Plast. Reconstr. Surg. 70, 179-183
105. Rudolph, R., Berg, J.V., Schneider, J.A., Fisher, J.C., Poolman, W.L. (1988)  
Slowed growth of cultured fibroblasts from human radiation wounds.  
Plast. Reconstr. Surg. 82, 669-675
106. Sakuma, I., Stuehr, D.J., Gross, S.S., Nathan, C., Levi, R. (1988)  
Identification of arginine as a precursor of endothelium-derived relaxing factor.  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 8664-8667
107. Sandberg, N., Zederfeldt, B. (1963)  
The tensile strength of healing wounds and collagen formation in rats and rabbits.  
Acta Chir. Scand. 126, 187-196
108. Sauer, R. (1993)  
Strahlentherapie und Onkologie.  
2. Aufl., Urban & Schwarzenberg, München, Wien, Baltimore

- 
- 109.Schäffer, M.R., Tantry, U., Gross, S.S., Wasserkrug, H.L., Barbul, A. (1996a)  
Nitric oxide regulates wound healing.  
J. Surg. Res. 63, 237-240
- 110.Schäffer, M.R., Tantry, U., Barbul, A. (1996b)  
Sustained nitric oxide synthesis in wounds.  
J. Surg. Res. 63, 237-242
- 111.Schäffer, M.R., Efron, P.A., Thornton, F.J., Klingel, K., Gross, S.S., Barbul, A. (1997a)  
Nitric oxide, an autocrine regulator of wound fibroblast synthetic function.  
J. Immunol. 158, 2375-2381
- 112.Schäffer, M.R., Tantry, U., Ahrendt, G.M., Wasserkrug, H.L., Barbul, A. (1997b)  
Acute protein-calorie malnutrition impairs wound healing: a possible role of decreased wound nitric oxide synthesis.  
J. Am. Coll. Surg. 184, 37-43
- 113.Schäffer, M.R., Tantry, U., Efron, P.A., Ahrendt, G.M., Thornton, F.J., Barbul, A. (1997c)  
Diabetes-impaired healing and reduced wound nitric oxide synthesis: a possible pathophysiologic correlation.  
Surgery 121, 513-519
- 114.Schäffer, M.R., Witte, M.B., Gottwald, T., Köveker, G., Becker, H.D. (1997d)  
Stickstoffmonoxid: Mediator der Gewebsreparation?  
Dtsch. Med. Wschr. 122, 339-345
- 115.Schäffer, M.R., Tantry, U., van Wesep, R.A., Barbul, A. (1997e)  
Nitric oxide metabolism in wounds.  
J. Surg. Res. 71, 25-31
- 116.Schäffer, M.R., Fuchs, N., Proksch, B., Bongartz, M., Beiter, T., Becker, HD. (1998a)  
Tacrolimus impairs wound healing: a possible role of decreased nitric oxide synthesis.  
Transplantation 65, 813-818
- 117.Schäffer, M., Barbul, A. (1998b)  
Lymphocyte function in wound healing and following injury.  
Br. J. Surg. 85, 444-460
- 118.Schäffer, M.R., Becker, H.D. (1999)  
Immunregulation der Wundheilung.  
Chirurg 70, 897-908

- 119.Scherer, E., Annweiler, H. (1996)  
Strahlentherapie.  
4. Auflage, Springer, Berlin, Heidelberg, New York
- 120.Schmidt, H.H.H.W., Warner, T.D., Nakane, M., Förstermann, U., Murad, F. (1992)  
Regulation and subcellular location of nitrogen oxide synthases in RAW264.7  
macrophages.  
Mol. Pharmacol. 41, 615-624
- 121.Seifter, E., Rettura, G., Barbul, A., Levenson, S.M. (1978)  
Arginine: an essential amino acid for injured rats.  
Surgery 84, 224-230
- 122.Shabani, M., Pulfer, S.K., Bulgrin, J.P., Smith, D.J. (1996)  
Enhancement of wound repair with a topically applied nitric oxide-releasing  
polymer.  
Wound Rep. Reg. 4, 353-362
- 123.Shi, H.P., Efron, D.T., Most, D., Tantry, U.S., Barbul, A. (2000)  
Supplemental dietary arginine enhances wound healing in normal but not inducible  
nitric oxide synthase knockout mice.  
Surgery 128, 374-378
- 124.Shukla, A., Rasik, A.M., Shankar, R. (1999)  
Nitric oxide inhibits wounds collagen synthesis.  
Mol. Cell. Biochem. 200, 27-33
- 125.Singer, A.J., Clark, R.A.F. (1999)  
Cutaneous wound healing.  
N. Engl. J. Med. 341, 738-746
- 126.Smith, D.J., Dunphy, M.J., Strag, L.N., Marletta, M.A. (1991)  
The influence of wound healing on urinary nitrate levels in rats.  
Wounds 3, 50-58
- 127.Snyder, S.H., Bredt, D.S. (1992)  
Stickstoffmonoxid – Regulator biologischer Signale.  
Spektrum der Wissenschaft 7, 72-80
- 128.Springfield, D.S. (1993)  
Surgical wound healing.  
In: Verweij, J., Pinedo, H.M., Suit, H.D.: Multidisciplinary treatment of Soft Tissue  
Sarcomas.  
Cancer Treat. Res. 67, 81-98

129. Stallmeyer, B., Kampfer, H., Kolb, N., Pfeilschifter, J., Frank, S. (1999)  
The function of nitric oxide in wound repair: inhibition of inducible nitric oxide synthase severely impairs wound reepithelialization.  
J. Invest. Dermatol. 113, 1090-1098
130. Stamler, J.S., Singel, D.J., Loscalzo, J. (1992)  
Biochemistry of nitric oxide and its redox-activated forms.  
Science 258, 1898-1902
131. Steel, G.G. (1993)  
Introduction: The significance of radiobiology for radiotherapy, 1-7  
in: Stell, G.G.: Basic clinical radiobiology.  
1. Aufl., Edward Arnold, London, Boston, Melbourne, Auckland
132. Streffer, C. (1996)  
Biologische Grundlagen der Strahlentherapie, 109-160  
in: Scherer, E., Sack, H.: Strahlentherapie.  
4. Aufl., Springer, Berlin, Heidelberg, New York
133. Stuehr, D.J., Marletta, M.A. (1987)  
Induction of nitrite/nitrate synthesis in murine macrophages by BCG infection, lymphokines or interferon  $\gamma$ .  
J. Immunol. 139: 518-525
134. Stuehr, D.J., Gross, S.S., Sakuma, I., Levi, R., Nathan, C.F. (1989)  
Activated murine macrophages secrete a metabolite of arginine with the bioactivity of endothelium-derived relaxing factor and the chemical reactivity of nitric oxide.  
J. Exp. Med. 169, 1011-1020
135. Thornton, F.J., Schäffer, M.R., Witte, M.B., Moldawer, L.L., MacKay, S.L.D., Abouhamze, A., Tannahill, C.L., Barbul, A. (1998)  
Enhanced collagen accumulation following direct transfection of the inducible nitric oxide synthase gene in cutaneous wounds.  
Biochem. Biophys. Res. Com. 246, 654-659
136. Tibbs, M.K. (1997)  
Wound healing following radiation therapy: a review.  
Radiother. Oncol. 42, 99-106
137. Tokarek, R., Bernstein, E.F., Sullivan, F., Uitto, J., Mitchell, J.B. (1994)  
Effect of therapeutic radiation on wound healing.  
Clin. Dermatol. 12, 57-70
138. Trachtman, H., Futterweit, S., Singhal, P. (1995)  
Nitric oxide modulates the synthesis of extracellular matrix proteins in cultured rat mesangial cells.  
Biochem. Biophys. Res. Com. 207, 120-125

139. Veeramachaneni, N.K., Harken, A.H., Cairns, C.B. (1999)  
Clinical implications of hemoglobin as a nitric oxide carrier.  
Arch. Surg. 134, 434-437
140. Viljanto, J. (1964)  
Biochemical basis of tensile strength and wound healing.  
Acta Chir. Scand. Suppl. 333
141. Vodovotz, Y., Bogdan, C., Paik, J., Xie, Q., Nathqan, C. (1993)  
Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor  $\beta$ .  
J. Exp. Med. 178, 605-608
142. Wang, Q., Dickson, G.R., Abram, W.P., Carr, K.E. (1994)  
Electron irradiation slows down wound repair in rat skin: a morphological investigation.  
Br. J. Dermatol. 130, 551-560
143. Wang, R., Ghahary, A., Shen, Y.J., Scott, P.G., Tredget, E.E. (1996)  
Human dermal fibroblasts produce nitric oxide and express both constitutive and inducible nitric oxide synthase isoforms.  
J. Invest. Dermatol. 106, 419-427
144. Weller, R. (1997)  
Nitric oxide - a newly discovered chemical transmitter in human skin.  
Br. J. Dermatol. 137, 665-672
145. Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G., Wachter, H. (1990)  
Tetrahydrobiopterin-dependent formation of nitrite and nitrate in murine fibroblasts.  
J. Exp. Med. 172, 1599-1607
146. Witte, M.B., Schäffer, M.R., Barbul, A. (1996)  
Phenotypic induction of nitric oxide is critical for synthetic function in wound fibroblasts.  
Surg. Forum 47, 703-705
147. Witte, M.B., Barbul, A. (1997a)  
General principles of wound healing.  
Surg. Clin. North Am. 77, 509-528
148. Witte, M.B., Thornton, F., Kiyama, T., Tantry, U., Barbul, A. (1997 b)  
Nitric oxide enhances wound collagen deposition in diabetic rats.  
Surg. Forum 47, 665-666

149. Woessner, J.F. (1961)  
The determination of hydroxyproline in tissue and protein samples containing small proportions of this imino acid.  
Arch. Biochem. Biophys. 93, 440-447
150. Xie, K., Huang, S., Dong, Z., Juang, S., Gutman, M., Xie, Q., Nathan, C., Fidler, I. (1995)  
Transfection with the inducible nitric oxide synthase gene suppresses tumorigenicity and abrogates metastasis by K-1735 murine melanoma cells.  
J. Exp. Med. 181, 1333-1339
151. Xu, X.P., Pollock, J.S., Tanner, M.A., Myers, P.R. (1995)  
Hypoxia activates nitric oxide synthase and stimulates nitric oxide production in porcine coronary resistance arteriolar endothelial cells.  
Cardiovasc. Res. 30, 841-847
152. Yamasaki, K., Edington, H.D.J., McClosky, C., Tzeng, E., Lizonova, A., Kovesdi, I., Steed, D.L., Billar, T.R. (1998)  
Reversal of impaired wound repair in iNOS-deficient mice by topical adenoviral-mediated iNOS gene transfer.  
J. Clin. Invest. 101, 967-971
153. Ziche, M., Morbidelli, L., Masini, E., Amerini, S., Granger, H.J., Maggi, C.A., Geppetti, P., Ledda, F. (1994)  
NO mediates angiogenesis in vivo and endothelial cell growth and migration in vitro promoted by substance P.  
J. Clin. Invest. 94, 2036-2044

## 9. Bezugsquellenverzeichnis

### 9.1. Versuchstiere

- **Albinoratten vom Stamm Sprague-Dawley**, männlich, 200 - 250 g, Fa. Charles River, Sulzfeld, Deutschland

### 9.2. Chemikalien und Material

#### 9.2.1. Chemikalien und Reagenzien

- **A. bidest.**, laboreigene Herstellung
- **BSA (Bovine serum albumin): Albumin Fraktion V (>98%)**, Art. 8076, Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- **Chloramin-T-hydrat (C<sub>7</sub>H<sub>7</sub>ClNO<sub>2</sub>SNa)**, Nr. 9887, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- **Citronensäure-monohydrat (C<sub>6</sub>H<sub>8</sub>O<sub>7</sub>·H<sub>2</sub>O)**, Nr. 244, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **DAB (3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat, C<sub>12</sub>H<sub>14</sub>N<sub>4</sub>·4HCl)**, D-9015, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- **di-Natriumphosphat-dihydrat (Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 2 H<sub>2</sub>O)**, Nr. 6580, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Eisessig (Essigsäure 100%, CH<sub>3</sub>COOH)**, Nr. 63, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Ethanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) 99,9%**, Universitätsapotheke Tübingen
- **Giemsas Azur-Eosin-Methylenblau-Lösung**, Universitätsapotheke Tübingen
- **Hämalaun (nach Meyer)**, Nr. 9249, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **HPLC-Wasser**, laboreigene Herstellung
- **Imidazol (C<sub>3</sub>H<sub>4</sub>N<sub>2</sub>)**, Nr. 56750, Fluka Chemie AG, Buchs, Schweiz
- **Kaliumchlorid (KCl)**, Nr. 4936, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland



- **Kaliumdihydrogenphosphat ( $\text{KH}_2\text{PO}_4$ )**, Nr. 4873, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Lipopolysaccharid (*E. coli* Serotyp 0128: B12)**, L-2755, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- **May-Günwald-Lösung (Eosin-Methylenblau-Lösung)**, Universitätsapotheker Tübingen
- **Methanol ( $\text{CH}_3\text{OH}$ )**, Nr. 6009, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **2-Methylbutan ( $\text{C}_5\text{H}_{12}$ )**, Nr. 6056, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Methylcellosolve (Ethylenglycol-monomethyl-ether)**, Nr. E 5378, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- **Methylrotlösung 0,1% in Ethanol**, Nr. 7137, J.T. Baker B.V., Deventer, Holland
- **Natriumacetat-anhydrat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ )**, Nr. 6268, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Natriumacetat-trihydrat ( $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ )**, Nr. 6267, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Natriumchlorid ( $\text{NaCl}$ )**, Nr. 6404, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Natriumchlorid-Spüllösung 0,9%**, CE 0123, Delta Pharma GmbH, Pfullingen, Deutschland
- **Natriumhydroxid ( $\text{NaOH}$ )**, Nr. 1.59319, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Natriumnitrit ( $\text{NaNO}_2$ )**, Nr. 6549, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Natronlauge ( $\text{NaOH}$ )**, 0,1 N (Nr. 9141), 1 N (Nr. 9137), 5 N (Nr. 9913), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **N-(1-Naphthyl)ethylenediamin-dihydrochlorid (NED,  $\text{C}_{12}\text{H}_{14}\text{N}_2 \cdot 2\text{HCl}$ )**, Nr. N 5889, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- **ortho-Phosphorsäure ( $\text{H}_3\text{PO}_4$ ) 85%**, Nr. 573, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Paraffin Roti®-Plast**“, Nr. 6642, Fa. Roth, Karlsruhe, Deutschland
- **Paraformaldehyd**, P6148, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland

- **PBS spezial 1-fach**, Nr. 041-90834, Fa. Gibco BRL Life Technologies GmbH, Karlsruhe, Deutschland
- **p-Dimethylaminobenzaldehyd (p-DABA)**, D 2004, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- **Perchlorsäure (HClO<sub>4</sub>) 70%**, Nr. 514, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Poly-L-Lysin-Lösung (w/v in Wasser) 0,1%**, Nr. P8920, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- **1-Propanol, (n-Propanol, C<sub>3</sub>H<sub>8</sub>O)**, Nr. 997, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **2-Propanol (Isopropanol)**, Nr. 9634, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Rattennormalserum**, X 0912, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland
- **Roti®-Histokitt**, Nr. 6638, Fa. Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland
- **Salzsäure (HCl)**, 0,01 N (Nr. 9974), 0,1 N (Nr. 9060), 1 N (Nr. 9057), 5 N (Nr. 9911), Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Streptavidin-Biotin-Komplex/HRP**, Nr. K0377, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland
- **Sulfanilamid**, Nr. S 9251, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- **Trans-4-Hydroxy-L-Prolin**, Nr. H 6002, Fa. Sigma, Deisenhofen, Deutschland
- **Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, Perhydrol®) 30%**, Nr. 7209, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland
- **Xylol**, Nr. 8681, Fa. Merck, Darmstadt, Deutschland

### 9.2.2. Nitrat-Nitrit-Bestimmung

- **Nitric Oxide Colorimetric Assay**, Nr. 1756281, Fa. Boehringer, Mannheim, Deutschland

### 9.2.3. Immunhistologie

- **Primärantikörper**: Anti-Induzierbare Stickstoffmonoxid-Synthase, Maus Makrophage (vom Kaninchen), polyklonal, Kat. Nr. 482728, Lot. B 25475, Fa. Calbiochem, San Diego, CA, USA

- **Sekundärantikörper:** Schwein Anti-Kaninchenimmunglobulin, biotinyliert F(ab')<sub>2</sub>, E 0431, Fa. Dako, Hamburg, Deutschland

#### 9.2.4. Laborverbrauchsmaterialien

- **Deckgläser**, 24x60 mm, Fa. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- **Einmalbecher mit Deckel**, 100 ml, Nr. 75.563, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
- **Eppendorf-Hütchen:** Safe-Lock-Reaktionsgefäße, 1,5 ml, Nr. 120.086, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- **Gewebekassetten Tissue-Tek® III**, Bayer Diagnostics U.K. LTD, Hampshire, Großbritannien
- **Mehrzweckgefäß mit Schnappdeckel**, Nr. 203170, Greiner Labortechnik, Frickenhausen, Deutschland
- **Millipore-Filter**, Einweg-Filtereinheiten: Sterile Millex – HV, 0,45 µm Filter Unit, Nr. SLHV025LS, Fa. Millipore, Eschborn, Deutschland
- **Millipore-Ultrafilter Biomax®**, Einweg-Filtereinheiten: Ultrafree – 0.5 Centrifugal Filter & Tube Biomax – 10K Membrane 0,5 ml Vol., Nr. UFV5BGC00, Fa. Millipore, Eschborn, Deutschland
- **Objektträger „SuperFrost“**, 76x26 mm, Fa. Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland
- **Papierfaltenfilter „Selecta“**, Ø 9 cm, Nr. 602h½, Fa. Carl Schleicher & Schül, Dassel, Deutschland
- **Pipettenspitzen „Eurotips“**, 0-10µl, Nr. 063.600, Fa. Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- **Pipettenspitzen „Standardtips“**, 10-100 µl (Nr. 003.004), 100-1000 µl (Nr. 015.002), Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- **Reagenzröhrchen mit Verschuß (Falcon®-Tubes)**, 15ml u. 50 ml, Nr. 2095 u. 2070, Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
- **S-Monovette Kalium EDTA**, Nr. 61664001, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland

- **96-well-PS-Mikroplatte, F-Form**, Nr. 655101, Greiner Labortechnik GmbH, Frickenhausen, Deutschland

### 9.2.5. Film

- **Farbbildfilm** „Fujicolor Superia 100“, Fuji, Tokio, Japan

## 9.3. Operationsmaterialien

### 9.3.1. Implantationsmaterial

- **Polyvinylalkohol-Schwämme, 12,7 mm dia × 3 mm, Q608303, Fa. M-PACT, Eudora, KS, USA**

### 9.3.2. Operationsmaterialien

- **Povidon-Iod-Lösung (Betaisadona®)**, Zul.-Nr. 61080220001, Mundipharma GmbH, Limburg, Deutschland
- **Diverse chirurgische Instrumente**
- **Einmalkanülen 100 Sterican®**, div. Größen, Fa. B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
- **Einmalspritzen**, 1ml, 5 ml u. 10 ml, Fa. B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
- **Hautklammergerät Leukoclip® SD**, Nr. 47111, Beiersdorf AG, Hamburg, Deutschland
- **Skalpell Cutifix® (Surgical Disposable Scalpel)**, Ref. Nr. 05518016, B. Braun Surgical GmbH, Melsungen, Deutschland
- **Steril-Kompressen Gazin®**, Nr. 13642, Laboratoires Stella s.a. (Lohmann Group), Liège, Belgien

### 9.3.3. Narkosemittel

- **Ketamin-hydrochlorid (Ketavet® 100mg/ml)**, Reg.-Nr. 89984, Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland

- **Xylazin-hydrochlorid (Rompun® 2%)** , Reg.-Nr. R1061, BayerVital GmbH&Co.KG, Leverkusen, Deutschland

### 9.3.4. Sonstiges

- **Elektrorasierapparat** mit Schneidekopf GH-703, Schnitthöhe 0,1 mm, Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland
- **Hautschneidegerät** mit 10 Dermatomeklingen (Aesculap AG, Tuttlingen, Deutschland), 7 Hautstreifen (Schnittlänge: 8,0 cm, Schnittbreite: 0,8 cm) pro Schneidevorgang, Anfertigung der Hauswerkstatt der Chirurgischen Klinik, Universitätsklinik Tübingen

## 9.4. Bestrahlung

- **Linearbeschleuniger „Linac A“**, 4 MeV, Fa. Electa, Großbritannien
- **Bleiplatte**, 20 × 20 cm, 1,5 cm dick, 3 Aussparungen mit 11 × 4 cm, Anfertigung in der Abteilung für Strahlentherapie, Universitätsklinik Tübingen
- **Plexiglasbehälter**, 10 × 20 × 20 cm, mit 3 Fächern (5,5 × 9 × 18 cm), Anfertigung Hauswerkstatt der Chirurgischen Klinik, Universitätsklinik Tübingen
- **Plexiglasplatte**, 20 × 20 cm, 3 mm dick, Anfertigung Fa. Fritz, Tübingen, Deutschland

## 9.5. Laborgeräte

### 9.5.1. Großgeräte

- **Analysenwaage AE 240**, Fa. Mettler Instrumente GmbH, Giessen, Deutschland
- **Autoklav Heraeus UT 6200**, Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
- **Brutschrank**, Fa. Memmert, Schwabach, Deutschland

- **ELISA-Reader**, Milenia Kinetic Analyzer, Leihgabe DPC Biermann GmbH, Bad Nauheim, Deutschland
- **Fotomikroskop „Axiophot“**, Fa. Zeiss, Oberkochen, Deutschland
- **Grobwaage P2000 N**, Nr. 250441, Fa. Mettler Instrumente GmbH, Giessen, Deutschland
- **Heizplatte „Histoplate“**, Jung, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland
- **Histoembedder (Paraffinausgießstation)**, Nr. 09200359, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland
- **Mikroskop Leitz Labor Lux S**, Fa. Leica, Wetzlar, Deutschland
- **Rotationsmikrotom RM 2035 BIOCUT**, Nr. 20890359, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland
- **Tensiometer (Universalprüfmaschine „Zwicki“)**, TMZ 2.5/TN1S, Fa. Zwick, Ulm, Deutschland
- **Vakuum-Gewebeinfiltrationsautomat „Histokinette“**, Jung TP 1050, Nr. TP 010194, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland
- **Wasserbad UB 20/R400**, Messgeräte-Werk Lauda, Lauda-Königshofen, Deutschland
- **Wasserbecken HI 1210**, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim, Deutschland
- **Zentrifuge „Biofuge A“**, Fa. Heraeus Sepatech, Hanau, Deutschland

### 9.5.2. Kleingeräte

- **Kochplatte IKAMAG®RH**, mit Drehfunktion, IKA-Labortechnik, Staufen, Deutschland
- **Kolbenhubpipetten**; 0,5 µl – 10 µl, 10 µl – 100 µl, 100 µl - 1000µl; Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Hamburg, Deutschland
- **Mikroprocessor pH-Meter, pH 535 Multi Cal®**, WTW GmbH, Weilheim, Deutschland
- **Vortex-Genie™ K550-GE**, Bender&Hobein AG, Zürich, Schweiz

## 10. Abkürzungsverzeichnis

$\alpha$	Irrtumswahrscheinlichkeit
Abb.	Abbildung
A. bidest.	destilliertes Wasser
ADP	Adenosindiphosphat
bFGF	Basic fibroblast growth factor
BH <sub>4</sub>	Tetrahydrobiopterin
BSA	Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	Kalzium-Ion
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
cNOS	konstitutive Stickstoffmonoxidsynthase
D	Energiedosis
Da	Dalton
DAB	3,3'-Diaminobenzidin-tetrahydrochlorid-dihydrat
DNS	Desoxyribonukleinsäure
E. coli	Escherichia coli
EDRF	Endothelium-derived relaxing factor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EGF	Epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked immuno sorbent assay
eNOS	endotheliale Stickstoffmonoxidsynthase
Fa.	Firma
FAD	Flavinadenindinukleotid
FMN	Flavinmononukleotid
g	Gramm
	Erdbeschleunigung ( $g = 9,81 \text{ m/s}^2$ )
GTP	Guanosintriphosphat

---

Gy	Gray
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HPLC	High performance liquid chromatography
IFN- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IGF-1	Insulin-like growth factor-1
IgG	Immunglobulin der Klasse G
Il	Interleukin
iNOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthase
i.p.	intraperitoneal
l	Liter
L-NAME	N <sup>G</sup> -Nitro-L-Arginin-methylhydrochlorid
L-NMMA	L-N <sup>G</sup> -Monomethyl-Arginin
LPS	Lipopolysaccharid
M	molare Lösung
Md	Median
Met-Hb	Methämoglobin
MeV	Megaelektronenvolt
MG	Molekulargewicht
$\mu$ l	Microliter
$\mu$ mol	Micromol
ml	Mililiter
MMP	Matrixmetalloproteinasen
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
n	Stichprobenumfang
N	Newton
	Normallösung
NaCl	Natriumchlorid
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat
NED	N-(1-Naphthyl)ethylendiamin-dichlorid
ng	Nanogramm



NMDA	N-Methyl-D-Aspartat
nNOS	neuronale Stickstoffmonoxidsynthase
NO	Stickstoffmonoxid
NO <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Nitrit
NO <sub>3</sub> <sup>-</sup>	Nitrat
NOS	Stickstoffmonoxidsynthase
NO <sub>x</sub>	Nitrat und Nitrit
O <sub>2</sub>	molekularer Sauerstoff
OHP	Hydroxyprolin
ONOO <sup>-</sup>	Peroxynitrit
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
PBS	phosphatgepufferte Kochsalzlösung
p-DABA	p-Dimethylaminobenzaldehyd
PDGF	Platelet-derived growth factor
PVA	Polyvinylalkohol
RBW	relative biologische Wirksamkeit
SD	Standardabweichung
SEM	Standardfehler
Tab.	Tabelle
Tabl.	Tablette
TGF- $\alpha$ / $\beta$	Transforming growth factor- $\alpha$ / $\beta$
TNF- $\alpha$	Tumour necrosis factor- $\alpha$
UV	ultraviolett
VEGF	Vascular endothelial growth factor
WRFform	„formalinfixierte“ Wundreißfestigkeit
WRFfr	„frische“ Wundreißfestigkeit
x	arithmetischer Mittelwert
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem

## 11. Danksagung

Herrn Privatdozent Dr. med. Michael Schäffer möchte ich an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Themas meiner Arbeit und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und Materials danken. Mein ganz besonderer Dank gilt seiner engagierten Betreuung und freundschaftlichen Unterstützung bei der Durchführung und Fertigstellung dieser Arbeit.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Frau Barbara Proksch bedanken, die mir mit Rat und Tat bei der Laborarbeit zur Seite stand.

Herrn Prof. Dr. med. Budach und dem Personal der Abteilung für Strahlentherapie des Universitätsklinikums Tübingen danke ich für die Zusammenarbeit bei der Bestrahlung der Versuchstiere.

Herrn A. Rosenberger vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung der Universität Tübingen danke ich für die Beratung bei der statistischen Auswertung meiner Daten.

Bei meinen Eltern Ute und Ernst Weimer bedanke ich mich ganz herzlich für ihr Verständnis und ihre Unterstützung, durch die mein Studium und die Fertigstellung dieser Arbeit erst möglich wurden und die mich bei all meinen Vorhaben und Zielen stets ermuntert und unterstützt haben.

Besonderen Dank möchte ich meiner Mutter und Tatjana Ljubicic für die Durchsicht dieser Arbeit aussprechen.

Meinem Bruder Lars Weimer danke ich herzlich für seine Unterstützung bei der Datenverarbeitung.

## 12. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Wiebke W e i m e r  
 Geburtsdatum: 1. Oktober 1975  
 Geburtsort: Böblingen  
 Familienstand: ledig  
 Eltern: Ute Maria Weimer, geb. Wille, Realschullehrerin  
 Ernst Karl Weimer, Diplom-Volkswirt

### Schulische Ausbildung und Studium

1982-1986 Eduard-Mörrike-Grundschule, Böblingen  
 1986 Hohbuch-Grundschule, Reutlingen  
 1986-1995 Johannes-Kepler-Gymnasium, Reutlingen  
 1995 Abitur  
 1995 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen  
 1997 Ärztliche Vorprüfung  
 1998 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 2001 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung  
 2001 - 2002 Praktisches Jahr:  
 Chirurgie, Katharinenhospital Stuttgart  
 Kinderheilkunde, Olgahospital Stuttgart  
 Innere Medizin, Kantonsspital Basel, Schweiz  
 26. November 2002 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

### Praktika, Famulaturen, Tutoriate

1996 Krankenpflegepraktikum in der Abteilung für Gynäkologie am Kreiskrankenhaus Reutlingen  
 1997 - 1998 Studentische Tutorin im Kursus der makroskopischen Anatomie am Anatomischen Institut Tübingen  
 1998 Famulatur in der Abteilung für Allgemein- und Gefäßchirurgie am Humboldt-Krankenhaus, Berlin  
 1998 Praxisfamulatur Allgemeinmedizin in Felixstowe, Großbritannien  
 1999 Famulatur in der Abteilung für Kinderchirurgie an der Universitätsklinik Tübingen  
 1999 Praxisfamulatur Radiologie in Metzingen  
 2000 - 2002 Pflegedienst bei der Mobile Hauskrankenpflege GmbH, Tübingen  
 2000 Studentische Tutorin an der Universitätskinderklinik Tübingen, Abteilung Kinderkardiologie

### Klinische Tätigkeit

Seit März 2003 Ärztin im Praktikum in der Abteilung für Kinderheilkunde, Universitätsklinik Münster