

Aus der Universitätsklinik für Allgemeine Chirurgie Tübingen

Ärztlicher Direktor: Professor Dr. Dr. h.c. H.D. Becker

**Neuroimmunomodulation in Heilungs-
prozessen chronischer Wunden:**

**Auswirkungen gepulster Elektrostimulation auf die
Mastzellfunktion in chronischen venösen Beinulcera**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin**

**der Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Daniel Svoboda
aus
Stuttgart - Bad Cannstatt
2002**

Dekan: Professor Dr. med. C.D. Claussen
1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. med. T. Gottwald
2. Berichterstatter: Professor Dr. med. M. Jünger

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungen

| | | |
|----------|--|-----------|
| 1 | Einleitung | 1 |
| 1.1 | Chronische Hautulcera | 1 |
| 1.2 | Mechanismen der Wundheilung | 1 |
| 1.2.1 | Hämostasephase | 2 |
| 1.2.2 | Inflamationsphase | 2 |
| 1.2.3 | Proliferationsphase | 4 |
| 1.2.4 | Reparative Phase | 5 |
| 1.3 | Mastzellen und Wundheilung | 6 |
| 1.3.1 | Allgemeines | 6 |
| 1.3.2 | Mastzellen in Wundheilungsprozessen | 7 |
| 1.4 | Nerven und Mastzellen | 9 |
| 1.4.1 | Morphologische und pharmakologische Ergebnisse | 10 |
| 1.4.2 | Funktionelle Ergebnisse | 10 |
| 1.5 | Schlussfolgerungen | 11 |
| 1.6 | Fragestellung | 12 |
| 2 | Material und Methoden | 14 |
| 2.1 | Material | 14 |
| 2.1.1 | Geräte | 14 |
| 2.1.2 | Antikörper und Chemikalien | 15 |
| 2.1.3 | Verbrauchsmaterialien | 15 |
| 2.1.4 | Puffer und Lösungen | 16 |

| | | |
|----------|---|-----------|
| 2.2 | Patientengut | 17 |
| 2.3 | Transkutane Sauerstoffpartialdruckmessung | 18 |
| 2.4 | Gewebeproben | 20 |
| 2.4.1 | Gewinnung der Gewebeproben | 20 |
| 2.4.2 | Processing der Gewebeproben | 21 |
| 2.5 | Klassische Mastzellfärbung mit Alcian Blau | 21 |
| 2.5.1 | Theorie | 21 |
| 2.5.2 | Durchführung | 22 |
| 2.6 | Immunhistochemie | 24 |
| 2.6.1 | Prinzip immunhistochemischer Färbemethoden | 24 |
| 2.6.2 | Histamin-spezifische Antikörperfärbung | 26 |
| 2.6.3 | FGF-spezifische Antikörperfärbung | 27 |
| 2.6.3.1 | Zusatzfärbung mit Alcian Blau | 29 |
| 2.7 | Quantitative mikroskopische Auswertung | 31 |
| 2.7.1 | Lichtmikroskopie | 31 |
| 2.7.2 | Quantitative Mikroskopie | 31 |
| 2.7.2.1 | Schaffung des Graubildes | 31 |
| 2.7.2.2 | Detektion der zu messenden Strukturen | 32 |
| 2.7.2.3 | Binäre Bildumrechnung | 33 |
| 2.7.3.4 | Besonderheiten der Durchführung | 33 |
| 2.8 | Statistische Auswertung | 34 |
| 3 | Ergebnisse | 36 |
| 3.1 | Ergebnis der transkutanen Sauerstoffpartialdruckmessung | 36 |
| 3.2 | Ergebnisse der Alcian Blau-Färbung | 37 |
| 3.2.1 | Mastzelldichte | 37 |
| 3.2.2 | Mittlere Optische Dichte | 39 |
| 3.3.3 | Integrierte Optische Dichte | 40 |
| 3.3 | Ergebnisse der Histamin-Färbung | 41 |

| | |
|---|-----------|
| 3.3.1 Mastzelldichte | 41 |
| 3.3.2 Mittlere Optische Dichte | 42 |
| 3.3.3 Integrierte Optische Dichte | 43 |
| 3.4 Ergebnisse der FGF-Einzelfärbung | 44 |
| 3.4.1 Zelldichte | 44 |
| 3.4.2 Mittlere Optische Dichte | 46 |
| 3.4.3 Integrierte Optische Dichte | 47 |
| 3.5 Ergebnisse der FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung | 48 |
| 3.5.1 Mastzelldichte | 48 |
| 3.5.2 Mittlere Optische Dichte | 49 |
| 3.5.3 Integrierte Optische Dichte | 50 |
| 4 Diskussion | 52 |
| 4.1 Methodenkritik | 52 |
| 4.1.1 Patientengut | 52 |
| 4.1.2 Probengewinnung | 53 |
| 4.1.3 Transkutane elektrische Nervenstimulation | 54 |
| 4.1.4 Mastzellfärbung mit Alcian Blau | 55 |
| 4.1.5 Immunhistochemie und Histamin-Färbung | 56 |
| 4.1.6 FGF-Färbung und FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung | 58 |
| 4.2 Ergebnisdiskussion | 59 |
| 4.2.1 Mastzelldichte | 59 |
| 4.2.2 Mittlere Optische Dichte | 60 |
| 4.2.3 Integrierte Optische Dichte | 61 |
| 4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse | 61 |
| 4.3 Betrachtung vorausgegangener Studien | 62 |
| 4.4 Schlussfolgerungen | 64 |
| 5 Zusammenfassung | 67 |

Danksagung

Abkürzungen

| | |
|--------------------------|---|
| Abb. | Abbildung |
| A. dest. | Aqua destillata |
| AEC | 3-Amino-9-ethylcarbazole |
| Aptex | 3-Aminopropyltriethoxysilane |
| C | cell(s)/ Zelle(n) |
| CGRP | calcitonin gene related peptide |
| CTMC | connective tissue mast cell(s)/ Bindegewebsmastzelle(n) |
| CVI | Chronisch Venöse Insuffizienz |
| DAB | Diaminobenzol |
| FAM | formalin/acetic acid/methanol |
| FGF-b | fibroblast growth factor basic |
| G-CSF | granulocyte colony-stimulating factor |
| GM-CSF | granulocyte and macrophage colony-stimulating factor |
| H ₁ -Rezeptor | Histamin-1-Rezeptor |
| IgG | Immunglobulin G |
| IL-x | Interleukin x |
| IOD | integrated optical density/ Integrierte Optische Dichte |
| Kap. | Kapitel |
| KG | Konfidenzgrenze(n) |
| MC | mast cell(s)/ Mastzelle(n) |
| M-CSF | macrophage colony-stimulating factor |

| | |
|-------------------|---|
| min. | Minute(n) |
| MMC | mucosa mast cell(s)/ Mukosamastzelle(n) |
| MOD | mean optical density/ Mittlere Optische Dichte |
| MW | Mittelwert |
| NBF | neutral buffered formalin |
| N. | Nervus |
| NSAIDs | non steroidal antiinflammatoric drugs/ Nicht-steroidale Antiphlogistika |
| p.A. | per analysi |
| PAF | plasminogen activating factor |
| pAVK | periphere Arterielle Verschlusskrankheit |
| PDGF | platelet derived growth factor |
| pO ₂ | Sauerstoffpartialdruck |
| qmm | entspricht mm ² |
| sek. | Sekunde(n) |
| s.g. | sogenannte(r,s) |
| s.o. | siehe oben |
| Std. | Stunde(n) |
| s.u. | siehe unten |
| TBS | Tris buffered saline |
| TENS | Trankutane Elektrische Nervenstimulation |
| tcpO ₂ | transkutaner Sauerstoffpartialdruck |
| TGF | tumor growth factor |
| TNF | tumor necrosis factor |
| Tris | Tris(hydromethyl)aminomethan |
| u.a.m. | und andere mehr |
| v.a. | vor allem |
| vgl. | vergleiche |
| z.B. | zum Beispiel |

1 Einleitung

1.1 Chronische Hautulcera

Trotz enormer Fortschritte, die während der letzten Jahre bezüglich der Behandlung und dem pathologischen Verständnis chronischer kutaner Ulcera erzielt wurden, stellen diese auch heute noch ein großes sozialmedizinisches Problem dar. Die Zahl der Patienten mit chronischen, nicht heilenden Ulcera wird in der Bundesrepublik Deutschland auf mehr als eine Million geschätzt. Häufig steht der Diabetes mellitus als Ursache im Vordergrund, aber ebenso können eine Chronisch Venöse Insuffizienz (CVI), ischämische Erkrankungen im Sinne einer peripheren Arteriellen Verschlusskrankheit (pAVK) und Vaskulitiden für solche Ulcera ursächlich sein.

1.2 Mechanismen der Wundheilung

Es hat sich als vorteilhaft erwiesen, die komplexen Vorgänge der Wundheilung als eine Vielzahl sich überlappender Phasen zu beschreiben. Als Wundheilungsphasen kann man folgende voneinander unterscheiden:

1. Blutstillungsphase (Hämostasephase)
2. Entzündungsphase (Inflammationsphase)
3. Proliferationsphase
4. Regenerationsphase (Reparative Phase)

1.2.1 Hämostasephase

Unmittelbar nach Entstehung einer Wunde, die zwangsläufig mit der Verletzung von Gefäßen einhergeht, kommt es zu einer Akkumulation von Erythrozyten, Leukozyten, Thrombozyten, Zellproteinen und Plasmaproteinen im Wundgebiet. Durch Aktivierung des intrinsischen und extrinsischen Gerinnungssystems kommt es unter Mitwirkung von Thrombozyten, welche sowohl vasoaktive Amine (wie Serotonin), Wachstumsfaktoren (wie TGF α und TGF β , PDGF und PAF), als auch Adhäsionsglycoproteine (wie Fibronectin, Thrombospondin, Thromboxan und von Willebrand-Faktor) sezernieren, zur Thrombozytenaggregation, Fibrinbildung und Kollagenadhäsion (15-17,31). Dadurch wird eine primäre Hämostase erreicht, welche vor erneuter Blutung schützt und das Gewebe für die erste entscheidende Phase der Reparatur, die Entzündungsphase, vorbereitet.

1.2.2 Inflammationsphase

Die Entzündungsphase ist durch zwei Aspekte gekennzeichnet. Zum einen durch eine Gefäßdilataion und eine Erhöhung der vaskulären Permeabilität, zum anderen durch die Extravasation zellulärer und nichtzellulärer Komponenten aus dem Blut ins Gewebe (16,17,31). Zu den zellulären Bestandteilen gehören Thrombozyten, Neutrophile Granulozyten, Makrophagen und Lymphozyten, in der Reihenfolge ihres zeitlichen Auftretens. Dabei stellt die Entzündungsphase ein komplexes Ineinandergreifen chemotaktischer Prozesse und von Zellproliferationen dar, welche durch eine Vielzahl chemischer Modu-

latoren, welche sich im Wundgebiet befinden, gesteuert werden (vgl. Tab. 1).

Tab. 1: Vorkommen und bekannte Effekte peptidischer Faktoren in Wundheilungsprozessen

| Faktor | Vorkommen | Effekte |
|---------------|---|--|
| PDGF | Thrombozyten, Makrophagen, Mastzellen u.a. | Fibroblastenproliferation, Chemotaxis, Kollagenasebildung |
| TGFa | Makrophagen, Mastzellen | Epithelzellproliferation, Bildung von Granulationsgewebe |
| TGFb | Thrombozyten, Makrophagen, Polymorphkernige Leukozyten, Mastzellen, T-Lymphozyten | Fibroblastenproliferation, Chemotaxis, Kollagenmetabolismus, Beeinflussung anderer Wachstumsfaktoren |
| IL-1 | Makrophagen, Mastzellen | Fibroblastenproliferation, Chemotaxis |
| IL-2 | Mastzellen, Lymphozyten, Keratinozyten | Anziehung von Monozyten und Lymphozyten |
| IL-4 | Mastzellen, T-Helferzellen | Chemotaxis |
| IL-6 | Mastzellen, Makrophagen, Granulozyten | Chemotaxis |
| TNFa | Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten | Fibroblastenproliferation |
| TNFb | Makrophagen, Mastzellen | Fibroblastenproliferation |
| GM-CSF | Mastzellen, Makrophagen, Granulozyten | Aktivierung proinflammatorischer Zellen |
| FGF | Makrophagen, Mastzellen, Granulozyten und andere | Fibroblastenproliferation, Kollagenbildung und Angiogenese |
| EGF | Zellen in versch. Organen: Magen, ZNS, Niere u.a. | Epithelzellproliferation, Bildung von Granulationsgewebe |

Die posttraumatische Änderung der vaskulären Permeabilität ist unbedingte Voraussetzung für das Einwandern spezifischer Entzündungszellen aus dem Blut. Nach den Thrombozyten erreichen zunächst Polymorphkernige Leukozyten das Wundgebiet, mit einem Dichtemaximum nach 24 bis 48 Stunden (19). Sie übernehmen antimikrobielle Aufgaben und sind entscheidend für das lokale Gewebedebridement verantwortlich (16,17), spielen aber per se nicht die entscheidende Rolle im Wundheilungsprozess.

Schlussendlich erreichen ca. 48 bis 72 Stunden nach dem Trauma Monozyten das Dichtemaximum, welche ihre prädominante Rolle als Wundmakrophagen wahrnehmen und eine Vielzahl von Funktionen wie Gewebedebridement und Sekretion von Wachstumsfaktoren und Regulatorsubstanzen ausüben (Tab. 1). Chemotaktische Faktoren wie PDGF und TGF β sind für ihre Invasion hauptsächlich verantwortlich (16,17,76).

1.2.3 Proliferationsphase

Kennzeichen der bereits nach einem Tag beginnenden Proliferationsphase ist die Bildung eines gefäßreichen Granulationsgewebes, was unter maßgeblicher Beteiligung von Fibroblasten geschieht. Sie wandern als mesenchymale Vorstufen in das Wundgebiet ein und differenzieren unter der Wirkung von FGF, TNF α und TNF β , TGF β und PDGF zu Fibroblasten aus (vgl. Tab. 1). Im Wundgebiet angelangt, produzieren sie Fibronectin und andere Bestandteile der extrazellulären Matrix wie Kollagen, Elastin und Glycosaminoglycane (15-17). Ein anderes zentrales Element der Proliferationsphase ist das Ausbilden von neuen Blutgefäßen (Angioneogenese). Ein wichtiger

Stimulus hierfür ist die lokale Ischämie nach dem Trauma (17). Daneben spielt die Vielzahl von Wachstumsfaktoren eine Rolle, wobei aber offensichtlich FGF die zentrale Rolle zu spielen scheint (17, Tab. 1). In unkomplizierten chirurgischen Wunden ist dieser Prozess der Vaskularisation nach ca. 6-7 Tagen beendet.

In der späten proliferativen Phase entwickeln sich aus den Fibroblasten Myofibroblasten, die eine hohe Ähnlichkeit zu glatten Muskelzellen aufweisen (17,32,46,78-80). Über kontraktile Elemente erreichen diese eine Verkleinerung der Wunde von ca. 1-2 mm täglich (78-80).

1.2.4. Reparative Phase

Während dieser zeitlich längsten Phase der Wundheilung gehen die angiogenetischen Prozesse zurück, während jetzt die Kollagenbildung und die Bildung von Regenerationsgewebe Überhand gewinnt. Wesentliches Merkmal hiervon ist die von den Rändern ausgehende Epithelialisierung, welche in drei Phasen abläuft:

1. Migration von Basalzellen
2. Mitotische Teilung von Epidermiszellen und deren Ausbreitung
3. Reifung neu gebildeter Zellen

Neben der beschriebenen, oberflächlichen Epithelialisierung wird auch der Aufbau der differenzierten Schichten der Haut vorangetrieben. Nach entsprechender Differenzierung verankern sich neu einsprossende Zellen mittels neu gebildeter Desmosomen, um eine feste Narbenbildung zu ermöglichen.

Diese hochdifferenzierten Umbauvorgänge sind auch bei völlig unkomplizierten Wunden erst nach mehreren Monaten abgeschlossen.

1.3 Mastzellen und Wundheilung

Während man lange Zeit davon ausging, dass Makrophagen die zentrale Rolle in fast allen Prozessen der Wundheilung spielen, wurde es in den letzten Jahren immer deutlicher, dass es die Mastzellen sind, welche den größten Teil der Aufgabe übernehmen, Faktoren zu produzieren, die entscheidende Rolle in Entzündungsprozessen und Wundheilungsprozessen spielen. Sowohl in akuten (30,64,69,86), wie auch in späteren Stadien (57,66) der Wundheilung befinden sich zahlreiche Mastzellen im betroffenen Gewebe.

1.3.1 Allgemeines

Unter den im Knochenmark gebildeten Zellen nehmen Mastzellen eine sehr ungewöhnliche Stellung ein, befinden sie sich doch den größten Teil ihres "Lebens" in anderen, fremden Geweben. Ihre Entstehung ist ein komplexer Prozess, aus welchem eine immer noch nicht gänzlich verstandene Heterogenität an Mastzellen hervorgeht. Dennoch sind zwei Untertypen bekannt, die sich sowohl in ihrem histochemischen und biochemischen Verhalten, als auch in ihrer Funktion voneinander unterscheiden lassen: Mukosamastzellen (mucosa mast cells, MMC) und Bindegewebsmastzellen (connective tissue mast cells, CTMC) (12,26,33).

Mastzellen sind im gesamten Körper des Menschen weit verbreitet, v.a. in der Haut, in den Atmungsorganen und im Verdauungskanal. Die klassische Aufgabe von Mastzellen besteht darin, im Rahmen von allergischen Reaktionen zu degranulieren und somit Histamin und 5-Hydroxytryptamin, zwei vasoaktive Amine, freizugeben, die zu erhöhter Kapillarpermeabilität führen. Zusammen mit anderen freigegebenen Arachidonsäurederivaten und Enzymen führen sie klinisch zu Rötung und Schwellung einerseits, andererseits zu Anziehung und Aktivierung anderer Zelllinien. Daneben wurden in den letzten Jahren zahlreiche Wachstumsfaktoren und Zytokine beschrieben, die von Mastzellen produziert und ausgeschüttet werden (vgl. Tab. 1, s.u.).

1.3.2 Mastzellen in Wundheilungsprozessen

Die Sofortreaktion von Mastzellen bei einer Verletzung besteht in deren Degranulation, was bereits präformierte Mediatoren (z.B. Histamin) in das umgebende Bindegewebe freigibt und durch Wirkung an den H₁-Rezeptoren zu Hyperämie und einer erhöhten Kapillarpermeabilität führt und auf diese Weise die Ursache für die klinischen Symptome Rötung und Schwellung darstellt (9,11,44,58,90).

Ein anderer sehr wichtiger Mediator ist das Heparin, ein hochgradig sulfatiertes saures Glycosaminoglycan, welches, bekannt für seine antikoagulatorische Eigenschaften, in der Medizin breite Anwendung gefunden hat. In der frischen Wunde spielt es einen wichtigen Beitrag in dem feinen Gleichgewicht zwischen Koagulation und Antikoagulation, an welchem neben den bekannten Gerinnungsfaktoren auch Prostazykline, Antithrombin III und Protein C beteiligt sind (17). Darüber hinaus konnte in den letzten Jahren gezeigt werden, dass

der Wachstumsfaktor FGF-basic (FGF-b oder FGF-2) zum einen von Mastzellen gebildet wird, zum anderen aber auch an Heparin gebunden in Mastzellen gespeichert und von diesen ausgeschüttet wird (73,93).

Deweiteren werden zahlreiche Zytokine wie IL-1, IL-3, IL-4 und IL-6, Wachstumsfaktoren wie FGF, EGF, PDGF, TGF α , TNF α und TNF β und Kolonie stimulierende Faktoren wie M-CSF und GM-CSF, welche alle an den komplexen Wundheilungsprozessen beteiligt sind, von Mastzellen produziert (39,48,61,67,84, Tab. 1). So sind z.B. angiogenetische Prozesse stark von der Mastzellpräsenz abhängig (63), welche über ihre Mediatoren solche Prozesse direkt beeinflussen. In späteren Wundheilungsphasen, in denen hauptsächlich Fibrozyten und Epithelzellen das histologische Bild bestimmen, ist v.a. ein Wachstumsfaktor von herausragender Bedeutung: der fibroblast growth factor (FGF). Er läßt aus Fibroblasten Fibrozyten ausdifferenzieren, führt bei den Epithelzellen zu einer erhöhten Proteasenproduktivität und gesteigerter Mitoseaktivität und ist schlussendlich auch stark an der Bildung der kollagenen Matrix (6,13,29,40,45,77) sowie angiogenetisch wirksam.

Auch was die zielgerichtete Bewegung von Mastzellen in das Wundgebiet angeht sind zahlreiche chemotaktisch aktive Substanzen für Mastzellen gefunden worden. Poole und Zetter konnten ein Peptid von 300-1000 Dalton identifizieren, welches direkt die zielgerichtete Beweglichkeit peritonealer Mastzellen beeinflusste und sahen darin einen wichtigen Faktor für die Tumolvaskularisation (71). Die selben Autoren konnten synthetische Tripeptide wie Glycylhistidylalanin herstellen und ihren stark chemotaktischen Reiz auf Mastzellen nachweisen. Eine andere chemotaktisch aktive Substanz, das Laminin, könnte einen Grund dafür darstellen, dass Mastzellen insbesondere in

Nähe der Basalmembran epithelialer Zellen gefunden wurden (20). Und seitdem bestätigt wurde, dass Mastzellen funktionelle Lamininrezeptoren exprimieren (88) ist dies noch weiter erhärtet worden. Meininger fand einen rekombinanten Stammzellfaktor, welcher selbst durch TGF β moduliert wurde und sich chemotaktisch auf Mastzellen auswirkte (62). Daneben wurden zahlreiche Zytokine wie IL-3, IL-4 und IL-10 beschrieben, welche sich dazu in der Lage zeigten, Mastzellen via Chemotaxis ins Wundgebiet zu rekrutieren (23,43,50,65, 86).

Aus alledem ist also offensichtlich, dass Mastzellen per se eine überaus wichtige Rolle in verschiedensten Wundheilungsprozessen spielen.

1.4 Nerven und Mastzellen

Neben der klassischen Stimulation von Mastzellen auf immunologische, IgE-abhängige Weise (39,57,61,87) werden Mastzellreaktionen auch durch physikalische, chemische und neurochemische Reize beeinflusst. Hierbei ist als Beispiel Substance P zu erwähnen, dessen Wirkung auf Mastzellen bereits bekannt ist (18). Neuere morphologische, pharmakologische und funktionelle Ergebnisse haben gezeigt, dass von zahlreichen Interaktionen zwischen Nerven und Mastzellen ausgegangen werden muss:

1.4.1 Morphologische und pharmakologische Ergebnisse

Mehrere Arbeitsgruppen um J. Bienenstock und R.H. Stead konnten zeigen, dass es deutliche mikroanatomische Beziehungen zwischen Mastzellen und Nervenfasern gibt (89). In den letzten Jahren konnten diese Nervenfasern darüber hinaus näher charakterisiert werden und es stellte sich heraus, dass es sich bei ihnen v.a. um unmyelinisierte C-Fasern handelt.

In der Lamina propria des Darms, und ähnlich auch im Respirations-trakt, wurden Mastzellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu Substance P- und CGRP-positiven Nerven nachgewiesen (25). Auch in kranker wie gesunder Haut wurden Mastzellen in besonderer Nähe zu Nerven gefunden (3,24,47,83).

Darauf aufbauend konnten zahlreiche pharmakologische Studien zeigen, dass durch Stimulation mit dem Neurotransmitter Substance P TNFa aus Mastzellen freigesetzt werden kann, während sich der Histamingehalt der Zellen dadurch nicht ändert (5,18).

Von anderen Neurotransmittern konnte ebenfalls gezeigt werden, dass sie Mastzellen beeinflussen, wenn auch die Erklärungen über die genaue Wirkungsweise dieser Neurotransmitter etwas widersprüchlich bleiben (91).

1.4.2 Funktionelle Ergebnisse

Verschiedenste Studien konnten zeigen, dass durch eine elektrische Nervenstimulation die Funktion von Mastzellen beeinflusst werden kann. So führte zum Beispiel eine elektrische Stimulation des Ganglion trigeminale bei Ratten zu einer ipsilateralen Mastzell-

degranulation in der Dura mater, welche verhindert werden konnte, wenn die Ratten in ihrer Jugend mit Capsaicin behandelt wurden (22). Im Gegensatz dazu wirkte sich eine elektrische Stimulation der sympathischen Halsganglien eher stabilisierend auf Dura mater-Mastzellen aus. Gottwald et al. konnten zeigen, dass eine elektrische Stimulation der Nervi vagi bei Ratten den Histamingehalt von Mukosamastzellen des Jejunums verändert (41). Ähnliche Beobachtungen wurden im Respirationstrakt allergischer Hunde gemacht (54,57).

1.5 Schlussfolgerungen

Mastzellen und Nerven spielen in verschiedensten Geweben, und v.a. auch in der Haut, eine wichtige Rolle und sind in der Lage, sich gegenseitig zu beeinflussen. Man kann also aus dem oben Dargelegten zu der Hypothese gelangen, dass Wundheilungsprozesse entscheidend durch neuronale Einflüsse beeinflusst werden können – und dies nicht nur auf direktem Wege, sondern auch entscheidend via Mastzellen. Auch würde dieses Zusammenwirken und die gegenseitige Beeinflussung von Nerven und Mastzellen manche anekdotische und teilweise auch neuere Studien zumindest teilweise erklären, welche die positiven Effekte einer "Elektrotherapie" auf das Heilen von Wunden beschrieben (1,2,4,7,14,27,35-38,42,52,55,75, 92).

Aber auch für das nähere Verständnis chronischer diabetischer Ulcera könnte dies eine entscheidende Rolle spielen: Der Diabetes mellitus stellt aufgrund seiner Neuropathie ein besonderes Risiko für die Ausbildung und die Unterhaltung chronischer Ulcera dar. Zum einen führt

diese Neuropathie zu einer Denervation und folglich Deformität des Fußgewölbes, was wiederum zu Fehlbelastung führt und dann häufig den Weg zum diabetischen Ulcus ebnet. Aber auch auf andere Weise könnte diese Neuropathie ursächlich für die Ulcusgenese sein: Nämlich durch die gestörte Interaktion zwischen Nervensystem und Mastzellsystem, welche sich durch die diabetische Zerstörung der Nervenfasern ergeben könnte. Dies könnte dann auch eventuell eine Erklärung dafür sein, weshalb bei Diabetikern häufig Ulcera auch an Stellen vorkommen, die keinerlei Druck oder anderem äußerlichen Stress ausgesetzt sind.

1.6 Fragestellung

Aus dem eben Dargelegten ergibt sich somit auch die Fragestellung dieser Arbeit:

In der vorliegenden Arbeit soll untersucht werden, inwieweit in sich regenerierendem Granulationsgewebe chronischer Ulcera Interaktionen zwischen dem Nervensystem einerseits und dem Mastzellsystem andererseits bestehen: Führt eine elektrische Feldstimulation von Nerven in einem chronischen Ulcus eines geeigneten Modells zu einer Mastzellantwort ?

Als Modell dient dabei das humane, chronische, rein venöse Ulcus, bei dem man, anders als beim diabetischen Ulcus, von einer völlig intakten nervalen Versorgung ausgehen kann.

Die Mastzellantwort wird durch die Anfärbung histologischer Schnitte aus dem Gebiet dieser Ulcera mit Alcian Blau und die immunhisto-

chemische Anfärbung des Histamins und deren quantitative Auswertung objektiviert.

Desweiteren wird der Wachstumsfaktor FGF-basic, der zweifellos wichtigste Wachstumsfaktor in heilenden Wunden, und wie oben beschrieben unter anderem von Mastzellen produziert, immunhistochemisch dargestellt und die entsprechenden Histologien ebenfalls quantitativ ausgewertet.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

| | |
|-------------------------------|--|
| Chemikalienlöffel | Fa. Aesculap, Tuttlingen |
| Färbebänke | Fa. Schott, Wiesbaden |
| Feuchte Färbekammern | Fa. Schott, Wiesbaden |
| Glasmaterial | Fa. Schott, Wiesbaden |
| Lichtmikroskop | Leitz Durchlichtmikroskop DM RBE, Fa. Leica, Wetzlar |
| Mikrotom | Rotationsmikrotom RM 2035, Fa. Leica, Wetzlar |
| pH-Meter | Fa. WTW, Weilheim |
| Pinzetten | Fa. Aesculap, Tuttlingen |
| Pipetten | Multipette, Fa. Eppendorf, Hamburg |
| Quantitative Mikroskopie | Quantimet 600, Fa. Leica, Wetzlar |
| Rühr-/Heizgerät | Fa. Gerhardt, Bonn |
| Schüttelmixer | Vortex Genie, Fa. Scientific Industries, N.Y., USA |
| Stoppuhren | Fa. Baeuerle, VS-St. Georgen |
| tcpO ₂ -Messung | TCM 2, Radiometer Copenhagen A/S, Kopenhagen, Dänemark |
| Transkutane Nervenstimulation | Einkanalstimulator, Fa. Tettamed, Köln Selbstklebende Elektroden 2834, Fa. Tettamed, Köln |
| Waagen | FA 240 und AE 160, Fa. Mettler, Gießen |

| | |
|--------------|--------------------------------|
| Wärmebad | HI 1210, Fa. Leica, Wetzlar |
| Wärmeplatte | Histoplate, Fa. Leica, Wetzlar |
| Wärmeschrank | Fa. Bachofer, Reutlingen |
| Wasserbad | Fa. UGW, Lauda |

2.1.2 Antikörper und Chemikalien

| | |
|-----------------------------------|-----------------------|
| ABC-rabbit-IgG-Kit | Fa. Sigma, MO, USA |
| Alcian Blau 8GX | Fa. Sigma, MO, USA |
| 3-Amino-9-ethylcarbazole | Fa. Sigma, MO, USA |
| 3-Aminopropyltriethoxysilane | Fa. Merck, Darmstadt |
| N,N-Dimethylformamid | Fa. Merck, Darmstadt |
| Gelatine, gepulvert | Fa. Merck, Darmstadt |
| Rabbit-IgG-anti-FGF-b | Fa. Sigma, MO, USA |
| Rabbit-IgG-anti-histamine | Fa. Chemikon, CA, USA |
| Streptavidin | Fa. Dako, Hamburg |
| Swine-IgG-anti-rabbit-IgG (biot.) | Fa. Dako, Hamburg |
| Swine serum | Fa. Dako, Hamburg |
| Tris(hydromethyl)aminomethan | Fa. Sigma, MO, USA |
| Trypsin | Fa. Sigma, MO, USA |

Alle übrigen Chemikalien (in p.A.-Qualität) wurden von der Firma Merck, Darmstadt bezogen.

2.1.3 Verbrauchsmaterialien

| | |
|------------|-------------------------------|
| Deckgläser | Fa. Langenbrinck, Emmendingen |
|------------|-------------------------------|

| | |
|-----------------|---------------------------------------|
| Einmalskalpelle | Cutfix, Fa. B. Braun-Dexon, Melsungen |
| Histokit | Fa. Roth, Karlsruhe |
| Objektträger | Fa. Langenbrinck, Emmendingen |
| Pipettenspitzen | Fa. Greiner, Nürtingen |
| Probenröhrchen | Fa. Eppendorf, Hamburg |

2.1.4 Puffer und Lösungen

| | |
|--------------------|---|
| AEC-Puffer | 50 ml Natriumacetat-Lösung 1 M 20 ml Essigsäure 1 M 930 ml A. dest. auf pH = 5,0 eingestellt |
| AEC-Lösung | 20 mg AEC 5 ml N-N Dimethylformamid 95 ml AEC-Puffer 50 µl H ₂ O ₂ |
| Alcian Blau-Lösung | 2 g Alcian Blau 8GX 1000 ml HCl 0,7 N |
| Aptex-Lösung | 4 ml Aptex 196 ml Aceton |
| FAM | 100 ml Formaldehyd 3,7% 100 ml Eisessig 800 ml Methanol |

| | |
|--|---|
| Methanol/H ₂ O ₂ | 120 ml Methanol 2 ml H ₂ O ₂ |
| NBF | 110 ml Formaldehyd 37% 890 ml A. dest. 4,55 g NaH ₂ PO ₄ (2 H ₂ O) 8,14 g Na ₂ HPO ₄ (2 H ₂ O) |
| TBS | 60,6 g TRIS-Puffer basisch 85,4 g NaCl mit 20 ml HCl 25% und A. dest. auf 1000 ml Gesamtmenge gelöst und auf pH = 7,6 ein- gestellt |
| Trypsinlösung | 98 ml TBS 0,1 g Trypsin 2 ml CaCl ₂ -Lösung 5% |

2.2 Patientengut

Für die vorliegende Arbeit wurden Gewebeproben untersucht, welche von Patienten gewonnen wurden, die an beiden Unterschenkeln Ulcera von jeweils mindestens 5 cm² aufwiesen. Es wurde streng darauf geachtet, dass diese Ulcera cruris rein CVI-bedingt waren und sowohl ein Diabetes mellitus, als auch eine pAVK ausgeschlossen war. Weitere Ausschlusskriterien waren: Infektion der Wunden; Medikation (bis zu 12 Wochen zuvor) mit Immunsuppressiva, Kortison, Heparin, Dextranen, Salicylaten oder NSAIDs; Chemo- oder Radiotherapie bis

12 Wochen zuvor; immuninkompetente Patienten, Autoimmunkrankheiten (z.B. Vaskulitis, rheumatoide Arthritis); Herzschrittmacher, Herzarrhythmien und sonstige Herzerkrankungen; Gerinnungsstörungen; Bindegewebserkrankungen; hämatologische, neurologische (insbesondere periphere Nervenschädigungen oder Nervenleitungsstörungen) oder endokrine Erkrankungen; Schwangere.

Die Patienten wurden über Ziel und Inhalt der Studie und über das Procedere der Probengewinnung, insbesondere über die Transkutane Elektrische Nervenstimulation (TENS) genauestens unterrichtet. Für die Aufnahme des Patienten in die Studie wurde eine schriftliche Einwilligung des Patienten vorausgesetzt. Den Patienten stand es frei, zu jeder Zeit die Teilnahme an der Studie zu beenden.

Es wurden 11 Patienten in die Studie eingeschlossen. Das Alter der Patienten reichte von 64 bis 88 Jahren, das Mittel lag bei 75,5 Jahren. Die offenen Wunden bestanden zum Zeitpunkt der Studiendurchführung seit zwischen 6 Monaten und 19 Jahren, das Mittel lag bei 4 Jahren und 4 Monaten.

2.3 Transkutane Sauerstoffpartialdruckmessung

Bei der transkutanen Sauerstoffpartialdruckmessung (tcpO₂-Messung) handelt es sich um eine nichtinvasive Methode, indirekt die Durchblutung einer bestimmten Körperpartie (z.B. einer Extremität) zu bestimmen. Sie basiert im Prinzip auf der Tatsache, dass die Erhöhung der Hauttemperatur eine Erhöhung der Hautdurchblutung und somit auch eine Erhöhung des Sauerstoffpartialdrucks bewirkt und die Haut für die Gasdiffusion durchlässig macht.

Die Messelektrode erwärmt die darunterliegende Haut und führt zu einer lokalen Hyperämie, was einer natürlichen, physiologischen Reaktion der Haut auf Wärme entspricht. Die Wärme erweitert die Blutgefäße in diesem Bereich, senkt damit den Strömungswiderstand und steigert die Durchblutung, um einen kühlenden Effekt zu erzeugen. Die gesteigerte Durchblutung arterialisiert das Kapillarblut, d.h. hebt den pO_2 -Wert auf annähernd arterielles Niveau. Desweiteren führt die Erwärmung der Haut dazu, dass an dieser Stelle die absolut dichte Membran für den Gastransport durchlässig wird. Die Messelektrode, bei der es sich um einen äußerst genauen Gassensor handelt, kann somit direkt die Sauerstoffgaskonzentration messen, woraus dann präzise der arterielle Sauerstoffpartialdruck errechnet wird (49,89).

Die $tcpO_2$ -Messung wurde während der Elektrostimulation deswegen durchgeführt, um mit großer Wahrscheinlichkeit auszuschließen, dass etwaige Mastzellreaktionen z.B. aufgrund einer massiven locoregionären Hyperämie, bedingt durch die Elektrostimulation, zustande kamen. Das Mittel der Sauerstoffpartialdruckmessung ist hierbei eine Möglichkeit, hyperämische Effekte im Groben auszuschließen. Sicherlich ist sie keine ausreichend suffiziente Methode, Durchblutungsänderungen der Haut im Detail zu dokumentieren. Diesbezüglich wären andere Mittel wie die z.B. die Laser Doppler Fluxmetrie weitaus geeigneter. Für die Kontrolle der Hautdurchblutung in grobem Maße scheint die transkutane Sauerstoffpartialdruckmessung jedoch ausreichend zu sein.

Im Stimulationsablauf wird die Messelektrode dabei neben das Ulcus cruris angebracht. Es wird darauf geachtet, dass diese mindestens 20 min. vor Stimulationsbeginn angebracht wird, damit der zeitwierige

Vorgang der Hauterwärmung durch die Elektrode vollständig abgeschlossen ist und der korrekte tcpO₂-Wert angezeigt wird. Die Elektrodenkerntemperatur beträgt hierbei 41°C.

2.4 Gewebeproben

2.4.1 Gewinnung der Gewebeproben

Durch Zufall wird ein Bein des Patienten ausgewählt, welches elektrisch stimuliert wird. Dazu werden ober- und unterhalb des Ulcus im Abstand von 20 cm zwei Elektroden an das zu stimulierende Bein angebracht und daran das Nervenstimulationsgerät angeschlossen. Neben dem Ulcus ist, wie bereits oben erwähnt, die Elektrode zur transkutanen Messung des pO₂ angebracht.

Vor Stimulationsbeginn werden auf beiden Seiten mittels Pinzette und Skalpell scharf Gewebeproben aus dem Wundgrund entnommen (Stimulationsseite: Probe S0, Kontrollseite: Probe K0). Dabei wird darauf geachtet, dass diese etwa eine Größe von 40-60 mm² und eine Dicke von 2-3 mm besitzen. Desweiteren wird der tcpO₂-Wert abgelesen und dokumentiert.

Danach beginnt die Stimulation. Bei dem Stimulationsstrom handelt es sich um einen monophasischen, gepulsten Rechteckstrom mit folgenden Charakteristika: Pulsfrequenz 6 Hz, Impulsdauer 180 µs, Stromstärke 36 mA. Bei der Wahl dieser Stromcharakteristika, von denen bekannt ist, dass es durch sie direkt zu einer Stimulation der C-Fasern kommt, wurde insbesondere auf Arbeiten von Peters et al. und Berthoud et al. zurückgegriffen, welche unterschiedliche Strom-

formen (v.a. Frequenz) und deren Wirkung auf unterschiedliche Nervenfasern untersuchten (10,51,68,70).

Im Abstand von 5 min. wird weiter der tcpO₂-Wert abgelesen und dokumentiert. Nach 30 min. wird die Stimulation beendet und es werden wiederum auf beiden Seiten Gewebeproben aus dem Wundgrund entnommen (Proben S30 und K30).

2.4.2 Processing der Gewebeproben

Die auf oben genannte Weise erhaltenen Gewebeproben werden halbiert und jeweils eine Hälfte in NBF und FAM fixiert. Nach 16 Std. Fixationsdauer werden die Gewebeproben mittels eines Einbettautomaten entwässert und dann in Paraffin eingebettet. Dabei wird darauf geachtet, dass die Wundgrundproben flach mit der Schnittfläche nach oben eingebettet werden. In Form dieser Paraffinblöcke werden die Gewebeproben gelagert.

2.5 Klassische Mastzellfärbung mit Alcian Blau

2.5.1 Theorie

Alcian Blau 8GX ist ein wasserlöslicher Phthalocyaninfarbstoff, welcher 1950 von Steedman zur selektiven Färbung von Mukosubstanzen eingeführt wurde. Die undifferenzierte Methode ermöglicht den Nachweis saurer Mukosubstanzen ohne Unterscheidbarkeit von carboxylierten oder sulfatierten sauren Mukosubstanzen. Saure Mukosubstanzen werden durch Alcian Blau leuchtend blau an-

gefärbt, wobei Zellkerne vorteilhafterweise nicht angefärbt werden und bei Bedarf leicht gegengefärbt werden können. Um zwischen carboxylierten und sulfatierten sauren Mukosubstanzen unterscheiden zu können, wurden zwei Wege vorgeschlagen: Entweder man senkt den pH-Wert der Farbstofflösung so weit ab, bis die Dissoziation der Carboxylgruppen aufgehoben wird und nur noch Sulfatgruppen saure Valenzen aufweisen (Methode nach Lev und Spicer, 1964) oder man hebt bei höherem pH-Wert durch Zusatz eines anderen Elektrolyts (z.B. $MgCl_2$) die Dissoziation der Carboxylgruppen auf, dass wiederum nur die sulfatierten sauren Valenzen für die Anfärbung bereitstehen (kritische Elektrolytkonzentrationsmethode nach Scott und Dorling, 1965). Bei dieser Arbeit wurde die saure Methode in 0,7 N Salzsäure angewandt, um die große Gruppe der Heparine (saure, hochgradig sulfatierte Mukosubstanzen), welche in den Mastzellen gespeichert sind, darzustellen.

2.5.2 Durchführung

Von den FAM-fixierten Gewebeproben werden 3 μm dicke Schnitte angefertigt und auf Aptex-beschichtete Objektträger aufgezogen.

Die Schnitte werden zunächst mit Xylol entparaffiniert und danach 30 min. mit einem Gemisch aus Methanol und H_2O_2 versetzt. Danach werden sie in 0,7 N HCl eingestellt und für 16 h in Alcian Blau-Färbelösung gefärbt. Nach Abschluss der Färbung werden sie in 0,7 N HCl gespült und kurz unter fließendem Leitungswasser differenziert. Daraufhin werden sie zur Kontrasterhöhung 2 sek. lang in klassischer Eosin-Färbelösung gegengefärbt und dann mithilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert, in Xylol gebracht und in Histokit einge-

deckt. Die Mastzellen erscheinen unter dem Lichtmikroskop hellblau angefärbt (s. Abb. 1).

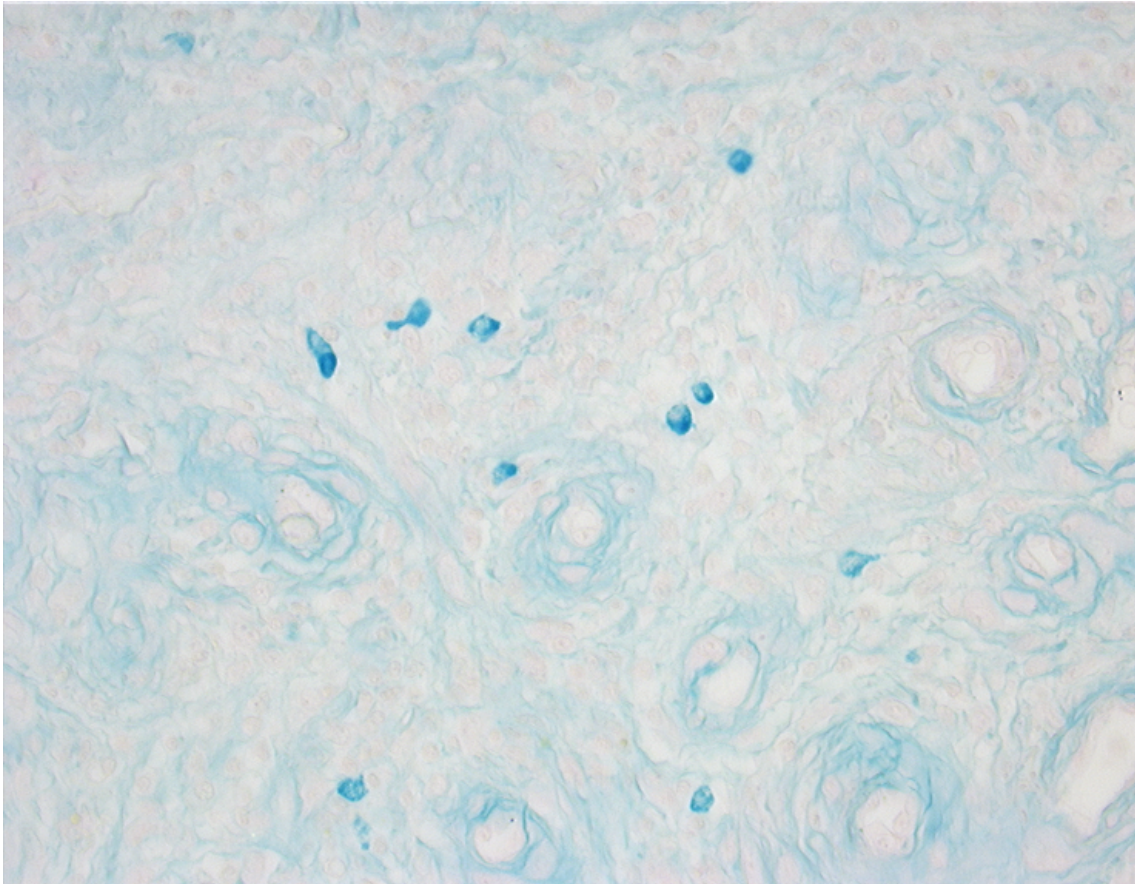


Abb. 1: Mastzellfärbung mit Alcian Blau bei 400-facher Vergrößerung: Man erkennt deutlich die leuchtend blau angefärbten Mastzellen. Bei den intrazellulären rundlichen Aufhellungen handelt es sich um die entsprechenden Zellkerne.

2.6 Immunhistochemie

2.6.1 Prinzip immunhistochemischer Färbemethoden

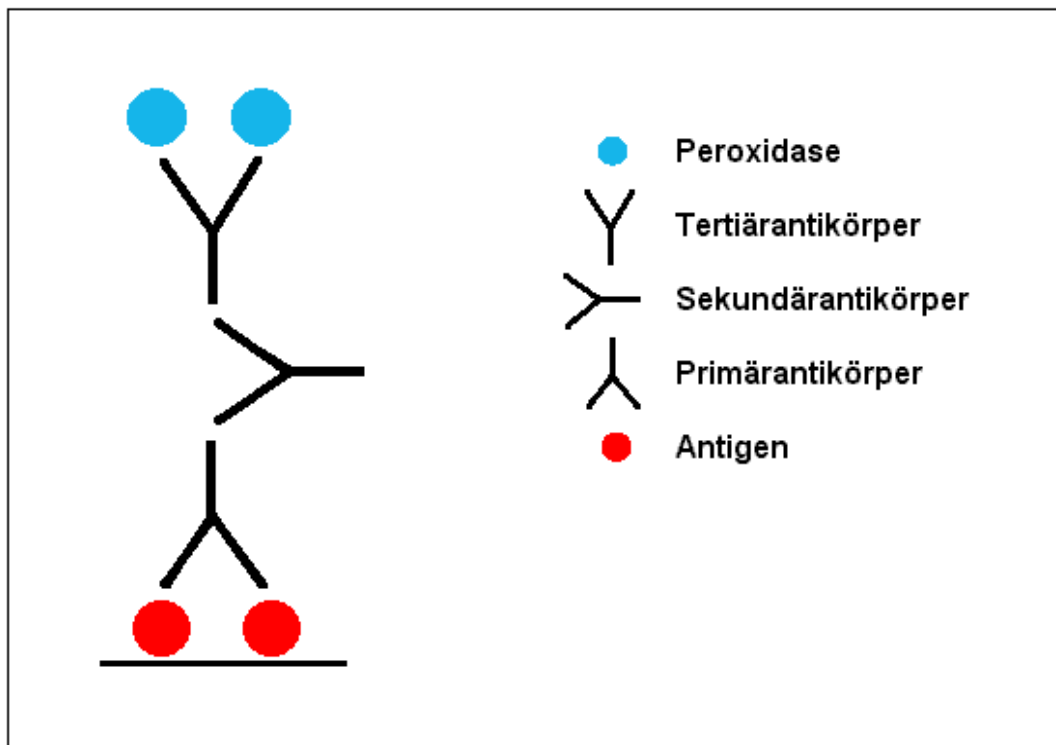


Abb. 2: Indirekte Antikörper-Enzym-Brücken-Methode: Ein brückenbildender Antikörper (Sekundärantikörper) verbindet den mit Peroxidase konjugierten Tertiärantikörper (Streptavidin) mit dem gegen das nachzuweisende Antigen gerichteten Primärantikörper. Die Immunreaktion wird durch den histochemischen Nachweis des Enzyms Peroxidase sichtbar gemacht.

Als Beispiel für immunhistochemische Nachweisverfahren wird im Folgenden die unter anderem verwendete indirekte Antikörper-Enzym-Brücken-Methode mit Biotin/Streptavidin beschrieben: Im Prinzip handelt es sich bei immunhistochemischen Nachweisverfahren um Antikörperfärbungen. Um ein bestimmtes Antigen nachzuweisen, ver-

wendet man sogenannte Primärantikörper. Dabei kommen entweder monoklonale Antikörper, vom Typ IgG, welche von einem bestimmten B-Lymphozyten stammen und damit nur an ein einzelnes Epitop des Antigens binden können, oder polyklonale Antikörper (ebenfalls vom Typ IgG), welche ein Gemisch mehrerer genetisch verschiedener Antikörper verschiedener B-Lymphozyten gegen ein bestimmtes Antigen darstellen und somit in ihrer Gesamtheit an verschiedene Epitope des Antigens binden, zum Einsatz. Nach erfolgter Bindung des Primärantikörpers an das Antigen wird der Sekundärantikörper, ein biotinylierter Antikörper, welcher spezifisch gegen IgG desjenigen Tieres gerichtet ist, das zur Herstellung des Primärantikörpers verwendet wurde. Handelt es sich zum Beispiel um einen primären Rattenantikörper, so verwendet man einen Sekundärantikörper, zum Beispiel aus dem Schwein, gegen Ratten-IgG. Das Biotin, welches fest mit dem Sekundärantikörper konjugiert wurde, hat die Eigenschaft, dass es eine hohe Affinität zu Streptavidin besitzt (Dissoziationskonstante 10^{-19} M). Fügt man also nun Streptavidin (Tertiärantikörper) hinzu, welches seinerseits mit einer Peroxidase markiert wurde, so erreicht man schlussendlich eine lange Kette aus Antigen / Primärantikörper / Sekundärantikörper / Streptavidin / Peroxidase (s. Abb. 2). Es muss nun nur noch mittels einer Substrat-Chromogenreaktion (z.B. mit AEC, oder auch DAB) die Peroxidase sichtbar gemacht werden (s.g. Entwicklung), was bei AEC zu einer Rotfärbung (s. Abb. 3), bei DAB zu einer Rot-Braunfärbung (s. Abb. 4) führt.

2.6.2 Histamin-spezifische Antikörperfärbung

Vorbereitend für die immunhistochemischen Färbungen werden von den NBF-fixierten Gewebeproben 2 µm dicke Schnitte angefertigt und auf Aptex-beschichtete Objektträger aufgezogen.

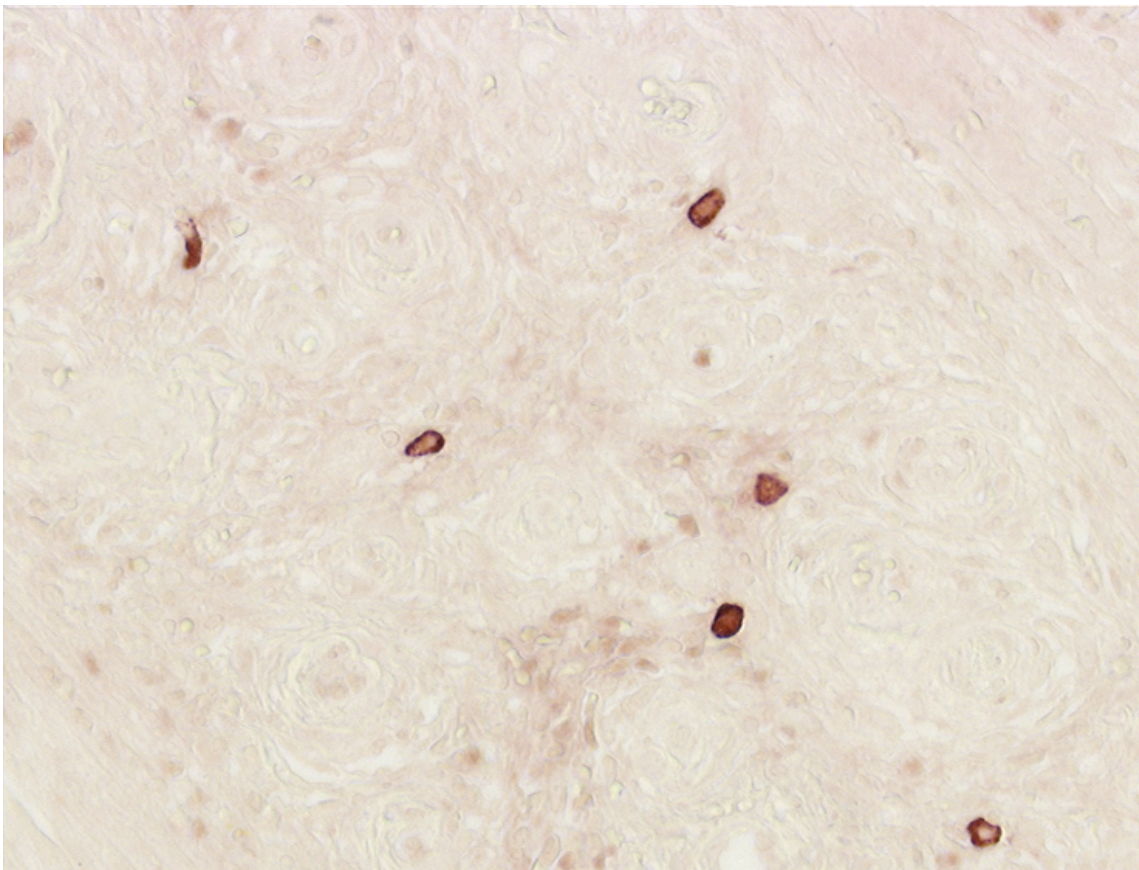


Abb. 3: Immunhistochemische Histamin-Färbung bei 400-facher Vergrößerung: Man erkennt deutlich das rot angefärbte Histamin der Mastzellen. Die intrazellulären rundlichen Aufhellungen entsprechen den Zellkernen.

Die oben gewonnenen Schnitte werden mit Xylol entparaffiniert. Zur Verbesserung der Färbeergebnisse werden die Schnitte zunächst 15

min. mit einem Gemisch aus Methanol und H_2O_2 versetzt, um die endogen im Gewebe vorhandenen Peroxidasen zu blockieren, danach bewässert und in TBS eingestellt. Zur Demaskierung des Histamins werden die Schnitte 30 min. bei $37^\circ C$ trypsiniert und daraufhin 20 min. lang mit Normal-Schweine-Serum (1:5 in TBS verdünnt) inkubiert. Danach werden sie zunächst 60 min. bei Raumtemperatur mit dem Primärantikörper (rabbit-IgG-anti-histamine, 1:200 in TBS verdünnt), dann 30 min. bei Raumtemperatur mit dem Sekundärantikörper (biotinyliertes swine-IgG-anti-rabbit-IgG, 1:100 in TBS verdünnt) und schließlich 30 min. bei Raumtemperatur mit dem Tertiärantikörper (Streptavidin, 1:100 in TBS verdünnt) inkubiert. Schlussendlich wird 15 min. lang mit AEC-Lösung entwickelt, was bei positiver Reaktion zu einer roten Anfärbung des Histamins unter dem Lichtmikroskop führt (s. Abb. 3).

2.6.3 FGF-spezifische Antikörperfärbung

Diese immunhistochemische Färbung wurde durch das immunhistochemische Labor des Pathologischen Institutes der Universität Tübingen, Abteilung für Spezielle Histo- und Zytopathologie (Prof. Dr. med. E. Kaiserling) durchgeführt.

Für den immunhistochemischen Nachweis des Wachstumsfaktors FGF-basic werden von den NBF-fixierten Gewebeproben ebenfalls 2 μm dicke Schnitte angefertigt und auf Aptex-beschichtete Objektträger aufgezogen.

Diese Schnitte werden entparaffiniert, mit einem Gemisch aus Methanol und H_2O_2 versetzt und daraufhin in TBS eingestellt. Zur Demaskierung werden sie 10 min. lang in der Mikrowelle vorbehandelt.

Danach werden sie 30 min. lang mit Normal-Schweine-Serum bei Raumtemperatur inkubiert und dann für 60 min. mit dem durch den Hersteller vorverdünnten Primärantikörper (Kit-Baustein) versetzt.

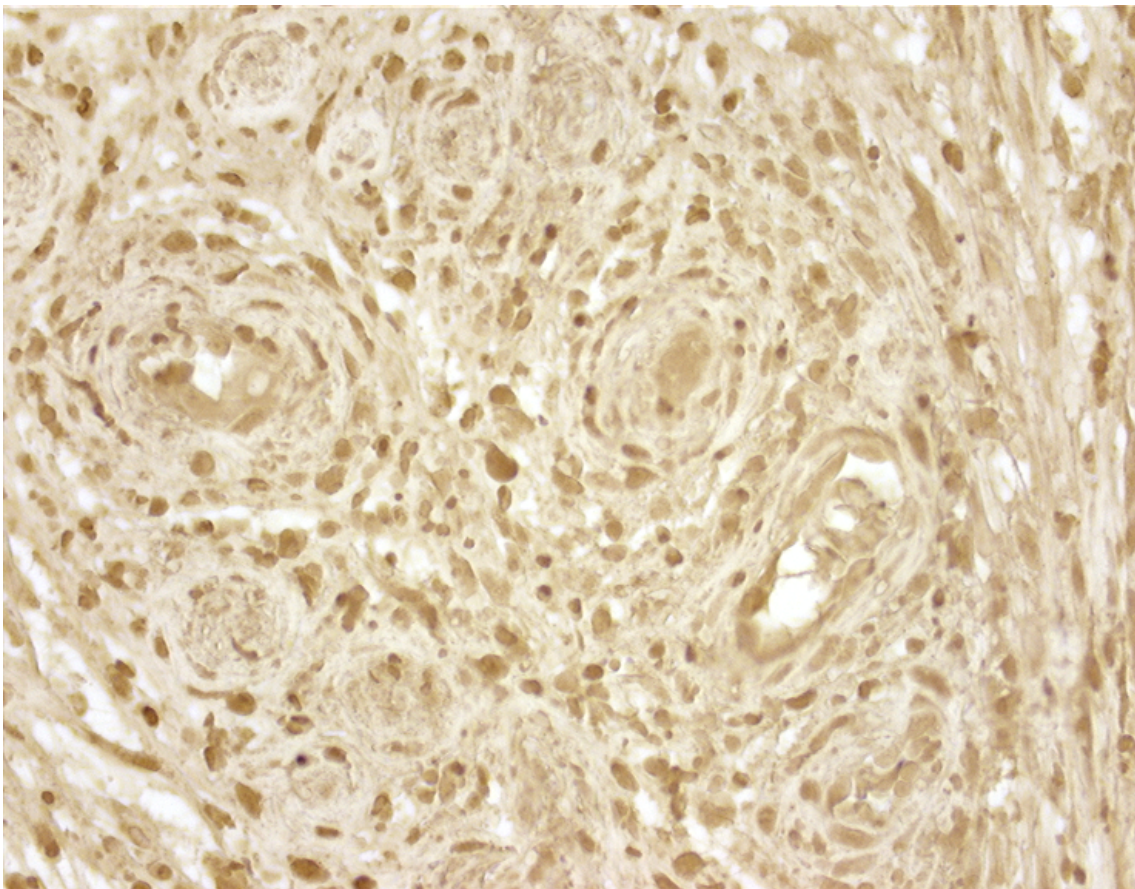


Abb. 4: Immunhistochemische FGF-Färbung bei 400-facher Vergrößerung: Neben Mastzellen sind auch zahlreiche andere Zelltypen wie Makrophagen, Granulozyten, Fibroblasten und Fibrozyten angefärbt.

Zur Ausführung der restlichen Färbeschritte wird ein ABC-Kit der Fa. Sigma verwendet. Die gefärbten Schnitte werden nach der Entwicklung in einer aufsteigenden alkoholischen Reihe entwässert, daraufhin in Xylol überführt und in Histokit eingedeckt. Unter dem Licht-

mikroskop erscheinen FGF-positive Zellen rot-braun angefärbt (s. Abb. 4). Auch bei dieser Färbung wird darauf geachtet, dass miteinander zu vergleichende Schnitte miteinander gefärbt werden.

2.6.3.1 Zusatzfärbung mit Alcian Blau

Wie aus Tabelle 1 ersichtlich, wird FGF von zahlreichen unterschiedlichen Zelltypen (Mastzellen, Makrophagen, Granulozyten u.a.m.) produziert und ist somit auch in zahlreichen verschiedenen Zelltypen histochemisch nachweisbar. Die reine FGF-Färbung, wie oben beschrieben, ist somit also nicht mastzellspezifisch. Um in diesen Schnitten Mastzellen von den anderen Zelltypen unterscheiden zu können, wurden die oben gewonnenen Schnitte nach durchgeführter mikroskopischer Auswertung (vgl. Kap. 2.7) noch zusätzlich mit Alcian Blau nachgefärbt.

Dazu werden die eingedeckelten Schnitte in Xylol gebracht und so lange darin belassen, bis sämtliche Deckgläser sich abgelöst haben und zu Boden der Küvette gesunken sind. Die Objektträger werden mittels einer absteigenden alkoholischen Reihe bewässert und der Alcian Blau-Färbung, wie sie oben beschrieben ist (vgl. Kap. 2.5), zugeführt. Nach 24-stündigem Färbevorgang werden die Schnitte differenziert, entwässert und in Histokit eingedeckt.

Durch diese Doppelfärbung kam es zwangsläufig zu einer Mischfarbenbildung. Die rot-braun gefärbten Strukturen veränderten ihre Farbe entsprechend ihrer unterschiedlich starken FGF-Anfärbung und ihrer unterschiedlich starken Alcian Blau-Bindung in ein helles bis dunkles, sattes Grün (vgl. Abb. 5). Bei Mastzellen, welche im Gegensatz zu den restlichen Strukturen in besonderem Maße das Alcian

Blau aufnahmen, kam es zu einer kräftigen, etwas mehr ins Bläuliche reichenden, leuchtenden Grünfärbung (vgl. Abb. 5).

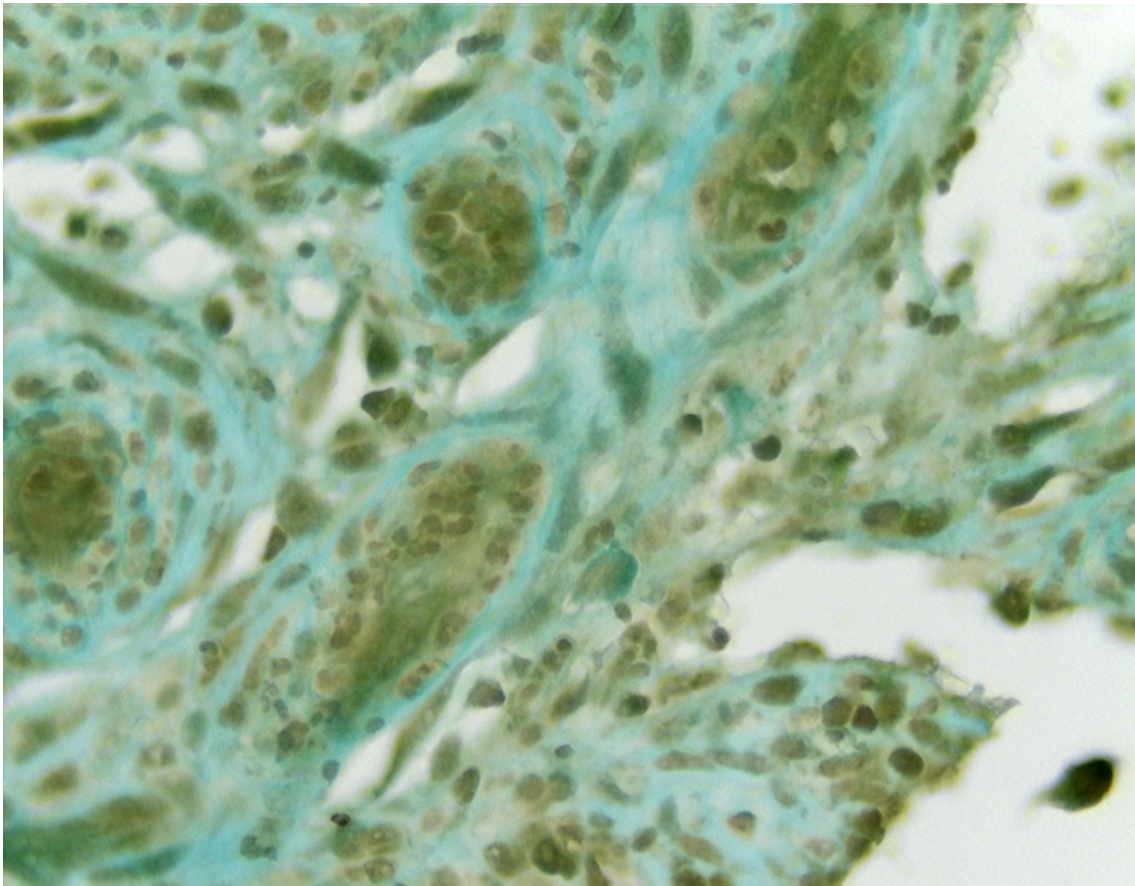


Abb. 5: Immunhistochemische FGF-Färbung und Alcian Blau-Färbung im Sinne einer Doppelfärbung bei 630-facher Vergrößerung: Die in der FGF-Färbung positiven, rot-braun angefärbten Zellen (vgl. Abb. 4) verändern durch die zusätzliche Alcian Blau-Färbung ihre Farbe in ein kräftiges Grün. Die mit dem Pfeil () markierte Zelle weist im Vergleich eine etwas kräftigere, leuchtende, ins Bläuliche reichende Grünfärbung. Sie wird somit in Zusammenschau mit morphologischen Kriterien (Größe, Form, intrazelluläre Granulierung) als Mastzelle erkannt. Zu beachten ist zudem die FGF-positive Anfärbung des zugehörigen Zellkerns, der jedoch kein Alcian Blau bindet.

2.7 Quantitative mikroskopische Auswertung

2.7.1 Lichtmikroskopie

Die histologische Untersuchung der gefärbten Paraffinschnitte erfolgte mit einem Durchlichtmikroskop der Fa. Leica (s. Kap. 2.1.1). Die Objektive und die Okulare stammten ebenfalls von der Fa. Leica. Alle Messungen wurden, soweit nicht anders genannt, mit dem 40x-Objektiv und einem 10x-Okular, also bei 400-facher Vergrößerung, durchgeführt.

2.7.2 Quantitative Mikroskopie

Mithilfe der Quantitativen Mikroskopie (Quantimet, s. Kap. 2.1.1) ist es möglich, lichtmikroskopische Bilder quantitativ auszuwerten. Dabei werden in einer Sequenz von Rechenoperationen sämtliche Informationen des lichtmikroskopischen Bildes auf wenige Daten zusammengefasst. Diese Messdaten werden dann, entsprechend der Anwendung und Fragestellung moduliert und weiterverarbeitet. Das grundlegende Prinzip kann wie folgt standardisiert dargestellt werden:

2.7.2.1 Schaffung des Graubildes

Das Computersystem wandelt die Informationen des analogen, lichtmikroskopischen Bildes, welche von einer 3-Chip Videokamera von Sony geliefert werden, in ein elektronisches Signal um, das dann von

einem Digitalkonverter digitalisiert wird und nunmehr in Form verschieden starker Grauwerte für folgende Berechnungen bereitsteht. Die kleinste Einheit der computergestützten Auswertung ist dabei das Pixel. Von entscheidender Bedeutung für die Auswertbarkeit ist die Qualität des histologischen Schnittes, welche in erster Linie für ein Scheitern der Methode verantwortlich sein kann. Über eine computergestützte Bearbeitung der Grauwerte durch Änderungen der Durchleuchtung, des Kontrasts, der Filterung und des Hintergrundtones ist es aber dennoch möglich, Proben so zu optimieren, dass korrekte Messungen noch möglich sind.

2.7.2.2 Detektion der zu messenden Strukturen

Bei den Experimenten kam es darauf an, zum einen die Dichte der zu detektierenden Strukturen (Mastzellen) pro bestimmte Fläche, zum anderen die Optische Dichte der Mastzellen zu bestimmen. Dabei wurden die Einstellungen und Schwellenwerte so definiert, dass zum einen Mastzellen gut kontrastiert, zum anderen aber auch Dichteunterschiede zwischen verschiedenen Mastzellen gut dargestellt wurden. Bei der Fläche, welche ausgewertet wurde, handelte es sich um sechs aneinandergrenzende Gesichtsfelder, welche durch entsprechendes Positionieren von Markierungen auf dem Computermonitor genauestens in ihrer Fläche berechnet wurden.

2.7.2.3 Binäre Bildumrechnung

Als Ergebnis der computergestützten Bilderkennung, welche durch manuelle Korrekturen (wie Umfahren, Trennen, Löschen, Hinzufügen bestimmter Areale) noch weiter optimiert wurden, erhielt man binäre Bilder, welche dann dem eigentlichen Messvorgang bereitstanden. Zur Bestimmung der Zelldichte pro Flächeneinheit wurden die als positiv detektierten Zellen in dem zuvor manuell markierten Areal gezählt und dann zusammen mit der markierten Gesamtfläche der 6 Gesichtsfelder die Zelldichte errechnet (\times Mastzellen/mm², \times MC/mm²). Zur Erlangung densidometrischer Ergebnisse über die Mittlere Optische Dichte (mean optical density, MOD) der positiv detektierten Zellen mussten Grauwertmessungen vorgenommen werden. Dabei war es nötig, mit entsprechenden Filtern der Fa. Kodak eine Grauwertkalibrierung vorzunehmen. Dann wurde additiv der gesamte Grauwert der einzelnen positiven Zellen bestimmt und daraus unter Einbeziehung der Zellflächen der mittlere Grauwert (entspricht der MOD) errechnet. Schlussendlich wurde noch aus den Werten der Zelldichte und der MOD das Produkt gebildet und als Integrierte Optische Dichte (integrated optical density, IOD) definiert. Die Datenausgabe erfolgte in Form von Microsoft-Excel[®]-Dateien, welche dann statistisch ausgewertet wurden.

2.7.2.4 Besonderheiten der Durchführung

Zunächst wurden sämtliche Objektträger kodiert und die Seiten- und Zeitkennung (z.B. K30) überklebt, so dass die auswertende Person nicht wusste, um welche Probe es sich handelte. Es wurde lediglich

darauf geachtet, dass die Patientenkenntung weiterhin ersichtlich war, um die miteinander zu vergleichenden Proben eines Patienten mit den gleichen Einstellungen und Kalibrierungen untersuchen zu können. Für die Färbungen Alcian Blau, Histamin und FGF (Einzelfärbung) wurde, wie oben beschrieben, die quantitative Mikroskopie durchgeführt. Im Falle der FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung wurde wegen der Notwendigkeit, Mastzellen aufgrund der Farbe und der Morphologie (Form, Größe, intrazelluläre Granulierung) zu determinieren, eine 630-fache Vergrößerung (63x-Objektiv, 10x-Okular) gewählt und auf eine automatische, computergestützte Detektion (welche sich lediglich auf die Farbe stützt) verzichtet. Stattdessen wurde basierend auf der Morphologie zusammen mit der Anfärbung, welche durch "Spielen" mit dem Schärfe-Feintrieb genauestens untersucht wurde, schlussendlich durch den Untersucher entschieden, bei welchen Zellen es sich um Mastzellen handelte, und bei welchen nicht. Diese wurden dann per Hand mit der Computermaus am Monitor umrandet und somit der weiteren Auswertung zugeführt. Aufgrund der etwas stärkeren Vergrößerung (630-fach) wurden hier 8 aneinanderliegende Gesichtsfelder ausgewertet. Die Bestimmung der MOD und die resultierenden Berechnungen waren identisch zu denen der anderen Färbungen.

2.8 Statistische Auswertung

Sämtliche statistischen Prozeduren und Analysen wurden vom Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen (Prof. Dr. rer. nat. K. Dietz) durchgeführt.

Die Analysen wurden dabei computergestützt durchgeführt und hierfür die Jump[®]-Software verwendet.

Bei den Rohdaten handelte es sich um nicht normalverteilte Wertemengen. Es erschien deswegen wenig sinnvoll, neben den Mittelwerten für die einzelnen Gruppen die Standardabweichung anzugeben, da dies eine Gauß'sche Normalverteilung impliziert hätte, und jedoch für nicht normalverteilte Mengen keine Aussagekraft besitzt. So wurden vielmehr der geometrische Mittelwert, die obere und untere 5%-Konfidenzgrenze und somit das 90%-Konfidenzintervall bestimmt, was einen in die Lage versetzt, sich zumindest ein mehr oder weniger scharfes Bild über die Wertemenge bilden zu können.

Um Signifikanzaussagen über diese Wertemengen machen zu können wurden sie einer Varianzanalyse unterzogen. Da lediglich relative und keine absoluten Unterschiede bei der Auswertung von Belang waren, wurden die Rohwerte hierfür logarithmiert und dann die relativen Unterschiede der Probenpaare S30/K30 und S0/K0 eines einzelnen Patienten miteinander verglichen. Weiter wurden diese Vergleiche geometrisch gemittelt, auf symmetrische Weise die obere und untere Konfidenzgrenzen des 90%-Konfidenzintervalls bestimmt und diese der Signifikanzprüfung unterzogen und entsprechende p-Werte bestimmt (Konfidenzmethode nach Turkey). Bei der Interpretation dieser p-Werte wurde die Signifikanzschwelle bei $p=0,05$ gesetzt, so dass ein signifikanter Unterschied bei $p<0,05$ angenommen wurde.

3 Ergebnisse

3.1 Ergebnis der transkutanen Sauerstoffpartialdruckmessung

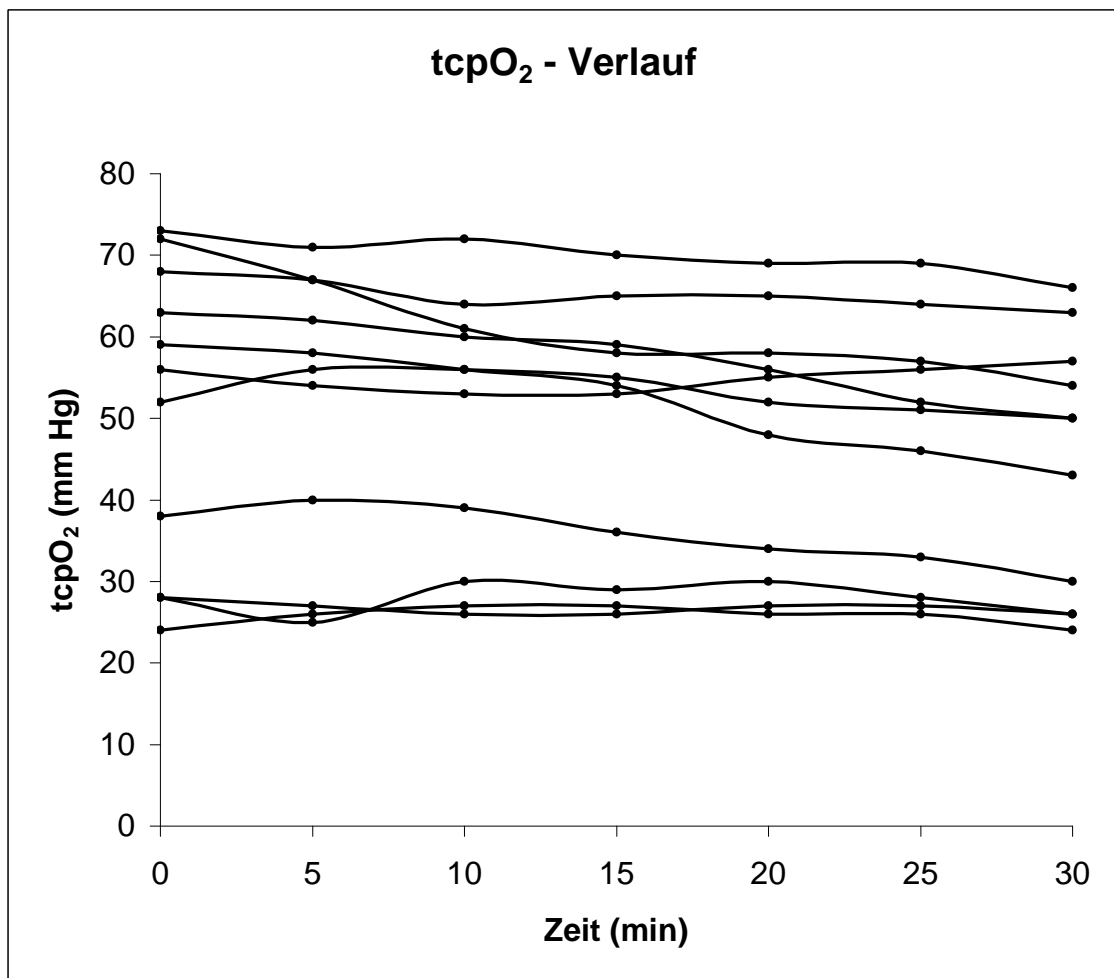


Abb. 6: Darstellung der transkutan gemessenen Sauerstoffpartialdruckverläufe (tcpO₂-Wert-Verläufe) der einzelnen Patienten. Aus den Einzelwerten wurde der entsprechende Kurvenverlauf interpoliert.

Die Verlaufsbeobachtung der transkutan gemessenen Sauerstoffpartialdrücke (tcpO₂-Werte) ergab die in Abbildung 6 gezeigten Ergebnisse.

Wie aus der graphischen Darstellung ersichtlich ist, kam es während der 30-minütigen Stimulation bei keinem der 11 Patienten zu relevanten Anstiegen der tcpO₂-Werte. Es kam somit auch zu keiner stimulationsbedingten Hyperämie in großem Ausmaß (vgl. hierzu die Erläuterungen in Kap. 2.3) der betroffenen Extremität. Die im Folgenden also dargelegten Ergebnisse sind somit mit großer Wahrscheinlichkeit Ausdruck einer direkten Mastzellreaktion auf die periphere Elektrostimulation und nicht etwa Folge einer ausgeprägten locoregionären Hyperämie mit entsprechender Konzentrationserhöhung mastzellaktiver Mediatoren aus dem Blut.

Da für diese Arbeit lediglich eine grobe Einschätzung der Durchblutungssituation am stimulierten Bein von Interesse war und eine detaillierte Aussage zur Hautdurchblutung aufgrund der Methodenwahl per se nicht möglich ist, wurde auf eine statistische Analyse dieser Daten bewusst verzichtet.

3.2 Ergebnisse der Alcian Blau-Färbung

3.2.1 Mastzellichte

Die statistische Auswertung der durch die quantitative Bildanalyse erhaltenen Daten ergab auf der Stimulationsseite zum Zeitpunkt 0 min. (S0) für die Mastzellichte einen geometrischen Mittelwert von 37,59 MC/mm² und ein 90%-Konfidenzintervall von 30,45 MC/mm² bis 46,39 MC/mm². Zum Zeitpunkt 30 min. (S30) waren dies am

stimulierten Bein als Mittelwert 51,84 MC/mm² und als Konfidenzgrenzen 45,38 MC/mm² und 63,99 MC/mm².

Auf der Kontrollseite betrug zum Zeitpunkt 0 min. (K0) der Mittelwert 35,23 MC/mm² (Konfidenzgrenzen: 28,54 MC/mm² und 43,49 MC/mm²) und zum Zeitpunkt 30 min. (K30) 36,77 MC/mm² (Konfidenzgrenzen: 29,79 MC/mm² und 45,38 MC/mm²).

Die vergleichende Varianzanalyse der logarithmierten Werte ergab für den Unterschied zwischen S30 und K30 im Vergleich mit S0/K0 ein $p=0,0402$.

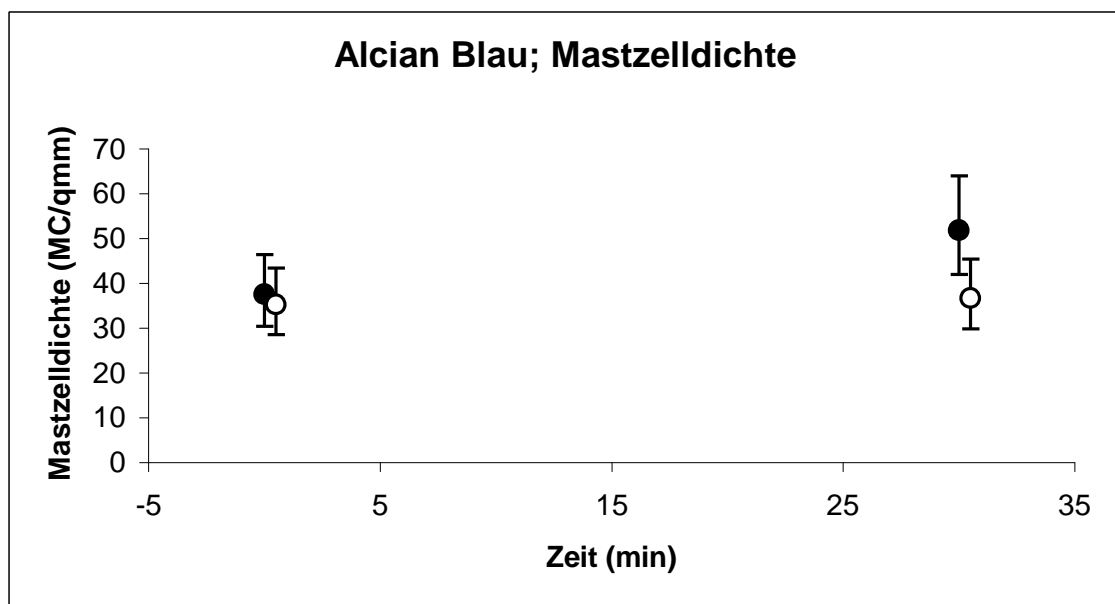


Abb. 7: Geometrisch gemittelte Mastzellichte der Alcian Blau-Färbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz – Stimulationsseite, Weiss – Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,0402$.

Es ergab sich somit ein signifikanter Anstieg der Mastzellichte durch die Stimulation (vgl. Abb. 7).

3.2.2 Mittlere Optische Dichte

Für die MOD ergaben sich für S0 ein Mittelwert (MW) von 0,43 units (Konfidenzgrenzen [KG]: 0,37 units und 0,50 units) und für S30 ein Mittelwert (MW) von 0,50 units (Konfidenzgrenzen [KG]: 0,44 units und 0,58 units).

Auf der Kontrollseite betrug für K0 der Mittelwert (MW) 0,46 units (Konfidenzgrenzen [KG]: 0,40 units und 0,53 units) und für K30 0,48 units (Konfidenzgrenzen [KG]: 0,42 units und 0,56 units).

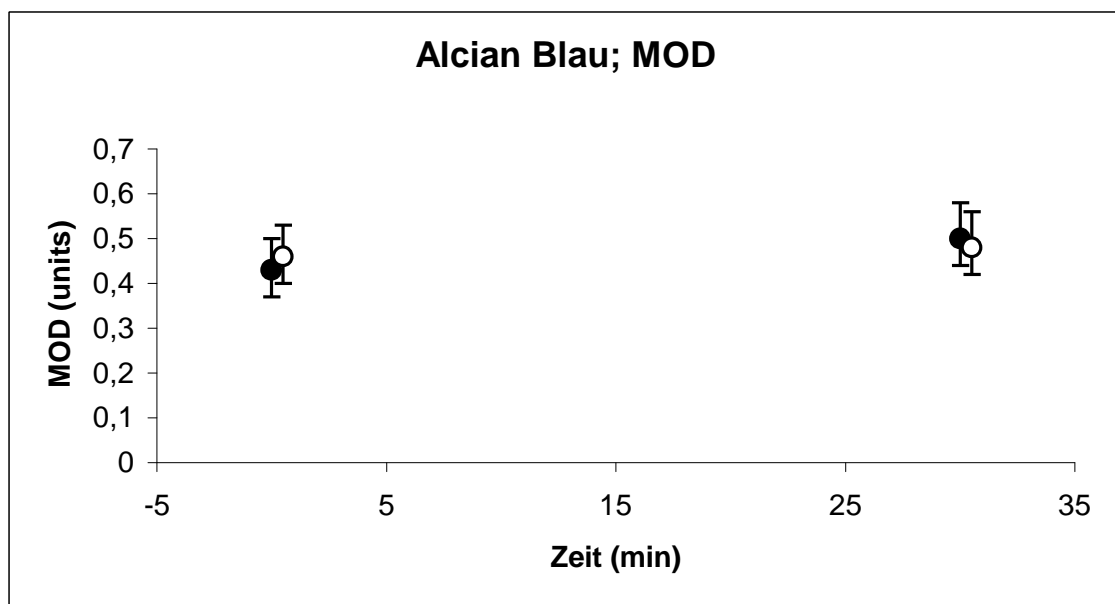


Abb. 8: Geometrisch gemittelte Mittlere Optische Dichte (MOD) der Alcian Blau-Färbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz – Stimulationsseite, Weiss – Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,2486$.

Bei der Varianzanalyse ergab sich für den Vergleich S30/K30 mit S0/K0 ein $p=0,2486$.

Es kam somit zu einem leichten Anstieg der MOD durch die Stimulation bei der Alcian Blau-Färbung, dieser war aber aufgrund der Signifikanzschwelle von $p < 0,05$ nicht signifikant (vgl. Abb. 8).

3.2.3 Integrierte Optische Dichte

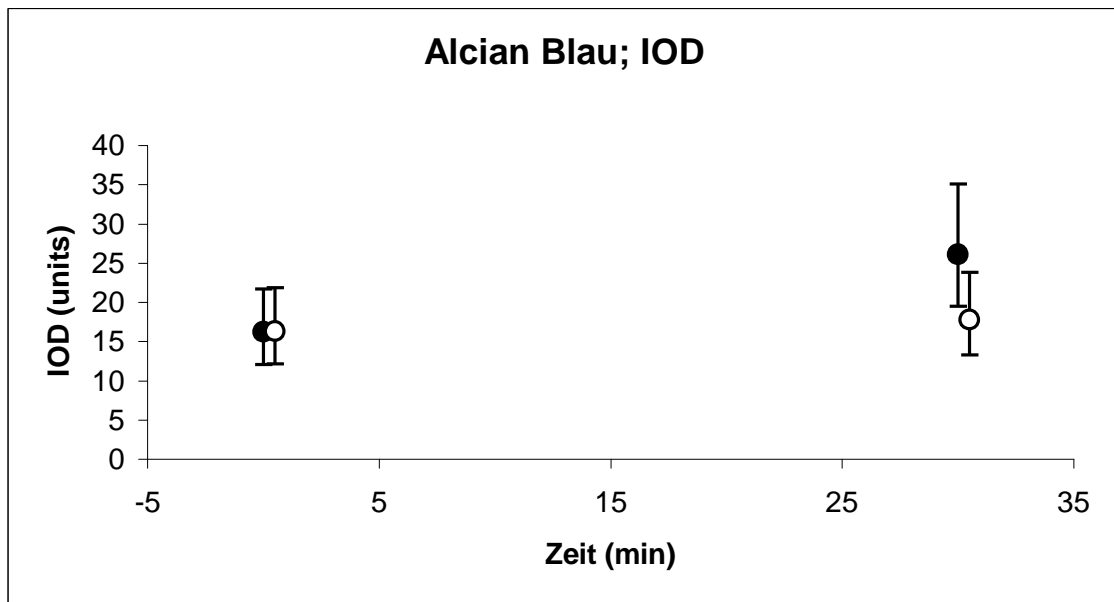


Abb. 9: Geometrisch gemittelte Integrierte Optische Dichte (IOD) der Alcian Blau-Färbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz – Stimulationseite, Weiss – Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,0334$.

Für die Integrierte Optische Dichte ergaben sich folgende Werte:

S0: MW: 16,21 units, KG: 12,08 units und 21,74 units
 S30: MW: 26,16 units, KG: 19,51 units und 35,09 units
 K0: MW: 16,31 units, KG: 12,16 units und 21,88 units

K30: MW: 17,79 units, KG: 13,27 units und 23,86 units

Als p-Wert ergab sich $p=0,0334$.

Es ergab sich somit eine signifikante Änderung der IOD im Vergleich S30/K30 und S0/K0 durch die Stimulation (vgl. Abb. 9).

3.3 Ergebnisse der Histamin-Färbung

3.3.1 Mastzellichte

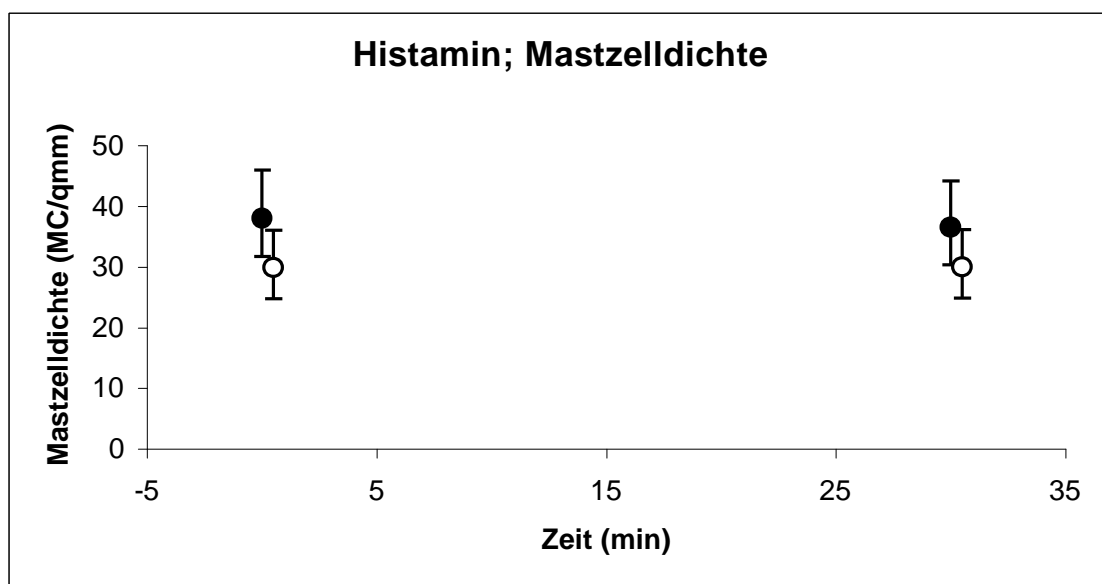


Abb. 10: Geometrisch gemittelte Mastzellichte der Histamin-Färbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz - Stimulationsseite, Weiss - Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,7765$.

Bei der Histamin-Färbung ergaben sich für die Mastzell-dichte folgende Werte:

S0: MW: 38,11 MC/mm², KG: 31,88 MC/mm² und 45,99 MC/mm²

S30: MW: 36,34 MC/mm², KG: 30,12 MC/mm² und 43,86 MC/mm²

K0: MW: 29,94 MC/mm², KG: 24,81 MC/mm² und 36,13 MC/mm²

K30: MW: 30,05 MC/mm², KG: 24,90 MC/mm² und 36,26 MC/mm²

Als p-Wert ergab sich $p=0,7765$.

Es ergab sich somit keine Veränderung der Mastzell-dichte im Vergleich S30/K30 mit S0/K0 (vgl. Abb. 10).

3.3.2 Mittlere Optische Dichte

Für die MOD ergaben sich folgende Werte:

S0: MW: 0,29 units, KG: 0,25 units und 0,33 units

S30: MW: 0,48 units, KG: 0,42 units und 0,55 units

K0: MW: 0,32 units, KG: 0,28 units und 0,37 units

K30: MW: 0,31 units, KG: 0,27 units und 0,36 units

Als p-Wert ergab sich $p=0,0002$.

Es kam also zu einer hoch signifikanten Erhöhung der MOD im Vergleich S30/K30 mit S0/K0 (vgl. Abb. 11).

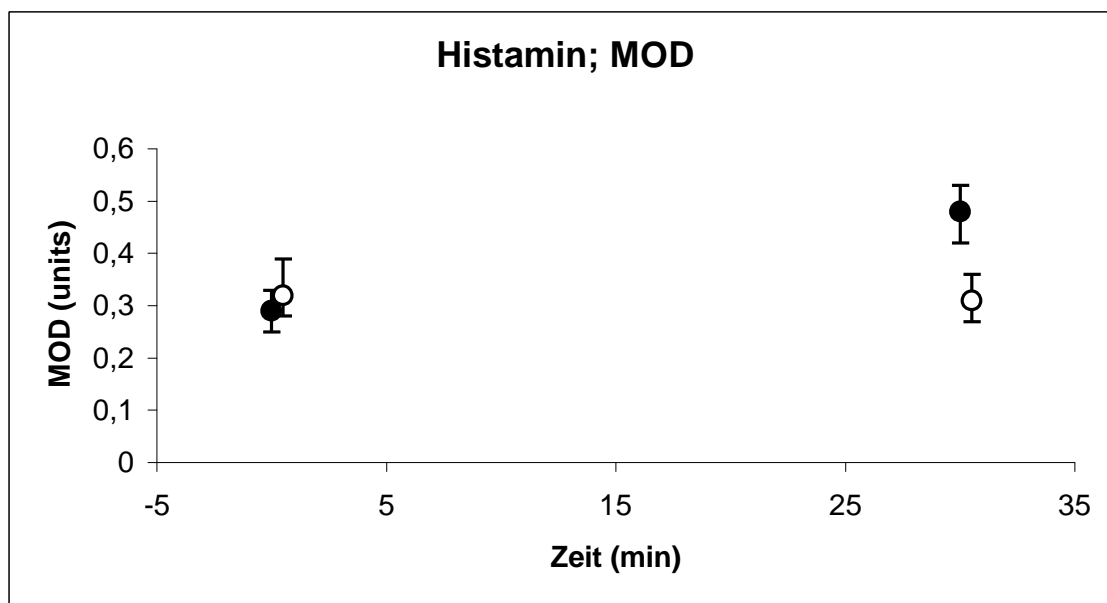


Abb. 11: Geometrisch gemittelte Mittlere Optische Dichte (MOD) der Histamin-Färbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz - Stimulationsseite, Weiss - Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,0002$.

3.3.3 Integrierte Optische Dichte

Für die IOD ergaben sich folgende Werte:

S0: MW: 11,07 units, KG: 8,56 units und 14,32 units

S30: MW: 17,48 units, KG: 13,51 units und 22,62 units

K0: MW: 9,56 units, KG: 7,39 units und 12,37 units

K30: MW: 9,41 units, KG: 7,27 units und 12,17 units

Als p-Wert ergab sich $p=0,0507$.

Für die IOD ergab sich also eine deutliche Zunahme im Vergleich S30/K30 mit S0/K0, diese war aber wegen der Signifikanzschwelle von $p < 0,05$ nicht signifikant (vgl. Abb. 12).

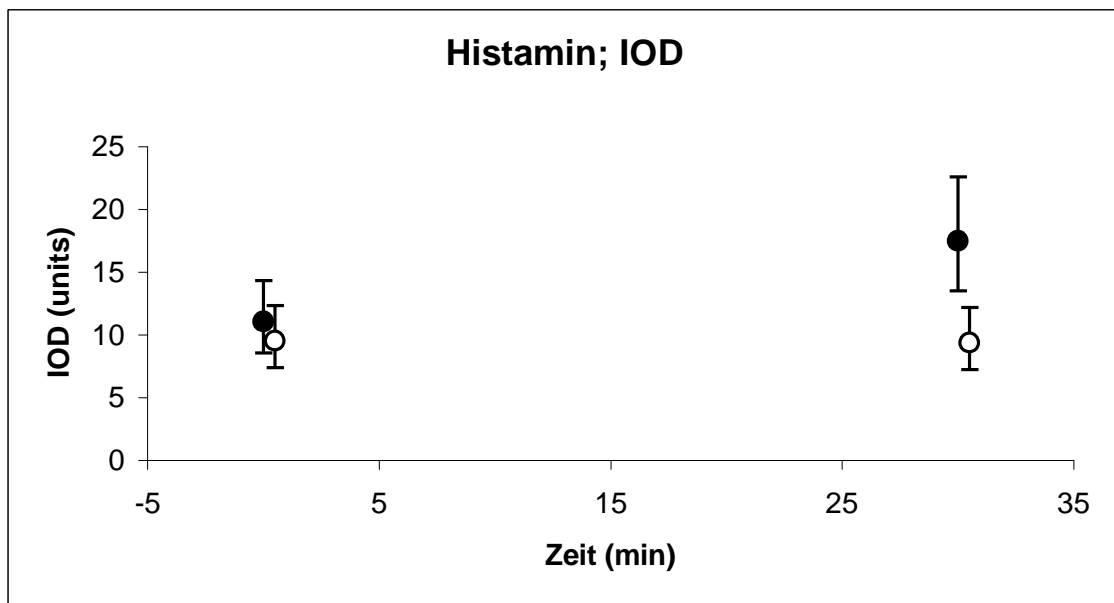


Abb. 12: Geometrisch gemittelte Integrierte Optische Dichte (IOD) der Histamin-Färbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz - Stimulationsseite, Weiss - Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,0507$.

3.4 Ergebnisse der FGF-Einzelfärbung

3.4.1 Zelldichte

Bei der FGF-Einzelfärbung ergaben sich für die Zelldichte folgende Werte:

S0: MW: 3612 C/mm², KG: 2395 C/mm² und 5448 C/mm²

S30: MW: 3434 C/mm², KG: 2277 C/mm² und 5180 C/mm²
K0: MW: 3625 C/mm², KG: 2404 C/mm² und 5469 C/mm²
K30: MW: 3241 C/mm², KG: 2149 C/mm² und 4489 C/mm²

Als p-Wert ergab sich $p=0,7137$.

Es ergab sich somit keine Veränderung der Zelldichte im Vergleich S30/K30 mit S0/K0 (vgl. Abb. 13).

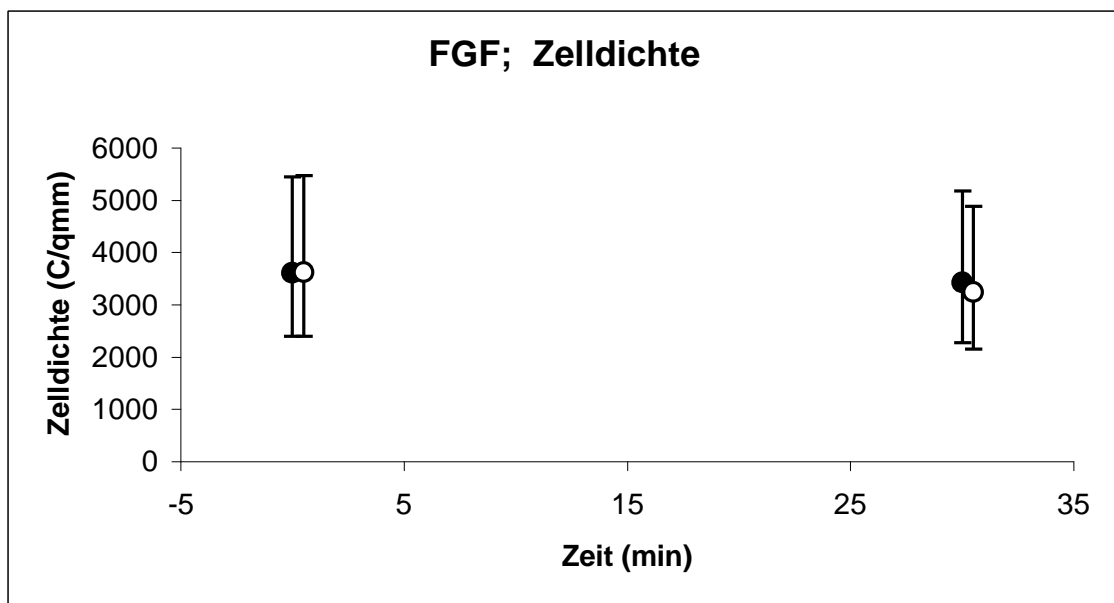


Abb. 13: Geometrisch gemittelte Zelldichte der FGF-Einzelfärbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz - Stimulationsseite, Weiss - Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,7137$.

3.4.2 Mittlere Optische Dichte

Für die MOD ergaben sich folgende Werte:

S0: MW: 0,46 units, KG: 0,41 units und 0,51 units

S30: MW: 0,45 units, KG: 0,41 units und 0,50 units

K0: MW: 0,46 units, KG: 0,41 units und 0,51 units

K30: MW: 0,45 units, KG: 0,40 units und 0,50 units

Als p-Wert ergab sich $p=0,7786$.

Es kam also zu keiner Veränderung der MOD im Vergleich S30/K30 mit S0/K0 (vgl. Abb. 14).

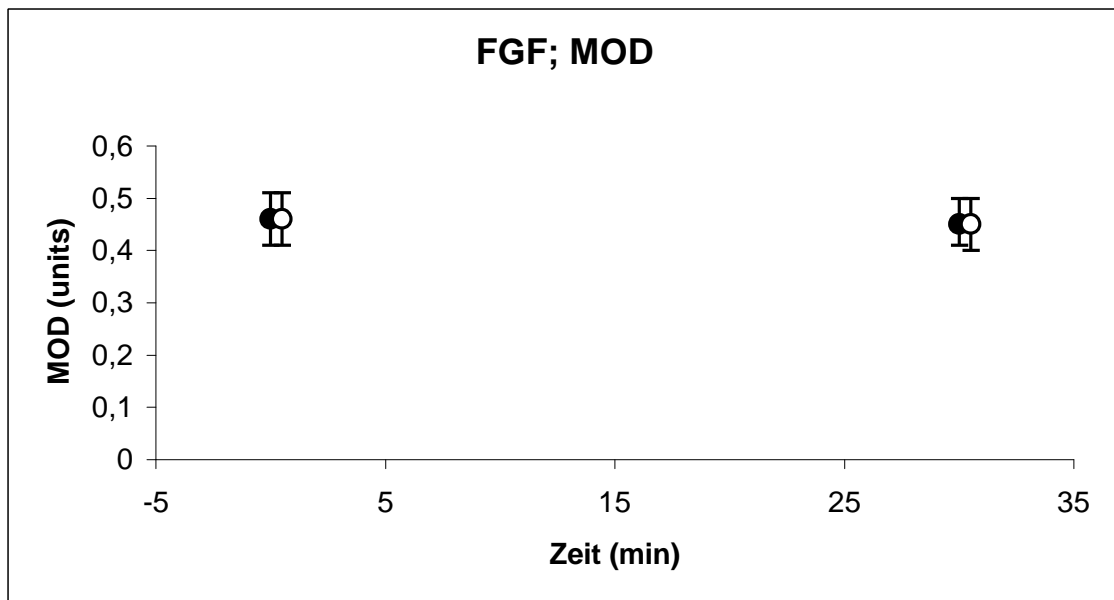


Abb. 14: Geometrisch gemittelte Mittlere Optische Dichte (MOD) der FGF-Einzelfärbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz - Stimulationsseite, Weiss - Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,7786$.

3.4.3 Integrierte Optische Dichte

Für die IOD ergaben sich folgende Werte:

S0: MW: 1651 units, KG: 1157 units und 2358 units

S30: MW: 1553 units, KG: 1088 units und 2218 units

K0: MW: 1652 units, KG: 1157 units und 2359 units

K30: MW: 1474 units, KG: 1033 units und 2105 units

Als p-Wert ergab sich $p=0,7573$.

Für die IOD ergab sich also keine Veränderung der IOD im Vergleich S30/K30 mit S0/K0 (vgl. Abb. 15).

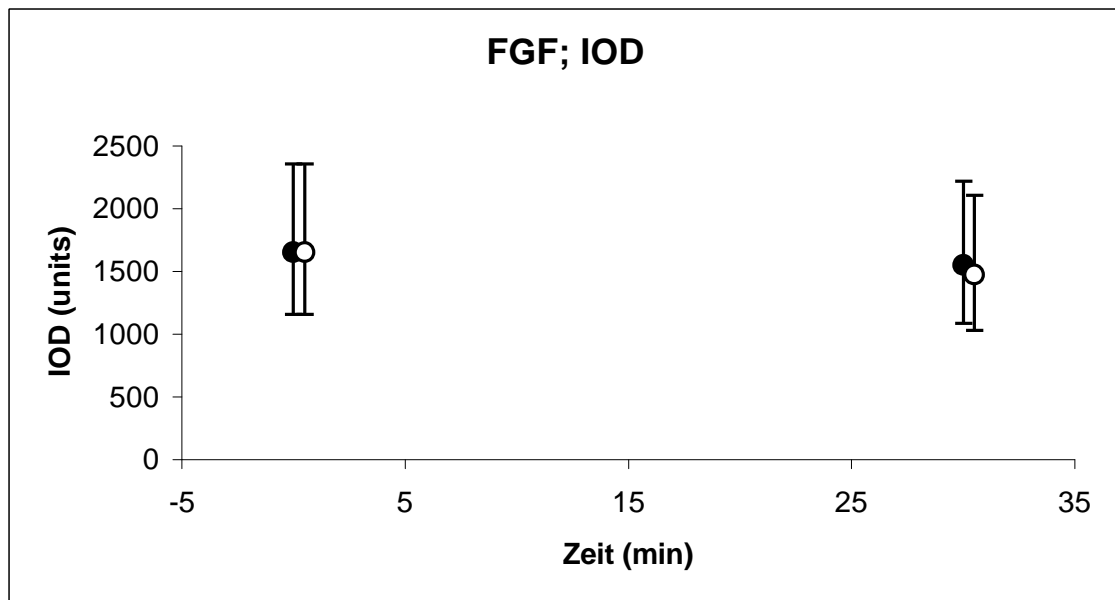


Abb. 15: Geometrisch gemittelte Integrierte Optische Dichte (IOD) der FGF-Einzelfärbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz - Stimulationsseite, Weiss - Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,7573$.

3.5 Ergebnisse der FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung

3.5.1 Mastzellichte

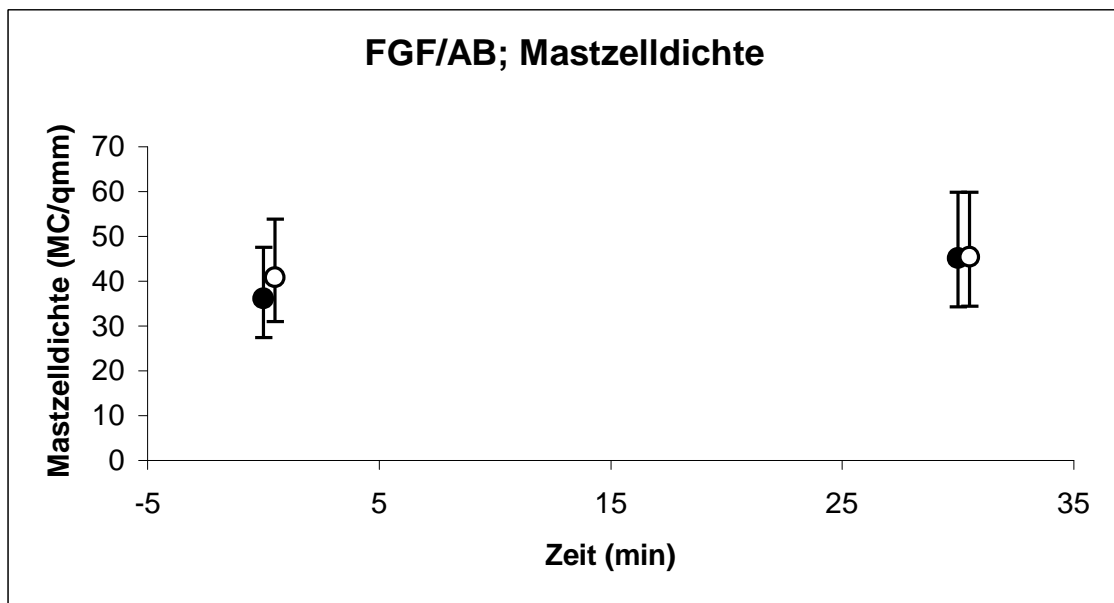


Abb. 16: Geometrisch gemittelte Mastzellichte der FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz - Stimulationsseite, Weiss - Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,2764$.

Bei der FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung ergaben sich für die Mastzellichte folgende Werte:

S0: MW: 36,13 MC/mm², KG: 27,41 MC/mm² und 47,63 MC/mm²

S30: MW: 45,19 MC/mm², KG: 27,41 MC/mm² und 59,56 MC/mm²

K0: MW: 40,88 MC/mm², KG: 31,01 MC/mm² und 53,88 MC/mm²

K30: MW: 45,45 MC/mm², KG: 34,48 MC/mm² und 59,90 MC/mm²

Als p-Wert ergab sich $p=0,2764$.

Es ergab sich somit eine kleine Erhöhung der Mastzellichte im Vergleich S30/K30 mit S0/K0, diese war aber aufgrund der Signifikanzschwelle von $p<0,05$ bei weitem nicht signifikant (vgl. Abb. 16).

3.5.2 Mittlere Optische Dichte

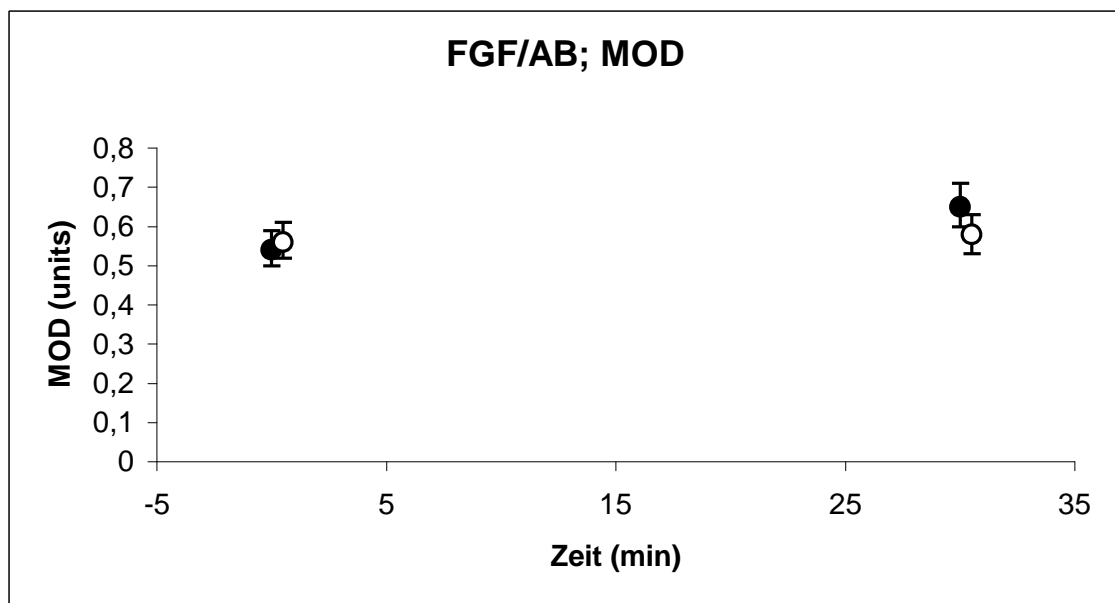


Abb. 17: Geometrisch gemittelte Mittlere Optische Dichte (MOD) der FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz - Stimulationsseite, Weiss - Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,0734$.

Für die MOD ergaben sich folgende Werte:

| | |
|------|---|
| S0: | MW: 0,54 units, KG: 0,50 units und 0,59 units |
| S30: | MW: 0,65 units, KG: 0,60 units und 0,71 units |
| K0: | MW: 0,56 units, KG: 0,52 units und 0,61 units |
| K30: | MW: 0,58 units, KG: 0,53 units und 0,63 units |

Als p-Wert ergab sich $p=0,0734$.

Es kam also zu einer Erhöhung der MOD im Vergleich S30/K30 mit S0/K0, diese war aber aufgrund der Signifikanzschwelle von $p<0,05$ nicht signifikant (vgl. Abb. 17).

3.5.3 Integrierte Optische Dichte

Für die IOD ergaben sich folgende Werte:

| | |
|------|--|
| S0: | MW: 21,34 units, KG: 16,56 units und 27,50 units |
| S30: | MW: 29,34 units, KG: 22,77 units und 37,81 units |
| K0: | MW: 23,03 units, KG: 17,87 units und 29,69 units |
| K30: | MW: 26,22 units, KG: 20,34 units und 33,79 units |

Als p-Wert ergab sich $p=0,0729$.

Für die IOD ergab sich also eine Zunahme im Vergleich S30/K30 mit S0/K0, diese war aber aufgrund der Signifikanzschwelle von $p<0,05$ nicht signifikant (vgl. Abb. 18).

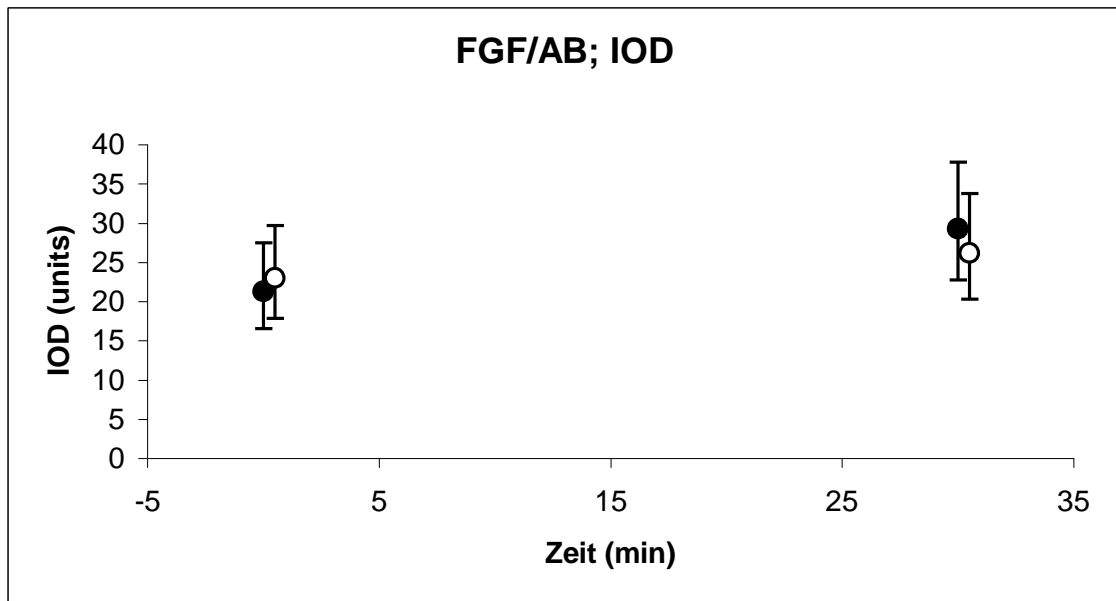


Abb. 18: Geometrisch gemittelte Integrierte Optische Dichte (IOD) der FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. im Vergleich. Schwarz - Stimulationsseite, Weiss - Kontrollseite, jeweils mit Angabe des 90%-Konfidenzintervalls. $p=0,0729$.

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Patientengut

So selten es in der Medizin monokausale Erkrankungen gibt, so selten sind auch chronische Beinulcera Ausdruck eines monoätiologischen Geschehens. So sind für die Entstehung chronischer Ulcera cruris insbesondere 3 Ätiologien von herausragender Bedeutung:

1. Diabetisches Fußsyndrom mit peripherer Neuropathie,
2. arterielle Durchblutungsstörungen im Sinne einer pAVK,
3. venöse Stauungssyndrome wie bei Chronisch Venöser Insuffizienz oder dem Postthrombotischen Syndrom,

wobei bei einem Patienten natürlich mehrere Ursachen der Ulcusgenese zugrunde liegen können. Mithilfe klinischer Untersuchungen ist es möglich, die Relevanz der o.g. Ätiologien zu bestimmen.

In die vorliegende Arbeit wurden Patienten eingeschlossen, bei denen die CVI alleinige Ursache für die Ulcusgenese war. D.h. bei jedem Patienten wurde eine gravierende Makroangiopathie durch Anamneseerhebung (Claudicatio intermittens !) und Palpation der Fußpulse ausgeschlossen. Eventuell bestehende leichtgradigere Formen (pAVK im Stadium I), die z.B. lediglich durch eine Angiographie der Beinarterien nachweisbar gewesen wären, wurden dadurch aber nicht erfasst.

In Bezug auf den Diabetes mellitus wurde weitaus rigoroser verfahren. Patienten mit einem manifesten Diabetes mellitus, sei es mit oder ohne periphere Sensibilitätsstörungen, wurden von vornherein ausgeschlossen. Patienten, bei denen man aufgrund der Anamnese oder aufgrund der klinischen und apparativen Untersuchungen auch nur den geringsten Verdacht auf einen latenten Diabetes mellitus haben konnte, wurden ebenfalls ausgeschlossen. Da es bei dieser Arbeit in höchstem Maße auf die Integrität der peripheren Nervenversorgung ankam, wurde somit jedem Risiko, einen Patienten mit (noch) latentem Diabetes mellitus und ohne nachweisbarem peripherem Nervenschaden in die Studie einzuschließen, aus dem Weg gegangen.

Desweiteren bestanden die Wunden bei den unterschiedlichen Patienten, und selbst den beiden unteren Extremitäten, seit verschieden langen Zeiträumen (s. Kap. 2.2). Um also interindividuelle Unterschiede völlig auszuschließen, wurde stets die eine, stimulierte Seite mit der anderen, unstimulierten Seite des selben Patienten verglichen und diese Vergleiche statistisch ausgewertet (s. Kap.2.8). Dennoch konnten damit intraindividuelle Unterschiede zwischen links und rechts nicht ausgeschlossen werden.

4.1.2 Probengewinnung

Die Proben wurden aus der Tiefe des Wundgrundes gewonnen. Dabei ist es durchaus vorstellbar, dass es sich bei einer chronischen Wunde um ein inhomogenes Geschehen handelt. Es wäre also keineswegs erstaunlich, wenn sich der Wundgrund im Zentrum der Wunde histologisch anders darstellte als derjenige, der sich nahe am Wundrand

befindet. Um also etwaige Unterschiede, die sich lediglich aus der Unterschiedlichkeit der Biopsiestellen ergeben, so gering wie möglich zu halten, wurden die Biopsien allesamt aus dem zentralen Areal des Ulcus entnommen.

4.1.3 Transkutane elektrische Nervenstimulation

In der vorliegenden Studie wurden mittels eines Transkutanen Nervenstimulators eine Elektrostimulation durchgeführt. Aufgrund der bereits bekannten Erkenntnisse über die Mastzellinervation durch neuronale C-Fasern (vgl. Kap. 1.4) wurden die Stimulationsparameter so gewählt, dass gerade diese C-Fasern stimuliert werden. Mithilfe der durchgeführten Histologien ist die Änderung der Mastzellfunktion untersucht worden. Es ist also zu vermuten, dass diese Änderungen der Mastzellfunktion über C-Fasern vermittelt wurde. Nicht auszuschließen ist jedoch die Tatsache, dass die Mastzellen auch durch das angelegte Spannungsfeld direkt stimuliert wurden. Dass eine Nervenstimulation durch das angelegte Spannungsfeld stattfand, ist aufgrund der Wahl der Stimulationsparameter zu vermuten und dadurch bekräftigt, dass die Patienten im Verlauf der dreißig minütigen Stimulation Kribbelparästhesien verspürten. Um die Stromwirkung auf die C-Fasern jedoch direkt nachzuweisen, wäre zum Beispiel eine weitergehende immunhistochemische Untersuchung auf bestimmte Neurotransmitter wie Substance P oder CGRP nötig, welche dann eventuell die direkte Aktivitätsänderung der C-Fasern, bedingt durch die Elektrostimulation, nachweisen könnte.

4.1.4 Mastzellfärbung mit Alcian Blau

Wie bereits oben beschrieben (vgl. Kap. 1.3.1) kann man aufgrund ihres histopathologischen und histochemischen Verhaltens zwei Mastzelltypen unterscheiden: Mucosamastzellen (MMC) und Bindegewebsmastzellen (CTMC). Aber auch unter den Bindegewebsmastzellen gibt es noch große Unterschiede, so dass diese ganz unterschiedlich auf mastzellspezifische Nachweisverfahren reagieren.

Zum histologischen (nicht immunhistochemischen) spezifischen Mastzellnachweis sind mehrere Methoden beschrieben worden. Im Großen und Ganzen handelt es sich um drei Verfahren: Die Anfärbung mit Toluidin Blau, Safranin O oder Alcian Blau.

V.a. Arbeitsgruppen an den Dermatologischen Universitätskliniken in London und Manchester haben großes Verdienst an Untersuchungen zum Färbeverhalten kutaner Mastzellen (59,60). Diese Arbeiten zusammenfassend kann festgestellt werden, dass mit diesen Methoden lediglich etwa 60-80%, abhängig vom Fixationsmedium, der gesamten Mastzellen in humanem Hautgewebe dargestellt werden können. Davon sind mit Alcian Blau ca. 80% nachweisbar, ca. 50% mit Toluidin Blau und ca. 15% mit Safranin O.

Möchte man also mit einer Einzelfärbung so viel Mastzellen wie möglich nachweisen, so bietet sich die Alcian Blau-Färbung in Kombination mit einem günstigen Fixationsmedium an, was denn auch in dieser Arbeit gemacht wurde. Für die Alcian Blau-Färbung wurde dabei FAM als Fixationsmedium gewählt, welches ähnlich wie Carnoys Medium für Mastzellfärbungen von Vorteil erscheint.

Dennoch muss aber davon ausgegangen werden, dass mit dieser Fixierung und der Alcian Blau-Färbung lediglich ca. 55-65% der tatsächlich vorhandenen Mastzellen angefärbt werden.

4.1.5 Immunhistochemie und Histamin-Färbung

Aus den im Vergleich zahlreichen Färbeschritten der immunhistochemischen Färbemethoden ergibt sich zwangsläufig auch die große Anfälligkeit solcher Methoden. Jeder Färbeschritt für sich stellt eine potentielle Fehlerquelle dar. Die Aneinanderkettung mehrerer Antikörperbindungsreaktionen ist die wichtigste Ursache für den Sensitivitätsverlust solcher Methoden. Geht man nur beispielhaft von einer Sensitivität von 90% eines jeden Antikörperfärbeschrittes aus (Primärantikörper, Sekundärantikörper, Tertiärantikörper, Entwicklungsreaktion), führt dies schlussendlich zu einer Gesamtsensitivität von ca. 65% ($90\% \times 90\% \times 90\% \times 90\%$). D.h. auch hier würden lediglich 65% aller Antigene nachgewiesen.

Weiterhin wird die Sensitivität immunhistochemischer Färbemethoden in hohem Maße (noch weitaus mehr als bei klassischen histologischen Verfahren) von der Qualität der verwendeten Antikörper und Chemikalien bestimmt. Eine saubere Arbeitsweise und ein schonender Umgang mit dem Gewebe sind zwar banale, aber wirkungsvolle Möglichkeiten, die Sensitivität immunhistologischer Methoden zu erhöhen. Bei der Histamin-Färbung zeigte sich eine mit der Alcian Blau-Färbung in etwa zu vergleichende Mastzell-dichte. Somit kann man also bei der Histamin-Färbung von einer Sensitivität ausgehen, die im Bereich der 55-65% der Alcian Blau-Färbung liegt.

Auch die Spezifität immunhistochemischer Methoden ist in hohem Maße von der Qualität der Antikörper abhängig. Spezifitätskontrollen (Positiv- und Negativkontrollen) sind somit wesentliche Voraussetzungen für die Verwertbarkeit immunhistochemischer Befunde. Positivkontrollen, aber in besonderem Maße auch Negativkontrollen

wurden somit v.a. in der Phase der Färbeaustestung und Färbemethodenoptimierung zahlreich verwendet.

Falsch positive Resultate können durch peroxidatische Aktivität des Häm-Moleküls (Erythrozyten) und endogen im Gewebe vorhandene Peroxidasen bewirkt werden, was durch die Vorbehandlung mit Methanol/H₂O₂ verhindert wurde.

Freie reaktive Gruppen können zur unspezifischen Bindung von IgG (besonders nach Formalinfixation) führen und wurden vor dem Versetzen mit dem Primärantikörper durch Vorbehandlung mit Normalserum (oder alternativ auch mit Serumalbumin möglich) abgesättigt.

Desweiteren zeigte sich z.B. die Histamin-Färbung als äußerst wärmeempfindlich, was an warmen Sommertagen zu äußerst schwachen Reaktionen, in kühleren Abend- oder Nachtstunden mit den selben Verdünnungen und Konzentrationen hingegen zu weitaus intensiveren Färbungen führte. Somit ergeben sich für die MOD und folglich auch die IOD Abhängigkeiten zur umgebenden Raumtemperatur zum Zeitpunkt der Färbung. Als Folge für die Durchführung ergab dies, dass diese Färbung zum einen zu kühleren Tageszeiten durchgeführt wurde, zum anderen Objektschnitte, die miteinander verglichen wurden, strengstens zusammen gefärbt wurden, um somit Temperaturunterschiede auszuschließen.

4.1.6 FGF-Färbung und FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung

Entsprechend der Tatsache, dass der Wachstumsfaktor FGF von zahlreichen, verschiedenen Zelltypen produziert, gespeichert, aufgenommen und ausgeschüttet wird (Mastzellen, Makrophagen, Granulozyten, Fibroblasten, Fibrozyten u.a.m.), führt dessen immunhistochemischer Nachweis zu einer Anfärbung all dieser verschiedenen Zellen (vgl. Abb. 4). Da in dieser Arbeit aber lediglich der FGF-Gehalt von Mastzellen von Interesse war, wurden die FGF-gefärbten Schnitte, nachdem sie mikroskopisch ausgewertet wurden, einer nachträglichen Alcian Blau-Färbung unterzogen. Dies erst ermöglichte eine Unterscheidbarkeit von Mastzellen gegenüber all den anderen, FGF-positiven Zellen. Dennoch war das Ergebnis dieser Doppelfärbung nicht so eindeutig wie erhofft. Die Entscheidung darüber, ob es sich bei den einzelnen angefärbten Zellen nun um eine Mastzelle handelte oder nicht, gestaltete sich immer noch als sehr schwierig. So wurde schlussendlich diese Entscheidung aufgrund einer Zusammenschau mehrerer Faktoren wie Farbe, Form, Größe und intrazellulärer Morphologie getroffen. Man muss aber davon ausgehen, dass diese "Mastzellauswahl" trotz allen Bemühens um Genauigkeit mit einem erheblichen Fehler behaftet ist. Daraus ergibt sich, dass es also besonders in diesem Fall wichtig war, für die mikroskopische Auswertung die einzelnen Objektträger zu kodieren und jegliche Seiten- und Zeitkennung (bis auf die Patientennummer) auf dem Objektträger zu überkleben. Aus dieser Kodierung folgt, dass dieser Fehler in ähnlich starkem Maße bei allen Präparatschnitten vorhanden ist. Daraus ergibt sich die Vergleichbarkeit der einzelnen Ergebnisse dieser Färbung.

4.2 Ergebnisdiskussion

4.2.1 Mastzellichte

Wie im Kapitel 3.2 dargestellt, kam es bei der Alcian Blau-Färbung zu einem signifikanten Anstieg ($p=0,0402$) der Mastzellichte durch die Stimulation. Es ist deshalb davon auszugehen, dass bereits die 30-minütige periphere Nervenstimulation dazu führte, dass Zellen, die vor der Stimulation noch wegen ihres zu geringen Gehalts an sulfatierten Mukosubstanzen (v.a. Heparin) durch die Alcian Blau-Färbung nicht erfasst wurden (s.g. ghost-cells), begannen, Heparin zu produzieren und einzulagern, so dass nach Beendigung der Stimulation diese anfärbbar waren und es somit zu einer Erhöhung der Mastzellichte kam.

Erstaunlich war nun, dass dieser signifikante Anstieg bei der Histamin-Färbung völlig fehlte ($p=0,7765$). Daraus lässt sich folgern, dass diese ghost-cells als Reaktion auf die Stimulation zwar Heparin produzierten, aber kein Histamin.

Bei der FGF-Färbung erfolgte die eigentliche Detektion der Mastzellen durch die zusätzliche Alcian Blau-Färbung. Man hätte also davon ausgehen können, dass bei der FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung die Mastzellichte in ähnlichem Maße zunimmt wie bei der reinen Alcian Blau-Färbung. Dies war nicht der Fall. Es kam zwar auch hier zu einem Anstieg der Mastzellichte durch die Stimulation, doch war dieser weitaus geringer ausgeprägt und nicht signifikant ($p=0,2764$). Wenn auch dies paradox erscheint, so könnte dies der Ausdruck dessen sein, dass die Mastzelldetektion, wie bereits oben beschrieben (vgl. Kapp. 2.7.2.4 und 4.1.5), mit einigen Schwierigkeiten belastet war und eben trotz allen Bemühens die detektierten Zellen nicht alle

Mastzellen waren und andere Mastzellen erst gar nicht detektiert wurden. Da die reine FGF-Färbung belegt, dass das Kollektiv aus wenig Mastzellen und sehr vielen übrigen Zellen, die ebenfalls FGF enthalten, auf die Stimulation nicht reagiert ($p=0,7137$), kommt es somit entsprechend des Ausmaßes dieser detektorischen Ungenauigkeit zu einer "Maskierung" der Ergebnisse, nicht nur bezüglich der Mastzellendichte, sondern auch der MOD und der IOD. Je größer die detektorische Ungenauigkeit ist, desto stärker ist der Einfluss der anderen Zellen (die ja keine stimulationsbedingten Reaktionen zeigten) auf die Ergebnisse.

4.2.2 Mittlere Optische Dichte

Bei der Histamin-Färbung kam es zu einem hoch signifikanten Anstieg der MOD ($p=0,0002$). Es kam also als Reaktion auf die Stimulation zu einer überaus starken Histaminproduktion der Mastzellen; und zwar derjenigen, die bereits vor Stimulationsbeginn Histamin enthielten und durch die Histamin-Färbung bereits zum Zeitpunkt 0 min. angefärbt wurden. Bei etwaigen ghost-cells bezüglich dieser Färbung kam es ja zu keiner Histaminproduktion (keine Änderung der Mastzellendichte!, s.o.).

Bei der Alcian Blau-Färbung kam es lediglich zu einer leichten, nicht signifikanten Änderung der MOD ($p=0,2486$). D.h. Mastzellen, die bereits zu Beginn der Stimulation Heparin enthielten, konnten durch diese nur minimal zu einer weiteren Heparinproduktion gebracht werden (im Gegensatz zu den Alcian Blau-ghost-cells, wie oben beschrieben!).

Bei der FGF/Alcian Blau-Doppelfärbung kam es zu einem Anstieg der MOD, der aber nicht signifikant war ($p=0,0734$). Bedenkt man aber, was bezüglich der Mastzellendichte bereits diskutiert wurde und auch hier die Messergebnisse mehr oder weniger "maskiert" sind, so muss man auch hier davon ausgehen, dass die Stimulation zu einer regen FGF-Produktion der Mastzellen führte, welches dann an bereits in der Mastzelle vorhandenes Heparin gebunden wurde. Aufgrund der detektorischen Ungenauigkeit äußert sich dies aber nicht als signifikantes Ergebnis.

4.2.3 Integrierte Optische Dichte

Da die Integrierte Optische Dichte als Produkt von MOD und Mastzellendichte von beiden abhängig ist, ergibt sich deren Aussagekraft zwangsläufig aus der MOD und der Mastzellendichte. Dennoch wurde sie mitberechnet, um die seltenen Fälle, in denen die Einzelfaktoren gerade keine signifikanten Änderungen mehr aufweisen, aber dafür deren Produkt, ebenfalls mitzuerfassen.

Dies war hier nicht der Fall, weshalb sich eine nähere Betrachtung der Ergebnisse erübrigt.

4.2.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Es lässt sich also zusammenfassen, dass die periphere Nervenstimulation zum einen zu einer Heparinproduktion der ghost-cells und in weitaus geringerem Maße auch der bereits Heparin enthaltenden Mastzellen führte und zum anderen diejenigen Mastzellen, die bereits

Histamin und FGF enthielten, zur weiteren Produktion (insbesondere des Histamins) anregte. Vermutlich erfolgte dies durch eine neural vermittelte Mastzellstimulation durch C-Fasern. Eine direkte Reaktion der Mastzellen auf das angelegte Spannungsfeld ist jedoch ebenfalls in Erwägung zu ziehen und mit dieser Studie nicht auszuschließen.

4.3 Betrachtung vorausgegangener Studien

Gottwald et al. (41) untersuchten Mastzellreaktionen im Ratten-jejunum auf elektrische Stimulation der Nervi vagi. Dazu wurden die Nn. vagi präpariert und blank auf die Stromelektroden gelegt. Vor und nach Stimulation wurden Gewebeproben aus dem Jejunum entnommen und diese ebenfalls mit Alcian Blau und auf Histamin gefärbt. Sie konnten zeigen, dass eine Vagusstimulation zu einer signifikanten Erhöhung des Histamingehaltes der Mastzellen führte ($p=0,001$ bezüglich der MOD). Desweiteren konnten sie aber auch, im Gegensatz zur vorliegenden Arbeit, eine Zunahme der Mastzell-dichte bei der Histamin-Färbung nachweisen ($p=0,017$).

Daraus folgerten Gottwald et al. unter anderem, dass das autonome Nervensystem in der Lage ist, auf entscheidende Weise auf Mukosamastzellen einzuwirken und so eventuell eine wichtige Rolle bei der Genese von Darmerkrankungen spielen könnte.

Dimitriadou et al. (22) führten bei Ratten elektrische Stimulationsversuche des Ganglion trigeminale und der zervikalen Ganglien durch. Sie konnten zeigen, dass eine Trigemini-stimulation zu einer Mastzelldegranulation in der gleichseitigen Dura mater führte. Im Gegensatz dazu führte eine Stimulation der

zervikalen Ganglien zu einer Stabilisierung der Mastzellen, so dass diese weniger häufig bei entsprechendem Reiz zu einer Degranulation neigten.

Auch Dimitriadou et al. postulierten deshalb die direkte Beeinflussung von Mastzellen durch Nervenfasern.

Reich et al. (74) führten bei Schweinen Stimulationsversuche iatrogen hergestellter Wunden durch und färbten die Gewebeproben mit Alcian Blau. Auch sie konnten eine stimulationsbedingte Zunahme der Mastzellichte zeigen ($p < 0,001$) und folgerten daraus funktionelle Zusammenhänge zwischen Nerven und Mastzellen.

Kiernan (54) konnte bei allergischen Hunden nachweisen, dass es durch eine elektrische Stimulation der Nervi vagi zu einer trachealen und bronchialen Mastzelldegranulation kam. Er folgerte daraus, dass Mastzellen durch Nervenfasern innerviert werden und dadurch in ihrer Funktion gesteuert werden.

Cocchiara et al. (18) stimulierten Mastzellen auf pharmakologische Weise mit dem Neurotransmitter Substance P und konnten dadurch eine gesteigerte Mastzellproduktivität von Zytokinen nachweisen. Sie konnten damit zeigen, dass auch eine pharmakologische Stimulation von Mastzellen möglich ist und legten somit die Vermutung nahe, dass der Neurotransmitter Substance P der entscheidende Faktor in der Signaltransduktion zwischen Nervenfasern und Mastzellen ist.

Mehrere unabhängig voneinander durchgeführte morphologische Studien durch **Alving et al.** (3), **Eady et al.** (24), **Ekblad et al.** (25), **Heine und Foster** (47) und **Stead et al.** (83) konnten zeigen,

dass Mastzellen in unmittelbarer Nähe von Nervenfasern zu finden sind, was auch hierbei die Autoren zu der Vermutung drängte, dass Nervenfasern und Mastzellen sich funktionell beeinflussen.

4.4 Schlussfolgerungen

Diese Arbeit konnte zeigen, dass die Anlage eines Spannungsfeldes im Bereich eines rein venös bedingten Ulcus cruris zu einer Modifikation der Mastzellfunktion in genau dieser Ulcusmitte führte. Ursache hierfür ist aller Wahrscheinlichkeit nach eine direkte nervale Stimulation der Mastzellen durch nervale C-Fasern, die durch das angelegte gepulste Spannungsfeld ihrerseits stimuliert wurden.

Während bereits in Vergangenheit in Tiermodellen gezeigt werden konnte, dass Mukosamastzellen des Dünndarmes funktionell durch Nerven beeinflussbar sind, muss man als Folge dieser Arbeit dringend vermuten, dass auch ein funktioneller Zusammenhang zwischen Bindegewebsmastzellen und unmyelinisierten C-Nervenfasern, und zudem noch im Menschen, vorliegt.

Darüber hinaus konnte gezeigt werden, dass der Mastzellgehalt des für die Heilung chronischer Wunden substantiell wichtigen Wachstumsfaktors FGF-basic direkt über die elektrische und vermutlich auch nervale Stimulation gesteuert werden kann.

Es ist also zu vermuten, dass unmyelinisierte Nervenfasern und Mastzellen eine funktionelle Einheit bilden und eine intakte Kommunikation zwischen Nervenfasern und Mastzellen entscheidende

Auswirkungen auf Wundheilungsprozesse hat. Daraus folgt, dass eine gestörte Inervation der Mastzellen, z.B. im Falle einer peripheren Nervendegeneration, zu einer Störung der kutanen Integrität führt und dadurch Ursache sowohl für die Entstehung, als auch für die Chronifizierung kutaner Gewebedefekte darstellen könnte.

Vor allem das Diabetische Fußsyndrom wirft trotz aller seiner bekannten Zusammenhänge bezüglich des Entstehens und der Unterhaltung chronischer kutaner Ulcera immer noch eine Reihe ungelöster Fragen auf:

1. Von welcher Wichtigkeit ist die diabetische Makroangiopathie ?
2. Welche Rolle spielt genau die diabetische Polyneuropathie ?
3. Wieso entstehen Ulcera häufig auch an stressfreien, nicht beanspruchten Stellen ?

Zumindest auf die beiden letzten Fragen kann diese Arbeit somit mögliche Antworten geben: Die durch die Polyneuropathie bedingte Störung der Mastzellinervation könnte direkte Ursache für die Entstehung und die Unterhaltung kutaner Wunden sein, insbesondere an den stressfreien, keinerlei äußerlichem Druck ausgesetzten Stellen, an denen man sich andere Ursachen nur sehr schwer vorstellen kann. Durch die polyneuropathisch bedingte gestörte nervale Stimulation der Mastzellen könnte es hierbei zu einer geminderten Produktion von Wachstumsfaktoren (insbesondere FGF-basic) und somit einem gestörten Gleichgewicht im Wundgebiet kommen, was, wie bereits oben dargelegt, sowohl Ursache für die Entstehung, als auch Ursache der Unterhaltung chronischer kutaner Ulcera sein könnte.

Um diese wohlbegründeten Vermutungen zu bestätigen wäre eine entsprechende Studie an Patienten mit einem diabetischen Fußsyndrom und diabetischen Ulcera von allergrößtem Interesse.

Desweiteren könnten in Zukunft die gezeigten Zusammenhänge zwischen Nervensystem und Mastzellen auch Auswirkungen auf die Therapie chronischer Ulcera haben. Zu denken ist da zum einen an eine elektrische Stimulationstherapie, zum anderen an eine andere, z.B. pharmakologische Stimulation der Mastzellen, um auf diese Weise die Funktion der Mastzellen bei Wundheilungsprozessen aufrecht zu erhalten.

5 Zusammenfassung

Bei Mastzellen handelt es sich um einen im Knochenmark gebildeten Zelltyp, der aber die größte Zeit in anderen Geweben wie in der Haut und der Darmmukosa anzutreffen ist. Seitdem bekannt ist, dass sie in der Lage sind, für Wundheilungsprozesse substantiell wichtige Wachstumsfaktoren wie insbesondere FGF-basic zu produzieren, erlangten sie neben ihrer Wichtigkeit bei allergischen Reaktionen auch eine für die Diskussion von Wundheilungsprozessen zentrale Rolle.

Es konnte in der Vergangenheit im Tiermodell gezeigt werden, dass Mukosamastzellen durch unmyelinisierte C-Fasern innerviert werden und somit die Mastzellfunktion unter anderem neural gesteuert wird.

In dieser Arbeit wurden Patienten, die an beiden Beinen rein venös bedingte Ulcera der Haut hatten, mit einem Transkutanen Elektrostimulator (TENS) stimuliert und die Auswirkungen dieser Elektrostimulation auf kutane Mastzellen untersucht.

Dazu wurden sowohl vor, als auch nach dieser Elektrostimulation Gewebeproben aus diesen Ulcera entnommen und diese histologisch durch Anfärbung der in Mastzellen vorhandenen Stoffe Heparin und Histamin aufgearbeitet und mithilfe einer computergesteuerten Mikroskopie quantitativ ausgewertet. Desweiteren wurde der unter anderem von Mastzellen gebildete Wachstumsfaktor FGF-basic immunhistologisch dargestellt und diese Schnitte ebenfalls quantitativ ausgewertet.

Es konnte gezeigt werden, dass es durch diese Elektrostimulation zu einer signifikanten Erhöhung des zellulären Histamingehaltes ($p=0,0002$) und einer signifikanten Erhöhung der Zelldichte Heparin-beladener Mastzellen kam ($p=0,0402$).

Untersuchungen auf den FGF-Gehalt vor und nach Stimulation konnten einen deutlichen Anstieg durch die Stimulation zeigen, welcher aber höchstwahrscheinlich aufgrund methodischer Schwierigkeiten nicht signifikant war ($p=0,0734$).

Diese Arbeit lässt somit eine funktionelle Interaktion zwischen Nerven und kutanen Mastzellen im Menschen vermuten. Man könnte daraus folgern, dass diese Interaktionen entscheidende Rolle bei Wundentstehungs- und Wundheilungsprozessen spielen. Diese Arbeit könnte somit zu einem besseren Verständnis des Diabetischen Fußsyndroms führen, bei dem Ulcera häufig an warmen, rosigen, also gut durchbluteten und stressfreien Stellen auftreten. Diese Ulcera sind vermutlich Folge eines Minderangebots kutaner Wachstumsfaktoren (namentlich FGF-basic) und durch die gestörte Nerv-Mastzell-Interaktion, welche direkte Folge der diabetischen Polyneuropathie darstellt, verursacht.

Um diese wohlbegründeten Vermutungen zu bestätigen wären somit entsprechende Untersuchungen an Patienten mit diabetischen Ulcera von allergrößtem Interesse.

6 Literatur

1. Akers TK, Gabrielson AL: The effect of high voltage galvanic stimulation on the rate of healing of decubitus ulcers. *ISA Trans* 1984; 99-100.
2. Alon G, Azaria M, Stein H: Diabetic ulcer healing using high voltage TENS (abstract). *Phys Ther* 1986; **66**: 503-508.
3. Alving K, Sundstom C, Panula R, Hokfelt T, Lundberg JM: Association between histamine containing mast cells and sensory nerves in the skin and airways of control and capsaicin-treated pigs. *Cell Tiss Res* 1991; **264**: 529-538.
4. Ammer K: Elektrotherapie. *Wien Med Wochenschr* 1994; **144**(3): 60-65.
5. Ansel JC, Brown JR, Payan DG, Brown MA: Substance P selectively activates TNF-alpha gene expression in murine mast cells. *J Immunol* 1993; **150**(10): 4478-4485.
6. Baird A, Esch F, Mormede P: Molecular characterization of fibroblast growth factor: Distribution and biological activities in various tissues. *Recent Prog Horm Res* 1986; **42**: 143-205.
7. Barron JJ, Jacobson WE, Tidd G: Treatment of decubitus ulcers, a new approach. *Minn Med* 1985; 103-106.
8. Basset CA: Beneficial effects of electromagnetic fields. *J Cell Biochem* 1993; **51**(4): 387-393.
9. Bedarida G, Bushell E, Blaschke TF, Hoffmann BB: H1- and H2-histamine receptor mediated vasodilatation varies with aging in humans. *Clin Pharmacol Ther* 1995; **58**(1): 73-80.
10. Berthoud HR, Laughton WB, Powel TB: Vagal stimulation-induced gastric acid secretion in the anesthetized rat. *J Auton Nerv Syst* 1986; **16**(3): 193-204.

11. Beyak M, Vanner S: Histamine H1 and H3 vasodilator mechanisms in the guinea pig ileum. *Gastroenterology* 1995; **108**(3): 712-718.
12. Bienenstock J, Befus AD, Denburg JA: Mast cell heterogeneity: basic questions and clinical implications. In: *Mast cell differentiation and heterogeneity* (Befus AD, Bienenstock J, Denburg JA, Hrsg.). New York, Raven Press, 1986, Seiten 391-402.
13. Burgess WH, Maciag T: The heparin binding (fibroblast) growth factor family of proteins. *Ann Rev Biochem* 1989; **58**: 575-606.
14. Carley PJ, Wainapel SF: Electrotherapy for acceleration of wound healing: low intensity direct current. *Arch Phys Med Rehabil* 1985; **66**: 443-446.
15. Cherry GW, Hughes MA, Kingsnorth AN, Arnold FW: Wound healing. In: *Oxford Textbook of Surgery*, Vol. 1. Oxford: Oxford Medical Publ., 1995: Seiten 2-23.
16. Clark RAF: Biology of dermal wound repair. *Dermatol Clin* 1993; **11**(4): 647-666.
17. Clark RAF: Wound repair. Overview and general consideration. In: *Clark RAF*, Hrsg., Plenum Press, New York and London, 1996: Seiten 3-35.
18. Cocchiara R, Albeggiani G, Azzolina A, Bongiovanni A, Lampiasi N, Di Blasi F, Geraci D: Effect of Substance P on Uterine mast cell cytokine release during the reproductive cycle. *J Neuroimmunol* 1995; **60**(1-2): 107-115.
19. Cohen IK, Diegelmann RF: Wound healing. The molecular and cellular biology of wound repair. In: *Surgery* (Greenfield LJ, Mulholland MW, Oldham KT, Zelenock GB, Hrsg.). Philadelphia: Lippincott, 1993: Seiten 86-102.
20. Columbo M, Bochner BS, Marone G: Human skin mast cells express functional beta 1 integrins that mediate adhesion to extracellular matrix proteins. *J Immunol* 1995; **154**(11): 6058-6064.

21. Columbo M, Horowitz EM, Botana LM: The human recombinant c-kit ligand, rhSCF, induces mediator release from human cutaneous mast cells and enhances IgE-dependent mediator release from both skin mast cells and peripheral blood basophils. *J Immunol* 1992; **149**(2): 599-608.
22. Dimitriadou V, Buzzi MG, Moskowitz MA, Theoharides TC: Trigeminal sensory fibre stimulation induces morphological changes reflecting secretion in dura mater mast cells. *Neuroscience* 1991; **44**: 97-112.
23. Dvorak AM, Kissell S: Granule changes of human skin mast cells characteristic of piecemeal degranulation and associated with recovered during wound healing in situ. *J Leukoc Biol* 1991; **49**(2): 197-210.
24. Eady RA, Cowen T, Marshall TF, Plummer V, Greaves MV: Mast cell population density, blood vessel density and histamine content in normal human skin. *Br J Dermatol* 1979; **100**: 623-633
25. Ekblad E, Winter C, Ekman R, Hakanson R, Sundler F: Projections of peptide-containing neurons in rat small intestine. *Neuroscience* 1987; **20**: 169-188.
26. Enerbäck L: Mast cells in rat gastrointestinal mucosa. 2. Dye binding and metachromatic properties. *Acta Path Microbiol Scand* 1966; **66**: 303-310.
27. Fakhri O, Amin M: The effect of low-voltage electric therapy on the healing of resistant skin burns. *J Bum Care Rehad* 1987; **8**: 15-18.
28. Ferrante F, Ricci A, Felici L: Suggestive evidence for a functional association between mast cells and sympathetic nerves in meningeal membranes. *Acta Histochem Cytochem* 1990; **23**: 637-646.
29. Folkman J, Klagsbrun M: Angiogenetic factors. *Science* 1987; **235**: 442-447.

30. Franzén L, Ghassemifar R, Malcherek P: Experimental mast cell activation improves connective tissue repair in the perforated rat mesentery. *Agents Actions* 1991; **33**: 371-377.
31. Furi B, Furi BC: The molecular basis of blood coagulation. *Cell* 1988; **53**: 505-518.
32. Gabbiani G, Ryan GB, Majno G: Presence of modified fibroblasts in granulation tissue and possible role in wound contracture. *Experientia* 1973; **27**: 549-550.
33. Galli DJ: New insights into "the riddle of the mast cell". Microenvironmental regulation of mast cell development and phenotypic heterogeneity. *Lab Invest* 1990; **62**: 5-12.
34. Galli SJ: New concepts about the mast cell. *N Engl J Med* 1993; **328**: 257-265.
35. Gault WR, Gatens P: Use of low intensity direct current in the management of ischemic skin ulcers. *Phys Ther* 1976; **56**: 265-269.
36. Gault WR, Gatens P, Wolcott LE: Acceleration of healing rate in ischemic skin ulcers with low intensity direct current (LIDC). *Preparation for A.P.T.A meeting, Las Vegas, Nevada, 1972, abstract Seiten 1-17.*
37. Gentzkow GD: Electrical stimulation to heal dermal wounds. *J Dermatol Surg Oncol* 1993; **19**(8): 753-758.
38. Gentzkow GD, Miller KH: Electrical stimulation for dermal wound healing. *Clin Podiatr Med Surg* 1991; **8**(4): 827-841.
39. Gordon JR, Galli SJ: Promotion of mouse fibroblast collagen gene expression by mast cells *via* the Fc epsilon RI. Role for mast cell-derived transforming growth factor beta and tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* 1994; **180**(6): 2027-2037.
40. Gospodarowicz D, Ferrara N, Schweigerer L: Characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr Rev* 1987; **8**: 95-114.

41. Gottwald T, Hewlett BR, Lhotak S, Stead RH: Electrical stimulation of the vagus nerve modulates the histamine content of mast cells in the rat jejunal mucosa. *NeuroReport* 1995; **7**(1): 313-317.
42. Griffin JW, Tooms RE, Mendius RA, Clifft JK, van der Swaag R, El-Zeky F: Efficacy of high voltage pulsed current for healing of pressure ulcers in patients with spinal cord injury. *Phys Ther* 1991; **71**: 433-444.
43. Gruber BL, Marchese MJ, Kew RR: Transforming growth factor-beta 1 mediates mast cell chemotaxis. *J Immunol* 1994; **152**(12): 5860-5867.
44. Gyorfı A, Fazekas A, Posch E, Irmes F, Rosival L: Role of histamine in the development of neurogenic inflammation of rat oral mucosa. *Gastroenterology* 1991; **32**(3-4): 229-236.
45. Halaban R, Langdon R, Birchall N: Basic fibroblast growth factor from human keratinocytes is a natural mitogen for melanocytes. *J Cell Biol* 1988; **107**: 1611-1619.
46. Hebda PA, Collins MA, Tharp M: Mast cell and myofibroblast in wound healing. *Dermatol Clin* 1993; **11**(4): 685-696.
47. Heine H, Foster FJ: Relationships between mast cells and preterminal nerve fibers. *Z Mikrosk Anat Forsch* 1975; **89**: 34-37.
48. Hu ZQ, Yamazaki T, Cai Z: Mast cells display natural suppressor activity partially by releasing transforming growth factor-beta. *Immunology* 1994; **82**(3): 482-486.
49. Huch A, Huch R, Lübbers DW: Transcutaneous pO₂. *Thieme-Stratton Inc.*, New York, 1981.
50. Iemura A, Tsai M, Ando A: The c-kit ligand, stem cell factor, promotes mast cell survival by suppressing apoptosis. *Am J Pathol* 1993; **142**(4): 965-974.
51. Janig W: Activation of afferent fibers ending in an old neuroma by sympathetic stimulation in the rat. *Neurosci-Lett.* 1990; **111**(3): 309-314.

52. Jercinovic A, Bohanovic F: Pressure sore healing and endogenous potential. *Bioelectrical Repair and Growth Society Transactions, Tenth Annual Meeting, Bioelectrical Repair and Growth Society*, Philadelphia, October 1990: abstract Seiten 14-17.
53. Kiernan JA: A pharmacological and histological investigation of mast cells in cutaneous axon reflex vasodilation. *Q J Exp Phys* 1975; **60**: 123-130.
54. Kiernan JA: Degranulation of mast cells in the trachea and bronchi of the dog following stimulation of the vagus nerve. *Int Arch Allergy Appl Immunol* 1990; **91**: 398-402.
55. Kloth L, Feedar J: Acceleration of wound healing with high voltage, monophasic, pulsed current, *Phys Ther* 1988; **68**: 503-508.
56. Lembeck F, Holzer P: Substance P as a neurogenic mediator of antidromic vasodilation and neurogenic plasma extravasation. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharmacol* 1979; **310**: 175-183.
57. Levi-Schaffer F, Kupietzky A: Mast cell enhance migration of fibroblasts into an *in vitro* wound. *Exp Cell Res* 1990; **188**(1): 42-49.
58. Lieberman P: The use of antihistamines in the prevention and treatment of anaphylaxis and anaphylactoid reactions. *J Allergy Clin Immunol* 1990; **86**: 684-686.
59. Markey AC, Churchill LJ, MacDonald DM: Human cutaneous mast cells-a study of fixative and staining reactions in normal skin. *Br J Dermatol* 1989; **120**: 625-631.
60. Marshall JS, Ford GP, Bell EB: Formalin sensitivity and differential staining of mast cells in human dermis. *Br J Dermatol* 1987; **117**: 29-36.
61. Meade R, Askenase PW, Geba GP: Transforming growth factor-beta 1 inhibits murine immediate and delayed type hypersensitivity. *J Immunol* 1992; **149**(2): 521-528.

62. Meininger CJ, Yano H, Rottapel R, Berstein A, Zsebo K, Zetter BR: The c-ligand is a chemoattractant for mast cells. *Blood* 1992; **79**: 958-963.
63. Meininger CJ, Zetter BR: Mast cells and angiogenesis. *Semin Cancer Biol* 1992; **3**(2): 73-79.
64. Mekori YA, Metcalfe DD: Transforming growth factor-beta prevents stem cell factor-mediated rescue of mast cells from apoptosis after IL-3 deprivation. *J Immunol* 1994; **153**(5): 2194-2203.
65. Metcalfe DD, Mekori JA, Rottem M: Mast cell ontogeny and apoptosis. *Exp Dermatol* 1995; **4**: 227-230.
66. Mukai H, Nishioka K, Kamimura K: Poikiloderma-like lesions on the neck in atopic dermatitis: a histopathological study. *J Dermatol* 1990; **17**(2): 85-91.
67. Nilsson G, Svensson V, Nilsson K: Constitutive and inducible cytokine mRNA expression in the human mast cell line HMC-1. *Scand J Immunol* 1995; **42**(1): 76-81.
68. Numao Y, Siato M, Terui N, Kumada M: The aortic nerve-sympathic reflex in the rat. *J Auton Nerv Syst* 1985; **13**(1): 65-79.
69. Oehmichen M, Cropelin A, Schmidt V: Quantitative studies of mast cell proliferation at the wound edge - rate of DNA synthesis in intravital and postmortem biopsy. *Beitr Gerichtl Med* 1990; **48**: 271-276.
70. Peters TK, Koralewski HE, Zerbst E: temporal and spatial stimulation caused by aortic nerve stimulation in rabbits. Effects of stimulation frequencies and amplitudes. *J Auton Nerv Syst* 1989; **27**(3): 193-205.
71. Poole TJ, Zetter BR: Stimulation of rat peritoneal mast cell migration by tumor-derived peptides. *Cancer Res* 1983; **43**: 5857-5861.

72. Qu Z, Liebler JM, Powers MR: Mast cells are major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *Am J Pathol* 1995; **147**(3): 564-573.
73. Reed JA, Albino AP, McNutt NS: Human cutaneous mast cells express basic fibroblast growth factor. *Lab Invest* 1995; **72**(2): 215-222.
74. Reich JD, Cazzaniga AL, Mertz PM, Kerdel FA, Eaglstein WH: The effect of electrical stimulation on the number of mast cells in healing wounds. *J Am Acad Dermatol* 1991; **25**(1): 40-46.
75. Reich JD, Tarlan PP: Electrical stimulation of skin. *Int J Dermatol* 1990; **29**: 395-400.
76. Riches DWH: Macrophage involvement in wound repair, remodeling, and fibrosis. In: *The molecular and cellular biology of wound repair* (Clark RAF, Hrsg.). New York, Plenum Press, 1996: Seiten 95-102.
77. Rifkin DB, Moscatelli D: recent developments in the cell biology of basic fibroblast growth factor. *J Cell Biol* 1989; **109**: 1-6.
78. Ryan GB, Cliff WL, Gabbiani G: Myofibroblasts in human granulation tissue. *Hum Pathol* 1974; **5**: 55-67.
79. Singer N, Kawka DW, Kazazis DM: *In vivo* co-distribution of fibronectin and actin fibers in granulation tissue. Immunofluorescence and electromicroscopic studies of the fibronexus at the fibroblast surface. *J Cell Biol* 1984; **98**: 2091-2106.
80. Skalli O, Gabbiani G: The biology of the myofibroblast, relationship to wound contraction and fibrocontractive diseases. In: *The Molecular and Cellular Biology of Wound repair* (Clark RAF, Henson PM, Hrsg.). New York, Plenum Press, 1988: Seiten 373-390.
81. Stanisz AM, Stead RH, Williams RM: Innervation of inflammatory cells. In: *Immunopharmacology of allergic diseases*. (Agrawal D, Townley R, Hrsg.). New York: Marcel Dekker, Inc, 1995: Seiten 159-181.

82. Stead RH: Innervation of mucosal immune cells in the gastrointestinal tract. *Regul Immunol* 1992; **4**: 91-99.
83. Stead RH, Dixon MF, Bramwell NH, Riddell RH, Bienenstock J: Mast cells are closely apposed to nerves in the human gastrointestinal mucosa. *Gastroenterology* 1989; **97**: 575-585.
84. Taipale J, Lohi J, Saarinen J: Human mast cell chymase and leucocyte elastase latent transforming growth factor-beta 1 from the extracellular matrix of human epithelial and endothelial cells. *J Biol Chem* 1995, **270**(9): 4689-4696.
85. Taniguchi H: Mast cells in fracture healing: an experimental study using rat model. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* 1990; **64**(10): 101-115.
86. Taub D, Dastych J, Inamura N: Bone marrow-derived murine mast cells migrate, but do not degranulate, in response to chemokines. *J Immunol* 1995; **154**(3): 2393-2402.
87. Thompson HL, Burbelo PD, Metcalfe DD: Regulation of adhesion of mouse bone marrow-derived mast cells to laminin. *J Immunol* 1990; **145**(10): 3425-3431.
88. Thompson HL, Burbelo PD, Yamada Y, Kleinman HK, Metcalfe DD: mast cells chemotax to laminin with enhancement after IgE-mediated activation. *J Immunol* 1989; **143**: 4188-4192.
89. Thunstrom AV, Stafford MJ, Severinghaus JW: A two temperature, two pO₂ method of estimating the determinants of tcpO₂. *Original Artical Series* 1979; **4**(15): 167-182.
90. White MV: The role of histamine in allergic diseases. *J Allergy Clin Immunol* 1990; **86**: 599-605.
91. Williams RM, Bienenstock J, Stead RH: Mast cells: the neuroimmune connection. In: *Human basophils and mast cells: Biological aspects* (Marone G, Hrsg.). *Chem Immunol*. Basel, Karger, 1995, **61**: 208-235.
92. Wolcott LE, Wheeler PC, Hardwicke HM, Rowley BA: Accelerated healing of skin ulcers by electrotherapy: preliminary clinical results. *South Med J* 1969; **62**: 796-799.

93. Zhenhong Q, Lieber JM, Powers MR, Galey T, Ahmadi P, Huang XN, Ansel JC, Butterfield JH, Planck SR, Rosenbaum JT: Mast cells are major source of basic fibroblast growth factor in chronic inflammation and cutaneous hemangioma. *Am J Pathol* 1995; **147**(3): 564-573.

Danksagung

Herrn Priv. Doz. Dr. med. Thomas Gottwald möchte ich für seine unermüdliche Bereitschaft zum offenen, persönlichen Gespräch sowie die intensive fachliche Unterstützung während allen Phasen dieser Arbeit ganz besonders danken. Für die großen Freiräume, die er mir bezüglich der Studienkonzeption und der praktischen Durchführung dieser Arbeit zu aller Zeit zugestand, bin ich ihm aufrichtig dankbar.

Herrn Prof. Dr. med. H.-D. Becker bin ich für die Möglichkeit, in den Labors seiner Abteilung wissenschaftlich arbeiten zu dürfen, zu großem Dank verpflichtet.

Mein herzlicher Dank gilt den Mitarbeiterinnen der Wundsprechstunde der Allgemeinchirurgischen Universitätsklinik Tübingen Frau Friedlinde Berger, Frau Gudrun Deutsche, Frau Marion Merkh und Frau Alice Stuhler und dem Ärztlichen Leiter der Wundsprechstunde, Herrn Priv. Doz. Dr. med. Stefan Coerper. Ebenfalls mein herzlicher Dank gilt Herrn Dr. med. Daniel Zuder von der Universitäts-Hautklinik Tübingen.

Für die umfassende Einarbeitung in die histologischen und immunhistologischen Techniken und die herzliche Aufnahme in den Immunhistologischen Labors bin ich Frau Jutta Hahn vom Zentrum Medizinische Forschung (ZMF) des Universitätsklinikums Tübingen zu überaus großem Dank verpflichtet. Sie hat dadurch maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Desweiteren danke ich Frau Prisi Schröder vom ZMF für die Einweisung in die computergestützte Bildauswertung und die Erstellung der entsprechenden Auswertungsprogramme.

Danken möchte ich den technischen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern des Pathologischen Instituts der Universität Tübingen, namentlich Frau Rebmann und Frau Ableiter, für die teilweise Verarbeitung der Gewebeproben, was mir viel Zeit ersparte, sowie Frau Dr. med. A. Greschniok vom Pathologischen Institut der Universität Tübingen.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. K. Dietz vom Institut für Medizinische Biometrie der Universität Tübingen möchte ich für die statistische Auswertung und die Beratung in statistischen Fragen herzlich danken.

Der Fa. Tettamed in Köln, die die transkutanen Nervenstimulatoren unentgeltlich zur Verfügung stellte, bin ich hierfür überaus dankbar.

Schlussendlich bin ich in höchstem Maße den Patienten, welche sich bereiterklärten, an dieser Studie teilzunehmen, zu überaus großem Dank verpflichtet. Ohne deren Bereitschaft, manche Mühen auf sich zu nehmen, wäre die Realisierung dieser Arbeit in dieser Form nie möglich gewesen.

Lebenslauf

4. April 1974 Daniel Svoboda, geboren in Stuttgart-Bad Cannstatt, erstes Kind der Eheleute Luise Svoboda, geb. Lenk und Vaclav Svoboda.
- 1980 – 1984 Besuch der Grundschule "Wittumschule" in Urbach.
- 1984 – 1993 Besuch des "Max-Planck-Gymnasiums" in Schorndorf.
- 1993 – 1994 Zivildienst im Kreiskrankenhaus Schorndorf.
- 1994 – 2001 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen und an der Université de Lausanne, Schweiz.
17. Mai 2001 Abschluss des Studiums mit dem Dritten Abschnitt der Ärztlichen Prüfung.
- Seit 1. Juli 2001 Tätigkeit als Arzt im Praktikum in der Unfallchirurgischen Klinik (Prof. Dr. Chr. Ulrich) der Klinik am Eichert Göppingen.