Aus dem **Institut für Rechtsmedizin**
des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. K. Püschel

Dekubitus und Wundheilung.
Eine immunhistochemische Studie zur Pathophysiologie der Dekubituswunde an Autopsiematerial

Promotion

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Miriam Fattouh
aus Stolberg / Rhld.
Hamburg 2013

angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am: 22.10.2013

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. Jan Sperhake

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. Felix Chun

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. Jozef Zustin

Meinen Eltern

1 ARBEITSHYPOTHESE UND FRAGESTELLUNG 1

2 EINLEITUNG 3

2.1 DEKUBITALULCERA 3
2.1.1 DEFINITION 3
2.1.2 PATHOPHYSIOLOGISCHER HINTERGRUND 4
2.1.3 EINTEILUNG VON DEKUBITALULCERA 6
2.1.4 RISIKOFAKTOREN UND RISIKOGRUPPEN 8
2.2 ENDOTHELIALE UND LEUKOZYTÄRE ADHÄSIONSMOLEKÜLE 8

3 MATERIAL UND METHODEN 12

3.1 MATERIAL 12
3.2 HISTOLOGIE 13
3.3 TISSUE MICRO ARRAY (TMA) 13
3.4 DEKUBITUS-ARRAY 15
3.5 IMMUNHISTOCHEMIE 20
3.6 STATISTIK 20

4 ERGEBNISSE 22

4.1 EXPRESSION P-SELEKTIN 22
4.2 EXPRESSION E-SELEKTIN 24
4.3 EXPRESSION VCAM-1 25
4.4 EXPRESSION LFA-1 27
4.5 EXPRESSION VLA-4 28
4.6 VERGLEICH DER UNTERSUCHTEN ANTIKÖRPER 30
4.6.1 P-SELEKTIN 30
4.6.2 E-SELEKTIN 32
4.6.3 VCAM-1 34
4.6.4 LFA-1 36
4.6.5 VLA-4 37
4.6.6 ZUSAMMENFASSUNG 39
4.7 SUBANALYSE DER KLINISCH RELEVANTEN DEKUBITUSGRADE III UND IV 39
4.7.1 DEKUBITUS III 39
4.7.2 DEKUBITUS IV 41
4.7.3 ZUSAMMENFASSUNG 44

5 DISKUSSION 45

5.1 P-SELEKTIN EXPRESSION (CD62P) UND E-SELEKTIN EXPRESSION (CD62E) 46
5.2 V-CAM-1 (CD106), VLA-4 (CD49D) UND LFA-1 (CD11A) EXPRESSION 47
5.3 LIMITATIONEN DER STUDIE 48

6 ZUSAMMENFASSUNG 49

7 ANHANG 51

7.1 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS 51

7.2 TABELLENVERZEICHNIS 51
7.3 ABBILDUNGSVERZEICHNIS 52
7.4 DATEN 53
7.4.1 DATEN UNTERSUCHUNGSMATERIAL 53
7.4.2 DATEN AUSWERTUNG 53

8 LITERATURVERZEICHNIS 57

9 DANKSAGUNG 60

10 EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG 61

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Aufgrund einer stetig steigenden Lebenserwartung und damit häufig einhergehenden verlängerten Zeiten der Immobilität bei komplexen Krankheitsverläufen gewinnt das Krankheitsbild Dekubitus kontinuierlich an Bedeutung. Der Begriff *„Dekubitus“*, stammt vom lateinischen Wort *decubare* („liegen“) ab. Gemeint ist damit das „Sichdurchliegen“ des immobilen Patienten, was zu chronisch offenen Wunden führt. [1-3]

Die Dekubituswunde ist durch verschiedene mikroskopische und makroskopische Besonderheiten gekennzeichnet wie beispielsweise eine Unterminierung der vitalen Haut von teilweise extensiven taschenförmigen Nekrosezonen. Grundsätzlich wird sie den sekundär heilenden Wunden zugeordnet mit einer klinisch deutlich eingeschränkten Heilungstendenz. Dies beruht darauf, dass sich eine Entzündungsreaktion als Voraussetzung für eine ausreichende Wundheilung nicht beziehungsweise nur rudimentär ausbildet, was Folge der im Wundgebiet herrschenden Ischämie ist. [2,4-6]

Die chronomorphologische Expression leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle aus der Gruppe der Selektin-, Integrin- und der Immunglobulin-Superfamilie (z.B. P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1, VLA-4) in primär heilenden Hautwunden ist tierexperimentell und an humanem Operations- und Autopsiematerial hinreichend untersucht worden. Hieraus abgeleitete Therapiekonzepte bestimmen die Ansätze zur Behandlung von Wundheilungsstörungen. [7] [8] Aufgrund der im Dekubituswundgebiet vorherrschenden Ischämie kann man vermuten, dass diese spezifische Initiierung der Wundheilung eingeschränkt ist. Leukozytäre und endotheliale Adhäsionsmoleküle sind entscheidend in die Entzündungsphase primär heilender Wunden eingebunden. [9-14] Jedoch liegen für die Dekubituswunde bezüglich der Gewebe-Expression leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle keine gesicherten Erkenntnisse vor. Im Ischämiegebiet des Dekubitus bildet sich eine relevante Entzündungsreaktion nicht aus. Hier gilt es zu überprüfen, inwiefern eine pathologische Expression einzelner Adhäsionsmoleküle mitverantwortlich für diese ausbleibende oder sich nur rudimentär ausbildende Entzündungsreaktion in der Dekubituswunde ist. Daher ist es das Ziel dieser Arbeit, bei Dekubituswunden den Einfluss der Gewebe-Expressionsmuster mittels Tissue Micro Arrays (TMA) [15] von P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1 und VLA-4 auf die sekundäre Wundheilung weitergehende Erkenntnisse hinsichtlich der Pathophysiologie der Dekubituswunde bei Dekubitalulcera verschiedener Schweregrade zu beurteilen. [14,16-19] Das Expressionsmuster leukozytärer

und endothelialer Adhäsionsmoleküle, welche üblicherweise in die Wundheilung involviert sind, soll bei den sekundär heilenden Dekubituswunden sowohl in Abhängigkeit

- verschiedener Schweregrade als auch
- der topographischen Zuordnung zu den unterschiedlichen Wundzonen (zentrale Nekrosezone, Granulationszone, Randbereich) innerhalb eines Schweregrades

untersucht werden.

Dabei wird das Verfahren des Tissue Micro Arrays (TMA) verwendet.

Auf speziell folgende Fragestellungen soll in dieser Arbeit eingegangen werden:

1. Wie verhält sich die lokale Expression von üblicherweise in die Wundheilung einbezogenen Adhäsionsmolekülen P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1, VLA-4 bei den sekundär heilenden Dekubitalulcera hinsichtlich der topographischen Zuordnung in den verschiedenen Zonen (zentrale Nekrosezone, Granulationszone, Randbereich) *gleicher* Dekubitusgrade im Vergleich zu intakter Haut von autoptisch gewonnenen Kontrollfällen?

2. Wie verhält sich die lokale Expression der Adhäsionsmoleküle P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1, VLA-4 bei Dekubitalulcera hinsichtlich der topographischen Zuordnung in den verschiedenen Zonen (zentrale Nekrosezone, Granulationszone, Randbereich) *unterschiedlicher* Dekubitusgrade im Vergleich zu intakter Haut von autoptisch gewonnenen Kontrollfällen?

3. Sollte eine pathologische (verminderte oder vermehrte) Expression endothelialer und/ oder leukozytärer Adhäsionsmoleküle in den verschiedenen Zonen der Dekubituswunde vorliegen: Wie ist deren Rolle – auch hinsichtlich ihrer topographischen Zuordnung zu den verschiedenen Wundgebieten innerhalb eines Dekubitus – im Zusammenhang mit der im Ischämiegebiet des Dekubitus fehlenden Entzündungsreaktion zu bewerten?

4. Ist innerhalb eines Dekubitusgrades ein Antikörper (AK) sinnvoll, um das Maß der Entzündungsreaktion immunhistochemisch festzumachen?

2 Einleitung

2.1 Dekubitalulcera

2.1.1 Definition

Als Dekubitalulcus, auch Dekubitalgeschwür, Druckgeschwür, Wundgeschwür, Durchliegegeschwür oder auch einfach Dekubitus bezeichnet man eine abgegrenzte Schädigung der Haut und des darunterliegenden Gewebes, hervorgerufen durch Druck, Scherkräfte, Reibung und bzw. oder eine Kombination davon. [8]

Die Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (1999) definiert den Dekubitus als *„…Folge einer ischämischen Nekrose der Haut und der darunter liegenden Gewebe aufgrund anhaltender Druckbelastung. Eine gefährliche Druckeinwirkung ist dann gegeben, wenn Arteriolen und Venolen während mehr als zwei Stunden an der gleichen Stelle mit einem Druck komprimiert werden, der den mittleren Kapillardruck übersteigt.“*

Die Wunden können unterschiedlichen Größenausmaßes sein und können zudem nur die oberflächlichen Hautschichten, die tiefer liegenden Bindegewebsschichten oder aber auch den Knochen infiltrieren.

Der Begriff *Dekubitus*, ein neulateinisches, erst im 19. Jahrhundert geprägtes Wort, hat seinen Ursprung im lateinischen Wort *decumbere* („liegen“). Damit gemeint ist das „Sichdurchliegen“ des Patienten.

Ursprünglich wurden Druckgeschwüre als *Gangraena per decubitum* bezeichnet, was sich von der griechischen Bezeichnung (*gángraina*, γάγγραινα,), „fressendes Geschwür“, ableitet und damit „faulige Wunde durch das Liegen“ gemeint ist. Nachfolgend blieb davon nur die Kurzform *Dekubitus* übrig. Das Wort *Geschwür* wird im deutschen Sprachraum seit dem 16. Jahrhundert verwendet. Es leitet sich von *schwären* (althochdeutsch sweran), „schmerzen“, „schwellen“, „eitern“ ab und bedeutete ursprünglich „das, was eitert“. [6]

2.1.2 Pathophysiologischer Hintergrund

Die Haut ist das größte Sinnesorgan unseres Körpers (ca. 2 m²) und stellt die äußere Begrenzung des Menschen zu seiner Umwelt dar. Die äußere Haut wird in drei Schichten eingeteilt: Epidermis (Oberhaut), Dermis (Corium, Lederhaut) und Subkutis (Unterhaut). [20] Sie ist mit vielen Gefäßen durchzogen, insbesondere Kapillaren, die bis in das Corium der Haut ziehen und das umliegende Gewebe ernähren. Von dort werden die Epithelzellen der Epidermis per Diffusion ernährt. Die Druckverhältnisse im arteriellen und venösen Schenkel der Kapillaren stehen in einem Verhältnis von 40: 20 mmHg. Sobald ein Druck, der von außen auf die Haut einwirkt, den Druck des venösen Schenkels übersteigt, kommt es zu einer Minderdurchblutung und Mangelversorgung der Haut [21] Bei andauernder Druckbelastung, z.B. bei einem immobilisierten Patienten, kann somit ein kompletter Gefäßverschluss resultieren. Dadurch wird der epitheliale Stoffwechsel eingeschränkt, und es kommt zur Nekrose [21] [22].

Man kann somit sagen, dass im Einzelnen zunächst die Faktoren Zeit, Druck aber auch eine Prädisposition (z.B. Diabetes mellitus) eine wichtige Rolle bei der Dekubitusentstehung spielen. Kommen somit zu einem bestehenden Risiko, wie zum Beispiel Immobilität, noch ein erhöhter Gewebedruck über einen längeren Zeitraum – überwiegend geht man von 1 bis 2 Stunden aus – hinzu, entsteht eine Mangeldurchblutung. Durch die eingeschränkte arterielle Versorgung des Gewebes kommt es zu einer Unterversorgung mit Sauerstoff und Nährstoffen. Zusätzlich ist durch den behinderten venösen Abfluss der Abtransport von Stoffwechselprodukten nicht mehr ausreichend [13]. Schon nach wenigen Stunden können irreversible Nervenläsionen auftreten [23]. Durch die arterielle Minderversorgung, vor allem aber auch durch die venöse Stauung und die damit verbundene Gewebsazidose kommt es reaktiv zu einer Vasodilatation. Dadurch kann es vermehrt zu Ödemen und Ausbildung von Gefäßthrombosen kommen, da freie Flüssigkeit und Proteine vermehrt in das Interstitium abfließen. [23]

Neben den lokalen Druck- und Zeitverhältnissen spielen die Endothelschädigung der Arteriolen sowie die durch sich ausbildenden lokale „Scherkräfte“ eingeschränkte Mikrozirkulation eine entscheidende Rolle bei der Entstehung eines Dekubitus. [7]. Mit dem Begriff Scherkräfte ist hier ein mechanischer Druck gemeint, der zu einer Gewebsverschiebung parallel zur Auflagefläche des Patienten führt. Dadurch kommt es zu einem Auseinanderdrängen der verschiedenen Gewebsstrukturen, wodurch Endothel- und Mikrozirkulationstörungen, insbesondere des Subkutangewebes, verursacht werden. Diese Endothel-Mikrotraumen aktivieren wiederum die Blutgerinnung, welche eine Okklusion der

beschädigten Blutgefäße vermittelt, und somit die Gefahr der Nekrose erhöht [2]. Dieser Circulosus vitiosus wird durch ein feuchtes Hautmilieu, wie zum Beispiel eine begleitende Harninkontinenz, verstärkt. [24]

Bezüglich der Lokalisation der Entstehung eines Dekubitus ist anzumerken, dass sich grundsätzlich an jeder Stelle des Körpers ein Dekubitus entwickeln kann. Jedoch treten Druckgeschwüre nicht an allen Körperregionen gleichmäßig oft auf. Dies ist vor allem mit der Dicke des Unterhautfettgewebes sowie der Kontaktfläche der Körperregion mit der Aufliegefläche zu erklären. Brick und Kollegen zeigten, dass ein Fettpolster von 2 cm Dicke die Druckwirkung um etwa 50% reduzieren kann. Somit sind diejenigen Körperregionen mit wenig Unterhautfettgewebe besonders dekubitusgefährdet und können lediglich ca. 1/10 des Druckes tolerieren. [25]

2.1.3 Einteilung von Dekubitalulcera

Es liegen viele verschiedene makroskopisch-klinische Einteilungssysteme zur Stadieneinteilung von Dekubitalulcera vor, welche sich an Wundtiefe, Flächenausdehnung und Kontaminationsgrad der Wunde orientieren. Das Wundmanagement orientiert sich an dem klinischen Schweregrad. Wichtig zu erwähnen bleibt, dass die Wundheilungsprognose mit dem klinischen Schweregrad korreliert.
Shea und Kollegen veröffentlichten 1975 eine mittlerweile verbreitete und akzeptierte Einteilung [26].

Dekubitusklassifikation nach Shea [26]
Grad I: Umschriebene Rötung der intakten Haut, die nach zweistündiger Entlastung nicht verschwunden ist.
Grad II: Schädigung oder Blasenbildung in den obersten Hautschichten.
Grad III: Schädigung aller Gewebeschichten mit sichtbaren Anteilen von Muskeln, Sehnen, und/ oder Fettgewebe.
Grad IV: Beteiligung von Knochenhaut und/oder Knochen im Sinne einer Entzündung (Osteomyelitis).

Daneben finden sich auch neuere Einteilungen nach Seiler [27] und der National Pressure Ulcer Advisory Panel [28], die zusätzlich den lokalen Wundbefund beschreiben.

Dekubitusklassifikation nach Grad und Stadium [27]

Grad 1: nicht wegdrückbare, umschriebene Hautrötung bei intakter Haut. Weitere klinische Zeichen können Ödembildung, Induration und eine lokale Überwärmung sein.

Grad 2: Teilverlust der Haut; Epidermis bis hin zu Anteilen des Koriums sind geschädigt. Der Druckschaden ist oberflächlich und kann sich klinisch als Blase, Hautabschürfung oder flaches Geschwür darstellen.

Grad 3: Verlust aller Hautschichten einschließlich Schädigung oder Nekrose des subkutanen Gewebes, die bis auf die darunterliegende Faszie reichen kann. Der Dekubitus zeigt sich klinisch als tiefes, offenes Geschwür.

Grad 4: Verlust aller Hautschichten mit ausgedehnter Zerstörung, Gewebsnekrosen oder Schädigung von Muskeln, Knochen oder stützenden Strukturen wie Sehnen oder Gelenkskapseln, mit oder ohne Verlust aller Hautschichten.

Stadium A: saubere Wunde, Gewebsneubildung (Granulation), keine Nekrosen.

Stadium B: Wunde schmierig belegt, Reste abgestorbenen Gewbebes, keine Infiltration des umgebenden Gewebes.

Stadium C: Wunde wie Stadium B mit Infiltration des umgebenden Gewebes und/ oder Allgemeininfektion (Sepsis).

Dekubitus Klassifikation nach dem National Pressure Ulcer Advisory Panel [28]

Grad 1: Persistierende (= nicht wegdrückbare) , umschriebene Hautrötung bei intakter Haut. Weitere klinische Zeichen können Ödembildung, Verhärtung und lokale Überwärmung sein.

Grad 2: Teilverlust der Haut, Epidermis bis hin zu Anteilen der Dermis sind geschädigt. Die Haut ist oberflächlich geschädigt: Blase, Hautabschürfung oder flaches Geschwür.

Grad 3: Tiefenschädigung von Haut und Gewebe. Verlust aller Hautschichten und Schädigung oder Nekrose des subkutanen Gewebes, die bis auf die darunter liegende Fascie reichen kann. Der Dekubitus zeigt sich klinisch als tiefes, offenes Geschwür.

Grad 4: Verlust aller Hautschichten mit ausgedehnter Zerstörung, Gewebsnekrose oder Schädigung von Muskeln, Knochen oder unterstützenden Strukturen (Sehnen, Gelenkkapsel)

** NPUAP = National Pressure Ulcer Advisory Panel*

2.1.4 Risikofaktoren und Risikogruppen

Alter und Immobilität stellen die wichtigsten Risikofaktoren für die Ausbildung eines Dekubitus dar. Ältere Menschen (≥70 Jahre) mit eingeschränkter Mobilität und somit verminderter Fähigkeit zur Kompensation von Reibung und Scherkräften weisen ein höheres Dekubitusrisiko auf. Wichtig in diesem Zusammenhang sind vor allem Komorbiditäten, die zur Dekubitusausbildung prädisponieren. Hierzu gehören Krankheitsbilder bzw. Symptome wie Kachexie (Zunahme der Konvexität der Brustwirbelsäule bei Kachexie, überdurchschnittlich hohe Druckspitzen bei abgemagerten Patienten), Hirn-, Rückenmarks- oder periphere Nervenverletzungen, hirnorganische und demenzielle Syndrome, Harninkontinenz und die damit häufig verbundene Feuchtigkeit im Wundgebiet, Anämie, Malnutrition, Hypalbuminämie, Exsikkose, Mobilitätseinschränkung oder Immobilität aufgrund von anderen Ursachen (wie z.B. infolge von Sedierung). [1][3,4][5][29].

2.2 Endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle

Die grundlegenden Mechanismen der Entzündung sind die Endothelzellaktivierung und Endothelzell-Leukozyten-Interaktion. Das kennzeichnende Merkmal und eigentliche Schlüsselereignis der inflammatorischen Antwort ist die Extravasation sowie die transendotheliale Migration der im Blutstrom zirkulierenden Leukozyten an den Entzündungsort. Die Regulation der Kommunikation zwischen Endothel und Leukozyten erfolgt durch endotheliale und leukozytäre Adhäsionsmoleküle, die, stimuliert durch Cytokine, auf der Zelloberfläche exprimiert werden. Eine Unterteilung der Adhäsionsmoleküle erfolgt aufgrund ihrer chemischen Struktur in drei Gruppen: Selektine, Integrine und die Immunglobulin-Superfamilie [12] [11] [30]. Die Adhäsionsmoleküle werden nicht nur bei Infektion und Sepsis auf Leukozyten und Endothelzellen verstärkt exprimiert, sondern ebenfalls bei Trauma, Schock, chronisch entzündlichen Erkrankungen und Reperfussionsprozessen im Rahmen der inflammatorischen Kaskade.

Der erste Schritt, der initiale Kontakt der neutrophilen Granulozyten mit den Endothelzellen und das Entlangrollen („rolling“; transiente, instabile Endothel-Leukozyten-Adhäsion) an der Endotheloberfläche bei der Extravasation Neutrophiler in das Gebiet der Inflammation, wird von der Expression dreier verschiedener Selektine (E-Selektin, P-Selektin und L-Selektin) gesteuert. E-Selektin wird von aktivierten Endothelzellen de novo synthetisiert, P-Selektin findet sich in präformierter Form in Endothelzellen gespeichert und L-Selektin wird auf der Leukozytenoberfläche exprimiert. Im darauf folgenden zweiten Schritt kommt es einerseits zum einem festen Anhaften der Neutrophilen an das Endothel sowie andererseits zur

Diapedese (altgriechisch *διά* dia „durch“, „hindurch“, „zwischen“, „auseinander“ und altgriechisch πηδᾶν *pedan* „springen“, „hüpfen“), welche das „Hindurchtreten“ der Granulozyten durch das Endothel bezeichnet. Dieser Vorgang wird durch die Verbindung von Endothel und Leukozyten über ihre entsprechenden Liganden aus der Immunglobulin Superfamilie (wie zum Beispiel ICAM-1, VCAM-1) sowie der Integrine (zum Beispiel LFA-1, VLA-4) vermittelt [9,12,30,31]. Diese Zell-Zell-Interaktion führt im Entzündungsprozess zum „Zusammenkleben“ von Leukozyten und Endothel, das so genannte „sticking“, die feste Adhäsion. Dies wiederum führt zur Verlangsamung der Fließgeschwindigkeit des Blutes im Kapillarbett. Diese Leukozytenadhäsion ist der initiale Schritt der Keimabwehr des Organismus. Zudem korreliert das Ausmaß der Leukozytenadhäsion mit dem Ausmaß der Leukozytenaktivierung bei Infektion und Sepsis. Mitunter kommt es aufgrund der Zerstörung des endothelialen Zellverbandes durch die Leukozytenadhäsion in der Frühphase der Infektion in der peripheren systemischen Zirkulation zu einem Barrierefunktionsverlust des Endothels, wodurch eine Leckage der Kapillaren (capillary leakage) entsteht, welches zur Extravasation von Plasmawasser und zu Eiweißverlust führt [10,16,32].

Die initiale Zell-Zell Interaktion von Leukozyten und Endothel wird von den Selektinen gesteuert. Dabei erfolgt eine Interaktion mit Kohlenhydrat Liganden, wodurch das initial „rolling“ der Leukozyten am Endothel vermittelt wird und somit der nachfolgende Migrationsprozeß initiiert wird. Den frühesten exprimierten Rezeptor während der Entzündungsreaktion stellt P-Selektin (CD62p) dar. Er bindet an den sulfatierten Sialyl-Lewis-Komplex. P-Selektin befindet sich auf aktiviertem Endothel und Thrombozyten [14]. Zur anschaulichen Darstellung dienen die beiden folgenden Abbildungen:

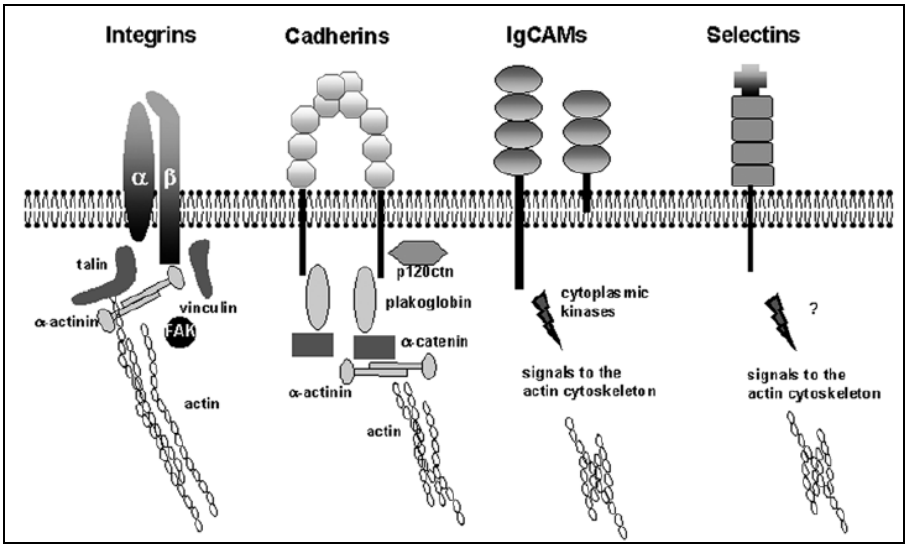

Abb. 1: Hauptklassen der Adhäsionsmoleküle und deren Bindung an das Aktin

aus: [16]

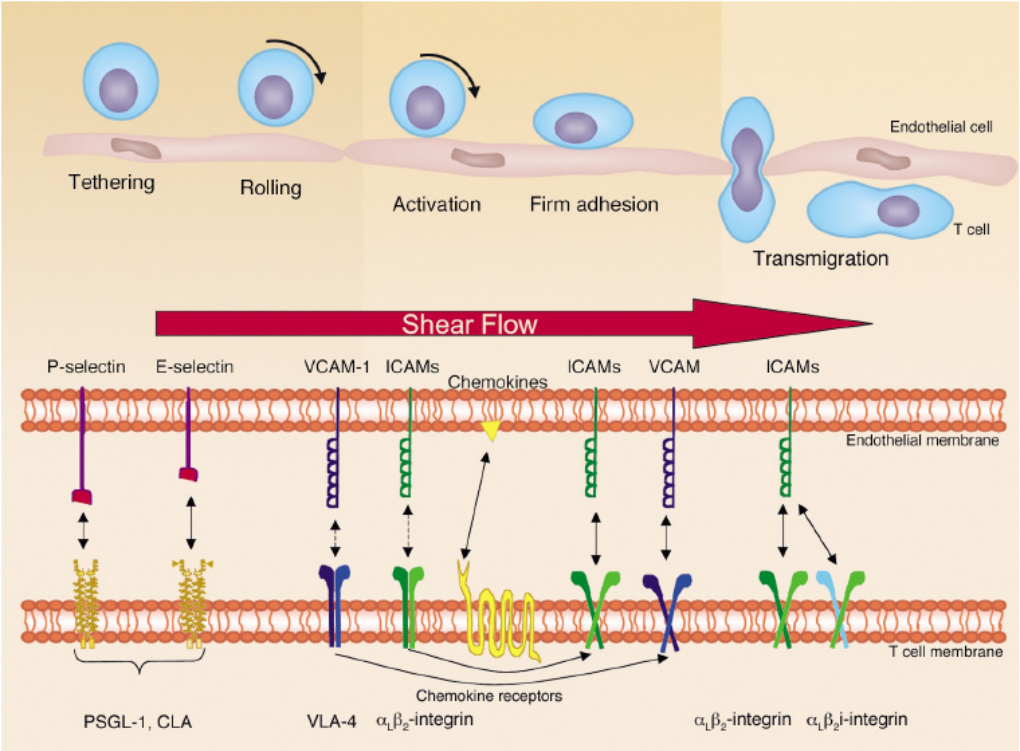

Abb. 2: Interaktion zwischen Lymphocyten und Endothelzellen

aus: [19].

Integrine binden an Zelladhäsionsmoleküle und verstärken das sticking. Das rolling wird dadurch verlangsamt und es kommt zu einem stärkeren Kontakt zwischen Leukozyt und Endothelzelle. Integrine sind locker aneinander gebundene Doppelmoleküle, die sich aus zwei Anteilen zusammensetzen, einem α- und einem β-Anteil, wobei der α-Anteil der spezifische von beiden ist im Gegensatz zum gleich bleibenden β2-Anteil. Der α-Anteil kann als CD11a, CD11b und CD11c verschieden gestaltet sein. LFA-1 (CD11a) wird auf Monozyten, T-Zellen, Makrophagen, neutrophilen Granulozyten und dendritischen Zellen exprimiert und nach einer induzierten Konformationsänderung erfolgt die Bindung an ICAM-1 und ICAM-2. ICAM, VCAM und PECAM sind Mitglieder der Immunglobulin Superfamilie. Sie sind der endotheliale Ligand für die Integrine und gewährleisten zusammen mit ihnen eine feste Bindung zwischen Leukozyt und Endothelzelle. VCAM-1 (CD 106) befindet sich auf aktiviertem Endothel und bevorzugt die Bindung an das Integrin VLA-4 an Monozyten und lymphatischen Zellen [33], [34].

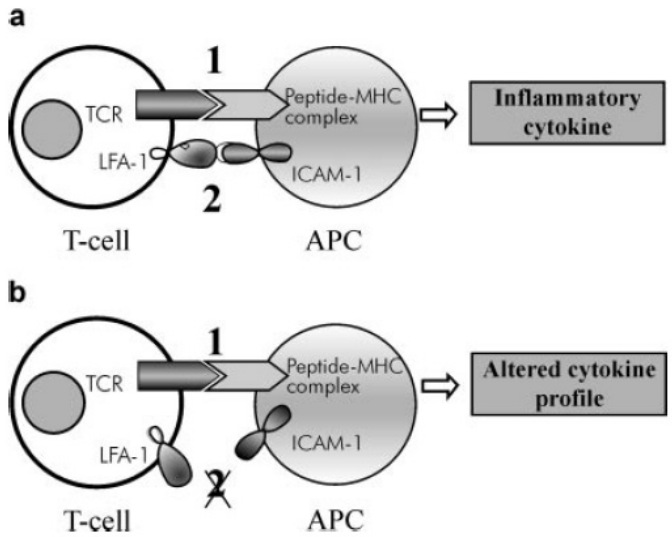

Figure 1. The two signal (signal-1 and signal-2) model of T-cell activation: LFA/ICAM-1 interactions are required in activation of T-cells making inflammatory cytokines. **a:** The first signal is provided by T-cell receptor (TCR) recognition of the Peptide: MHC complex on the APC (Signal 1). The second signal is mediated in part by cell adhesion molecules such as LFA-1/ICAM-1 interaction (Signal 2). The activation of both signal-1 and signal-2 leads to the release of T-cell inflammatory cytokines (IL-12, IFN-γ). **b:** Blocking the LFA-1/ICAM-1 interaction (e.g., with mAb) alters T-cell cytokine profile toward potentially non-inflammatory cytokines (IL-4 and IL-10).

Abb. 3: T-Zell Aktivierung

aus: [18]

3 Material und Methoden

3.1 Material

Im Zeitraum 2003 bis 2006 wurden im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bei insgesamt 17 Obduktionsfällen Gewebe von Dekubitalulcera unterschiedlicher Schweregrade asserviert. Die Einteilung der unterschiedlichen Schweregrade erfolgte nach Shea [26]. Die Todesursache war meist ein kardiales Geschehen, bei vier der oben genannten Fälle zeigte sich als Todesursache eine Sepsis. Das Durchschnittsalter der Verstorbenen lag bei 81 Jahren (Altersspanne 44 bis 96 Jahre).

Eine genaue Auflistung über die verschiedenen Merkmale wie Geschlecht, Alter, Körpergewicht und –größe des Patienten, Dekubitusgrad, Lokalisation, Beschaffenheit und Erscheinungsbild des Dekubitus sowie Todesursache ist im Anhang Kapitel 7 unter 7.4.1 einzusehen.

Es wurden aus folgenden vier Zonen jedes einzelnen Dekubitusgrades Gewebeproben entnommen: Zentrale Nekrosezone, Granulationszone, auch perinekrotische Zone genannt, Haut im Randbereich und intakte Haut. In zehn Fällen lag ein Dekubitusgrad IV vor, in vier Fällen ein Dekubitusgrad III, in zwei Fällen ein Dekubitus I. Grades und in einem Fall ein Dekubitus II. Grades. Das Erscheinungsbild des Dekubitus reichte von sauberen und trockenen Wundverhältnissen bis zu feuchten, putriden und abszedierenden Wundbeschaffenheiten. In allen siebzehn Fällen war der Dekubitus in der Sakralregion lokalisiert.

Die Gewebeproben wurden primär in Formalin (5%) fixiert und im Rahmen der üblichen histologischen Aufarbeitung in Paraffin gegossen.

Als Kontrollgruppe diente gesundes Hautgewebe aus der Scapularegion, entnommen im Zeitraum 2005 bis 2006, von 32 Obduktionsfällen. In diesen Fällen trat der Tod ebenfalls meist aufgrund einer kardialen Ursache ein. Auch diese Gewebeproben wurden primär in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin gegossen. Weiterhin wurden HE-Schnitte angefertigt um das zu erfassende Gebiet einzugrenzen.

Das Standard-Control-Tissue des Dekubitus Arrays, welches verwendet wurde, um die immunhistochemische Färbung zu prüfen, entstammt dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Auch diese Gewebeproben wurden primär in Formalin fixiert und anschließend in Paraffin gegossen. Da dieses Gewebe sich stets auf den Dekubitus Arrays bzw. Kontroll Arrays befand, wurden sie ebenfalls nach Anfertigung der Schnitte mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt. Im Abschnitt Dekubitus-Array (3.4.) findet sich eine genaue Auflistung, welche Gewebe im Detail verwendet wurden.

3.2 Histologie

Die in Kapitel 3.1 beschriebenen Gewebeproben wurden primär in Formalin (5%) fixiert und im Rahmen der üblichen histologischen Aufarbeitung in Paraffin gegossen. Anschließend wurden von jedem einzelnen Paraffinblock Schnitte angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin angefärbt, um das Dekubitusgewebe mikroskopisch zu visualisieren. Dies diente dazu, sicherzugehen, dass aussagekräftiges Gewebe dargestellt wird. Die Schnittdicke betrug ca. 5µm. Aus diesem definierten Bereich wurden weiterhin 4 mm messende Biopsien für die Herstellung des Arrays entnommen. Die Einzelheiten diesbezüglich werden im Abschnitt 3.4. beschrieben.

Die angefertigten Schnitte wurden wiederum von zwei Untersuchern nach folgendem Schema ausgewertet:

- Lokalisation der Inflammation (Zonen in Bezug auf Dekubitusgrade)
- Vorherrschender Zelltyp des entzündlichen Infiltrates (Granulozyten, Makrophagen, gemischtzelliges Infiltrat) als semiquantitative Schätzung in %
- Grad der Ausprägung des vorherrschenden Zelltypes (gering, mäßig, stark)

3.3 Tissue Micro Array (TMA)

Das Prinzip der TMA – Herstellung wurde bereits ausführlich beschrieben. Mithilfe des so genannten TMA-Verfahrens, einer molekularen „high throughput“ Methode, können hunderte archivierte, in Paraffin eingebettete Gewebeproben in einem einzigen, neuen Paraffinblock angeordnet und entsprechende Kandidaten Gene auf DNA analysiert werden. [15][35] [36] [37]

Im ersten Schritt wird von jedem archivierten Paraffinblock ein HE-Schnitt angefertigt, um die zu untersuchende Region histologisch zu kennzeichnen. Dann werden anschließend aus diesem definierten Bereich, mithilfe eines Array-Stanzgerätes, Biopsien eines definierten Durchmessers entnommen (im Schnitt 0,6 mm). Das Array-Stanzgerät besitzt einen Bohrer mit einem an der Spitze geschärften Hohlzylinder in dem vorher definierten Durchmesser, so dass nun mit diesem Bohrer aus dem Paraffinblock, dem sogenannten „Donor“ oder „Spenderblock“, die vorher definierte Gewebeprobe ausgestanzt wird und anschließend in den „Recipient“ oder Empfängerblock, der über vorgefertigte Löcher desselben Durchmessers verfügt, eingebracht. In Abbildung 4 ist eine schematische Darstellung der Funktionsweise des Tissue-Micro-Array-Verfahrens dargestellt.

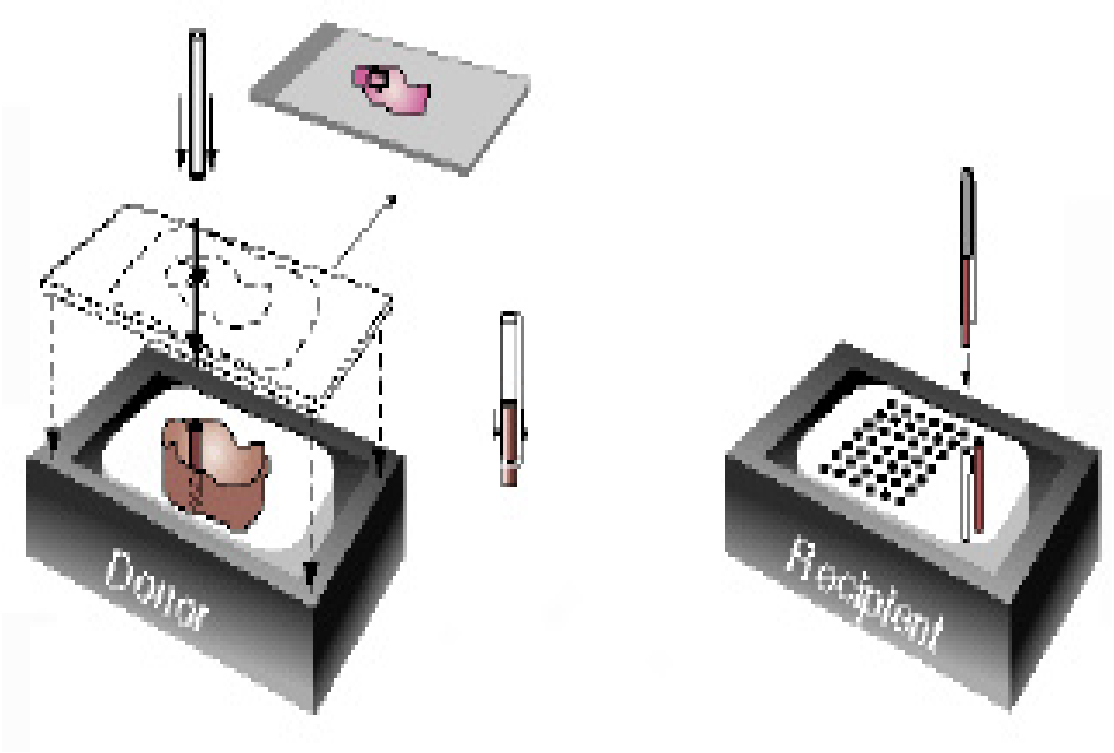

Abb. 4: Tumor-Array-Herstellung. Das Instrument besteht aus einem dünnen, an der Spitze geschärften Hohlzylinder (innerer Durchmesser ca. 600 µm), welcher in einem X-Y-Achsen-Präzisionsgerät gehalten wird. Ein genau in den Hohlzylinder passender Stahldraht ermöglicht das Ausstoßen von gestanzten Gewebestücken in, mit einem analogen Instrument (äußerer Durchmesser ca. 600 µm), vorgefertigte Löcher im Empfängerblock (Tumor-Array). Ein verstellbarer "Eindring-Stopper" sichert eine konstante Länge von Zylindern und vorgefertigten Löchern im Empfängerblock. Bis zu tausend Gewebezylinder können in einen 20 x 40 mm messenden Empfänger-Paraffinblock eingebracht werden. (Quelle: Dissertation Yvonne Forster-Schnyder: Epidemiologie der Calretininexpression in normalen und neoplastischen Geweben: Eine Gewebearray Untersuchung an 4987 Gewebeproben, Medizinische Fakultät, Universität Basel, 2003)

3.4 Dekubitus-Array

In Zusammenarbeit mit dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf wurde der von uns entwickelte Dekubitus Array modifiziert, um einen besseren Überblick aus dem Bereich der Inflammation bzw. Nekrosezone zu erlangen. Zu diesem Zwecke wurden anstelle von 0,6 mm Stanzen 4 mm Stanzen verwendet. Zur sicheren Auswahl der verschieden Dekubituszonen (zentrale Nekrosezone, Granulationszone, Haut im Randbereich und intakte Haut) wurden diese vorher histologisch untersucht und das betreffende Areal markiert. Bei einer Stanzgröße von 4 mm konnten somit 20 Gewebezylinder in den 20 x 40 mm messenden Empfängerblock eingebracht werden. Dies ermöglichte eine Darstellung aller vier oben genannten Dekubituszonen von insgesamt fünf verschiedenen Dekubituspatienten auf einem einzelnen Empfängerblock. Anschließend wurden weitere 38 Gewebezylinder mit einem jeweiligen Durchmesser von 0,6 mm auf den freien unteren Bereich des Empfängerblocks eingestanzt, das so genannte „Standard Control Tissue“, um so die Qualität der immunhistochemischen Färbung zu kontrollieren. Das hierfür bereitstehende Gewebe entstammt aus dem Institut für Pathologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Als Kontrollgewebe dienten hierfür jeweils zwei Stanzen Herz-, Nieren-, Lungen-, Kolonmukosa-, Endometrium-, Prostata- und Lymphknotengewebe sowie quergestreifte Muskulatur. Weiterhin wurden je fünf Stanzen aus Mammakarzinom-, Lungenkarzinom- (jeweils drei Stanzen Plattenepithelkarzinom- und zwei Stanzen Adenokarzinom-), Kolonkarzinom- und Prostatakarzinomgewebe entnommen.

Insgesamt entstanden somit fünf Empfängerblöcke, die das komplette Gewebematerial der 17 Dekubituspatienten (alle vier Zonen beinhaltend), 32 Kontrollfälle sowie das „Standard Control Tissue“ enthielten. Der genaue Aufbau der einzelnen Blöcke ist in den Abbildungen 5, 6 und 7 dargestellt.

In Abbildung 8 ist ein makroskopisches Beispielfoto dargestellt.

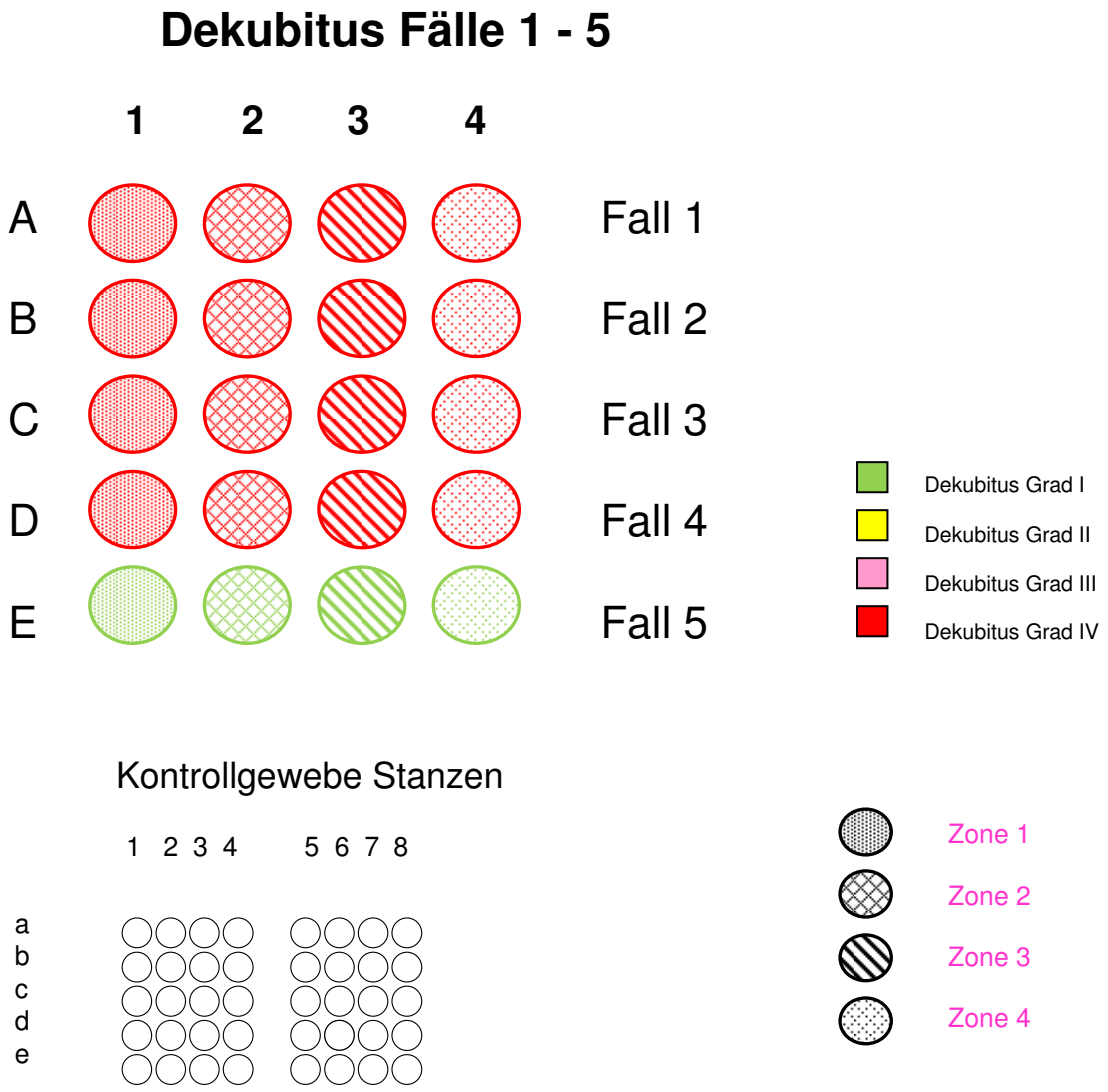

Abb. 5: Aufbau des Dekubitus Arrays Block 1 . Spalte 1 entspricht der zentralen Nekrosezone (Zone 1) des jeweiligen Falles bzw. Dekubitusgrades. In Spalte 2 findet sich die Granulationszone (Zone 2), in Spalte 3 entspricht der Haut im Randbereich (Zone 3) und Spalte 4 der intakten Haut (Zone 4). Farbliche Hinterlegung des Falles entspricht dem jeweiligen Dekubitusgrad. Das Kontrollgewebe (a1 bis e8) setzt sich auf allen Blöcken gleichermaßen zusammen. Für die nachfolgenden Dekubitus Arrays 2 und 3 (Fälle 6 bis 15) entspricht der Aufbau dem Aufbau von Dekubitus Array 1.

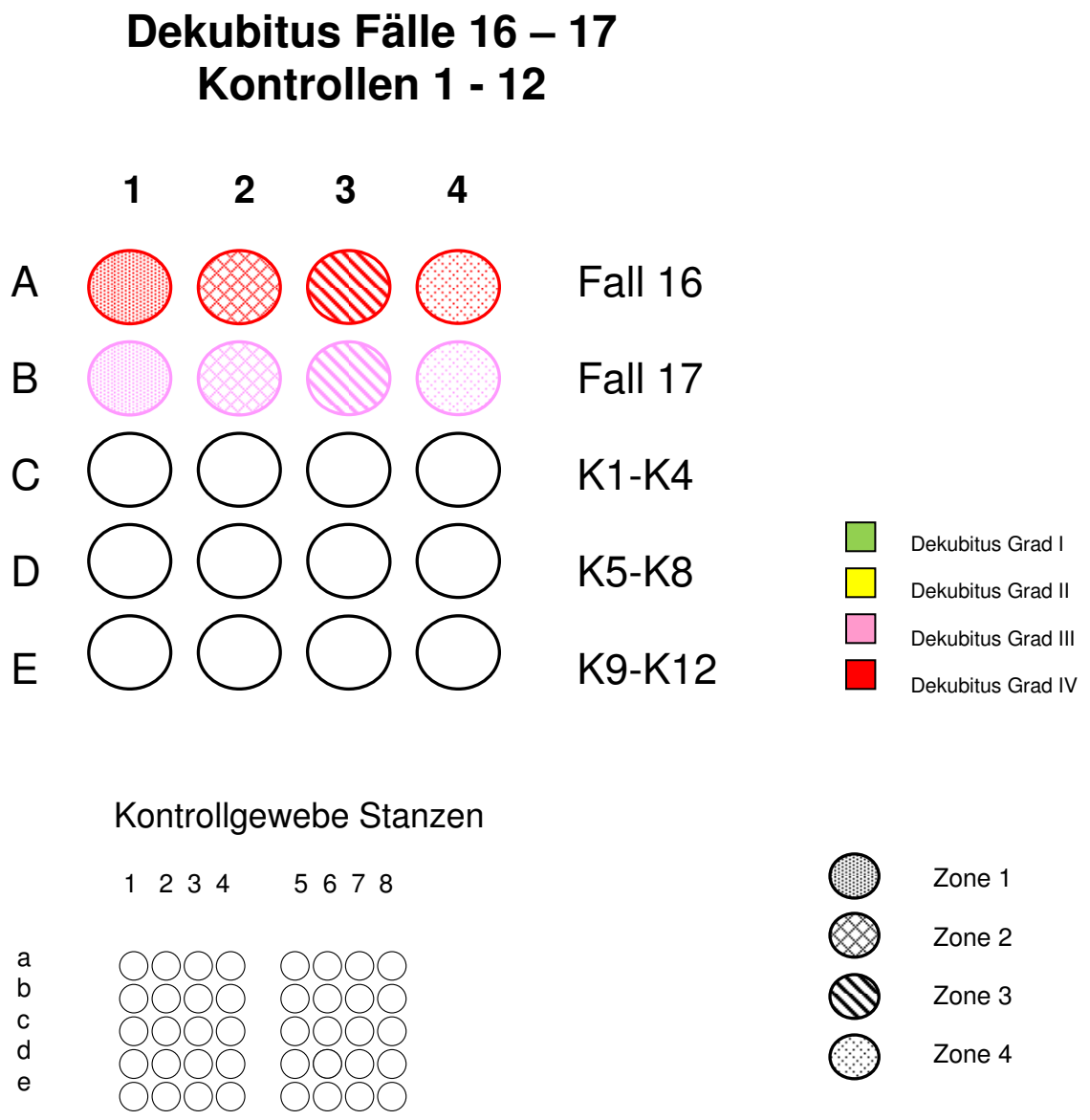

Abb. 6: Aufbau des Dekubitus Arrays Block 4 inklusive Kontrollen . Spalte 1 (A und B) entspricht der Zone 1 des jeweiligen Falles bzw. Dekubitusgrades. In Spalte 2 (A und B) findet sich Zone 2, in Spalte 3 der Reihen A und B Zone 3 und Spalte 4 (Reihe A und B) entspricht dem Randbereich. Ab Reihe C entspricht jede Spalte einer Kontrolle.
Das Kontrollgewebe (a1 bis e8) setzt sich auf allen Blöcken gleichermaßen zusammen.

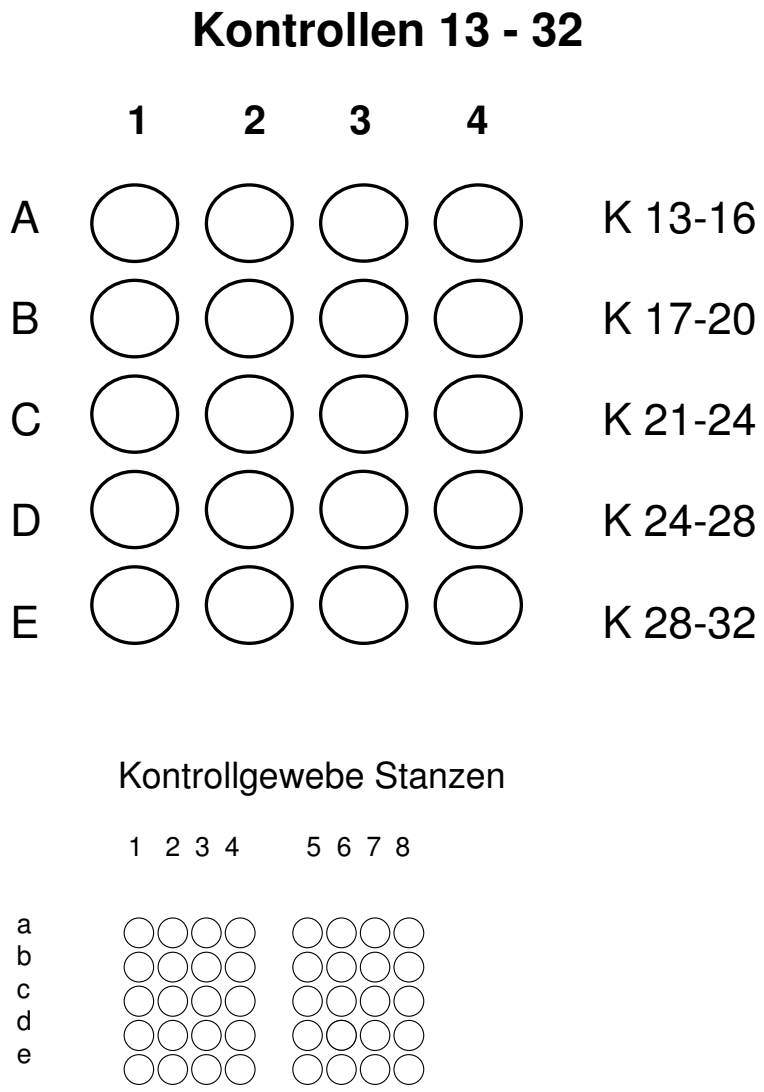

Abb. 7: Aufbau des Kontroll Arrays . Jeder Kreis entspricht einer Kontrolle.
Das Kontrollgewebe (a1 bis e8) setzt sich auf allen Blöcken gleichermaßen zusammen.

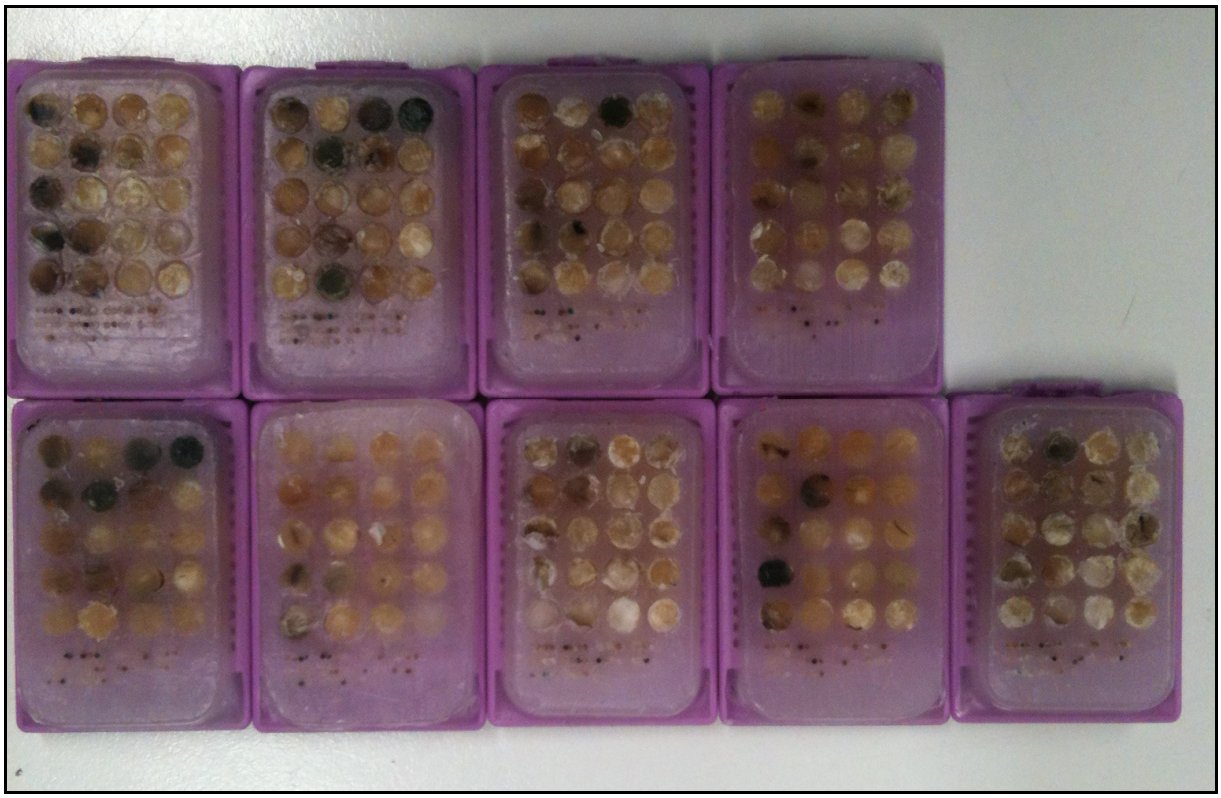

Abb. 8: Beispielfoto Dekubitus Array inklusive Kontrollstanzen

3.5 Immunhistochemie

Die Schnitte der TMA-Blöcke wurden auf beschichtete Objektträger (Instrumedics, Hackensack, New Jersey) aufgezogen. Es wurde für die immunhistochemische Analyse die standardisierte indirekte Immunoperoxidase-Prozedur angewandt (ABC-Elite, Vector Laboratories, Berlingame, CA). Der monoklonale Mausantikörper gegen P-Selektin (CD62p) wurde zur Immunhistochemie 1:20 verdünnt. Optimale Färbeergebnisse konnten nach Vorbehandlung im Autoklaven (5 min bei 121 °C in Demaskierungspuffer BIOGENICS, pH 2,0) erzielt werden.

Der monoklonale Mausantikörper gegen E-Selektin (CD62e) wurde zur Immunhistochemie 1:20 verdünnt. Weiterhin wurde zur Demaskierung der Strukturen das Enzym Pronase VIV angewendet.

Der monoklonale Mausantikörper gegen VCAM-1 (CD106) wurde 1:20 für die Immunhistochemie verdünnt. Optimale Färbeergebnisse konnten nach Vorbehandlung im Autoklaven (5 min bei 98 °C in Demaskierungspuffer DAKO, pH 9,0) erzielt werden.

Der monoklonale Mausantikörper gegen LFA-1 (CD11a) wurde zur Immunhistochemie 1:800 verdünnt. Optimale Färbeergebnisse konnten nach Vorbehandlung im Autoklaven (5 min bei 121 °C in Demaskierungspuffer BIOGENICS, pH 2,0) erzielt werden.

Der monoklonale Mausantikörper gegen VLA-4 (CD49d) wurde zur Immunhistochemie 1:450 verdünnt. Optimale Färbeergebnisse konnten nach Vorbehandlung im Autoklaven (5 min bei 121 °C in Demaskierungspuffer BIOGENICS, pH 2,0) erlangt werden.

Es wurde die Expression der einzelnen Adhäsionsmolekülen auf dem Endothel, auf den ins Gewebe eingewanderten und in den Gefäßen befindlichen Entzündungszellen ausgewertet. Bei allen untersuchten Stanzen wurde der Anteil positiver Zellen geschätzt (<50% = 1, 50%-70% = 2, >70% = 3) und die Färbeintensität semiquantitativ bestimmt (nicht angefärbt = 0, schwach angefärbt = 1, stark angefärbt = 2). Diese beiden Werte wurden miteinander multipliziert und jeder Score, der einen Wert von ≥ 1 aufwies, wurde als positiv bewertet.

3.6 Statistik

Die Scores der Immunhistochemie und die Anzahl der gefärbten Zellen wurden als kategorische Variablen mittels Anzahl und Prozentsatz dargestellt. Ferner wurden die einzelnen Scores als nominale Variabeln gedeutet, um das Verhalten der Farbintensität und der Anzahl der gefärbten Zellen deskriptiv darzustellen. Zu statistischen Auswertung wurde der Fisher exact Test verwendet, um Unterschiede in der Expression von P-Selektin, E-Selektin, LFA-1, VCAM-1 und VLA-4 auf Endothel-, Entzündungs- und Bindegewebszellen

in den vier Zonen der vier unterschiedlichen Dekubitusgrade sowie der Kontrollfälle zu untersuchen. Ein zweiseitiger p-Wert < 0,05 wurde als statistisch signifikant angesehen.

4 Ergebnisse

Im Zeitraum von 2003 bis 2006 wurden im Institut für Rechtsmedizin des Universitätsklinikums Hamburg – Eppendorf bei insgesamt 17 Obduktionsfällen Gewebe von Dekubitalulcera unterschiedlicher Schweregrade asserviert. Insgesamt wurden von jedem Patienten 4 Gewebeproben aus folgenden Dekubitus- Zonen entnommen: Zentrale Nekrosezone, perinekrotische Zone, Haut im Randbereich und intakte Haut. In zehn Fällen lag ein Dekubitusgrad IV vor, in vier Fällen ein Dekubitusgrad III, in zwei Fällen ein Dekubitus I. Grades und in einem Fall ein Dekubitus II. Grades. In allen siebzehn Fällen war der Dekubitus in der Sakralregion lokalisiert.

Als Kontrollgruppe diente gesunde Haut, im Regelfall aus dem Skapulabereich, welche im Zeitraum 2005 bis 2006 von 32 Obduktionsfällen asserviert wurde.

Somit ergeben sich insgesamt hundert zu untersuchende Gewebeproben (4 Zonen pro Dekubitusgrad + 32 Kontrollfälle).

Bei allen untersuchten Stanzen wurde der Anteil der Immunhistochemie-positiven Zellen abgeschätzt (<50% = 1, 50%-70% = 2, >70% = 3) und die Färbeintensität semiquantitativ bestimmt (nicht angefärbt = 0, schwach angefärbt = 1, stark angefärbt = 2). Diese beiden Werte wurden miteinander multipliziert und jeder Score, der einen Wert von ≥ 1 aufwies, wurde als positiv bewertet.

4.1 Expression P-Selektin

P-Selektin (CD62p) wurde in unterschiedlichem Ausprägungsgrad sowohl auf Endothelzellen als auch auf Thrombozyten so wie, bei Vorhandensein, auf Granulozyten nukleär und cytoplasmatisch exprimiert.

Tabelle 1 beinhaltet für jede einzelne Zone jedes Dekubitusgrades den kleinsten sowie den höchsten Score (Produkt aus Farbintensität und Zellanzahl), gleiche Dekubitusgrade wurden gruppiert. Eine genaue Auflistung aller Scores jeder einzelnen Zone und jedes einzelnen Dekubitusgrades ist im Anhang (Kapitel 7.4) aufgelistet.

Aus den Mittelwerten der P-Selektin Expression ergibt sich das Balkendiagramm, welches in Abbildung 9 dargestellt ist.

Hier zeigt sich deutlich, dass P-Selektin wesentlich stärker bei einem Schweregrad Dekubitus I in der Granulationszone und der Haut im Randbereich (Zone 2 und 3) exprimiert wird als in der zentralen Nekrosezone (Zone 1). P-Selektin wurde im Bereich der intakten Haut (Zone 4) nicht exprimiert. Bei einem Dekubitusgrad II wurde P-Selektin sowohl in Zone 2, 3 als auch in Zone 4 mit einem Score ≥ 1 exprimiert, in Zone 1 beträgt der Score 0.

Dekubitusgrad III zeigt in allen vier Zonen einen positiven Mittelwertsscore, die stärkste Expression ist in Zone 1 und 3 zu sehen. Dekubitusgrad IV zeigt ebenfalls in allen vier Zonen einen positiven Mittelwertsscore, die stärkste Expression ist auch hier in Zone 1 und 3 zu sehen.

Zone/ Dekubitusschweregrad	n (%)	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard abweichung
Score_Z1_PS, D1	2	0,50	0,5	0	1	0,71
Score_Z1_PS, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z1_PS, D3	4	2,00	2	1	3	0,82
Score_Z1_PS, D4	10	2,00	2	0	6	2,31
Score_Z2_PS, D1	2	3,50	3,5	1	6	3,54
Score_Z2_PS, D2	1	1,00	1	1	1	•
Score_Z2_PS, D3	4	1,00	1	0	2	0,82
Score_Z2_PS, D4	9	0,44	0	0	1	0,53
Score_Z3_PS, D1	2	2,00	2	0	4	2,83
Score_Z3_PS, D2	1	3,00	3	3	3	•
Score_Z3_PS, D3	4	1,25	1,5	0	2	0,96
Score_Z3_PS, D4	10	1,00	1	0	3	1,05
Score_Z4_PS, D1	2	0,00	0	0	0	0
Score_Z4_PS, D2	1	1,00	1	1	1	•
Score_Z4_PS, D3	4	0,50	0,5	0	1	0,58
Score_Z4_PS, D4	9	0,22	0	0	2	0,67
Score _PS, D0	32	0,19	0	0	1	0,40

Tab. 1: P-Selektin Expression unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

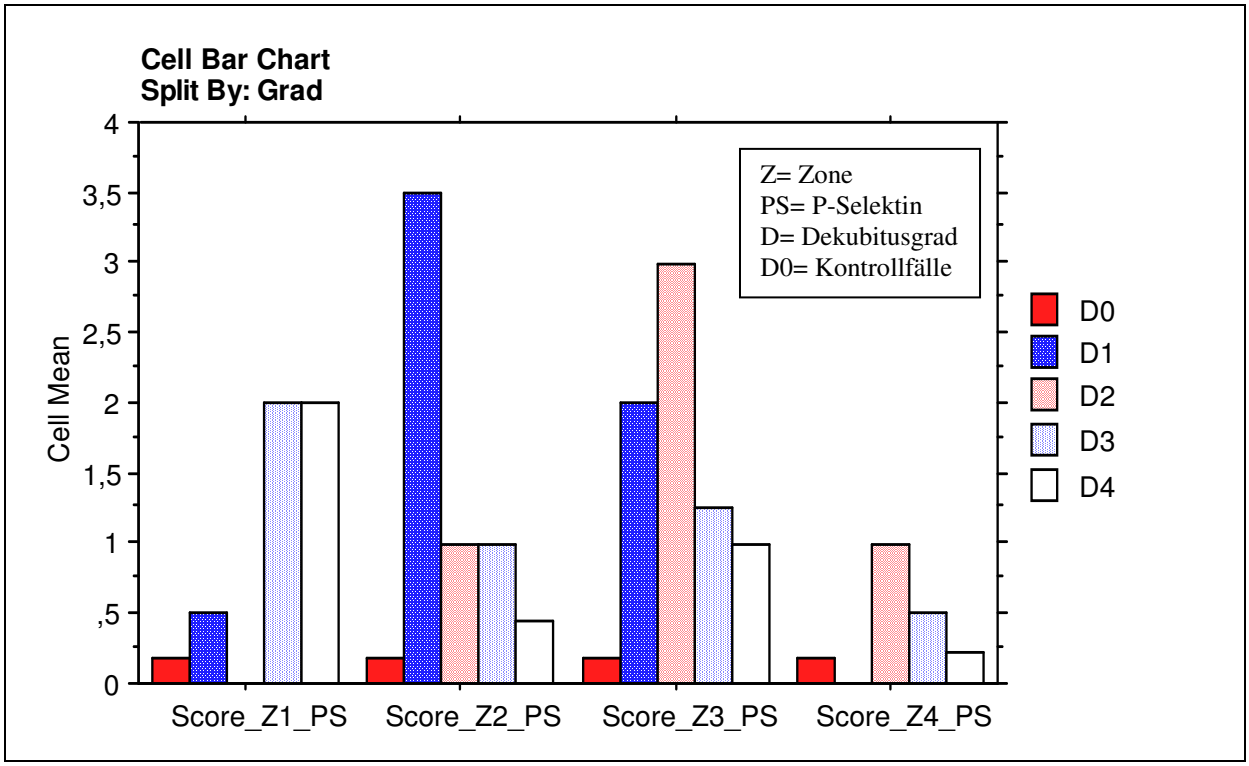

Abb. 9: Balkendiagramm zur Mittelwert- Darstellung der P-Selektin Expression nach unterschiedlicher Zone und Dekubitusgrad

4.2 Expression E-Selektin

E-Selektin (CD62e) wurde in unterschiedlichem Ausprägungsgrad auf Endothelzellen exprimiert.

Tabelle 2 beinhaltet für jede einzelne Zone jedes Dekubitusgrades den kleinsten sowie den höchsten Score (Produkt aus Farbintensität und Zellanzahl), gleiche Dekubitusgrade wurden gruppiert. Eine genaue Auflistung aller Scores jeder einzelnen Zone und jedes einzelnen Dekubitusgrades ist im Anhang (Kapitel 7.4) aufgelistet.

Aus den Mittelwerten des Scores ergibt sich das Balkendiagramm, welches in Abbildung 10 dargestellt ist.

Hier zeigt sich, dass bei einem Schweregrad Dekubitus I in der Granulationszone (Zone 2) E-Selektin wesentlich stärker exprimiert wird als in der zentralen Nekrosezone (Zone 1). In dem Randbereich sowie der intakten Haut (Zone 3 und 4) wurde E-Selektin gar nicht exprimiert.

Bei einem Dekubitusgrad II wurde E-Selektin sowohl in Zone 2 als auch in Zone 3 mit einem Score = 1 exprimiert, in Zone 1 und 4 beträgt der Score 0.

Dekubitusgrad III zeigt in allen vier Zonen einen positiven Mittelwertsscore, die stärkste Expression ist in Zone 1 zu sehen.

Dekubitusgrad IV zeigt ebenfalls in allen vier Zonen einen positiven Mittelwertsscore, die stärkste Expression ist in Zone 2 und 3 zu sehen.

Zone/ Dekubitusschweregrad	n (%)	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard abweichung
Score_Z1_ES, D1	2	0,50	0,5	0	1	0,71
Score_Z1_ES, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z1_ES, D3	4	2,00	2	0	4	2,31
Score_Z1_ES, D4	10	1,20	1	0	4	1,32
Score_Z2_ES, D1	2	1,50	1,5	0	3	2,12
Score_Z2_ES, D2	1	1	1	1	1	•
Score_Z2_ES, D3	4	0,50	0	0	2	1,00
Score_Z2_ES, D4	9	1,56	0	0	6	2,55
Score_Z3_ES, D1	2	0	0	0	0	0
Score_Z3_ES, D2	1	1	1	1	1	•
Score_Z3_ES, D3	4	0,50	0	0	2	1,00
Score_Z3_ES, D4	10	1,50	1	0	6	2,01
Score_Z4_ES, D1	2	0	0	0	0	0
Score_Z4_ES, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z4_ES, D3	4	0,25	0	0	1	0,50
Score_Z4_ES, D4	9	0,44	0	0	2	0,73
Score_Z4_ES, D0	32	0	0	0	0	0

Tab. 2: E-Selektin Expression unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

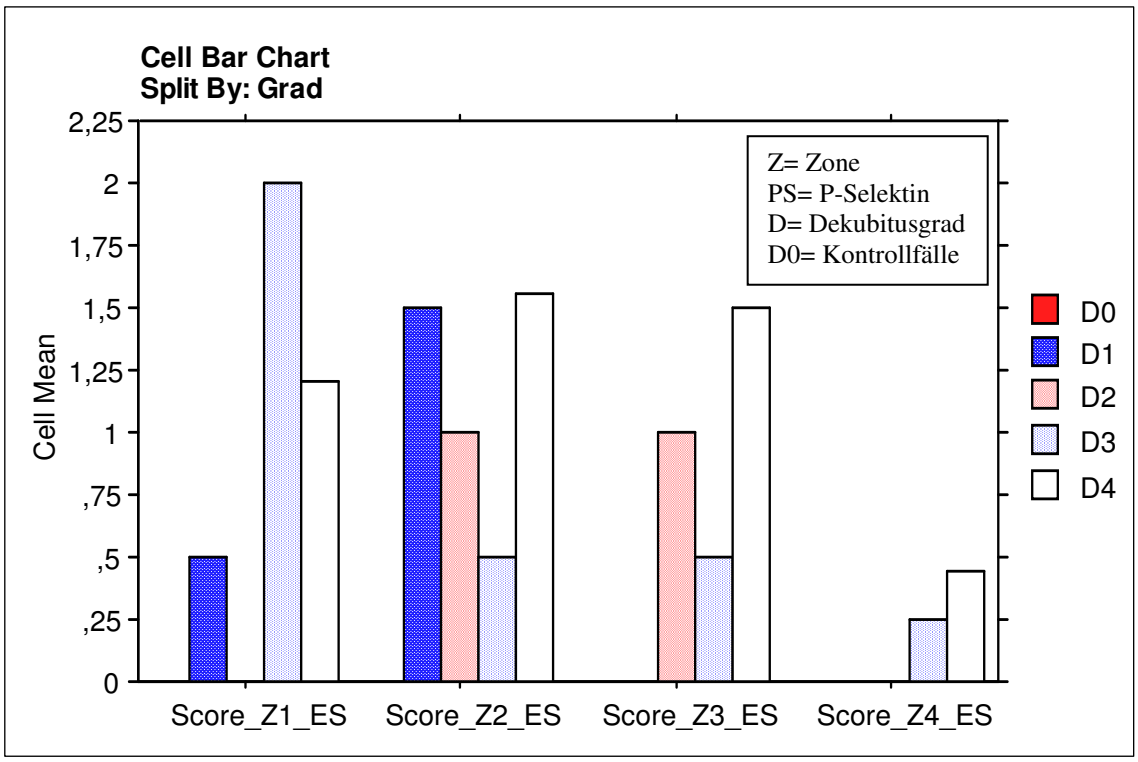

Abb. 10: Balkendiagramm zur Mittelwert- Darstellung der E-Selektin Expression nach unterschiedlicher Zone und Dekubitusgrad

4.3 Expression VCAM-1

VCAM-1 (CD106) wurde in sehr geringem Ausmaß auf Endothelzellen exprimiert.

Aus den Mittelwerten ergibt sich das Balkendiagramm, welches in Abbildung 11 dargestellt ist.

Hier zeigt sich, dass bei einem Schweregrad Dekubitus I nur in der Haut im Randbereich (Zone 3) VCAM-1 exprimiert wird (Mittelwertsscore = 1). In allen übrigen Zonen (Zone 1, Zone 2 und Zone 4) wurde VCAM-1 gar nicht exprimiert.

Bei einem Dekubitusgrad II beträgt für alle vier Zonen der Score 0.

Dekubitusgrad III zeigt in allen vier Zonen einen positiven Mittelwertsscore, die stärkste Expression ist in Zone 1 zu sehen (Mittelwertsscore 0,50).

Dekubitusgrad IV zeigt ebenfalls in allen vier Zonen einen positiven Mittelwertsscore, die stärkste Expression ist in Zone 3 zu sehen (Mittelwertsscore 0,40).

Zone/ Dekubitusschweregrad	n (%)	Median	Mittelwert	Minimum	Maximum	Standard abweichung
Score_Z1_VCAM, D1	2	0	0	0	0	0
Score_Z1_VCAM, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z1_VCAM, D3	4	0	0,50	0	2	1,00
Score_Z1_VCAM, D4	10	0	0,30	0	2	0,67
Score_Z2_VCAM, D1	2	0	0	0	0	0
Score_Z2_VCAM, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z2_VCAM, D3	4	0	0,25	0	1	0,50
Score_Z2_VCAM, D4	9	0	0,11	0	1	0,33
Score_Z3_VCAM, D1	2	1	1	0	2	1,41
Score_Z3_VCAM, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z3_VCAM, D3	4	0	0,25	0	1	0,50
Score_Z3_VCAM, D4	10	0	0,40	0	3	0,97
Score_Z4_VCAM, D1	2	0	0	0	0	0
Score_Z4_VCAM, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z4_VCAM, D3	4	0	0	0	0	0
Score_Z4_VCAM, D4	9	0	0,11	0	1	0,33
Score_Z4_VCAM, D0	32	0	0	0	0	0

Tab. 3: Expression VCAM-1 unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

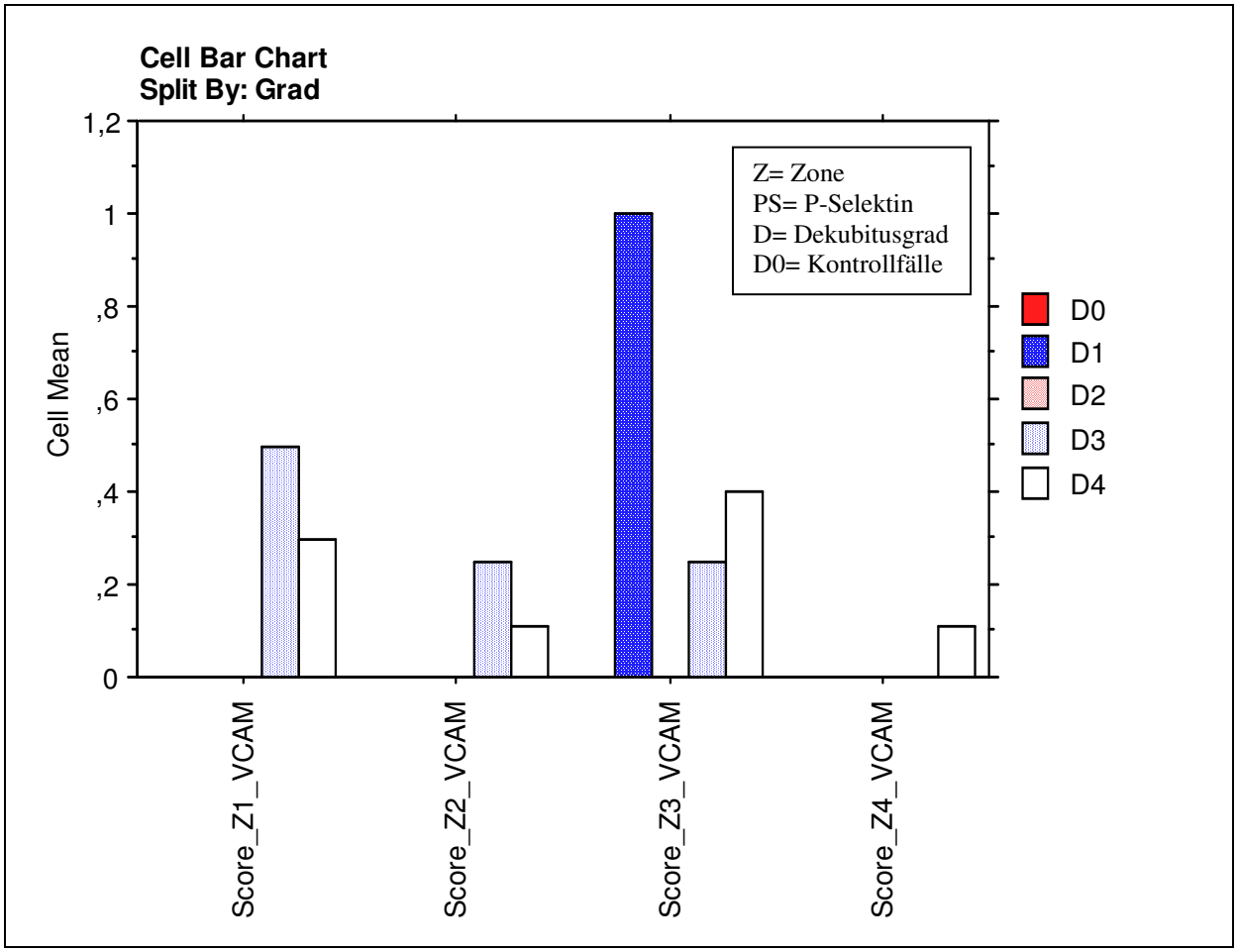

Abb. 11: Balkendiagramm zur Mittelwert- Darstellung der V-CAM Expression nach unterschiedlicher Zone und Dekubitusgrad

4.4 Expression LFA-1

LFA-1 (CD11a) wurde in unterschiedlichem Ausprägungsgrad auf Granulozyten exprimiert. Tabelle 4 beinhaltet für jede einzelne Zone jedes Dekubitusgrades den kleinsten sowie den höchsten Score (Produkt aus Farbintensität und Zellanzahl), gleiche Dekubitusgrade wurden gruppiert. Eine genaue Auflistung aller Scores jeder einzelnen Zone und jedes einzelnen Dekubitusgrades ist im Anhang (Kapitel 7.4) aufgelistet.

Aus den Mittelwerten ergibt sich das Balkendiagramm, welches in Abbildung 12 dargestellt ist.

Hier zeigt sich, dass bei einem Schweregrad Dekubitus I in der Granulationszone und der Haut im Randbereich (Zone 2 und 3) LFA-1 wesentlich stärker exprimiert wird als in der zentralen Nekrosezone (Zone 1) und im Bereich der intakten Haut (Zone 4).

Bei einem Dekubitusgrad II wurde LFA-1 sowohl in Zone 1, Zone 2 als auch in Zone 3 mit einem Mittelwertsscore = 1 exprimiert, in Zone 4 beträgt der Score 0.

Dekubitusgrad III zeigt in allen vier Zonen einen positiven Mittelwertsscore, die stärkste Expression ist in Zone 2 zu sehen (Mittelwertsscore = 2).

Dekubitusgrad IV zeigt ebenfalls in allen vier Zonen einen positiven Mittelwertsscore, die stärkste Expression ist in Zone 1 zu sehen (Mittelwertsscore = 2,50).

Zone/ Dekubitusschweregrad	n (%)	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard abweichung
Score_Z1_LFA, D1	2	0,50	0,5	0	1	0,71
Score_Z1_LFA, D2	1	1	1	1	1	•
Score_Z1_LFA, D3	4	1,25	1	0	3	1,26
Score_Z1_LFA, D4	10	2,50	2	0	6	2,07
Score_Z2_LFA, D1	2	2,50	2,5	1	4	2,12
Score_Z2_LFA, D2	1	1	1	1	1	•
Score_Z2_LFA, D3	4	2	2	1	3	0,82
Score_Z2_LFA, D4	9	1,11	1	0	3	0,93
Score_Z3_LFA, D1	2	1,50	1,5	1	2	0,71
Score_Z3_LFA, D2	1	1	1	1	1	•
Score_Z3_LFA, D3	4	1,75	2	0	3	1,50
Score_Z3_LFA, D4	10	1,00	1	0	3	0,94
Score_Z4_LFA, D1	2	0,50	0,5	0	1	0,71
Score_Z4_LFA, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z4_LFA, D3	4	0,50	0,5	0	1	0,58
Score_Z4_LFA, D4	9	0,44	0	0	1	0,53
Score_Z4_LFA, D0	32	0,16	0	0	1	0,37

Tab. 4: Expression LFA-1 unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

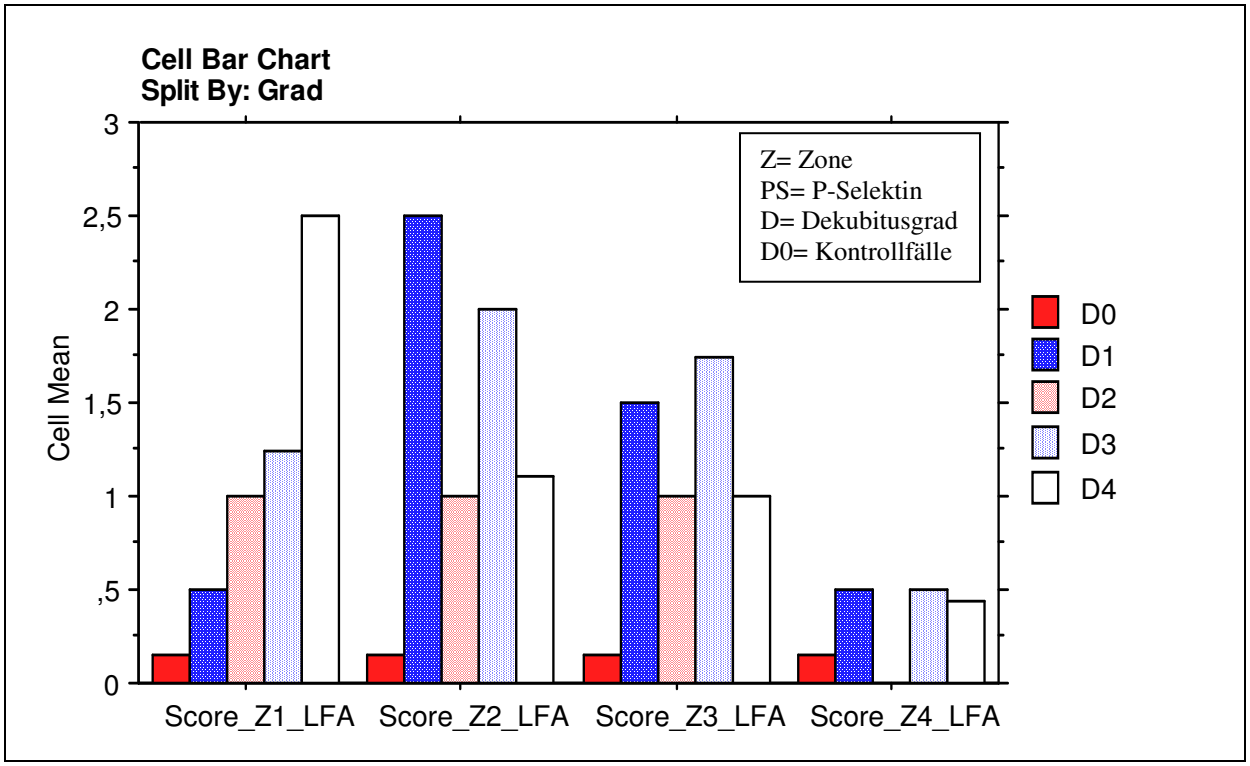

Abb. 12: Balkendiagramm zur Mittelwert- Darstellung der LFA-1 Expression nach unterschiedlicher Zone und Dekubitusgrad

4.5 Expression VLA-4

VLA-4 (CD49d) wurde in überaus geringem Ausmaß auf Endothelzellen membranös exprimiert.

Aus den Mittelwerten ergibt sich das Balkendiagramm, welches in Abbildung 13 dargestellt ist.

Hier zeigt sich, dass die Expression von VLA-4 nicht nennenswert ist.

In fünf Zonen zeigte sich der Mittelwertsscore stets ≤ 0,30, in den übrigen zwölf Zonen wurde VLA-4 nicht exprimiert.

Zone/ Dekubitusschweregrad	n (%)	Mittelwert	Median	Minimum	Maximum	Standard abweichung
Score_Z1_VLA, D1	2	0	0	0	0	0
Score_Z1_VLA, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z1_VLA, D3	4	0,25	0	0	1	0,50
Score_Z1_VLA, D4	10	0,30	0	0	1	0,48
Score_Z2_VLA, D1	2	0	0	0	0	0
Score_Z2_VLA, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z2_VLA, D3	4	0	0	0	0	0
Score_Z2_VLA, D4	9	0,22	0	0	1	0,44
Score_Z3_VLA, D1	2	0	0	0	0	0
Score_Z3_VLA, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z3_VLA, D3	4	0,25	0	0	1	0,50
Score_Z3_VLA, D4	10	0,20	0	0	1	0,42
Score_Z4_VLA, D1	2	0	0	0	0	0
Score_Z4_VLA, D2	1	0	0	0	0	•
Score_Z4_VLA, D3	4	0	0	0	0	0
Score_Z4_VLA, D4	9	0	0	0	0	0
Score_Z4_VLA, D0	32	0	0	0	0	0

Tab. 5: Expression VLA-4 unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

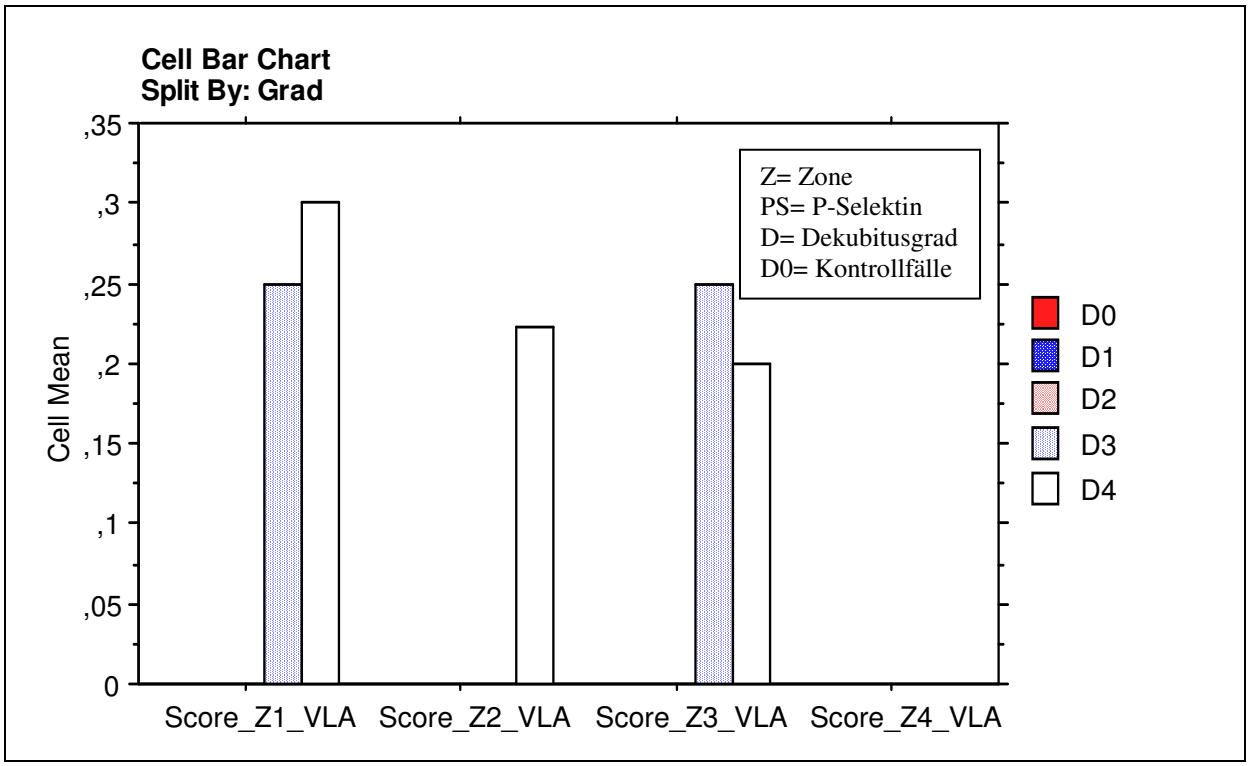

Abb. 13: Balkendiagramm zur Mittelwert- Darstellung der VLA-4 Expression nach unterschiedlicher Zone und Dekubitusgrad

4.6 Vergleich der untersuchten Antikörper

Die anschließende Darstellung und Beschreibung der Ergebnisse bezieht sich auf die Expression der unterschiedlichen Antigene (CD62p für P-Selektin, CD62e für E-Selektin, CD106 für VCAM-1, CD11a für LFA-1 und CD49d für VLA-4) innerhalb gleicher Dekubitusgrade bezogen auf die jeweiligen Kontrollfälle.

Das Färbeergebnis wurde auf Grundlage des oben erklärten Scores (siehe auch Kapitel 3.5. Immunhistochemie) als positiv oder negativ bewertet. Die Höhe des Scores wurde nicht berücksichtigt. Die absoluten Zahlen werden im Anhang aufgeführt. Da nur ein Fall eines zweitgradigen Dekubitus vorliegt, wird dieser nur für P-Selektin aufgelistet.

4.6.1 P-Selektin

Die Dekubitusfälle (n = 17) innerhalb eines Grades wurden zusammen mit der Kontrollgruppe untersucht.

Es lagen zwei Fälle eines Dekubitus ersten Grades, ein Fall eines Dekubitus zweiten Grades, vier Fälle eines drittgradigen Dekubitus sowie zehn Fälle eines Dekubitus vierten Grades vor.

Anschließend ist das Ergebnis jeder einzelnen Zone der jeweiligen Dekubitusgrade mit dem Ergebnis der Kontrollgruppe in Beziehung gesetzt worden und die statistische Relevanz mittels Fisher`s Exact Test ermittelt worden.

4.6.1.1 Dekubitusgrad I

In der zentralen Nekrosezone (Zone 1) lag sowohl ein positiver als auch ein negativer Befund vor, in der Granulationszone (Zone 2) zeigten sich beide Fälle positiv, in dem Hautbezirk im Randbereich (Zone 3) jeweils ein positiver und ein negativer Befund und in der intakten Haut (Zone 4) zeigten sich beide Fälle negativ. In der Kontrollgruppe wiesen sechs Fälle einen positiven Befund auf und sechsundzwanzig einen negativen.

Somit ergibt sich für die Zone 2 eine statistische Signifikanz ($p = 0.0499$).

Eine schematische Übersicht ist in Abbildung 14 wiedergegeben.

4.6.1.2 Dekubitusgrad II

In der zentralen Nekrosezone (Zone 1) lag ein negativer Befund vor, in der Granulationszone (Zone 2), in dem Hautbezirk im Randbereich (Zone 3) und in der intakten Haut (Zone 4) zeigten sich jeweils ein positiver Befund. In der Kontrollgruppe wiesen sechs Fälle einen positiven Befund auf und sechsundzwanzig einen negativen.

Es ergibt sich für keines der Fälle eine statistische Signifikanz.
Eine schematische Übersicht mittels Kreisdiagrammen ist in Abbildung 14 wiedergegeben.

4.6.1.3 Dekubitusgrad III

In Zone 1 wiesen alle vier Fälle einen positiven Befund auf, in Zone 2 und 3 zeigten sich drei Fälle positiv und in Zone 4 zeigte das Ergebnis zwei positive und zwei negative Befunde. Für die Kontrollgruppe zeigte sich der gleiche Befund wie oben im Text bereits beschrieben.
Somit ergibt sich für Zone 1 eine statistische Signifikanz ($p = 0{,}0036$) und für die Zonen 2 und 3 ebenfalls ($p = 0{,}0406$).
Eine Übersicht liefert Abbildung 14.

4.6.1.4 Dekubitusgrad IV

In Zone 1 (zentrale Nekrosezone) wiesen sechs Fälle einen positiven Befund auf, ebenso wie in Zone 3 (Haut im Randbereich), in Zone 2 (Granulationszone) zeigten sich vier Fälle positiv und in Zone 4 (intakte Haut) nur einer. Für die Expression von P-Selektin in Zone 1 und 2 in Korrelation mit der Kontrollgruppe ließ sich mittels Fisher`s exact Test eine statistische Signifikanz ermitteln ($p = 0{,}0195$).
Eine Übersicht der Ergebnisse liefert Abbildung 14.

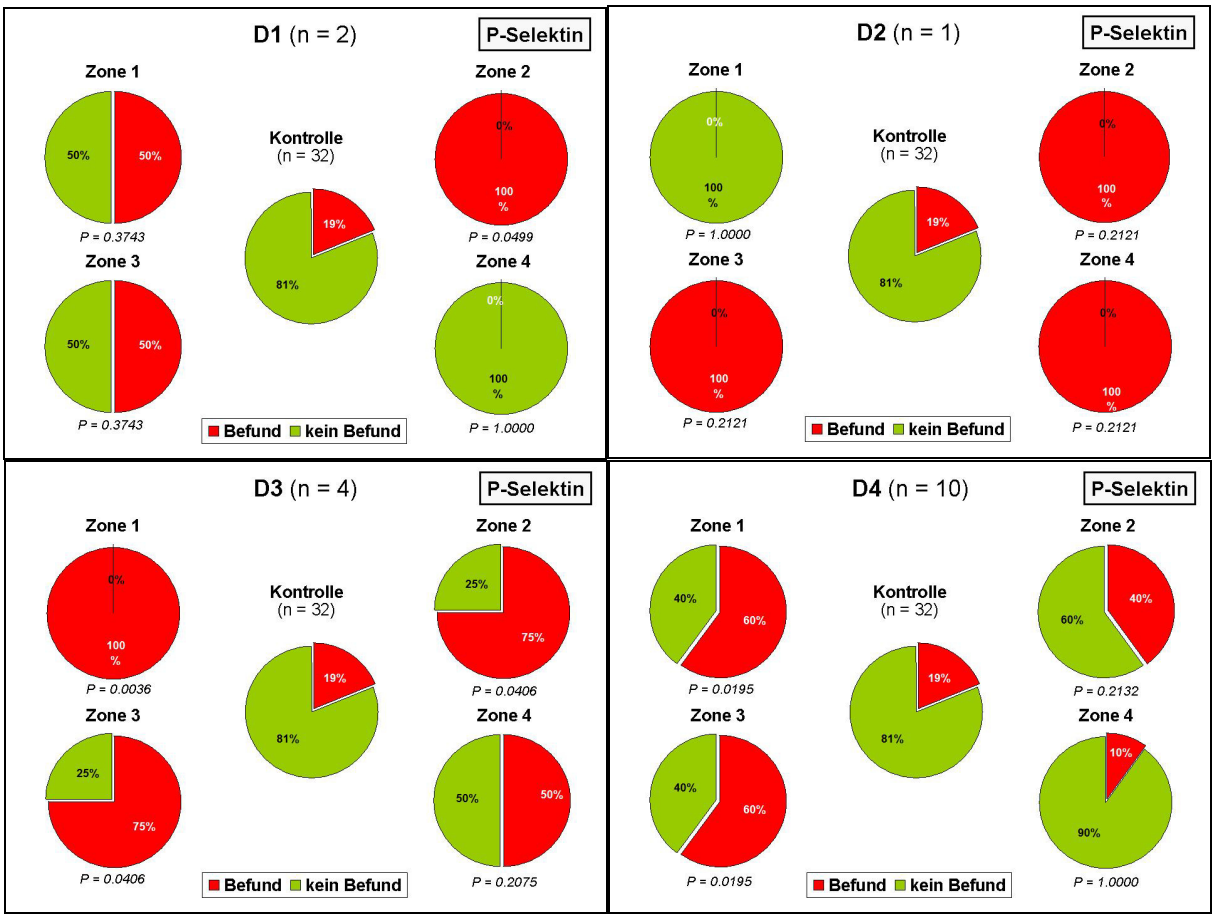

Abb. 14: Expression P-Selektin Dekubitus I - IV und Kontrollfälle

4.6.2 E-Selektin

Es lagen insgesamt zwei Fälle eines Dekubitus ersten Grades vor, vier Fälle eines drittgradigen Dekubitus und zehn Fälle eines viertgradigen Dekubitus, die zusammen mit der Kontrollgruppe (n = 32) untersucht wurden. Dekubitusgrad II wurde aufgrund der nicht vorhandenen Aussagekraft nicht dargestellt. Anschließend ist das Ergebnis jeder einzelnen Zone mit dem Ergebnis der Kontrollgruppe in Beziehung gesetzt worden und die statistische Relevanz mittels Fisher`s Exact Test ermittelt worden.

4.6.2.1 Dekubitusgrad I

In der zentralen Nekrosezone (Zone 1) lagen sowohl ein positiver als auch ein negativer Befund vor, ebenso in der Granulationszone (Zone 2). In dem Hautbezirk im Randbereich (Zone 3) sowie in der intakten Haut (Zone 4) zeigten sich beide Fälle negativ. In der Kontrollgruppe wiesen alle zweiunddreißig Fälle einen negativen Befund auf.
Es ergibt sich für keinen der untersuchten Korrelationen eine statistische Signifikanz.

4.6.2.2 Dekubitusgrad III

In Zone 1 wiesen alle zwei Fälle einen positiven und zwei einen negativen Befund auf, in Zone 2, 3 und 4 zeigten sich drei Fälle negativ und ein Fall positiv. In der Kontrollgruppe zeigte sich in allen Fällen ein negativer Befund.
Somit ergibt sich für Zone 1 eine signifikant höhere Expression von E-Selektin bezogen auf die Kontrollgruppe ($p = 0,0095$).
Eine Übersicht liefert Abbildung 15.

4.6.2.3 Dekubitsusgrad IV

Sowohl in der zentralen Nekrosezone (Zone 1) als auch in dem Randbereich (Zone 3) zeigten sich sechs Fälle positiv, in der Granulationszone (Zone 2) wiesen vier Fälle einen positiven Befund auf und in dem intakten Hautbereich (Zone 4) zeigten sich drei Fälle positiv. In der Kontrollgruppe wiesen alle zweiunddreißig Fälle einen negativen Befund auf.
Somit ergibt sich für die Expression von E-Selektin in Zone 1 und 3 in Korrelation mit der Kontrollgruppe eine statistische Signifikanz ($p < 0,0001$), ebenso für Zone 2 ($p = 0,0019$) und für Zone 4 bezogen auf die Kontrollgruppe ($p = 0,0105$).
Eine Übersicht liefert Abbildung 15.

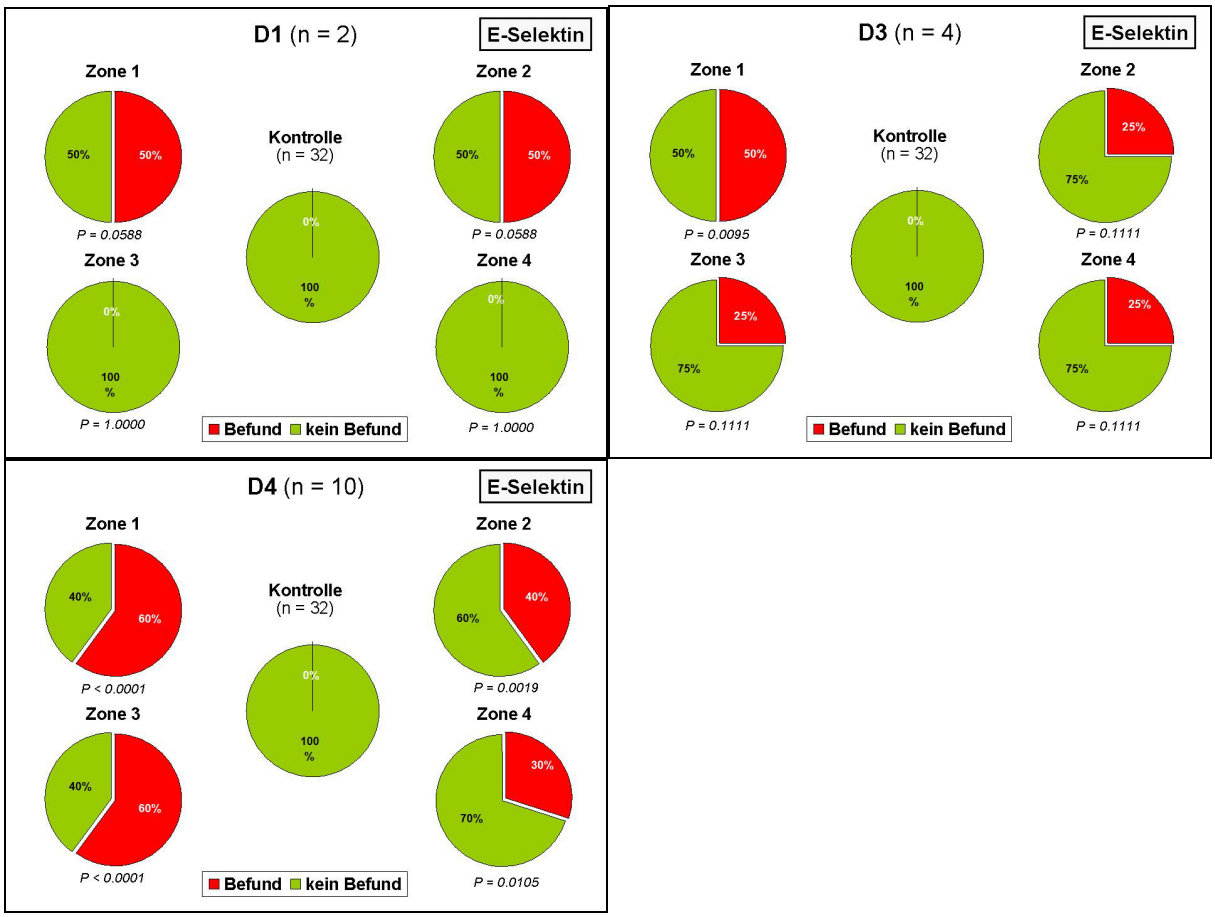

Abb. 15: Expression E-Selektin Dekubitus I, III, IV und Kontrollfälle

4.6.3 VCAM-1

Zwei Fälle eines erstgradigen Dekubitus, vier Fälle eines drittgradigen Dekubitus und zehn Fälle eines viertgradigen Dekubitus, die zusammen mit der Kontrollgruppe (n = 32) untersucht wurden. Dekubitusgrad II wurde aufgrund der nicht vorhandenen Aussagekraft nicht dargestellt.

4.6.3.1 Dekubitusgrad I

In der zentralen Nekrosezone (Zone 1), in der Granulationszone (Zone 2) und in dem Bereich der intakten Haut (Zone 4) zeigten sich beide Fälle negativ. Bei der Haut im Randbereich (Zone 3) wies ein Fall einen negativen und ein Fall einen positiven Befund auf. In der Kontrollgruppe wiesen alle zweiunddreißig Fälle einen negativen Befund auf.
Es ergibt sich für keinen der Vergleiche eine statistische Signifikanz.
Eine Übersicht ist in Abbildung 16 wiedergegeben.

4.6.3.2 Dekubitusgrad III

Bei vier Fällen eines Dekubitus dritten Grades zeigten sich bei der Anfärbung mit VCAM-1 in Zone 1, 2 und 3 jeweils ein positiver Befund. In Zone 4 und bei den Kontrollfällen zeigten sich alle Befunde negativ.
Somit ergibt sich für keinen der Fälle eine statistische Signifikanz.
Abbildung 16 zeigt eine Übersicht.

4.6.3.3 Dekubitusgrad IV

In Zone 1 und 3 zeigten sich jeweils zwei Befunde positiv, in Zone 2 und 4 jeweils ein Befund. In den Kontrollfällen wie oben schon beschrieben zeigten sich alle Befunde negativ. Auch hier ergibt sich keine statistische Signifikanz.

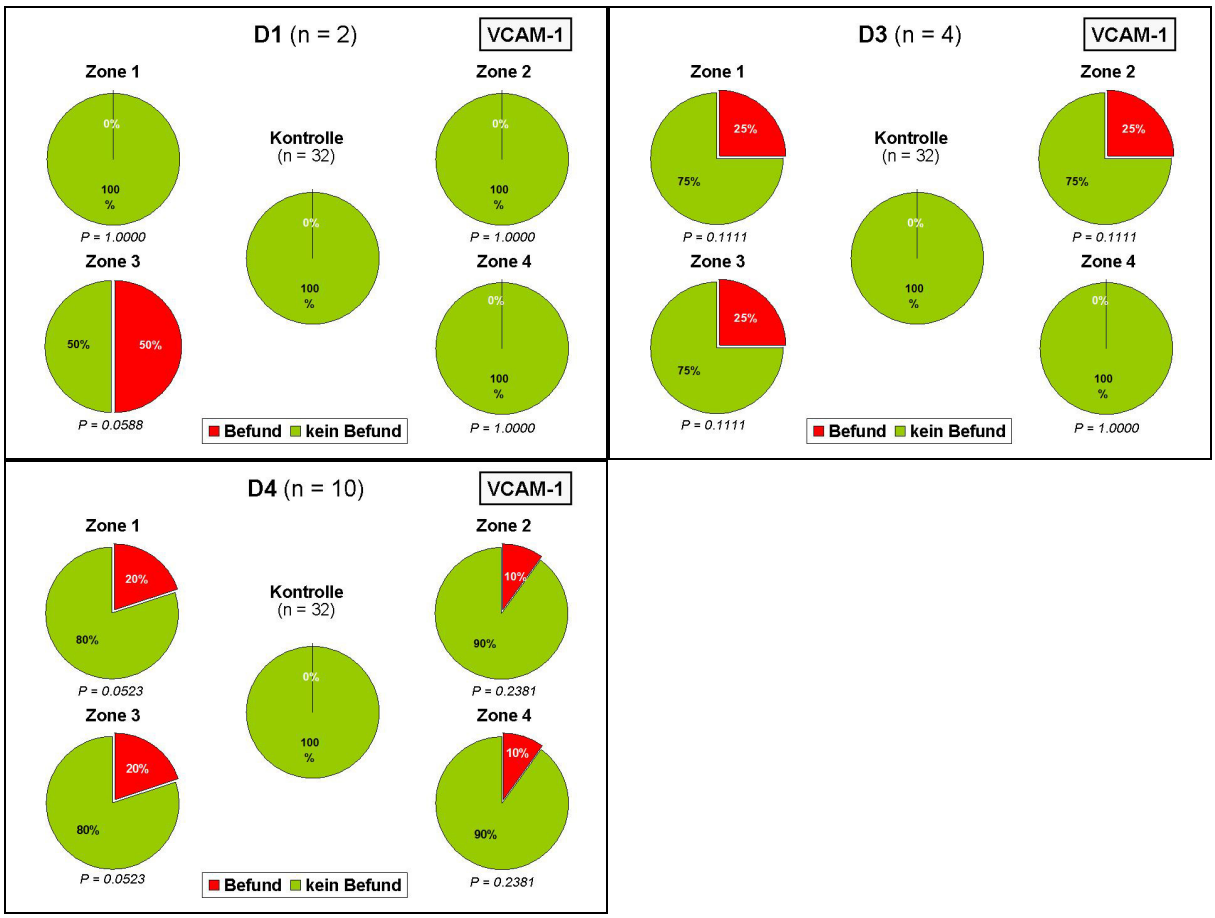

Abb. 16: Expression VCAM-1 Dekubitus I, II, III und Kontrollfälle

4.6.4 LFA-1

Zwei Fälle eines erstgradigen Dekubitus, vier Fälle eines Dekubitus dritten Grades, zehn Fälle eines Dekubitus vierten Grades sowie zweiunddreißig Kontrollfälle wurden hinsichtlich der Expression von CD11a (LFA-1) untersucht.

4.6.4.1 Dekubitusgrad I

Hier zeigen sich in der zentralen Nekrosezone und im Bereich der intakten Haut einer von zwei Befunden positiv. Die Granulationszone sowie die Haut im Randbereich zeigten jeweils beide Fälle positiv. In der Kontrollgruppe wiesen fünf Fälle einen positiven Befund auf.
Somit ergibt sich für die beiden letztgenannten Zonen (Zone 2 und 3) in Korrelation mit der Kontrollgruppe eine statistische Signifikanz ($p = 0,0374$).
Eine Übersicht ist in Abbildung 17 wiedergegeben.

4.6.4.2 Dekubitusgrad III

In Zone 1 und Zone 3 zeigten sich jeweils einer von vier Fällen positiv, in Zone 2 wiesen alle vier Fälle einen positiven Befund auf und in Zone 4 zeigten sich zwei Fälle positiv. In der Kontrollgruppe zeigten sich fünf von zweiunddreißig Fällen positiv.
Für die Zone 1 und 3 bezogen auf die Kontrollgruppe ergibt sich somit eine statistische Signifikanz von $p = 0,0278$ und für Zone 2 $p = 0,0021$.
Eine Übersicht stellt Abbildung 17 dar.

4.6.4.3 Dekubitusgrad IV

In Zone 1 (zentrale Nekrosezone) wiesen neun Fälle einen positiven Befund auf. In Zone 2 (Granulationszone) und in Zone 3 (Haut im Randbereich) zeigten sich sieben Fälle positiv und in Zone 4 (intakte Haut) vier Fälle. Die Kontrollgruppe wies wie oben bereits beschrieben fünf positive Befunde auf.
Für die Befunde in Zone 1 ließ sich mittels Fisher`s exact Test eine statistische Signifikanz von $p < 0,0001$ ermitteln. Für die Zonen 2 und 3 ergab sich $p = 0,0023$.
Eine Übersicht der Ergebnisse liefert Abbildung 17.

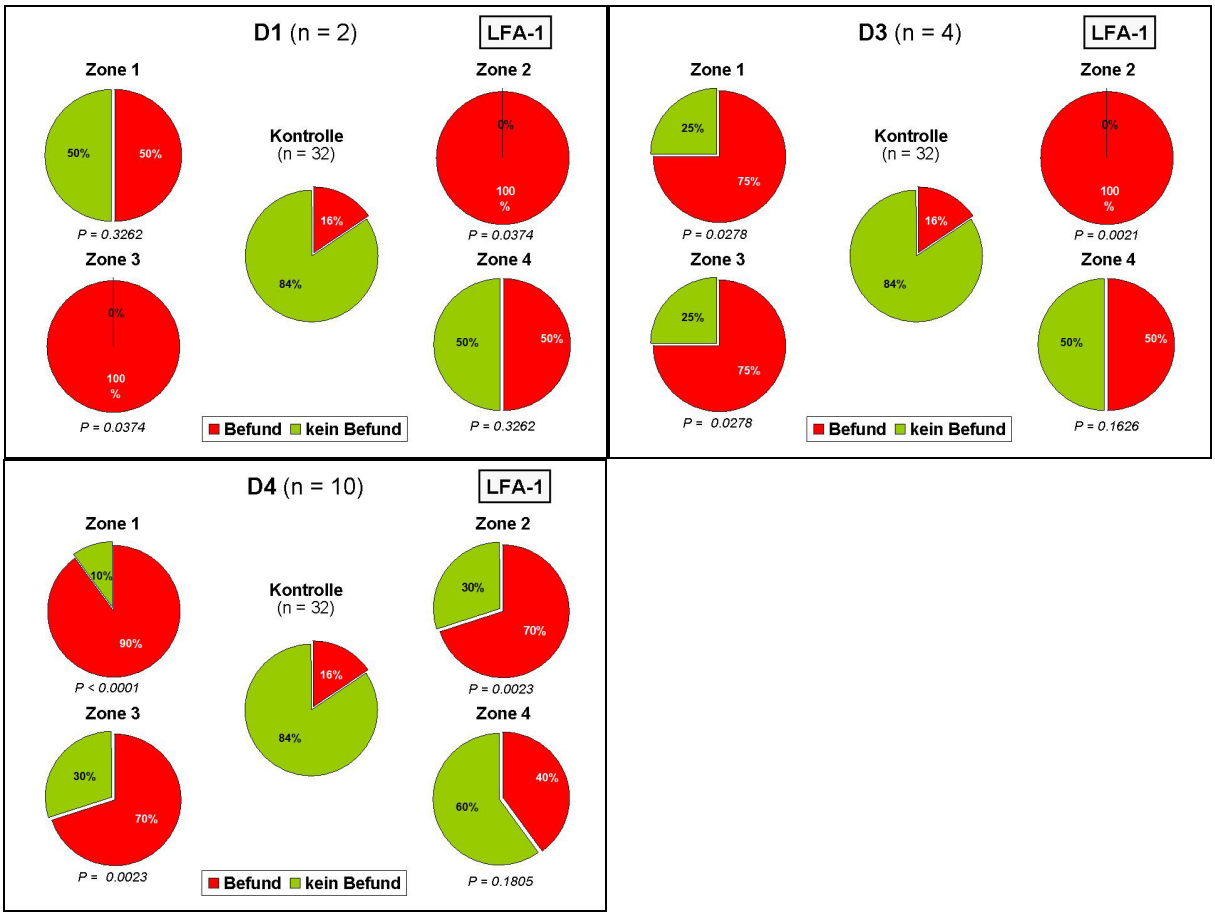

Abb. 17: Expression LFA-1 Dekubitus I, III, IV und Kontrollfälle

4.6.5 VLA-4

4.6.5.1 Dekubitusgrad I

Für beide Fälle der erstgradigen Dekubiti ließ sich in keiner der Zonen einen positiven Befund nachweisen. Ebenso zeigten alle Fälle der Kontrollgruppe einen negativen Befund.

4.6.5.2 Dekubitusgrad III

Bei der Untersuchung der vier Dekubitusfälle dritten Grades und der zweiunddreißig Kontrollfälle zeigte sich hinsichtlich der Expression von VLA-4 in der zentralen Nekrosezone (Zone 1) und der Haut im Randbereich (Zone 3) jeweils ein Befund positiv. In der Granulationszone (Zone 2), der intakten Haut (Zone 4) und in den Kontrollfällen wiesen alle untersuchten Fälle einen negativen Befund auf.

Somit ließ sich mittels Fisher`s exact Test für keinen der Korrelate eine statistische Signifikanz errechnen.

Eine Übersicht ergibt Abbildung 18.

4.6.5.3 Dekubitusgrad IV

Erneut wurden zehn Fälle eines viertgradigen Dekubitus mit zweiunddreißig Kontrollfällen untersucht und statistisch verglichen. In Zone 1 zeigten sich drei positive Befunde, in Zone 2 und 3 jeweils zwei Befunde. In Zone 4 sowie in den Kontrollfällen zeigten sich alle Befunde negativ.

Somit ergibt sich keine statistische Signifikanz.

Eine Übersicht findet sich in Abbildung 18.

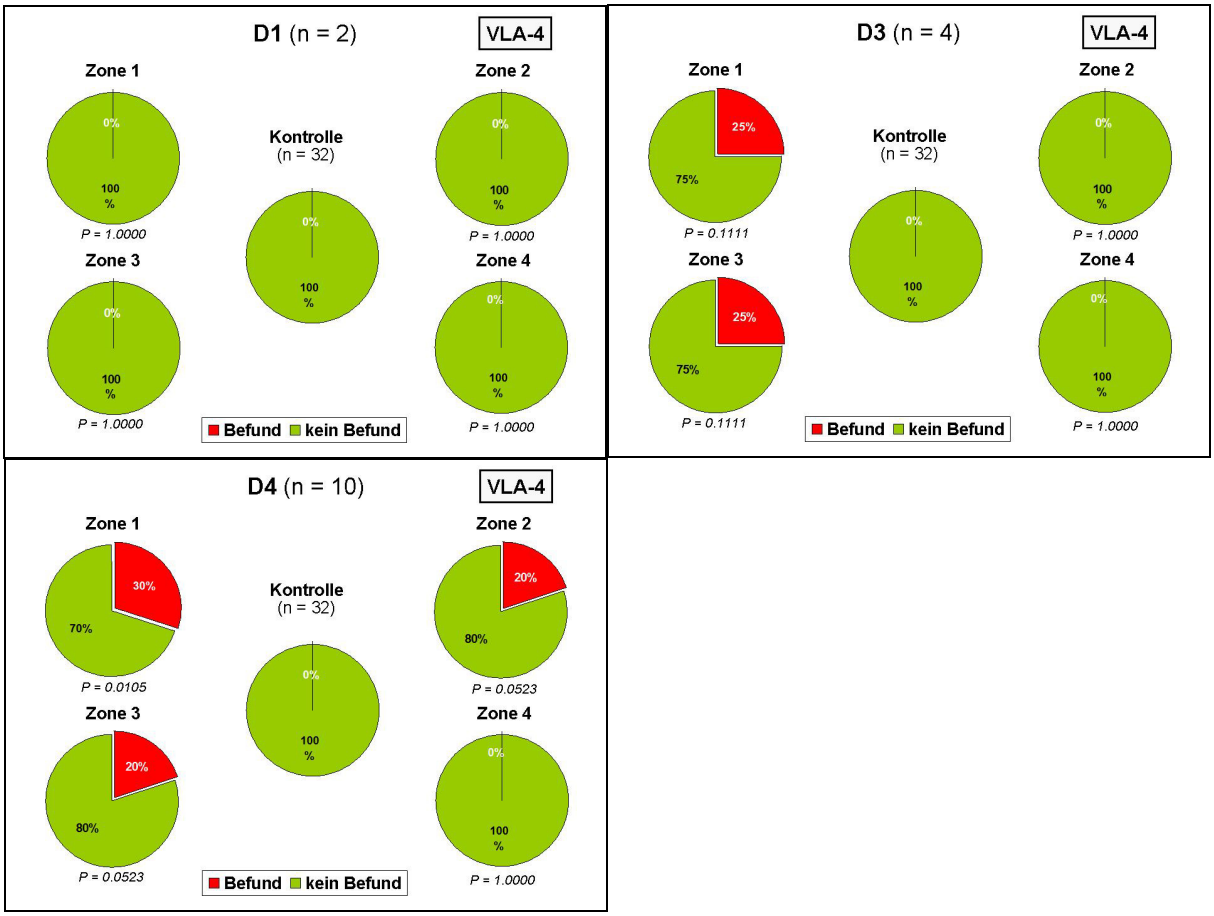

Abb. 18: Expression VLA-4 Dekubitus I, III, IV und Kontrollfälle

4.6.6 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist festzustellen, dass bei der Expression der Antigene CD62p für P-Selektin und CD11a für LFA-1 in 14 Arealen (sechs für P-Selektin, acht für LFA-1) von vierundzwanzig eine signifikante Überexpression im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollfällen zu beobachten ist ($p<0.05$). Für E-Selektin sind es immerhin fünf von zwölf ($p>0.05$). Für VLA-4 und VCAM-1 lag praktisch keine Expression vor.
Da für den zweitgradigen Dekubitus nur ein einziger Fall vorlag, wurde dieser nicht berücksichtigt.

4.7 Subanalyse der klinisch relevanten Dekubitusgrade III und IV

In diesem Kapitel werden die Färbegrade sowie die Anzahl der angefärbten Zellen in Beziehung zu den verschiedenen Zonen der Dekubitusgrade III und IV graphisch mittels Säulendiagrammen dargestellt. Grundlage der Darstellung sind die bereits im Kapitel 3.5. beschriebenen Messwerte (nicht angefärbt = 0, schwach angefärbt = 1, stark angefärbt = 2; Anzahl der angefärbten Zellen <50% = 1, 50%-70% = 2, >70% = 3). Es werden die am stärksten exprimierten Antigene (CD62p für P-Selektin, CD62e für E-Selektin und CD11a für LFA-1) aufgezeigt.

4.7.1 Dekubitus III

4.7.1.1 Farbintensität

Für P-Selektin lag in Zone 1 bei vier Fällen eine Farbintensität von 1 vor. In Zone 2 und 3 zeigte sich jeweils bei einem Patienten eine Farbintensität der angefärbten Zellen von 0, bei drei Fällen eine Intensität von 1. In Zone 4 weisen zwei Patienten eine Farbintensität von 0, zwei von 1.
Für E-Selektin zeigte sich in Zone 1 bei 2 Fällen eine Intensität von 0 und bei den anderen beiden Fällen eine Intensität von 2. In Zone 2 zeigten sich bei drei Fällen eine 0, bei einem Fall eine Intensität von 2. Zone 3 und wiesen eine gleiche Intensität auf: drei Fälle wiesen ein 0 auf, ein Fall eine 1.
Für LFA-1 zeigte sich in der ersten Zone bei einem Patienten eine Farbintensität von 0 und bei dreien eine Intensität von 1. In Zone 2 zeigten alle vier Fälle eine Farbintensität von 1. In Zone 3 verhält sich die Intensität genau wie in Zone 1. In Zone 4 zeigen zwei Fälle eine Farbintensität von 0, zwei eine 1.
Eine Darstellung gibt Abbildung 19.

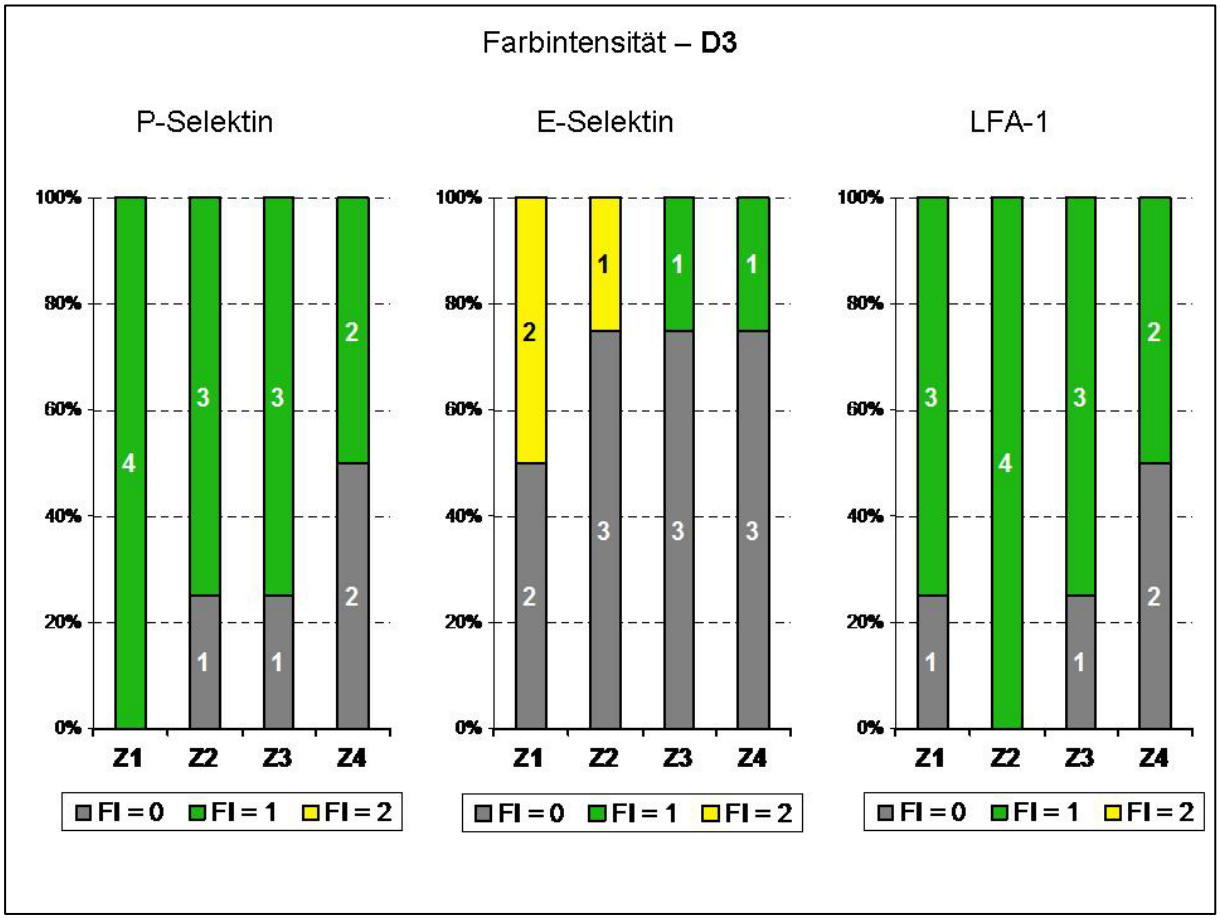

Abb. 19: Farbintensität für Dekubitusgrad III

4.7.1.2 Häufigkeit angefärbter Zellen

Für P-Selektin lag die Häufigkeit angefärbter Zellen in Zone 1 bei einem Fall <50%, bei zwei Fällen 50-70% und bei einem Fall >70%. In Zone 2 zeigte sich bei drei Fällen eine Häufigkeit der angefärbten Zellen von <50%, bei einem Fall eine Häufigkeit von 50-70%. In Zone 3 ließ sich für P-Selektin bei jeweils zwei Fällen eine Häufigkeit von <50% bzw. 50-70% darstellen. In Zone 4 wiesen alle vier Fälle eine Häufigkeit der angefärbten Zellen <50% auf.

Für E-Selektin wiesen in Zone 1 jeweils zwei Fälle eine Häufigkeit <50% und 50-70% auf. In Zone 2 zeigten alle vier Fälle eine Häufigkeit der angefärbten Zellen von <50%. In Zone 3 sind drei Fälle mit einer Häufigkeit <50% und ein Fall mit einer Häufigkeit 50-70% zu vermerken. Zone 4 verhält sich wie Zone 2.

Für LFA-1 lag in der Zone 1 die Häufigkeit angefärbter Zellen bei 2 Fällen <50% und bei 2 Fällen >70%. In der Zone 2 waren dagegen bei einem Fall weniger als 50% der Zellen angefärbt, bei zwei Fällen waren 50-70% aller Zellen angefärbt und bei einem Fall waren es mehr als 70%. Zone 4 verhält sich genau wie Zone 4 für P- und E-Selektin: alle vier Fälle zeigen eine Anzahl gefärbter Zellen von weniger als 50%.
Eine Darstellung gibt Abbildung 20.

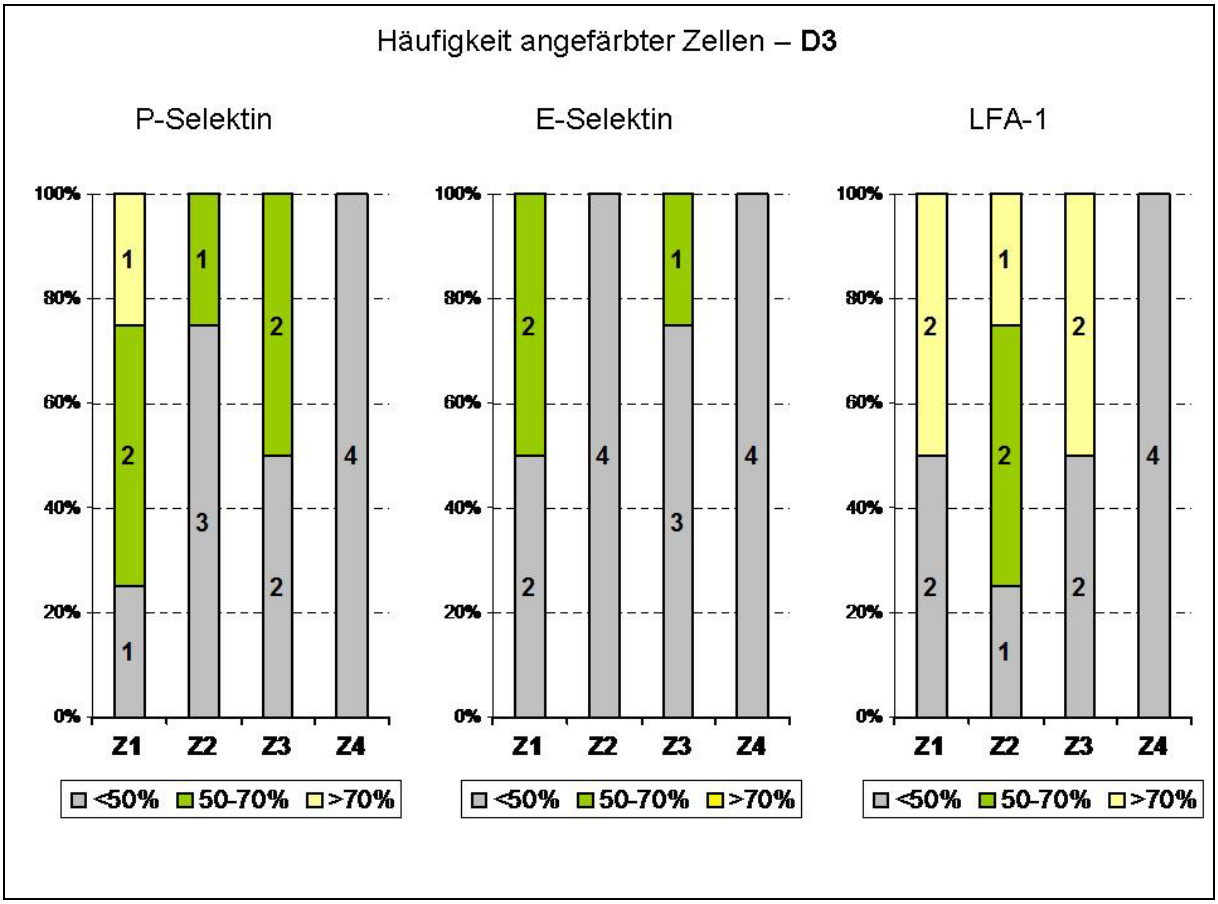

Abb. 20: Häufigkeit angefärbter Zellen für Dekubitusgrad III

4.7.2 Dekubitus IV

4.7.2.1 Farbintensität

Für P-Selektin lag in Zone 1 lag bei vier Fällen eine Farbintensität von 0, bei zweien eine Farbintensität von 1 und bei vier Fällen eine Intensität von 2 vor. In Zone 2 zeigte sich für P-Selektin bei fünf Fällen eine Farbintensität der angefärbten Zellen von 0, bei vier Fällen eine Intensität von 1. In Zone 3 ließ sich für sechs Fälle eine Intensität von 1 darstellen, die restlichen vier Fälle zeigten eine 0. In Zone 4 herrscht bei acht Fällen für P-Selektin eine Farbintensität von 0, in einem Fall eine 1.

Für E-Selektin zeigten vier Fälle eine Intensität von 0, vier Fälle eine 1 und zwei Fälle eine 2 in Zone 1. In Zone 2 zeigten sich bei fünf Fällen eine 0, bei zwei Fällen eine Intensität von 1 und bei zwei Fällen eine 2. In Zone 3 zeigten sich jeweils vier Fälle mit einer Intensität von 0 bzw. 1 und die übrigen beiden Fälle wiesen eine 2 auf. In Zone 4 zeigten sich für E-Selektin sechs Fälle mit einer Intensität von 0 zwei Fälle mit einer Intensität von 1 und ein Fall mit einer 2.

Für LFA-1 zeigte nur ein Fall in Zone 1 eine Farbintensität von 0, sieben Fälle wiesen eine 1 auf und zwei Fälle eine 2. In Zone 2 zeigten zwei Fälle eine Farbintensität von 0 und die restlichen sieben Fälle eine Intensität von 1. In Zone 3 zeigten sieben Fälle eine 1 auf, drei Fälle eine 0. In Zone vier zeigten nur noch vier Fälle eine Intensität von 1 auf, die restlichen fünf Fälle wiesen eine 0 auf.

Eine Darstellung gibt Abbildung 21.

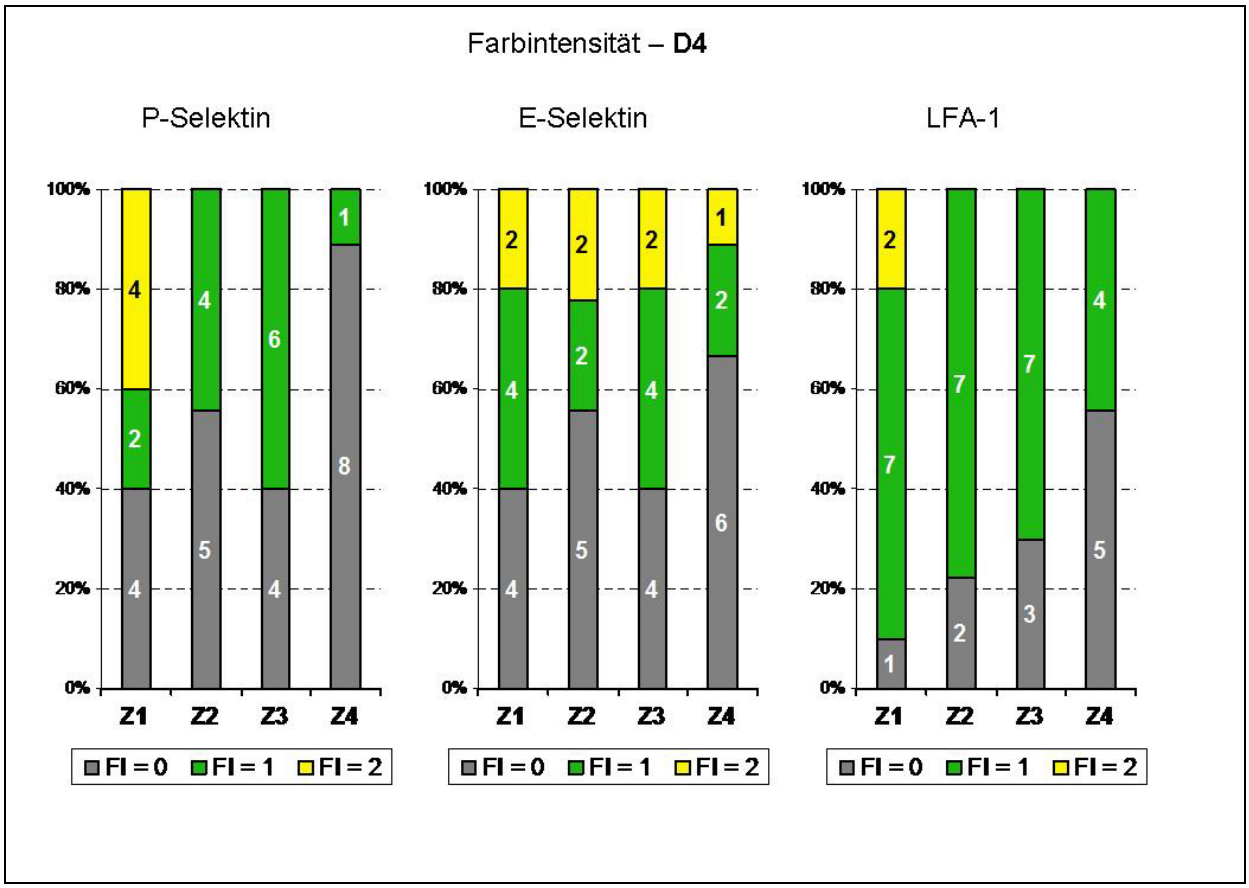

Abb. 21: Farbintensität für Dekubitusgrad IV

4.7.2.2 Häufigkeit angefärbter Zellen

Für P-Selektin zeigte sich bei sechs Fällen eine Häufigkeit angefärbter Zellen <50%, bei zwei Fällen eine Häufigkeit von 50-70% und bei den restlichen zweien eine Häufigkeit von mehr als 70%. In Zone 2 zeigte sich bei allen neun Fällen weniger als 50% der Zellen angefärbt. In Zone 3 waren sieben Fälle weniger als 50% der Zellen angefärbt, zwei Fälle 50-70% und in einem Fall zeigten sich über 70% der Zellen angefärbt. In Zone vier zeigten sich nur in einem Fall 50-70% angefärbt, in allen übrigen Fällen weniger als 50%.

Für E-Selektin zeigten sich in Zone 1 in sieben Fällen eine Anfärbbarkeit der Zellen von weniger als 50%, in drei Fällen von 50-70%. Auch in Zone 2 zeigten sich in sieben Fällen weniger als 50% angefärbt, in zwei Fällen 50-70%. In Zone 3 waren sieben Fälle weniger als 50% der Zellen angefärbt, zwei Fälle 50-70% und in einem Fall zeigten sich über 70% der Zellen angefärbt. In Zone 4 waren in allen neun Fällen weniger als 50% der Zellen angefärbt.

Für LFA-1 zeigte sich bei vier Fällen eine Häufigkeit angefärbter Zellen <50%, bei zwei Fällen eine Häufigkeit von 50-70% und bei den restlichen vieren eine Häufigkeit von mehr als 70%. In Zone 2 und 3 zeigte sich jeweils ein Fall mit über 70% der Zellen angefärbt, jeweils ein weiterer Fall mit 50-70% angefärbt und die übrigen sieben bzw. acht Fälle mit weniger als 50% der Zellen angefärbt. In Zone 4 waren in allen neun Fällen weniger als 50% der Zellen angefärbt.

Eine Darstellung gibt Abbildung 22.

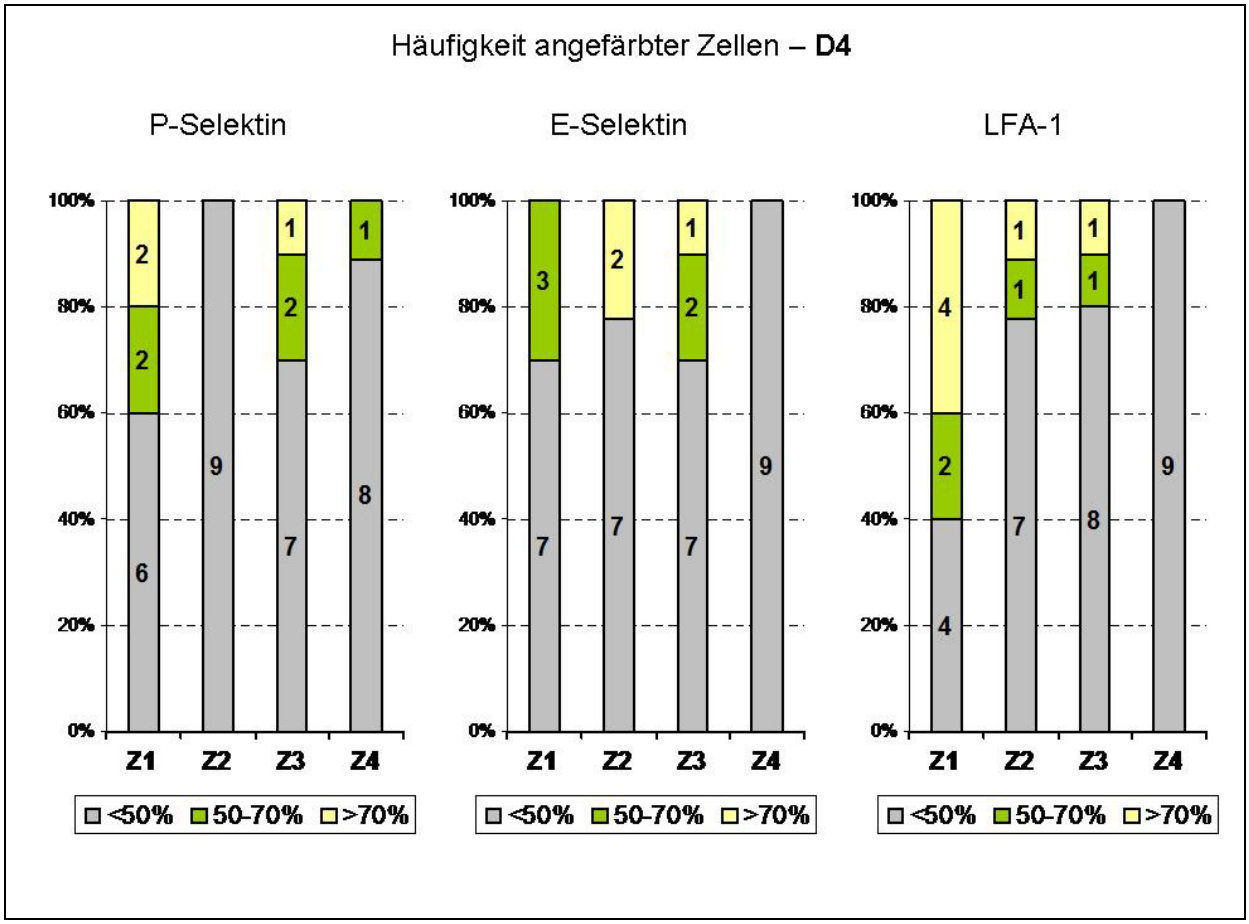

Abb. 22: Häufigkeit angefärbter Zellen für Dekubitusgrad IV

4.7.3 Zusammenfassung

Zusammenfassend ist bei dem Vergleich der Farbintensität und Anzahl der angefärbten Zellen bei der Expression der Antikörper P-Selektin, E-Selektin und LFA-1 im Dekubitusgrad III und IV zu bemerken, dass die Farbintensität mit der Dekubituszone, also zentral versus peripher korreliert: Je zentraler das untersuchende Gewebe, desto höher die Farbintensität und auch Anzahl der angefärbten Zellen.

5 Diskussion

Eine besondere Rolle der so genannten „Entzündungsphase“, kommt den leukozytären und endothelialen Adhäsionsmolekülen zu. Diese Adhäsionsmoleküle aus der Gruppe der Selektin-, Integrin- und der Immunglobulin-Superfamilie vermitteln über Chemokine die Ausbildung einer Lymphozytenadhärenz an das Endothel und eine Transmigration (Diapedese) durch die Endothelwand im Rahmen der Leukozyten-Endothel-Interaktion. [18] [11,12,14] Bislang liegen für die Dekubituswunde bezüglich der Gewebe-Expression leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle, also der Frühphase der Wundheilung, keine gesicherten Erkenntnisse vor. Daher wurde in der vorliegenden Studie dieser Mechanismus erstmalig an unterschiedlichen Dekubitus-Geweben Graden (I-IV) und nach topographischer Zuordnung zu den unterschiedlichen Wundzonen [zentrale Nekrosezone (Z1); Granulationszone (Z2); Randbereich (Z3); intakte Haut (Z4)] anhand des neuartigen, molekulargenetischen Expressionsverfahrens, dem Tissue Micro Array (TMA), untersucht. Bei den untersuchten Markern handelt es sich um P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1 und VLA-4.

Grundsätzlich zeigen die Ergebnisse unserer Arbeit, dass, mit Ausnahme von VLA-4, eine (Über-) Expression der untersuchten Entzündungsmarker (P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1) auch in Dekubitusendothel bzw. in an der Entzündungsreaktion beteiligten Zellen (Thrombozyten, Granulozyten) stattfindet. Somit lässt sich feststellen, dass die initialen molekularen Mechanismen der „Entzündungsphase“ der Wundheilung auf Ebene der Leukozyten-Endothel-Interaktion auch in Dekubituswunden stattfinden (Tabellen 1 - 4, Abbildungen 14 - 18). Hierbei weisen die einzelnen Marker jedoch ein unterschiedliches Expressionsmuster in Bezug auf 1.) den Dekubitusgrad und 2.) die topographische Zone des Dekubitus auf. Das bedeutet wiederum, dass sich anhand unserer Ergebnisse kein Markerexpressionsmuster zu den einzelnen Graden oder der Topographie vorhersagen lässt (Abbildungen 9 - 13). Zusätzlich ist wichtig anzumerken, dass bislang keine vergleichenden TMA-gewebe-basierte Untersuchung von Dekubitalulcera durchgeführt wurde. Vielmehr orientiert sich die aktuelle Literatur eher an molekulargenetischer Wundexsudat-Untersuchung. [38] [39] Daher sind die Ergebnisse der vorliegenden Dissertationsarbeit als „proof-of-principle“- Studie zu werten, da das hier untersuchte Patientenkollektiv aufgrund der geringen Fallzahl keine endgültigen Aussagen zulässt.

5.1 P-Selektin Expression (CD62p) und E-Selektin Expression (CD62e)

P-Selektin (CD62p) wurde in Endothelzellen, Thrombozyten und Granulozyten gleichermaßen nukleär und cytoplasmatisch in allen 4 Dekubitusschweregraden und allen topographischen Zonen exprimiert (Tabelle 1). Wichtig bleibt festzuhalten, dass dieses positive Expressionsverhalten für die Dekubitusgrade I und II nur eingeschränkt aussagekräftig ist, da lediglich 3 Patienten diesen Schweregraden zuzuordnen war. Darüber hinaus lässt sich insbesondere für die Schweregrade III und IV für das Expressionsverhalten von P-Selektin nachvollziehen, dass tendenziell eine zonale Abnahme der Markerexpression von zentral nach peripher stattfindet (Abbildung 9). Dieses Ergebnis spricht für eine molekulare Reproduktion des klinischen topographisch-zonalen Bildes eines Dekubitus. Die Leukozyten-Endothel-Interaktion ist vor allem in der zentralen Nekrosezone, der Granulationszone und der Haut im Dekubitus-Randbereich am stärksten ausgebildet. Interessanterweise zeigt sich bei Dekubitusgraden III und IV, also einer Tiefenschädigung von Haut- und Gewebe mit Verlust aller Hautschichten und Schädigung oder Nekrose des subkutanen Gewebes, die bis auf die darunter liegende Fascie reicht mit oder ohne Schädigung von Muskeln, Knochen oder unterstützenden Strukturen [28] im Vergleich zur Kontrollgruppe besonders in den Zonen 1-3 eine signifikante erhöhte P-Selektin Expression (alle p Werte <0.05).

E-Selektin wird analog dem P-Selektin auf Endothelzellen exprimiert und vermittelt eine Bindung an T- Zellen über den P-Selektin Glykoprotein-Ligand 1 auf der T- Zelloberfläche. Im Unterschied zu P-Selektin wird dieser sulfatierte Sialyl-Lewis-Kohlenhydratkomplex erst nach P-Selektin-Aktivierung für das E-Selektin zugänglich. In unseren Untersuchungen wurde E-Selektin in Endothelzellen nukleär und cytoplasmatisch in allen 4 Dekubitusschweregraden und allen topographischen Zonen exprimiert (Tabelle 1). Ähnlich zu den P-Selektin Ergebnissen waren vor allem die Dekubitusschweregrade III und IV auswertbar. Analog zum P-Selektin zeigte sich bei diesen Schweregraden, dass die E-Selektinexpression in Richtung Wundrand abnahm. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten die Zone 1 bei einem Schweregrad III und alle Zonen 1-4 bei einem Schweregrad IV signifikant erhöhte E-Selektinexpressionsmuster (alle p Werte ≤ 0.01).

Da die Selektinexpression eine Frühform der „Entzündungsphase“ der Wundheilung vermittelt, können aufgrund unserer Ergebnisse 2 unterschiedliche Wund-Mechanismen angenommen werden:

1. die Frühform der Wundheilung läuft ungehindert auf molekularer Ebene ab, jedoch stellen Grad III- IV Dekubiti eine derartig ausgeprägte Endothelverletzung dar, dass

bei entsprechender Gewebe-Tiefenschädigung der „normale“ Mechanismus nicht ausreichend greifen kann, um eine Defektausheilung zu initiieren. Vielmehr „verharrt“ die Wundheilung in der Diapedese. In der Folge kommt es somit zu einer vermehrten Exsudation der aktivierten Entzündungszellen ins Interstitium.

2. Die bestehenden Endothel-Mikrotraumen bedingen eine überschießende Inflammationsantwort und bedingen eine T-Zell vermittelte Okklusion der beschädigten Blutgefäße. Damit erhöht sich die Gefahr der Nekrose durch die molekulare Rekrutierung von Entzündungszellen und Endothelzellen.

Beide hypothetischen Mechanismen können lokal in einen „Circulosus vitiosus“ führen, da die nächste Phase der Wundheilung gar nicht erst erreicht wird.

5.2 V-CAM-1 (CD106), VLA-4 (CD49d) und LFA-1 (CD11a) Expression

V-CAM-1 gehört zur Immunglobulin-Superfamilie und ist auf aktiviertem Endothel lokalisiert. V-CAM-1 bindet T-Zellseitig an dem Integrin VLA-4 und bedingt eine Stärkung der Zell-Zell Interaktion zwischen T-Zelle und Endothel. Hierdurch bedingen Integrine sowohl ein „inside-out“- als auch ein „outside-in“- signaling und beeinflussen somit multiple zelluläre Prozesse. Hierbei stehen vor allem das adhäsionsbedingte Zellüberleben, die Zellproliferation und -beweglichkeit im Vordergrund. [16] Interessanterweise zeigte sich endothelseitig, bis auf den Grad II, in allen weiteren drei Dekubitusschweregraden eine V-CAM-1 Überexpression. Dagegen war bei keinem Patienten eine VLA-4 Expression detektierbar. Im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Dekubituskohorte waren die detektierten V-CAM-1 Expressionsmuster jedoch nicht statistisch signifikant erhöht.

LFA-1 ist analog zum VLA-4 ein Integrin, welches auf Monozyten, T-Zellen, neutrophilen Granulozyten, Makrophagen und dendritischen Zellen exprimiert wird. Seine Funktion ähnelt dem VLA-4. Es bindet endothelseitig an ICAM-1 und -2. Im Gegensatz zum Integrin VLA-4 konnte, außer bei Dekubitusschweregrad II, bei fast allen topographischen Zonen eine LFA-1 Expression dargestellt werden. Besonders in der Granulationszone und der Haut im Dekubitus-Randbereich zeigte sich eine signifikante Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe (alle p Werte $\leq 0{,}02$).

Aus diesen Ergebnissen kann abgeleitet werden, dass bei ausbleibender VLA-4- T-Zell Antwort die Ausbildung einer stabilen Zell-Zell-Interaktion kompromittiert ist, was wiederum die Vollendung der Entzündungsphase der Wundheilung beeinträchtigt und unter Umständen eine Wundchronifizierung begünstigt.

5.3 Limitationen der Studie

Neben den interessanten Ergebnissen unserer Arbeit ist es wichtig, wie eingangs bereits erwähnt, gewisse Limitationen der vorliegenden Dissertation anzumerken. An erster Stelle ist der retrospektive Charakter unserer Arbeit zu nennen, was aber mit der Auswahl einer Autopsiekohorte zu begründen ist, jedoch ist somit offensichtlich, dass keine standardisierte Gewebegewinnung erfolgen kann. Darüber hinaus können molekulargenetische Ergebnisse im Vergleich zu einer „in-vivo Kohorte“ andere Ergebnisse erbringen. Die Wahl der Expressionsmarker ist ebenfalls zu erwähnen. P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1 und VLA-4 stellen wichtige Targets der leukozytär-endothelialen Zell-Zell-Interaktion dar, jedoch bleibt abschließend zu klären, welchen Einfluss sie tatsächlich auf die Wundheilung nehmen. Unsere Markerauswahl bildet nicht ab, dass unter Umständen andere Zell-Zell Interaktionsmarker keinen Einfluss auf die Wundheilung haben. [40] Des Weiteren ist die untersuchte Patientenkohorte klein (n=17), mit lediglich 3 Fällen mit einem Dekubitusschweregrad I oder II. Hieraus wird ersichtlich, dass unsere Ergebnisse mit Zurückhaltung zu interpretieren sind. Abschließend wäre eine Korrelation zu Wundexsudaten wünschenswert, um die Validität der Ergebnisse zu prüfen. Bei einem Autopsiemodell ist dies jedoch wiederum leider nicht möglich. [38] [39] Dennoch erscheint es aussichtsreich, in der Zukunft eine „in vivo“ Kohorte fußend auf den Ergebnissen der vorliegenden Studie zu untersuchen, um unsere Ergebnisse zu validieren. Potentiell wäre eine so genannte „target Therapie“ von Dekubituswunden im weitesten Sinne möglich. Damit ist gemeint, dass wenn sich in einer weiterführenden Studie die bereits von uns untersuchten Ansätze bezüglich der (Über-)Expression von P-Selektin, E-Selektin oder VLA-4 verifizieren lässt, könnte man gezielte Hemmmechanismen einsetzen, um gegebenenfalls die Progression eines Dekubitus zu intervenieren.

6 Zusammenfassung

Die chronomorphologische Expression leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle aus der Gruppe der Selektin-, Integrin- und der Immunglobulin-Superfamilie in primär heilenden Hautwunden ist tierexperimentell und an humanem Operations- und Autopsiematerial genügend untersucht worden. Jedoch gibt es für die Dekubituswunde bezüglich der Gewebeexpression leukozytärer und endothelialer Adhäsionsmoleküle keine gesicherten Erkenntnisse. In dieser Arbeit sollte der Einfluss der Gewebeexpressionsmuster von P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1 und VLA-4 in Abhängigkeit der verschiedenen Schweregrade sowie auch der topographischen Zuordnung zu den verschiedenen Wundzonen [zentrale Nekrosezone (Z1); Granulationszone (Z2); Randbereich (Z3); intakte Haut (Z4)] innerhalb eines Schweregrades beurteilt werden. Dafür wurde eine speziell für Entzündungen erarbeitete Modifikation des zuvor beschriebenen Tissue Micro Arrays (TMA) genutzt. Für diese Arbeit wurde bei insgesamt siebzehn Obduktionsfällen Gewebe von Dekubitalulcera unterschiedlicher Schweregrade asserviert. Die Einteilung der unterschiedlichen Schweregrade erfolgte nach Shea [26]. In zehn Fällen lag ein Dekubitusgrad IV. Grades vor, in vier Fällen ein Dekubitusgrad III. Grades, in zwei Fällen ein Dekubitus I. Grades und in einem Fall ein Dekubitus II. Grades.

Prinzipiell kann man basierend auf den Ergebnissen dieser Arbeit schlussfolgern, dass, abgesehen von VLA-4, eine (Über-) Expression der untersuchten Entzündungsmarker (P-Selektin, E-Selektin, VCAM-1, LFA-1) in Dekubitusendothel bzw. in an der Entzündungsreaktion beteiligten Zellen (Thrombozyten, Granulozyten) stattfindet. Dies wiederum impliziert, dass die initialen molekularen Mechanismen der „Entzündungsphase“ der Wundheilung bezüglich der Leukozyten- Endothel-Interaktion auch in Dekubituswunden stattfinden. Jedoch weisen die einzelnen Marker ein unterschiedliches Expressionsmuster sowohl in Bezug auf den Dekubitusgrad als auch der topographischen Zone des Dekubitus auf. Dies bedeutet wiederum, dass anhand unserer Ergebnisse ein Markerexpressionsmuster zu den einzelnen Graden oder der Topographie nicht zuzuordnen ist.

P-Selektin wurde in allen Dekubitusgraden sowie ebenfalls in allen vier Zonen des jeweiligen Dekubitusschweregrades exprimiert. Das Maß der Expression nahm bezüglich der Topographie von zentral nach peripher ab. Insbesondere bei den Dekubitusschweregraden III und IV ließ sich im Vergleich zur Kontrollgruppe besonders in den Zonen 1-3 eine signifikante erhöhte P-Selektin Expression (alle p Werte $<0,05$) nachweisen.

E-Selektin (CD62e) wurde ebenfalls in unseren Untersuchungen in allen vier Dekubitusschweregraden sowie allen topographischen Zonen exprimiert. Ähnlich dem P-Selektin waren vor allem die Dekubitusschweregrade III und IV auswertbar. Und auch hier zeigte sich bei diesen Schweregraden, dass die Expression von E-Selektin in Richtung Normalgewebe abnahm. Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigte die Zone 1 bei einem Schweregrad III und alle Zonen 1-4 bei einem Schweregrad IV signifikant erhöhte E-Selektin-Expressionsmuster (alle p Werte $\leq 0{,}01$).

VCAM-1 (CD106) wurde endothelseitig bei den Dekubitusgraden I, III und IV exprimiert.

Im Vergleich zwischen der Kontrollgruppe und der Dekubituskohorte waren die detektierten V-CAM-1 Expressionen jedoch nicht statistisch signifikant erhöht.

In keiner Untersuchung zeigte sich eine VLA-4 (Very-late antigen4) Expression.

LFA-1 (CD11a) konnte in unseren Untersuchungen im Gegensatz zum Integrin VLA-4 bei fast allen topographischen Zonen eine Expression vorweisen. Besonders in der Granulationszone (Zone 2) und der Haut im Dekubitus-Randbereich (Zone 4) zeigte sich eine signifikante Überexpression im Vergleich zur Kontrollgruppe (alle p Werte $\leq 0{,}02$).

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen kein einheitliches Ergebnis. Dennoch zeigte sich die angewandte Methodik vielversprechend im Hinblick auf weitere Untersuchungen der Pathophysiologie der Dekubituswunde.

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

α: alpha

β: beta

D: Dekubitus

z.B.: zum Beispiel

P-Selektin: Plättchen-Selektin

E-Selektin: Endothel-Selektin

HE: Hämatoxylin-Eosin

VLA-4: very late antigen-4

LFA-1: Lymphocyte function-associated antigen 1

Bspw.: beispielsweise

ICAM: intercellular adhesion molecule

PECAM: platelet endothelial cell adhesion molecule

VCAM: vascular cell adhesion molecule

Bzw.: beziehungsweise

o.g.: oben genannt

µm: mikrometer

mm: millimeter

TMA: Tissue Micro Array

Z: Zone

7.2 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Expression P-Selektin unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

Tab. 2: Expression E-Selektin unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

Tab. 3: Expression VCAM-1 unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

Tab. 4: Expression LFA-1 unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

Tab. 5: Expression VLA-4 unterteilt nach Zonen und Dekubitusschweregrad

Tab. 6: Auswertung P-Selektin

Tab. 7: Auswertung E-Selektin

Tab. 8: Auswertung VCAM-1

Tab. 9: Auswertung LFA-1

Tab. 10: Auswertung VLA-4

7.3 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Hauptklassen der Adhäsionsmoleküle und deren Bindung an das Aktin

Abb. 2: Interaktion zwischen Lymphocyten und Endothelzellen

Abb. 3: T-Zell Aktivierung

Abb. 4: Tumor-Array-Herstellung

Abb. 5: Aufbau des Dekubitus Arrays Block 1

Abb. 6: Aufbau des Dekubitus Arrays Block 4 inklusive Kontrollfälle

Abb. 7: Aufbau des Kontroll Arrays

Abb. 8: Beispielfoto Dekubitus Array inklusive Kontrollstanzen

Abb. 9: Balkendiagramm zur Darstellung der Expression P-Selektin anhand der Mittelwerte

Abb.10: Balkendiagramm zur Darstellung der Expression E-Selektin anhand der Mittelwerte

Abb.11: Balkendiagramm zur Darstellung der Expression VCAM-1 anhand der Mittelwerte

Abb.12: Balkendiagramm zur Darstellung der Expression LFA-1 anhand der Mittelwerte

Abb.13: Balkendiagramm zur Darstellung der Expression VLA-4 anhand der Mittelwerte

Abb.14: Expression P-Selektin Dekubitus I - IV und Kontrollfälle

Abb.15: Expression E-Selektin Dekubitus I, II, III und Kontrollfälle

Abb.16: Expression VCAM-1 Dekubitus I, II, III und Kontrollfälle

Abb.17: Expression LFA-1 Dekubitus I, II, III und Kontrollfälle

Abb.18: Expression VLA-4 Dekubitus I, II, III und Kontrollfälle

Abb.19: Farbintensität für Dekubitusgrad III

Abb.20: Häufigkeit angefärbter Zellen für Dekubitusgrad III

Abb.21: Farbintensität für Dekubitusgrad IV

Abb.22: Häufigkeit angefärbter Zellen für Dekubitusgrad IV

7.4 Daten

7.4.1 Daten Untersuchungsmaterial

Geschlecht	Alter	Körpergewicht	Körpergröße	Dekubitusgrad	Lokalisation Dekubitus	Erscheinungsbild des Dekubitus	Todesursache
m	86	44,1 kg	171 cm	D4	Sakralregion	trocken, im Randbereich sauber abgetragen bzw. verheilt	bds. lappenfüllende Lungenentzündung
m	95	63 kg	167 cm	D4	Sakralregion	starke Weichteileiterung	frischer Herzinfarkt
w	82	70 kg	166 cm	D4	Sakralregion	Freiliegung von Knochen, Zerfall der Muskulatur und Subkutis, schmierig	Protein- und Nährstoffverlust aufgrund Dekubitus
w	67	60 kg	160 cm	D4	Sakralregion	Freiliegung von Knochen, schmierig-eitrig	akutes Atemversagen durch Aspiration von Erbrochenem
w	92	n.e.	n.e.	D1	Sakralregion	keine Entzündungszeichen, Haut intakt	Herzversagen
w	90	35 kg	148 cm	D1	Sakralregion	Rötung, trocken	Pneumonie
w	84	73,3 kg	165 cm	D4	Sakralregion	Knochen frei, trocken, sauber exzidierte Wundränder	Sepsis
w	96	58 kg	154 cm	D4	Sakralregion	Knochen frei, schmierig belegt, Muskulatur erweicht	frischer Herzinfarkt
w	82	n.e.	n.e.	D1	Sakralregion	oberflächlich, keine Entzündungszeichen	Pneumonie
w	82	40,5 kg	154 cm	D4	Sakralregion	Wundränder sauber, keine Entzündungszeichen	Akutes Linksherzversagen bei Kardiomegalie und frischem HI
w	74	74,1 kg	156 cm	D3	Sakralregion	entzündungsfrei, sauber	V.a. Pneumonie
w	73	56 kg	155 cm	D4	Sakralregion	schmierig rötlich - gelblich, Abszess im Bereich des Knochens	MOV nach Sepsis bei Dekubitus
w	95	60,1 kg	154 cm	D4	Sakralregion	schmierig, nekrotisch	MOV nach Sepsis bei Dekubitus u Pyelonephritis
w	90	46,4 kg	159 cm	D3	Sakralregion	reizlos, trocken	Pneumonie
m	59	n.e.	n.e.	D2	Sakralregion	reizlos, trocken	GI Blutung bei Duodenalulcus bei Blasen CA
w	86	56 kg	166 cm	D4	Sakralregion	nicht weiter erwähnt	Nierenversagen bei eitriger Blasenentzündung mit Harnstau
m	44	92 kg	173 cm	D3	Sakralregion	sauber, feucht - rötlicher Wundgrund	MOV bei Sepsis

7.4.2 Daten Auswertung

D1: Dekubitus Grad I

D2: Dekubitus Grad II

D3: Dekubitus Grad III

D4: Dekubitus Grad IV

FI: Farbintensität

NrC: Anzahl der angefärbten Zellen

Z1: Zone 1 (zentrale Nekrosezone)

Z2: Zone 2 (Granulationszone)

Z3: Zone 3 (Haut im Randbereich)

Z4: Zone 4 (intakte Haut)

Grad	FI_Z1	NrC_Z1	Score_Z1	FI_Z2	NrC_Z2	Score_Z2	FI_Z3	NrC_Z3	Score_Z3	FI_Z4	NrC_Z4	Score_Z4
D1	1	1	1	2	3	6	2	2	4	0	1	0
D1	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0
D2	0	1	0	1	1	1	1	3	3	0	1	1
D3	1	2	2	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D3	1	2	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D3	1	3	3	1	2	2	1	2	2	1	1	1
D3	1	1	1	1	1	1	1	2	2	1	1	1
D4	2	3	6	0	1	0	1	3	3	0	0	0
D4	2	3	6	0	0	0	1	1	1	0	1	0
D4	2	1	2	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	2	1	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	1	2	2	0	1	0
D4	1	2	2	1	1	1	0	1	0	0	1	0
D4	1	2	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D4	0	1	0	1	1	1	1	2	2	1	2	2

Tab. 6: Auswertung P-Selektin

Grad	FI_Z1	NrC_Z1	Score_Z1	FI_Z2	NrC_Z2	Score_Z2	FI_Z3	NrC_Z3	Score_Z3	FI_Z4	NrC_Z4	Score_Z4
D1	0	1	0	1	3	3	0	1	0	0	1	0
D1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D2	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D3	2	2	4	2	1	2	1	2	2	0	1	0
D3	2	2	4	0	1	0	0	1	0	1	1	1
D3	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D3	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	2	3	6	2	3	6			
D4	2	2	4				1	2	2	2	1	2
D4	2	1	2	2	3	6	1	1	1	1	1	1
D4	1	1	1	1	1	1	2	2	4	1	1	1
D4	1	2	2	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	1	2	2	0	1	0	1	1	1	0	1	0
D4	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0

Tab. 7: Auswertung E-Selektin

Grad	Fl_Z1	NrC_Z1	Score_Z1	Fl_Z2	NrC_Z2	Score_Z2	Fl_Z3	NrC_Z3	Score_Z3	Fl_Z4	NrC_Z4	Score_Z4
D1	0	1	0	0	1	0	1	2	2	0	1	0
D1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D3	1	2	2	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D3	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D3	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D3	0	1	0	0	1	0	1	1	0	0	1	0
D4	0	3	0	0	1	0	0	2	0			
D4	0	1	0				0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	1	3	3	1	1	1
D4	1	2	2	1	1	1	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0

Tab. 8: Auswertung VCAM-1

Grad	Fl_Z1	NrC_Z1	Score_Z1	Fl_Z2	NrC_Z2	Score_Z2	Fl_Z3	NrC_Z3	Score_Z3	Fl_Z4	NrC_Z4	Score_Z4
D1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D1	0	1	0	2	2	4	1	2	2	1	1	1
D2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D3	1	1	1	1	2	2	0	1	0	0	1	0
D3	1	3	3	1	3	3	1	3	3	1	1	1
D3	0	3	0	1	2	2	1	3	3	1	1	1
D3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D4	1	3	3	1	1	1	1	2	2			
D4	2	3	6				1	3	3	1	1	1
D4	2	3	6	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D4	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D4	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	1	3	3	1	3	3	1	1	1	0	1	0
D4	1	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1
D4	1	1	1	1	2	2	1	1	1	0	1	0

Tab. 9: Auswertung LFA-1

Grad	Fl_Z1	NrC_Z1	Score_Z1	Fl_Z2	NrC_Z2	Score_Z2	Fl_Z3	NrC_Z3	Score_Z3	Fl_Z4	NrC_Z4	Score_Z4
D1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D2	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D3	1	1	1	0	1	0	1	1	1	0	1	0
D3	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D3	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D3	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	1	1	1	1	1	1	1	1	1			
D4	1	1	1				0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
D4	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0

Tab. 10: Auswertung VLA-4

8 Literaturverzeichnis

1. Barbenel JC, Jordan MM, Nicol SM, Clark MO: Incidence of pressure-sores in the Greater Glasgow Health Board area. Lancet 1977;2:548-550.
2. Bridel J: The epidemiology of pressure sores. Nurse Stand 1993;7:25-30.
3. Spector WD: Correlates of pressure sores in nursing homes: evidence from the National Medical Expenditure Survey. J Invest Dermatol 1994;102:42S-45S.
4. Allmann R: Pressure ulcers prevalence, incidence, risk factors and impact. Clin Geriatr Med 1997;13:421-436.
5. Andersen KE, Kvorning SA: Medical aspects of the decubitus ulcer. Int J Dermatol 1982;21:265-270.
6. Bienstein C SG, Braun M, Neander KD: Dekubitus. Die Herausforderung für die Pflege. Thieme, Stuttgart, New York 1997.
7. Barton A, Barton M: The management and prevention of pressure sores. Faber & Faber, London 1981.
8. Panel EPUAPaNPUA: Prevention and Treatment of pressure ulcers: quick reference guide. Washington DC: National Pressure Ulcer Advisory Panel. http://www.epuap.org/gltreatment.html 2009.
9. Lukacs NW, Ward PA: Inflammatory mediators, cytokines, and adhesion molecules in pulmonary inflammation and injury. Adv Immunol 1996;62:257-304.
10. Luscinskas FW, Ma S, Nusrat A, Parkos CA, Shaw SK: Leukocyte transendothelial migration: a junctional affair. Semin Immunol 2002;14:105-113.
11. Osborn L: Leukocyte adhesion to endothelium in inflammation. Cell 1990;62:3-6.
12. Springer TA: Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. Cell 1994;76:301-314.
13. Stotts NA, Hopf HW: The link between tissue oxygen and hydration in nursing home residents with pressure ulcers: preliminary data. J Wound Ostomy Continence Nurs 2003;30:184-190.
14. Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P: The selectins: vascular adhesion molecules. Faseb J 1995;9:866-873.
15. Nocito A, Kononen J, Kallioniemi OP, Sauter G: Tissue microarrays (TMAs) for high-throughput molecular pathology research. Int J Cancer 2001;94:1-5.

16. Hauck CR: Cell adhesion receptors - signaling capacity and exploitation by bacterial pathogens. Med Microbiol Immunol 2002;191:55-62.
17. Xu CR, Yusuf-Makagiansar H, Hu Y, Jois SD, Siahaan TJ: Structural and ICAM-1-docking properties of a cyclic peptide from the I-domain of LFA-1: an inhibitor of ICAM-1/LFA- 1-mediated T-cell adhesion. J Biomol Struct Dyn 2002;19:789-799.
18. Yusuf-Makagiansar H, Anderson ME, Yakovleva TV, Murray JS, Siahaan TJ: Inhibition of LFA-1/ICAM-1 and VLA-4/VCAM-1 as a therapeutic approach to inflammation and autoimmune diseases. Med Res Rev 2002;22:146-167.
19. Zollner TM, Asadullah K: Selectin and selectin ligand binding: a bittersweet attraction. J Clin Invest 2003;112:980-983.
20. Moll I: Duale Reihe Dermatologie. Thieme, Stuttgart 2005;6. Auflage:2-3.
21. Brick JL: Dekubitus – ein pflegerisches Problem? Krankenpflege Journal 1991;29:248 – 259.
22. Hofmann– Rösener M, Furth P: Beispiel einer standardisierten Dekubitustherapie. Krankenpflege Journal 1995;33:81– 84.
23. Niitsuma J, Yano H, Togawa T: Experimental study of decubitus ulcer formation in the rabbit ear lobe. J Rehabil Res Dev 2003;40:67-73.
24. Bergstrom JP, Larsson J, Nordstrom H, Vinnars E, Askanazi J, Elwyn DH, Kinney JM, Furst PJ: Influence of injury and nutrition on muscle water and electrolytes: effect of severe injury, burns and sepsis. Acta Chir Scand 1987;153:261-266.
25. Brick JL: Dekubitus – nicht notwendig! Krankenpflege Journal 1993;31:232– 237.
26. Shea JD: Pressure sores: classification and management. Clin Orthop Relat Res 1975:89-100.
27. Seiler WO, Stahelin HB: [Decubitus: pathogenesis, prevention and theory]. Z Krankenpfl 1979;72:84-89.
28. NPUAP: http://www.npuap.org.
29. Manley MT: Incidence, contributory factors and costs of pressure sores. S Afr Med J 1978;53:217-222.
30. Carlos TM, Harlan JM: Leukocyte-endothelial adhesion molecules. Blood 1994;84:2068-2101.
31. Ertel W, Morrison MH, Wang P, Ba ZF, Ayala A, Chaudry IH: The complex pattern of cytokines in sepsis. Association between prostaglandins, cachectin, and interleukins. Ann Surg 1991;214:141-148.

32. Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, Meisner M: Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis. Crit Care Med 2002;30:S302-312.
33. Janeway CA, Trafers P, Walport M, Shlomchik MJ: Immunologie. Spektrum Akademischer Verlag GmbH. 2002.
34. Egger G: Die Akute Entzündung. Vienna: Springer-Verlag/Wien. 2005.
35. Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. Nat Med 1998;4:844-847.
36. Bubendorf L, Kononen J, Koivisto P, Schraml P, Moch H, Gasser TC, Willi N, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP: Survey of gene amplifications during prostate cancer progression by high-throughout fluorescence in situ hybridization on tissue microarrays. Cancer Res 1999;59:803-806.
37. Sauter G: Representativity of TMA studies. Methods Mol Biol 2010;664:27-35.
38. Eming SA, Koch M, Krieger A, Brachvogel B, Kreft S, Bruckner-Tuderman L, Krieg T, Shannon JD, Fox JW: Differential proteomic analysis distinguishes tissue repair biomarker signatures in wound exudates obtained from normal healing and chronic wounds. J Proteome Res 2010;9:4758-4766.
39. Edsberg LE, Wyffels JT, Brogan MS, Fries KM: Analysis of the proteomic profile of chronic pressure ulcers. Wound Repair Regen 2012;20:378-401.
40. Taverna D, Nanney LB, Pollins AC, Sindona G, Caprioli R: Multiplexed molecular descriptors of pressure ulcers defined by imaging mass spectrometry. Wound Repair Regen 2011;19:734-744.

9 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen Personen danken, die mich im Rahmen meiner Dissertation begleitet und unterstützt haben.

Ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater PD Dr. med. Jan Sperhake, der mich stets motiviert hat und mir mit überaus konstruktiver Kritik und einer herausragenden Unterstützung bei der Korrekturarbeit zur Seite stand.

Ebenfalls möchte ich meinem vorherigen Doktorvater Prof. Dr. med. Michael Tsokos für die Bereitstellung dieses interessanten Themas und sein Verständnis danken.

Herrn Dr. Michael Schlüter möchte ich für die selbstlose und sehr hilfreiche Unterstützung bei der Durchführung der Statistik danken.

Mein Dank gilt ebenso Frau Dr. med. Anna-Sophie Torke für die tatkräftige Hilfestellung bei der Durchführung und des Erlernens des praktischen Teils dieser Dissertation.

Für die immunhistochemischen Auswertung möchte ich Herrn Dr. Jakob Matschke danken.

Ebenfalls möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Klaus Püschel sowie Herrn Prof. Dr. med. Guido Sauter für die gute Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Rechtsmedizin sowie dem Institut für Pathologie danken.

Allen Mitarbeitern des Instituts für Rechtsmedizin danke ich für die tatkräftige Unterstützung bei der Bereitstellung des Gewebematerials.

Dem Laborteam des Instituts für Pathologie, speziell Frau Martina Mirlacher danke ich für die Fertigstellung der Dekubitus Arrays sowie der Hilfsbereitschaft.

Überaus besonderer Dank gilt meinem guten Freund Felix, der mir privat und auch wissenschaftlich mit Rat und Tat beim Fertigstellen meiner Dissertation zur Seite stand.

Von ganzem Herzen danke ich meiner lieben Freundin Susanne, die mich unterstützt, mir zuhört und mich versteht.

Besonderer liebevoller Dank gilt meinen Eltern für die stets rückhaltlose Unterstützung meines privaten und auch beruflichen Daseins und dem unermüdlichen Interesse am Fertigstellen meiner Dissertation.

10 Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.
Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....