

**Diplomarbeit**

**Die Wirkung von Autophagie-induzierenden Substanzen  
bei Verbrennungen**

eingereicht von

**Aida Abd Elhalim**

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Universitätsklinikum für Chirurgie**

Klinischen Abteilung für Plastische, Ästhetische und  
Rekonstruktive Chirurgie

unter der Anleitung von

Dr. med. univ. Judith Christine Julie Geißler  
Univ.-Prof. Dr. med. Lars-Peter Kamolz, MSc

Graz, 16.08.2021

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 16.08.2021*

*Aida Abd Elhalim eh.*

# Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis .....	3
Abkürzungen und deren Erklärung.....	5
Abbildungsverzeichnis .....	7
Tabellenverzeichnis .....	8
Zusammenfassung .....	9
Abstract.....	11
Einleitung .....	11
1 Verbrennungen – Grundlagen .....	14
1.1 Ursachen einer Verbrennung.....	14
1.1.1 Thermische Verletzung.....	14
1.1.2 Elektrische Verletzung .....	15
1.1.3 Chemische Verletzung.....	17
1.2 Pathophysiologie einer Verbrennung .....	18
1.2.1 Lokale Reaktionen.....	18
1.2.2 Systemische Reaktionen .....	20
1.3 Diagnostik einer Verbrennung.....	23
1.3.1 Tiefe.....	24
1.3.2 Ausmaß.....	26
1.4 Verbrennungskrankheit .....	27
1.4.1 Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit.....	27
1.4.2 Komplikationen der Verbrennungskrankheit .....	28
1.5 Therapie einer Verbrennung.....	31
1.5.1 Volumentherapie .....	31
1.5.2 Therapie des Wärmeverlusts .....	31
1.5.3 Schmerztherapie .....	32
1.5.4 Ernährungstherapie.....	32
1.5.5 Antibiotikatherapie .....	33
1.5.6 Escharotomie .....	33
1.5.7 Lokale Wundversorgung .....	33
2 Das Nachbrennen und seine Therapiemöglichkeiten .....	34
2.1 Autophagie, Apoptose und deren Modulation.....	35
2.1.1 Spermidin .....	38
2.1.2 Rapamycin.....	39
2.1.3 Hydroxycitrat.....	40
2.1.4 Dimethylsulfoxid.....	40
2.1.5 Nicotinamid .....	41
2.1.6 Weitere Substanzen .....	42
2.2 Wundperfusion und ihre Modulation .....	43
2.2.1 Ödeme.....	43
2.2.2 Hyperkoagulabilität .....	50
2.3 Reaktive Sauerstoffspezies .....	52
2.4 Andere Therapien des Nachbrenn-Effekts .....	54
3 Material und Methoden .....	56
3.1 Literaturrecherche.....	56
3.2 Tierversuch .....	57
3.2.1 Die Versuchsreihe.....	57
4 Ergebnisse – Resultate.....	67
4.1 Literaturrecherche.....	67
4.1.1 Autophagie .....	67

4.1.2	ROS .....	68
4.1.3	Perfusion.....	68
4.1.4	Andere .....	69
4.2	Tierversuch .....	70
4.2.1	Gewichtsmessung .....	70
4.2.2	Laser-Speckle-Contrast Imaging .....	71
4.2.3	Histologie .....	73
5	Diskussion und Conclusio .....	76
5.1	Tierversuch .....	77
5.1.1	Gewichtsmessung .....	77
5.1.2	Laser-Speckle-Messung.....	78
5.1.3	Histologie .....	78
6	Literaturverzeichnis .....	80

## Abkürzungen und deren Erklärung

4E-BP1 Eukaryotic translation initiation factor 4E-binding protein 1  
ABSI-Score Abbreviated burn severity index  
AC Adenylylase  
AKT Proteinkinase B  
Akt/mTOR-Signalweg  
Proteinkinase B/mechanistic "mammalian" target of Rapamycin-Signalweg 41  
ARDS Acute respiratory stress syndrome  
ATG Autophagy related Gene  
ATLS Advanced trauma life support  
ATX Astaxanthin  
Bax Bcl-2-assoziertes X-Protein  
Bcl-Proteine B-cell-lymphoma protein  
CaM Calmodulin  
CD8+ T Cluster of differentiation 8  
CRM Caloric restriction mimetic  
DAG Diacylglycerin  
DMSO Dimethylsulfoxid  
EPO Erythropoietin  
GCS Glasgow coma scale  
H1R H1-Rezeptoren  
HBO Hyperbare Oxygenation  
HMG-CoA-Reduktase 3-Hydroxy-3-Methylglutaryl-Coenzym-A-Reduktase  
IHT Inhalationstrauma  
IL Interleukin  
KOF Körperoberfläche  
LC3 Microtubule-associated proteins 1A/1B light chain 3  
L-NAME Nw-nitro-L-Arginin-Methylester  
MAPK Mitogen-activated protein kinase  
MDA Malondialdehyd  
MLCK Myosin-leichte-Ketten-Kinase  
MTORC1 mechanistic/mammalian target of rapamycin complex 1  
mTOR-Kinase mechanistic/mammalian target of rapamycin  
NAC N-Acetylcystein  
NaCl Natriumchlorid  
NAD<sup>+</sup> Nicotinamidadenindinukleotid  
NB-201 Benzalkoniumchlorid  
NF-κB Nuklear Faktor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells  
NO Stickstoffoxid, Stickstoffoxid  
NOS NO-Synthase  
P70S6K Ribosomal protein S6 kinase beta-1  
PAF Plättchen-aktivierenden Faktors  
PGI<sub>2</sub> Prostazyklin  
PI3K Phosphoinositid-3-Kinase  
PIP<sub>2</sub> Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat  
PIP<sub>3</sub> Phosphatidyl-3,4,5-Triphosphat  
P<sub>is</sub> interstitieller Druck  
PKA Proteinkinase A

PKB Proteinkinase B  
PLC- $\beta$  Phospholipase C- $\beta$   
ROS Reaktive oxygen species  
r-tPA recombinant tissue plasminogen activator  
SD Standardabweichung  
SIRS Systemic inflammatory response  
Sirt1 Sirtuin-1  
SOFA-Score Sepsis-related organ failure assessment score  
TGF- $\beta$ 1 Transforming growth factor beta receptor 1  
TNF- $\alpha$  Tumornekrosefaktor-  $\alpha$   
TUNEL-Assay terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling  
VC Vitamin C  
VD Vitamin D  
VEGF Gefäß-endotheliale Wachstumsfaktor

## Abbildungsverzeichnis

Abb. 1 Zellschichten der Kutis .....	18
Abb. 2 Verbrennungszonen nach Jackson .....	19
Abb. 3 Die Verbrennungsgrade .....	25
Abb. 4 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg .....	35
Abb. 5 Strukturformel – Spermidin .....	38
Abb. 6 Strukturformel – Rapamycin .....	39
Abb. 7 Strukturformel – Hydroxycitrat .....	40
Abb. 8 Strukturformel – DMSO .....	40
Abb. 9 Strukturformel – Nicotinamid .....	41
Abb. 10 Histamin-Rezeptor-Signalkaskaden .....	46
Abb. 11 Ratte (27 – DMSO) nach Verbrühung .....	59
Abb. 12 Ratte (27 – DMSO) mit Schutz-Panzer .....	59
Abb. 13 Aufbau der Laser-Speckle-Apparatur .....	61
Abb. 14 Elektronik der Laser-Speckle-Apparatur .....	62
Abb. 15 Einbezogene Studienanzahlen .....	67
Abb. 16 Mittleres Gewicht in [g] an Tag 1 und Tag 8 .....	71
Abb. 17 Tag 1 vor der Verbrühung – (DMSO-Rattennr.27) .....	72
Abb. 18 Tag 1 nach der Verbrühung – (DMSO-Rattennr.27) .....	72
Abb. 19 Tag 8 – (DMSO-Rattennr.27) .....	72
Abb. 20 Überblick über Flux-Mean-Werte $\pm$ SD aller Substanzgruppen .....	73
Abb. 21 Score-Durchschnitt $\pm$ SD der histologischen Auswertungen .....	74

## Tabellenverzeichnis

Tab. 1 Verbrennungen nach Ursache und Häufigkeit .....	14
Tab. 2 Die Verbrennungsgrade des deutschsprachigen und des englischsprachigen Raumes .....	25
Tab. 3 Beispiel für eine Analgosedierung .....	32
Tab. 4 Starling-Gleichung - Definitionen.....	43
Tab. 5 Dosis der angewandten Substanzen .....	60
Tab. 6 Histologische Auswertungskategorien .....	63
Tab. 7 A - Epithelregeneration – Scoringdefinition .....	63
Tab. 8 B - Degeneration/Nekrose - Scoredefinitionen .....	64
Tab. 9 C - Dermale Reparatur – Scoredefinitionen .....	64
Tab. 10 D - Entzündung – Scoredefinitionen .....	65
Tab. 11 E - Heilungskomplikation – Scoredefinitionen .....	65
Tab. 12 F - Einblutungen - Scoredefinitionen .....	66
Tab. 13 Substanzen der Studien zur Autophagieinduktion .....	67
Tab. 14 Substanzen der Studien zum oxidativen Stress .....	68
Tab. 15 Studien zur Perfusion .....	69
Tab. 16 Substanzen der Studien zu mehreren Pathomechanismen .....	70
Tab. 17 Mittleres Gewicht und SD in [g] an T1 und T8 .....	71
Tab. 18 Absolutwerte der Scoredurchschnitte der histologischen Auswertungen .....	74

# **Zusammenfassung**

## **Einführung:**

Die Autophagie und Apoptose in verbranntem Gewebe scheinen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie und Therapie einer Verbrennungsverletzung zu spielen.

Durch den Prozess der Autophagie kann eine Zelle ihre Bestandteile abbauen und wiederverwerten. Womöglich kann mittels Autophagie-Induktion dem Nachbrenneffekt einer Brandverletzung entgegengewirkt werden, dieser beschreibt die Ausweitung der Nekrose von der Koagulationsnekrose-Zone auf die Stase-Zone einer Brandwunde. Weitere involvierte pathophysiologische Prozesse wie Ischämien, überschießende Entzündungsreaktionen und Sauerstoffradikal-Akkumulationen (ROS) beeinflussen ebenso das Nachbrennen.

Das Ziel der Literaturrecherche und Tierversuchsstudie war es, sowohl die pathophysiologischen Prozesse, des Nachbrennens zu veranschaulichen, als auch die verschiedenen Wirkungen von experimentellen Substanzen insbesondere auf die Autophagie zu beleuchten.

## **Material und Methoden:**

Diese Studie umfasste eine Literaturrecherche und einen prospektiven Tierversuch.

Die Recherche erfolgte mittels vordefinierter MESH-Begriffe, PUBMED und ResearchGate-Suchen zum Thema des Nachbrenneffektes, seiner Pathophysiologie und den unterschiedlichen Möglichkeiten diesen zu verhindern.

Im Tierversuch wurden 6 Gruppen zu je 10 Sprague-Dawley-Ratten zu je 20 % ihrer Körperoberfläche mit kochendem Wasser verbrüht, wonach sie intraperitoneal einmalig die Testsubstanzen Spermidin, Rapamycin, Hydroxycitrat und Nicotinamid erhielten. Diese wurden mit 2 Kontrollgruppen verglichen, von denen eine Dimethylsulfoxid und die andere Kochsalzlösung erhielt. Das Ziel war es die Nekrose der Stase-Zone zu verhindern oder zu reduzieren.

Während der gesamten Studiendauer (8 Tage) wurde das Gewicht der Ratten und die Hautperfusion mittels Laser-Speckle-Contrast Imaging zu Beginn und am achten und letzten Tag der Studie beobachtet. Darüber hinaus wurden Biopsien der Verbrühungswunden histologisch untersucht.

**Ergebnisse:**

In der Literaturrecherche überwog die Anzahl der Studien, die auf die Verbesserung der Perfusion von Verbrennungswunden abzielten. 14 von 34 der einbezogenen Studien verwendeten Substanzen zur Erhöhung der Durchblutung. 7 reduzierten die Menge an ROS und 8 Studien zeigten, dass die verwendeten Substanzen mehrere Mechanismen gleichzeitig beeinflussten.

Die Kenntnisse über die Anwendung von Autophagie-induzierenden Substanzen und deren wundheilende Eigenschaften sind begrenzt. 5 Studien wurden gefunden, in denen Substanzen, wie DMSO, Rapamycin, Erythropoietin, Vitamin D und Plättchen-reiches Plasma, verwendet wurden, um das Fortschreiten von Verbrennungswunden über die Autophagie zu reduzieren.

Keine der in der Tierstudie verwendeten Substanzen zeigte eindeutig positive Effekte auf die Stase-Zone. 4 Ratten der Spermidingruppe starben, woraufhin die Spermidingabe abgebrochen wurde. Weiteres waren die Unterschiede zwischen den Substanzgruppen im Vergleich zu den Kontrollen nicht signifikant.

**Fazit:**

Diese Literaturübersicht zeigt vielversprechende Testsubstanzen im Gegensatz zur hier durchgeführten Tierversuchsstudie. Ein aussagekräftigeres Ergebnis der Tierstudie könnte durch Erhöhung der Rattenzahl pro Substanzgruppe, einer längeren Studiendauer oder durch Dosisanpassungen der Substanzen erreicht werden. Es sollten daher weitere Forschungsschritte eingeleitet werden, um eine ausführliche Bewertung Autophagie-induzierender Substanzen und deren Entwicklung zu ermöglichen.

## **Abstract**

### **Introduction:**

Autophagy and apoptosis appear to be of great importance in the pathophysiology and therapy of burn injuries. Cells can recycle their components and potentially improve healing processes through an increase of autophagy. Other mechanisms involved in burn wound progression are ischemia, excessive inflammatory reactions and oxygen radical accumulations (ROS).

The objective of this study was to review these pathophysiological pathways involved in burn wound progression as well as different effects of therapeutic substances, like autophagy-inducers used to reduce the destruction of the zone of stasis.

### **Methods:**

This study entails a literature review and a prospective animal study.

The review was conducted through pre-defined MESH terms on burn wound progression and its prevention, as well as PUBMED and ResearchGate-Searches. This study focused on specific pathophysiological mechanisms, namely autophagy and apoptosis, perfusion and oxidative stress as well as experimental treatments targeting said mechanisms.

The animal study was performed to test the efficacy of autophagy-inducing substances on salvaging the zone of stasis through an in vivo study. 6 groups of 10 Sprague Dawley rats were scalded using boiling water to create a burn injury extending over 20% of the total body surface area (TBSA). The test substances spermidine, rapamycin, hydroxy citric acid and nicotinamide were administered once post-burn and intraperitoneally.

These 4 substance groups were compared to 2 control groups receiving dimethyl sulfoxide (DMSO) and saline solution, respectively. We assessed the outcomes through determining the rats' weights and laser speckle measurements at the beginning and end (day 8) of the study. Furthermore, biopsies of the scald wounds were examined, and the resulting scores were analyzed.

### **Results:**

The review revealed the predominance of studies targeting the amelioration of burn wound perfusion to salvage the zone of stasis. 14 out of 34 studies used substances to elevate perfusion levels and 7 reduced the amount of ROS in burn wounds. 8 studies found substances interfering with more mechanisms at once. Knowledge about the application of

autophagy-inducing substances and their wound healing properties are limited. 5 studies were found using DMSO, rapamycin, erythropoietin, vitamin D and platelet-rich plasma to reduce burn wound progression.

None of the substances used in the animal study showed a reduction of burn wound conversion. Apart from the fact that 4 spermidine-rats died leading to a stop of spermidine-use in this study, differences between the substance groups compared to the controls were non-significant.

**Conclusion:**

This literature review shows promising therapeutic interventions to reduce the secondary burn wound progression in contrast to the animal study. A more valid outcome of the animal study might be achieved through increasing the number of rats per substance group and the duration of the study or through substance dose adjustments. Therefore, further research should be conducted to enable a proper evaluation of autophagy-inducing substances and their development.

## Einleitung

Der Nachbrenneffekt ist das Phänomen der sekundären Gewebeschädigung nach einer Verbrennung. Die Verbrennungswunde weitet sich nach dem erfolgten thermischen Trauma weiter aus und führt zu initialen Fehleinschätzungen der Verbrennungstiefe und ihres Ausmaßes (1).

Dieses sekundäre Fortschreiten der Brandverletzung resultiert aus der Ischämie, der Apoptose und Autophagie, der Ödembildung, des oxidativen Stresses und der überschießenden Entzündungsreaktion im betroffenen Hautareal auf die thermische Noxe. Initial intakt imponierendes Gewebe wird dadurch nekrotisch (2).

Im klinischen Alltag führt der Nachbrenneffekt zur Unterschätzung der Verbrennungsverletzung und in weiterer Folge auch zur Einleitung einer inadäquaten Therapie. Folglich erhöht sich die Potentialität schwerwiegender Komplikationen und die Letalität der VerbrennungspatientInnen.

In den letzten 80 Jahren wurden sowohl die Pathophysiologie als auch neue Therapieansätze erforscht, um den Nachbrenneffekt zu vermindern oder zu verhindern. Einige Ansätze, welche die Modulation des Prozesses der Autophagie untersuchen, scheinen vielversprechende Ergebnisse zu zeigen (3–5). Die Autophagie einer Zelle beschreibt einen Abbau- und Wiederverwertungsmechanismus der Zellorganellen, die Zelle und ihre Bestandteile werden im Grunde ‚recycelt‘ (6).

Erforscht wurden in dieser Arbeit Therapiemöglichkeiten, wie etwa die Autophagie-Induktion (7), die Optimierung der Perfusion und die Reduktion der reaktiven Sauerstoffspezies in der Verbrennungswunde. Für die Autophagie-Induktion kommen Substanzen wie Rapamycin (8–10), Spermidin (11,12) und Nicotinamid (13,14) und Hydroxycitrat (15,16) in Frage. Spermidin zeigte bei einer zuvor gehenden Tierversuchsstudie hierorts bereits vielversprechende Ergebnisse (12).

Mit den genannten Substanzen wurde eine Tierversuchsstudie durchgeführt, um den Effekt dieser Substanzen auf die sekundären Schäden durch die Verbrühungen in Ratten zu untersuchen. Ratten wurden in Allgemeinnarkose am Rücken verbrüht und anschließend mit den oben angeführten Substanzen therapiert. Die Verbrühung am Rücken wurde am Ende der Studie histopathologisch beurteilt und der Versuch in seiner Gesamtheit analysiert.

# 1 Verbrennungen – Grundlagen

Verbrennungen sind Verletzungen durch thermische Einwirkungen auf die Haut, ihre Anhangsgebilde und ihre unterschiedlichen Schichten; bei entsprechender Tiefe der Verbrennung können auch Muskulatur und Knochen betroffen sein. Großflächige Verbrennungen können schwerwiegende systemische Symptome bis hin zum Schock oder zur Sepsis verursachen. Im Jahr 2018 wurden in Österreich 1404 stationäre Aufnahmen mit einer ICD-10 Entlassungsdiagnose „Verbrennungen oder Verätzungen (T20-T32)“ aufgezeichnet. Davon waren 145 tagesklinische Aufenthalte, 18 Patienten sind ihren Verletzungen erlegen (17).

Verbrennungen können durch mannigfache thermische Noxen entstehen (s. Tab. 1), die verschiedenen Ursachen der Brandverletzung können diagnostisch wegweisend sein und unterschiedliche therapeutische Konsequenzen mit sich ziehen (18).

Verbrennungsursache	Häufigkeit
Flamme	44,9%
Verbrühung	25,9%
Explosion	11,2%
Kontaktverbrennung	6,7%
Stromunfall	4,6%
Sonstige (Sonne, Reibung, etc.)	5,2%

Tab. 1 Verbrennungen nach Ursache und Häufigkeit (19)

## 1.1 Ursachen einer Verbrennung

### 1.1.1 Thermische Verletzung

*Verbrühungen* – Heiße Flüssigkeiten verursachen bei Kindern bis zu 70% aller Verbrennungsverletzungen, allerdings sind auch ältere Menschen oft von Verbrühungen betroffen. Die Verbrühung, auch Ambustio, kann insbesondere durch heiße Öle alle Schichten der Haut beschädigen (20). Oft sind Verbrühungen auch ein ‚Mosaik von oberflächlich und tiefer verbrühten Arealen‘ (21).

*Verbrennung* – Flammen verursachen 50% der Verbrennungen, auch Combustio, bei Erwachsenen und sind nicht selten mit Inhalations- und anderen Begleittraumata assoziiert. Hier können betroffene Hautschichten variieren (20,21).

*Kontaktverbrennung* – Bei älteren Menschen, neurologischen Patienten (Epilepsie) und Patienten unter Drogen oder Alkoholeinfluss kann es durch Synkopen und die schlechtere Reaktionsfähigkeit zu einer Kontaktverbrennung kommen, bei Kindern geschieht diese überwiegend durch Unfälle.

Verletzungen durch einen kurzzeitigen Kontakt mit einem übermäßig heißen Objekt (z.B. heißes Metall, Plastik, Kohle, Glas) kommen im Industriebereich bei Arbeitsunfällen vor. Oft haben diese Wunden alle Hautschichten durchdrungen oder kommen tief in der Dermis zu liegen (20,21).

### **1.1.2 Elektrische Verletzung**

Ein elektrischer Strom kann durch den menschlichen Körper über eine Eintritts- und eine Austrittsstelle fließen. Durch die Umwandlung von elektrischer zu Wärmeenergie, wird die Haut beschädigt. Das Ausmaß des Gewebeschadens ist abhängig von der Stromstärke, der Kontaktfläche, der Einwirkdauer, des Stromweges und der Stromart (22).

Es werden zwei Stromarten voneinander unterschieden:

- Wechselstrom – Elektronen kreisen im Stromkreis, der zu tetanischen Muskelfibrillationen führen kann und somit den Menschen an der Stromquelle ‚festhält‘.
- Gleichstrom – Elektronen fließen in eine Richtung. Der erzeugte Stromschock kann Betroffene ruckartig von der Stromquelle entfernen.

Diese Unterschiede gelten nur bei Niederspannungen, ab einer Spannung von über 1000 V spielt die Art des Stromes keine wesentliche Rolle mehr (23).

Folgende Formel dient zur Einschätzung des entstandenen Gewebeschadens, sie beschreibt die generierte Hitze:  $0,24 \times U^2 \times R$ .

Der Widerstand (R) ist in jedem Gewebe des Körpers ein anderer. Nervengewebe, Blutgefäße, Schleimhäute und die Muskulatur haben einen eher geringen Widerstand. Knochen dagegen einen Hohen.

Die Hauptdeterminante für die Einschätzung des Gewebeschadens ist die Spannung, daher werden diese Verletzungen nach Größe pro Höhe der Spannung eingeteilt (20).

*Hochspannungsstrom* – Dieser kann ‘echte Hochspannungsverletzungen’ oder ‘flash-Verletzungen’ erzeugen. Die echte Hochspannungsverletzung ist jene, welche durch ein Durchströmen des Körpers mit einer Ein- und Austrittsstelle des Stroms auf ihrem gesamten Weg Gewebeschäden anrichten kann. Hierbei handelt es sich um Spannungen von ca. 1000V oder höher, wobei der Kontakt mit Spannungen über 70.000V letal ist.

Oft kommt es bei Spannungen von ca. 1000V zu großflächigen Weichteil- und Knochennekrosen, die Amputationen zur Folge haben können. Die Muskelschädigung kann zu einer Rhabdomyolyse führen, welche die Nierenfunktion einschränken und zu einer Niereninsuffizienz führen kann. Hier muss therapeutisch aggressiv eingegriffen werden. Ein ausgedehntes Debridement sowie eine komplexe Wundbehandlung sind notwendig. Auch sind Myokardischämien mögliche Komplikationen von Stromunfällen. Eine häufige Todesursache ist jedoch der Atemstillstand (23).

*Blitzschlag* – Der Blitz ist ein gerichteter Gleichstrom. Dieser kommt zustande, wenn die elektrische Spannungsdifferenz zwischen einer Gewitterwolke und der Erde die Spannung der umgebenden Luft übersteigt. Die Stromspannung eines Blitzes kann 1 mio. V, die Stromstärke 200.000 A und die Temperatur 25.000°C übersteigen (23).

*Lichtbogen ,arc flash‘* – Hochspannungssysteme verursachen Lichtbögen, die, über den tangentialen Kontakt mit der um den Strom entstehenden Hitze, Brandverletzungen hervorrufen können. Dies nennt sich auch Überschlag. Bei dieser Art der elektrischen Verbrennung fließt kein Strom durch den Körper. Hier werden Körperoberflächen verletzt, die der entstehenden Hitze exponiert sind. Meist sind diese oberflächlichen Verbrennungen im Gesicht oder auf Händen. Es kommt allerdings auch vor, dass die Kleidung sich entzündet, in diesem Fall sind die entstehenden Verbrennungen dritten Grades tief und flächig durch die längere Expositionsdauer über Kleidungsstücke (23).

*Haushaltsstrom* – Niedrigstromspannungsverletzungen neigen dazu kleinflächige tiefe Kontaktverbrennungen zu erzeugen. Diese findet man an den Ein – und Austrittsstellen des Stromes. Der Wechselstrom im Haushalt führt nicht selten zu Nervenleitungsstörungen, die den kardialen Rhythmus beeinflussen und Arrhythmien auslösen können (23).

Bei durch elektrischen Strom verursachten Traumata, muss eine engmaschige Beobachtung und Diagnostik der Herzleitungsbahnen (24h-EKG-Überwachung) durchgeführt werden. Arrhythmien sollten frühestmöglich erkannt und therapiert werden, da diese unentdeckt unweigerlich zur Bildung von Emboli beitragen, welche oftmals Gefäße des Hirnkreislaufes verlegen und somit zu erheblichen Schlaganfällen führen können (23).

### **1.1.3 Chemische Verletzung**

Diese kommt hauptsächlich im Industriegebiet vor, kann allerdings auch im Haushalt durch unterschiedliche chemische Substanzen verursacht werden. Die durch ätzende Chemikalien verursachten Verbrennungen sind meist tiefe Koagulationsnekrosen, die zur Gänze entfernt werden müssen. Der korrosionsfördernde Anteil in aggressiven Chemikalien ist in seiner Gewebsschädigung nicht selbstlimitierend. Dies bedeutet, dass die weitere Schädigung nur durch die Entfernung der Noxe zu verhindern ist.

Laugen neigen dabei dazu tiefere Wunden zu verursachen als Säuren. Zement ist ein Beispiel für eine Laugenverbrennung. Flusssäure wird im industriellen Setting oft für Glasätz-Prozesse verwendet. Es verursacht eine kontinuierliche und tiefgreifende Verbrennung, die mit Calciumgluconat neutralisiert werden muss.

Die Initialtherapie bei chemischen Verbrennungsverletzungen ist immer dieselbe. Alle kontaminierten Kleidungsstücke müssen entfernt und die betroffene Stelle muss gründlich gespült werden. Auch die PatientInnen zu duschen, zeigt oft eine Reduktion der Tiefe der Wunde. Lackmuspapier kann verwendet werden, um die Entfernung der Chemikalie zu bestätigen. Bei Augenbeteiligungen sollte reichlich gespült werden und entsprechend behandelt werden (20,24).

Verschiedene Ursachen einer Verbrennung prägen das Outcome der Wundverhältnisse, welche wiederum das therapeutische Management beeinflussen. Daher ist es wichtig zu verstehen, wie sich eine Person die Verbrennungsverletzung zugezogen hat und mit welcher physiologischen Antwort der Körper reagiert, um angemessene Therapiemaßnahmen einleiten zu können (20).

## 1.2 Pathophysiologie einer Verbrennung

Der Grundbaustein für eine effektive therapeutische Intervention ist ein Verständnis der Pathophysiologie von Verbrennungen. Der Körper reagiert auf Verbrennungen sowohl lokal als auch systemisch. Die lokale Reaktion lässt sich durch die drei Zonen der Verbrennung nach Jackson beschreiben (s. Abb. 2) (25).

### 1.2.1 Lokale Reaktionen

Ein grundlegendes Verständnis für den histologischen Aufbau und die Physiologie der Haut ist essenziell für den adäquaten Umgang mit Brandverletzungen. Die Haut setzt sich aus unterschiedlichen Schichten zusammen (s. Abb. 1) (26).

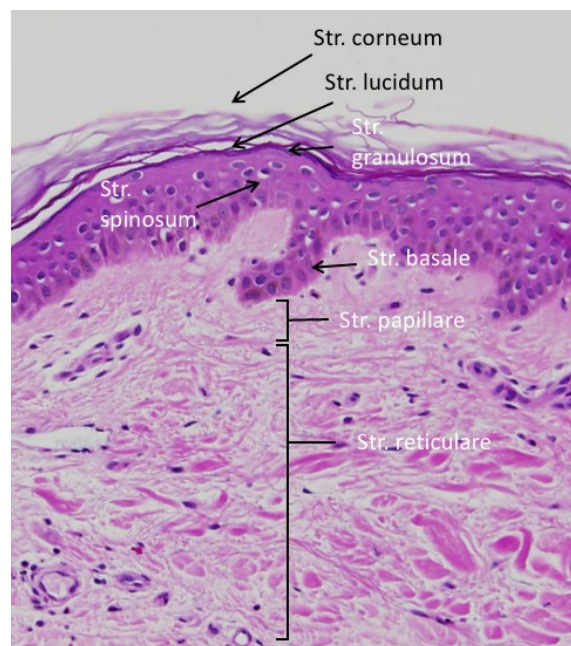


Abb. 1 Zellschichten der Kutis

Das Integumentum commune, die Hautdecke, setzt sich aus drei Schichten zusammen: Epidermis, Dermis und Subkutis.

Die Epidermis ist die oberflächlichste Schicht der Haut und besteht aus einem verhornten mehrschichtigen Plattenepithel (Stratum corneum bis Stratum basale). Darunter liegt der Bindegewebsanteil der Haut, die Dermis (Stratum papillare und reticulare). Gemeinsam bilden Epidermis und Dermis die Kutis, die obere Schicht der Hautdecke (s. Abb. 1). Darunter liegt eine Schicht aus Binde- und Fettgewebe, die Subkutis oder Tela subcutanea.

Zu den Hautanhangsgebilden zählen Verhornungsprodukte wie Haare und Nägel, aber auch Hautdrüsen wie Talg- und Schweißdrüsen.

Die Funktionen der Haut sind der Schutz vor dem Wasserverlust und vor dem Eindringen körperfremder Substanzen, dazu befinden sich Langerhans-Zellen als ‚first line defense‘ des angeborenen Immunsystems in der Epidermis. Eine weitere Funktion ist die Thermoregulation, welche über die Gefäßarchitektur und Schweißdrüsen erfolgt. Zusätzlich dazu schützen über der Basalmembran befindliche Melanozyten den Organismus vor den kanzerogenen UV-Strahlen der Sonne, dieser Schutz erfolgt über die Produktion von Melaninpigmenten (21,27). Die Haut ist auch metabolisch aktiv, da hier 7-Dehydro-Cholesterol durch die UV- und Wärmeeinwirkung der Sonnenstrahlen zu Cholecalciferol (Vitamin D<sub>3</sub>) umgewandelt wird (28).

Eine Verbrennungsverletzung beschädigt die Haut in einer zwiebelschalenartigen Form, welche von Jackson 1953 beschrieben wurde (25). Es wurden 3 Zonen der Verbrennungen wie folgt festgelegt (s. Abb. 2):

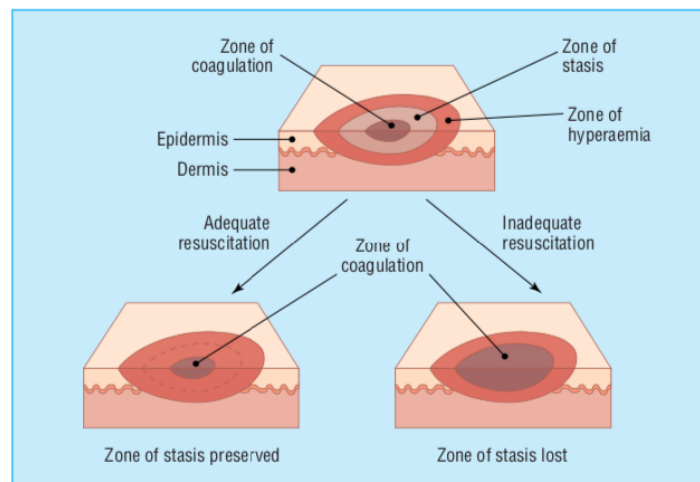


Abb. 2 Verbrennungszonen nach Jackson (20)

- Koagulationsnekrose-Zone:

Dies ist der zentrale irreversibel-zerstörte Nekrose-Bereich einer Verbrennung, dort werden enthaltene Proteine denaturiert und sie koagulieren (20).

- Stase-Zone:

Diese Nekrose-Zone wird zirkulär von der Stase-Zone umgeben.

Sie zeichnet sich aus durch eine verminderte Perfusion des betroffenen Gewebes und ist potenziell regenerationsfähig. Allerdings bleibt die Regeneration bei fehlender Intervention völlig aus und auch diese Zone nekrotisiert (20).

- Hyperämie-Zone:

Die äußerste Zone einer Verbrennungsverletzung wird vermehrt durchblutet, hier erfolgt in den meisten Fällen eine Regeneration des Gewebes. Sollte der Patient eine schwere Sepsis oder eine prolongierte Durchblutungsstörung erleiden, kann auch die Hyperämie-Zone zugrunde gehen (20).

Die Verbrennungsverletzung löst nach der direkten Proteindenaturierung die Ausschüttung von Entzündungsmediatoren aus, auch Sauerstoffradikale werden frei und schädigen das Endothel, wodurch sich die Nekrose ausweitet. Die Wunde ‚brennt nach‘ (21).

## **1.2.2 Systemische Reaktionen**

Erreicht die Verbrennung ein Ausmaß von über 20% der Körperoberfläche (KOF) reagiert der gesamte Organismus auf die Gewebeschädigung (20,21):

### **1.2.2.1 Kardiovaskulärer Effekt**

Die Gefäßwandpermeabilität wird erhöht, sodass Proteine und Flüssigkeit in das Interstitium gelangen. Es kann zum hypovolämischen Schock kommen, dabei leiden PatientInnen an Hypotonie, Tachykardie, Tachypnoe, auch nephrologische Symptome kommen vor von einer Oligurie bis zur Anurie (21).

Weiteres erfolgt eine Vasokonstriktion sowohl in den peripheren Gefäßen als auch in den Gefäßen des Splanchnikusgebietes, so wird die Darmperfusion erheblich beeinträchtigt (21). Therapeutisch kann dem, mit einer angemessenen Flüssigkeitszufuhr, entgegengewirkt werden (Parkland-Formel nach Baxter für Erwachsene:  $(4 \text{ ml z. B. Ringer-Laktat} \times \% \text{ VKOF} \times \text{kg KG}) / 24 \text{ h}$ ; siehe Kapitel 2.5) (20). So konnte in den letzten 80 Jahren die Inzidenz des Nierenversagens nach einer Verbrennung erheblich gesenkt werden (21).

### **1.2.2.2 Respiratorischer Effekt**

Die Inflammationsmediatoren verursachen eine Bronchokonstriktion, in schweren Fällen kommt es zu einer akuten respiratorischen Insuffizienz auch ‚Acute Respiratory Distress Syndrome‘ (ARDS) genannt. Hierbei handelt es sich um eine akute Lungenschädigung, welche zu einer alveolaren Flüssigkeitsansammlung führt, welche wiederum den Gasaustausch stark einschränkt und die Compliance der Lunge herabsetzt. Die Oxygenierung des Blutes wird erschwert. Therapeutisch ist die wichtigste Maßnahme die Behebung der Ursache. Zusätzlich dazu wird eine für die Lunge schonende Beatmung empfohlen (20). Eine Sauerstoffbehandlung mittels O<sub>2</sub>-Maske mit Reservoirbeutel ist bereits bei Verbrennungen von 10% der gesamten Körperoberfläche vorteilhaft. Indikationen für eine präklinische Intubation wären Kombinationstraumata mit hypovolämischen Schock, pulmonaler Insuffizienz und einer Vigilanzminderung (GCS<8) (29).

### **1.2.2.3 Metabolischer Effekt**

Während eines Verbrennungsschocks, bei dem die Sympathikusaktivität erhöht ist und Volumenrezeptoren stimuliert werden, können Angiotensin II und Vasopressin im Blut in hohen Konzentrationen gefunden werden. Diese Vasokonstriktoren, insbesondere Angiotensin II, können z. B. für die selektive Darm- und Schleimhautischämie verantwortlich sein, die eine Verschiebung von Endotoxinen und Bakterien aus dem Gastrointestinaltrakt in die Blutbahn verursachen könnten. Somit wird die Entwicklung einer Sepsis und eines Multiorganversagens begünstigt (30).

Zusätzlich werden Hormone wie Katecholamine, Glukagon und insbesondere Kortison vermehrt ausgeschüttet, welche einen Hypermetabolismus auslösen (21).

Der Grundumsatz kann sich um bis zu 300% steigern, dies hängt nicht ausschließlich mit der Hormonausschüttung zusammen, es wurde beispielsweise festgestellt, dass in den ersten 2-4 Wochen nach der Brandverletzung eine Umwandlung des weißen Fettgewebes zu braunem Fettgewebe bei Brandverletzten stattfindet, was ebenso zu einem Hypermetabolismus führen kann. Braunes Fettgewebe hat bekanntlich einen hohen Anteil an Mitochondrien und somit auch einen erhöhten Energieverbrauch als weißes Fettgewebe (31).

Die Steigerung des Grundumsatzes ist auch verbunden mit der Hypoperfusion des Darmes, welcher dadurch in seiner Funktion der Nährstoffabsorption geschwächt ist. Es wird empfohlen eine sofortige, zeitlich knapp begrenzte, parenterale Ernährung zu beginnen. So wird vorerst der Katabolismus reduziert und die Integrität des Darmes gewahrt (20). Allerdings sollte so bald als möglich die enterale Ernährung wieder eingeleitet werden, um die Verschleppung von Bakterien und Toxinen aus der Darmflora ins Blut zu verhindern. Bei einer Magenatonie sollte eine Duodenalsonde gelegt werden, da die parenterale Ernährung nur bei kompletter Dysfunktion des Gastrointestinaltraktes indiziert ist (32).

#### **1.2.2.4 Immunologischer Effekt**

Das Immunsystem wird unspezifisch gedrosselt. Diese Down-Regulation betrifft sowohl das humorale als auch das zelluläre Immunsystem (20). Vorerst ist die Immunantwort lokal begrenzt, denn Makrophagen werden an die betroffene Stelle angelockt und schütten durch ihre Degranulation Histamin aus. Histamin ist eines der Mediatoren, welche die Hyperpermeabilität der Gefäße in der Brandwunde steigern und zur Ödembildung beitragen. Weitere, nach einem thermischen Trauma, gesteigerte vasoaktive Substanzen wären Serotonin, Bradykinin, Prostaglandin und Leukotriene (s. Kapitel 2.2) (30,32).

#### **1.2.2.5 Nozizeptiver Aspekt**

Verbrennungen sind je nach Verbrennungsgrad unterschiedlich in ihrer Schmerzintensität. Eine Verbrennung dritten Grades ist weniger schmerzhaft als jene zweiten Grades, da eine vollständige Destruktion der kutanen nozizeptiven Rezeptoren der Nervenzellen erfolgt. Die Sedoanalgesie Brandverletzter ist ein wichtiger Therapiebestandteil, da nie der gesamte Körper einen einzigen Verbrennungsgrad aufweist. Von besonderer Bedeutung ist dabei

auch die Reduktion der schmerzbedingten Sympathikusaktivierung, welche bereits genannte Kreislaufkomplikationen mit sich bringen kann (29).

### **1.3 Diagnostik einer Verbrennung**

Bei großflächigen Verbrennungen erfolgt eine rasche Beurteilung der Vitalfunktionen nach dem ATLS®-Protokoll (ABCDE-Schema). Untersucht werden Atemwege und Atmung, Kreislauf und Blutungen.

Auch der neurologische Status unter Angabe des Glasgow-Coma-Scale-Wertes (GCS) der PatientInnen ist notwendig, wobei bei einem GCS-Wert von 8 oder darunter die endotracheale Intubation durchgeführt wird. PatientInnen sollten unter Kontrolle der Hypothermie vollständig entkleidet werden, um eine ganzheitliche Beurteilung der Verbrennung und möglicher anderer oberflächlicher oder tiefer Verletzungen sicherzustellen (18,33).

Hinweise auf das Vorliegen eines Inhalationstraumas sollten bei der Erstbeurteilung berücksichtigt werden. Darunter fallen Gesichtsverbrennungen, versengte Augenbrauen- und Nasenhaare, Husten mit rußigem Auswurf, Heiserkeit oder erhöhte Atemfrequenzen. Bestätigen lässt sich ein Verdacht auf Inhalationstrauma durch eine Bronchoskopie, so kann man die Diagnose sichern und den Schweregrad festlegen (33).

Verbrennungen werden nach dem Ausmaß der Ausdehnung der Hautschädigung und ihrer Tiefe in unterschiedliche Grade eingeteilt, beurteilt werden die Durchblutung, das Hautcolorit und die Nozizeption, somit auch das Ausmaß der Nervenschädigung.

Bei Blitztraumata können typische ‚farnkrautartige Tannenbaummuster‘ auf den betroffenen Hautarealen sichtbar sein, die Form der Wunde ist somit ebenso diagnostisch aussagekräftig (34).

Die prognostische Abklärung Brandverletzter erfolgt mittels zweier Scores, der Baux-Score und der ABSI-Score (Abbreviated Burn Severity Index).

*Baux-Score* – errechnet sich aus der Summe des PatientInnenalters und dem verbrannten KOF-Anteil in Prozent. Die Differenz zwischen 100 bzw. 110 und Baux-Score ergeben die Überlebenschancen (35).

*ABSI-Score* – berücksichtigt werden mehrere Faktoren: 3 Trauma-spezifische Parameter (die verbrannte Körperoberfläche, das Vorliegen eines thermischen Inhalationstrauma, die Verbrennungstiefe Grad  $\geq 3$ ) und 2 PatientInnen-individuelle Parameter (Lebensalter, Geschlecht). Somit ist dieser Score wesentlich genauer als der Baux-Score, lässt allerdings doch noch einige Faktoren außer Acht. Fehlende Parameter wären beispielsweise das Körpergewicht (Adipositas) oder Nikotin- und Alkoholabusus. Der ABSI-Score zeigt eine Verminderung der Überlebenschancen um 10-20% bei einem Score von 6-7 (29,36).

### 1.3.1 Tiefe

Die Bezeichnungen sind im deutsch- und englischsprachigen Raum etwas verschieden und werden in Tab. 2 angeführt. Die ausschlaggebenden Faktoren für die Tiefe einer Verbrennung sind unter anderem die Temperatur und die Dauer der Hitzeexposition.

<b>Verbrennungsgrade und ihre englischsprachige Bezeichnung</b>	<b>Wundgrund</b>	<b>Verbrennungstiefe</b>
I (superficial thickness burn)	Rötung, Schwellung, Schmerz	Oberflächliche Epithelschädigung ohne Zelltod
IIA (superficial partial thickness burn)	Blasenbildung, roter Untergrund, stark schmerzhaft	Schädigung der Epidermis und oberflächlicher Anteile der Dermis mit Sequestrierung
IIB (deep partial thickness burn)	Blasenbildung, heller Untergrund, schmerzhaft	Weitgehende Schädigung der Dermis unter Erhalt der Haarfollikel und Drüsenanhänge
III (full thickness burn)	Epidermis-Fetzen, Gewebe weiß, keine Schmerzen	Vollständige Zerstörung der Epidermis und Dermis

IV (fourth degree burn)	Verkohlung, Lyse	Zerstörung weitgehender Schichten mit Unterhautfettgewebe, eventuell Muskeln, Sehnen, Knochen und Gelenken
-------------------------	------------------	--

Tab. 2 Die Verbrennungsgrade des deutschsprachigen und des englischsprachigen Raumes (37)

Weitere wichtige Aspekte sind die Leitfähigkeit des Gewebes, die Hautdurchblutung und vorhandene isolierende Schichten wie Haare oder Hornhautauflagerungen.

Zwischen 44°C bis 55°C steigt der Zellschaden exponentiell, er verdoppelt sich mit jedem erhöhten Grad an Temperatur. Verbrennungen ersten und zweiten Grades geschehen bei einer Hauttemperatur von unter 45°C, wenn die Einwirkzeit im Bereich von Stunden ist. Im Vergleich dazu ist bei Temperaturen über 45°C bis 55°C lediglich eine Einwirkzeit von einigen Minuten ausreichend. Liegt die Temperatur in einem noch höheren Bereich reduziert sich die Einwirkzeit auf einige Sekunden (38).

Nach Davies et al. wurde ein Zusammenhang zwischen Temperatureinwirkung, subjektiver Beschwerden, und dem Auftreten der verschiedenen Verbrennungsgrade aufgezeigt. Es verursachen 8,4-13,4 J/cm<sup>2</sup> eine Rötung, bis 16 J/cm<sup>2</sup> eine Verbrennung zweiten Grades (partial thickness burn) und bis 19,7 J/cm<sup>2</sup> eine Verbrennung dritten Grades (full thickness burn) (39).

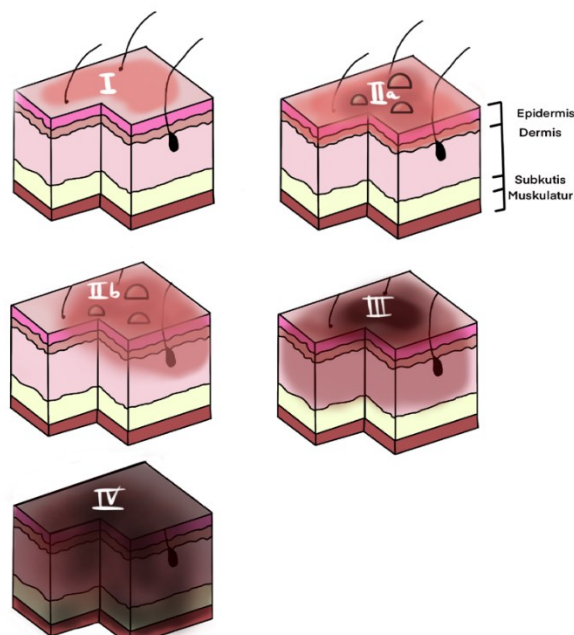


Abb. 3 Die Verbrennungsgrade (40)

Papp et al. konnten klinisch das Fortschreiten der Verbrennungstiefe in einem Verbrennungsmodell an Schweinen nachweisen. Je länger die Dauer der Hitzeeinwirkung, desto tiefer der Hautschaden. Zusätzlich weitete sich der Schaden bis zu 48h post-Brandverletzung in die Tiefe aus, der bereits oftmals erwähnte Nachbrenneffekt (s. Kapitel 2) findet statt (1).

### **1.3.2                    Ausmaß**

Der verbrannte Anteil der Körperoberfläche (KOF) wird als % der Gesamtkörperoberfläche angegeben. Um die Beurteilung zu objektivieren, werden unterschiedliche Hilfsmittel verwendet, darunter die Handflächenregel, Neunerregel nach Wallace, Lund Browder-Chart und die 3D-Computer assistierte Berechnung (40).

- **Handflächenregel:**

Die Handfläche des Patienten wird als 1% seiner gesamten KOF gesehen, anhand derer das Verbrennungsausmaß geschätzt werden kann. Doch führt diese Methode oft zur Überschätzung des Ausmaßes um ca. 10 – 20% (41).

- **Neunerregel nach Wallace:**

Die Neunerregel auch ‚Rule of nines‘ genannt, liefert gute Ergebnisse bei Patienten mit einem Körpergewicht zwischen 10 – 80kg. Die Neunerregel führt aber ebenso zu einer Überschätzung der Verbrennungsfläche bei über 80kg schweren Menschen und erhöhtem Body Mass Index (41).

- **Lund Browder Chart:**

Verschiedenen Altersgruppen werden Körperproportionen zugewiesen. Die Lund Browder Chart ist genauer als die Neunerregel, beachtet allerdings nicht die unterschiedlichen Körperbautypen oder deren Fettgehalte, auch werden die verschiedenen Gewichtsklassen außer Acht gelassen (41).

## 1.4 Verbrennungskrankheit

Überschreiten Verbrennungen eine Ausdehnung von 20% der gesamten KOF, führen sie zur sogenannten Verbrennungskrankheit mit möglichem Kreislaufchock, Sepsis und Organversagen. Die Symptomatik der Verbrennung ist nun nicht mehr lokal begrenzt, sie betrifft den gesamten Organismus. Es erfolgt die Freisetzung von Entzündungsmediatoren, die eine Kapillardilatation und eine erhöhte Permeabilität der Gefäßwände („capillary leak“) verursachen. Dadurch bildet sich ein interstitielles Ödem im gesamten Körper aus (42).

### 1.4.1 Pathophysiologie der Verbrennungskrankheit

Den Verlauf der Verbrennungskrankheit kann man in 4 Phasen einteilen.

Durch den massiven Flüssigkeits- und Proteinverlust gerät der Körper in der ersten Phase in einen hypovolämischen Schock mit Hypotension als Folge.

Diese Initialphase, auch Schockphase genannt, findet in den ersten 36-48h nach der Verbrennung statt und ist vom Verbrennungsausmaß abhängig. Sie kann eine lebensgefährliche Kreislaufinstabilität mit sich bringen, da sich durch das Kapillarleck und den negativen interstitiellen Gewebedruck die intravasale Flüssigkeit ins Interstitium verlagert. Die hämodynamischen Veränderungen und die Entwicklung eines hypovolämischen Schocks führen zum Abfall des Herzzeitvolumens, doch ist bereits vor einer messbaren Verminderung des intravasalen Volumens ein vermindertes Herzzeitvolumen erkennbar. Dies ist dem Anstieg des Afterloads der anfänglichen Kontraktion der Gefäße und dem dadurch erhöhten systemischen Gefäßwiderstand zuzuschreiben (43). Bei einem Verbrennungsausmaß von über 30% KOF senken sich Membranpotentiale der verbrannten und gesunden Zellen. Durch eine verminderte Funktionsfähigkeit der  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase, steigt die intrazelluläre Natriumkonzentration, die Zelle füllt sich durch den osmotischen Effekt mit Flüssigkeit und es entstehen Zellödeme im gesamten Organismus. Wird eine adäquate Schocktherapie (s. Kapitel 1.5) eingeleitet, können die Membranpotentiale innerhalb weniger Tage normalisiert und der erweiterte Zelluntergang verhindert werden (43). Dieser Aspekt spielt auch in der Minimierung des Nachbrennens eine bedeutende Rolle, die Flüssigkeitsgabe ist ein essenzieller Therapiebestandteil.

In der zweiten Phase, der Rückresorptionsphase, nimmt die Kapillarpermeabilität wieder ab. Die Flüssigkeiten aus Gewebsödemen können wieder rückresorbiert werden, allerdings entstehen über die verbrannte Hautoberfläche evaporative Wasserverluste. Diese Verluste erschweren die Einschätzung der angemessenen Volumentherapie, da sie oft unterschätzt werden (43).

Ab dem 7.Tag bis zum Wundverschluss sind die Wunden bakteriell besiedelt und die dritte Phase, die Inflammationsphase, beginnt. Die lokale Aktivierung der Gewebemakrophagen in der thermisch geschädigten Haut führt zur gesteigerten Freisetzung von Entzündungsmediatoren und proinflammatorischen Zytokinen, die Inflammation wird systemisch.

Die systemisch-inflammatorische Antwort (SIRS, systemic inflammatory response), welche durch die Verbrennung selbst ausgelöst wird, kann durch infektiöse Geschehnisse verstärkt werden. Verursacht wird sie zumeist durch das hypersensible Immunsystem und geht mit einem hypodynamen Kreislauf einher, bedingt durch einen niedrigen systemischen Gefäßwiderstand bei einem hohen Herzzeitvolumen. All diese Mechanismen machen den Organismus suszeptibel für Wundinfektionen und Sepsis (43,44).

Die vierte und letzte Phase, die Erholungs- und Rehabilitationsphase, beginnt nach der weitgehenden Abheilung der Wunden. Hier wird die verlorene Körpermasse durch den Katabolismus, den die Verbrennungskrankheit mit sich bringt, wieder aufgebaut. Im Vordergrund steht die Zunahme des Fettgewebes, da die Wiedergewinnung der Muskelmasse Monate bis Jahre dauern kann (43,44).

#### **1.4.2 Komplikationen der Verbrennungskrankheit**

Als Folge des zuvor genannten intravasalen Flüssigkeitsmangel kann es zu einer Oligurie oder Anurie kommen. Die Nierenfunktion kann auch durch das Auftreten einer Hämolyse so beeinträchtigt werden, dass durch die daraus resultierende Hämoglobinurie eine Niereninsuffizienz entstehen.

Zusätzlich dazu leidet der Körper, wegen der geschädigten Hautbarriere und durch die verstärkte Verdunstung, nicht nur an Flüssigkeits- sondern auch an Wärmeverlust.

580 kcal pro Gramm verdunstetes Wasser gehen an Wärme verloren, zusätzlich dazu findet im Postaggressionsstoffwechsel ohnehin bereits ein erhöhter Energieverbrauch statt. Es bedarf einer gesteigerten Kalorien- und Flüssigkeitszufuhr (44).

Der Postaggressionsstoffwechsel ist eine physiologische Reaktion auf große Traumata, dazu zählen unter anderem auch großflächige Verbrennungen. Entwicklungsgeschichtlich ist das Ziel dieser Stoffwechsellage die Bereitstellung von Nährstoffen für die wichtigsten Organe (z.B. das Gehirn) des geschwächten Organismus. Da der Körper im geschwächten Zustand nicht in der Lage ist sich Nahrung zuzuführen, kommt es zu einer ‚Glucoseverwertungsstörung‘. Alle peripheren Gewebe, die mit Aminosäuren oder Fetten versorgt werden können, werden insulinresistent und überlassen somit die geringen Kohlenhydratreserven dem Gehirn, da dieses ausschließlich Glucose verwerten kann (45).

Es kommt zum Katabolismus mit erhöhten Katecholaminkonzentrationen, erhöhtem Kortisol und Glukagon. Der Katabolismus steigert den Proteinabbau und braucht vitale Substanzen des Organismus auf, da der Körper über keine Proteinspeicher verfügt. Dieser Stress, dem der geschwächte Körper ausgesetzt ist, kann akute Ulzerationen im Magen-Darm-Trakt verursachen. Diese können lebensbedrohlich sein und sind eine gefürchtete gastrointestinale Komplikation der Verbrennungskrankheit (45).

Die häufigste Todesursache nach großflächigen Verbrennungen ist die Sepsis. Dabei ist sie meist vom Wundgrund oder der Lunge ausgehend. Die auslösenden Keime sind meist gramnegativ. Da Brandverletzten die Hautbarriere fehlt und somit das Eindringen von Mikroorganismen erleichtert ist, entsteht nahezu immer eine Bakteriämie. Diese kann wieder abklingen und muss nicht obligat symptomatisch verlaufen. Die Septikämie bezeichnet die schwere Allgemeininfektion und ist eine stärkere Form der Bakteriämie. Sie ist schwer festzustellen, da der Organismus durch die Freisetzung der vielen Entzündungsmediatoren ohnedies bereits zahlreiche Kriterien der Sepsis erfüllt. So haben Brandverletzte Fieber (ca. 38,5 °C), sind monatelang tachykard und tachypnoeisch und haben durch die Brandverletzung selbst oft veränderte Leukozytenzahlen. Die Leukozytose ist daher nicht zwingend ein Anzeichen für eine beginnende Sepsis, daher sind festgelegte Kriterien wie der SOFA-Score in diesen Fällen weniger hilfreich (46).

Bei der *American Burn Association Consensus Conference to Define Sepsis and Infection in Burns* wurde ein hier hilfreiches Übereinkommen getroffen (47).

Folgende Kriterien rechtfertigen die Dokumentation einer Sepsis:

- Brandwundenbiopsie mit über  $10^5$  Organismen/g Gewebe, histologische Hinweise auf die Invasion vitalen Gewebes
- Positive Blutkultur
- Harnwegsinfekt mit über  $10^5$  Organismen/ml Urin
- Lungeninfektion

Zusätzlich sollten mindestens 5 oder mehr der folgenden Kriterien zutreffen:

- Tachypnoe
- Paralytischer Darmverschluss
- Hyper-, Hypothermie
- Veränderung der Bewusstseinslage
- Thrombozytopenie
- Leukopenie, -zytose
- Azidose oder Hyperglykämie

Eine weitere Komplikation der Verbrennungserkrankung ist die Ateminsuffizienz. Eine Pneumonie im Verlauf der Erkrankung oder Inhalationstrauma (IHT) können Gründe für ein ARDS oder eine globale respiratorische Insuffizienz sein.

Definiert wird das Inhalationstrauma als Schädigung des gesamten Atemtraktes durch chemische Noxen oder durch das direkte thermische Trauma. Die Letalität steigt um 20% bei einem IHT, steigt um 40% bei einer Pneumonie und um 60% bei einer Pneumonie mit vorangegangenem IHT. Die genaue klinische Untersuchung und das Ergründen des Unfallherganges sind aufschlussreiche diagnostische Mittel. Beispielsweise sind Gesichtsverbrennungen, angesengte Nasenhaare, Husten oder rußiges Sputum Hinweise für ein IHT. Die Diagnosesicherung erfolgt nur mittels Bronchoskopie. Man kann tracheale oder bronchiale Ulzerationen erkennen, nekrotische Veränderungen und Ödeme sowie eine gesteigerte sekretorische Aktivität (48).

Eine Komplikation bei zirkulären Extremitätenverbrennungen ist die Gefahr der Entstehung eines Kompartmentsyndroms. Hierbei handelt es sich um das Vorliegen eines erhöhten Gewebedrucks in einem, durch den Hautmantel oder Muskelfaszien, begrenzten Raum. Durch diese Druckerhöhung wird die Perfusion des Gewebes beeinträchtigt und führt zu Muskel-, Organ-, Gewebeuntergang (49).

## **1.5 Therapie einer Verbrennung**

### **1.5.1 Volumentherapie**

Die Volumentherapie erfolgt mittels großlumiger Kanülen. Nach dem Baxter-Parkland-Schema werden in den ersten 24h beim Erwachsenen 4ml/kg Körpergewicht/% verbrannter KOF einer kristalloiden Lösung (z.B. Ringer-Laktat-Lösung) verabreicht. Allerdings sollte diese Formel nur als Faustregel gelten, denn der tatsächliche Volumenbedarf muss an die individuelle kardiorespiratorische Situation angepasst werden. Wichtig ist es einen Zentralvenenkatheter zu setzen, um die Messung des Zentralvenendruckes zu ermöglichen, anhand dessen erfolgt die Anpassung der Flüssigkeitszufuhr. Die Gabe kolloidaler Lösungen soll in den ersten 24 Stunden vermieden werden, da durch den ‚capillary leak‘ die Proteine in das Interstitium gelangen und osmotisch Flüssigkeit mit sich ziehen würden, was zur weiteren Erniedrigung des intravasalen Volumens führen würde (44).

Ab dem zweiten posttraumatischen Tag kann die Gabe von Humanalbumin in Betracht gezogen werden, da sich die Kapillarpermeabilität wieder normalisiert. Es sollen über 24h wechselnd 5% Humanalbumin/kg/%verbrannter KOF und 50ml Ringer-Laktat-Lösung/kg verabreicht werden. Es kann trotz sorgfältiger Beobachtung der Brandverletzten zu einer Volumenüberladung kommen, dies kann, durch das entstehende Lungenödem, eine respiratorische Insuffizienz zur Folge haben (44,50,51).

Bei kardiopulmonaler Instabilität muss vorsichtig mit der Gabe von gefäßverengenden Medikamenten umgegangen werden. Diese können durch die Vasokonstriktion das Fortschreiten der Brandverletzung verursachen, der Nachbrenneffekt wird verstärkt. Zusätzlich dazu kann die Perfusion der Niere in Mitleidenschaft gezogen werden, daher versucht man in den ersten 24h auf die Gabe von Katecholaminen zu verzichten und die Volumentherapiemöglichkeiten auszuschöpfen (44,50).

### **1.5.2 Therapie des Wärmeverlusts**

Verletzte werden umgehend durch ErsthelferInnen von ihrer Kleidung im Bereich der Brandverletzung befreit, um eine weitere Hitzeeinwirkung auf die beschädigte Haut zu verhindern. Durch die beschädigte Haut soll der Wärmeverlust eingedämmt werden, dies erfolgt mittels einer Wärmedecke aus wärmeisolierender Alufolie, mit der die Betroffenen

vor Ort abgedeckt werden (51). Im Verbrennungszentrum wird die Zimmertemperatur auf 28-32°C angehoben, auch können warme Infusionen verabreicht werden (44).

### 1.5.3 Schmerztherapie

Eine suffiziente Sedoanalgesie ist von großer Bedeutung, da Brandverletzte meist unter starken Schmerzen leiden (s. Tab. 3). Wie bereits beschrieben, möchte man die Katecholamin-induzierte Vasokonstriktion verhindern, unter anderem, um die Wundheilung nicht zu verzögern. Eine inadäquate Analgesierung nach einer flächigen Bandverletzung begünstigt demnach den Nachbrenn-Effekt. Außerdem führen Schmerzen zu Katabolismus, welcher zu einer verminderten Immunabwehr führt, dies erhöht dann die Infektionssuszeptibilität. Daher ist das Ziel den PatientInnen einen schmerzfreien, stressabgeschirmten Behandlungsverlauf zu ermöglichen ohne eine Langzeitnarkose einzuleiten (32).

Dauer der Analgosedierung	Substanzen
Kurzzeitanalgosedierung (<24h)	Propofol oder Midazolam-Boli + Remifentanil
Mittellange Analgosedierung (<3d)	Stabiler Patient: Propofol oder Midazolam + Remifentanil/Sufentanil + ggf. Clonidin  Instabiler Patient: S-Ketamin als Sedativum
Langzeitanalgosedierung (>3d)	s. mittellange Analgosedierung

Tab. 3 Beispiel für eine Analgosedierung (32)

### 1.5.4 Ernährungstherapie

Unter Beachtung des Hypermetabolismus, sollten in der Postaggressionsphase 3000-4000 kcal pro Tag zugeführt werden. Es ist im weiteren Verlauf auch eine erhöhte Proteinzufuhr notwendig (45). Der Kaloriengehalt der Ernährung sollte bei 4,5kcal/g sein und die Eiweißmengen sollten bei ca. 1-2g/kg Körpergewicht/Tag (32).

### **1.5.5 Antibiotikatherapie**

Brandverletzte sollten in einem Isolierzimmer untergebracht sein, bei allen Maßnahmen sollte aseptisch vorgegangen werden. Eine nachgewiesene Wundinfektion, im Falle Brandverletzter meist mit gramnegativen Bakterien (z.B. *Pseudomonas aeruginosa*), wird nach erfolgtem Antibiogramm mit entsprechenden Antibiotika behandelt. Von einer Antibiotika-Prophylaxe wird abgeraten, da Brandwunden initial durch das Trauma steril sind (44).

### **1.5.6 Escharotomie**

Die Behandlung eines drohenden Kompartmentsyndroms erfolgt anfangs meist konservativ. Die jeweilige Extremität wird gekühlt und angehoben, um eine Druckentlastung zu erreichen. Eine antiphlogistische Therapie wird eingeleitet und regelmäßige Kontrollen werden durchgeführt, um bei einer weiteren Verschlechterung rasch die chirurgische Therapie im Sinne einer Escharotomie oder einer Dermatofasziotomie durchführen zu können.

Bei der Escharotomie handelt es sich um die Durchtrennung der nekrotischen Haut bis ins subkutane Fettgewebe, während bei einer Dermatofasziotomie eine zusätzliche Spaltung der Muskelfaszie erfolgt. Dabei wird die Wiederherstellung einer ungestörten Perfusion der Extremität angestrebt. Die Haut und Muskelfaszien werden gespalten um eine Druckentlastung zu erlangen, anschließend wird die Wunde offen behandelt (44).

### **1.5.7 Lokale Wundversorgung**

Die avitalen Areale der Verbrennungswunde selbst werden vorerst debridiert und mit antiseptischen Oberflächentherapeutika wie Fettgaze und Betaisodona-Tücher versorgt. Oft werden auch nekrotische Hautbezirke abgetragen und anschließend mit einer Kunsthaut oder einem Spalthauttransplantat abgedeckt. Die Verzögerung einer Nekrosektomie steigert die Infektionsgefahr, weshalb sie bereits am dritten posttraumatischen Tag durchgeführt werden sollte (44).

## 2 Das Nachbrennen und seine Therapiemöglichkeiten

Um die Diagnose und Therapie von Verbrennungen zu verbessern, ist es essenziell ein besseres Verständnis für die Tiefe und Ausdehnung der Wunde zu entwickeln.

1953 hat Douglas Jackson, wie oben erwähnt, die Zonen der Verbrennungswunde definiert (s. Abb. 2). Die Nekrose-Zone im Zentrum der Verbrennung ist meist irreversibel, dagegen ist der durch den Nachbrenn-Effekt verursachte Sekundärschaden in der Stase-Zone mit der adäquaten therapeutischen Intervention reversibel (52).

Wie DeCamara et al. (53) und Watts et al. (54), konnten Papp et al. (1) an einem neuen Verbrennungsmodell das zeitlich abhängige Fortschreiten einer Verbrennungswunde – den Nachbrenn-Effekt – nachweisen. Bei diesem neuen Verbrennungsmodell wurden Schweine ventral an 8 Quadraten mit einem Messingblock verbrannt. In früheren Studien wurde die dorsale Haut der Schweine verwendet, welche durch ihre Dicke nicht mit der menschlichen Haut vergleichbar ist. Vielmehr eignet sich die Haut im abdominellen Bereich der Schweine, um eventuelle Rückschlüsse auf die menschliche Haut ziehen zu können.

Die oben genannten Verbrennungsareale unterscheiden sich in der Dauer der Hitzeexposition und werden danach in unterschiedlichen Zeitabständen histologisch untersucht (1).

Es stellt sich heraus, die Verbrennungen bleiben bei geringer Dauer der Hitzeeinwirkung oberflächlicher als bei längeren Einwirkzeiten. Alle Verbrennungsareale waren zusätzlich im Vergleich zur unversehrten Kontrollfläche verdickt.

Daraus erschließt sich, dass die Evaluierung der Verbrennungstiefe im frühen Stadium nach der Hitzeeinwirkung meist inkorrekt ist, da sich die Verbrennungstiefe bis zu 72h lang nach Einwirkung der Noxe ausweiten kann (55).

Diese Progression der Verbrennungswunde kann sich in der regionalen und in der systemischen Reaktion des Körpers widerspiegeln; auch die therapeutische Intervention, um Funktion, Ästhetik und Lebensqualität wiederherzustellen, kann negativ beeinflusst werden. Eine größere und tiefere Verbrennungsverletzung erhöht Komplikationen und die Morbidität (56).

## 2.1 Autophagie, Apoptose und deren Modulation

Die Autophagie und Apoptose in verbranntem Gewebe scheinen eine wichtige Rolle in der Pathophysiologie als auch in der Therapie einer Verbrennungsverletzung zu spielen.

Durch den Prozess der Autophagie kann eine Zelle ihre Bestandteile abbauen und wiederverwerten (57). In sogenannten Autophagosomen werden beschädigte Organellen, defekte Proteine und zytosolisches Material abgebaut. Die Aktivierung erfolgt durch Nährstoffmangel, Wachstumsfaktoren und Hypoxie. Die mTOR-Kinase und ATG-Proteine regulieren die Autophagie (7). Dieser Signalweg, auch PI3K/AKT/mTOR-Signalweg (s. Abb. 4) ist ein intrazelluläres System, welches für die Zellzyklus-Regulation von großer Bedeutung ist. Phosphatidylinositol-3-Kinasen (PI3K) werden über die Ligandenbindung an, in der Plasmamembran befindlichen, Rezeptor-Tyrosinkinasen aktiviert. Aktive PI3K katalysieren die Bildung von Phosphatidyl-3,4,5-Triphosphat (PIP3), das im weiteren Verlauf die Proteinkinase AKT aktiviert. AKT kann die Apoptose hemmen und hemmt auch über die Aktivierung von mechanistic/mammalian Target of Rapamycin (mTOR) die Autophagie (58). MTORC1, eine Untergruppe der mTOR-Kinasen, hemmt die Formation von Phagophoren. Phagophoren sind initial eine Doppellipidmembranschicht, diese stellt sich schalenförmig konkav dar. Schließt sich diese Membran zu einer Kugel zusammen, nennt man sie auch Autophagosom, dort findet die Autophagie statt; lysosomale Hydrolasen bauen dort Zellbestandteile ab, sollten diese Fehler in ihrer Form oder Funktion haben (59); diese Bestandteile der Zelle können recycelt und vom Organismus wiederverwendet werden (60). Die Autophagie ist also zuständig für die Renovierung und Homöostase der Zellen, sie kann auch als Überlebensmechanismus in Hungerperioden oder bei gestressten Zellen dienen (7,61).

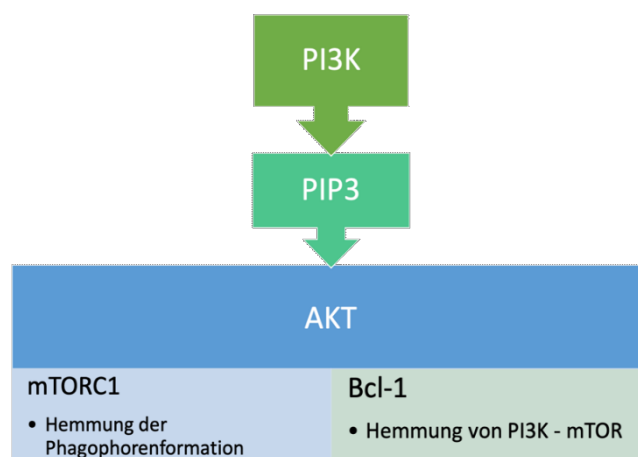


Abb. 4 PI3K/AKT/mTOR-Signalweg

2010 wurde erstmals vermutet, dass die Autophagie eine Rolle in der Entwicklung des Nachbrenneffekts spielen könnte, doch es gab dafür noch keine wissenschaftlichen Nachweise (62).

Tan et al. fanden 2013 eine Zunahme der Autophagie im Vergleich zur Apoptose in den Haarfollikel von Mäusen 2 – 24h nach einer Comb-Modell-Verbrennung. Daraus schloss man, dass beide Prozesse zu unterschiedlichen Zeitpunkten am Zelltod in der Stase-Zone beteiligt sind. So sollte je nach Zeitpunkt auch die Therapie angepasst werden. Die Autophagie findet früher als die Apoptose statt, daher sollte in frühen Stadien einer Verbrennungsintervention die Einflussnahme auf den Vorgang der Autophagie im Vordergrund stehen. Bereits 2h nach der Verbrennung konnte im Haarfollikelepithel mittels immunhistochemischen Untersuchungen die Autophagie nachgewiesen werden. 12h post-Verbrennung erreichte sie ihren Höhepunkt und klang danach wieder ab. Die Apoptose fand bereits nach 6h in geringem Ausmaß im Stratum epidermis statt und nahm langsam zu (52). Die gemessenen Biomarker waren Beclin-1 für die Autophagie und Bax (Bcl-2-assoziiertes X-Protein) für die Apoptose.

Beclin-1 ist das Säugetierortholog zum ATG6/Vps30-Protein in Hefezellen; es ist ein Teil eines der PI3K-Komplexe und dient somit in vivo als Autophagie-Biomarker. Hier wird die mTOR-Kinase durch PI3K gehemmt, so kann die Produktion der Doppelmembranen für Autophagosomen stattfinden.

Bcl-Proteine (B-cell-lymphoma-protein) sind eine Familie von Regulatorproteinen, die für die Apoptose zuständig sind (57,63).

Zu dieser Familie zählt das anti-apoptotische und protoonkogene Bcl-2. Es deaktiviert Beclin-1 mit seiner Bindung daran und verhindert somit auch die Autophagie. Ein proapoptotisches Protein der Bcl-Familie wäre das Bax-Protein, dieses wirkt auch Autophagie-fördernd (63).

Tan et al. haben hohe Mengen an Bcl-2 und niedrige Mengen an Bax nach der Verbrennung festgestellt. Das sollte bedeuten, die Apoptose und Autophagie sind anfänglich gehemmt und werden erst mit der späteren Steigerung von Bax-Proteinexpressionen aktiviert. Dieser Widerspruch zwischen Theorie und Studienergebnis kann durch die unterschiedlichen Schwellen der Aktivierung von Autophagie und Apoptose erklärt werden. Erhöhte Bcl-2-Mengen deuten darauf hin, dass Beclin-1 nicht daran gebunden ist und somit über die Bindung an PI3K die Autophagie antreiben kann (7,64).

Xiao et al. stellten fest, Autophagie-Prozesse sinken zu Beginn nach einer Verbrennung und steigen erst nach 24h wieder an, waren allerdings trotzdem geringer ausgeprägt als in der normalen Haut (8).

Die gemessenen Biomarker sind LC3 und Beclin-1 für die Autophagie, für die Quantifizierung der Apoptose wurde ein „terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) assay“ verwendet. 1992 wurde diese Methode erstmals beschrieben (65). Im TUNEL-Assay werden die, während der Apoptose freiwerdende Hydroxy-Gruppen der DNA durch Enzyme an markierten Nukleotiden gebunden und fluoreszierend unter Mikroskopen sichtbar. Hier wurden nach 6h bereits TUNEL-positive Zellen gefunden. Deren Zahl stieg um das 3,7-fache bis zu 48h nach der Verbrennung an und ebte danach wieder ab (66).

2006 haben Gravante et al. (67), basierend auf Erkenntnissen von Cassuto et al. (68) und Jeschke et al. (69), die Apoptose in Zusammenhang mit Verbrennungswunden gebracht. Es wurde vermutet, dass die Haut der Ratten mit tiefen Verbrennungen progrediente Ischämien auf Grund von Vasokonstriktion und Thrombosen aufzeigen, dies ist suggestiv für laufende apoptotische Prozesse. Gravante et al. fanden mittels TUNEL-Assay apoptotische Vorgänge in 44% der dermalen Zellen in humanen Brandverletzungen (Grad IIB). 13 Tage lang post-Verbrennungsverletzung waren Apoptose-Zellen nachzuweisen.

Diese Daten untermauern ältere Studien, welche den Fund von apoptotischen Vorgängen in Verbrennungen bereits aufzeigen (70,71).

Die Versuche von Xiao et al. zeigten mehr apoptotische Zellen in den tieferen Verbrennungswunden als in der gesunden Haut oder bei leichten Verbrennungen ersten Grades (8).

Giles et al. fanden eine Korrelation zwischen der direkten Applikation von c-Jun-Inhibitoren bei Grad III – Verbrennungen (Mäuse) und einer verbesserten Re-Epithelialisierung und Reduktion der Apoptose-Aktivität 24h post-thermischen Traumas (62,72).

Diese Funde könnten darauf hindeuten, dass die Inhibierung von apoptotischen Vorgängen in der Stase-Zone einer Brandverletzung die Wundheilung verbessert.

1996 – 2000 haben Godar et al. die durch Phototraumata ausgelöste Apoptose nach ihrem zeitlichen Auftreten eingeteilt:

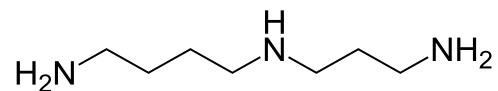
Die sofortige Apoptose, welche binnen 30min auftritt und keine posttraumatische Proteinbiosynthese für den Heilungsprozess benötigt. Die intermediäre Apoptose, welche

zwischen 30min und 4h auftreten kann und durch die Vernetzung der Todesrezeptoren angeregt wird. Todesrezeptoren sind Proteine, welche die Apoptose intrazellulär, transmembranös und extrazellulär triggern können.

Die verspätete Apoptose tritt nach 4h auf und benötigt zur Regeneration eine post-traumatisch stattfindende Proteinbiosynthese (73–75).

Nach Shupp et al. kann dieses Konzept auch auf Verbrennungen unterschiedlichster Genese ebenso angewandt werden. Die verspätete Apoptosereaktion des Gewebes ist beiträgend zum Fortschreiten der Brandverletzung. Somit wäre die logische Behandlungsstrategie diesen Apoptose-Vorgängen mit bestimmten Substanzen auf der Ebene ihrer Signalkaskaden entgegenzuwirken oder sie gar zu verhindern (62).

### 2.1.1 Spermidin



*Abb. 5 Strukturformel – Spermidin*

Spermidin ist ein Polyamin und wurde erstmals von Philipp Schreiner 1870 aus der männlichen Samenflüssigkeit isoliert (76). Mittlerweile wurde nachgewiesen, dass Spermidin in und um Zellkerne aller Zellarten vorkommt (77).

Madeo et al. konnten feststellen, dass Spermidin das Leben verschiedenster Zellen und Tiere verlängert. Spermidin, als ein „Caloric Restriction“-Mimetikum (CRM), ahmt den positiven Effekt einer beschränkten Kalorienzufuhr nach (11). Fasten oder eine kalorische Restriktion über 24-48h fördert eine Verbesserung der Autophagie, durch eine Stimulation von Sirtuin-1 (Sirt1). Sirt1 ist eine NAD<sup>+</sup>-abhängige Deacetylase, sie tauscht eine Acetylgruppe mit H<sup>+</sup> an Autophagie-Genen (ATG5, ATG7) und LC3 aus und induziert so den Prozess der Autophagie (78).

Weitere beobachtete Effekte sind Verminderung der Körpertemperatur, geringerer oxidativer Stress oder auch eine Erniedrigung der Konzentration von Zytokinen wie TNF- $\alpha$  (79).

Polyamine, wie Spermidin und Spermin, spielen eine wichtige Rolle bei zellulären Vorgängen wie Zellwachstum, Zellproliferation und Gewebsregeneration. Sie binden und stabilisieren die DNA und RNA, haben eine antioxidative Wirkung, modulieren Enzymfunktionen und sind notwendig für die Regulation der Translation. Außerdem wurden Spermidin weitere Charakteristika nachgewiesen; dazu zählen anti-inflammatorische

Eigenschaften, sowie eine positive Veränderung der Proteostase und der Aktivität der Chaperone. Die mitochondriale Funktion wird verbessert und geschützt und der Stammzellalterung wird entgegengewirkt. Es konnte weiteres bestätigt werden, dass eine zusätzliche Zufuhr von Spermidin altersassoziierten Erkrankungen (z.B. kardiovaskuläre, neurodegenerative Krankheiten, maligne Entartungen) ebenso entgegenwirken kann (11).

In vorangegangenen Tierversuchen wurde in der Histologie gezeigt, dass es durch die Spermidin Applikation (lokal und systemisch), zu einer verminderten Schädigung der Haut (tiefe Dermis) und zu einer verminderten Ödembildung im Bereich der angrenzenden Muskulatur (im Vergleich zur Kontrollgruppe) kam (11). Ito et al. stellten in vitro eine Beschleunigung der Wundheilung durch die Spermidinapplikation fest (81).

Tuca et al. konnten mit der intraperitonealen und topischen Anwendung von Spermidin bei Ratten eine Abnahme der Ödembildung feststellen, auch konnte die Kollagenfaserschwellung reduziert werden (12).

### 2.1.2 Rapamycin

Rapamycin ist ein Makrolid Antibiotikum, produziert von *Streptomyces hygroscopicus*. Primär wurde es als Antimykotikum, gegen *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* und *Aspergillus fumigatus*, entwickelt.

Es besitzt immunsuppressive und antiproliferative Eigenschaften. Rapamycin bindet FKBP-12, dieser Komplex

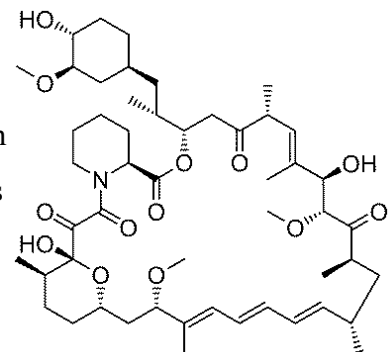


Abb. 6 Strukturformel – Rapamycin

kann mTOR inhibieren und auf diesen Weg die weitere Phosphorylierung von P70S6K, 4E-BP1 und anderen translations- und transkriptionsrelevanten Proteinen verhindern. Es hemmt die T-Zell-Proliferation, induziert von Antigenen, mitogenen Lektinen, Alloantigenen und Crosslinking der T-Zell Oberflächenmarkern mit monoklonalen Antikörpern. Zusätzlich werden andere Proteine, die einen Einfluss auf die Transkription, die Translation und den Zellzyklus haben, indirekt gehemmt (10).

Xiao et al. konnten zeigen, dass Rapamycin zu einer Verbesserung der Autophagie in Verbrennungswunden führt. Es konnte nachgewiesen werden, dass Rapamycin die Autophagie, über eine Hemmung der mTOR-Kinaseaktivität, induziert. Weiteres konnte beobachtet werden, dass es zu einer schnelleren Re-Epithelialisierung kommen kann (8).

### 2.1.3 Hydroxycitrat

Hydroxycitrat ist, wie Spermidin, ein CRM; es wird wie dieses durch Kurzzeitfasten vom Körper gebildet; ist ein kompetitiver Inhibitor der ATP-Citrat-Lyase, welche wiederum ein Enzym zur Bildung von zytosolischen Acetyl-CoA ist (15).

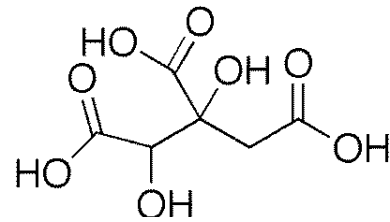


Abb. 7 Strukturformel – Hydroxycitrat

Durch die Konversion von LC3 I zu LC3 II, welches dann Autophagosomen rekrutiert, und durch die Inhibition der Lipid- oder Steroidbiosynthese wird die Autophagie stimuliert (16).

### 2.1.4 Dimethylsulfoxid

Dimethylsulfoxid (DMSO) ist ein organisches Lösungsmittel und wurde 1867 erstmals synthetisiert (82).

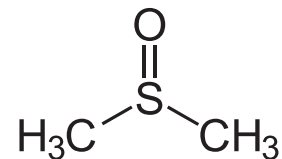


Abb. 8 Strukturformel – DMSO

In den späten 1950er Jahren wurde die Anwendung des kleinen Moleküls rasch vorangetrieben. Nun wird es in der Zellbiologie als Lösungsmittel für Arzneimittel verwendet (83), fungiert als Kryoprotektor (84,85) und kann Biomembranen durchdringen (86). DMSO ist auch ein Hydroxyl-Radikalfänger (87), fördert Zellfusionsmechanismen (88–90), und ist ein Induktor von Zelldifferenzierungsprozessen (91).

Guo et al. beschreiben in ihrer Studie die Vorteile der Gabe von niedrig konzentrierten DMSO für die Wundheilung bei diabetischen und nicht-diabetischen Ratten nach einer zirkulären Hautexzision. Es stellt sich heraus, dass eine Wundaufgabe aus Filterpapier mit NaCl-verdünntem DMSO die Wundheilung und Fibroblastenproliferation unterstützt. DMSO fördert den Wundverschluss, die Kollagensynthese und fördert auch indirekt die Keratinozyten-Migration über die vermehrte TGF- $\beta$ 1-Sekretion von Fibroblasten. Erkennt

wurde der indirekte Einfluss von DMSO auf die Keratinozytenmigration durch die Längenzunahme der Epithelzunge und die erhöhte TGF- $\beta$ 1-Expression (92).

Die Aktivierung des AKT/mTOR-Signalweg in Fibroblasten konnte festgestellt werden. DMSO steigert die Phosphorylierung von AKT und mTOR, fördert die Bildung von aktiven eIF4F-Komplexen und verstärkt die Protein-Translation (92). Die eIF4F-Komplexe erleichtern das Andocken der Ribosomen an das 5'-Ende der mRNA über den eIF4E-Anteil des Komplexes, so kann die Translationsaktivität in Zellen gesteigert werden.

Pielesz et al. konnten erhöhte Biomarker für eine DMSO-bedingte Verstärkung des Regenerationsprozesses in Brandwunden entdecken. Da DMSO leicht membrangängig ist und die Zellfusion fördert, wird vermutet, dass es den Wasserabtransport über Membranproteinporen unterbinden könnte. DMSO okkludiert die Poren und verhindert somit in Brandverletzungen den zusätzlichen Flüssigkeitsverlust. Die dafür benötigte DMSO-Konzentration muss noch weiter erforscht werden (93).

### 2.1.5 Nicotinamid

Nicotinamid, auch Vitamin B3, ist ein wesentlicher Bestandteil des Nicotinamidadenindinukleotid ( $\text{NAD}^+$ ).  $\text{NAD}^+$  ist ein Coenzym, welches an zahlreichen Redoxreaktionen des Organismus beteiligt ist. Ein hohes Redoxpotential besteht, wenn das Konzentrationsverhältnis  $\text{NAD}^+/\text{NADH}$  groß ist (13,14).  $\text{NAD}^+$  aktiviert auch Sirtuin-1, welches die zelluläre Gesundheit und Lebensdauer positiv beeinflusst. Ein Grund dafür ist, dass  $\text{NAD}^+$  und Sirtuin-1 als Schlüsselenzyme an der Autophagie und als Teil davon an der Mitophagie beteiligt sind. Mitochondrien, die fehlerhaft sind oder ihre Aufgaben nicht mehr adäquat erfüllen können, wahrscheinlich durch ein niedriges Membranpotential und einen hohen Anteil an ROS, werden über die Mitophagie abgebaut und wiederverwertet. Damit wird die hohe Qualität der Mitochondrien in den Zellen beibehalten.

Song et al. konnten zeigen, dass eine Behandlung mit Nicotinamid die Höhe an ROS senken und das Membranpotential von Mitochondrien erhöhen könnte (14).

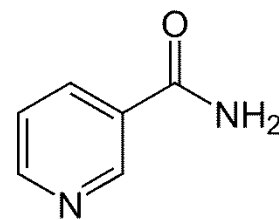


Abb. 9 Strukturformel – Nicotinamid

Die Lebenszeit von Fibroblasten und Keratinozyten wird durch Nicotinamid erhöht. Choi et al. konnten dazu auch zeigen, dass durch eine verminderte Apoptoserate die Anzahl der CD8+ T-Zellen zunahm. Ein Grund dafür ist die verminderte Menge an ROS in den Zellen, das üblicherweise zur Apoptose führt; den Sauerstoffradikalen wird antioxidativ entgegengewirkt (13).

### **2.1.6 Weitere Substanzen**

Vitamin D (VD) wurde als Autophagie-induzierende Substanz von Das et al. erklärt. Bei oberflächlichen UV-vermittelten Verbrennungen wie es bei einem Sonnenbrand der Fall ist, sorgen bestimmte Makrophagen (M2) für eine Suppression der überschießenden Inflamationsreaktion und für eine Epithelregeneration.

Die einmalige Gabe von VD stimuliert die Autophagie in Makrophagen (M2), reduziert die Ausschüttung von inflammatorischen Zytokinen und NOS-Produktion und es erfolgte eine Up-Regulation der LC3-Expression (94).

Erythropoietin (EPO) ist ein im juxtaglomerulären Apparat der Niere produziertes Hormon. Es stimuliert die Erythropoese und wird bei AnämiepatientInnen therapeutisch eingesetzt. Zusätzlich zum hämatopoietischen Effekt wurden anti-inflammatorische und anti-apoptotische Wirkungen entdeckt.

Tobalem et al. konnten eine signifikante Reduktion des Nachbrenn-Effektes bei der Anwendung von EPO beobachten (95). EPO induziert die Autophagie durch die Hemmung der Akt/mTOR-Signalwege, stellten Wu et al. fest (96).

Orhan et al. haben eine signifikante Senkung der Apoptose und Steigerung der Autophagie bei der Anwendung von Plättchen-reichem Plasma auf Verbrennungswunden erkannt. Die Entzündung und der oxidative Stress konnten gesenkt werden, ebenso die Nekrose der Stase-Zone (97).

## 2.2 Wundperfusion und ihre Modulation

Der Name der Ischämie-Zone impliziert die fehlende Perfusion im Zentrum der Verbrennungswunde, dem liegen einige Pathomechanismen zu Grunde, wie beispielsweise eine Ödembildung durch unterschiedliche Substanzen und vasoaktive Prozesse, eine Hyperkoagulation durch Aggregation von Neutrophilen oder Erythrozyten, auch können Endothelschäden durch Sauerstoffradikale das Fortschreiten von Verbrennungswunden verursachen (62,98).

Eine verminderte Durchblutung in der retikulären Dermis vermindert die Lebens- und Funktionsfähigkeit der Reservoirs von Keratinozyten und anderer Zellen der Hautanhangsgebilde, folglich kommt es zu einer verzögerten Wundheilung und auch zur Progression der Brandverletzung (99).

### 2.2.1 Ödeme

Lokale und systemische Ödeme sind ernstzunehmende Aspekte der Verbrennungspathophysiologie. Die Verschiebung der Flüssigkeitsverteilung vom Blutkreislauf ins Interstitium geschieht bei Veränderungen folgender Variablen (Tab. 4) der Starling-Gleichung (62,100):

$$J_v = K_f [(P_{Ka} - P_{Is}) - \sigma(\pi_{Ka} - \pi_{Is})]$$

Variable	Definition
$J_v$	Netto-Kapillarfiltrationsrate (Volumen/Zeit)
$K_f$	Filtrationskoeffizient (hydraulische Leitfähigkeit x kapilläre Filtrationsfläche)
$P_{Ka}$	Hydrostatischer Druck in der Kapillare
$P_{Is}$	Hydrostatischer Druck im Interstitium
$\sigma$	Reflexionskoeffizient
$\pi_{Ka}$	Kolloidosmotischer Druck in der Kapillare
$\pi_{Is}$	Kolloidosmotischer Druck im Interstitium

Tab. 4 Starling-Gleichung – Definitionen (100)

Eine positive Filtrationsrate ( $J_v$ ) bedeutet eine Filtration aus dem Blutgefäßsystem ins Interstitium, eine negative das Gegenteil. In der Stase-Zone einer Verbrennung kommt es durch ein positives  $J_v$  zur Ödembildung im Interstitium, was wiederum einen erhöhten hydrostatischen Druck auf Gefäße ausüben kann und diese so verschließt. Es kommt zur Ischämie und in weiterer Folge zu einer Nekrose, das Nachbrennen findet statt und die Verbrennungswunde weitet sich aus (101).

Eine Veränderung im Reflexionskoeffizienten ( $\sigma$ ) kann auch zur Ödembildung beitragen, ist  $\sigma = 1$  so spricht dies für eine völlige Undurchlässigkeit der Kapillarwand gegenüber Plasmaproteinen, gleicht der Koeffizient null so ist die Membran frei permeabel (100). Man konnte nach einer Verbrennung eine allgemeine Verminderung des Reflexionskoeffizienten feststellen (102) insbesondere zeigten Pitt et al. eine Reduktion von annähernd 0,87 – dem Wert bei gesunder Haut – auf 0,45 (103). Die Konsequenz eines verminderten  $\sigma$  ist eine indirekte Steigerung des intravasalen hydrostatischen Drucks durch die Senkung des interstitiellen kolloidosmotischen Drucks, die Filtrationsrate ( $J_v$ ) wird positiv und das Ödem größer.

Eine erhöhte Kapillarpermeabilität mit einem erniedrigten  $\sigma$  kann bei Verbrennungen auch durch die Kontraktion der nachgeschalteten Venolen bedingt sein. Die Vasokonstriktion wird durch Mediatoren wie Histamin, Bradykinin, Leukotriene, Substanz P und NO verursacht (104,105). Verbrennungen üben auch direkten Schaden am Endothel aus, so kann die Permeabilität der Kapillarwand auch herabgesetzt werden,  $\text{Na}^+$ -Ionen strömen in die Zelle und ziehen Wasser osmotisch mit sich. Die Zelle schwillt an und löst sich vom Zellverband (62,98).

### **2.2.1.1 Histamin**

Histamin ist ein Gewebshormon. Das biogene Amin dockt an 4 verschiedenen Histamin-Rezeptoren an, alle gehören den heterotrimeren G-Protein-gekoppelten Rezeptoren an (106). Die grundlegende Membrantopologie zeigt einen extrazellulären N-Terminus, einen intrazellulären C-Terminus, 7 transmembranöse Helices verbunden durch drei intrazelluläre Loops (107). Histamin-Rezeptoren weisen eine konstitutive Aktivität auf und können damit unabhängig von der Ligandenbindung in ihre aktive Konformation übergehen und

biologische Reaktionen hervorrufen (108). Die Rezeptoren unterscheiden sich allerdings in ihrer Lokalisation und in den Signalkaskaden, dies führt zu Rezeptor-spezifischen Effekten in den unterschiedlichen Gewebs- und Zelltypen. Jeder der Rezeptoren hat zusätzlich eine andere Histaminaffinität:  $H_{1/2}$ -Rezeptoren haben eine niedrige Affinität im  $\mu\text{M}$ -Bereich und  $H_{3/4}$ -Rezeptoren eine höhere (5-10 nM) (107,108).

Ähnlich wie sich die Rezeptoren in ihren Affinitäten unterscheiden, unterscheiden sie sich auch in ihren Signalkaskaden (s. Abb. 10).

$H_1$ -Rezeptoren ( $H1R$ ), im Gehirn, in der glatten Muskulatur, in Endothel-, dendritischen, B- und T-Zellen und in Monozyten (98,103), koppeln an  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Proteine. Sie aktivieren damit die Phospholipase C- $\beta$  (PLC- $\beta$ ), die die Hydrolyse von Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $PIP_2$ ) zu Diacylglycerin (DAG) und Inositoltriphosphat ( $IP_3$ ) katalysiert (107,109).

DAG aktiviert die Proteinkinase C (PKC), welche die Vasodilatation steigert und den ‚Mitogen-activated protein kinase‘ (MAPK)-Signalweg aktiviert, der den Zellzyklus und die Zelldifferenzierung antreibt.

$IP_3$  mobilisiert über Rezeptoren im endoplasmatischen Retikulum  $Ca^{2+}$ -Ionen, die weitere Effekte haben können, wie die weitere Stimulation der Histaminausschüttung, die Transkription von Zytokinen (IL-6, IL-8) oder die Aktivierung von NF- $\kappa$ B (109,110).

Ein weiteres Zielprotein von  $Ca^{2+}$ -Ionen ist Calmodulin (CaM), es aktiviert die endotheliale Stickstoffmonoxid-Synthase; diese katalysiert die Bildung von NO aus der Aminosäure L-Arginin. NO trägt zur Vasodilatation bei und steigert durch die Öffnung interzellulärer Endothellücken die Gefäßpermeabilität; fördert also weiterhin die Ödembildung (106,111).

$H_2$ -Rezeptoren ( $H2R$ ) wirken an  $G_{\alpha_s}$ -Proteinen und seltener an  $G_{\alpha_{q/11}}$ -Proteinen, dies führt zu einer Aktivierung der Adenylylcyclase (AC) und Erhöhung des zyklischen Adenosinmonophosphates (cAMP). cAMP stimuliert die Proteinkinase A (PKA) und induziert so einen Influx von  $Ca^{2+}$ -Ionen in die Zelle (106). Die PKA-Aktivität katalysiert die Phosphorylierung der Myosin-leichte-Ketten-Kinase (MLCK), welche somit inaktiv ist und Kontraktionen der glatten Endothelmuskulatur verhindert. Wäre die MLCK aktiv würde sie das Myosin der Muskelzellen phosphorylieren und somit die Bindung an Aktinfilamente ermöglichen, was zur Steigerung des Muskeltonus und Vasokonstriktion führen würde (112).  $H2R$  finden sich im Gehirn, in der glatten Muskulatur, in Endothel-, Epithel-, neutrophile Granulozyten, B- und T-Zellen und in Monozyten (107,113).

H<sub>3</sub>-Rezeptoren (H<sub>3</sub>R) reagieren mit G<sub>α<sub>i/o</sub></sub>-Proteinen, sie inhibieren die AC-Aktivität und vermindern somit die cAMP-Formation, in weiterer Folge wird die PKA-Aktivität ebenso herabgesetzt. Durch die PLC-Aktivierung wird die Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K) aktiv und steigert über Proteinkinase B (PKB) den MAPK-Signalweg, ähnlich wie H<sub>1</sub>R. Weitere Gemeinsamkeiten mit H<sub>1</sub>R bestehen in der Aktivierung der DAG und IP<sub>3</sub>, mit den darauffolgenden oben bereits beschriebenen Signalen. Im ZNS sorgen H<sub>3</sub>R für eine negative Rückkoppelung der Histaminausschüttung.

H<sub>4</sub>-Rezeptoren (H<sub>4</sub>R) reagieren ebenso mit G<sub>α<sub>i/o</sub></sub>-Proteinen sie sind beteiligt an der Regulation von proinflammatorischen Zytokinen und Chemokinen sowie an der Entstehung von Juckreiz. Am häufigsten sind H<sub>4</sub>R im Knochenmark exprimiert, auf RNA-Ebene konnten H<sub>4</sub>R auch in der Milz, dem Thymus, der Lunge, dem Herzen, der Niere, in Epithelzellen und im peripheren Blut detektiert werden (114,115). Sie sind allerdings aktuell noch Gegenstand der Forschung (108,111,116).

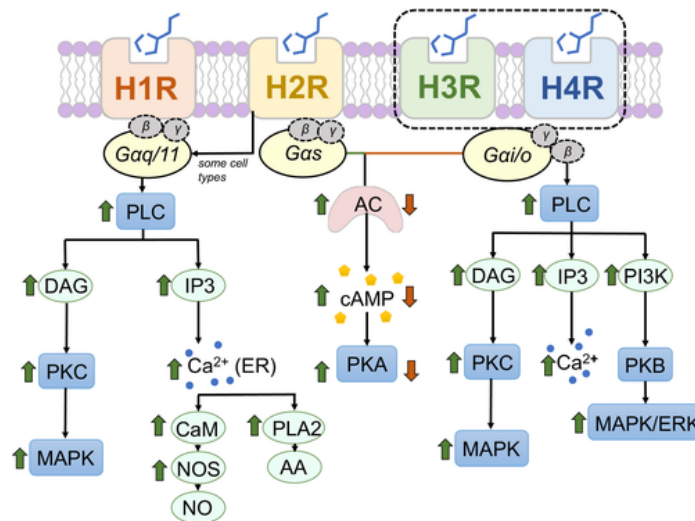


Abb. 10 Histamin-Rezeptor-Signalkaskaden (106)

Histamin wird nach einer Verbrennung aus Mastzellen ausgeschüttet, es steigert unter anderem auch die Produktion von reaktiven Sauerstoffradikalen (ROS) durch die Induktion der Xanthin-Oxidase (117).

Friedl et al. konnten mit einem Mastzellstabilisator, Natrium-Cromoglicat, eine Senkung der Histaminausschüttung und der Xanthin-Oxidase-Expression erzielen, es zeigte sich eine

Reduktion der Kapillarpermeabilität um 92,8%. Dies wurde mittels Messung der Leaks des  $^{125}\text{I}$ -Bovinen Serumalbumins (BSA) quantifiziert (118). Auch der positive Effekt von  $\text{H}_2$ -Antagonisten, wie Cimetidin, wurde beobachtet. Allerdings liegt dem nicht der Histaminantagonismus zugrunde, sondern viel mehr die Fähigkeit Cimetidins freie Sauerstoffradikale zu binden (109).

Räntfors et al. konnten ebenso keine Senkung der Kapillarpermeabilität durch  $\text{H}_1$ -Antagonisten erkennen. Der, in dieser Studie verwendete,  $\text{H}_2$ -Rezeptorantagonist Ranitidin senkte die Perfusion in Verbrennungen dritten Grades, vermutlich durch die Hemmung der Vasodilatation.  $\text{H}_3$ -Rezeptoragonisten erhöhten die Perfusion in Verbrennungswunden durch die Steigerung des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) (119).

Ob Histamin einen positiven oder negativen Einfluss auf die Verbrennungspathophysiologie hat, ist noch nicht zur Gänze geklärt und erfordert noch weitere Forschung, feststehend ist jedoch die vermehrte Histaminausschüttung in den ersten beiden Tagen nach einem thermischen Trauma (120).

### **2.2.1.2 VEGF**

Der Gefäß-endotheliale Wachstumsfaktor, VEGF, wird stimuliert durch Ischämie und Hypoxie und führt zur Neovaskularisation im beschädigten Gefäßbett (121). VEGF wird aus Mastzellen, Makrophagen, Neutrophilen, Thrombozyten und Keratinozyten ausgeschüttet und induziert eine Hyperpermeabilität des Endothels über die bereits erwähnten PLC- und PI3K-Signalwege. Durch diese Signalwege erfolgt die Veränderung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Ionenkonzentration, die Ausschüttung von NO, auch die Synthese des Plättchen-aktivierenden Faktors (PAF) wird gesteigert und der Cyclooxygenase-Signalweg wird aktiviert (121,122).

Infanger et al. stellten eine Erhöhung der VEGF-Werte im Serum Brandverletzter fest. Diese Erhöhung konnte am 1.Tag nach der Verbrennung gemessen werden bis hin zum 35.Tag. Die durch die VEGF-Erhöhung verursachten Ödeme wurden per Gewichtsmessung aufgezeigt, womöglich gibt es einen neuen Therapieansatz mittels VEGF-Inhibition. So würde das Ödem und somit das Nachbrennen verhindert werden (122).

Andererseits zeigte VEGF auch eine Förderung der Neoangiogenese (121), was zur Perfusionsverbesserung im Wundbett führen kann, vermutlich ist die Wirkung von VEGF auf die Brandwunde ebenso von Dosis und Gabezeitpunkt abhängig.

### **2.2.1.3 Bradykinin**

Das vasoaktive Peptidhormon, welches durch Mastzellen und basophile Granulozyten sezerniert wird, spielt eine Histamin-ähnliche Rolle in der Ödembildung einer Verbrennungsverletzung. Es stimuliert die Ausschüttung von NO über seinen endothelialen B<sub>2</sub>-Rezeptor, was eine Vasodilatation und Hyperpermeabilität des Endothels zu Folge hat (123).

Nwariaku et al. stellten eine bedingte Besserung der Wunddurchblutung, bei Verwendung eines B<sub>2</sub>-Antagonisten (NPC 17731), fest (124). Jonkam et al. versuchten mittels eines anderen B<sub>2</sub>-Antagonisten (Icatibant) die Verbrennungsödeme zu vermindern und konnten einen reduzierten Efflux von Flüssigkeit und Protein aus dem Gefäßsystem erzielen (123). Diese Studien suggerieren eine Therapiemöglichkeit zur Verhinderung der Ödembildung und folglich zur Verminderung des Nachbrennens, durch die Stabilisierung der Gefäßwände (62).

### **2.2.1.4 Arachidonsäure-Metaboliten**

Aus Arachidonsäure werden die meisten Eikosanoide gebildet, dazu zählen Prostaglandin, Prostazyklin, Thromboxan, Leukotriene und einige andere Mediatoren der Zellkommunikation (125).

Prostaglandin H, Leukotrien A<sub>4</sub>-F<sub>4</sub>, Prostazyklin (PGI) und Thromboxan A<sub>2</sub>/B<sub>2</sub>, tragen zur progressiven Schädigung der Stase-Zone über die Förderung der Ödeme bei (62).

Alexander et al. konnten durch die Anwendung von LTA<sub>4</sub>-Rezeptorblocker (FPL 55712) eine Verminderung der Extravasation von Evans Blue (Azofarbstoff mit hoher Affinität für Albumin (126)) feststellen. Es konnten eine Vasodilatation und einer Hyperpermeabilität der Kapillaren verhindert werden (127).

Barrow et al. erhielten mit der Gabe von Ibuprofen vor der Verbrennung die lokale Perfusion aufrecht und reduzierten das lokale Ödem. Die klinische Relevanz dieser Studie ist allerdings durch den Einnahmezeitpunkt nicht gegeben (128).

Robson et al. vermuteten bereits, dass die Vasokonstriktion im betroffenen Gewebe zum Nachbrenneffekt beitragen könnte, als Grund dafür sahen sie das Ungleichgewicht prostanoider Derivate (62,98,129).

Eine fehlerhafte Vasokonstriktion würde hierbei, in den nur teilweise geschädigten Gewebsabschnitten der Stase-Zone, zu einer Minderperfusion führen, welche wiederum die Teilschädigung in eine Totalnekrose verwandeln würde (55,129).

### **2.2.1.5 Substanz P und NO**

Substanz P ist ein von Nervenzellen und Leukozyten gebildetes Neuropeptid, es wirkt über G-Protein-gekoppelte Tachykininrezeptoren (TACR1, NK1R). Gewebeschäden führen zur Freisetzung von Bradykinin und Prostaglandinen, die eine Aktivierung und Sensibilisierung von lokalen Nozizeptoren (C-Fasern) bewirken. Die C-Fasern schütten Substanz P und ‚Calcitonin gene-related peptide‘ (CGRP) aus. CGRP dilatiert periphere Blutgefäße und führt zur Rötung der Haut. Substanz P löst die Degranulation von Mastzellen aus, das dadurch sezernierte Histamin reizt lokale Nozizeptoren weiter und führt zu einer Hyperalgesie. Substanz P sorgt auch für die Extravasation von Plasma und trägt zur Bildung vom Ödem bei (130).

Stickstoffmonoxid (NO) ist das kleinste endogene Signalmolekül und wird durch NO-Synthasen (NOS) gebildet, die es aus der Aminosäure L-Arginin spaltet. NO bewirkt über eine Aktivierung der Guanylylcyclase (GC) die Erhöhung des zyklischen Guanosinmonophosphates (cGMP) und somit eine Relaxation der glatten Gefäßmuskulatur (131).

Yonehara et al. wiesen eine Erhöhung der lokalen NO-Metaboliten nach einer Verbrennung nach. Die Gabe von N<sup>w</sup>-nitro-L-Arginin-Methylester (L-NAME, ein  $\alpha$ -Aminosäureester) verminderte die Kapillarpermeabilität der Stase-Zone. NK1R-Antagonisten verminderten die NO-Konzentrationen und Evans Blue-Extravasation, woraus geschlossen wurde, dass in der Wunde pathophysiologisch bereits gewisse Mengen an Substanz P über geschädigte afferente Fasern ausgeschüttet wurde (132).

Inoue et al. wiesen mit der Anwendung von L-NAME und Aminoguanidin (NOS-Inhibitoren) ebenso eine Senkung der Evans Blue-Extravasation nach (133).

Somit besteht die Möglichkeit einer Therapie des Nachbrennens mittels Modulation der NO-Konzentration in der Wunde, sei es durch die Hemmung der NK1-Rezeptoren oder durch die Hemmung der NO-Synthase.

### **2.2.1.6 Der hydrostatische interstitielle Druck**

Einer der vielen Wege, um die Ödembildung zu verhindern wäre die Erhöhung des interstitiellen Drucks ( $P_{Is}$ ). Durch die Verbrennung wird  $P_{Is}$  gesenkt, der Efflux aus dem Gefäßlumen wird erleichtert (134). Luna et al. konnten durch die Gabe von  $\alpha$ -Trinositol (Entzündungshemmer)  $P_{Is}$  etwas anheben (135), mehrere Studien erzielten mit einer hochdosierten Vitamin C-Gabe ähnliche Effekte (136,137). Man konnte zusätzlich mittels der nicht-invasiven HBO-Therapie eine geringere Ödembildung und eine Verbesserung des Nachbrenneffektes beobachten (134,138,139).

## **2.2.2 Hyperkoagulabilität**

Ein weiterer Ischämie-fördernder Pathomechanismus der Verbrennungswunde ist die Thrombosierung in der Stase-Zone (140). Die prothrombotische und antifibrinolytische Eigenschaft des Endothels nach einer Verbrennung werden teilweise der Schädigung und Down-Regulation des antikoagulatorischen Thrombomodulins zugeschrieben (62).

### **2.2.2.1 Thrombomodulin**

Thrombomodulin ist ein Oberflächenglykoprotein des Endothels. Es bindet Thrombin, woraus ein Antikoagulans aus Thrombin wird, welches Protein C und S aktiviert. Protein C inaktiviert wiederum die Gerinnungsfaktoren Va und VIIIa, reduziert auch die Produktion inflammatorischer Zytokine und vermindert die Leukozytenadhäsion (62).

Uygur et al. wiesen eine Steigerung der Thrombomodulin-Expression in Ratten bei Gabe von Simvastatin nach. Die Perfusion in der Stase-Zone konnte erhalten und Gewebeschäden reduziert werden (141). Boyko et al. gaben Atorvastatin als Therapieoption für Menschen

frei (142). Für HMG-CoA-Reduktase-Hemmer wurden einige Studien durchgeführt die ihre anti-fibrotischen und anti-inflammatorischen Eigenschaften nachweisen konnten. Die anti-inflammatorische Wirkung zeigt sich in der Hemmung der Signalwege für TGF- $\beta$ 1, IL-6, TNF- $\alpha$ , die anti-fibrotische in der Hemmung der Fibroblastenproliferation (143–145).

Akershoek et al. verglichen Atorvastatin mit Losartan und stellten die Überlegenheit des Statins fest. Atorvastatin förderte die Re-Epithelialisierung und das Anwachsen der Hauttransplantate bei Schweinen nach Verbrennungen dritten Grades (146). Dies liegt vermutlich daran, dass Atorvastatin die Angiogenese im Wundbett fördert (147). Es reduzierte auch die Kontrakturen und Hypertrophie der Narbe, vermutlich durch das frühzeitige Auflösen von Myofibroblasten (146).

Hosny et al. entwickelten ein neues Wirkstoffapplikationssystem für Simvastatin in einer Kokosnussöl-Nanoemulsion. Es wurde angenommen, dass ein Synergismus zwischen Simvastatin und dem Öl der *Cocos nucifera* Linn (Arecaceae) bestehen wird, da Kokosnussöl anti-inflammatorische und antibakterielle Wirkungen hat. Die Emulsion ergab eine Größenabnahme des Verbrennungsdurchmessers, eine Abnahme von IL-6 und eine Zunahme der Inhibitionszone des Erregers *Staphylococcus aureus* (148).

#### **2.2.2.2 Fibrin**

Fibrin (Faktor Ia) ist ein hydrophobes hochmolekulares Proteinpolymer, das zahlreiche Quervernetzungen besitzt. Seine Vorstufe, das Fibrinogen (Faktor I), wird in der Leber produziert, sie wird durch Proteolyse zu Fibrin-Monomeren und weiter zu festen Fibrinthromben (149,150).

Isik et al. erforschten die Reaktion von Verbrennungswunden auf die Gabe von ‚recombinant tissue plasminogen activator‘ (r-tPA), einem Fibrinolytikum, das Plasmin aus Plasminogen spaltet, welches Fibrin in wasserlösliche Fibrinpeptide zerlegt (151,152).

Ratten in der r-tPA-Gruppe wiesen vitale Stase-Zonen auf verglichen mit der Kontrollgruppe, die Nekrosen in den Stase-Zonen entwickelte. Die Fibrinolyse hilft somit bei der Rettung der Stase-Zone (152).

### 2.2.2.3 Prostazyklin

Prostazyklin (PGI<sub>2</sub>) dilatiert Gefäße und hemmt die Thrombozytenaggregation (153). Battal et al. verabreichten Ratten ein PGI<sub>2</sub>-Analogon, Beraprost, in einer Tierversuchsstudie und konnten so eine gesteigerte Perfusion der Stase-Zone feststellen. Beraprost verhinderte die Akkumulation von Neutrophilen, senkte die Ödembildung, Thrombozytenaggregation und die Nekrose. Es wird auch vermutet, dass Beraprost die Entwicklung von reaktiven Sauerstoffradikalen reduzieren könnte (154).

## 2.3 Reaktive Sauerstoffspezies

Ein freies Radikal ist ein Atom oder Molekül mit einem ungepaarten Valenzelektron und einer hohen Reaktivität, es trägt sowohl bei Oxidationen als auch bei Reduktionsreaktionen im Organismus bei. Als Reaktive Sauerstoffspezies oder ‚reactive oxygen species‘ (ROS) bezeichnet man freie Radikale und andere Moleküle, die an der Produktion von freien Radikalen beteiligt sind. Wichtige ROS wären das Hyperoxid-Anion (O<sub>2</sub><sup>·-</sup>), Wasserstoffperoxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) und das Hydroxyl-Radikal (OH<sup>·</sup>) (155).

Im gesunden Zustand einer Zelle kommen ROS auch physiologisch vor. Die Ribonukleotid-Reduktase verwendet ROS bei der Katalyse gewisser Reaktionen (156,157). Aktivierte Phagozyten produzieren im Rahmen der Phagozytose das bakterizid wirkende O<sub>2</sub><sup>·-</sup>. Diese Radikale können Zellmembranen passieren und geraten oft aus der Zelle, beispielsweise bei Elektronentransportketten in Mitochondrien oder über das endoplasmatische Retikulum. Eine weitere Quelle für Hyperoxid-Anionen sind Autooxidationen von Vitamin C, Thiolen (Glutathion, Cystein), Adrenalin oder Flavin-Coenzymen. Die Xanthin-Oxidase und NADPH-Dehydrogenase sind ebenso bekannte Radikalproduzenten (155).

Die meisten Biomoleküle sind bei Radikalüberschüssen anfällig auf Schäden, vor allem Zellmembranen mit mehrfach ungesättigten Fettsäuren werden oxidiert und zerstört. Dieser ‚oxidative Stress‘, dem die Zelle ausgesetzt wird, löst eine sich wiederholende Kettenreaktion der Lipid-Peroxidation aus. Zusätzlich lösen entstandene Hyperoxid-Anionen eine Inflammationsreaktion im Gewebe aus (155). Endothelzellen werden beschädigt, was eine Hyperpermeabilität der Gefäße verursacht und die Neutrophilenaggregation fördert (158). Weitere Schäden wären beispielsweise der Zerfall

von Hyaluronsäure und Kollagen, die Schädigung von Membranen gewisser Zellorganellen, wie Lysosomen und Mitochondrien (159), auch werden wichtige Enzyme der Zelle, dazu zählen die  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase,  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase, Glutamin-Synthetase und der  $\alpha$ -1-Proteinase-Inhibitor, in ihrer Funktion beeinträchtigt (160,161).

Radikale werden im gesunden Organismus durch Radikalfänger, Antioxidantien, unschädlich gemacht (162). Mit der Superoxid-Dismutase und der Glutathion-Peroxidase werden enzymatisch aus zwei Hyperoxid-Anionen und zwei Wasserstoff-Kationen, Wasser und Sauerstoff gebildet. Beispiele für nicht-enzymatische Antioxidantien sind  $\alpha$ -Tocopherol (bioaktive Form von Vitamin E), Vitamin C, Harnsäure, Glutathion,  $\beta$ -Carotin und DMSO (155).

Bei thermischen Traumata kann das Gleichgewicht zwischen Radikalen und Radikalfängern nicht mehr gehalten werden, es kommt zum oxidativen Stress (155).

Singer et al. setzten Curcumin als Antioxidans bei Ratten ein und stellten eine Reduktion der Nekrose in der Stase-Zone fest (163). Bei der Anwendung von Hydrogen-reicher Kochsalzlösung an einem Rattenmodell mit Verbrennungen dritten Grades, stellten Guo et al. erhöhte Aktivitäten von endogenen enzymatischen Antioxidantien fest. Eine Reduktion der Expression mehrerer inflammatorischer Zytokine ( $\text{TNF-}\alpha$ ,  $\text{IL-}\beta$ 1,  $\text{IL-}6$ ) und apoptotischer Zellen in der Stase-Zone konnte beobachtet werden. Sie konnten auch eine Senkung des Malondialdehyds (MDA) messen (164). MDA ist ein Abbauprodukt der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren, wie sie in den Zellmembranen vorkommen, dieses Molekül reichert sich bei oxidativem Stress an und wird daher als Maß dafür verwendet (165).

Fang et al. stellten eine Reduktion der Apoptose-Zellen und MDA-Konzentrationen in der Stase-Zone fest, dabei wurde das Antioxidans Astaxanthin (ATX, früher Hämatochrom) bei Ratten in hohen Dosen verwendet. ATX (3,3' -Dihydroxy-b,b'-carotin-4,4' -dion) ist ein natürlich vorkommendes rötliches Carotinoid, weit verbreitet unter Meeresorganismen, kommt es vor in Algen, Krustentieren, auch in Lachsen. Es verleiht ihnen ihre charakteristische Färbung (166).

Rosique et al. verabreichten den Ratten intraperitoneal das Antioxidans, Methylenblau, sie konnten die Reduktion der Nekrose der Stase-Zone feststellen, MDA wurde dabei nicht gesenkt (167).

N-Acetylcystein (NAC) kann den oxidativen Stress ebenso senken. Ocal et al. konnten mittels NAC, nach einer Verbrennung, die bakterielle Translokation aus dem Intestinum bei Ratten verhindern. Ebenso konnten sie eine Senkung von MDA nachweisen (168).

Ein weiteres Antioxidans, das eine breitgefächerte Anwendung in der Medizin findet, ist Ascorbinsäure (Vitamin C, VC). Mehrere Studien konnten den positiven Effekt von VC auf Verbrennungswunden belegen. Tanaka et al. vermuteten durch VC eine geringere Ödembildung in Verbrennungen. Hohe Dosen an VC konnten  $P_{1s}$  erhöhen und die Ödembildung vermindern, hatten allerdings keine Auswirkung auf die Albuminextravasation (137). Nakajima et al. konnten eine geringere Mortalität der VerbrennungspatientInnen feststellen, aber keinen signifikanten Effekt auf den Flüssigkeitsbedarf der PatientInnen (136).

## **2.4 Andere Therapien des Nachbrenn-Effekts**

In der Rezension von Francis et al. wird der Einsatz von Stammzell-Therapien bei Verbrennungsverletzungen beurteilt. Sie kamen zu folgendem Schluss: Stammzellen beschleunigen die Wundheilung über unterschiedliche Signalwege, die die Neoangiogenese, die Kollagendeposition und die Formation von Granulationsgewebe unterstützen. Stammzellen modulieren die Immunantwort und hemmen überschießende Entzündungsreaktionen, sie fördern die Regeneration von Haarfollikeln und anderen Hautanhangsgebilden. Die meisten der inkludierten Studien wurden im präklinischen Bereich durchgeführt und sind nur begrenzt aussagekräftig für die klinische Anwendung (169).

Hill et al. applizierten einen wasserlöslichen Surfactant Wundverband auf Verbrennungen zweiten Grades. Es wurden 32 PatientInnen in die retrospektive monozentrische Studie inkludiert, alle Brandwunden unterschritten 20% KOF in ihrer Ausdehnung. Bei 59% der PatientInnen bestand noch die Nebendiagnose einer Substanzabhängigkeit. Die Verbrennungen zeigten keine Progression zu drittgradigen Verbrennungen. Auf Surfactant basierte Wundverbände werden bereits bei chronischen Wunden mit Heilungskomplikationen und kleinen Verbrennungswunden angewandt, hier konnten bei Verbrennungsverletzungen positive Effekte gezeigt werden. 91% der PatientInnen zeigten

eine teilweise oder vollständige Regeneration der betroffenen Hautareale, bei 69% der PatientInnen kam es zu keiner Ausweitung der Verbrennungen (170).

Dolgachev et al. untersuchten dermale Nanoemulsionen mit Benzalkoniumchlorid (NB-201, NB-402), das üblicherweise ein Bestandteil von Hautdesinfektionsmitteln, Augentropfen und Nasensprays ist. NB-201 reduzierte den Nachbrenn-Effekt, keine der Verbrennungen sind fortgeschritten (171). Durch die antibakteriellen Eigenschaften reduzierte NB-201 das Vorkommen von Wundinfektionen, es wirkte auch anti-inflammatorisch durch eine Reduktion der Zytokin-Ausschüttung (IL- $\beta$ 1, IL-6, TNF- $\alpha$ ) (172).

Rosiglitazon wurde von Taira et al. verwendet. Es ist ein orales Antidiabetikum, welches den Peroxisom-Proliferator-aktivierten Rezeptor- $\gamma$  (PPAR- $\gamma$ ) aktiviert. PPAR- $\gamma$  erhöht die Insulinsensitivität der Zellen und hat auch anti-inflammatorische und antioxidative Wirkungen auf das Gewebe. Makroskopisch und histologisch konnte keine signifikante Ausbreitung der Ischämie-Zone festgestellt werden. Eine geringere Anzahl thrombosierter Gefäße konnte nachgewiesen werden sowie eine schnellere Re-Epithelialisierung (173,174).

Choi et al. erforschten die Auswirkung von Nicorandil auf die Stase-Zone mittels „comb burn model“ bei Ratten. Nicorandil ist ein Nicotinamid-Derivat, es bindet an ATP-abhängige Kaliumkanäle und öffnet diese. Es erfolgte eine Nicorandil-induzierte Vasodilatation (NO-ähnliche Wirkung). Somit nahmen die Ischämie und Hypoxie in der Stase-Zone ab. In dieser Studie konnte eine verminderte Expression des Hypoxie-induzierten Faktor-1  $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) gemessen werden (175). HIF-1 $\alpha$  ist ein heterodimerer Transkriptionsfaktor, mit einer Sauerstoff-regulierten  $\alpha$ -Untereinheit und einer konstitutiv exprimierten  $\beta$ -Untereinheit. Dieser unterstützt die VEGF-Expression und somit die Angiogenese. VEGF wird bei Hypoxie hochreguliert und wurde durch die aufrechterhaltene Perfusion in der Stase-Zone nicht vermehrt produziert (176).

Ein weiterer therapeutischer Ansatz wäre die Applikation von kaltem Wasser auf Verbrennungswunden als erste Hilfemaßnahme, allerdings kann die Kälte-bedingte Vasokonstriktion zur Ischämie-Ausweitung führen. Tobalem et al. untersuchten den Effekt der Applikation von kaltem Wasser (17°C) im Vergleich zu warmem Wasser (37°C). Sie konnten nach 4 Tagen eine Verminderung des Nachbrennens in der Stase-Zone feststellen,

bei Applikation von warmem Wasser für 20 min. Der Grund soll die wärmebedingte Vasodilatation sein, welche die Durchblutung der Stase-Zone gefördert haben sollte (177).

## 3 Material und Methoden

### 3.1 Literaturrecherche

Eine Übersicht der aktuellen Literatur wurde erstellt, um die Suche nach Studien über den Nachbrenneffekt und seine Therapiemöglichkeiten zu erleichtern. Die Literaturrecherche wurde mit Hilfe einer MESH-Suche von "Burns/physiopathology"[MAJR] und („Burns/metabolism"[Mesh] OR "Burns/physiopathology"[Mesh] OR "Burns/therapy"[Mesh]), PUBMED-Suche von „burn wound AND (conversion OR progression OR expansion)“ und „burn wound AND (pathophysiology)“ durchgeführt. Auch wurde mittels PUBMED und ResearchGate nach „(burn) AND (wound) AND (conversion)“, sowie nach „zone of stasis“ gesucht. Referenzen der dabei gefundenen Artikel wurden auch mit einbezogen. Artikel in den Sprachen Deutsch und Englisch wurden verwendet.

Abstracts wurden so ausgewählt, dass der Fokus speziell auf der Pathophysiologie und experimentellen medikamentösen Therapie des Nachbrennens bei Verbrennungen liegt. Artikel zur Inflammation wurden exkludiert, da sie den Rahmen sprengen würden. Einbezogene Studien wurden nach dem jeweiligen Pathomechanismen kategorisiert. Vier Kategorien wurden ausgewählt: Autophagie, Perfusion, Oxidativer Stress und „Andere“. In allen Studien sollten die Verbrennungsprogression und Wundheilungsprozesse anhand der histopathologischen Auswertung und der jeweiligen Biomarker beurteilt werden.

Epidemiologische Daten aus der Datenbank der Statistik Austria und der Deutschen Gesellschaft für Verbrennungen wurden verwendet.

Bücher zum Thema Verbrennungen wurden hinzugezogen, insbesondere:

- Kamolz L-P, Herndon DN, Jeschke MG (Hrsg.). Verbrennungen - Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas. Wien: SpringerWienNewYork; 2009.
- Cardell M, Calcagni M. Checkliste Chirurgie [Internet]. 11th ed. Largiadèr FA, Saeger H, Keel M, editors. Checkliste Chirurgie. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016.

- Lemke H, Toomes L. Referenz Notfallmedizin. Referenz Notfallmedizin. Thieme; 2019.
- Marx G, Muhl E, Zacharowski K, Zeuzem S, editors. Die Intensivmedizin [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015.

## 3.2 Tierversuch

In einem Ratten-Verbrühungsmodell soll untersucht werden, ob die Substanzen Spermidin, Rapamycin, Hydroxycitrat, Dimethylsulfoxid (DMSO) und Nicotinamid einen positiven Einfluss auf den Nachbrenn-Effekt nach einer Verbrühung haben. Alle Substanzen können eine Rolle im Bereich Autophagie spielen und somit den beschriebenen Effekt positiv beeinflussen.

### 3.2.1 Die Versuchsreihe

Im Rahmen dieses Tierversuches soll die Ausdehnung der Verbrennungstiefe und der Effekt der oben genannten, applizierten Substanzen auf die Stase-Zone bei Ratten evaluiert werden. Der Tierversuchsantrag (GZ: BMWFW-66.010/0184-V/3b/2018 NR) und die Antragsänderung (GZ: BMWFW-66.010/0039-V/3b/2019 NR) wurden vom Bundesministerium für Wissenschaft, Forschung und Wirtschaft genehmigt.

Für diese Studie wurden 60 männliche Sprague Dawley Ratten, mit einem Gewicht von etwa 500g bis 600g, herangezogen. Das Alter der Ratten zu Beginn des Experimentes lag bei 10 Wochen. Die Ratten wurden von der Fa. Harlan Laboratories B.V., Zona Industriale Azzida, 57, 33049 San Piero al Natisone (DU), Italien bezogen.

Es werden pro Durchgang 6 Gruppen mit jeweils 10 Ratten pro Gruppe (40 Interventionsratten + 20 Kontrollraten) gebildet. Bei den Ratten werden an 20% der Körperoberfläche jeweils eine Verbrühung zweiten bis dritten Grades erzeugt.

### Anästhesie

Die Einleitung der Narkose erfolgt in einer Induktionskammer für Ratten (Rothacher Medical GmbH). Die Kammer besitzt auf einer Seite einen Normanschluss für die Narkoseeinspeisung, über ein Combi-vet-Anästhesiegerät inklusive elektronischem

Durchflussmesser und Verdampfer; die andere Seite besitzt den Anschluss für die passive Narkosegasabsaugung. Die Durchflussrate beträgt für Isofluran 4 Vol.% und 2,5 l Sauerstoff/min.

Unter Narkose werden die Ratten aus der Induktionskammer entnommen und auf dem Bauch liegend auf einer Kleintier-Heizmatte positioniert, die über eine Rektalsonde reguliert wird. Sofort werden sie auch an eine Narkosemaske angeschlossen, welche einen stabilen Durchfluss von Sauerstoff (1,5-2,5 l/min) und Isofluran sicherstellt.

Die Anästhesie erfolgt durch eine intraperitoneale Injektion einer Mischung aus Fentanyl (0,005 mg/kg), Midazolam (2 mg/kg) und Medetomidin (0,15 mg/kg). Um ein Austrocknen der Hornhaut der geöffneten Augen zu vermeiden, wird zusätzlich Oleovit<sup>®</sup> Augengel verwendet.

Den Ratten werden präoperativ subkutan Carprofen/Rimadyl<sup>®</sup> (4 mg/kg) und Enrofloxacin (5 mg/kg) als antibiotische Prophylaxe verabreicht. Die Überwachung des Kreislaufs erfolgt mittels Pulsoxymetrie an einer der Pfoten.

Nach erfolgter Operation wird Medetomidin durch die subkutane Gabe von Atipamezol/Andisedan<sup>®</sup> (0,2mg/kg) antagonisiert; die Ratten erhalten unmittelbar postoperativ eine standardisierte Analgesie durch die Gabe von Buprenorphin/Temgesic<sup>®</sup> (0,1mg/kg s.c.). Piritramid (30ml/250ml Trinkwasser) und Ibuprofen/Nureflex<sup>®</sup> (10ml/250ml Trinkwasser) werden oral über das Trinkwasser für sieben Tage verabreicht.

## **Tag 1 – Verbrühung**

In Allgemeinanästhesie wird dem Tier der Rücken mit einem Elektrorasierer rasiert; es erfolgt die erste Gewichtsmessung und die Laser-Speckle-Messung.

Auf einer weichen Schaumstoffrolle wird die Ratte (in Allgemeinanästhesie) in Bauchlage über ein Becken gelegt, es wird eine 10x4x5cm flexible Kunststoffschablone auf den Rücken der Ratte gepresst.

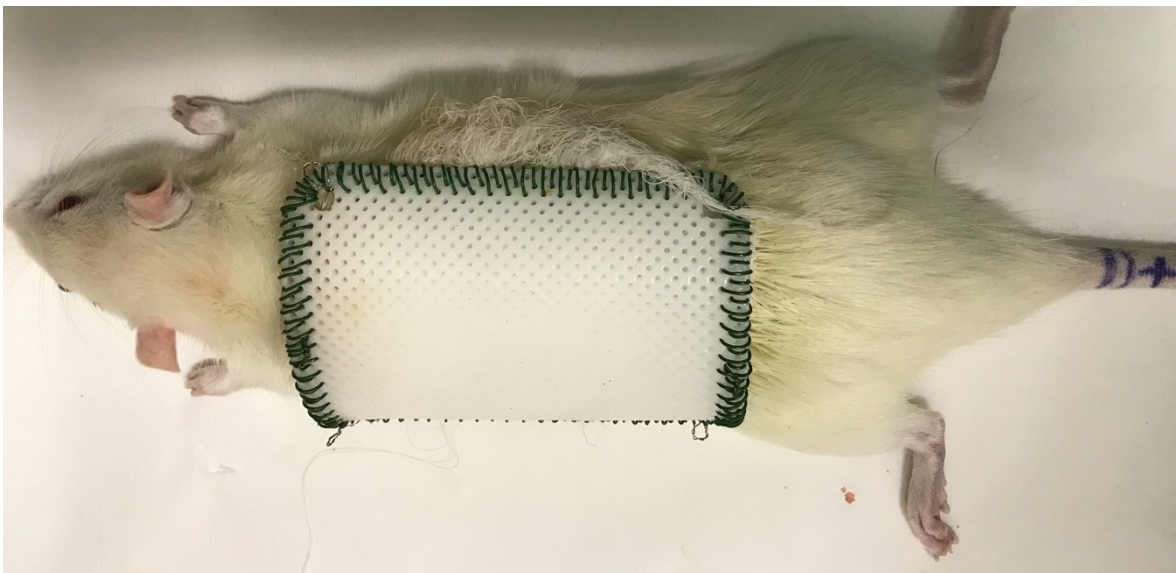
Die Schablone wird mit 100 ml kochendes Wasser (100°C) angefüllt; die Einwirkzeit beträgt 10 Sekunden. Nach 10 s wird die Schablone und die Ratte um 90° gedreht, so kann das Wasser abfließen und andere Hautareale werden verschont. Folgend wird die verbrühte

Stelle abgetrocknet. Es erfolgt die zweite Analyse mittels des Laser-Speckle-Contrast Imaging.



*Abb. 11 Ratte (27 – DMSO) nach Verbrühung*

Anschließend wird der Wundverband mit Klammern fixiert und ein „Schutz-Panzer“ aus hartem Kunststoff an den Rücken der Ratte angenäht (Abb. 12). Damit soll sichergestellt werden, dass es zu keiner zusätzlichen Manipulation an der Wunde kommt.



*Abb. 12 Ratte (27 – DMSO) mit Schutz-Panzer*

Nach Anlegen eines Schutzverbandes wird die jeweilige Testsubstanz intraperitoneal (i.p.) verabreicht. In Tab. 5 werden die Substanzen und ihre Dosierungen angeführt.

Die Substanzen Spermidin, Nicotinamid und Hydroxycitrat werden mit NaCl als Trägersubstanz verdünnt und so den Ratten appliziert. Die NaCl-Lösung gilt hier als Kontrollgruppe. Rapamycin benötigt DMSO als Lösungsmittel. Um einen möglichen Effekt von DMSO isoliert messen zu können und eine Verfälschung der Interpretation der Rapamycin-Ergebnisse zu umgehen, werden weitere 10 Ratten (+20% Dropout = 12 Ratten) mit DMSO behandelt. So gelten DMSO und NaCl als Kontrollsubstanzen, jedoch auch DMSO als eigene Testsubstanz, die eigenständige Effekte auf die Wundheilung haben könnte (92).

Substanz	Konzentrationen
Spermidin	50 mg/kg Körpergewicht
Rapamycin	1 mg/kg Körpergewicht
Hydroxycitrat	5,5 mg/kg Körpergewicht
Nicotinamid	200 mg/kg Körpergewicht
DMSO	85 µl/kg Körpergewicht
NaCl	9 mg/Tier

*Tab. 5 Dosis der angewandten Substanzen*

Fotodokumentationen im Bereich der Wunde wurden prä-, intra- oder postoperativ durchgeführt. Die Schmerzmittel werden subkutan injiziert, bzw. anschließend auch oral über das Trinkwasser verabreicht (Piritramid und Ibuprofen).

## **Tag 8 – Messung und Euthanasie<sup>7</sup>**

Am 8. Tag postoperativ erfolgt eine erneute Narkoseeinleitung der Ratte. Die letzte Gewichtsmessung erfolgt und die Laser-Speckle-Messung wird durchgeführt.

Anschließend wurden die Tiere unter Narkose entblutet (10ml aus VCI) und das Herz der Ratten entfernt.

Nach der Euthanasie werden Gewebeproben aus dem verbrühten Hautareal entnommen und histologisch analysiert.

## Messmethoden der Studie

- Gewicht

Das Gewicht der Ratten wurde zu Beginn (T1 vor der Verbrühung), sowie vor der Euthanasie (T8) gemessen.

- Fotodokumentation

Es werden Fotodokumentationen nach der Verbrennung und nach der Verbandsanlage durchgeführt (T1, T8).

- Laser-Speckle-Contrast Imaging

Bei Verbrennungsverletzungen ist die Durchblutung je nach Ausmaß der Wunde eingeschränkt. Durch das Laser-Speckle-Verfahren ist diese Minderdurchblutung berührungslos messbar, so wird die bereits geschwächte Hautbarriere vor einer weiteren Schädigung durch andere Messmethoden gewahrt. Es muss beispielsweise bei einer Doppler-Messung die Sonde auf die verbrannte Haut aufgelegt werden, dies kann bei der Laser-Speckle-Messung vermieden werden.

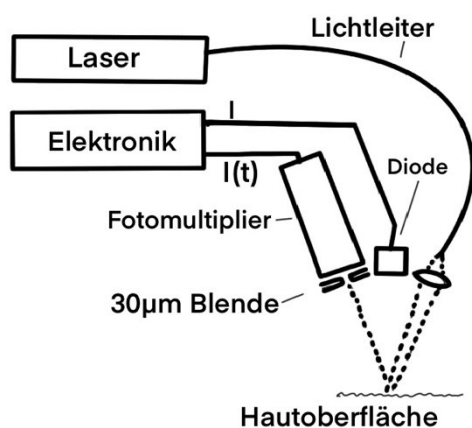


Abb. 13 Aufbau der Laser-Speckle-Apparatur

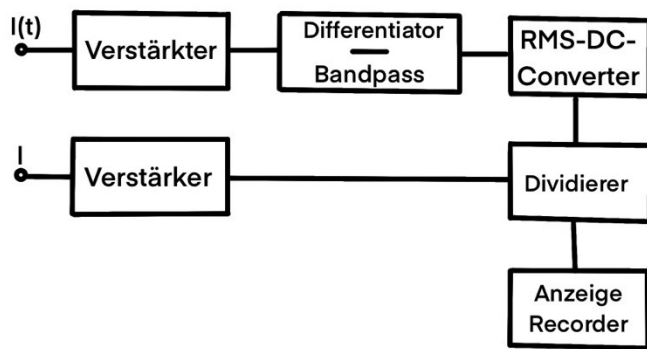
Das Laserlicht ( $\lambda=632,8\text{nm}$ ) wird an der Rauheit einer Objekt Oberfläche gestreut und bildet sogenannte „Speckles“, da es zu zufälligen Phasenverschiebungen kommt (178).

Der Laser (s. Abb. 13) bildet, nach durchlaufen des Lichtleiters und der Linse, einen Punkt auf der Hautoberfläche ( $\varnothing=1,3\text{ mm}$ ). Dort entsteht das Speckle-Muster durch Streuung des Lasers an der Hautoberfläche. Über die  $30\mu\text{m}$ -Blende

und den Fotomultiplier (eng. photomultiplier tube, kurz PMT) wird das Speckle-Muster detektiert und amplifiziert (178). Photonen, die auf eine Elektrode im Fotomultiplier treffen,

lösen Elektronen aus der Elektrode heraus (auch photoelektrischer Effekt). Diese werden beschleunigt und treffen wiederum auf eine Elektrodenreihe (auch Dynoden). Bei jeder Dynode werden mehrere Sekundärelektronen frei, die gemessen werden können. Somit wird das schwache Ursprungssignal messbar (179). Das verstärkte Signal  $I(t)$  wird in der Elektronik (s. Abb. 14) differenziert. Danach wird die mittlere Amplitude im ‚Root-to-Square to Direct Current-Converter‘ (RMS-DC-Converter) gebildet, welche proportional zur mittleren Frequenz ist. Die Intensitäten ( $I$ ) des Streulichts werden im Dividierer so kompensiert, dass Änderungen im Reflexionsverhalten an der Haut keine großen Auswirkungen auf das Messergebnis haben sollten (178).

Die Streuung des Lasers am Blut ist jedoch sehr gering verglichen mit der Streuung an der



nicht-durchbluteten Epidermis, die sich oft unwillkürlich bewegt. Es kommt zu einer kohärenten Überlagerung von zwei dynamischen Speckle-Mustern.

Durch den Bandbreitenfilter (auch Bandpass) werden Störungen durch die Epidermis deutlich reduziert.

Abb. 14 Elektronik der Laser-Speckle-Apparatur

Es ergibt sich ein quantitatives Maß für die Blutgeschwindigkeit und den Blutfluss, es wird Blutflussparameter genannt. Der Blutflussparameter wird in relativen Einheiten angegeben und steigt mit dem Heilungsprozess und der Durchblutungskapazität der Haut (178).

In dieser Studie wurden insgesamt drei Analysen mittels Laser-Speckle-Verfahren durchgeführt. Die erste erfolgte nach der Rasur des Rattenfells und vor der Verbrühung, (T1-vor). Die nächste Analyse erfolgte direkt nach der Verbrühung (T1-nach); und die dritte und letzte Analyse (T8) kurz vor der Euthanasie.

▪ Histologie

Es wurde nach der Euthanasie aus dem verbrühten Hautareal bzw. aus dem umliegenden gesunden Areal Biopsien entnommen. Jedes der Biopsate wurden deskriptiv analysiert, dies erfolgte in 6 Kategorien (Tab. 6) mit den zugehörigen Scores angeführt in Tab. 7 - Tab. 12.

A	Epithelregeneration (Re-epithelialisierung)
B	Degeneration, Nekrose
C	Dermale Reparatur
D	Entzündung, akut zu chronisch
E	Heilungskomplikation: Bakterienkolonien, Suppuration (Eiterung)
F	Einblutungen

*Tab. 6 Histologische Auswertungskategorien*

Für die Re-Epithelialisierung (RE) wurde folgender Score verwendet:

Score – A	Definition
0 – keine RE	Kein Hinweis auf Epithelregeneration
1 – minimale RE	Minimale Regeneration in Hautanhangsgebilden (Haarfollikel, Schweiß-, Talgdrüsen)
2 – gering RE	Lokale Regeneration der Hautanhangsgebilde bis zur Hautoberfläche, ohne Ausbreitung
3 – moderate RE	< 50% der Oberfläche regeneriert
4 – ausgeprägte RE	> 50% der Oberfläche regeneriert
5 – vollständige RE	Vollständige Regeneration mit/ohne Hyperplasie

*Tab. 7 A - Epithelregeneration – Scoringdefinition*

Die Nekrose (D/N) wurde definiert über den Mangel an Erythrozyten im Gefäßsystem und die durch Haferzellen (degenerierte Leukozyten (180)) bedingte Degeneration und Nekrotisierung der Rete Malpighi oder Retezellen. Diese Bezeichnung beschreibt Zellen aus dem Stratum basale und dem Stratum spinosum der Haut (s. Abb. 1) (181).

In dieser Untersuchung wurde die Grenze zwischen vitalem und avitalem Gewebe wie folgt definiert: Präsenz von erweiterten Blutgefäßen und Kapillaren, die durch hyaline Mikrothrombi oder gestaute Erythrozyten aufgebläht sind.

Score – B	Anteil der Schädigung
0 - keine D/N	0%
1 - minimale D/N	1-15%
2 - geringe D/N	16-30%
3- moderate D/N	31-60%
4 - ausgeprägte D/N	61-100%
5 - schwerwiegende D/N	Schäden der kutanen Muskulatur bis in die Subkutis

*Tab. 8 B - Degeneration/Nekrose - Scoredefinitionen*

Die dermale Reparatur (DR) besteht aus neuem dermalem Gewebe und neuen Gefäßen, keine Regeneration der Muskulatur oder der Subkutis. Die Regeneration ist charakterisiert durch die entstandenen neuen intakten Fibroblasten und neue Gefäßknospen.

Score - C	Anteil der Reparatur
0 - keine DR	Kein neues Gewebe oder Revaskularisation: 0%
1 - minimale DR	minimale Menge an neuem Gewebe oder Revaskularisation: ~ 1-15%
2 - geringe DR	geringe Menge an neuem Gewebe oder Revaskularisation: ~ 16-30%
3 - moderate DR	mittelmäßige Menge an neuem Gewebe oder Revaskularisation: ~31-60%
4 - nahezu vollständig DR	fast vollständige, fortgeschrittene Reparatur der Haut: ~ 61-100%
5 - floride DR	florides neues dermales Gewebe, Granulationsgewebe bis hin zum exzessiven Wachstum/Keloid > 100%

*Tab. 9 C - Dermale Reparatur – Scoredefinitionen*

Das Entzündungsausmaß (I) in der jeweiligen Gewebeprobe wurde anhand der Anzahl und Dichte der Entzündungszellen im Biopsat ermittelt.

Score – D	Entzündungsausmaß
0 - keine I	keine Entzündungszeichen 0%
1 - minimale I	wenige disseminierte Entzündungszellen, wie Granulozyten und Makrophagen um Gefäße, ~ 1-4% der Probe betroffen
2 - geringe I	milde Entzündungszeichen mit wenigen Entzündungszellen, wie kleine Lymphozyten, Monozyten und wenige Makrophagen, ~ 5-29% der Probe betroffen
3 - moderate I	viele diffus verteilte Entzündungszellen, ~ 30-59% der Probe betroffen
4 - ausgeprägte I	ausgeprägte Entzündung mit Zell-Einschmelzungen ~ 60-85%
5 - schwerwiegende I	schwerwiegende diffuse Entzündung, keine Abgrenzung zum umliegenden Gewebe möglich

*Tab. 10 D - Entzündung – Scoredefinitionen*

Als Heilungskomplikation (K) gilt der Keimbefall der Gewebeprobe und sein Ausmaß.

Score – E	Komplikation
0 - keine K	keine Komplikation
1 - minimale K	fokale perifollikuläre Eiterung ohne Bakterien
2 - geringe K	sichtbare multifokale Bakterienkolonien im nekrotischen Gewebe
3 - moderate K	bakterielle Überwucherung in allen Hautschichten

*Tab. 11 E - Heilungskomplikation – Scoredefinitionen*

Der Score für Einblutungen (H) beschreibt die Hämorrhagie in gewissen Hautschichten der Proben. Sie gehen einher mit der Reperfusion der Wunde nach der Verbrühung. In einer Verbrennungswunde folgt auf die initiale Ischämiephase eine Reperusionsphase, die Wiederholung beider aufeinanderfolgender Prozesse trägt zum Nachbrennen bei (182).

Score – F	Hämorrhagie
0 - keine H	keine Hämorrhagie
1 - minimale H	diskrete Extravasation von vereinzelt Erythrozyten, oberes $\frac{1}{3}$ der Dermis
2 - geringe H	mehrere perivaskuläre Einblutungen, obere $\frac{2}{3}$ der Haut (reicht in Subkutis)
3 - moderate H	konsistente und großflächige Erythrozyten-Extravasation um dilatierte und thrombosierte Gefäße, gesamte Dermis und Subkutis betroffen

*Tab. 12 F - Einblutungen - Scoredefinitionen*

- Analyse

Die unterschiedlichen Ergebnisse (Gewichtsmessung, Flux-Werte der Laser-Speckle-Messungen, histologische Scores) der Gruppen wurden miteinander anhand der Berechnung der Mittelwerte und Standardabweichungen verglichen. Dafür wurden die Daten gesammelt und mittels Excel analysiert und als Graphiken dargestellt.

## 4 Ergebnisse – Resultate

### 4.1 Literaturrecherche

Es wurden 34 Studien und 1 Review einbezogen und in 4 Kategorien eingeteilt (s. Abb. 15). Bei 46% der Studien stand die Anpassung der Perfusion in der Brandwunde im Vordergrund, 18% der Studien modulierten die Therapiemaßnahmen mehrere Mechanismen des Organismus, 21% dämmten den oxidativen Stress nach einer Verbrennung ein und bei 15% wurde die Autophagie und Apoptose der Zellen moduliert. In den Studien wurden hauptsächlich Tierversuchsmodelle verwendet.

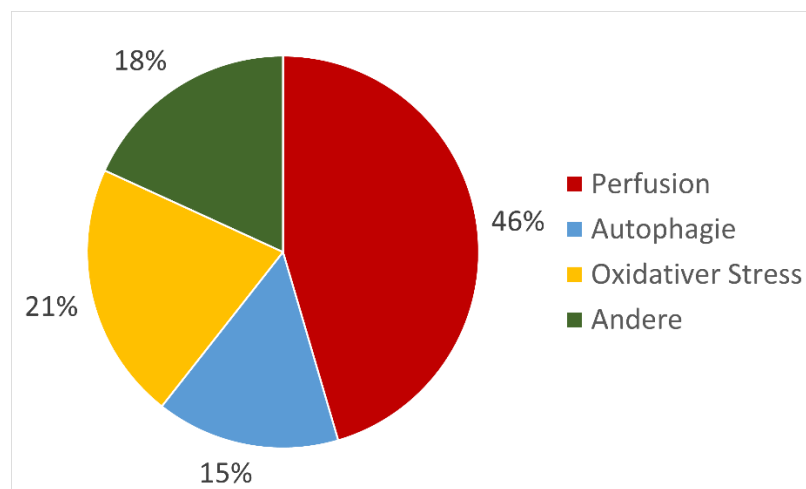


Abb. 15 Einbezogene Studienanzahlen

#### 4.1.1 Autophagie

Die in Tab. 13 angeführten Studien zeigten durch unterschiedliche Autophagie-induzierende Substanzen eine protektive Wirkung auf die Stase-Zone. Der Nachbrenn-Effekt konnte somit minimiert werden.

Substanz	Autor	Publikationsjahr
DMSO	Pielesz et al.	2018
	Guo et al.	2020
Rapamycin	Xiao et al.	2013
EPO	Tobalem et al.	2013
Vit D	Das et al.	2019
PRP	Orhan et al.	2019

Tab. 13 Substanzen der Studien zur Autophagieinduktion

#### 4.1.2 Reaktive Sauerstoffspezies

Die angeführten Substanzen (Tab. 14) führten zur Senkung des oxidativen Stresses, zur Verbesserung der Perfusion und zur Verminderung der überschießenden Inflammationsreaktion nach einer Verbrennung.

Substanz	Autor	Publikationsjahr
Astaxanthin	Fang et al.	2017
Methylenblau	Rosique et al.	2017
H-reiche NaCl-Lsg.	Guo et al.	2015
Curcumin	Singer et al.	2011
N-Acetylcystein	Ocal et al.	2004
Vitamin C	Nakajima et al.	2019
	Tanaka et al.	1999

*Tab. 14 Substanzen der Studien zum oxidativen Stress*

#### 4.1.3 Perfusion

Die in Tab. 15 unter Ödeme gelisteten Substanzen sorgten für eine Hemmung der Hyperpermeabilität und somit zur Verhinderung von Ödemen und in weiterer Folge zur Förderung der Perfusion in der Stase-Zone einer Verbrennungswunde. Unter Hyperkoagulabilität angegebene Substanzen führen zur Unterbindung der Mikrothrombosierungen in Verbrennungswunden und somit wieder zur Verbesserung der Wunddurchblutung und zur Unterbindung des Nachbrennens.

<i>Symptom</i> Substanz	Autor	Publikationsjahr
<i>Ödeme</i>		
Spermidin	Tuca et al.	2015
Icatibant	Jonkam et al.	2007
Ranitidin, Clemastine, Thioperamid	Räntfors et al.	2003
L-NAME, Aminoguanidin	Inoue et al.	2001
Ibuprofen	Barrow et al.	2000
L-NAME	Yonehara et al.	2000
NPC 1773	Nwariaku et al.	1996
Na-Cromoglinat, Cimetidin	Friedl et al.	1989
FPL 55712	Alexander et al.	1984
<i>Hyperkoagulabilität</i>		
Atorvastatin	Boyko et al.	2020
Simvastatin-Kokosöl-Emulsion	Hosny et al.	2020
Losartan, Atorvastatin	Akershoek et al.	2017
Simvastatin	Uygur et al.	2009
r-TPA	Isik et al.	1998
Beraprost	Battal et al.	1996

*Tab. 15 Studien zur Perfusion*

#### **4.1.4 Andere**

Hier wurden mehrere unterschiedliche Substanzen betrachtet, sie beeinflussen mehrere der obengenannten Aspekte der Verbrennungsphysiologie gleichzeitig (Tab. 16). Stammzell-Therapien haben positive Wirkungen auf die Neoangiogenese und somit auf die Perfusion, Inflammation und Regeneration der Stase-Zone gezeigt. Surfactant verhindert die Extravasation von Erythrozyten, verbessert den Blutfluss zur Wunde und verringert die Koagulation in der Stase-Zone. Benzalkoniumchlorid wirkt anti-inflammatorisch und senkt durch seine bakterizide Wirkung die Anfälligkeit von Verbrennungswunden auf bakterielle Infektionen und fördert somit den Heilungsprozess. Rosiglitazon wirkte anti-inflammatorisch, antithrombotisch und antioxidativ.

Substanz	Autor	Publikationsjahr
Stammzellen	Francis et al	2019
Surfactant	Hill et al.	2021
	Baskaran et al.	2001
Benzalkoniumchlorid	Dolgachev et al.	2020
	Dolgachev et al.	2016
Rosiglitazon	Taira et al.	2009
Nicorandil	Choi et al.	2018
Warmes Wasser	Tobalem et al.	2012

*Tab. 17 Substanzen der Studien zu mehreren Pathomechanismen*

## 4.2 Tierversuch

### 4.2.1 Gewichtungsmessung

Hier zeigen sich Gewichtsverluste wie im nachfolgenden Graphen (s. Abb. 16) und in Tab. 18 dargestellt, in jeder Gruppe fand ein merklicher Gewichtsverlust statt. Tab. 18 wurde hier mit Standardabweichungen (SD) eingefügt, da die SD nicht ausreichend übersichtlich in der Grafik darstellbar ist.

In den Substanzgruppen Rapamycin, Nicotinamid und Hydroxycitrat verloren die Ratten bis zum 8.Tag der Studie im Durchschnitt 7,2% ihres Gewichts. Verglichen mit 8,3% Gewichtsverlust in der NaCl-Kontrollgruppe, könnten diese Substanzen eine minimale Besserung der metabolischen Lage der Ratten verursacht haben.

In der DMSO-Substanzgruppe behielten die Ratten 93,19% ihres ursprünglichen Gewichts, somit hatte diese Ratten-Gruppe den geringsten Gewichtsverlust. Der einzig signifikant reduzierte Gewichtswert wurde bei der Spermidin-Gruppe gemessen, beide überlebenden Ratten hatten einen mittleren Gewichtsverlust von 20,4%. Hier wurde nach dem 6. Durchgang die Gabe von Spermidin eingestellt. Von 6 Ratten überlebten 2 bis zur zweiten Gewichtsmessung am 8.Tag der Versuchsreihe.

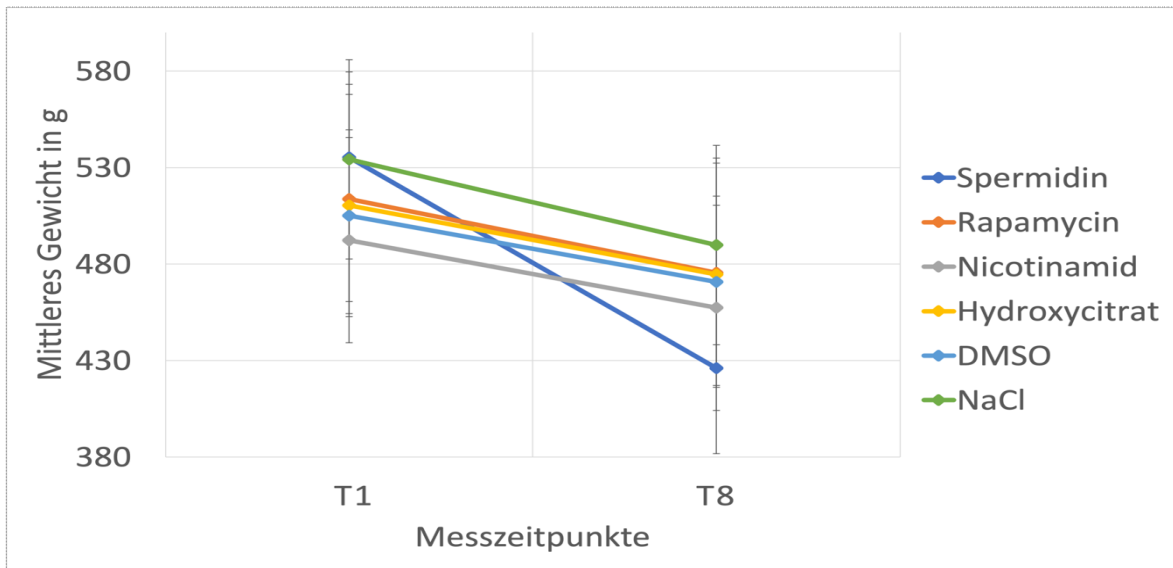


Abb. 16 Mittleres Gewicht in [g] an Tag 1 und Tag 8

Substanz	T1	SD	T8	SD
Rapamycin	513,7	59,4	475,4	54,9
Hydroxycitrat	510,3	57,6	474,6	60,5
Nicotinamid	492,3	53,1	457,3	57,8
DMSO	505,1	44,5	470,7	47,6
NaCl	534,2	51,7	489,8	44,4
Spermidin	535,2	44,4	426	15

Tab. 18 Mittleres Gewicht und SD in [g] an T1 und T8

#### 4.2.2 Laser-Speckle-Contrast Imaging

Die Blutflussparameter der Ratten sanken ausnahmslos nach der Verbrühung, da jede Verbrennung die Durchblutung der Haut beeinträchtigt (s. Abb. 20). Man erkannte durch die Verminderung des Speckle-Musters (hellblaue Lichtstreuung) im markierten Messbereich von Abb. 17 verglichen mit Abb. 18 eine sofortige Veränderung der Mikrozirkulation. An Tag 8 nach der Verbrühung zeigte sich eine weitere Reduktion der messbaren Speckles (s. Abb. 19).

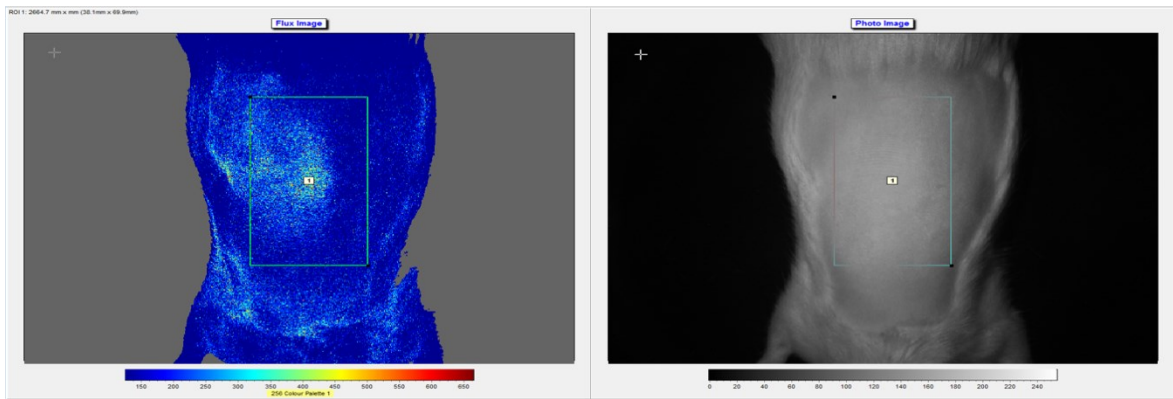


Abb. 17 Tag 1 vor der Verbrühung – (DMSO-Rattennr.27)

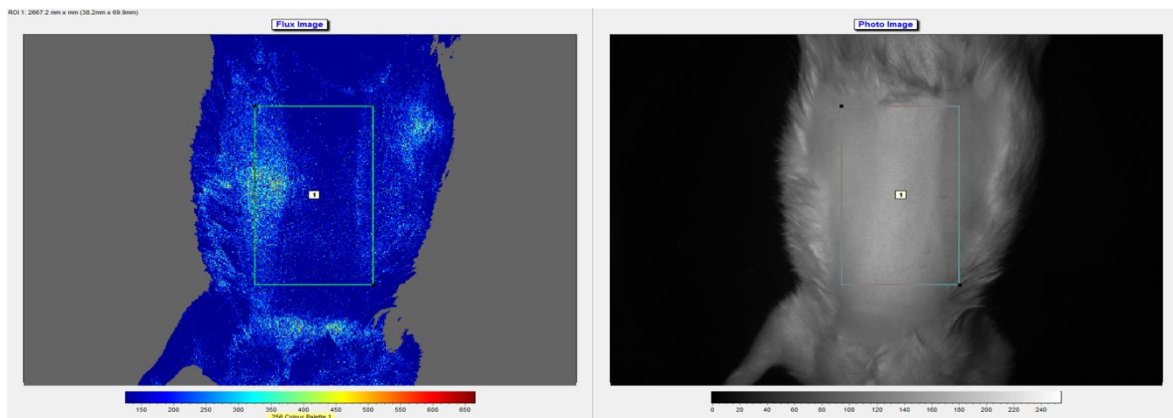


Abb. 18 Tag 1 nach der Verbrühung – (DMSO-Rattennr.27)

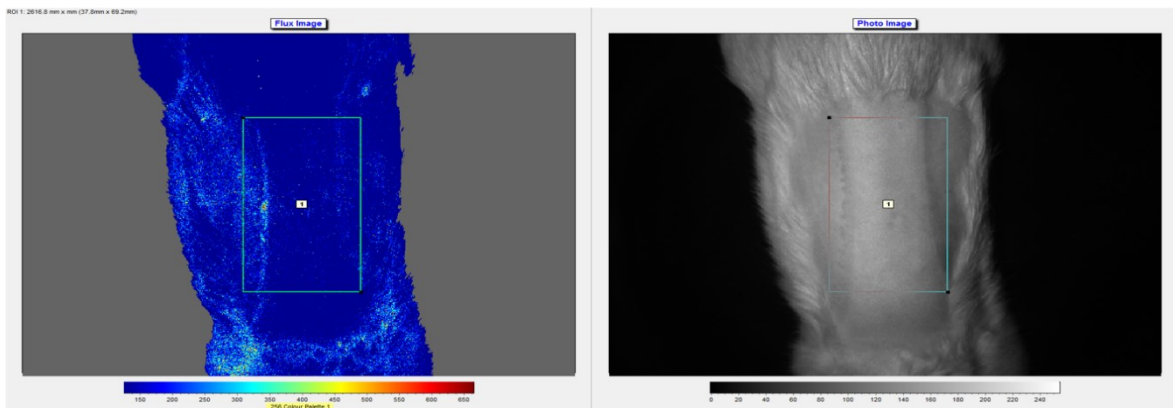


Abb. 19 Tag 8 – (DMSO-Rattennr.27)

Hydroxycitrat, Nicotinamid und DMSO zeigten verglichen mit der NaCl-Kontrollgruppe eine geringere Senkung des Blutflusses in der Haut der Ratten.

Rapamycin und Spermidin zeigten keine Besserungen gegenüber den beiden Kontrollgruppen (DMSO, NaCl) (s. Abb. 20). Allerdings ist die Spermidin-Kurve in der untenstehenden Graphik mit Vorsicht zu betrachten, da nur 6 Ratten diese Substanz erhielten (vgl. alle anderen Gruppen bestanden aus 10 Ratten), von diesen 6 Ratten überlebten nur 2. Die Werte sind daher stark verzerrt im Vergleich zu den anderen Gruppen.

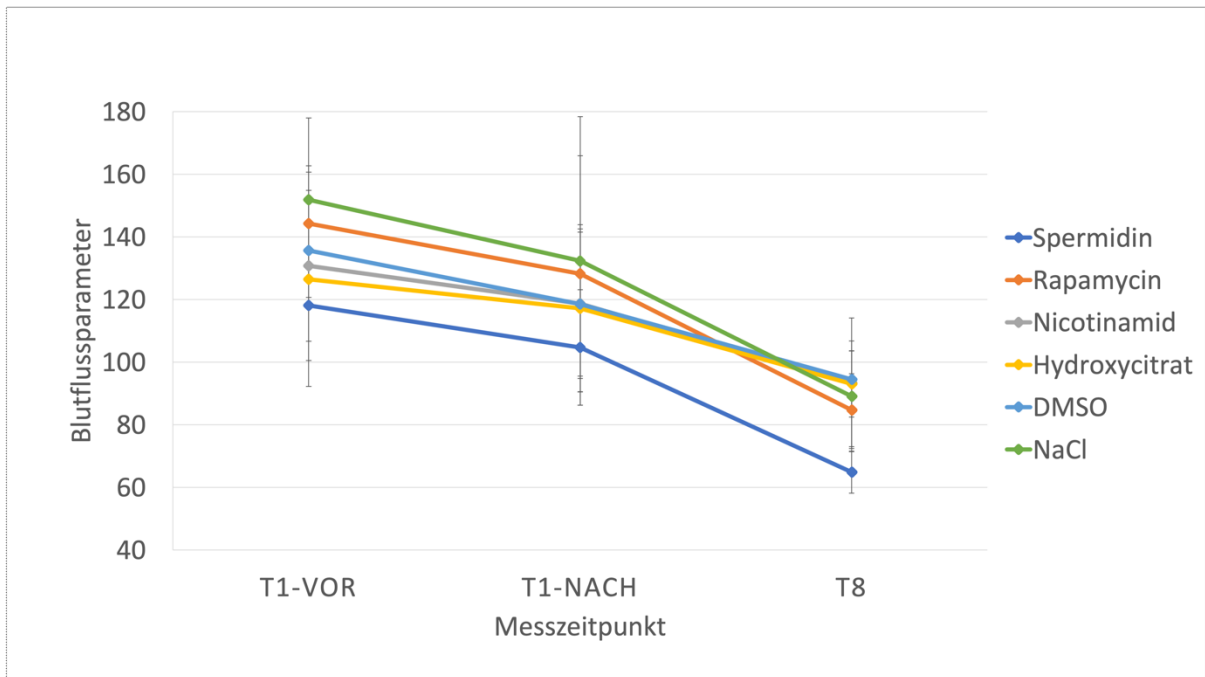


Abb. 20 Überblick über Flux-Mean-Werte  $\pm$  SD aller Substanzgruppen

### 4.2.3 Histologie

Die Biopsie-Auswertung zeigte keine schlüssigen Werte. Nach einer 6-monatigen Verweildauer der Gewebeproben in einer Formalin-Lösung, wurden die fixierten Proben von Firma TPL aufgearbeitet, gefärbt und von Histopathologen bewertet. Ratten der Spermidin-Gruppe, wurden aufgrund der kleinen Kohorte nicht histologisch beurteilt.

In Abb. 21 werden die Mittelwerte der Scores (s. Tab. 19) und ihre Standardabweichungen graphisch dargestellt.

Scores in Tab. 19 stellen die Mittelwerte der histologischen Beurteilungen der Biopsate jeder Ratte der jeweiligen Substanzgruppen dar, wobei jede der Farben der Säulen einer verabreichten Substanz entspricht. Der Graph und die Tabelle werden in den nächsten 6 Unterpunkten erläutert.

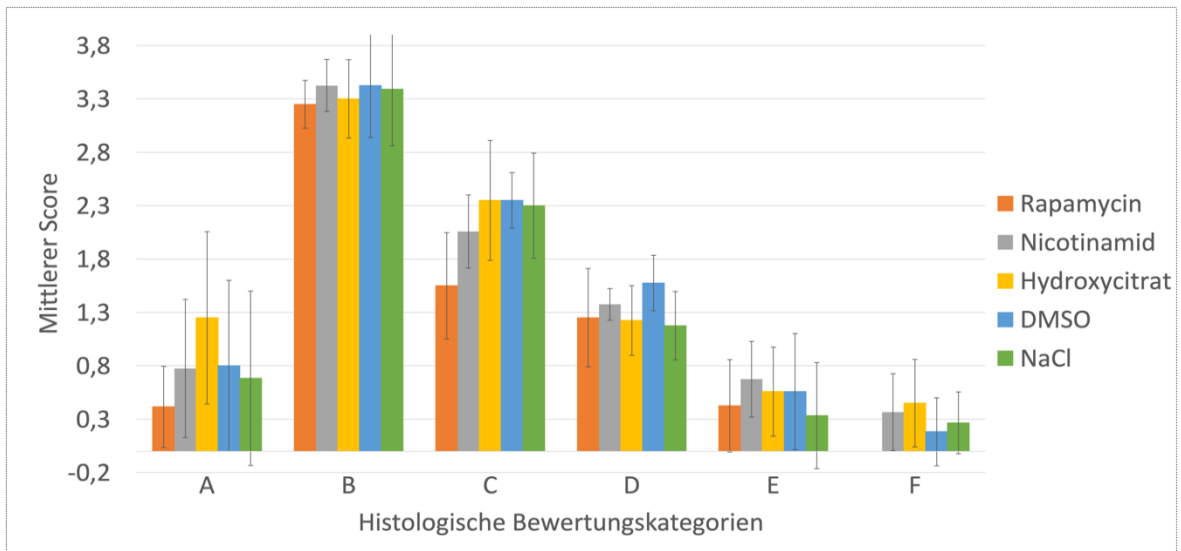


Abb. 21 Score-Durchschnitt  $\pm$  SD der histologischen Auswertungen

Substanz	A - Score	B - Score	C - Score	D - Score	E - Score	F - Score
Rapamycin	0,42 $\pm$ 0,4	3,25 $\pm$ 0,2	1,55 $\pm$ 0,5	1,25 $\pm$ 0,5	0,425 $\pm$ 0,4	0
Hydroxycitrat	1,25 $\pm$ 0,8	3,3 $\pm$ 0,4	2,35 $\pm$ 0,6	1,23 $\pm$ 0,3	0,56 $\pm$ 0,4	0,45 $\pm$ 0,4
Nicotinamid	0,78 $\pm$ 0,64	3,43 $\pm$ 0,24	2,06 $\pm$ 0,34	1,38 $\pm$ 0,15	0,68 $\pm$ 0,36	0,37 $\pm$ 0,36
DMSO	0,8 $\pm$ 0,8	3,43 $\pm$ 0,49	2,35 $\pm$ 0,26	1,58 $\pm$ 0,26	0,56 $\pm$ 0,54	0,18 $\pm$ 0,32
NaCl	0,68 $\pm$ 0,8	3,39 $\pm$ 0,53	2,3 $\pm$ 0,49	1,18 $\pm$ 0,32	0,33 $\pm$ 0,5	0,27 $\pm$ 0,29

Tab. 19 Absolutwerte der Scoredurchschnitte  $\pm$  SD der histologischen Auswertungen

#### 4.2.3.1 A - Score – Epithelregeneration (RE)

Mit einem durchschnittlichen Score von 1,25 von 5 zeigten die Ratten der Hydroxycitrat-Gruppe den höchsten Score dieser Kategorie, trotzdem deutet dieser Score lediglich auf eine gering-gradige Epithelregeneration hin. Verglichen mit den mittleren Scores der Kontrollgruppen mit den Substanzen NaCl und DMSO, welche respektive Scores von 0,63 und 0,8 haben, liegt der Score der Hydroxycitrat-Gruppe deutlich darüber.

Nicotinamid, mit einem Score von 0,77, zeigte verglichen mit NaCl keine erwähnenswerte Besserung. Rapamycin lag mit 0,4 unter beiden Kontrollgruppen.

Da die meisten Ratten der Spermidin-Gruppe vor der Gewebsentnahme starben, wurde auf die Auswertung der beiden lebenden verzichtet.

#### **4.2.3.2 B - Score – Degeneration, Nekrose (D/N)**

Unabhängig von der Substanzgruppe sind alle Werte von 5 und >3 bis <4, sie beschreiben somit eine ‚moderate‘ bis ‚ausgeprägte‘ Schädigung der Haut mit einem Ausmaß um 60% der Gewebprobe. Die Rapamycin-Gruppe hatte den niedrigsten Score von 3,25, der geringer ist verglichen mit den Kontrollgruppen, welche beide bei 3,4 waren. Mit 3,42 hat die Nicotinamid-Gruppe den höchsten Score.

#### **4.2.3.3 C - Score – Dermale Reparatur (DR)**

Die Substanzgruppe Rapamycin hatte den niedrigsten Score (1,55) verglichen mit der NaCl- und DMSO-Kontrollgruppe (2,3;2,35). Rapamycin bewirkte somit in seiner Gruppe eine dermale Reparatur von < 16%, NaCl und DMSO hingegen < 31%. Hydroxycitrat erzielte die gleiche Wirkung wie beide Kontrollgruppen. Nicotinamid hatte einen Score von 2,06, und erbrachte somit eine dermale Reparatur von ~ 30%.

#### **4.2.3.4 D - Score – Entzündung/Inflammation (I)**

Entzündungsscores der Substanzgruppen halten sich unter 1,6, wobei die NaCl-Kontrollgruppe den niedrigsten Wert und die DMSO-Kontrollgruppe den höchsten aufwies. Alle Proben zeigten somit eine milde Entzündung, bis zu 5% der Haut waren betroffen.

#### **4.2.3.5 E - Score – Heilungskomplikationen (K)**

Der Score der Nicotinamid-Gruppe ist mit 0,68 von 3 am höchsten verglichen mit den anderen Substanzgruppen. Dies deutet daraufhin, dass keine der Substanzen eine ausgeprägte Heilungskomplikation mit einer bakteriellen Überwucherung aufzeigte.

#### **4.2.3.6 F - Score – Einblutungen (H)**

Hier fielen alle mittleren Scores unter 0,5 von 3 aus, keine nennenswerte Extravasation von Erythrozyten fand statt.

## 5 Diskussion und Conclusio

Die Recherche zu konservativen Therapiemöglichkeiten des Nachbrennens in den Bereichen der Autophagie, Perfusion und des oxidativen Stresses einer thermischen Verletzung zeigte in den vergangenen 40 Jahren einige Fortschritte auf.

Die meisten der hier untersuchten Studien zielen auf eine Durchblutungsverbesserung der Wunde ab, sei es durch die Inflammationssenkung oder die Verhinderung der Ödembildung, durch eine Antikoagulation oder die Förderung der Neoangiogenese. Das Hauptaugenmerk liegt in der derzeitigen Forschung auf der Perfusionsoptimierung. Zurzeit kommen in Studien zur Rettung der Stase-Zone noch deutlich wenige Autophagie-induzierende Substanzen zur Anwendung, wie in Abb. 15 ersichtlich. Womöglich gibt es einen bestehenden Zusammenhang zwischen der Perfusionseinschränkung durch Ödembildung und der Autophagie-Hemmung in Verbrennungswunden, durch erfolgende Onkosis der Zellen könnten Autophagie-induzierende Prozesse möglicherweise gehemmt werden.

Die Ergebnisse der durchgeführten Tierversuchsstudie wurden mit Ergebnissen aus der Literaturrecherche verglichen. Im Gegenteil zu den Ergebnissen, der hier erfolgten Tierversuchsstudie zeigten die Substanzen Rapamycin und DMSO, in zuvor durchgeführten Studien, vielversprechende Ergebnisse in der Autophagieinduktion. Es ist allerdings noch nicht eindeutig geklärt, ob die Autophagie tatsächlich eine protektive Funktion vor dem Zelltod einnimmt oder diesen fördert. Möglicherweise werden beide Effekte in einer Verbrennungswunde ausgelöst, abhängig vom Zeitpunkt und vom Grad der Verbrennung. Dies wird bei der Gegenüberstellung der Studien von Xiao et al. und Tan et al. deutlich (7,8). Beide genannten Studien deuten auf eine Verbesserung der Wundheilung mit Rapamycin hin, welche über den Signalweg der mTOR-Kinase die Autophagie unterstützt und die Verbrennungsprogression vermindert. Es wurde festgestellt, dass Autophagieprozesse unmittelbar nach Verbrennungen herabgesetzt sind und erst nach 24h erneut ansteigen. Überdies ist auch nach 24h die Autophagie-Intensität weiterhin deutlich unter der Norm einer gesunden Haut. (3,4).

In beiden Studien war auch die Anwendung unterschiedlicher Verbrennungsmodelle ausschlaggebend. Ebenso wiesen Xiao et al. eine geringe Kohortenanzahl und eine kurze Studiendauer auf, wodurch die Beurteilung und die Vergleichbarkeit der Ergebnisse erschwert wurden.

Für Hydroxycitrat wurden in der Recherche keine mit dem hier durchgeführten Tierversuch vergleichbare Studien gefunden. Hydroxycitrat wurde noch nicht im Zusammenhang mit Autophagie-Induktion bei Verbrennungswunden erforscht. Um die Aussagekraft der hier beschriebenen Studie untersuchen zu können, sollten daher weitere Untersuchungen mit diesen Substanzen durchgeführt werden.

Die topische und intraperitoneale Applikation von Spermidin bei Brandverletzungen wurde von Tuca et al. (12) bereits angewandt. Ratten wurden am Rücken mit kochendem Wasser verbrüht (selbes Verbrennungsmodell, wie im hier durchgeführten Tierversuch). Histologisch konnte gezeigt werden, dass sich sowohl die Ödembildung als auch die Kollagenschädigung durch beide Formen der Spermidingabe in den tiefen dermalen Schichten und in Muskelfasern senkten. Dies könnte in weiterer Folge eine Eindämmung des Nachbrennens bedeuten.

Choi et al. erreichten mit Nicorandil, einem Nicotinamid-Derivat, eine Verbesserung der Perfusion in der Stase-Zone. Es wurde in der hier durchgeführten Tierversuchsstudie in der Nicotinamid-Gruppe der höchste Degenerations- und Nekrosescore gemessen, auch der höchste Entzündungsscore wurde in dieser Gruppe festgestellt. Diesen widersprüchlichen Ergebnissen können mehrere Aspekte zugrunde liegen, wie die unterschiedlichen Dosen, die Größen der Kohortengruppen oder auch unterschiedliche Wirkungen der beiden Substanzen.

## **5.1 Tierversuch**

### **5.1.1 Gewichtsmessung**

Die Gewichtsmessung zeigte einen signifikanten Masseverlust in der Spermidin-Substanzgruppe. Diese Ergebnisse scheinen widersprüchlich zu Tuca et al. (12) zu sein. Dies hängt vermutlich mit der CRM-Wirkung des Spermidins zusammen. Eine Dosisverminderung, eine alternative Applikationsmethode oder eine erhöhte Kalorienzufuhr würde diesem Effekt womöglich entgegenwirken.

Die übrigen Gruppen unterschieden sich in der Gewichtsabnahme nur marginal und haben somit eine eingeschränkte Aussagekraft.

Zusätzlich dazu haben Verbrennungen im Ausmaß von 20% der KOF einen gravierenden katabolischen Effekt auf den Organismus. Dieser trägt unabhängig von der applizierten Substanz zu einem merklichen Gewichtsverlust bei, da die intestinale Mukosa durch großflächige Verbrennungen in Mitleidenschaft gezogen wird und somit keine adäquate Absorption der Nährstoffe aus dem Intestinum stattfinden kann. Chung et al. konnten 1993 zudem beweisen, dass Spermidin keinen positiven Effekt auf die Regeneration der Darmmukosa hat (183).

### **5.1.2 Laser-Speckle-Messung**

Eine Senkung der Blutflussparameter in allen Gruppen war vorherzusehen, da die Verbrühung eine Koagulation, Inflammation und eine Vasodestruktion mit sich bringt. Es fand somit eine unmittelbare Schädigung der Mikrozirkulation nach der Verbrühung der Tiere statt. Geringe Besserungen der Blutflussparameter zeigten sich in den Substanzgruppen: DMSO, Hydroxycitrat und Nicotinamid. Dies könnte auf eine minimale Verbesserung der Perfusion in der Wunde hindeuten. Die auffallende Reduktion der Perfusion in der Spermidin-Substanzgruppe ist das Resultat der kleinen Kohorte, welche die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen maßgeblich verzerrte.

Eine weitere Fehlerquelle kann das Fell der Tiere sein, da die Laser-Speckle-Messung auf der Analyse der Streuung des Lasers beruht, welcher bereits durch die Oberfläche der Epidermis messbare Streuungen anzeigen kann. Die Streuung wird durch die Kontraktion der Musculi arrectores pilorum der Haare im Fell der Ratten am Rand der Verbrühungsfläche fälschlich verstärkt. Dazu trägt auch die Atmung der Tiere bei. Die totale Entfernung des Fells beeinträchtigt allerdings die Thermoregulation der Tiere. Eine vergleichende Studie könnte hierzu durchgeführt werden, um Messunterschiede aufzuzeigen. Es würden die Ratten mit vollem Fell, nach einer teilweisen Rasur und anschließend mit freiem Rücken vermessen werden.

### **5.1.3 Histologie**

Die Biopsate wurden 6 Monate in einer Konservierungslösung mit Formaldehyd aufbewahrt, bevor sie mikroskopisch untersucht wurden. Formaldehyd kann Gewebstücke verhärten und schrumpfen lassen, da sie entwässert werden. Womöglich werden dadurch die Zellen im Gewebsverband nach dem Mikrotomschnitt deformiert und verfälscht wahrgenommen.

Eine andere Konservierungsmethode könnte sich möglicherweise bei langen Konservierungsdauern als vorteilhafter erweisen.

Durch die Verbrüfung verursachte Schäden spiegeln sich im Degenerationsscore wider, dort wurden die höchsten Scores aller histologischen Kategorien gemessen.

Außerdem sind bei allen Substanzgruppen die Werte der Standardabweichung zumindest gleichgroß oder als größer im Verhältnis zu den Durchschnittswerten der Scores einzustufen, was für eine hohe Streuung der Werte spricht und ihre Aussagekraft begrenzt. Die Unterschiede der Scores in den Substanzgruppen waren sehr gering, eine längere Studiendauer, eine quantitativ größere Tierversuchsgruppe oder eine mehrmalige Gabe der Substanzen in verschiedenen Dosen könnte die Unterschiede zwischen den Gruppen hervorheben.

Zusätzlich könnten einheitlich lokalisierte Bereiche am Rücken der Ratte in Abhängigkeit von ihrer Körpergröße vermessen werden und dafür eine Hautgewebsstanze verwendet werden, um eine einheitliche Probeentnahme zu ermöglichen.

Es würden beispielsweise 14% der Körpergröße berechnet werden, dieser Wert gibt den Abstand des ersten Punktes am Rücken, ab der Schwanzwurzel der Ratte, an. Senkrecht dazu werden jeweils nach links und rechts Punkte mit Abständen von jeweils 2% der Körpergröße markiert. Dort soll die einheitliche Gewebsentnahme mittels einer Hautstanze erfolgen. So wird eine uniforme Gewebsentnahmemöglichkeit geschaffen. Auf diese Weise kommt es auch zur Kongruenz des subkutanen Fettanteils an den Entnahmestellen. Dieser hat auf die Wundheilung der Haut einen positiven Effekt (184–186). Das subkutane Fett kann eine Regeneration begünstigen und somit eine Rolle spielen in der histologischen Beurteilung der Stase-Zone.

Mehrere Ansätze zur Erforschung des Nachbrenneffektes und seiner Beeinflussbarkeit durch unterschiedliche körpereigene und körperfremde Substanzen bestehen bereits. Einige der hier verwendeten Substanzen zeigten in der Literaturrecherche vielversprechende Ergebnisse. Allerdings konnte mit der hier durchgeführten Tierversuchsstudie keine definitive Aussage zu den Wirkungen der verwendeten Substanzen getroffen werden. Hierzu sind weitere Forschungsschritte mit anderen Studienmodellen notwendig, beispielsweise könnten wie oben erwähnt eine Dosisanpassung bzw. andere Applikationsmethoden in Erwägung gezogen werden, auch eine größere Kohorte könnte aussichtsreiche Ergebnisse liefern.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Papp A, Kiraly K, Härmä M, Lahtinen T, Uusaro A, Alhava E. The progression of burn depth in experimental burns: A histological and methodological study. *Burns*. 2004;30(7):684–90.
2. Haller H. Verbrennungstiefe ist ein dynamischer Prozess. In: *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 161.
3. Glenn WW. A Physiologic Analysis of the Nature and of the Treatment of Burns. *Annals of surgery* [Internet]. 1944;119(6):801–14. Available from: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=1617982&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>
4. Hinshaw JR. Early Changes in the Depth of Burns. *Annals of the New York Academy of Sciences*. 1968;150(3):548–53.
5. Sevitt S. LOCAL BLOOD-FLOW CHANGES IN EXPERIMENTAL BURNS. 1949;LXI.
6. Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: Renovation of cells and tissues [Internet]. Vol. 147, *Cell*. Cell Press; 2011 [cited 2019 Sep 26]. p. 728–41. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0092867411012761?via%3Dihub>
7. Tan J-Q, Zhang H-H, Lei Z-J, Ren P, Deng C, Li X-Y, et al. The roles of autophagy and apoptosis in burn wound progression in rats. *Burns* [Internet]. 2013 Dec;39(8):1551–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417913001344>
8. Xiao M, Li L, Hu Q, Ma L, Liu L, Chu W, et al. Rapamycin reduces burn wound progression by enhancing Autophagy in deep second-degree burn in rats. In: *Wound Repair and Regeneration*. 2013.
9. Su Y, Lu J, Chen X, Liang C, Luo P, Qin C, et al. Rapamycin Alleviates Hormone Imbalance-Induced Chronic Nonbacterial Inflammation in Rat Prostate Through Activating Autophagy via the mTOR/ULK1/ATG13 Signaling Pathway. *Inflammation* [Internet]. 2018 Aug 19;41(4):1384–95. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s10753-018-0786-7>
10. Vignot S, Faivre S, Aguirre D, Raymond E. mTOR-targeted therapy of cancer with rapamycin derivatives. *Annals of Oncology* [Internet]. 2005 Apr;16(4):525–37. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0923753419477351>
11. Madeo F, Eisenberg T, Pietrocola F, Kroemer G. Spermidine in health and disease. *Science* [Internet]. 2018 Jan 26;359(6374):eaan2788. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.aan2788>
12. Tuca A, Parvizi D, Wurzer P, Schintler M, Prandl E, Madeo F, et al. EVALUATION OF THE EFFECTS OF SPERMIDINE ON BURN WOUND PROGRESSION IN RATS. *Annals of Burns and Fire Disasters*. 2015;28(September):2015.
13. Choi HJ, Jang SY, Hwang ES. High-Dose Nicotinamide Suppresses ROS Generation and Augments Population Expansion during CD8(+) T Cell Activation. *Molecules and cells*. 2015;38(10):918–24.
14. Song SB, Jang SY, Kang HT, Wei B, Jeoun UW, Yoon GS, et al. Modulation of mitochondrial membrane potential and ROS generation by nicotinamide in a manner independent of SIRT1 and mitophagy. *Molecules and Cells*. 2017;40(7):503–14.

15. Pietrocola F, Pol J, Vacchelli E, Baracco EE, Levesque S, Castoldi F, et al. Autophagy induction for the treatment of cancer. *Autophagy* [Internet]. 2016;12(10):1962–4. Available from: <http://dx.doi.org/10.1080/15548627.2016.1214778>
16. Pietrocola F, Pol J, Vacchelli E, Rao S, Enot DP, Baracco EE, et al. Caloric Restriction Mimetics Enhance Anticancer Immunosurveillance. *Cancer Cell* [Internet]. 2016 Jul;30(1):147–60. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1535610816302215>
17. Austria S. Stationäre Spitalsaufenthalte in Akutkrankenanstalten 2018 nach Diagnose ( ICD-10 ISHMT ) Stationäre Spitalsaufenthalte in Akutkrankenanstalten 2018 nach Diagnose ( ICD-10 ISHMT ). 2018;15–7. Available from: [https://www.statistik.at/wcm/idc/idcplg?IdcService=GET\\_PDF\\_FILE&RevisionSelectionMethod=LatestReleased&dDocName=122012](https://www.statistik.at/wcm/idc/idcplg?IdcService=GET_PDF_FILE&RevisionSelectionMethod=LatestReleased&dDocName=122012)
18. Malzer R. Erstversorgung am Unfallort. In: Kamolz L, Herndon D, Jeschke M, editors. *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 25–30.
19. Deutsche Gesellschaft für Verbrennungsmedizin. *Behandlung thermischer Verletzungen des Erwachsenen*. 2018.
20. Hettiaratchy S, Dziewulski P. ABC of burns: pathophysiology and types of burns. *BMJ (Clinical research ed)* [Internet]. 2004 Jun 12;328(7453):1427–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/15191982>
21. Gauglitz G, Herndon DN, Kamolz L J. Pathophysiologie der Verbrennungswunden. In: Kamolz L, Herndon D, Jeschke M, editors. *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 5–23.
22. García-Sánchez V, Gomez Morell P. Electric burns: high- and low-tension injuries. *Burns* [Internet]. 1999;25(4):357–60. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0305417998001892>
23. Lumenta DB, Kamolz L-P, Frey M. Stromverletzungen. In: *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 195–8.
24. Gauglitz G, Herndon DN, Kamolz L J. Chemische Verbrennungen. In: Kamolz L, Herndon D, Jeschke M, editors. *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. 1st ed. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 6–7.
25. Jackson DMacGD. The diagnosis of the depth of burning. *BJS (British Journal of Surgery)* [Internet]. 1953 May 1;40(164):588–96. Available from: <https://doi.org/10.1002/bjs.18004016413>
26. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Mehrschichtiges Plattenepithel. In: *Taschenlehrbuch Histologie*. 6th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019. p. 130.
27. Lüllmann-Rauch R, Asan E. Haut und Hautanhangsgebilde. In: *Taschenlehrbuch Histologie2*. 6th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2019. p. 634–63.
28. Jakob FJ. Vitamin D (Cholecalciferol) und Vitamin-D-Hormon (Calcitriol) [Internet]. Blum HE, Müller-Wieland D, editors. *Klinische Pathophysiologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2020 [cited 2021 Jul 29]. Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-004-132250>
29. Kloeters O, Germann G, Megerle K. Aufnahme und Erstversorgung des Schwerbrandverletzten. In: Kamolz L, Herndon DN, Jeschke MG, editors. *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 31–9.

30. Gauglitz G, Herndon DN, Kamolz L-P, Jeschke MG. Mediatoren der Brandverletzung. In: Kamolz L, Herndon DN JM, editor. Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas. Wien; 2009. p. 13–6.
31. Stanojic M, Abdullahi A, Rehou S, Parousis A, Jeschke MG. Pathophysiological Response to Burn Injury in Adults. *Annals of Surgery* [Internet]. 2018 Mar;267(3):576–84. Available from: <https://journals.lww.com/00000658-201803000-00030>
32. Pallua N, Demir E. Brandverletzungen. In: Marx G, Muhl E, Zacharowski K, Zeuzem S, editors. *Die Intensivmedizin* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 2015. p. 1086–104. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-54953-3>
33. Cardell M, Calcagni M. Checkliste Chirurgie [Internet]. 11th ed. Largiadèr FA, Saeger H, Keel M, editors. *Checkliste Chirurgie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-004-132240>
34. Bühren V, Keel M, Marzi I. Verletzungen durch physikalische Einwirkungen. In: Bühren V, Keel M, Marzi I, editors. *Checkliste Traumatologie* [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016. p. 236–7. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-003-129342>
35. Schmidt GN, Thiele J. Baux-Score. *Pschyrembel online*. 2020.
36. Lüdi M, Stüber F, Venetz P. Abbreviated Burn Severity Index (ABSI) [Internet]. *Pschyrembel online*. 2020 [cited 2020 Jun 8]. Available from: <https://www.pschyrembel.de/Abbreviated Burn Severity Index/K00TH>
37. Lemke H, Toomes L. Referenz Notfallmedizin. *Referenz Notfallmedizin*. Thieme; 2019. 513–522.
38. Moritz AR, Henriques FC. Studies of Thermal Injury: II. The Relative Importance of Time and Surface Temperature in the Causation of Cutaneous Burns. *The American journal of pathology*. 1947;23(5):695–720.
39. Davies JWL. Interactions of heat with tissues. In: Cooper G, editor. *Scientific foundations of trauma*. Oxford: Butterworth-Heinemann; 1997. p. 389–409.
40. Verbrennung (Medizin) [Internet]. 2021 [cited 2021 Aug 11]. Available from: [https://de.wikipedia.org/wiki/Verbrennung\\_\(Medizin\)](https://de.wikipedia.org/wiki/Verbrennung_(Medizin))
41. Haller H. Verbrennungstiefe und Ausmaß. In: *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 159–64.
42. Kamolz L-P, Herndon DN, Jeschke MG (Hrsg. ). *Verbrennungen - Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Wien: SpringerWienNewYork; 2009. 1–251.
43. Schindler E, Redaktion P. Verbrennung. *Pschyrembel online*. 2018.
44. Raff T. Verbrennung. In: Hartig W, Biesalski HK, Druml W, Fürst P, Weimann A, editors. *Ernährungs- und Infusionstherapie* [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2004. p. 395–7. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/b-0034-14215>
45. Striebel HW. Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin [Internet]. *Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2020. 560–564. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b0000000059>
46. Striebel HW. Künstliche Ernährung. In: *Anästhesie Intensivmedizin Notfallmedizin* [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2020. p. 429. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b0000000059>

47. G. Gauglitz, Herndon D, Kamolz L JM. Sepsis bei Brandverletzten. In: *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 151–2.
48. Greenhalgh DG, Saffle JR, Holmes JH, Gamelli RL, Palmieri TL, Horton JW, et al. American Burn Association Consensus Conference to Define Sepsis and Infection in Burns. *Journal of Burn Care & Research* [Internet]. 2007 Nov;28(6):776–90. Available from: <https://academic.oup.com/jbcr/article/28/6/776-790/4636823>
49. Kloeters O, Germann G, Megerle K. Inhalationstrauma. In: *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Springer Verlag Wien; 2009. p. 37–8.
50. Heyde C-E, Kayser R, Böhm H. Das Kompartmentsyndrom der Extremitäten. *Der Notarzt* [Internet]. 2002 Apr;18(2):46–51. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-2002-25243>
51. Kloeters O, Germann G, Megerle K. Katecholamin-Therapie. In: Kamolz L-P, Herndon DN, Jeschke MG, editors. *Verbrennungen Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. 1st ed. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 36–7.
52. Malzer R. Erstversorgung am Unfallort. In: Kamolz L-P, Herndon DN, Jeschke MG, editors. *Verbrennungen – Diagnose, Therapie und Rehabilitation des thermischen Traumas*. Wien: Springer Verlag Wien; 2009. p. 25–20.
53. Schmauss D, Rezaeian F, Finck T, Machens HG, Wettstein R, Harder Y. Treatment of Secondary Burn Wound Progression in Contact Burns - A Systematic Review of Experimental Approaches. *Journal of Burn Care and Research*. 2015 May 1;36(3):e176–89.
54. deCamara DL, Raine TJ, London MD, Robson MC, Hegggers JP. Progression of thermal injury: A morphologic study. *Plastic and Reconstructive Surgery* [Internet]. 1982 Mar;69(3):491–9. Available from: <http://journals.lww.com/00006534-198203000-00016>
55. Watts AMI, Tyler MPH, Perry ME, Roberts AHN, McGrouther DA. Burn depth and its histological measurement. *Burns*. 2001;27(2):154–60.
56. Singh V, Devgan L, Bhat S, Milner SM. The pathogenesis of burn wound conversion. *Annals of Plastic Surgery*. 2007;59(1):109–15.
57. Gravante G, Filingeri V, Delogu D, Santeusano G, Palmieri MB, Esposito G, et al. Apoptotic cell death in deep partial thickness burns by coexpression analysis of TUNEL and Fas. Vol. 139, *Surgery*. United States; 2006. p. 854–5.
58. Gozuacik D, Kimchi A. Autophagy and Cell Death. *Current Topics in Developmental Biology*. 2007;78(06):217–45.
59. Showkat M, Beigh MA, Andrabi KI. mTOR Signaling in Protein Translation Regulation: Implications in Cancer Genesis and Therapeutic Interventions. *Molecular Biology International*. 2014;2014:1–14.
60. Rubinsztein DC, Shpilka T, Elazar Z. Mechanisms of Autophagosome Biogenesis. *Current Biology* [Internet]. 2012;22(1):R29–34. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960982211013169>
61. Salibian AA, Rosario AT del, Severo LDAM, Nguyen L, Banyard DA, Toranto JD, et al. Current concepts on burn wound conversion—A review of recent advances in understanding the secondary progressions of burns. *Burns* [Internet]. 2016;42(5):1025–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2015.11.007>
62. Levine B, Kroemer G. Autophagy in the Pathogenesis of Disease. *Cell*. 2008;132(1):27–42.

63. Shupp JW, Nasabzadeh TJ, Rosenthal DS, Jordan MH, Fidler P, Jeng JC. A Review of the Local Pathophysiologic Bases of Burn Wound Progression. *Journal of Burn Care & Research* [Internet]. 2010 Nov;31(6):849–73. Available from: <https://academic.oup.com/jbcr/article/31/6/849-873/4601974>
64. Kang R, Zeh HJ, Lotze MT, Tang D. The Beclin 1 network regulates autophagy and apoptosis. *Cell Death & Differentiation* [Internet]. 2011 Apr 11;18(4):571–80. Available from: <http://www.nature.com/articles/cdd2010191>
65. Levine B, Sinha S, Kroemer G. BCL-2 family members. *Autophagy*. 2008;4(5):600–6.
66. Gavrieli Y, Sherman Y, Ben-Sasson SA. Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *Journal of Cell Biology* [Internet]. 1992 Nov 1;119(3):493–501. Available from: <https://rupress.org/jcb/article/119/3/493/14516/Identification-of-programmed-cell-death-in-situ>
67. Xiao M, Li L, Li C, Zhang P, Hu Q, Ma L, et al. Role of autophagy and apoptosis in wound tissue of deep second-degree burn in rats. *Academic Emergency Medicine*. 2014;21(4):383–91.
68. GRAVANTE G, FILINGERI V, Delogu D, Santeusano G, Palmieri MB, ESPOSITO G, et al. Apoptotic cell death in deep partial thickness burns by coexpression analysis of TUNEL and Fas. *Surgery* [Internet]. 2006 Jun;139(6):854–5. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606006000729>
69. Cassuto J, Tarnow P, Yregård L, Lindblom L, Röntfors J. Regulation of postburn ischemia by  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenoceptor subtypes. *Burns* [Internet]. 2005 Mar;31(2):131–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417904002505>
70. Jeschke MG, Bolder U, Finnerty CC, Przkora R, Müller U, Maihöfer R, et al. The effect of hepatocyte growth factor on gut mucosal apoptosis and proliferation, and cellular mediators after severe trauma. *Surgery* [Internet]. 2005 Sep;138(3):482–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606005002126>
71. Iwasaki K, Izawa M, Mihara M. Thermal injury induces both necrosis and apoptosis in rat skin. *British Journal of Dermatology* [Internet]. 1997 Oct;137(4):647–8. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-2133.1997.tb03805.x>
72. Matylevitch NP, Schuschereba ST, Mata JR, Gilligan GR, Lawlor DF, Goodwin CW, et al. Apoptosis and accidental cell death in cultured human keratinocytes after thermal injury. *American Journal of Pathology* [Internet]. 1998;153(2):567–77. Available from: [http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)65599-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0002-9440(10)65599-X)
73. Giles N, Rea S, Beer T, Wood FM, Fear MW. A peptide inhibitor of c-Jun promotes wound healing in a mouse full-thickness burn model. *Wound Repair and Regeneration* [Internet]. 2008 Jan;16(1):58–64. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1524-475X.2007.00331.x>
74. Godar DE. Preprogrammed and Programmed Cell Death Mechanisms of Apoptosis: UV-Induced Immediate and Delayed Apoptosis. *Photochemistry and Photobiology* [Internet]. 1996 Jun;63(6):825–30. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1751-1097.1996.tb09638.x>
75. Godar DE. UVA1 Radiation Triggers Two Different Final Apoptotic Pathways. *Journal of Investigative Dermatology* [Internet]. 1999 Jan;112(1):3–12. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022202X1540363X>
76. Godar DE. Singlet oxygen-triggered immediate preprogrammed apoptosis. In 2000. p. 309–30. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687900190329>

77. Schreiner Ph. Ueber eine neue organische Basis in thierischen Organismen. Justus Liebig's Annalen der Chemie [Internet]. 1878;194(1):68–84. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1002/jlac.18781940107>
78. Shimizu H, Kakimoto Y, Sano I. Spermine and spermidine in blood cells, and a possible occurrence of spermine in cell nucleus. Archives of Biochemistry and Biophysics [Internet]. 1965;110(2):368–72. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003986165901360>
79. Kitada M, Ogura Y, Koya D. Role of Sirt1 as a Regulator of Autophagy. In: Autophagy: Cancer, Other Pathologies, Inflammation, Immunity, Infection, and Aging [Internet]. Elsevier; 2016. p. 89–100. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/B978012802937400003X>
80. Golbidi S, Daiber A, Korac B, Li H, Essop MF, Laher I. Health Benefits of Fasting and Caloric Restriction. Current Diabetes Reports. 2017;17(12).
81. Ito D, Ito H, Ideta T, Kanbe A, Ninomiya S, Shimizu M. Systemic and topical administration of spermidine accelerates skin wound healing. Cell Communication and Signaling [Internet]. 2021;19(1):1–12. Available from: <https://doi.org/10.1186/s12964-021-00717-y>
82. Yu ZW, Quinn PJ. Dimethyl sulphoxide: A review of its applications in cell biology. Bioscience Reports. 1994;14(6):259–81.
83. Schofield MA, Agbunag R, Miller JH. DNA inversions between short inverted repeats in Escherichia coli. Genetics [Internet]. 1992 Oct;132(2):295–302. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1427029>
84. Karlsson JO, Cravalho EG, Borel Rinkes IH, Tompkins RG, Yarmush ML, Toner M. Nucleation and growth of ice crystals inside cultured hepatocytes during freezing in the presence of dimethyl sulfoxide. Biophysical Journal [Internet]. 1993 Dec;65(6):2524–36. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006349593813195>
85. Rall WF, Fahy GM. Ice-free cryopreservation of mouse embryos at –196 °C by vitrification. Nature [Internet]. 1985 Feb 1;313(6003):573–5. Available from: <http://www.nature.com/articles/313573a0>
86. Hsieh DS. Drug Permeation Enhancement - Theory and Applications. Drug Development and Industrial Pharmacy [Internet]. 1994 Jan 20;20(10). Available from: <http://www.tandfonline.com/doi/full/10.3109/03639049409038397>
87. Simic MG. Mechanisms of inhibition of free-radical processes in mutagenesis and carcinogenesis. Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis [Internet]. 1988;202(2):377–86. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0027510788901996>
88. Ahkong QF, Fisher D, Tampion W, Lucy JA. Mechanisms of cell fusion. Nature [Internet]. 1975;253(5488):194–5. Available from: <https://doi.org/10.1038/253194a0>
89. Ancho doguy TJ, Cecchini CA, Crowe JH, Crowe LM. Insights into the cryoprotective mechanism of dimethyl sulfoxide for phospholipid bilayers. Cryobiology [Internet]. 1991;28(5):467–73. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001122409190056T>
90. Tilcock CPS, Fisher D. Interactions of glycerol monooleate and dimethylsulphoxide with phospholipids A differential scanning calorimetry and <sup>31</sup>P-NMR study. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes [Internet]. 1982;685(3):340–6. Available from: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/000527368290075X>

91. Maclean N, Hall BK. Cell commitment and differentiation. In: Ford C, editor. FEBS Letters [Internet]. Cambridge University Press; 1988. p. 219–20. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1016/0014-5793%2888%2980682-3>
92. Guo W, Qiu W, Ao X, Li W, He X, Ao L, et al. Low-concentration DMSO accelerates skin wound healing by Akt / mTOR -mediated cell proliferation and migration in diabetic mice. *British Journal of Pharmacology* [Internet]. 2020 Jul 7;177(14):3327–41. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/bph.15052>
93. Pielesz A, Gawłowski A, Biniś D, Bobiński R, Kawecki M, Klama-Baryła A, et al. The role of dimethyl sulfoxide (DMSO) in ex-vivo examination of human skin burn injury treatment. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*. 2018 May;196:344–52.
94. Das LM, Binko AM, Traylor ZP, Peng H, Lu KQ. Vitamin D improves sunburns by increasing autophagy in M2 macrophages. *Autophagy* [Internet]. 2019;15(5):813–26. Available from: <https://doi.org/10.1080/15548627.2019.1569298>
95. Tobalem M, Harder Y, Rezaeian F, Wettstein R. Secondary burn progression decreased by erythropoietin. *Critical Care Medicine*. 2013;41(4):963–71.
96. Wu S-H, Lu I-C, Lee S-S, Kwan A-L, Chai C-Y, Huang S-H. Erythropoietin attenuates motor neuron programmed cell death in a burn animal model. Hsieh Y-H, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 2018 Jan 31;13(1):e0190039. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0190039>
97. Orhan E, Sapmaz-Metin M, Tarladaçalışır-Topçu Y, Gündüz Ö, Kaya O. The effect of platelet-rich plasma in inactive form on the burn zone of stasis in rats. *Journal of Plastic Surgery and Hand Surgery* [Internet]. 2019;53(5):301–8. Available from: <https://doi.org/10.1080/2000656X.2019.1614454>
98. Baskaran H, Toner M, Yarmush ML, Berthiaume F. Poloxamer-188 Improves Capillary Blood Flow and Tissue Viability in a Cutaneous Burn Wound. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 2001 Nov;101(1):56–61. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480401962626>
99. Papp A, Romppanen E, Lahtinen T, Uusaro A, Härmä M, Alhava E. Red blood cell and tissue water content in experimental thermal injury. *Burns* [Internet]. 2005 Dec;31(8):1003–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417905001907>
100. Lund T, Onarheim H, Reed RK. Pathogenesis of edema formation in burn injuries. *World Journal of Surgery* [Internet]. 1992 Jan;16(1):2–9. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/BF02067107>
101. Baskaran H, Yarmush ML, Berthiaume F. Dynamics of Tissue Neutrophil Sequestration after Cutaneous Burns in Rats. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 2000 Sep;93(1):88–96. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022480400959559>
102. Ferrara JJ, Kukuy EL, Gilman DA, Choe EU, Franklin EW, Flint LM. Alpha-trinositol reduces edema formation at the site of scald injury. *Surgery* [Internet]. 1998 Jan;123(1):36–45. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0039606098702260>
103. Pitt RM, Parker JC, Jurkovich GJ, Taylor AE, Curreri PW. Analysis of altered capillary pressure and permeability after thermal injury. *Journal of Surgical Research* [Internet]. 1987 Jun;42(6):693–702. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0022480487900138>
104. Robbins SL, Kumar V, Cotran RS. Robbins and Cotran pathologic basis of disease. Philadelphia, PA: Saunders/Elsevier; 2010.

105. Cotran RS. The Delayed And Prolonged Vascular Leakage In Inflammation. II. An Electron Microscopic Study Of The Vascular Response After Thermal Injury. The American journal of pathology [Internet]. 1965 Apr;46:589–620. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14278666>
106. Sudarikova A v., Fomin M v., Yankelevich IA, Ilatovskaya D v. The implications of histamine metabolism and signaling in renal function. *Physiological Reports* [Internet]. 2021 Apr;9(8). Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.14814/phy2.14845>
107. Panula P, Chazot PL, Cowart M, Gutzmer R, Leurs R, Liu WLS, et al. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. XCVIII. Histamine Receptors. Ohlstein EH, editor. *Pharmacological Reviews* [Internet]. 2015 Jul;67(3):601–55. Available from: <http://pharmrev.aspetjournals.org/lookup/doi/10.1124/pr.114.010249>
108. Mehta P, Miszta P, Rzodkiewicz P, Michalak O, Krzeczyński P, Filipek S. Enigmatic Histamine Receptor H4 for Potential Treatment of Multiple Inflammatory, Autoimmune, and Related Diseases. *Life* [Internet]. 2020 Apr 24;10(4):50. Available from: <https://www.mdpi.com/2075-1729/10/4/50>
109. Mocking TAM, Bosma R, Rahman SN, Verweij EWE, McNaught-Flores DA, Vischer HF, et al. Molecular aspects of histamine receptors. In: Blandina P, Passani MB, editors. *Histamine receptors: Preclinical and clinical aspects*. Springer International Publishing; 2016. p. 1–49.
110. Holden NS, Gong W, King EM, Kaur M, Giembycz MA, Newton R. Potentiation of NF- $\kappa$ B-dependent transcription and inflammatory mediator release by histamine in human airway epithelial cells. *British Journal of Pharmacology* [Internet]. 2007 Nov;152(6):891–902. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1038/sj.bjp.0707457>
111. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M. *Pharmakologie und Toxikologie* [Internet]. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M, Hein L, editors. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016. 147–157. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-004-129674>
112. Hinghofer-Szalkay H. Kontraktionsmechanismus [Internet]. *Grundlagen und Methoden der Physiologie*. [cited 2021 Jun 20]. Available from: <http://physiologie.cc/I.3.htm>
113. Monczor F, Copsel S, Fernandez N, Davio C, Shayo C. Histamine H2 Receptor in Blood Cells: A Suitable Target for the Treatment of Acute Myeloid Leukemia. In 2016. p. 141–60. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/164\\_2016\\_8](http://link.springer.com/10.1007/164_2016_8)
114. Kay LJ, Suvarna SK, Peachell PT. Histamine H4 receptor mediates chemotaxis of human lung mast cells. *European Journal of Pharmacology* [Internet]. 2018 Oct;837:38–44. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0014299918304916>
115. Thangam EB, Jemima EA, Singh H, Baig MS, Khan M, Mathias CB, et al. The Role of Histamine and Histamine Receptors in Mast Cell-Mediated Allergy and Inflammation: The Hunt for New Therapeutic Targets. *Frontiers in Immunology* [Internet]. 2018 Aug 13;9. Available from: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.01873/full>
116. Jemima EA, Prema A, Thangam EB. Functional characterization of histamine H4 receptor on human mast cells. *Molecular Immunology* [Internet]. 2014 Nov;62(1):19–28. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0161589014001199>
117. Santos FX, Arroyo C, García I, Blasco R, Obispo JM, Hamann C, et al. Role of mast cells in the pathogenesis of postburn inflammatory response: reactive oxygen species as mast cell stimulators. *Burns* [Internet]. 2000 Mar;26(2):145–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417999000212>

118. Friedl HP, Till GO, Trentz O, Ward PA. Roles of histamine, complement and xanthine oxidase in thermal injury of skin. *The American journal of pathology* [Internet]. 1989 Jul;135(1):203–17. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2570531>
119. Röntfors J, Cassuto J. Role of histamine receptors in the regulation of edema and circulation postburn. *Burns* [Internet]. 2003 Dec;29(8):769–77. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417903002031>
120. Smalley MC, Olivi J, Causa KA, Pathak M, Austin CL, Thompson SJ. Post-burn temporal dynamics of blood plasma histamine during the initial 6 days from injury. *International journal of burns and trauma*. 2020;10(3):68–75.
121. Hippenstiel S, Krüll M, Ikemann A, Risau W, Clauss M, Suttorp N. VEGF induces hyperpermeability by a direct action on endothelial cells. *American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology* [Internet]. 1998 May 1;274(5):L678–84. Available from: <https://www.physiology.org/doi/10.1152/ajplung.1998.274.5.L678>
122. Infanger M, Schmidt O, Kossmehl P, Grad S, Ertel W, Grimm D. Vascular endothelial growth factor serum level is strongly enhanced after burn injury and correlated with local and general tissue edema. *Burns* [Internet]. 2004 Jun;30(4):305–11. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417903003607>
123. Jonkam CC, Enkhbaatar P, Nakano Y, Boehm T, Wang J, Nussberger J, et al. EFFECTS OF THE BRADYKININ B2 RECEPTOR ANTAGONIST ICATIBANT ON MICROVASCULAR PERMEABILITY AFTER THERMAL INJURY IN SHEEP. *Shock* [Internet]. 2007 Dec;28(6):704–9. Available from: <https://journals.lww.com/00024382-200712000-00012>
124. Nwariaku FE, Sikes PJ, Lightfoot E, Mileski WJ, Baxter C. Effect of a bradykinin antagonist on the local inflammatory response following thermal injury. *Burns* [Internet]. 1996 Jun;22(4):324–7. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0305417995001301>
125. Holzmann H, Altmeyer P. *Dermatologie und Rheuma* [Internet]. Holzmann H, Altmeyer P, Marsch WC, Vogel HG, editors. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1987. 25–50. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/978-3-642-72668-2>
126. Yao L, Xue X, Yu P, Ni Y, Chen F. Evans Blue Dye: A Revisit of Its Applications in Biomedicine. *Contrast Media & Molecular Imaging* [Internet]. 2018;2018:1–10. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/cmml/2018/7628037/>
127. ALEXANDER F, MATHIESON M, TEOH KHT, HUVAL W v., LELCUK S, VALERI CR, et al. Arachidonic Acid Metabolites Mediate Early Burn Edema. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* [Internet]. 1984 Aug;24(8):709–12. Available from: <http://journals.lww.com/00005373-198408000-00003>
128. Barrow RE, Ramirez RJ, Zhang X-J. Ibuprofen modulates tissue perfusion in partial-thickness burns. *Burns* [Internet]. 2000 Jun;26(4):341–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417999001680>
129. Robson MC, del Beccaro EJ, Hegggers JP. The effect of prostaglandins on the dermal microcirculation after burning, and the inhibition of the effect by specific pharmacological agents. *Plastic and reconstructive surgery* [Internet]. 1979 Jun;63(6):781–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/441193>

130. Kandel E, Koester S, Mack SH, Siegelbaum S. Hyperalgesia Has Both Peripheral and Central Origins. In: Principles of neural science. 6th ed. McGraw-Hill Education; 2021. p. 480.
131. Kandel E, Koester JD, Mack SH, Siegelbaum S. Several Classes of Metabolites Can Serve as Transcellular Messengers. In: Principles of neural science. 6th ed. McGraw-Hill Education; 2021. p. 310.
132. Yonehara N, Yoshimura M. Interaction between nitric oxide and substance P on heat-induced inflammation in rat paw. *Neuroscience Research* [Internet]. 2000 Jan;36(1):35–43. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168010299001078>
133. Inoue H, Ando K, Wakisaka N, Matsuzaki K, Aihara M, Kumagai N. Effects of Nitric Oxide Synthase Inhibitors on Vascular Hyperpermeability with Thermal Injury in Mice. *Nitric Oxide* [Internet]. 2001 Aug;5(4):334–42. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1089860301903507>
134. Shi Z, Li C, Li C. The Effect of Air Pressure on Edema and Healing of Scalded Tissue of Rats. *Journal of Burn Care & Research* [Internet]. 2007 Mar;28(2):286–90. Available from: <https://academic.oup.com/jbcr/article/28/2/286-290/4605514>
135. Lund T, Reed RK. Alpha-Trinositol Inhibits Edema Generation N And Albumin Extravasation In Thermally Injured Skin. *The Journal of Trauma: Injury, Infection, and Critical Care* [Internet]. 1994 Jun;36(6):761–5. Available from: <http://journals.lww.com/00005373-199406000-00001>
136. Nakajima M, Kojiro M, Aso S, Matsui H, Fushimi K, Kaita Y, et al. Effect of high-dose vitamin C therapy on severe burn patients: a nationwide cohort study. *Critical Care* [Internet]. 2019 Dec 12;23(1):407. Available from: <https://ccforum.biomedcentral.com/articles/10.1186/s13054-019-2693-1>
137. Tanaka H, Lund T, Wiig H, Reed RK, Yukioka T, Matsuda H, et al. High dose vitamin C counteracts the negative interstitial fluid hydrostatic pressure and early edema generation in thermally injured rats. *Burns* [Internet]. 1999 Nov;25(7):569–74. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030541799900073X>
138. Smolle C, Lindenmann J, Kamolz L, Smolle-Juettner F-M. The History and Development of Hyperbaric Oxygenation (HBO) in Thermal Burn Injury. *Medicina* [Internet]. 2021 Jan 8;57(1):49. Available from: <https://www.mdpi.com/1648-9144/57/1/49>
139. Edwards M, Singh M, Selesny S, Cooper JS. Hyperbaric Treatment Of Thermal Burns [Internet]. *StatPearls*. 2021. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29262193>
140. Meizoso J, Ray J, Allen C, van Haren R, Ruiz G, Namias N, et al. Hypercoagulability and Venous Thromboembolism in Burn Patients. *Seminars in Thrombosis and Hemostasis* [Internet]. 2015 Feb 15;41(01):043–8. Available from: <http://www.thieme-connect.de/DOI/DOI?10.1055/s-0034-1398380>
141. Uygur F, Evinc R, Urhan M, Celikoz B, Haholu A. Salvaging the Zone of Stasis By Simvastatin: An Experimental Study in Rats. *Journal of Burn Care & Research* [Internet]. 2009 Sep;30(5):872–9. Available from: <https://academic.oup.com/jbcr/article/30/5/872-879/4598474>
142. Boyko T, Marin C, Furnari G, Flynn W, Lukan JK. Safety profile of atorvastatin in the role of burn wound injury conversion. *The American Journal of Surgery* [Internet]. 2020 Nov;220(5):1323–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961020304025>

143. Lunder M, Žibera L, Janić M, Jerin A, Skitek M, Šabovič M, et al. Low-dose atorvastatin, losartan, and particularly their combination, provide cardiovascular protection in isolated rat heart and aorta. *Heart and Vessels* [Internet]. 2013 Mar 21;28(2):246–54. Available from: <http://link.springer.com/10.1007/s00380-012-0259-0>
144. Bagnato G, Bitto A, Pizzino G, Irrera N, Sangari D, Cinquegrani M, et al. Simvastatin attenuates the development of pulmonary and cutaneous fibrosis in a murine model of systemic sclerosis. *Rheumatology* [Internet]. 2013 Aug 1;52(8):1377–86. Available from: <https://academic.oup.com/rheumatology/article-lookup/doi/10.1093/rheumatology/ket144>
145. Li C, Sun BK, Lim SW, Song JC, Kang S-W, Kim YS, et al. Combined Effects of Losartan and Pravastatin on Interstitial Inflammation and Fibrosis in Chronic Cyclosporine-Induced Nephropathy. *Transplantation* [Internet]. 2005 Jun 15;79(11):1522–9. Available from: <https://journals.lww.com/00007890-200506150-00010>
146. Akershoek JJ, Brouwer KM, Vlig M, Boekema BKHL, Beelen RHJ, Middelkoop E, et al. Differential effects of Losartan and Atorvastatin in partial and full thickness burn wounds. *PLoS ONE*. 2017;12(6).
147. Wang B, Sun L, Tian Y, Li Z, Wei H, Wang D, et al. Effects of atorvastatin in the regulation of circulating EPCs and angiogenesis in traumatic brain injury in rats. *Journal of the Neurological Sciences* [Internet]. 2012 Aug;319(1–2):117–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022510X12002067>
148. Hosny KM, Alhakamy NA, Sindi AM, Khallaf RA. Coconut oil nanoemulsion loaded with a statin hypolipidemic drug for management of burns: Formulation and in vivo evaluation. *Pharmaceutics*. 2020;12(11):1–16.
149. Hoth M, Wischmeyer E. Sekundäre Hämostase. In: *Duale Reihe - Physiologie*. 2nd ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. p. 183–5.
150. Krause U. Fibrin. *Pschyrembel online*. 20AD.
151. Hoth M, Wischmeyer E. *Duale Reihe Physiologie* [Internet]. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2012. 189. (Duale Reihe). Available from: <http://www.thieme-connect.de/products/ebooks/book/10.1055/b-002-23567>
152. Işik S, Şahin Ü, Ilgan S, Güler M, Günalp B, Selmanpakoğlu N. Saving the zone of stasis in burns with recombinant tissue-type plasminogen activator (r-tPA): an experimental study in rats. *Burns* [Internet]. 1998 May;24(3):217–23. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417997001162>
153. Lüllmann H, Mohr K, Wehling M, Hein L, editors. *Das Eicosanoid-System*. In: *Pharmakologie und Toxikologie* [Internet]. 18th ed. Stuttgart: Georg Thieme Verlag; 2016. p. 350–61. Available from: <https://eref.thieme.de/10.1055/b-004-129674>
154. Battal MN, Hata Y, Matsuka K, Ito O, Matsuda H, Yoshida Y, et al. Reduction of progressive burn injury by a stable prostaglandin I<sub>2</sub> analogue, beraprost sodium (Procylin): an experimental study in rats. *Burns* [Internet]. 1996 Nov;22(7):531–8. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0305417996000241>
155. Latha B, Babu M. The involvement of free radicals in burn injury: a review. *Burns* [Internet]. 2001 Jun;27(4):309–17. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0305417900001273>
156. Stubbe J. Ribonucleotide reductases: amazing and confusing. *The Journal of biological chemistry* [Internet]. 1990 Apr 5;265(10):5329–32. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2180924>

157. Reichard P, Ehrenberg A. Ribonucleotide reductase--a radical enzyme. *Science* [Internet]. 1983 Aug 5;221(4610):514–9. Available from: <https://www.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/science.6306767>
158. Fantone JC, Ward PA. Role of oxygen-derived free radicals and metabolites in leukocyte-dependent inflammatory reactions. *The American journal of pathology* [Internet]. 1982 Jun;107(3):395–418. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6282132>
159. del Maestro R, Thaw HH, Björk J, Planker M, Arfors KE. Free radicals as mediators of tissue injury. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* [Internet]. 1980;492:43–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6261530>
160. Weiss SJ. Oxygen, ischemia and inflammation. *Acta physiologica Scandinavica Supplementum* [Internet]. 1986;548:9–37. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3019082>
161. Babior BM. Oxygen-Dependent Microbial Killing by Phagocytes. *New England Journal of Medicine* [Internet]. 1978 Mar 23;298(12):659–68. Available from: <http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJM197803232981205>
162. Horton JW. Free radicals and lipid peroxidation mediated injury in burn trauma: the role of antioxidant therapy. *Toxicology* [Internet]. 2003 Jul;189(1–2):75–88. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300483X03001549>
163. Singer AJ, Taira BR, Lin F, Lim T, Anderson R, McClain SA, et al. Curcumin Reduces Injury Progression in a Rat Comb Burn Model. *Journal of Burn Care & Research* [Internet]. 2011 Jan;32(1):135–42. Available from: <https://academic.oup.com/jbcr/article/32/1/135-142/4588198>
164. Guo SX, Jin YY, Fang Q, You CG, Wang XG, Hu XL, et al. Beneficial Effects of Hydrogen-Rich Saline on Early Burn-Wound Progression in Rats. Shimosawa T, editor. *PLOS ONE* [Internet]. 2015 Apr 13;10(4):e0124897. Available from: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0124897>
165. Yagi K. Assay for blood plasma or serum. In 1984. p. 328–31. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0076687984050424>
166. Fang Q, Guo S, Zhou H, Han R, Wu P, Han C. Astaxanthin protects against early burn-wound progression in rats by attenuating oxidative stress-induced inflammation and mitochondria-related apoptosis. *Scientific Reports* [Internet]. 2017;7(September 2016):1–13. Available from: <http://dx.doi.org/10.1038/srep41440>
167. Rosique MJ, Rosique RG, Faria FM, Oliveira CC, Farina JA, Évora PRB. Methylene blue reduces progression of burn and increases skin survival in an experimental rat model. *Burns* [Internet]. 2017;43(8):1702–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.burns.2017.04.021>
168. Ocal K, Avlan D, Cinel I, Unlu A, Ozturk C, Yaylak F, et al. The effect of N-acetylcysteine on oxidative stress in intestine and bacterial translocation after thermal injury. *Burns*. 2004;30(8):778–84.
169. Francis E, Kearney L, Clover J. The effects of stem cells on burn wounds: a review. *International journal of burns and trauma* [Internet]. 2019;9(1):1–12. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30911430>
170. Hill DM, Mahmood AO, Mitchell MB, Allen JH, Hickerson WL, Velamuri SRR, et al. Early Application of a Water-soluble Surfactant Dressing for Partial-thickness Burn Wounds to Reduce Wound Conversion. *Journal of Burn Care & Research* [Internet]. 2021 Apr 1;42(Supplement\_1):S126–S126. Available from: [https://academic.oup.com/jbcr/article/42/Supplement\\_1/S126/6205982](https://academic.oup.com/jbcr/article/42/Supplement_1/S126/6205982)
171. Dolgachev VA, Ciotti S, Liechty E, Levi B, Wang SC, Baker JR, et al. Dermal Nanoemulsion Treatment Reduces Burn Wound Conversion and Improves Skin

- Healing in a Porcine Model of Thermal Burn Injury. *Journal of Burn Care & Research* [Internet]. 2021 Jun 18; Available from: <https://academic.oup.com/jbcr/advance-article/doi/10.1093/jbcr/irab118/6305143>
172. Dolgachev VA, Ciotti SM, Eisma R, Gracon S, Wilkinson JE, Baker JR, et al. Nanoemulsion Therapy for Burn Wounds Is Effective as a Topical Antimicrobial Against Gram-Negative and Gram-Positive Bacteria. *Journal of Burn Care & Research* [Internet]. 2016;37(2):e104–14. Available from: <https://academic.oup.com/jbcr/article/37/2/e104-e114/4668502>
  173. Şener G, Şehirli AÖ, Gedik N, Dülger GA. Rosiglitazone, a PPAR- $\gamma$  ligand, protects against burn-induced oxidative injury of remote organs. *Burns* [Internet]. 2007 Aug;33(5):587–93. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S030541790600698X>
  174. Taira BR, Singer AJ, McClain SA, Lin F, Rooney J, Zimmerman T, et al. Rosiglitazone, a PPAR- $\gamma$  ligand, reduces burn progression in rats. *Journal of Burn Care and Research*. 2009;30(3):499–504.
  175. Choi J, Kim R, Kim J, Jeong W, Park SW, Lee HW, et al. Nicorandil reduces burn wound progression by enhancing skin blood flow. *Journal of Plastic, Reconstructive and Aesthetic Surgery*. 2018 Aug 1;71(8):1196–206.
  176. Semenza GL. Hypoxia-inducible factor 1: Control of oxygen homeostasis in health and disease. *Pediatric Research*. 2001;49(5):614–7.
  177. Tobalem M, Harder Y, Tschanz E, Speidel V, Pittet-Cuénod B, Wettstein R. First-aid with warm water delays burn progression and increases skin survival. *Journal of Plastic, Reconstructive & Aesthetic Surgery* [Internet]. 2013 Feb;66(2):260–6. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1748681512005505>
  178. Ruth B. Berührungslose Durchblutungsmessung mit der Laser-Speckle-Methode. *Biomedizinische Technik/Biomedical Engineering* [Internet]. 1988 Jul 17;33(S2):97–8. Available from: <https://www.degruyter.com/document/doi/10.1515/bmte.1988.33.s2.97/html>
  179. Polyakov S v. Photomultiplier Tubes. *Experimental Methods in the Physical Sciences*. 2013;45:69–82.
  180. Hermeyer KA. Immunhistochemische Untersuchungen zum Nachweis der Expression von induzierbarer Stickoxid-Synthase ( iNOS ), Nitrotyrosin ( NT ) und Mangan-Superoxid-Dismutase ( Mn-SOD ) in Lungen von Kälbern nach experimenteller Infektion mit *Mycoplasma bovis* [Internet]. 2008. Available from: [https://elib.tiho-hannover.de/servlets/MCRFileNodeServlet/etd\\_derivate\\_00001671/hermeyerk\\_ss08.pdf](https://elib.tiho-hannover.de/servlets/MCRFileNodeServlet/etd_derivate_00001671/hermeyerk_ss08.pdf)
  181. Hamperl H. Haut und Hautdrüsen. In: *Lehrbuch der Allgemeinen Pathologie und der Pathologischen Anatomie* [Internet]. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg; 1950. p. 737–67. Available from: [http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-28502-2\\_23](http://link.springer.com/10.1007/978-3-662-28502-2_23)
  182. Jaskille AD, Jeng JC, Sokolich JC, Lunsford P, Jordan MH. Repetitive ischemia-reperfusion injury: A plausible mechanism for documented clinical burn-depth progression after thermal injury. *Journal of Burn Care and Research*. 2007;28(1):13–20.
  183. Chung DH, Evers BM, Townsend CM, Huang KF, Herndon DN, Thompson JC. Role of polyamine biosynthesis during gut mucosal adaptation after burn injury. *The American Journal of Surgery* [Internet]. 1993 Jan;165(1):144–9. Available from: <https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0002961005804180>

184. Abbas OL, Özatik O, Gönen ZB, Öğüt S, Özatik FY, Salkın H, et al. Comparative Analysis of Mesenchymal Stem Cells from Bone Marrow, Adipose Tissue, and Dental Pulp as Sources of Cell Therapy for Zone of Stasis Burns. *Journal of Investigative Surgery*. 2019;32(6):477–90.
185. Gurtner GC. ADIPOSE TISSUE IN WOUND HEALING. *Fat Injection*. 2018;(December).
186. Hu L, Wang J, Zhou X, Xiong Z, Zhao J, Yu R, et al. Exosomes derived from human adipose mesenchymal stem cells accelerates cutaneous wound healing via optimizing the characteristics of fibroblasts. *Scientific Reports*. 2016;6(March):1–11.