

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. med. U. Pohl

Reperfusion von Knochen und Muskel -
eine experimentelle Studie mittels fluoreszierender Mikrosphären

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Klaus Stöckl

aus

Weiden

2012

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Hermann Anetzberger

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. med. Dirk André Clevert
Priv. Doz. Dr. med. Stefan Huber-Wagner

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h. c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 22.03.2012

Meinen Eltern Irene und Harald gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	7
1.1. Knochen als vitales Gewebe	7
1.2. Aufbau und Blutversorgung des Röhrenknochens	8
1.3. Aufbau und Blutversorgung des Skelettmuskels	11
1.4. Einführung in das Themengebiet	12
1.5. Methodenübersicht	15
1.6. Vorteile der FM-Methode	18
1.7. Ziele der Arbeit	18
2. Material und Methode	20
2.1. Versuchstiere	20
2.2. Anästhesie und OP-Vorbereitung	20
2.3. Chirurgische Präparation	21
2.3.1. Tracheotomie	21
2.3.2. Darstellung der Carotiden und Kathetereinlage	21
2.4. Versuchsablauf	23
2.5. Mikrosphärenmethode	24
2.5.1. Vorbereitung der Mikrosphären	24
2.5.2. Injektion der Mikrosphären	24
2.5.3. Entnahme der arteriellen Referenz	25
2.6. Dissektion der Organe	25
2.7. Validierung der Mikrosphärenmethode am Muskel	26
2.8. Berechnung des regionalen Blutflusses und des Herzzeitvolumens	27
2.9. Statistik	28

3. Ergebnisse	29
3.1. Validierung der FM-Methode zur Messung der Muskeldurchblutung	29
3.2. Versuchsreihe 1 (Ischämiedauer 60 Minuten)	33
3.2.1. Hämodynamische Parameter	33
3.2.2. Probengewichte	34
3.2.3. Nierendurchblutung	34
3.2.4. Knochendurchblutung	35
3.2.4.1. Blutfluss in Femur, Tibia und Talus	35
3.2.4.2. Regionaler Blutfluss im Femur	38
3.2.4.3. Regionaler Blutfluss in der Tibia	43
3.2.5. Muskeldurchblutung	46
3.3. Versuchsreihe 2 (Ischämiedauer 120 Minuten)	48
3.3.1. Hämodynamische Parameter	48
3.3.2. Probengewichte	50
3.3.3. Nierendurchblutung	50
3.3.4. Knochendurchblutung	50
3.2.4.1. Blutfluss in Femur, Tibia und Talus	50
3.2.4.2. Regionaler Blutfluss im Femur	53
3.2.4.3. Regionaler Blutfluss in der Tibia	57
3.3.5. Muskeldurchblutung	60
4. Diskussion	63
4.1. Einleitung	63
4.2. Methodendiskussion	64
4.3. Systemische Auswirkungen der Blutsperre	66
4.4. Knochendurchblutung	68
4.4.1. Durchblutung des Röhrenknochens	68
4.4.2. Regionale Knochendurchblutung	68
4.5. Knochendurchblutung nach Ischämie	68
4.5.1. Gesamter Knochen	68
4.5.2. Einzelne Knochenregionen	70

4.6. Anwendung fluoreszierender Mikrosphären zur Messung der Muskeldurchblutung	70
4.7. Blutfluss im Muskel unter physiologischen Bedingungen	71
4.8. Durchblutung der Muskulatur nach Ischämie	71
5. Zusammenfassung	73
6. Literaturverzeichnis	76
7. Tabellenanhang	87
8. Danksagung	100

1. Einleitung

1.1. Knochen als vitales Gewebe

In seinem Bild „Selbstportrait mit fiedelndem Tod“ (1872) lauscht der berühmte schweizer Maler Arnold Böcklin der vom Skelett gespielten Geige. So lebendig werden die Knochen des Menschen selten dargestellt. Das Skelett dient vielmehr als Symbol für Tod und Verfall. In Wahrheit ist der Knochen ein eigenständiges, vitales Organ. Ständige Auf- und Abbauprozesse sorgen dafür, dass er sich der jeweiligen mechanischen Situation anpasst und somit seine Stabilität und Funktionstüchtigkeit erhält. Neben einer stützenden Funktion sind Knochen am Aufbau der Gelenke beteiligt und für die Bildung der Blutbestandteile verantwortlich.

Hierzu muss das Knochengewebe ausreichend mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Bis zu 10% der Herzauswurfleistung werden für seine Durchblutung zur Verfügung gestellt (Shim et al., 1967; Aalto et al., 1984).

Die Durchblutungsverhältnisse im Knochen und die möglichen Einflussfaktoren sind im Gegensatz zu anderen Organen unzureichend geklärt. Der Grund hierfür ist, dass die Messung der Knochendurchblutung aufgrund der kompakten Struktur des Gewebes besonders schwierig ist.

1967 entwickelten Rudolph und Heymann (Rudolph & Heymann, 1967) ein genaues Verfahren zur Blutflussmessung. In weiteren Versuchen konnte auch die Zuverlässigkeit dieser Methode zur Messung der Knochendurchblutung bewiesen werden (Kane & Grim, 1969; Gross et al., 1981; Brookes & Revell, 1998; Grundnes & Reikeras, 1992; McGrory et al., 1994; Anetzberger et al., 2004a,b).

Hiermit ließen sich bereits einige Erkenntnisse zur Knochendurchblutung erzielen. Es konnte gezeigt werden, dass die Durchblutung innerhalb eines Röhrenknochens heterogen ist (Cumming, 1962; Kane, 1968; Shim et al., 1968). Vor allem die metaphysären Bereiche von Femur, Tibia und Humerus werden im Vergleich zu dia- und epiphysären Bereichen mehr durchblutet. Darüber hinaus wird nicht jeder Knochen gleich stark durchblutet. Unter konstanten hämodynamischen Bedingungen ist der mittlere Blutfluss im Humerus beim Kaninchen mit etwa 14 ml/min/100g am höchsten, gefolgt vom Femur mit etwa 11 ml/min/100g und der Tibia mit etwa 7 ml/min/100g (Anetzberger et al., 2004a). Vermutlich spielen unterschiedliche Perfusionsdrücke in den Knochen eine wesentliche Rolle. Die Ergebnisse von Anetzberger et al. (2003a) weisen darauf hin, dass moderate

Blutdruckschwankungen im Organismus die Knochendurchblutung nicht verändern. Wahrscheinlich besitzt der Knochen die Fähigkeit, seine Durchblutung über einen weiten Blutdruckbereich konstant zu halten. Diese Eigenschaft ähnelt dem Autoregulationsmechanismus der Niere (Anetzberger et al., 2003a). Die Modulation der Durchblutung ist über die Innervation von glatten Muskelzellen in Gefäßwänden der kleinen Arterien im Knochen gegeben (Duncan & Shim, 1977; Thurston, 1982; Brooks & Revell, 1998). Zusätzlich ist eine lokale Modulation der Durchblutung durch neuronale, hormonelle und metabolische Einflüsse möglich (Cumming, 1962; Shim et al., 1966; Shim et al., 1967; Duncan, 1977; Gross et al., 1979; Tondevold & Bulow, 1983; Davis et al., 1987; Ferrel et al., 1990). Außerdem wurde entdeckt, dass der Blutfluss im Knochen sensibel auf Temperaturänderungen reagiert.

Die dargelegten Besonderheiten in der Hämodynamik der Knochendurchblutung weisen auf die Anpassungsfähigkeit und Vitalität des Knochengewebes hin. Weitere Experimente sollen helfen, die Pathophysiologie der Knochendurchblutung unter verschiedenen Bedingungen zu verstehen und klinische Konsequenzen daraus abzuleiten.

1.2. Aufbau und Blutversorgung des Röhrenknochens

Der ausdifferenzierte Knochen ist nach dem Zahnbein die härteste Substanz des Gewebes. Neben seiner Härte zeichnet er sich durch die plastische Verformbarkeit aus.

Der Röhrenknochen wird in Epi-, Meta- und Diaphyse eingeteilt. Er besteht aus organischer Matrix, die durch Einlagerung von Calcium verstärkt und stabilisiert wird. Die extrazelluläre Matrix besteht zu ca. 60% aus anorganischer Substanz, hauptsächlich Hydroxylapatit ($\text{Ca}_{10}[\text{PO}_4]_6[\text{H}_2\text{O}]_2$). Die restlichen 40% sind organische Substanz, die zu 90% aus Kollagen-Typ-I und zu 10% aus nicht-kollagenen Proteinen und Lipiden besteht (Seibel, 2004).

Das Periost bildet die äußerste Faserschicht und ist über Sharpey'sche Fasern mit der festen Knochensubstanz verbunden (Junqueira et al., 2002). Es enthält Nerven und Gefäße und trägt wesentlich zur Ernährung des Knochens bei. Das Periost enthält abgeplattete, teilungsfähige Zellen („lining cells“), die sich zu Osteoblasten ausdifferenzieren können. Diese Osteoblasten bilden die organische Komponente der Knochenmatrix und sorgen für ständige Umbauprozesse im Knochen. Sie bauen sich von der Knochenoberfläche aus in die Substantia compacta (Kortikalis) ein und können auf diesem Wege auch zur Frakturheilung nach Knochenbrüchen führen. Die Osteoblasten liegen in der Kortikalis in verkalkten Lakunen und

werden dann als Osteozyten bezeichnet. Die Osteozyten besitzen viele feine Fortsätze, die in Kontakt zu den ernährenden Blutgefäßen stehen. Eine Diffusion von Nährstoffen und Sauerstoff direkt durch die Grundsubstanz hindurch ist wegen ihrer Festigkeit nicht möglich. Die Osteozyten bilden spezielle kollagene Fasern, sog. Lamellen, die sich in der Kompakta jeweils röhrenförmig anordnen und so einen längs verlaufenden Kanal bilden. Es entstehen feine Säulen, die nur wenige Millimeter lang sind. Diese werden als Osteone bezeichnet und stellen die Baueinheit des Knochens dar (Abbildung 1). In den so gebildeten Kanälen, Havers'sche Kanäle genannt, laufen die Blutgefäße.

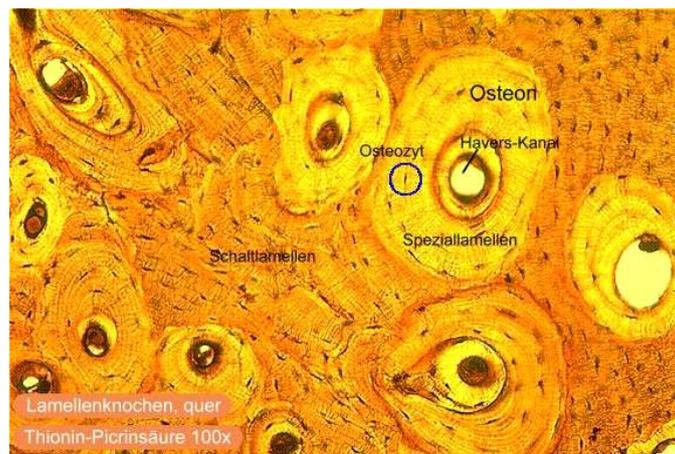


Abbildung 1: Aufbau des Röhrenknochens. Schnittbild, Thionin-Picrinsäure-Färbung. Das Osteon bildet die Baueinheit des Knochens.

Quelle: http://www.tiho-hannover.de/einricht/anat/lit/mwenth/os/pcd_imgs/img0026.jpg

Mehrere Havers'sche Kanäle sind über quer verlaufende Kanäle miteinander verbunden. Diese heißen Volkmann Kanäle und enthalten ebenfalls Gefäße. Nach einer dünnen Knocheninnenhaut (Endost) schließt sich zur Mitte die Substantia spongiosa an. Ihre Zwischenräume sind stellenweise mit Knochenmark gefüllt. Osteoklasten und Osteoblasten sorgen durch Umbauvorgänge dafür, dass sich die Wabenstruktur je nach Belastungsanforderung ausrichtet.

Hierfür muss der Knochen ständig mit Blut versorgt werden. Etwa die Hälfte der Blutmenge gelangt über ein oder zwei größere Arterien (Aa. nutrientes) in Höhe der Diaphyse in das Innere des Knochens. In der Kompakta verlaufen die Gefäße in den Havers'schen Kanälen längs und in den Volkmann'schen Kanälen quer. Ergänzt wird das innere Versorgungssystem durch epi- und metaphysäre Arterien aus dem periartikulären Gefäßnetz (Abbildung 2). Sie tragen etwa 40% zur Blutversorgung eines Röhrenknochens bei und anastomosieren beim

Erwachsenen miteinander. Ca. 10 % der Blutversorgung geschieht über periostale Kapillaren, die aus der Knochenhaut in den Knochen hineinziehen und ebenfalls mit dem inneren Versorgungssystem anastomosieren. Die Periostarterien stehen in enger Verbindung mit den Arterien der Muskeln. Sie versorgen hauptsächlich den äußeren Teil der Kortikalis, der innere Teil wird von medullär aus versorgt (Weiland et al., 1982). Werden die intramedullären Gefäße durch eine Fraktur zerstört, werden die periostalen Gefäße in der frühen Heilungsphase mehr durchblutet (Rhineland, 1968; Schweiberer & Schenk, 1977; McCarthy, 2006).

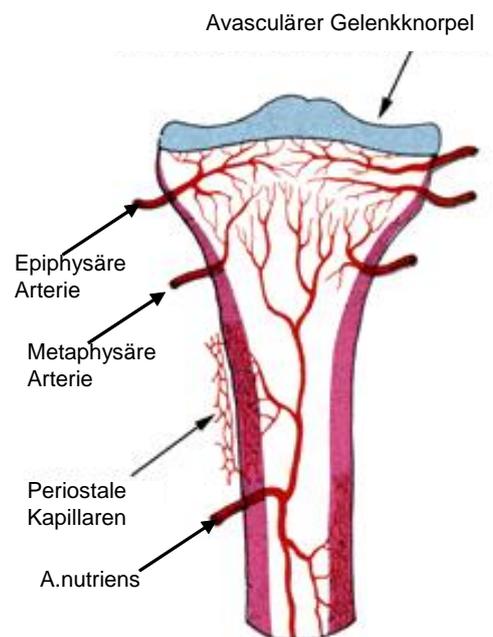


Abbildung 2: Arteriell Gefäßsystem des Röhrenknochens (modifiziert nach Brookes, 1998).

Quelle:<http://education.vetmed.vt.edu/curriculum/vm8054/labs/Lab8/IMAGES/BONE%20BLOOD%20SUPPLY.jpg>

Nach Passage des arteriellen Schenkels des Kapillarbetts wird das venöse Blut der Epi- und Metaphyse über epi- und metaphysäre Venen abtransportiert (Brookes & Revell, 1998). Im Markraum wird das Blut, ähnlich wie in der Leber, zunächst in medullären Sinusoiden gesammelt. Venae emissariae nehmen das Blut aus Sammelvenen auf und laufen gemeinsam mit den Aa. nutrientes durch die Kortikalis (De Bruyn et al., 1970). Über den periostalen Venenkomplex stehen beide Gefäßsysteme mit den Sammelvenen, intramuskulären und interfaszikulären Venen in Verbindung.

1.3. Aufbau und Blutversorgung des Skelettmuskels

Die Fähigkeit des Muskels sich zu kontrahieren beruht auf dem Zusammenspiel von Aktin- und Myosinfilamenten. Durch eine periodische Anordnung dieser kleinsten Baueinheiten des Skelettmuskels entstehen die Myofibrillen. 2500 bis 3500 Myofibrillen sind notwendig, um eine Muskelfaser aufzubauen. Zwischen den Myofibrillen liegt das Sauerstoff bindende Myoglobin, das auch für die Rotfärbung des Muskels verantwortlich ist. Die Muskelfasern werden durch das Endomysium, welches aus feinen Bindegewebszügen besteht, zu Primär- und Sekundärbündeln zusammengefasst. Die Bindegewebszüge setzen sich als Perimysium fort und umhüllen Gruppen von Muskelfaserbündeln. Die äußerste Schicht wird durch das Epimysium und die Muskelfaszie gebildet. Am Muskelende geht die Faszie in die Muskelsehne über, die in der Regel an einem Knochen ansetzt (Abbildung 3).

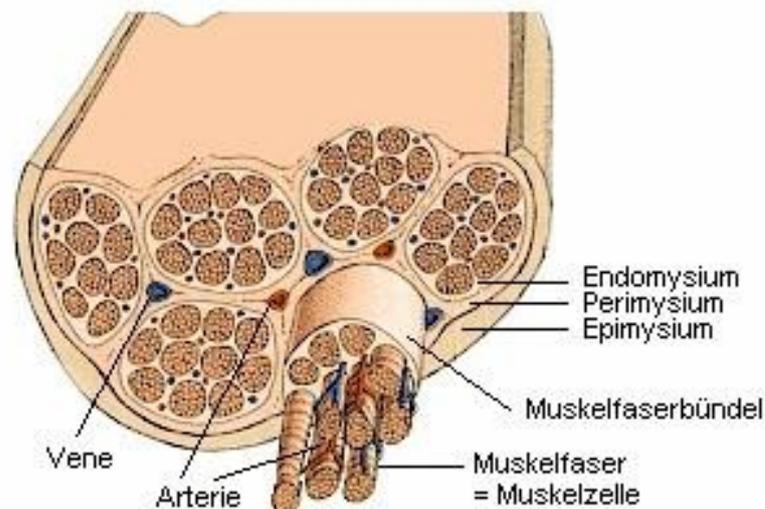


Abbildung 3: Muskelaufbau

Quelle: <http://medizininfo.de/ruecken/images/muskelaufbau.jpg>

Die Skelettmuskulatur ist sehr gut durchblutet. Die Eintrittsstelle der Blutgefäße liegt meistens im mittleren Abschnitt des Muskels, dem sog. Hilus. Im Allgemeinen dringt eine Arterie mit einem Nerv in den Muskel ein. Das Perimysium dient als Bindegewebestraße für die Blutgefäße und auch für Lymphgefäße und Nerven. Innerhalb des Perimysiums zweigen sich die Blutgefäße in Äste auf und treten mit dem Endomysium in die Sekundär- und Primärbündel ein. Auf diesem Wege gelangen sie zur Oberfläche der Muskelfasern. Dort bilden sie ein dichtes Kapillarnetz um die Muskelfasern. Pro Quadratmillimeter finden sich im Muskelquerschnitt 300 bis 400 Kapillaranschnitte, bei gut trainierter Muskulatur auch bis zu 800. Die Kapillaren enthalten ein kontinuierliches (nicht fenestriertes) Endothel und sind

überwiegend in Längsrichtung der Muskelfasern orientiert.

Der venöse Schenkel des Kapillarnetzes speist dann analog größere Venen im Perimysium, die für den Abtransport des sauerstoff- und nährstoffarmen Blutes sorgen. In der Regel verlassen ein bis zwei Venen den Muskel (Benninghoff et al., 2008).

1.4. Einführung in das Themengebiet

Für operative Eingriffe an Knochen und Gelenken wird routinemäßig eine Blutsperre angelegt. Die pneumatische Manschette wird am Oberrarm bis zu 300 mmHg, am Bein bis zu 500 mmHg aufgepumpt. Die maximal tolerierbare Ischämiezeit beträgt zwei bis drei Stunden (Daëlback & Rais, 1966; Solonen et al., 1968; Flatt, 1972; Parks, 1973; Egkher et al., 1986). Die Grundlage hierfür sind aber nur Erfahrungswerte, postoperative Komplikationen treten bereits bei deutlich kürzeren Ischämiezeiten auf.

Die durch die Ischämie verursachten Schäden werden unter dem Begriff Post-Tourniquet-Syndrom zusammengefasst und wurden hauptsächlich an der Muskulatur und dem Nervengewebe untersucht (Wakai et al., 2001b). Typische Komplikationen sind Wundheilungsstörungen und das Auftreten von Nekrosen. Auch Funktionsstörungen der Muskulatur bis hin zu Paralysen sind nach längeren Ischämiezeiten beobachtet worden (Saunders et al., 1979). Nach Eingriffen an Gelenken tritt häufiger ein Hämarthros auf. Mit zunehmender Ischämiedauer kommt es postoperativ zu einer Schwellung mit der Gefahr eines Kompartmentsyndroms. Durch die möglichen Komplikationen verlängert sich die postoperative Rehabilitationsphase deutlich. In Tierversuchen hat man beispielsweise eine verzögerte Frakturheilung festgestellt (Cetinus et al., 2005).

Um die Komplikationsrate zu verringern wurden alternative Methoden zur Blutsperre überprüft. Der Einsatz einer klassischen Esmarch-Bandage und die medikamentöse Ischämieinduktion durch lokale Adrenalininjektion zeigten jedoch keine Vorteile (Braithwaite et al., 1993; Akinyoola et al., 2007).

Studien zur Pathogenese des Post-Tourniquet-Syndroms zeigen teilweise beträchtliche Auswirkungen auf zellulärer Ebene. Wakai et al. (Wakai et al., 2001a) führten eine Studie mit Patienten durch, bei denen eine elektive Kniearthroskopie durchgeführt wurde. 14 Patienten wurden unter Blutsperre, 12 Patienten ohne Blutsperre operiert. 15 min nach Entfernen der Blutsperre wurden Blutproben entnommen und der Aktivierungsgrad und die transendotheliale Migration von Monozyten und neutrophilen Granulozyten in vitro untersucht. In der Gruppe mit Blutsperre wurde eine Aktivierung und verstärkte

Gewebsmigration der Granulozyten beobachtet. Da sie zu einer Schädigung des Gewebes führen können, spielt wahrscheinlich deren Weitertransport durch den Blutstrom für die Pathogenese des Post-Tourniquet Schadens eine wichtige Rolle.

In einer weiteren Studie wurde bei 8 Patienten die Blutsperre am Bein nach einer Dauer von 90 Minuten entfernt und die Serumspiegel von Stoffwechselprodukten gemessen. Laktat, Hypoxanthin, Glycerin, Glukose, Pyruvat und Urease stiegen bis zum Fünffachen der Normwerte an (Ostman et al., 2004). Die während der Ischämie anfallenden sauren Metabolite führen zu einer Übersäuerung mit der Gefahr von Gewebeschäden.

Mars & Gregory (1991) untersuchten in einer experimentellen Studie den postischämischen Muskelschaden und quantifizierten die Muskelfaserschwellung histologisch. Dabei zeigte sich für oxidative Typ 1-Fasern eine Durchmesserzunahme um 29% und eine Vergrößerung des Muskelfaserabstandes um 48%. Takaki (1988) fand nach ischämiebedingter Drucksteigerung in der Muskulatur sogar Hinweise für eine Muskelfasertransformation von Typ 1- zu glykolytisch metabolisierenden Typ 2-Fasern.

Weiterhin existieren zahlreiche Studien über ischämiebedingte Nervenschäden. Ferkel et al. (Ferkel et al., 1996) dokumentierte in einer retrospektiven Studie an 612 Patienten in 4,4% neurologische Komplikationen. Alle Probanden wurden unter Blutsperre am Sprunggelenk arthroskopiert. In einer Fallbeschreibung von De Tullio et al. (1990) kam es nach einer Oberschenkeloperation zu einem dreimonatigen paralytischen Syndrom. Als Ursache wurde eine zu stark aufgepumpte pneumatische Manschette angenommen.

Viele Autoren (Xing et al., 1997; Kokki et al., 1998; Winet et al., 1998; Hsieh et al., 2001) weisen darauf hin, dass das Ausmaß der tourniquetbedingten Schäden von der Druckhöhe und der Ischämiezeit abhängt. Studien zur Wirkung einer Blutsperre auf die Knochendurchblutung finden sich nicht so zahlreich und die Interpretation der Ergebnisse ist aufgrund methodischer Fehler oft schwierig. Jones & Hungerford (2007) fassten die bisherigen Erkenntnisse über die pathophysiologischen Vorgänge im Knochen nach Ischämie wie folgt zusammen (Abbildung 4).



Abbildung 4: Verlauf der pathophysiologischen Vorgänge nach Unterbrechung der Blutzufuhr im Knochen nach Jones und Hungerford (2007)

Die Unterbrechung der arteriellen Blutzufuhr durch das Aufpumpen einer Blutsperre führt unmittelbar zur Reduktion der Blutzufuhr im Knochen und zur Behinderung des venösen Abflusses. Es beginnt die Phase der *primären Ischämie*. Die Blutstromverlangsamung mit Abflussbehinderung führt zur Steigerung des intrakapillären Drucks. Es kommt zur Zellschädigung und Ödembildung. Abgeschlieferte Zellverbände verursachen Mikroembolien und die Ausschüttung zytotoxischer Zellfaktoren und Endotoxinen wird provoziert. Dadurch wird der venöse Abfluss zusätzlich behindert und es besteht die Gefahr einer tiefen Beinvenenthrombose. Der intrakapilläre Druck steigt an und noch mehr Flüssigkeit wird durch die aufgelösten Zell-Zell-Verbindungen in den Extravasalraum gepresst. Dies führt zu einer Behinderung der arteriellen Blutzirkulation.

Die nach Lösen der Blutsperre auftretende Reperfusion der Extremität wird in zwei Phasen unterteilt. Die erste Phase zeichnet sich durch eine abnorme Gefäßdurchlässigkeit und Vasodilatation der kleinen Gefäße aus. Es kommt zu weiteren Flüssigkeitsverschiebungen in den Extravasalraum. Die während der primären Ischämiephase aktivierten Gerinnungs- und

Abwehrzellen haften an den Endothelzellen an und behindern die Blutzirkulation zusätzlich. Dies wird als sog. *no-reflow Phänomen* oder *sekundäre Ischämie* bezeichnet.

Die zweite Phase der Reperfusion beginnt ungefähr nach einer Woche mit der Neubildung von Blutgefäßen (Hsieh et al., 2001).

1.5. Methodenübersicht

Zur Messung der Organdurchblutung wurden in den letzten 50 Jahren verschiedene Verfahren entwickelt. Viele dieser Methoden sind jedoch mit Nachteilen verbunden.

Bei der sog. „Venous effluent collection“ (Cumming, 1962) wird die A. nutriens direkt mit Ringerlösung perfundiert und der venöse Abfluss z.B. über die V. femoralis gemessen. Hieraus kann der Blutfluss im gesamten untersuchten Röhrenknochen berechnet werden. Einzelne Knochenabschnitte lassen sich mit dieser Methode nicht untersuchen. Zusätzlich ist die Präparation mit Freilegung der Gefäße sehr traumatisch.

Durch die intravenöse Injektion von Isotopen und Bestimmung der Clearance lässt sich ebenfalls der Blutfluss in Organen ermitteln (Copp & Shim, 1965; Shim et al., 1967; McCarthy & Hughes, 1990). Aus der Radioaktivität der injizierten Menge, einer arteriell gesammelten Referenz und der Radioaktivität in der Gewebsprobe kann der Blutfluss nach dem Fickschen Prinzip errechnet werden. Die Nachteile dieser Methode sind die hohe Shuntrate und die Rezirkulation von Isotopen. Dies führt in Abhängigkeit der eingesetzten Isotope und der Flussrate im Organ zu teilweise erheblichen Messfehlern.

In den 70er Jahren wurde die „Intravitalmikroskopie“ (McCuskey et al., 1971) eingeführt. Diese erfordert das Einbringen einer speziell entwickelten Kammer oder Kunststoffhohlschraube direkt in den Knochen. Es können dann zelluläre Vorgänge und lokale Blutflussveränderungen direkt beobachtet werden. Der Nachteil dieser Methode liegt darin, dass durch die aufwendige chirurgische Präparation zur Implantation der Kammer der Knochen erheblich traumatisiert wird. Die in der Folge auftretenden entzündlichen Veränderungen beeinflussen die lokale Durchblutung. Weiterhin können mittels Intravitalmikroskopie nur kleine Knochenbereiche untersucht werden.

Die „Washout-Technik“ (Kelly et al., 1971; Paradis & Kelly, 1975) beruht auf dem Prinzip, dass sich radioaktive Tracer im Gewebe zunächst anreichern und dann in Abhängigkeit der Höhe der Organdurchblutung ausgewaschen werden. Die Radioaktivitätsänderung im Gewebe wird über einen von außen angelegten Detektor gemessen und der Blutfluss berechnet. Das Problem dieser Methode ist, dass für die Applikation der Tracersubstanzen in den Knochen

die direkte Injektion in die A. nutriens erforderlich ist. Die Traumatisierung des Gewebes, die mit der chirurgischen Darstellung der A. nutriens verbunden ist, führt jedoch per se zu einer Abnahme des Blutflusses im Knochen (Cofield et al., 1975).

Bei der „Hydrogenwashout-Technik“ (Whiteside et al., 1977; Notzli et al., 1989; Kiaer et al., 1993) wird die Konzentration des gasförmigen Wasserstoffes im Organ mittels Platinelektroden bestimmt. Zur Messung der Knochendurchblutung müssen die Elektroden direkt am Knochen befestigt werden. Die notwendige chirurgische Präparation führt zu Veränderungen der Knochendurchblutung. Außerdem sind feine regionale Unterschiede nicht messbar.

Mit der „Laser Doppler Flowmetrie“ (Swiontkowski et al., 1986; Swiontkowski et al., 1988; Notzli et al., 1989; Lausten et al., 1993; Hupel et al., 1999; Shymkiw et al., 2001) ist ebenfalls eine kontinuierliche Messung des Blutflusses möglich. Neben der Traumatisierung des Gewebes durch das Einbringen der Messsonde über einen Bohrkanal im Knochen können mittels dieser Methode jedoch nur Blutflussänderungen erfasst werden.

Zusammenfassend ergeben sich bei den eingesetzten Methoden zur Messung der Knochendurchblutung folgende Fehlerquellen:

1. Die chirurgische Präparation zur Anbringung von Messsensoren ist traumatisch und führt entweder direkt oder indirekt über eine Entzündungsreaktion zu einer Beeinflussung der Knochendurchblutung.
2. Die Durchblutung wird nur lokal im Bereich der Messsensoren gemessen. Dadurch können Durchblutungsänderungen im restlichen Knochen oder auch in anderen Geweben nicht gleichzeitig gemessen werden.
3. Die teilweise sehr hohen Shunraten der Makersubstanzen verfälschen die Messwerte erheblich.

Aufgrund der Vorteile gegenüber den anderen Verfahren hat sich die Mikrosphärenmethode als Goldstandard für die Messung der Knochendurchblutung etabliert (Kane & Grim, 1969; Brooks, 1970; Gross et al., 1981; Bunger et al., 1983; Tothill et al., 1987; Davis et al., 1990; Hansen et al., 1991; Grundnes & Reikeras, 1992; McGroory et al., 1994; Drescher et al., 1999, 2001; Anetzberger et al., 2003b, 2004a,b).

1967 wurde diese Methode von Rudolph und Heymann zur Messung des Blutflusses in der Nabelschnur eines Feten eingeführt und später durch viele Arbeiten validiert (Makowski et

al., 1968; Buckberg et al., 1971; Archie et al., 1973; Warren & Ledingham, 1974; Dole et al. 1982). Die Methode beruht auf dem Prinzip, dass sich in den linken Ventrikel injizierte Mikrosphären durch die dort herrschende turbulente Strömung homogen im Blut verteilen. Sie gelangen von dort mit dem Blutstrom in die Peripherie und bleiben aufgrund ihres größeren Durchmessers (15 μm) - der Durchmesser einer Kapillare beträgt 7 μm - im präkapillären Gefäßbett hängen. Aufgrund der homogenen Verteilung der MS im Blut ist die Anzahl der im Gewebe festgehaltenen Sphären direkt proportional zum Blutfluss im Gewebe. Um nicht nur relative Blutflüsse messen zu können, wurde die Mikrosphärenmethode um die Technik der arteriellen Referenzentnahme (Domenech et al., 1968; Kaihara et al., 1968; Makowski et al., 1968; Neutze et al., 1968) ergänzt. Durch eine arterielle Blutentnahme während der MS-Injektion mit einer Präzisionspumpe mit konstantem Zugvolumen wird ein „Referenzorgan“ simuliert. Dessen Blutfluss ist durch die Abzugsgeschwindigkeit und die Anzahl der in der Referenzblutprobe enthaltenden Mikrosphären definiert. Nach Bestimmung der MS-Anzahl im zu untersuchenden Organ kann dann dessen absoluter Blutfluss berechnet werden.

Zu Beginn wurden ausschließlich radioaktiv markierte Mikrosphären (RM) verwendet. Die Nachteile der RM liegen vor allem in der eingeschränkten Praktikabilität im Labor. Die Verwendung von RM ist mit gesundheitlichen Risiken verbunden. Der Einsatz unterliegt der Strahlenschutzverordnung und ist daher genehmigungspflichtig. Ständige Kontrollen der Radioaktivität im Labor, spezialisierte Messeinrichtungen und die Entsorgung kontaminierter Gegenstände und Versuchstiere verursachen einen hohen zeitlichen und finanziellen Aufwand. Darüber hinaus sind die RM für die Anwendung im Langzeitversuch ungeeignet. Zum einen haben die Isotope nur eine kurze Halbwertszeit, zum anderen konnte gezeigt werden, dass sich während des Experimentes Isotope von den Sphären lösen und dadurch falsche Messwerte erhoben werden (Jong De et al., 1977; Van Oosterhout et al., 1998).

1993 wurden von Glenny et al. (1993) fluoreszierende Mikrosphären (FM) eingeführt und in der Folge von vielen Autoren validiert (Prinzen & Glenny, 1994; Tan et al., 1997; Van Oosterhout et al., 1998; Hübler et al., 1999; Powers et al., 1999; Schimmel et al., 2000, 2001; Thein et al., 2002). Hierbei werden die Mikrosphären mit einer genau definierten Menge fluoreszierender Farbstoffe beladen. Jeder Farbstoff besitzt dabei ein charakteristisches Exzitations- und Emissionsmaximum. Im Fluoreszenzspektrophotometer lässt sich dadurch die Farbe exakt bestimmen und über die Farbintensität die Mikrosphärenzahl indirekt

errechnen. Voraussetzung ist allerdings, dass die Farbstoffe verlustfrei von den Mikrosphären extrahiert werden. Die Probenverarbeitung bereitete lange Zeit Probleme und war mit hohem zeitlichen Aufwand verbunden. Im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München konnte ein automatisiertes Filtrationssystem (Sample-Processing-Unit = SPU) entwickelt werden, mit dessen Hilfe die vollständige Mikrosphärenrückgewinnung aus den Gewebeproben und die Farbstoffextraktion erfolgt (Raab et al., 1999; Thein et al., 2000). Eine vollautomatisierte Probenverarbeitung garantiert dabei die Exaktheit der Prozedur und minimiert den zeitlichen Aufwand. Ein Robotersystem vollzieht die zur Extraktion des Farbstoffs aus den Mikrosphären in den Gewebeproben notwendigen Schritte und misst abschließend die Fluoreszenzintensität. Hieraus lassen sich die Blutflüsse berechnen. Die Anwendung fluoreszierender Mikrosphären speziell zur Messung des regionalen Knochenblutflusses wurde durch Anetzberger et al. (2003a,b; 2004a,b) validiert und etabliert.

1.6. Vorteile der FM-Methode

Verglichen mit den anderen Verfahren zur Messung des Blutflusses in Organen hat die FM-Methode mehrere entscheidende Vorteile.

Der Einsatz unterschiedlicher fluoreszierender Farbstoffe erlaubt wiederholte Messungen am selben Tier. Für die Messung des RKBF mittels MS-Methode müssen lediglich zwei arterielle Katheter platziert werden. Eine chirurgische Präparation und somit Traumatisierung am Knochen selbst ist nicht nötig. Durch die Dissektion eines Röhrenknochens in anatomische Regionen können regionale Unterschiede der Knochendurchblutung erfasst werden. Dies erlaubt einen Vergleich der Durchblutung verschiedener Anteile eines Röhrenknochens. Während einer Injektion können gleichzeitig das Herzzeitvolumen (Archie et al., 1973) und der Blutfluss in anderen Organen bestimmt werden (Bhattacharya & Beilin LJ., 1980). Dadurch lassen sich die hämodynamischen Effekte auf den Gesamtorganismus kontrollieren. Schließlich kann durch die simultane Injektion von Mikrosphären und den Vergleich der errechneten Blutflusswerte die Präzision der Methode jederzeit überprüft werden.

1.7. Ziele der Arbeit

Viele operative Eingriffe an den Extremitäten werden unter Blutsperre durchgeführt. Die Vorteile liegen in einer besseren Übersicht und einem geringeren Blutverlust (Wakai et al., 2001b). Obwohl die Kenntnisse über die Pathophysiologie der Ischämie und Reperfusion von

anderen Organen auf den Knochen teilweise übertragen werden können, bleiben einige Fragen offen. Aus klinischen und experimentellen Studien ist bekannt, dass die Häufigkeit postoperativer Komplikationen von der Dauer der Blutsperre abhängt. Die Dynamik der frühen Reperfusion im Knochen und Muskel nach festgelegten Ischämiezeiten wurde bisher noch nicht untersucht. Unklar ist auch, ob die Durchblutung während der Reperfusionsphase innerhalb der verschiedenen Regionen eines Röhrenknochens unterschiedlich ist. Hinweise auf besonders vulnerable Regionen innerhalb eines Röhrenknochens könnten für die Klinik von hohem Interesse sein. Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, anhand einer experimentellen Studie mittels der MS-Methode die Knochen- und Muskeldurchblutung in der frühen Reperfusionsphase zu untersuchen.

Im Detail sollte auf folgende Fragen eingegangen werden:

1. Ist die Messung der Muskeldurchblutung mittels fluoreszierender Mikrosphären zuverlässig?
2. Wie werden systemische hämodynamische Parameter nach Eröffnen der Blutsperre bei einer Ischämiedauer von einer im Vergleich zu zwei Stunden beeinflusst?
3. Welchen Verlauf zeigt die Knochendurchblutung während der frühen Reperfusionsphase nach einer und nach zwei Stunden Ischämiedauer?
4. Ist die Dynamik der Reperfusion nach Ischämie in den verschiedenen Regionen innerhalb eines Röhrenknochens gleich?
5. Welchen Verlauf zeigt die Muskeldurchblutung während der frühen Reperfusionsphase nach einer und nach zwei Stunden Ischämiedauer?

2. Material und Methode

2.1. Versuchstiere

Für die Versuche wurden insgesamt 13 (6 in der ersten und 7 in der zweiten Versuchsgruppe) erwachsene weibliche New Zealand White Kaninchen (Harlan Winkelmann, Borcheln, Deutschland) verwendet. Bei allen Tieren waren die Epiphysenfugen geschlossen, sie waren zwischen 3,2 und 3,8 kg schwer. Die Tiere wurden in Großtierboxen (2,55 m²) mit freiem Auslauf (12,0 m²) in der Versuchstierhaltung des Instituts für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München gehalten und mit Standardfutter und Wasser versorgt. Die Versuche wurden durch die Regierung von Oberbayern, München genehmigt (AZ.: 55.2-1-54-2531-12-05).

2.2. Anästhesie und OP-Vorbereitung

Die Tiere wurden nach dem Zufallsprinzip ausgewählt. Die Narkoseeinleitung erfolgte durch intramuskuläre Injektion von 15 mg/kg KGW Ketamin (Ketavet®, 100 mg/ml, Ketaminhydrochlorid, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland) und 2 mg/kg KGW Xylazinhydrochlorid (Rompun® 2%, Bayer AG, Leverkusen, Deutschland). Die Kaninchen wurden gewogen und nach Rasur der anterioren Halsregion in Rückenlage auf dem OP-Tisch fixiert. Für die kontinuierliche Überwachung wurden EKG-Elektroden (Pädiatrielektroden, Hersteller Skintact) auf die Brust geklebt. Zur Fortführung der Anästhesie wurde über eine Braunüle in der Vena auricularis eine Mischung aus Ketamin (10 mg/kg KGW pro Stunde) und Xylazinhydrochlorid (2,4 mg/kg KGW pro Stunde) in einer Perfusorspritze (50 ml, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) mit NaCl 0,9% auf 25 ml aufgezozen und mit einer Geschwindigkeit von ca. 6 ml/h infundiert.

Über einen zweiten intravenösen Zugang in der gegenseitigen V.auricularis wurde bei Volumenbedarf 0,9 %ige physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B. Braun Melsungen AG Melsungen, Deutschland) und HAES (Haemofusin® 6%, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit Hilfe eines Infusionsgerätes (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) substituiert.

2.3. Chirurgische Präparation

2.3.1. Tracheotomie

Nach Hautdesinfektion (Desinfektionsspray Skinman Soft, Herst. Henkel, Düsseldorf) wurde die Haut zwischen Kehlkopf und oberem Sternumrand längs eröffnet. Nach stumpfer Präparation und Abschieben der geraden Halsmuskulatur wurde die Trachea dann unterhalb des Schildknorpels unter Schonung der Schilddrüse quer inzidiert und ein Pädiatrietubus (Trachealtubus, Größe 5,0; Rüsch, Fa.Seidl, München, Deutschland) eingebracht (Abbildung 5). Dieser wurde sofort mit dem Beatmungsgerät (Sechrist IV-100 B, 12 mmHg, Luft/O₂ Verhältnis 0,21 – 0,40, Beatmungsfrequenz 25 – 40 Atemzüge/min, Inspiration/Expiration Verhältnis 1:2) verbunden. Nach Lagekontrolle des Tubus durch pulmonale Auskultation wurden sofort 2 ml Pancuronium (Pancuroniumbromid, Curamed, Karlsruhe, Deutschland) zur Muskelrelaxation über die Ohrvene verabreicht.

2.3.2. Darstellung der Carotiden und Kathetereinlage

Nach der Tracheotomie wurde zunächst die rechte äußere Halsfaszie nach längs gespalten und stumpf in die Tiefe zwischen den M. sternocleidomastoideus und den M. sternochoideus eingegangen (Abbildung 5). Unter Schonung des N. vagus wurde die Gefäß-Nerven-Scheide eröffnet und die A. carotis communis von den Adventitia befreit. Die Arterie wurde nach peripher ligiert und nach zentral ein Fadenloop vorgelegt. Nach querer Inzision der Arterie wurde ein Katheter (Cavafix® MT, Durchflussrate: 10 ml/min, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) eingeführt und die Positionierung der Katheterspitze im linken Ventrikel mit Hilfe des online Druckwandlermonitorgerätes (Sirecust 304D, München, Deutschland) kontrolliert. Die korrekte Lage zeigte sich hier am Umschlagen der Druckkurve der A. carotis communis in die charakteristische Wellenform des linken Ventrikels (Abbildung 6). Bei Zeichen für Herzrhythmusstörungen am EKG-Gerät wurde der Katheter neu platziert. Mit Hilfe des Fadenloops wurde dann die korrekte Lage des Katheters fixiert. Das gleiche Vorgehen wiederholte sich auf der linken Seite. Nach Inzision der Arterie und Kathetereinlage wurde dieser jedoch nur bis in die Pars thoracica aortae vorgeschoben.

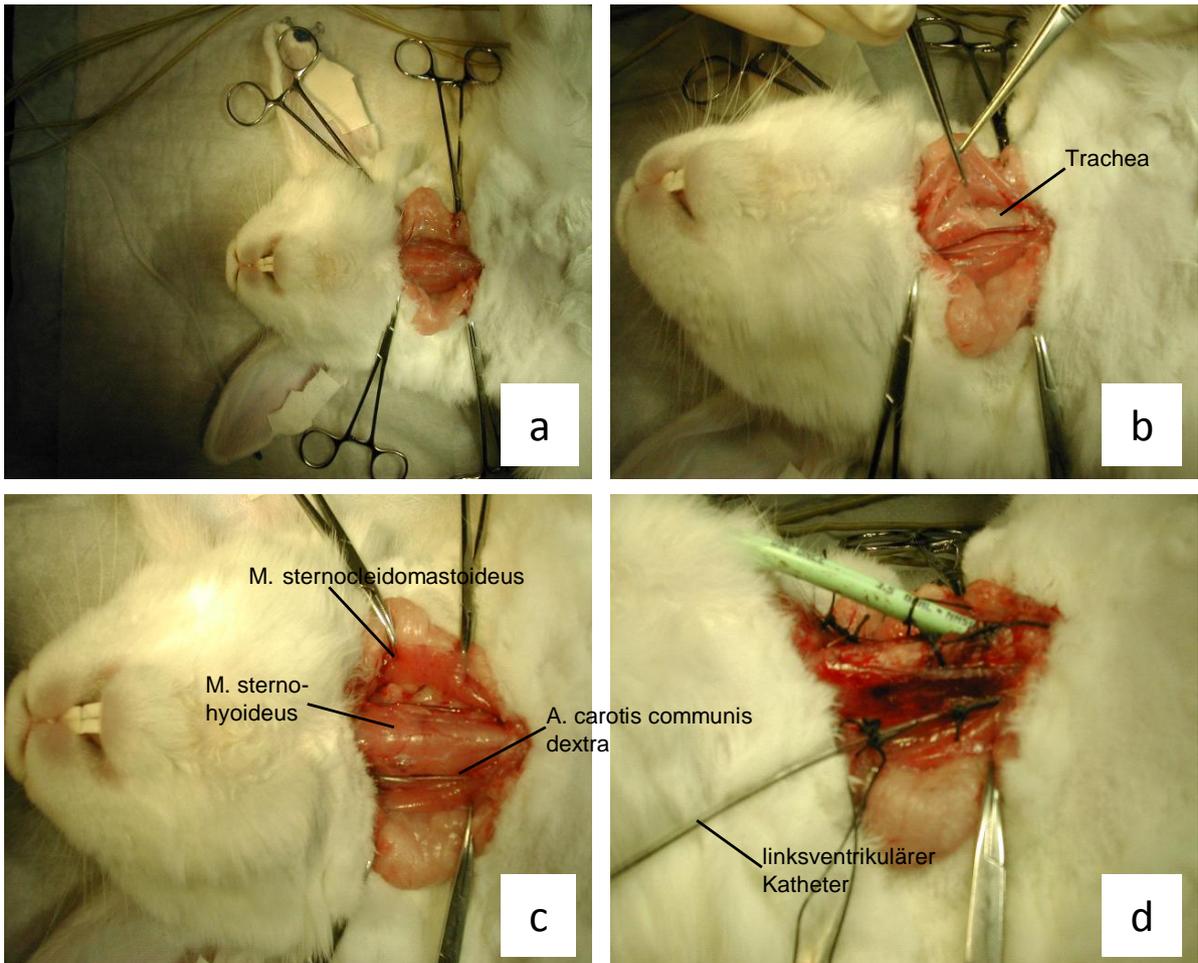


Abbildung 5: Tracheotomie, Darstellung der Carotiden und Kathetereinlage.

- a. Nach Inzision der Haut und der Halsfaszie zeigt sich die gerade Halsmuskulatur.
- b. Durch Verdrängung der Halsmuskulatur wird die Trachea unterhalb des Schildknorpels dargestellt.
- c. Zwischen dem M. sternocleidomastoideus und dem M. sternohyoideus befindet sich das Gefäß-Nerven-Bündel mit der A. carotis communis.
- d. Nach Tracheotomie wird ein Pädiatrietubus in die Luftröhre eingeführt und fixiert. Die Halsschlagadern werden auf beiden Seiten präpariert und ein Katheter bis in den linken Ventrikel bzw. bis in die Aorta ascendens vorgeschoben.

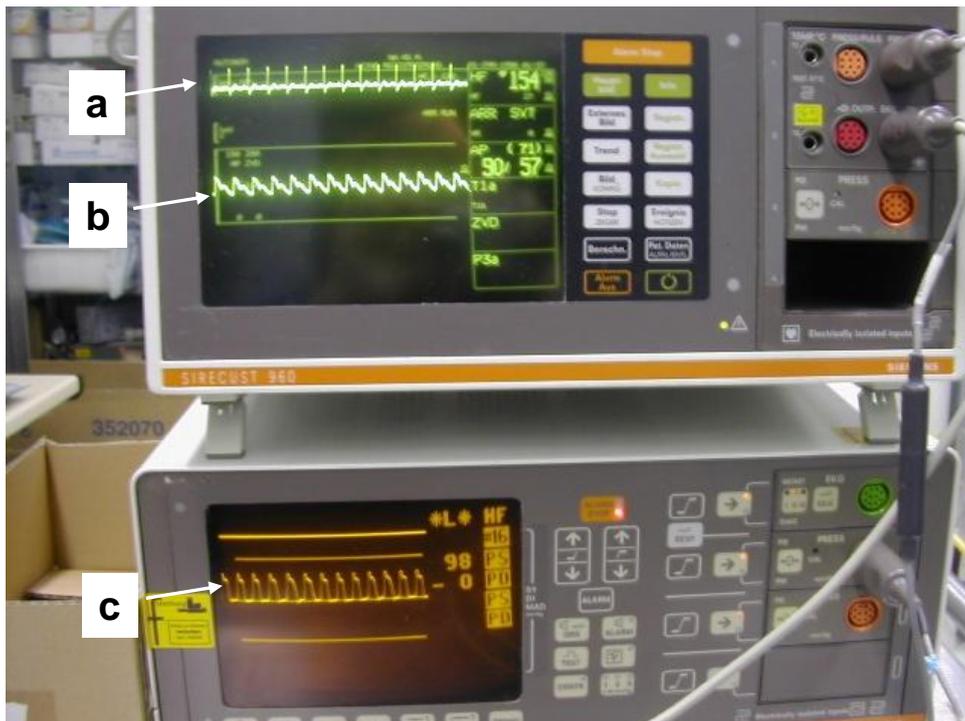


Abbildung 6: EKG (a), Druckkurve in der Aorta (b) und im linken Ventrikel (c)

2.4. Versuchsablauf

Nach Rasur wurde eine pneumatische Säuglingsblutdruckmanschette (Aneroid Zweischlauchmodell mit Säuglingsmanschette, Herst. ERKA. Kallmeyer Medizintechnik GmbH % Co KG, Bad Tölz, Deutschland) am linken Hinterlauf in Höhe der Femurdiaphyse angelegt und auf 300 mmHg aufgepumpt. Der Zeitpunkt des Anlegens der Blutdruckmanschette wurde dokumentiert.

In der ersten Versuchsreihe (Ischämiezeit 60 min) erfolgte die erste Mikrosphäreninjektion noch vor Aufpumpen der Tourniquet-Blutsperr, um die Blutflusswerte unter Normalbedingungen zu erhalten. 10 min vor der erneuten Blutstromfreigabe erfolgte eine weitere Messung, um die Höhe der Durchblutung während der Blutsperr zu dokumentieren. Anschließend wurden 1, 5, 15, 30 und 60 min nach Eröffnen der Blutsperr Messungen durchgeführt (Abbildung 7).

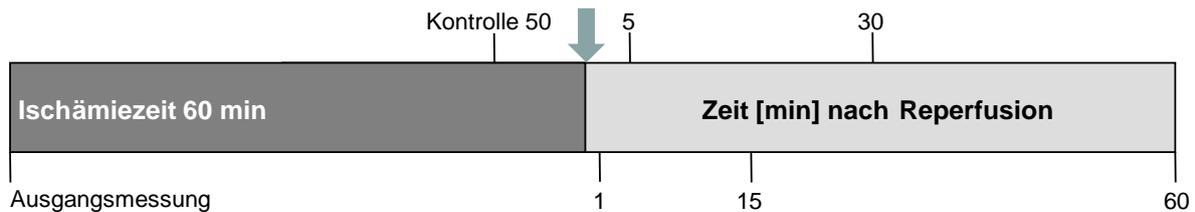


Abbildung 7: Injektionsschema der 1. Versuchsreihe. Der Pfeil markiert die Entfernung der Blutsperre.

In der 2. Versuchsreihe mit einer Ischämiezeit von 120 min wurde die erste Messung 10 Minuten vor Reperfusion durchgeführt. Die weiteren Messungen erfolgten 1, 5, 15, 30, 60 und 90 min nach Abnahme der Blutsperre (Abbildung 8).

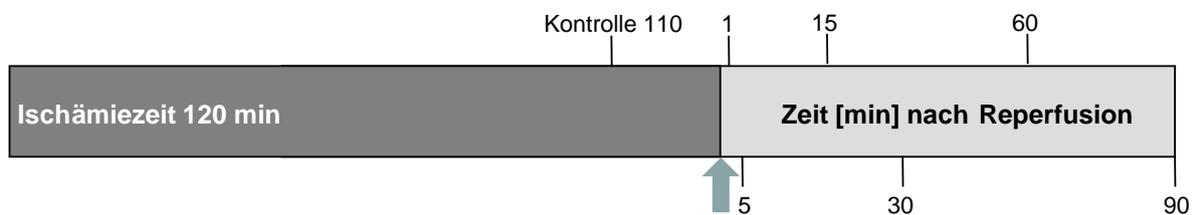


Abbildung 8: Injektionsschema der 2. Versuchsreihe. Der Pfeil markiert die Entfernung der Blutsperre.

2.5. Mikrosphärenmethode

2.5.1. Vorbereitung der Mikrosphären

Für die Versuche standen sieben mit Fluoreszenzfarbstoffen markierte Mikrosphären zur Verfügung: Blue, Blue-Green, Yellow-Green, Orange, Red, Crimson, Scarlet. Vor jeder Injektion wurde eine Farbe nach dem Zufallsprinzip ausgewählt.

Um die Mikrosphären in der Stammlösung homogen zu verteilen, wurden diese vor der Entnahme 3 min in einem Vortexgerät (Genie 2, Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz) geschüttelt, anschließend 5 min ins Ultraschallbad (Sonorex TK52H, Bandelin, Deutschland) gelegt und wieder 3 min geschüttelt. Drei Milliliter der Stammlösung wurden entnommen und mit 0,9% iger NaCl auf 10 ml verdünnt. Für die Messung des HZV wurden aus der injizierten Menge 20 µl entnommen und deren Farbintensität bestimmt.

2.5.2. Injektion der Mikrosphären

Unmittelbar vor jeder Injektion wurden die Herzfrequenz und der Blutdruck protokolliert.

Zusätzlich wurde eine arterielle Blutgasanalyse zur Bestimmung des pO₂, pCO₂, pH,

Hämatokrits und Hämoglobins gewonnen. Nach Überprüfung der korrekten Lage der Katheterspitze im linken Ventrikel anhand der charakteristischen Druckkurve erfolgte die Injektion der Mikrosphären. Diese erfolgte gleichmäßig über einen Zeitraum von einer Minute und wurde immer durch dieselbe Person durchgeführt.

2.5.3. Entnahme der arteriellen Referenz

Für die Berechnung der absoluten Blutflüsse wurde eine arterielle Referenzblutprobe über den Katheter in der linken Pars thoracica aortae entnommen. Dies geschah mit Hilfe einer Präzisionspumpe (33´Syringe Pump, FMI, Egelsbach, Deutschland) mit konstantem Zugvolumen von 3,54 ml/min. Die verwendeten 50 ml Injektionsspritzen wurden vorher mit 5 ml Na-Citrat aufgezogen, um eine Blutgerinnung zu verhindern. Die Pumpe wurde 15 Sekunden vor der Sphäreninjektion gestartet und eine Minute nach Injektion gestoppt. Anschließend wurde der Blutdruck und die Herzfrequenz gemessen. Die „Referenzblutprobe“ wurde direkt in die SPU-Filter filtriert und die Fluoreszenzintensität gemessen.

2.6. Dissektion der Organe

Die Tötung der Tiere erfolgte unmittelbar nach Versuchsende jeweils mit einer Überdosis Pentobarbital (Narcoren®, Rhone Merieux GmbH, Laupheim, Deutschland). Anschließend wurden die Nieren und die Muskeln des Unterschenkels entnommen (M. gastrocnemius, M. tibialis anterior) und sorgfältig von Binde- und Fettgewebe befreit. Die beiden Nieren wurden in jeweils acht, die beiden Mm. gastrocnemici in zehn und die beiden Mm. tibialis anteriores in drei gleich große Proben aufgeteilt. Weiterhin wurden beide Femora, Tibiae und Tali entnommen. Die Knochen wurden vom Periost, Knorpelgewebe und von Sehnen- und Bandansätzen befreit. Die Aufteilung in kleine Knochenproben erfolgte nach einem definierten Dissektionsschema, welches sich an den anatomischen Regionen orientierte (Abbildung 9). Jede Probe wurde abschließend gewogen und bis zur Messung in einem beschrifteten Probenröhrchen im Dunkeln aufbewahrt. Zu den Weichteilproben wurde 10%iges Formalin gegeben. Die Knochenproben wurden zur Entkalkung für 4 Wochen in Salzsäure (1 mol/l) eingelegt (Anetzberger et al., 2003b). Danach erfolgte die automatisierte Probenverarbeitung und Auswertung im Walter-Brendel-Zentrum für Experimentelle Medizin der Ludwig-Maximilians-Universität München (Thein et al., 2000).

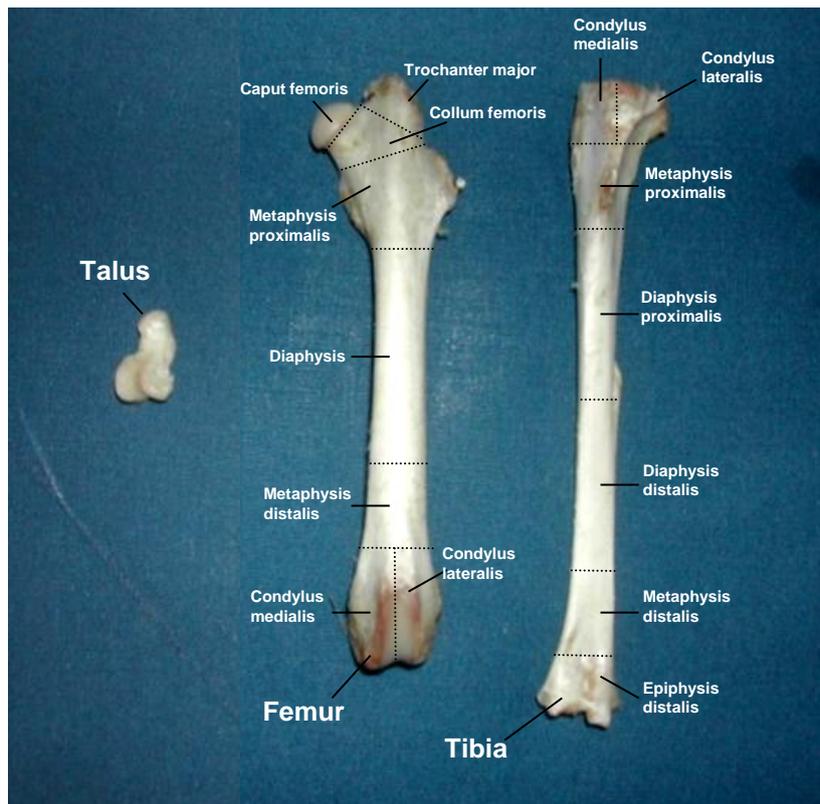


Abbildung 9: Dissektionsschema der Knochen

2.7. Validierung der Mikrosphärenmethode am Muskel

Zur Validierung der fluoreszierenden Mikrosphären am Muskel wurden bisher unveröffentlichte Daten aus Experimenten von Anetzberger et al. (2003a) verwendet. In den Experimenten wurde die Genauigkeit der Mikrosphärenmethode am Kaninchenknochen durch simultane Injektion von fluoreszierenden und radioaktiven MS unter wechselnden hämodynamischen Bedingungen überprüft. Die Injektion der FM und RM und deren Verarbeitung erfolgten standardisiert. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) wurde durch Infusion des Kolloids HAES (Haemofusin® 6%, Baxter, Unterschleißheim, Deutschland) oder durch Entnahme von Blut auf die Zielwerte von 90, 70 und 50 mmHg eingestellt. Die Injektion der Mikrosphären erfolgte jeweils, nachdem der MAD über 20 min konstante Werte aufgewiesen hatte. Nach dem Versuchsende wurden neben den Knochen und Nieren auch beide Mm. gastrocnemicae entnommen und in 10 Proben aufgeteilt. Die Auswertung der Muskelproben erfolgte direkt nach Versuchsende. Zuerst wurde die Radioaktivität in den Gewebeproben und den arteriellen Referenzproben bestimmt. Nach der Dissektion wurden die Gewebeproben in ein tariertes Szintillationsgefäß eingelegt und gewogen. Durch ein vor Versuchsbeginn für jedes Organ festgelegtes Dissektionsschema wurde durch ein spezielles

Computerprogramm das Gewicht automatisch der entsprechenden Probe zugeordnet. Die Szintillationsgefäße wurden in den γ -Counter gestellt und die Radioaktivität gemessen. Um den Zählfehler möglichst gering zu halten ($< 1\%$), wurde die Radioaktivität über einen Zeitraum von 3 min gemessen. Aus der gemessenen Radioaktivität wurde durch die sogenannte Matrix-Inversions-Methode mit Hilfe der MIC III Software die tatsächliche Radioaktivität berechnet. Mit diesem Verfahren werden die möglichen Fehler, die durch die unterschiedliche Halbwertszeit der Isotope, der Hintergrundstrahlung und den Spillover auftreten können, berücksichtigt und korrigiert (Schosser et al., 1990; Gross et al., 1990). Über die eingegebenen Daten (Gewicht, Dotierung, Dissektionsschema) wurde der Blutfluss aller Proben automatisch berechnet. Die Messung der Fluoreszenzintensität in den arteriellen Referenzblut- und Muskelproben erfolgte unmittelbar nach Bestimmung der Radioaktivität. Die Digestion der organischen Matrix der Gewebe- und der arteriellen Referenzproben in KOH (4 mol/l) und die Isolierung der FM aus der Digestionslösung erfolgte automatisiert mit Hilfe der Sample-Processing-Unit (SPU) (Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland) (Nolte et al., 1999; Thein et al., 2000). Der Zusatz von Na-Citrat in einem Verhältnis von 2:1 zur arteriellen Referenzblutprobe erlaubte die direkte Filtration des Blutes mit Hilfe der SPU. Mit den erhaltenen Daten wurde dann der Blutfluss für jede einzelne Probe und jeden Injektionszeitpunkt berechnet.

2.8. Berechnung des regionalen Blutflusses und des Herzzeitvolumens

Sämtliche Berechnungen wurden mit Hilfe der Software Microsoft® Excel 2007 (Microsoft Corporation, USA) durchgeführt.

Der *absolute* Blutfluss wurde folgendermaßen berechnet:

$$\text{Blutfluss}_{\text{Probe}} [\text{ml}/\text{min}/100\text{g}] = \frac{\text{Abzugsgeschwindigkeit}_{\text{Pumpe}} [\text{ml}/\text{min}] \times \text{Intensität}_{\text{Probe}}}{\text{Intensität}_{\text{Referenz}} \times \text{Gewicht}_{\text{Probe}} [100\text{g}]}$$

Zur Validierung der Mikrosphärenmethode am Muskel wurden nach Hübler et al. (1999) und Schimmel et al. (2000) die *relativen* Blutflüsse berechnet. Für jede Muskelprobe wurde hierfür der Quotient der Radioaktivität/Fluoreszenzintensität der einzelnen Probe und der mittleren Radioaktivität/Fluoreszenzintensität des zugehörigen gesamten Muskels (Muskel total) berechnet:

$$\text{Blutfluss}_{\text{Relativ}} = \frac{\text{Intensität/Radioaktivität}_{\text{Probe}}}{\text{Intensität/Radioaktivität}_{\text{Muskel total}}}$$

Zur Beurteilung der hämodynamischen Situation zum Zeitpunkt der Mikrosphäreninjektion wurde zusätzlich das Herzzeitvolumen nach Archie et al. (1973) berechnet.

$$\text{Herzzeitvolumen [ml/min]} = \frac{\text{Abzugsgeschwindigkeit}_{\text{Pumpe}} [\text{ml/min}] \times \text{Intensität}_{\text{Injizierte Menge}}}{\text{Intensität}_{\text{Referenz}}}$$

Das Herzzeitvolumen wurde durch das Körpergewicht dividiert und in ml/min/kg Körpergewicht angegeben.

2.9. Statistik

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Programm SPSS für Windows (Version 18, SPSS Inc., Chicago, USA) verwendet.

Für jede einzelne Gewebeprobe wurden die Blutflüsse berechnet und die Mittelwerte und Standardfehler der Mittelwerte (SEM) angegeben.

Die Blutflusswerte von wiederholten Messungen wurden mittels des nicht parametrischen Tests für verbundene Stichproben nach Friedman getestet. Im Signifikanzfall wurde als post-hoc-Test der Wilcoxon-Test eingesetzt. Zum Vergleich zwischen identischen rechten und linken Proben kam ebenfalls der Wilcoxon-Test zur Anwendung. Die Unterschiede zwischen Blutflusswerten zweier verschiedener Muskeln wurden mittels des U-Tests nach Mann und Whitney getestet.

Zum Intermethodenvergleich zwischen simultan injizierter RM und FM wurden die relativen Blutflüsse mittels linearer Regressionsanalyse und der Methode nach Bland und Altman (1986) verglichen. Die Regressionsanalyse wurde durch die Parameter Korrelationskoeffizient (r), Bestimmtheitsmaß (r²), Standardfehler des Schätzers (SEE) und Regressionsgleichung beschrieben.

Für die graphische Darstellung des Bland- und Altman-Plots wurde die Differenz der relativen Blutflusswerte (y-Achse) der zwei simultan injizierten MS Spezies (RM-FM) berechnet und anschließend gegen das Ergebnis bei Injektion von RM (x-Achse) aufgetragen. Die doppelte Standardabweichung (SD) und die Abweichung vom Mittelwert wurden ergänzt.

3. Ergebnisse

3.1. Validierung der FM-Methode zur Messung der Muskeldurchblutung

Zur Validierung der FM-Methode am Muskel wurden drei simultane Injektionen von FM und RM bei den Blutdruckwerten von 90, 70 und 50 mmHg durchgeführt und jeweils die relativen Blutflüsse berechnet. Die Werte wurden mittels Regressionsanalyse und der Methode nach Bland und Altman (1986) miteinander verglichen. Der intermethodische Vergleich zeigt hier eine hohe Übereinstimmung bei allen Messzeitpunkten. Der Regressionskoeffizient lag nahe bei 1, der Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit den Achsen bei 0. Die Regressionsgleichung für simultan injizierte RM/FM war bei einem MAD 90 mmHg $y = 0,97x + 0,05$ ($r^2 = 0,89$, $SEE = 0,13$), die mittlere Differenz betrug $0,03 \pm 0,14$ (Abbildung 10).

Bei MAD 70 mmHg war die berechnete Regressionsgleichung $y = 0,94x + 0,07$ ($r^2 = 0,83$, $SEE = 0,07$), die mittlere Differenz zwischen den simultan gemessenen Blutflusswerten betrug $0,01 \pm 0,08$ (Abbildung 11).

Die Regressionsgleichung für simultan injizierte RM/FM war bei einem MAD von 50 mmHg $y = 1,05x - 0,03$ ($r^2 = 0,84$, $SEE = 0,07$), die mittlere Differenz war $0,01 \pm 0,07$ (Abbildung 12).

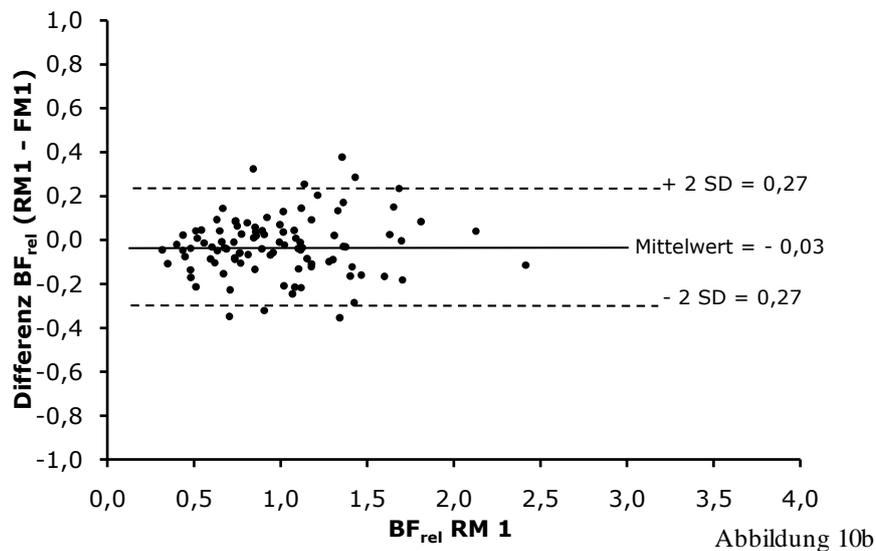
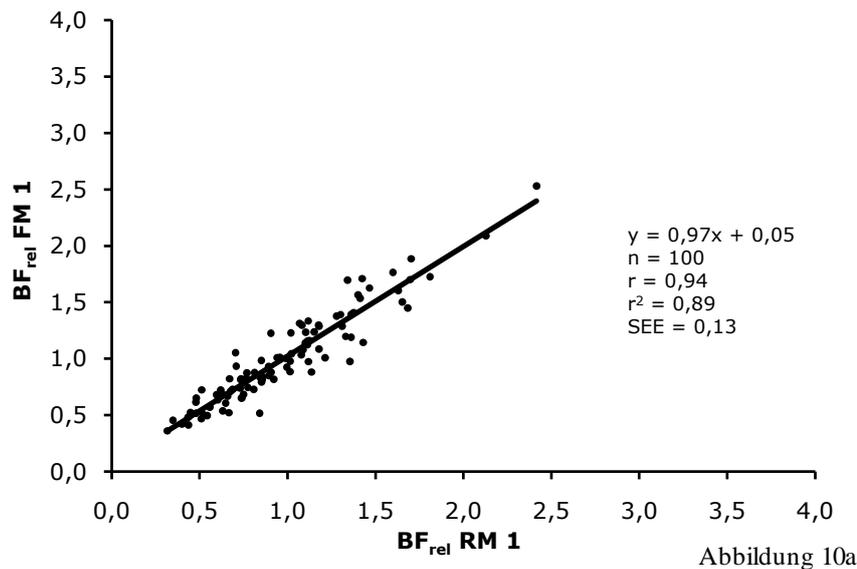


Abbildung 10: Vergleich der durch simultane Injektion von RM und FM ermittelten relativen Muskelblutflüsse (BF_{rel}) bei 90 mmHg.

Abbildung a: Regressionsanalyse; die durchgezogene Linie ist die Regressionsgerade.

Abbildung b: Vergleich der Methode von Bland und Altman (1986); die ermittelten relativen Blutflusswerte zeigen eine gleichmäßige Verteilung ober- und unterhalb von 0 und weichen im Mittel um $0,03 \pm 0,27$ (Mittelwert $\pm 2SD$) ab.

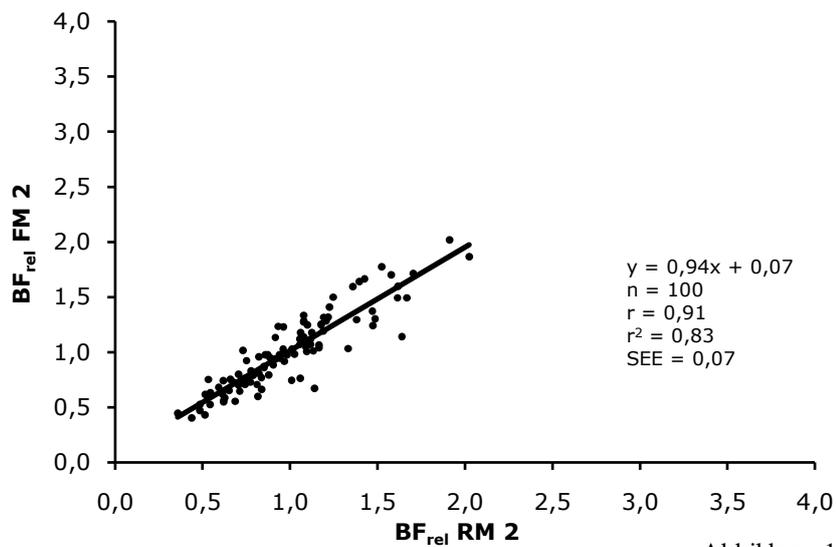


Abbildung 11a

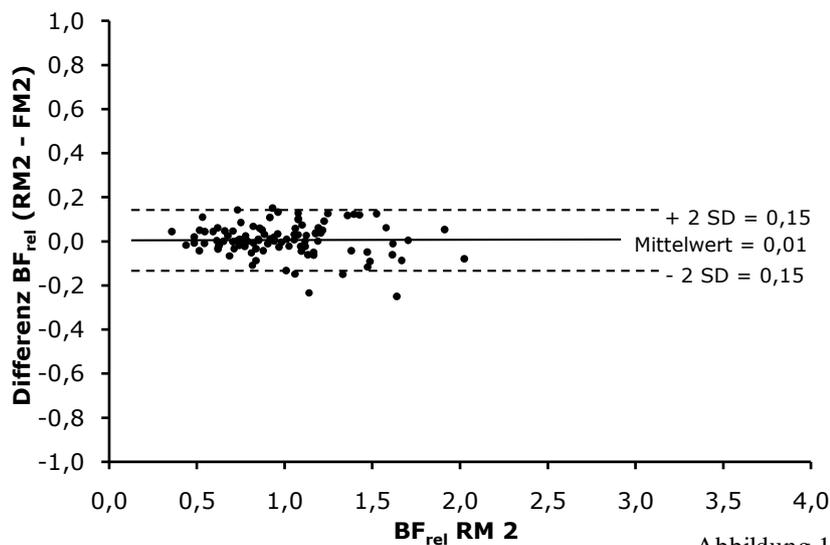


Abbildung 11b

Abbildung 11: Vergleich der durch simultane Injektion von RM und FM ermittelten relativen Muskelblutflüsse (BF_{rel}) bei 70 mmHg.

Abbildung a: Regressionsanalyse; die durchgezogene Linie ist die Regressionsgerade.

Abbildung b: Vergleich der Methode von Bland und Altman (1986); die ermittelten relativen Blutflusswerte zeigen eine gleichmäßige Verteilung ober- und unterhalb von 0 und weichen im Mittel um $0,01 \pm 0,15$ (Mittelwert $\pm 2SD$) ab.

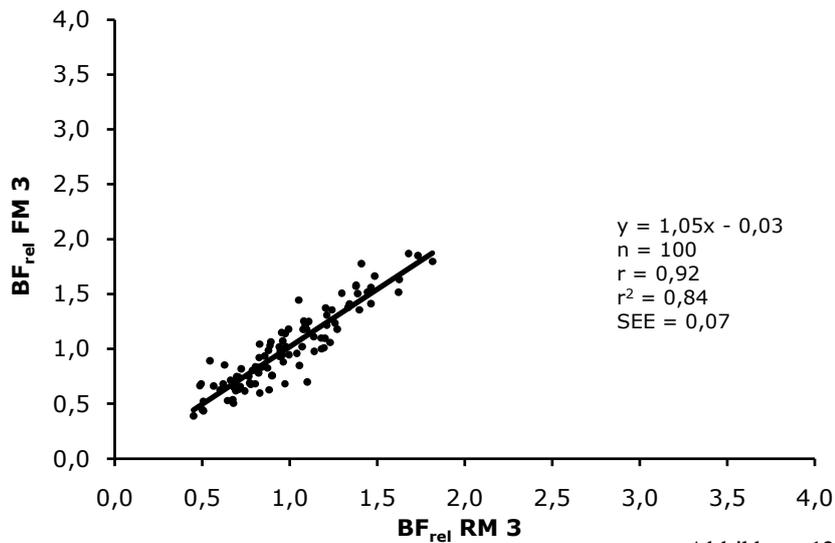


Abbildung 12a

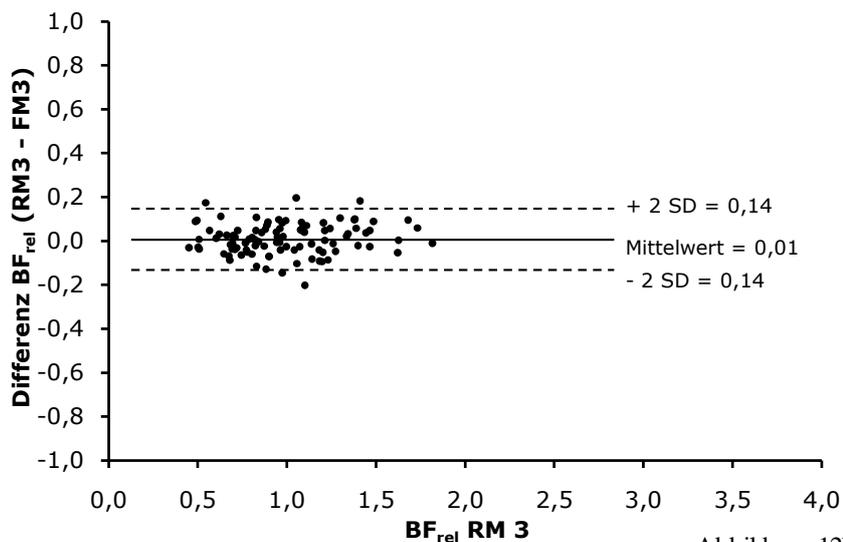


Abbildung 12b

Abbildung 12: Vergleich der durch simultane Injektion von RM und FM ermittelten relativen Muskelblutflüsse (BF_{rel}) bei 50 mmHg.

Abbildung a: Regressionsanalyse; die durchgezogene Linie ist die Regressionsgerade.

Abbildung b: Vergleich der Methode von Bland und Altman (1986); die ermittelten relativen Blutflusswerte zeigen eine gleichmäßige Verteilung ober- und unterhalb von 0 und weichen im Mittel um $0,01 \pm 0,14$ (Mittelwert $\pm 2\text{SD}$) ab.

3.2. Versuchsreihe 1 (Ischämiedauer 60 min)

3.2.1. Hämodynamische Parameter

Das Herzzeitvolumen lag zwischen 141 ± 14 ml/min/kg (Ausgangsmessung) und 113 ± 18 ml/min/kg (letzte Messung) und blieb während des gesamten Versuchs konstant (Abbildung 13, Tabelle 1).

Die Herzfrequenz blieb ebenfalls konstant und variierte zwischen 152 ± 6 Schläge/min und 212 ± 9 Schläge/min ($p > 0,05$; Friedman-Test) (Tabelle 1). Betrachtet man die HF vor und nach den MS-Injektionen zeigte sich ein signifikanter Abfall um ca. 10 Schläge/min nach 1 min, 5 min und 15 min ($p < 0,05$; Nachfolgetest nach Wilcoxon).

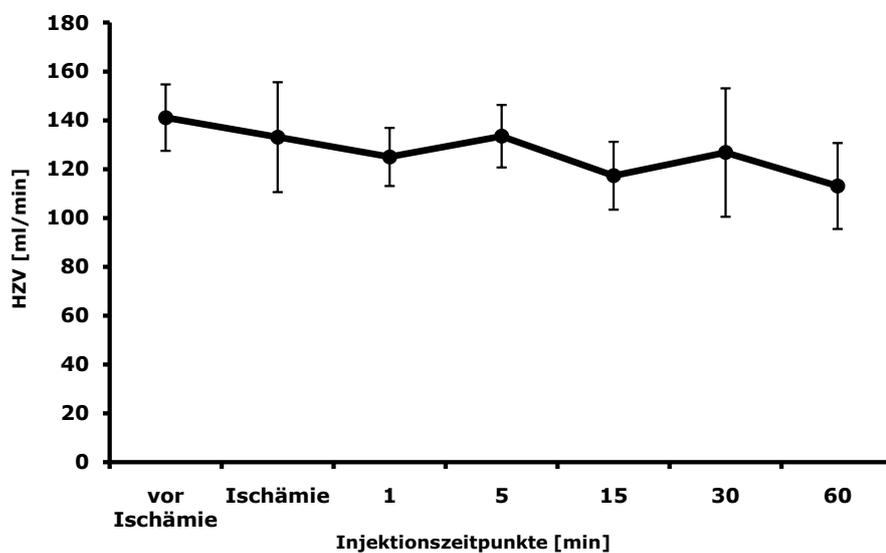


Abbildung 13: Herzzeitvolumen in ml/min zu den jeweiligen Messzeitpunkten (Mittelwert \pm SEM, $n=6$). Das HZV blieb während des Versuchsablaufes konstant ($p > 0,05$).

Der Arterielle Mitteldruck (MAD) betrug vor Anlegen der Blutsperre 83 ± 3 mmHg (Tabelle 1) und sank nach dem Anlegen der Blutsperre nicht signifikant auf 78 ± 3 mmHg ab. Nach Entfernen der Blutsperre kam es zu einem hoch signifikanten Abfall des MAD um 10 mmHg auf 70 ± 2 mmHg ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest nach Wilcoxon). Danach blieb der arterielle Mitteldruck konstant (Abbildung 14). Direkt nach jeder MS-Injektion war der MAD jeweils genauso hoch wie davor (davor durchschnittlich 71 mmHg und danach 70 mmHg).

Die Partialdrücke von O_2 und CO_2 waren konstant ($p > 0,05$; Friedman-Test) (Tabelle 1).

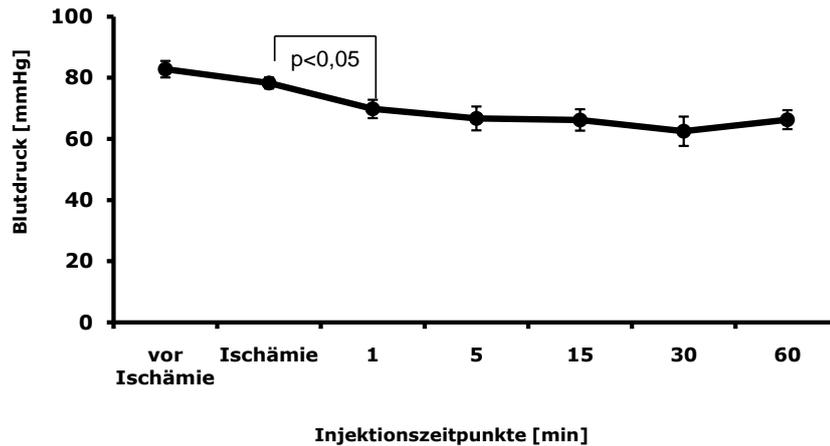


Abbildung 14: Mittlerer arterieller Blutdruck MAD in mmHg zu den jeweiligen Messzeitpunkten (Mittelwert \pm SEM, n=6). Nach Entfernung der Blutsperre kam es zu einem signifikanten Blutdruckabfall ($p < 0,05$).

3.2.2. Probengewichte

Das Gewicht von rechten und linken Knochenproben (Tabelle 2) war identisch ($p > 0,05$, Wilcoxon Test).

3.2.3. Nierendurchblutung

Die Nierendurchblutung lag zwischen 221 ± 36 ml/min/100g (vor Ischämie) und 157 ± 19 ml/min/100g (nach 60 min), es bestand kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen den Messzeitpunkten ($p > 0,05$; Friedman-Test). Die Durchblutung in der rechten und linken Niere (Tabelle 3) war gleich hoch ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test).

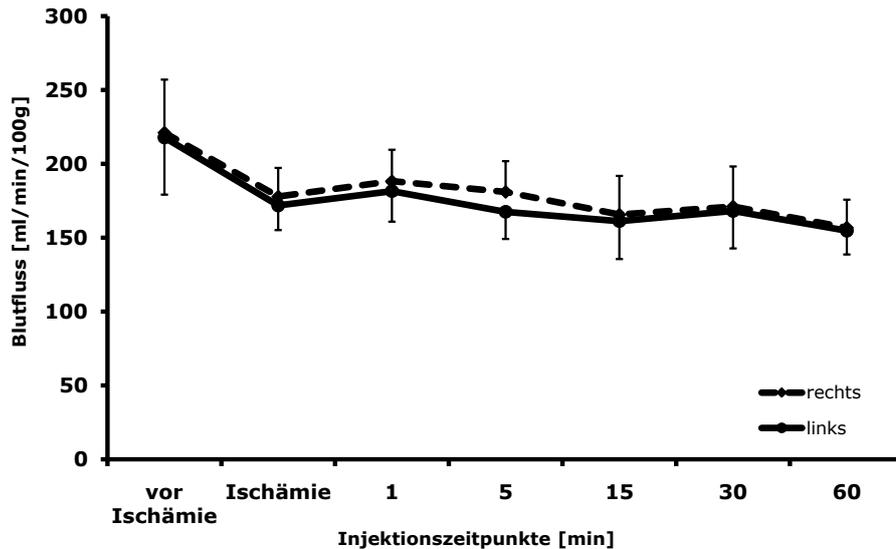


Abbildung 15: Regionaler Blutfluss (RBF) in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=6) in beiden Nieren zu den jeweiligen Messzeitpunkten (durchgezogene Linie: links; gestrichelte Linie: rechts). Die Nierendurchblutung blieb während der Versuchsdauer konstant ($p > 0,05$). Die Durchblutung der rechten und linken Niere war gleich ($p > 0,05$).

3.2.4. Knochendurchblutung

3.2.4.1. Blutfluss in Femur, Tibia und Talus

Der Blutfluss im rechten Femur (Kontrollseite) blieb während des Versuchsablaufes konstant und lag zwischen $8,4 \pm 0,5$ ml/min/100g und $10,1 \pm 0,7$ ml/min/100g ($p > 0,05$; Friedman-Test). Der Blutfluss im linken Femur (Ischämieseite) änderte sich ebenfalls nicht ($p > 0,05$; Friedman-Test). Er lag zwischen $7,7 \pm 0,8$ ml/min/100g und $8,8 \pm 0,8$ ml/min/100g (Tabelle 3). Bei angelegter Blutsperre war der Blutfluss auf der Ischämieseite mit $7,7 \pm 0,8$ ml/min/100g kleiner als auf der Kontrollseite mit $10,1 \pm 0,8$ ml/min/100g. Der Unterschied war jedoch statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test). Die weiteren Blutflüsse waren links und rechts gleich hoch (Abbildung 16).

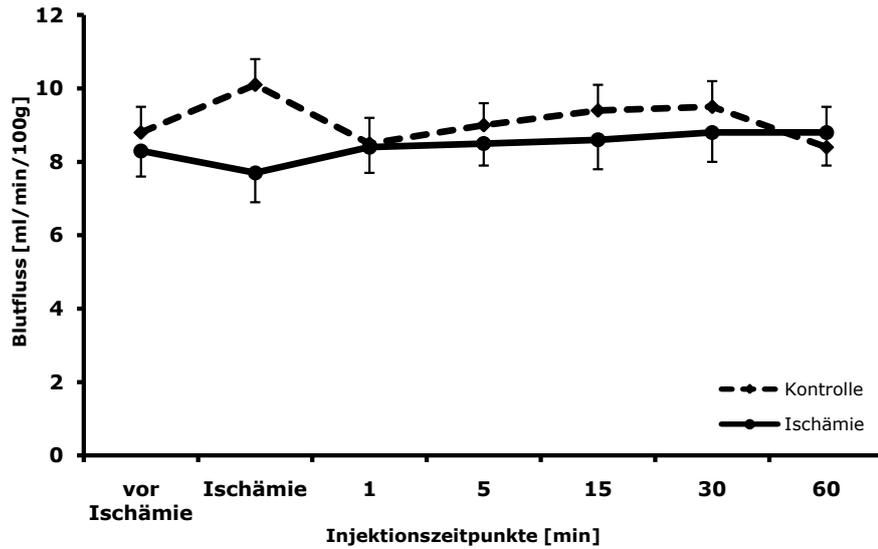


Abbildung 16: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=6) des Femurs (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Der Blutfluss blieb während der Messzeitpunkte gleich, es bestand kein Unterschied zwischen der Ischämieseite und der Kontrollseite.

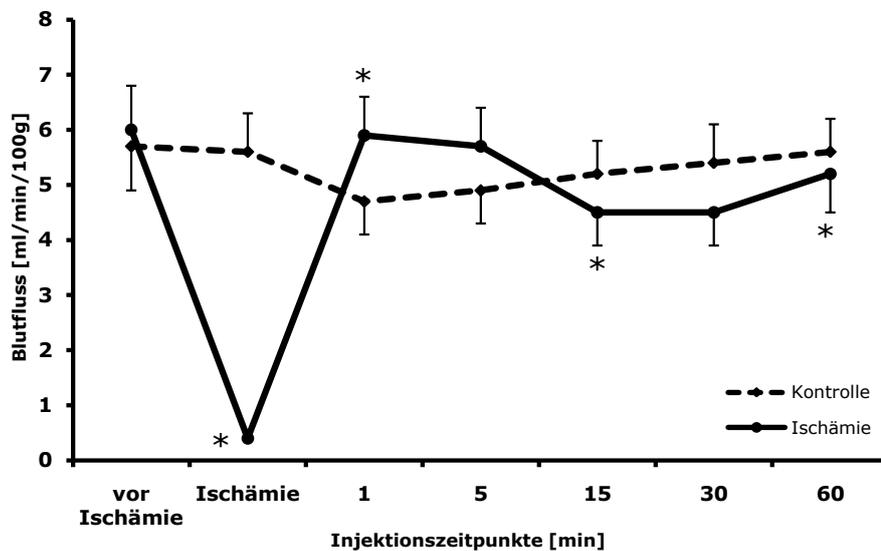


Abbildung 17: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=6) der Tibia (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Der Blutfluss lag während der Blutsperre nahe bei null. Nach Lösen der Blutsperre kam es zu einem vorübergehenden Anstieg der Durchblutung über die Werte der Kontrollseite. Die mit * markierten Werte waren im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

Die Durchblutung in der rechten Tibia (Kontrollseite) sank während der Ischämie signifikant von $5,6 \pm 0,7$ ml/min/100g auf $4,7 \pm 0,6$ ml/min/100g ab ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test) und blieb danach konstant. Die linke Seite (Ischämieseite) war während der Blutsperre fast nicht durchblutet, der Blutfluss lag bei $0,4 \pm 0,1$ ml/min/100g.

Eine Minute nach Aufheben der Blutsperre stieg die Durchblutung signifikant an und war mit $5,9 \pm 0,7$ ml/min/100g höher als auf der Gegenseite mit $4,7 \pm 0,6$ ml/min/100g. Danach sank der Blutfluss wieder leicht ab und war nach 15 min mit $4,5 \pm 0,6$ ml/min/100g um etwa 1 ml/min/100g niedriger als auf der Gegenseite. Nach 30 min blieb der Blutfluss unverändert und nach 60 min zeigte sich ein leichter Anstieg auf $5,2 \pm 0,7$ ml/min/100g, er lag aber noch unterhalb des Blutflusses auf der Kontrollseite mit $5,6 \pm 0,6$ ml/min/100g. Der Unterschied zwischen rechter und linker Seite war nach 1 min, 15 min und 60 min signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test) (Tabelle 3, Abbildung 17).

Im rechten Talus (Kontrollseite) war der Blutfluss während des gesamten Versuchs konstant ($p > 0,05$; Friedman-Test) und lag zwischen $4,7 \pm 0,6$ ml/min/100g und $5,7 \pm 0,8$ ml/min/100g. Im linken Talus (Ischämieseite) sank die Durchblutung nach Anlage der Blutsperre auf $0,4 \pm 0,4$ ml/min/100g signifikant ab ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test). Nach Eröffnen der Blutsperre stieg der Blutfluss signifikant ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test) bis auf $5,0 \pm 1,3$ ml/min/100g an (5 min) und war damit etwa 2 ml/min/100g höher als auf der Gegenseite (Tabelle 3, Abbildung 18). Danach zeigte sich ein Abfall der Durchblutung, nach 15 min war der Blutfluss rechts und links gleich hoch (ca. 3 ml/min/100g). Nach 30 min sank der Blutfluss erneut leicht auf $2,3 \pm 0,4$ ml/min/100g und war kleiner als auf der Kontrollseite ($2,7 \pm 0,5$ ml/min/100g). Nach 60 min änderte sich die Durchblutung kaum. Zwischen linker und rechter Seite bestand nach Entfernen der Blutsperre kein statistisch signifikanter Unterschied ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test).

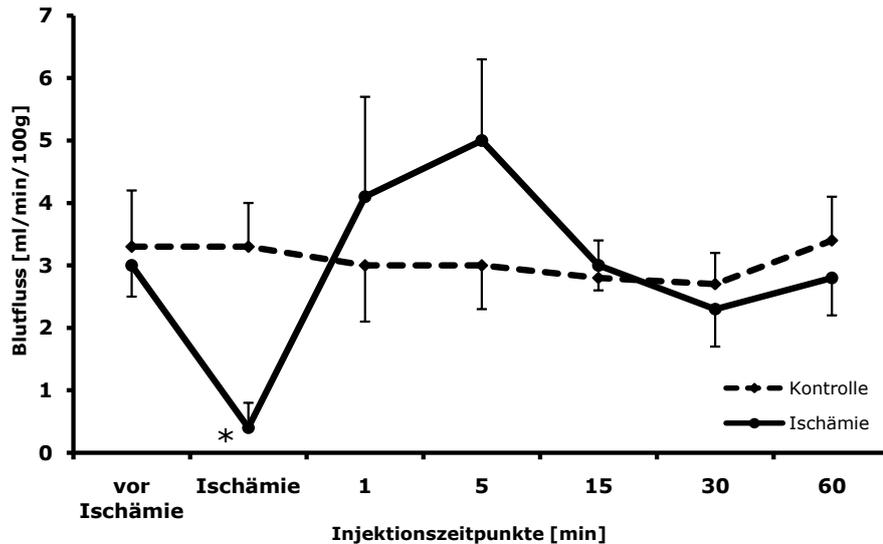


Abbildung 18: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=6) des Talus (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Der Blutfluss lag während der Blutsperre nahe bei null. Nach Lösen der Blutsperre kam es zu einem vorübergehenden Anstieg der Durchblutung über die Werte der Kontrollseite. Der mit * markierte Werte war im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

3.2.4.2. Regionaler Blutfluss im Femur

Im rechten Femur wurde der höchste Blutfluss im Trochanter major und im Collum femoris gemessen ($12,7 \pm 3,4$ ml/min/100g bzw. $11,7 \pm 2,5$ ml/min/100g). Im Caput femoris betrug der Blutfluss $9,5 \pm 2,7$ ml/min/100g, in der proximalen Metaphyse $9,4 \pm 0,9$ ml/min/100g und in der medialen und lateralen Condyle $7,8 \pm 1,6$ ml/min/100g bzw. $7,8 \pm 1,7$ ml/min/100g. In der distalen Metaphyse wurde ein Wert von $6,9 \pm 0,7$ ml/min/100g gemessen. Die niedrigste Durchblutung wies die Diaphyse mit $4,6 \pm 0,5$ ml/min/100g auf (Tabelle 4). Der Blutfluss war im rechten und linken Femur gleich hoch ($p > 0,05$, Wilcoxon-Test) und blieb in den Knochenregionen proximal der Blutsperre während der Versuchsdauer konstant. In den Knochenregionen distal der Blutsperre kam es zu einem signifikanten Rückgang des Blutflusses im Condylus medialis und im Condylus lateralis auf etwa 1 ml/min/100g. Nach Entfernen der Blutsperre stieg der Blutfluss in den ersten 5 min auf $9,4 \pm 1,5$ ml/min/100g im Condylus medialis und auf $7,5 \pm 1,7$ ml/min/100g im Condylus lateralis an ($p < 0,05$, Friedman-Test, Nachfolgetest nach Wilcoxon). Die Durchblutung lag höher als auf der Kontrollseite, der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test). Nach 15 min und 30 min nahm der Blutfluss in beiden Knochenregionen auf ca. 6 ml/min/100g ab und lag damit um 2 ml/min/100g niedriger als auf der Kontrollseite. Im

Condylus medialis war der Unterschied zur Gegenseite nach 15 min statistisch signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test). Nach 60 min waren die Werte in rechten und linken Knochenregionen wieder gleich hoch (Abbildung 19).

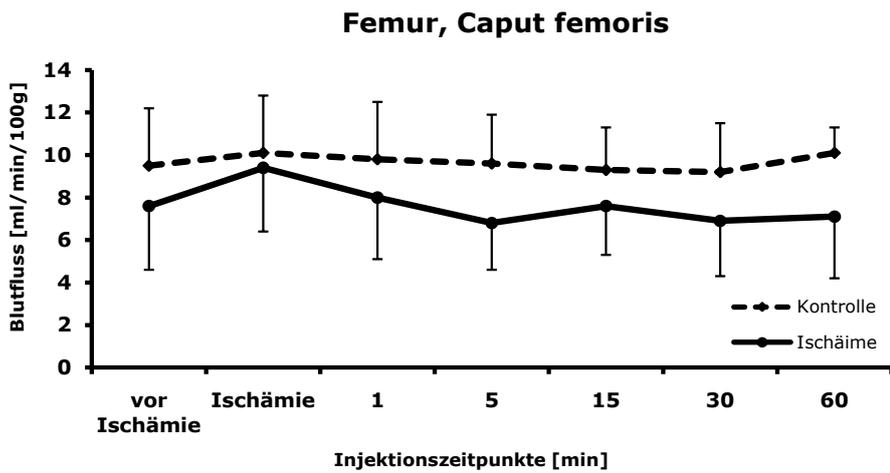


Abbildung 19a

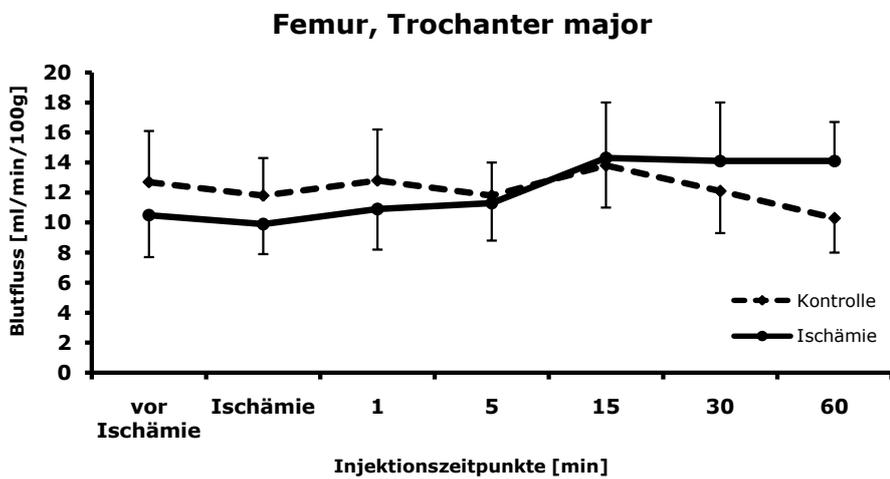


Abbildung 19b

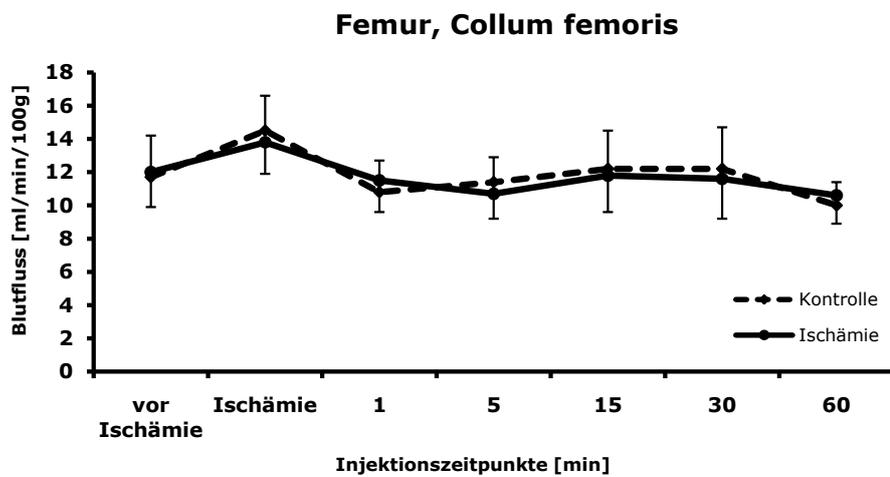


Abbildung 19c

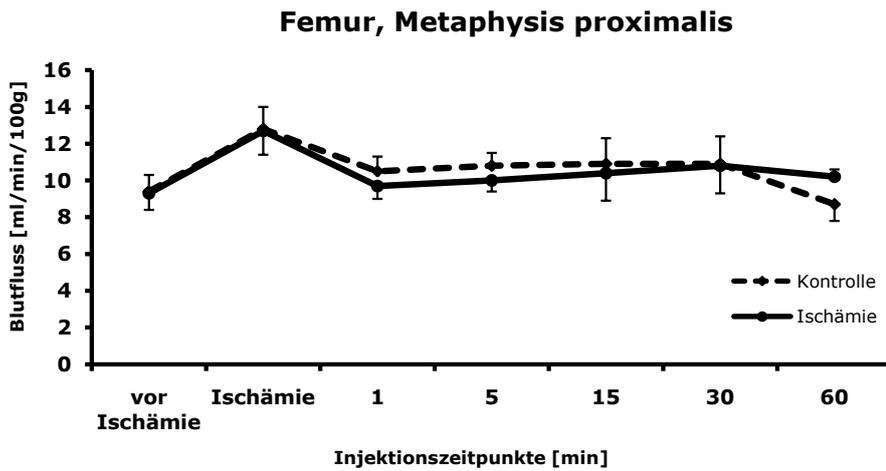


Abbildung 19d

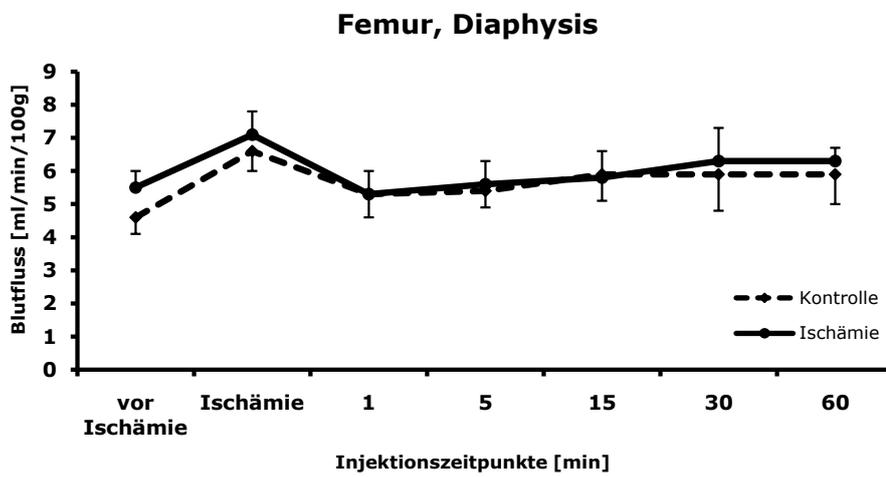


Abbildung 19e

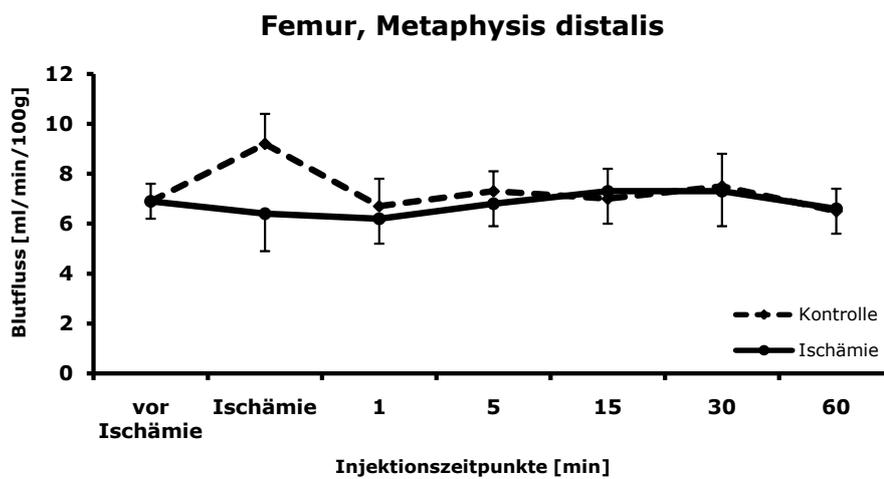


Abbildung 19f

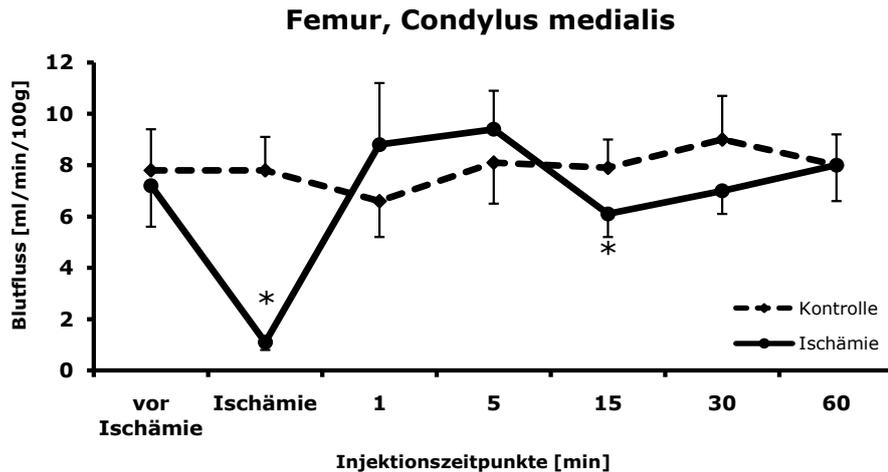


Abbildung 19g

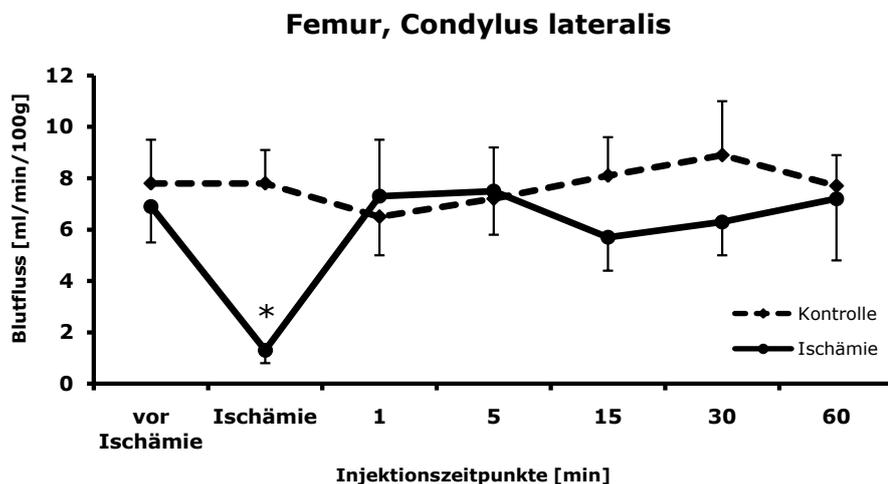


Abbildung 19h

Abbildung 19: Regionaler Knochenblutfluss (RKBf) in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=6) in den einzelnen Regionen des Femurs (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). In den Knochenabschnitten proximal der Blutsperre war die Durchblutung konstant (Abbildung 19a-f). Distal davon kam es nach Lösen der Blutsperre im Vergleich zur Gegenseite zu einer signifikanten Mehrdurchblutung mit nachfolgender Minderdurchblutung (Abbildung 19g und 19h). Die mit * markierten Werte waren im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

- Abbildung a: Durchblutung im Caput femoris
- Abbildung b: Durchblutung im Trochanter major
- Abbildung c: Durchblutung im Collum femoris
- Abbildung d: Durchblutung in der Metaphysis proximalis
- Abbildung e: Durchblutung in der Diaphyse
- Abbildung f: Durchblutung in der Metaphysis distalis
- Abbildung g: Durchblutung im Condylus medialis
- Abbildung e: Durchblutung im Condylus lateralis

3.2.4.3. Regionaler Blutfluss in der Tibia

Die höchsten Blutflüsse in der rechten Tibia wurden im Condylus medialis und Condylus lateralis gemessen ($10,9 \pm 3,1$ ml/min/100g bzw. $8,6 \pm 2,4$ ml/min/100g). In der proximalen Metaphyse betrug der Blutfluss $7,2 \pm 0,9$ ml/min/100g. Am geringsten war die Durchblutung in der proximalen und distalen Diaphyse ($3,4 \pm 0,3$ ml/min/100g und $3,1 \pm 1,5$ ml/min/100g). Der Blutfluss in der distalen Metaphyse ($3,5 \pm 1,2$ ml/min/100g) und Epiphyse ($4,3 \pm 1,6$ ml/min/100g) war ebenfalls niedrig (Tabelle 5). Die Durchblutung der einzelnen Knochenregionen blieb auf der Kontrollseite während des Versuchs gleich ($p > 0,05$; Friedman-Test). Auf der Ischämieseite war die Durchblutung nach Anlage der Blutsperre fast auf 0 ml/min/100g gesunken. Nach Lösen der Blutsperre kam es zu einem sofortigen Anstieg der Durchblutung ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test). Der Blutfluss lag in den meisten Knochenregionen über dem der Kontrollseite. Der Unterschied war im Condylus lateralis ($7,9 \pm 2,1$ ml/min/100g, links $12,4 \pm 2,5$ ml/min/100g) und in der Epiphyse (rechts $3,2 \pm 0,7$ ml/min/100g, links $5,6 \pm 1,0$ ml/min/100g) am größten und statistisch signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test). Im Condylus medialis (rechts $8,7 \pm 2,5$ ml/min/100g, links $9,3 \pm 1,5$ ml/min/100g) und der distalen Diaphyse (rechts $1,5 \pm 0,4$ ml/min/100g, links $1,9 \pm 0,4$ ml/min/100g) war der Unterschied geringer ausgeprägt. In der Metaphysis proximalis (rechts $6,7 \pm 1,1$ ml/min/100g, links $5,5 \pm 0,4$ ml/min/100g), Diaphysis proximalis (rechts $3,6 \pm 0,3$ ml/min/100g, links $3,3 \pm 0,4$ ml/min/100g) und Metaphysis distalis (rechts $2,8 \pm 0,8$ ml/min/100g, links $2,3 \pm 0,5$ ml/min/100g) trat nur ein geringer Blutflussanstieg auf und die Durchblutung auf der Kontrollseite lag noch höher als auf der Ischämieseite. Nach 15 min sank die Durchblutung in allen Knochenregionen ab, im Condylus lateralis war der Rückgang mit etwa 4 ml/min/100g sogar signifikant ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test). Die Durchblutung aller Regionen war bis zum Versuchsende auf der Ischämieseite im Vergleich zur Kontrollseite niedriger. Der Unterschied war in der proximalen und distalen Diaphyse nach 15 min statistisch signifikant ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test) (Abbildung 20).

Tibia, Condylus medialis

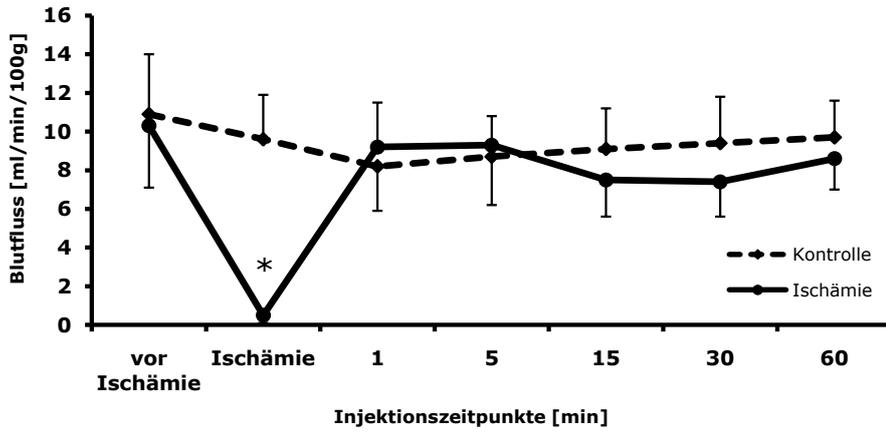


Abbildung 20a

Tibia, Condylus lateralis

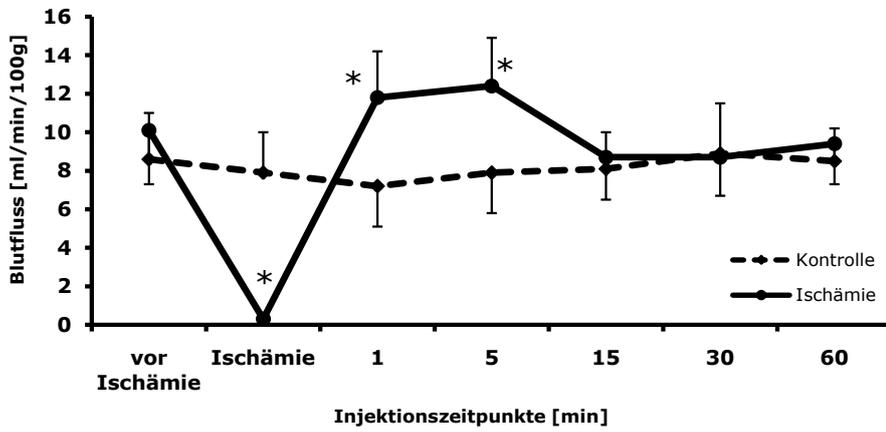


Abbildung 20b

Tibia, Metaphysis proximalis

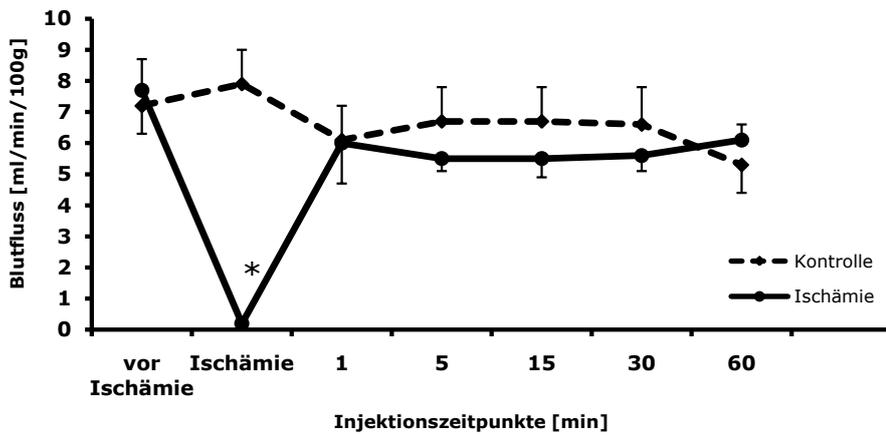


Abbildung 20c

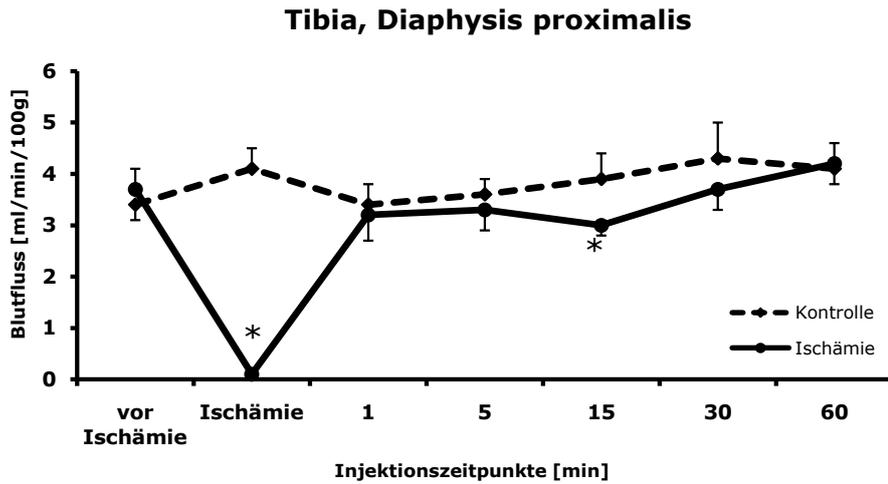


Abbildung 20d

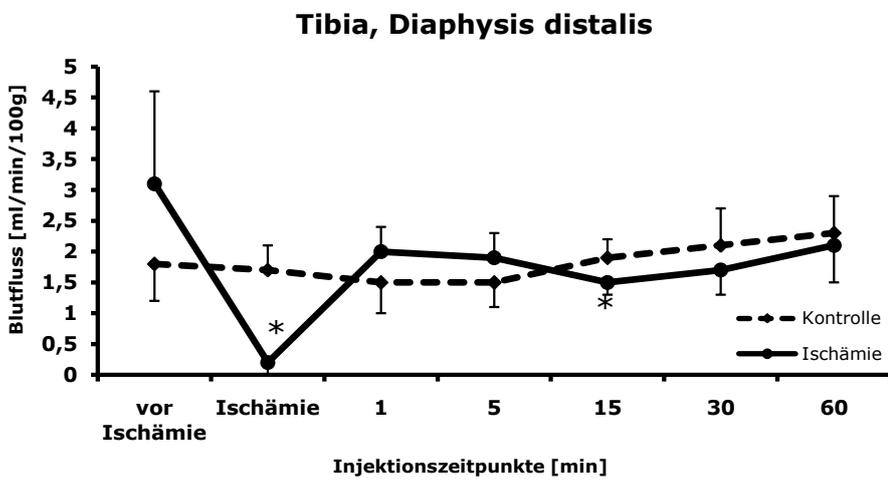


Abbildung 20e

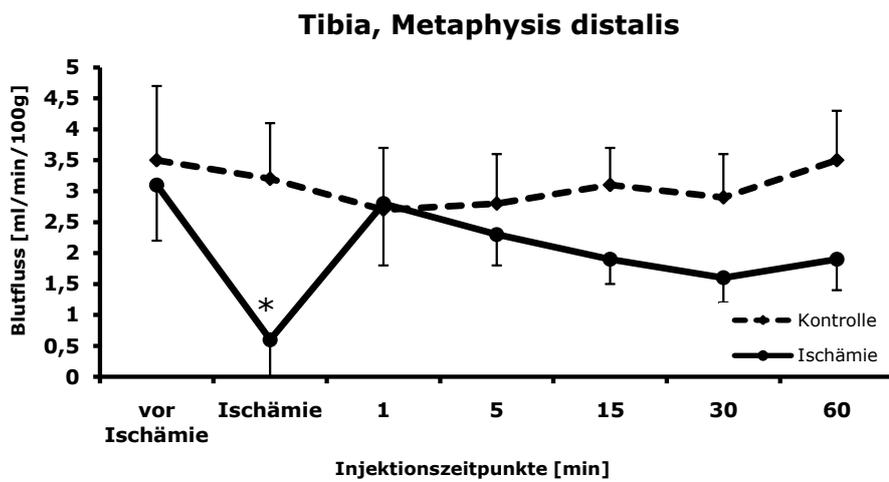


Abbildung 20f

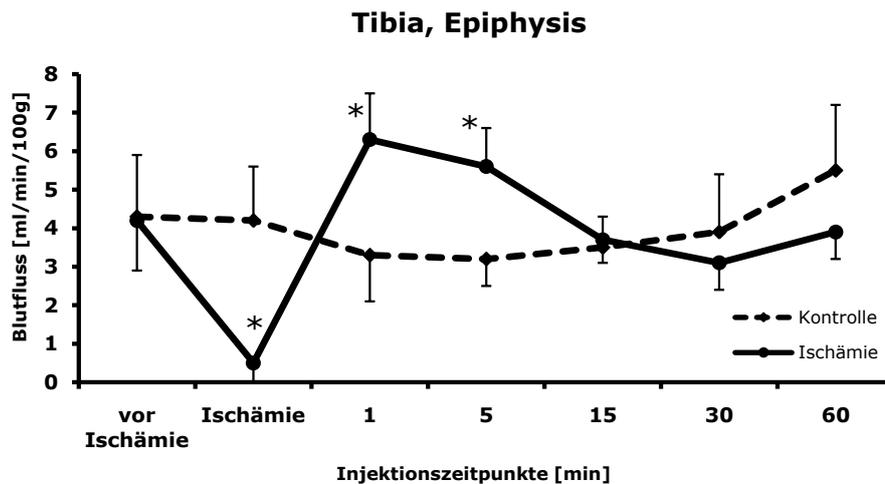


Abbildung 20g

Abbildung 20: RKBF in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=6) in den einzelnen Regionen der Tibia (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Nach Entfernen der Blutsperre zeigte sich im Condylus lateralis und der Epiphyse eine signifikante Mehrdurchblutung (Abbildung 20 b,g). Nach 15 min trat in allen Regionen eine leichte Minderdurchblutung im Seitenvergleich auf. Die mit * markierten Werte waren im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

Abbildung a: Durchblutung im Condylus medialis

Abbildung b: Durchblutung im Condylus lateralis

Abbildung c: Durchblutung in der Metaphysis proximalis

Abbildung d: Durchblutung in der Diaphysis proximalis

Abbildung e: Durchblutung in der Diaphysis distalis

Abbildung f: Durchblutung in der Metaphysis distalis

Abbildung g: Durchblutung in der Epiphyse

3.2.5. Muskeldurchblutung

Vor Anlage der Blutsperre war der Blutfluss im rechten und linken M. gastrocnemius (rechts: $12 \pm 2,2$ ml/min/100g, links: $11,6 \pm 2,1$ ml/min/100g) gleich. Der Blutfluss im M. tibialis anterior war signifikant höher und betrug rechts $16,2 \pm 2,3$ ml/min/100g und links $15 \pm 2,1$ ml/min/100g ($p < 0,05$; Mann-Whitney-U-Test) (Tabelle 6). Auf der Kontrollseite blieb die Durchblutung in beiden Muskeln während des Versuchsablaufes konstant ($p > 0,05$; Friedman-Test). Nach Anlegen der Blutsperre sank der Blutfluss ab und betrug im M. gastrocnemius nur $0,6 \pm 0,2$ ml/min/100g und im M. tibialis anterior $1,4 \pm 0,9$ ml/min/100g. Nach Lösen der Blutsperre stieg die Durchblutung sofort auf $39,6 \pm 5,5$ ml/min/100g im M. gastrocnemius und auf $31,0 \pm 4,2$ ml/min/100g im M. tibialis anterior an (Tabelle 6). Dies entsprach einer Durchblutungssteigerung auf das 5-fache bzw. 3-fache der Normalwerte. Anschließend fiel die Durchblutung in beiden Muskeln wieder kontinuierlich ab. Nach 5 min lag der Blutfluss

im M. gastrocnemius bei $19,7 \pm 2$ ml/min/100g und im M. tibialis anterior bei $16,1 \pm 1,7$ ml/min/100g. Nach 15 min waren die Blutflüsse in beiden Muskeln wieder gleich hoch und blieben bis zum Versuchsende konstant. Im M. gastrocnemius betrug der Blutfluss etwa 6 ml/min/100g und im M. tibialis anterior etwa 8 ml/min/100g (Abbildung 21, 22).

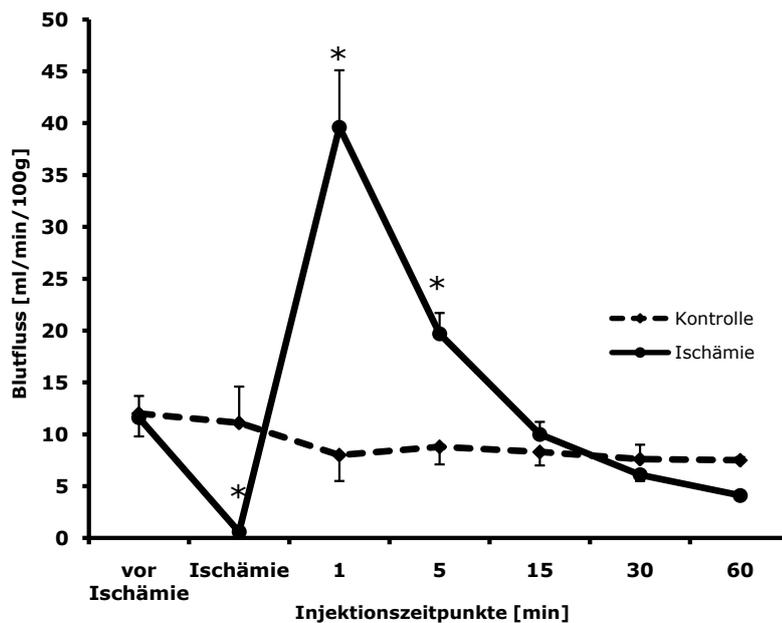


Abbildung 21: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=6) im M. gastrocnemius (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Nach Ischämie zeigte sich in den ersten 5 min eine deutliche Hyperperfusion. Die mit * markierten Werte waren im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

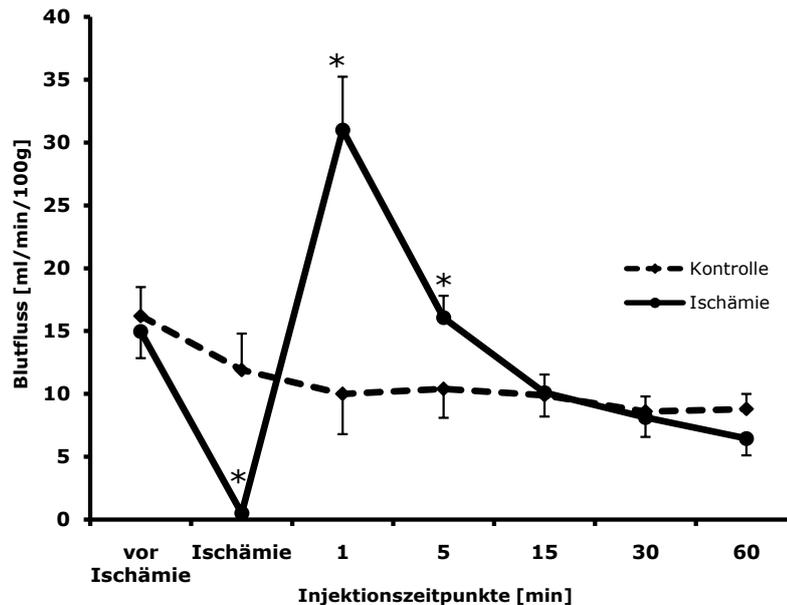


Abbildung 22: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=6) im M. tibialis anterior (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Nach Ischämie zeigte sich in den ersten 5 min eine deutliche Hyperperfusion. Die mit * markierten Werte waren im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

3.3. Versuchsreihe 2 (Ischämiedauer 120 min)

3.3.1. Hämodynamische Parameter

Das Herzzeitvolumen variierte zwischen 138 ± 12 ml/min (Ausgangsmessung) und 88 ± 10 ml/min (letzte Messung) (Abbildung 23). Nach Entfernen der Blutsperre zeigte sich ein signifikanter Rückgang des Herzzeitvolumens von 138 ± 12 ml/min auf 120 ± 6 ml/min ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test). Im weiteren Verlauf fielen die Werte leicht ab, die Unterschiede waren aber nicht signifikant (Tabelle 7).

Die Herzfrequenz betrug während der Ischämie 181 ± 11 Schläge/min und nach Lösen der Blutsperre 176 ± 6 Schläge/min. Im weiteren Verlauf fiel die Herzfrequenz auf 153 ± 6 Schläge/min ab ($p < 0,05$ Friedman-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test) (Tabelle 7). Die MS-Injektion führte zu keiner direkten Änderung der Herzfrequenz ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test).

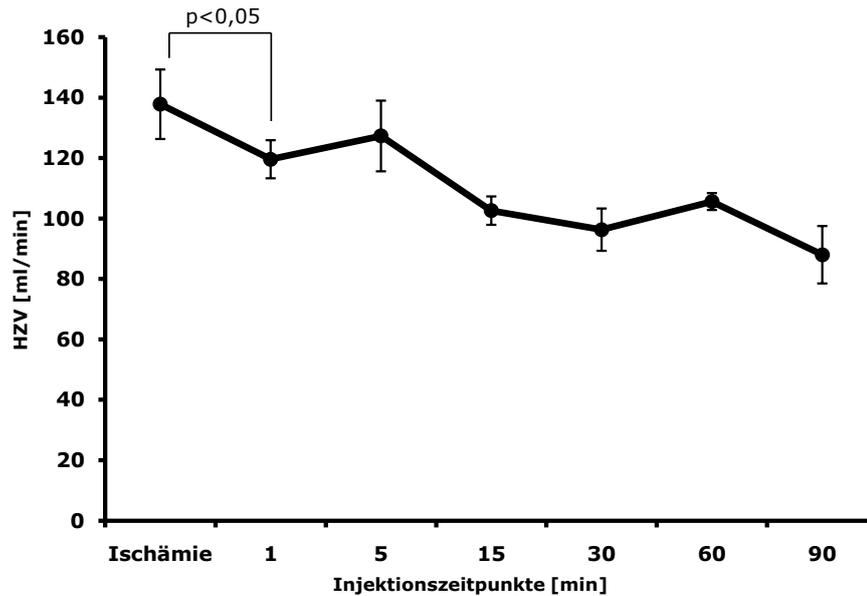


Abbildung 23: Herzzeitvolumen in ml/min zu den jeweiligen Messzeitpunkten (Mittelwert \pm SEM, n=7). Nach Eröffnen der Blutsperrre kam es zu einem signifikanten Rückgang des HZV ($p < 0,05$).

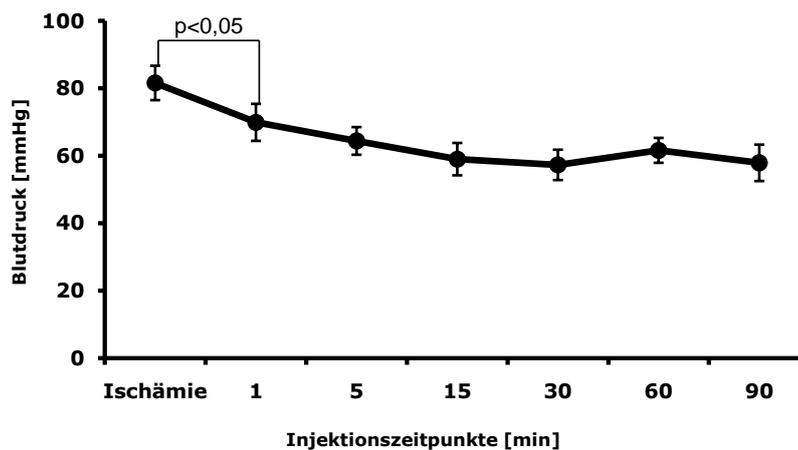


Abbildung 24: MAD in mmHg zu den jeweiligen Messzeitpunkten (Mittelwert \pm SEM, n=7). Nach Entfernung der Blutdruckmanschette zeigte sich ein signifikanter Blutdruckabfall ($p < 0,05$).

Der MAD lag während der Ischämie bei 82 ± 5 mmHg. 1 min nach Entfernen der Blutsperrre fiel der Blutdruck signifikant auf 70 ± 6 mmHg ab und dann nach 5 min auf 64 ± 4 mmHg ($p < 0,05$ im Friedman-Test, Nachfolgetest nach Wilcoxon). Im weiteren Verlauf blieb der MAD bei etwa 60 mmHg konstant (Abbildung 24, Tabelle 7). Die Injektion der MS führte zu keinem Blutdruckabfall ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test), er betrug vor der Injektion durchschnittlich 65 mmHg und nach der Injektion 63 mmHg.

Die gemessenen O₂- und CO₂-Partialdrücke blieben während der Versuchsdauer konstant (p>0,05 im Friedman-Test) (Tabelle 7).

3.3.2. Probengewichte

Die Gewebeprobe von linker und rechter Seite waren in der zweiten Versuchsreihe gleich schwer (Tabelle 8).

3.3.3. Nierendurchblutung

Die Nierendurchblutung betrug während der ersten Messung 231 ± 27 ml/min/100g und sank nach Eröffnen der Blutsperre signifikant bis auf 164 ± 18 ml/min/100g (15 min) ab. Der Blutfluss blieb danach zunächst konstant und fiel nach 90 min erneut signifikant auf 120 ± 5 ml/min/100g ab (p<0,05; Friedmann-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test). Zu keinem Messzeitpunkt bestand ein Unterschied im Seitenvergleich (Tabelle 9, Abbildung 25).

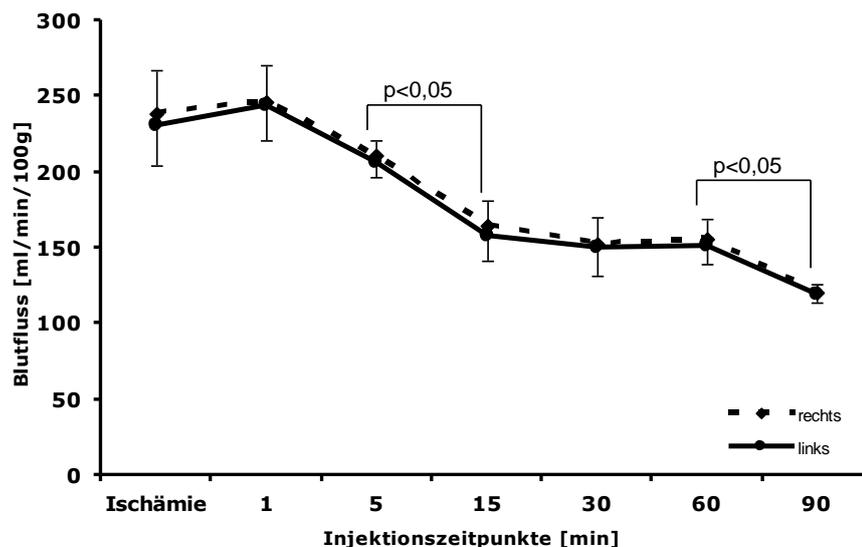


Abbildung 25: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert ± SEM, n=7) in beiden Nieren zu den jeweiligen Messzeitpunkten (durchgezogene Linie: links; gestrichelte Linie: rechts). Nach Eröffnen der Blutsperre kam es zu einem signifikanten Abfall der Nierendurchblutung (p<0,05). Es bestand kein Unterschied im Seitenvergleich.

3.3.4. Knochendurchblutung

3.3.4.1. Blutfluss in Femur, Tibia und Talus

Der Blutfluss im rechten Femur (Kontrollseite) schwankte zwischen $8,6 \pm 0,7$ ml/min/100g und $11,7 \pm 1,1$ ml/min/100g. Auf der linken Seite (mit Blutsperre) lag der Blutfluss zwischen $8,9 \pm 0,7$ ml/min/100g und $10,2 \pm 0,9$ ml/min/100g. Im Seitenvergleich unterschieden sich die

Messungen während der Ischämie und nach 30 min signifikant voneinander ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test) (Tabelle 9, Abbildung 26).

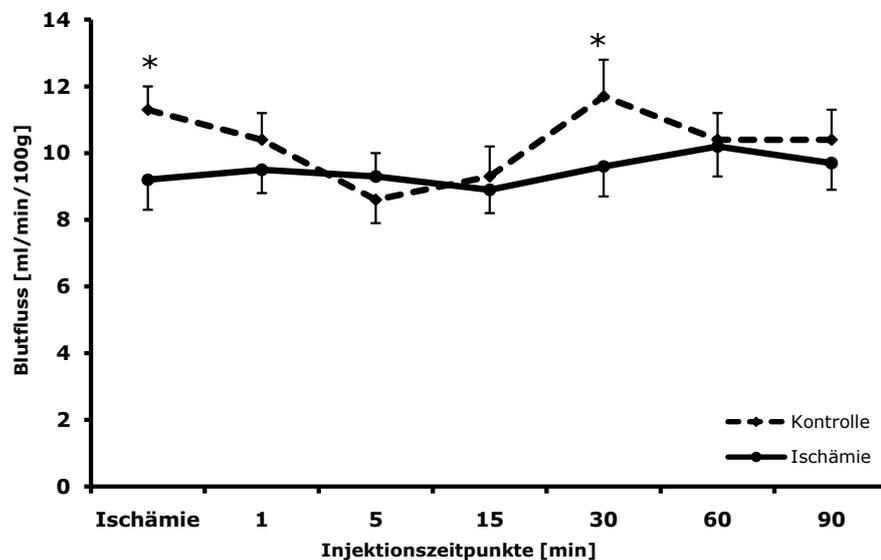


Abbildung 26: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, $n=7$) des Femurs (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Im Seitenvergleich waren die Werte während der Ischämie und nach 30 min signifikant verschieden (*).

In der rechten Tibia (Kontrollseite) betrug der RKBF bei der ersten Messung $7,8 \pm 0,8$ ml/min/100g. Sofort nach Abnahme der Blutsperrung kam es zu einem signifikanten Rückgang des Blutflusses auf $5,9 \pm 0,8$ ml/min/100g ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest nach Wilcoxon). Im weiteren Verlauf blieb die Durchblutung konstant und betrug ca. 6 ml/min/100g. Auf der linken Seite betrug der Blutfluss während der Ischämie $0,1 \pm 0,1$ ml/min/100g. Eine Minute nach dem Entfernen der Blutsperrung kam es zu einem deutlichen Blutflussanstieg auf $7,3 \pm 0,8$ ml/min/100g ($p < 0,05$, Friedman-Test, Nachfolgetest nach Wilcoxon). Die weiteren Werte waren zu allen Messzeitpunkten höher als auf der Kontrollseite. Der Unterschied war nach 15 min, 30 min und 60 min signifikant (Tabelle 9, Abbildung 27).

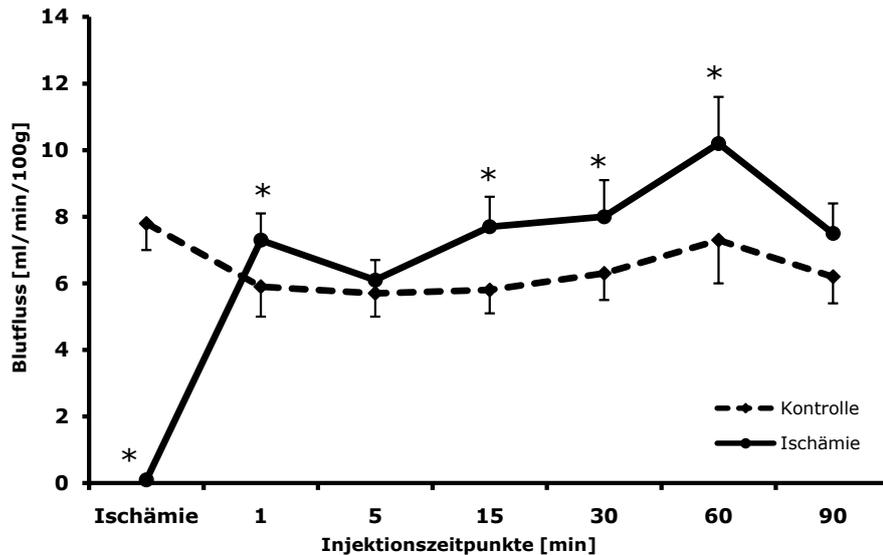


Abbildung 27: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=7) der Tibia (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Nach Entfernen der Blutsperre zeigte sich ein Anstieg des Blutflusses. Sämtliche Blutflusswerte waren höher als auf der Kontrollseite. Die mit * markierten Werte waren im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

Die Durchblutung im rechten Talus (Kontrollseite) betrug zu Versuchsbeginn $2,5 \pm 0,5$ ml/min/100g und stieg bis zum Ende des Versuchs langsam auf $4,6 \pm 1,3$ ml/min/100g an. Der Unterschied zwischen den Messungen war nicht signifikant ($p > 0,05$ im Friedman-Test).

Auf der Ischämiesseite lag der Blutfluss bei angelegter Blutsperre nur bei $0,6 \pm 0,5$ ml/min/100g. Nach Entfernen der Blutsperre stieg der Blutfluss in den ersten 5 min signifikant auf $5,8 \pm 1,7$ ml/min/100g an ($p < 0,05$, Friedman-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test) und lag um $2,5$ ml/min/100g höher als rechts. Danach sank der Blutfluss wieder auf $3,4 \pm 0,6$ ml/min/100g ab, lag aber weiterhin über der Kontrollseite ($2,8 \pm 0,4$ ml/min/100g). Im Verlauf zeigte sich ein langsamer Blutflussanstieg bis auf $5,9 \pm 1,3$ ml/min/100g nach 90 min. Die Blutflusswerte nach 30 min und 60 min waren signifikant höher als auf der Kontrollseite ($p < 0,05$ im Wilcoxon-Test) (Tabelle 9, Abbildung 28).

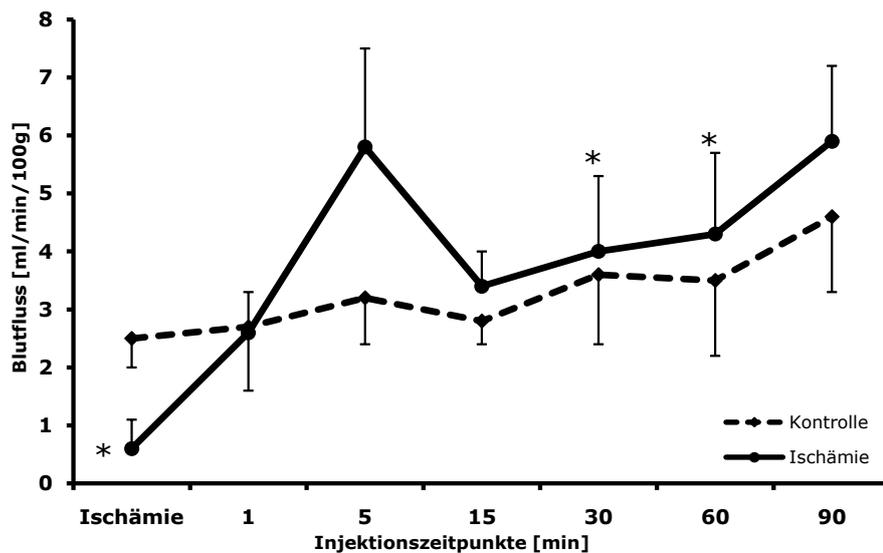


Abbildung 28: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=7) des Talus (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Nach dem Entfernen der Blutsperre kam es zu einem deutlichen Blutflussanstieg. Bis zum Versuchsende lag die Durchblutung auf der Ischämieseite höher als auf der Gegenseite. Die mit * markierten Werte waren im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

3.3.4.2. Regionaler Blutfluss im Femur

Proximal der angelegten Blutsperre war die Durchblutung in den einzelnen Knochenregionen des Femurs links und rechts nahezu gleich. Nur im Collum femoris wurde nach 60 min rechts ein statistisch höherer Wert als links gemessen ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test). Die Durchblutung blieb im Versuchsverlauf nahezu konstant, der beobachtete leichte Blutflussrückgang nach Entfernen der Blutsperre innerhalb der ersten 5 min war statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; Friedman-Test). Distal der Femurdiaphyse sank der Blutfluss durch die Blutsperre ab und lag in der distalen Metaphyse und im medialen Condylus signifikant unter dem Blutfluss auf der Kontrollseite ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test). Nach Entfernen der Blutsperre zeigte sich in der distalen Metaphyse und in beiden Femurcondylen ein sofortiger nicht signifikanter Blutflussanstieg ($p > 0,05$; Friedman-Test). In den Femurcondylen waren die Werte in den ersten 5 min höher als auf der Kontrollseite, der Unterschied war aber statistisch nicht signifikant ($p > 0,05$; Wilcoxon-Test). Danach blieb die Durchblutung auf beiden Seiten bis zum Versuchsende wieder annähernd gleich (Tabelle 10, Abbildung 29).

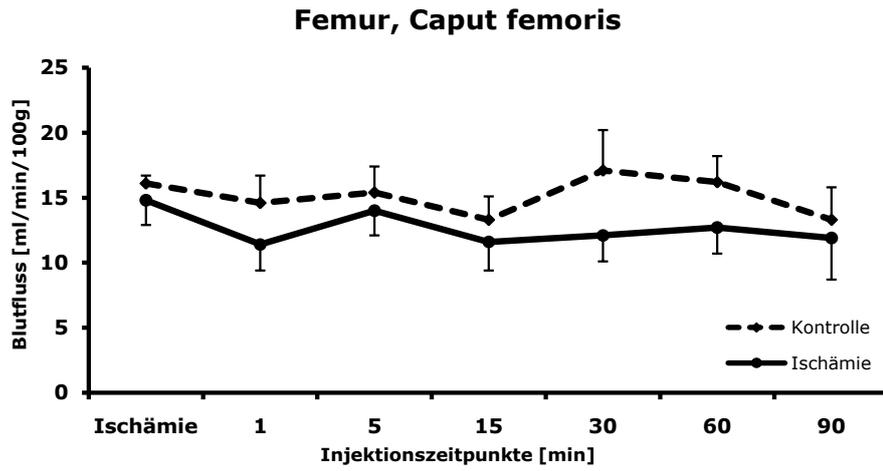


Abbildung 29a

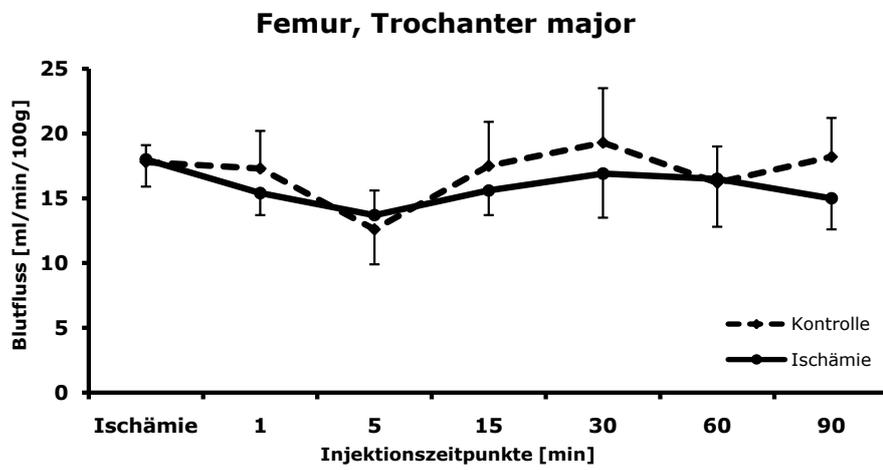


Abbildung 29b

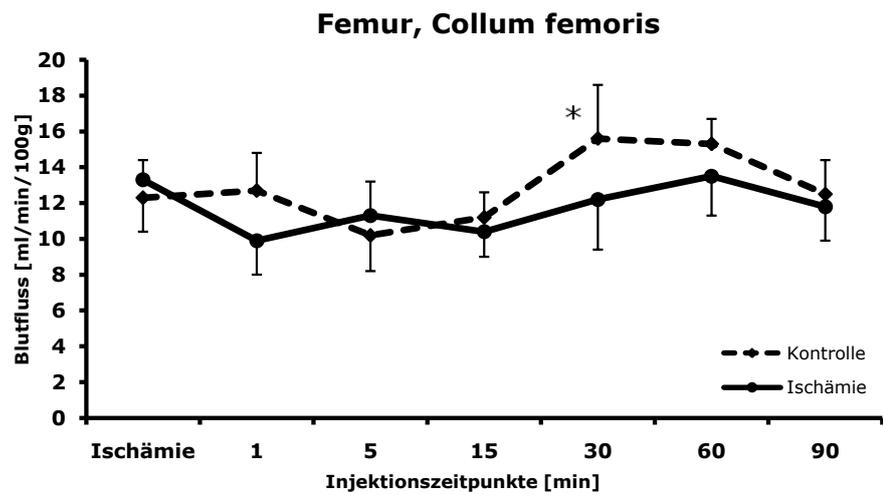


Abbildung 29c

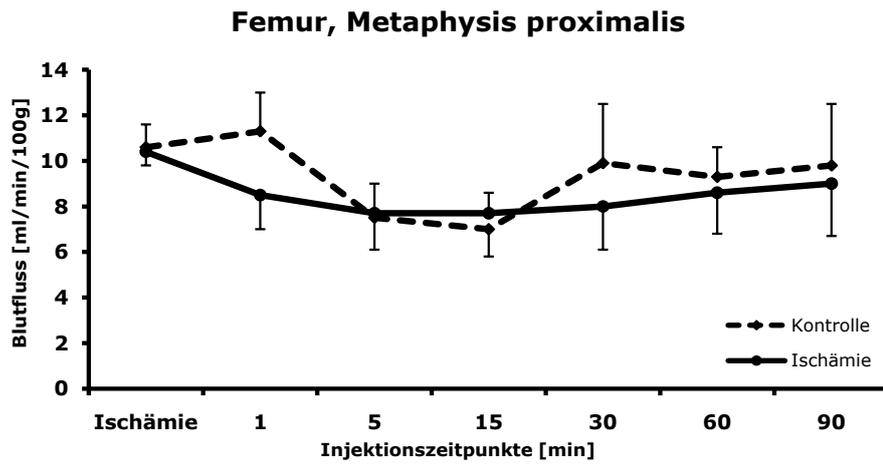


Abbildung 29d

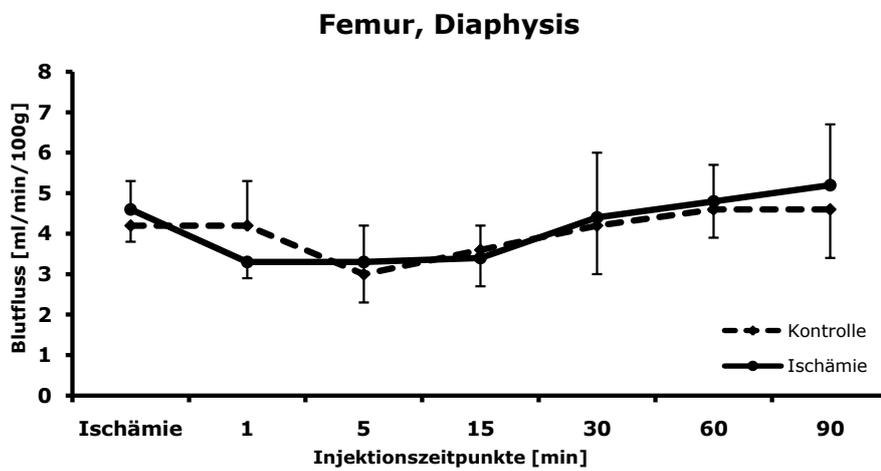


Abbildung 29e

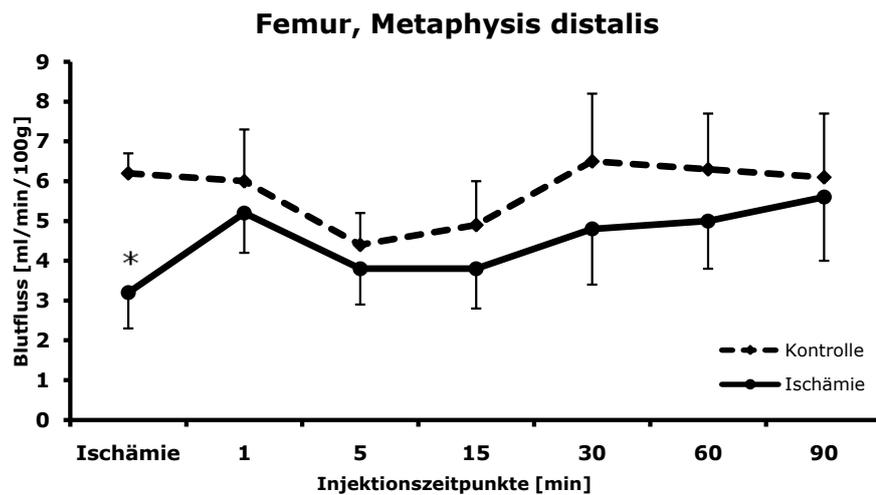


Abbildung 29f

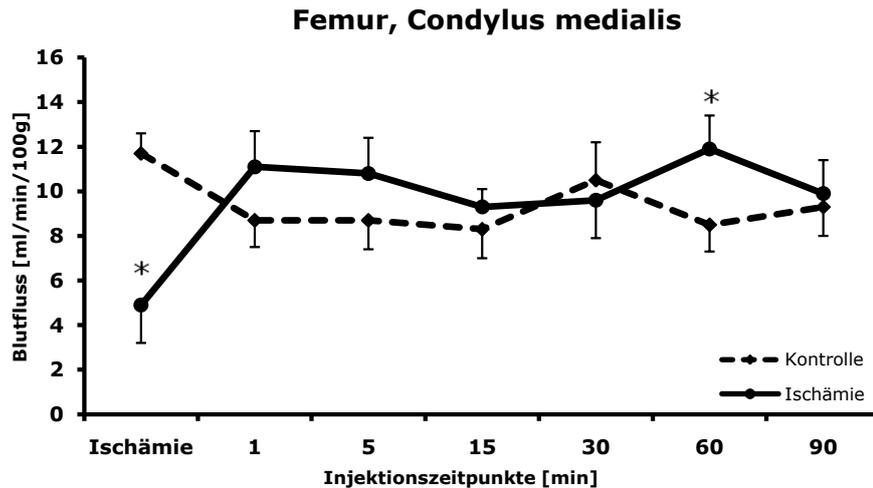


Abbildung 29g

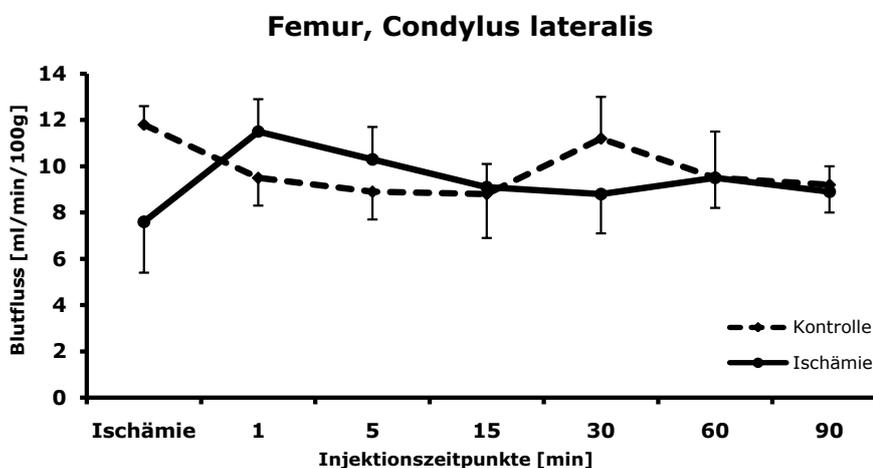


Abbildung 29h

Abbildung 29: RKBF in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=7) in den einzelnen Regionen des Femurs (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Proximal der Blutsperre war die Durchblutung weitgehend konstant (Abbildung 29a-e). Nach Entfernen der Blutsperre zeigte sich in der distalen Metaphyse und in den Femurcondylen ein Blutflussanstieg (Abbildung 29f-h). In den Femurcondylen lag der Blutfluss höher als auf der Kontrollseite. Die mit * markierten Werte waren im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

- Abbildung a: Durchblutung im Caput femoris
- Abbildung b: Durchblutung im Trochanter major
- Abbildung c: Durchblutung im Collum femoris
- Abbildung d: Durchblutung in der Metaphysis proximalis
- Abbildung e: Durchblutung in der Diaphyse
- Abbildung f: Durchblutung in der Metaphysis distalis
- Abbildung g: Durchblutung im Condylus medialis
- Abbildung e: Durchblutung im Condylus lateralis

3.3.4.3. Regionaler Blutfluss in der Tibia

Die Durchblutung der einzelnen Knochenregionen auf der Kontrollseite blieb weitgehend konstant. Nur in der Diaphyse zeigte sich nach Entfernen der Blutsperre eine kurzfristige Durchblutungssenkung von ca. 3 ml/min/100g auf 2 ml/min/100g innerhalb der ersten 5 min ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest nach Wilcoxon). Auf der linken Seite lag der Blutfluss während der Ischämie nahe bei null. Nach Entfernen der Blutsperre trat in allen Regionen ein sofortiger signifikanter Blutflussanstieg auf ($p < 0,05$, Friedman-Test, Nachfolgetest Wilcoxon-Test). Die höchsten Blutflusswerte wurden erst nach 30 bis 60 min gemessen und die Durchblutung war in sämtlichen Regionen höher als auf der Kontrollseite. Eine Mehrdurchblutung auf fast das Doppelte war in der distalen Diaphyse (links: $4,4 \pm 2,1$ ml/min/100g; rechts: $2,3 \pm 0,2$ ml/min/100g) und in der Epiphyse (links: $12,9 \pm 6,8$ ml/min/100g; rechts: $6,5 \pm 1,7$ ml/min/100g) zu verzeichnen. In den anderen Regionen stieg der Blutfluss auf über die Hälfte an, ein statistisch signifikanter Unterschied ergab sich jedoch nur in der Metaphysis proximalis (links: $8,9 \pm 1,7$ ml/min/100g; rechts: $5,1 \pm 1,0$ ml/min/100g) und in der Epiphyse ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test). Am Versuchsende zeigte sich ein Rückgang der Durchblutung in allen Abschnitten, im Condylus medialis und in der proximalen Metaphyse war der Blutflussrückgang signifikant ($p < 0,05$; Friedman-Test, Nachfolgetest nach Wilcoxon). Nach 90 min war die Durchblutung nur noch in der Epiphyse auf der Ischämieseite mit $11,6 \pm 3,4$ ml/min/100g deutlich höher als auf der Kontrollseite mit $5,5 \pm 1,4$ ml/min/100g. In den anderen Knochenabschnitten waren die Blutflüsse links und rechts wieder fast gleich hoch (Tabelle 11, Abbildung 30).

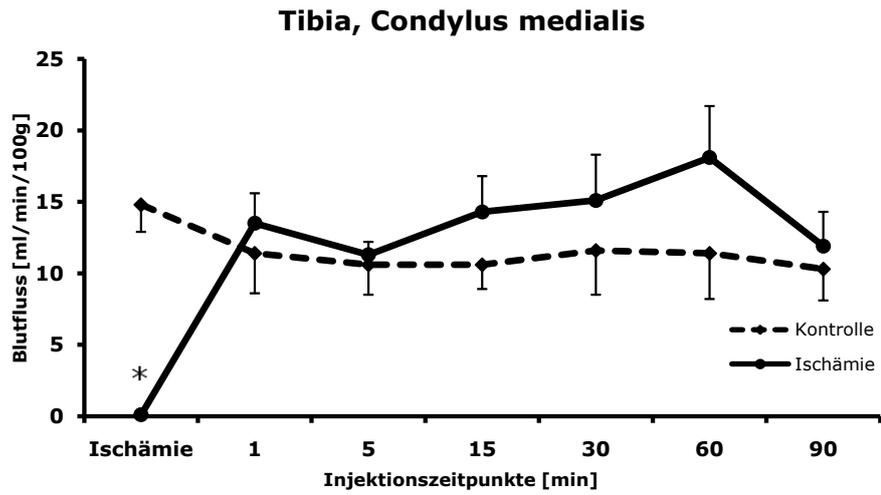


Abbildung 30a

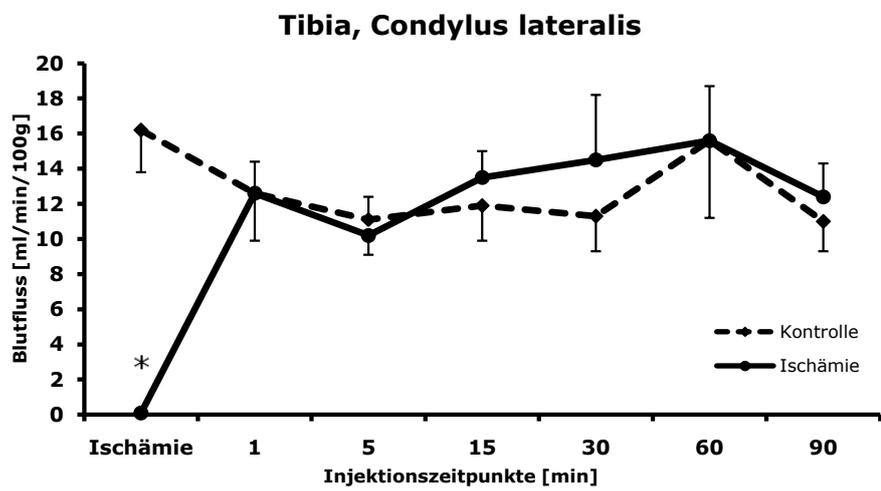


Abbildung 30b

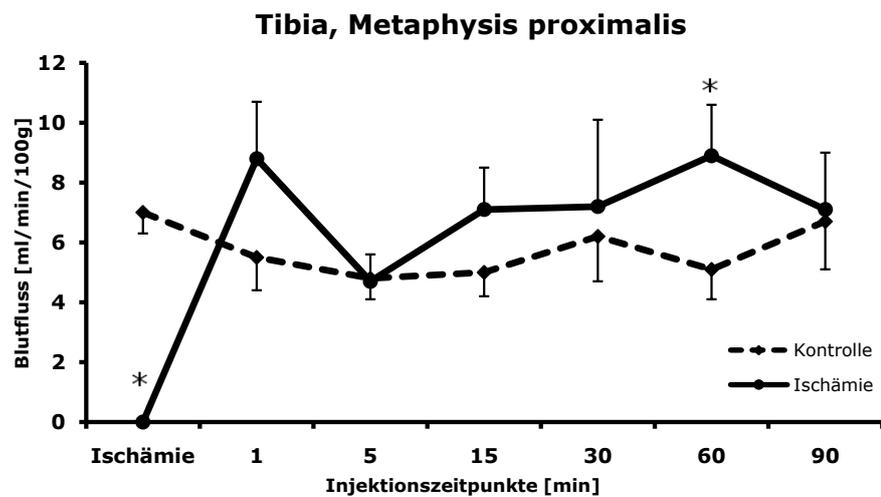


Abbildung 30c

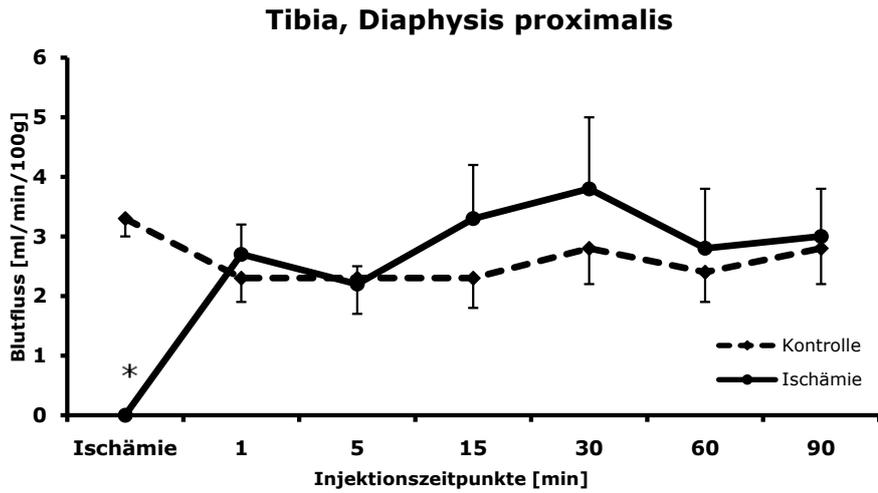


Abbildung 30d

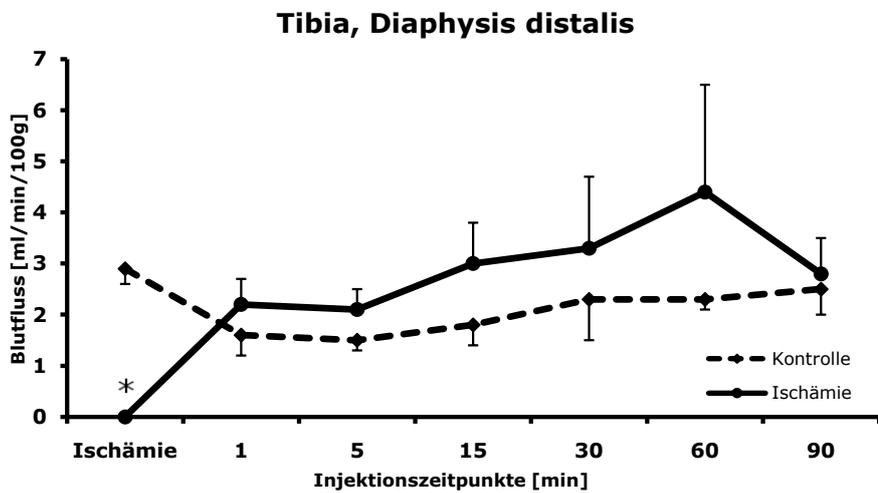


Abbildung 30e

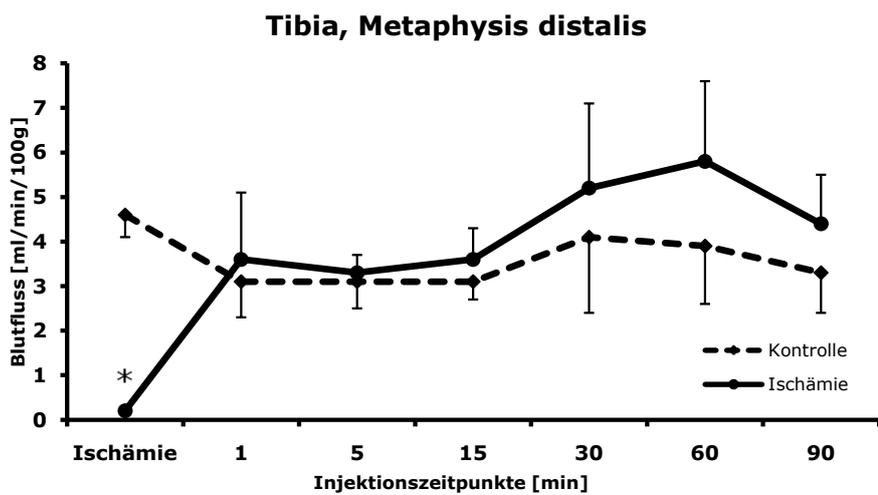


Abbildung 30f

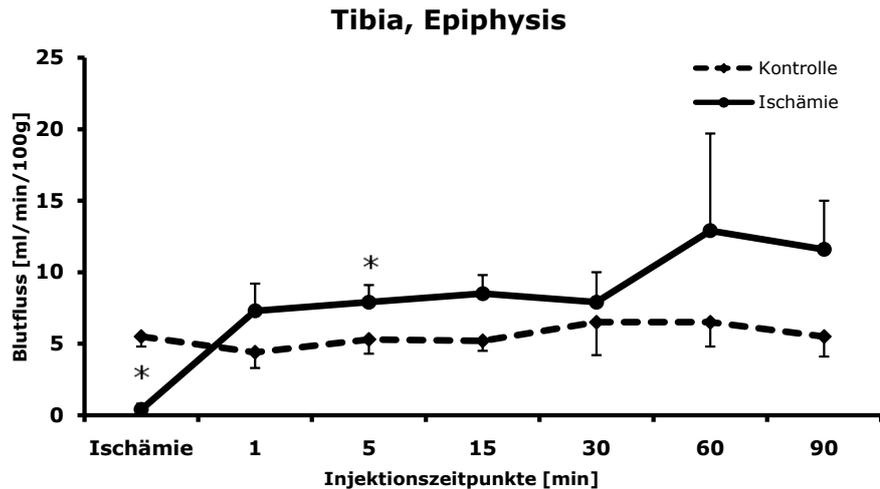


Abbildung 30g

Abbildung 30: RKBF in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=7) in den einzelnen Regionen der Tibia (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Nach Lösen der Blutsperre kam es in allen Knochenregionen auf der Ischämieseite zu einer deutlichen Hyperperfusion. Nach 30 min bis 60 min war die Durchblutung am höchsten. Im Vergleich zur Kontrollseite war der Unterschied in der Diaphysis distalis (Abb. 30e) und in der Epiphyse (Abb. 30g) am größten. Die mit * markierten Werte waren im Seitenvergleich signifikant verschieden ($p < 0,05$).

Abbildung a: Durchblutung im Condylus medialis

Abbildung b: Durchblutung im Condylus lateralis

Abbildung c: Durchblutung in der Metaphysis proximalis

Abbildung d: Durchblutung in der Diaphysis proximalis

Abbildung e: Durchblutung in der Diaphysis distalis

Abbildung f: Durchblutung in der Metaphysis distalis

Abbildung g: Durchblutung in der Epiphyse

3.3.5. Muskeldurchblutung

Die Durchblutung in den Muskeln der Kontrollseite war während der Versuchsdauer konstant ($p > 0,05$; Friedman-Test) und lag im rechten M. gastrocnemius (Kontrollseite) zwischen $6,2 \pm 0,8$ und $8,8 \pm 1,3$ ml/min/100g, im M. tibialis anterior zwischen $7,4 \pm 1,4$ und $11,7 \pm 2,3$ ml/min/100g (Tabelle 12). Der Blutfluss im M. tibialis anterior war signifikant höher als im M. gastrocnemius ($p < 0,05$ im Mann-Whitney-U-Test). Während der Ischämie lag der Blutfluss im linken M. gastrocnemius bei $1,4 \pm 0,9$ ml/min/100g, im linken M. tibialis anterior bei $0,9 \pm 0,7$ ml/min/100g. Eine Minute nach Eröffnen der Blutsperre stieg der Blutfluss im M. gastrocnemius auf $54,5 \pm 8,1$ ml/min/100g und nach 5 min auf $55,7 \pm 5,8$ ml/min/100g was einem Anstieg auf das 6-fache der normalen Durchblutung bedeutete. Anschließend kam es zu einem kontinuierlichen Abfall der Durchblutung und erst 90 min

nach Eröffnen der Blutsperre waren die Ausgangswerte in etwa erreicht (Abbildung 31).

Ein ähnlicher Kurvenverlauf zeigte sich im M. tibialis anterior (Abbildung 32). Nach Eröffnen der Blutsperre kam es innerhalb von 5 min zu einem raschen Anstieg der Durchblutung auf das 4-fache des Ausgangswertes (bis $44,1 \pm 6,4$ ml/min/100g). Anschließend fiel die Durchblutung kontinuierlich ab, war aber mit $16,5 \pm 2,9$ ml/min/100g auch nach 90 min noch signifikant höher als auf der Gegenseite ($7,4 \pm 1,4$ ml/min/100g) ($p < 0,05$; Wilcoxon-Test).

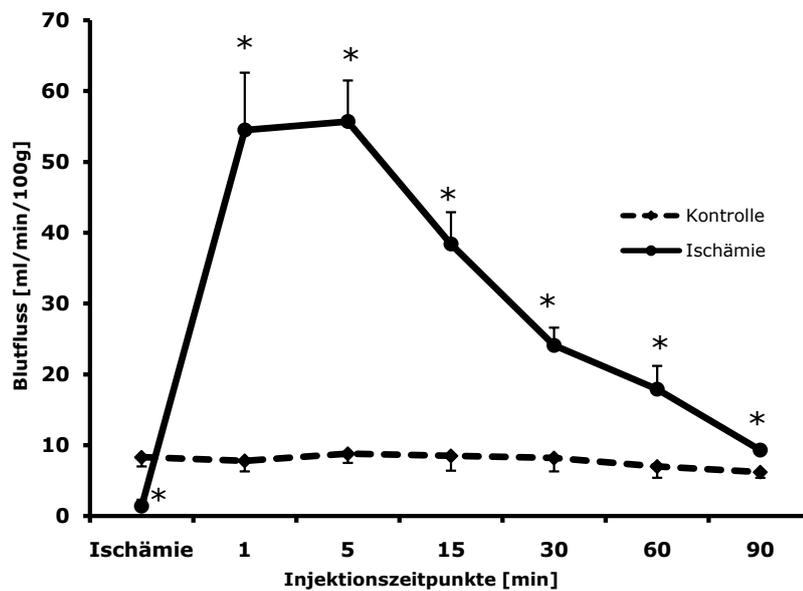


Abbildung 31: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, $n=7$) im M. gastrocnemius (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Sämtliche Blutflusswerte lagen nach Wiederherstellung der Durchblutung signifikant (*) über den Werten der Kontrollseite ($p < 0,05$).

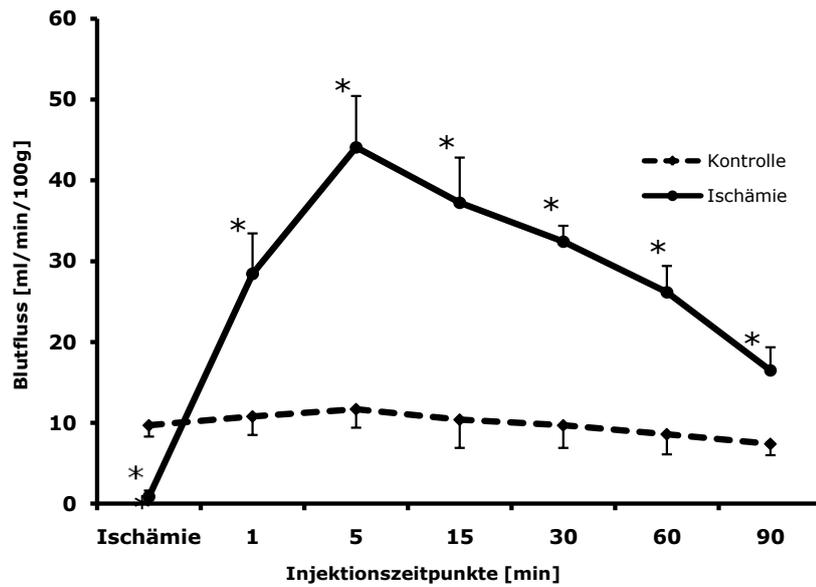


Abbildung 32: Durchblutung in ml/min/100g (Mittelwert \pm SEM, n=7) im M. tibialis anterior (durchgezogene Linie: Ischämie; gestrichelte Linie: Kontrolle). Sämtliche Blutflusswerte lagen nach Wiederherstellung der Durchblutung signifikant (*) über den Werten der Kontrollseite ($p < 0,05$).

4. Diskussion

4.1. Einleitung

Während vieler Gelenk- und Knochenoperationen wird wegen der besseren Übersicht und des geringeren Blutverlustes eine pneumatische Manschette angelegt (Babuccu et al., 2004). Schwierige Eingriffe dauern oft mehrere Stunden und überschreiten nicht selten die tolerierbare Ischämiezeit des Gewebes (Flatt, 1972; Egkher et al., 1986). Für die Muskulatur beträgt die maximal tolerierbare Ischämiezeit 4 Stunden. Danach treten irreversible und ausgedehnte Muskelschäden auf. Nervengewebe hingegen toleriert bis zu 8 Stunden Ischämiezeit, Fettgewebe 13 Stunden, Haut 24 Stunden und Knochen sogar 4 Tage (Blaisdell, 2002).

Aber auch schon kürzere Ischämiezeiten haben vaskuläre, strukturelle und entzündliche Schäden zur Folge (Blaisdell, 2002). Diese werden als Post-Ischämie- oder Post-Tourniquet- oder als Reperfusionssyndrom bezeichnet. In Folge einer ischämiebedingten Zellschwellung und Auflösung der Tight junctions kommt es zu einer Kontinuitätsunterbrechung der vaskulären Endothelzellen. Die Unterbrechung der Gefäßwände ermöglicht einen Austritt der Flüssigkeit in den Extravasalraum und es entstehen Ödeme. Die Flussgeschwindigkeit der Blutzellen in den Gefäßen nimmt ab und die roten Blutkörperchen verklumpen. Durch den Endothelschaden und die Blutstromverlangsamung werden auch Thrombozyten aktiviert. Zusätzlich wirken abgestorbene Zellverbände im Blut als Prokoagulanzen und aktivieren über den Faktor XII das intrinsische Gerinnungssystem. Die aktivierte Gerinnungskaskade lockt Leukozyten an. Die Expression von Adhäsionsmolekülen und eine allgemeine Aktivierung der Endothelzellen führt zu einer Leukozytenanheftung und zu einer Entzündungsreaktion (Guba et al., 2000). In der Folge werden Histamin, Komplementfaktoren, Thromboxan und Bradykinin aktiviert. Diese Mediatoren führen zu einer Permeabilitätserhöhung in den Gefäßwänden und verstärken die Flüssigkeitsverschiebung in den Extravasalraum. Die Mikrozirkulation wird noch stärker beeinträchtigt. Dieser Pathomechanismus führt zu den typischen postoperativen Komplikationen des Reperfusionssyndroms. Diese sind Ödembildung, Schmerz, verzögerter Heilungsprozess bis hin zu Gewebsnekrosen (Mars & Gregory, 1991; Harris et al., 1997; Cowled et al., 2001; Wakai et al., 2001a). Im Rahmen des Reperfusionssyndroms kann es auch zu systemischen Schäden und sogar zu Todesfällen kommen (Haimovici, 1960).

Das Ausmaß der Schäden hängt von der Dauer der unterbrochenen Blutzufuhr ab. Je länger

die Ischämie dauert, desto größer sind die lokalen und systemischen Schäden. Während die Auswirkung der Ischämiedauer auf Muskel- und Nervengewebe gut untersucht sind (Gonchar & Mel'man, 1989; Xing et al., 1997; Kokki et al., 1998), gibt es nur wenige Arbeiten, die sich mit den Folgen für das Knochengewebe beschäftigen.

Obwohl die tolerierbare Ischämiezeit beim Knochen sehr lang ist, werden auch hier postischämische Schäden vermutet. Zum Beispiel wird diskutiert ob das Auftreten von Osteonekrosen bei Kniegelenksarthroskopien oder die Entstehung von Pseudarthrosen nach operativer Frakturversorgung auf die Blutsperrung zurückzuführen sind (Zippel et al., 1981). Interessant ist in diesem Zusammenhang die frühe Reperfusionphase nach Ischämie. Da es keine Untersuchungen hierzu gibt war es Ziel der vorliegenden Arbeit, die Durchblutung während der frühen Reperfusionphase im Knochen- und Muskelgewebe nach definierten Ischämiezeiten zu untersuchen. Die Ergebnisse sollen die Kenntnisse der Pathophysiologie des postischämischen Schadens erweitern.

4.2. Methodendiskussion

Als Versuchstiere wählten wir Kaninchen, da die meisten Knochenblutflussmessungen am Kaninchen durchgeführt wurden (Gregg et al. 1980; Burton et al., 1988, Iversen & Nicolaysen 1989; Nolte et al., 1999; Hsieh et al., 2001; Schimmel et al., 2000, 2001; Shymkiw et al., 2001; Thein et al., 2002; Anetzberger et al. 2003a,b; 2004 a,b). Dadurch lassen sich die Ergebnisse gut mit den vorhandenen Ergebnissen vergleichen und durch die ausgiebigen Erfahrungen können die methodischen Fehler minimiert werden. Um geschlechts- und altersspezifische Unterschiede auszuschließen, wurden nur weibliche, erwachsene Zuchtkaninchen verwendet. Der Verschluss der Epiphysenfugen wurde während der Knochenverarbeitung überprüft. Die Narkose wurde mit Ketamin/Xylazinhydrochlorid durchgeführt. Eine Beeinflussung des regionalen Knochenblutflusses durch eine narkosebedingte Vasodilatation, wie sie bei der Verwendung von Barbituraten oder Halothan beschrieben wurde (Davis et al., 1990; Jones et al., 1982) ist dadurch unwahrscheinlich (Anetzberger et al., 2003b).

Da die meisten operativen Eingriffe ein bis zwei Stunden dauern, wählten wir auch in unseren Versuchen eine Ischämiezeit von 60 und 120 min. Wie in der klinischen Routine wurde auch in unseren Versuchen eine pneumatische Blutsperrung angewendet. Der Blutfluss im Muskel und im Knochen war während der Ischämie nahe bei null.

Da bereits Reperfusionsschäden unmittelbar nach Wiederherstellen der Durchblutung

eintreten (Schmidt & Lang, 2007) haben wir die Dynamik der Reperfusion bis zu 90 min nach Entfernen der Blutsperre erfasst.

Zur Messung des regionalen Blutflusses in den verschiedenen Organen wurden fluoreszierende Mikrosphären (MS) verwendet. Es handelt sich hierbei um gleichförmige, aus Polystyrol (Styropor) hergestellte Trägersubstanzen. Diese können mit unterschiedlichen Farbstoffen beladen werden. Jede verwendete Farbe besitzt ein charakteristisches Excitations- und Emissionsspektrum und kann dadurch mittels Fluoreszenzspektrophotometrie genau identifiziert werden. Da jede einzelne Mikrosphäre einer Herstellungsreihe die gleiche Menge Farbstoff enthält, kann über die Messung der Farbintensität die exakte Anzahl der Mikrosphären in einer Probe bestimmt werden.

Um mögliche Fehler der MS-Methode zu vermeiden, müssen die Versuche genau geplant und durchgeführt werden. Valide Messungen setzen eine gleichmäßige Verteilung der MS im zirkulierenden Blut voraus. Um dies zu garantieren, wurden die MS erst nach vorheriger Durchmischung im Ultraschallbad und im Vortex aus der Stammlösung entnommen. Über einen arteriellen Katheter wurden sie dann direkt in den linken Ventrikel injiziert, da hier durch die turbulente Strömung die homogene Durchmischung der MS im Blut gewährleistet ist (Buckberg et al., 1971; Buckberg, 1975; Kobrin et al., 1984). Eine sehr gute Kontrolle für die homogene Durchmischung der MS liefert die seitengleiche Organdurchblutung (Bhattacharya & Beilin L.J., 1980). In unseren beiden Versuchsreihen war die Durchblutung der linken und rechten Niere gleich, was einen adäquaten Versuchsaufbau unterstreicht.

Mit dem Blutstrom werden die MS dann in die Peripherie transportiert und bleiben im Kapillarbett hängen. Hier ist entscheidend, dass keine Mikrosphären in den Kreislauf rezirkulieren. Die Shuntrate am Knochen beträgt bei Verwendung von Sphären mit 15 µm Durchmesser 1-4 % (Gross et al., 1981; Hansen et al., 1991; McGrory et al., 1994). Weiterhin müssen für eine valide Messung genügend viele Sphären enthalten sein. Buckberg et al. (1971) gaben eine Zahl von 384 MS pro Gewebeprobe an. Mehrere Versuchsgruppen erzielten jedoch auch schon mit deutlich weniger MS in der Probe valide Ergebnisse. In den Untersuchungen von Anetzberger et al. (2003a) betrug der methodische Fehler in Knochenproben, die zwischen 150 und 250 Sphären enthielten, für ein 95% Konfidenzintervall weniger als 10%. Diese Arbeitsgruppe konnte zeigen, dass durch Injektion von 1 Million MS pro kg Körpergewicht eine ausreichend hohe Anzahl MS in den Knochenproben erzielt werden kann. Die Injektion einer hohen Anzahl MS könnte bei mehrmaligen Injektionen zu einer Beeinträchtigung der Hämodynamik führen. Mehrere

Autoren konnten dies jedoch auch bei einer Zahl von 21 Millionen injizierter MS ausschließen (Buckberg et al., 1971; Baer et al., 1984; von Ritter et al., 1988; Anetzberger et al., 2004b). Die Tatsache, dass in unseren Versuchen Herzfrequenz und Blutdruck vor und nach Injektion jeweils konstant waren, unterstützt diese Ergebnisse. Die wiederholte Referenzblutentnahme wurde durch die Infusion von kristalloiden und kolloidalen Lösungen ausgeglichen. Hierdurch blieb der Blutdruck stabil, es kam jedoch zu einem Hämoglobinabfall um 43% in der ersten und 35% in der zweiten Versuchsreihe.

Nach Beendigung der Versuche wurden die Knochen entnommen und sorgfältig von Bindegewebe und Sehnenansätzen befreit. Da einzelne Knochenregionen einen unterschiedlichen Blutfluss aufweisen, wurde das Dissektionsschema von Anetzberger et al. (2003b) unter Beachtung der anatomischen Regionen und der Gefäßversorgung der Knochen streng eingehalten. Um Fehler durch unterschiedliche Probengröße zu kontrollieren, wurde ein Gewichtsvergleich durchgeführt. Das Gewicht aller rechten und linken Knochenregionen war gleich, wodurch ein systemischer Fehler durch unterschiedliche Probengröße unwahrscheinlich ist.

Zur Rückgewinnung der MS aus den Knochenproben mussten diese entkalkt werden. Hierfür wurden sie in Salzsäure eingelegt. Anetzberger et al. (2003b) konnten einen Einfluss der Säure auf die Fluoreszenzintensitäten in den Proben experimentell ausschließen.

Zur Bestimmung der Fluoreszenzintensitäten wurde im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München ein automatisiertes Filtrationssystem (Sample-Processing-Unit = SPU) entwickelt (Raab et al., 1999; Thein et al., 2000). Damit lässt sich die Intensität in der untersuchten Probe exakt bestimmen und die Mikrosphärenzahl errechnen. Durch die Verwendung von SPU und die automatisierte Probenverarbeitung ist der methodische Fehler gering. Er beträgt für den Versuchsaufbau, der dem von Anetzberger et al. (2003b) entspricht, etwa 7,5%.

4.3. Systemische Auswirkungen der Blutsperr

Es ist bekannt, dass die Verwendung einer Blutsperr zu hämodynamischen Auswirkungen führen kann. In einer klinischen Studie mit 600 Patienten, die an der unteren Extremität mit Blutsperr operiert wurden, beobachteten Kaufman und Walts (1982) in 11 % der Fälle einen Anstieg der Blutdruckwerte im Durchschnitt um 30% nach Anlage der Blutsperr. Der Blutdruckanstieg entwickelte sich langsam und war nach einer Stunde am höchsten. Betroffen waren allerdings hauptsächlich ältere Patienten mit kardiovaskulären Risikofaktoren,

wohingegen Gesunde kaum Veränderungen des Blutdrucks zeigten. Die Herzfrequenz dieser Patienten blieb auch nach Anlage der Blutsperre konstant. Nach Lösen der Blutsperre kam es bei nahezu allen Patienten zu einem raschen Abfall des Blutdrucks um ca. 20 – 30%. Bei kardial vorbelasteten Patienten kann dies zu ernsthaften Komplikationen führen (Valli & Rosenberg, 1985; Kahn et al., 1992; Girardis et al., 2000; Szokoly et al., 2006).

Um die systemischen Auswirkungen der Blutsperre zu beurteilen, dokumentierten wir den mittleren arteriellen Blutdruck (MAP), die Herzfrequenz (HF) und das Herzzeitvolumen (HZV). Zusätzlich wurde die Nierendurchblutung gemessen. Während der Blutsperrendauer von ein und zwei Stunden blieben die gemessenen makrohämodynamischen Parameter konstant. Nach Entfernen der Blutsperre kam es sofort zu einem Abfall des MAP. Er betrug bei einer Ischämiezeit von 60 min 10%, bei einer Ischämiezeit von 120 min sogar 14%. Eine Erklärung hierfür ist, dass es nach Eröffnen der Blutsperre zur Ausschwemmung von Kalium, sauren Stoffwechselprodukten, fibrinolytischen und vasoaktiven Substanzen kommt (Schulte et al., 2006). Dies bewirkt eine systemische Vasodilatation und resultiert in einem Abfall des Blutdruckes. Außerdem führte die Entfernung der Blutsperre in unseren Versuchen zu einer schlagartigen Querschnittsvergrößerung des perfundierten Stromgebietes und zu einer Umverteilung des zirkulierenden Blutvolumens vor allem in die stark hyperperfundierte Muskulatur. Hierdurch kommt es zu einer Senkung des systemischen Blutdruckes. Die Herzfrequenz war in beiden Versuchsreihen auf dem 5% Signifikanzniveau konstant. Auch das HZV blieb in der ersten Versuchsreihe gleich, in der zweiten Versuchsreihe zeigte sich während der Reperfusion ein signifikanter Abfall des HZV um 13%. Veränderungen des Herzzeitvolumens sind im Rahmen des Reperfusionssyndroms bekannt (Schulte et al., 2006). Als Ursache werden kleine Lungenembolien durch eingeschwemmte Zellverbindungen aus der Extremität nach Reperfusion gesehen. Dies führt zu einem ZVD- und MPAP-Anstieg mit konsekutivem HZV-Abfall. In der zweiten Versuchsreihe konnten wir auch ein Absinken der Nierendurchblutung um ca. 90% von 230 ml/min/100g auf 120 ml/min/100g feststellen. Im Rahmen des Reperfusionssyndroms kommt es, ähnlich dem Auftreten eines hypovolämischen Schocks, durch eine Blutumverteilung zu einer Kreislaufzentralisation. Insbesondere die starke Hyperperfusion in der Muskulatur führt zu diesem Effekt. Hinzu kommt, dass aus den Muskelzellen Myoglobin freigesetzt wird. Myoglobin führt zu einer Verlegung der Harnkanälchen, katalysiert die Bildung von Radikalen in den Tubuluszellen und führt durch eine feste Bindung mit dem Vasodilatator Stickoxid (NO) zu einer Verminderung der Nierenperfusion. Im Extremfall führt dies zu einer irreversiblen Schädigung der Nieren, dem

sog. Crush-Syndrom (Martin et al., 1985; Zager, 1989).

Die in unseren Versuchen aufgetretenen systemischen Veränderungen durch den Einsatz einer Blutsperre stimmen mit den Beobachtungen in der Literatur überein. Nach Entfernen der Blutsperre sinken der Blutdruck und das Herzzeitvolumen ab. Die Verlängerung der Ischämiezeit auf 2 Stunden führt zu einer stärkeren Blutdruck- und HZV-Senkung und zusätzlich reduziert sich die Nierendurchblutung.

4.4. Knochendurchblutung

4.4.1. Durchblutung des Röhrenknochens

Auf der Kontrollseite betragen die Blutflüsse im Femur etwa 10 ml/min/100g, in der Tibia 6 ml/min/100g und im Talus 3 ml/min/100g. Die Zahlen stimmen mit den in der Literatur beschriebenen überein (Shim et al., 1967; Schneider et al., 1998; Anetzberger et al., 2003b).

4.4.2. Regionale Knochendurchblutung

Bisherige Studien zeigen, dass die Durchblutung der Röhrenknochen heterogen ist (Shim et al., 1968; Okubo et al., 1979; Bloomfield et al., 2002; Anetzberger et al., 2003b).

Diese regionalen Unterschiede in der Höhe der Durchblutung konnten wir durch unsere Ergebnisse bestätigen. Im Femur betrug der Blutfluss in den proximalen Abschnitten (Caput, Trochanter major, Collum, Metaphysis proximalis) 10 bis 13 ml/min/100g, in der Diaphyse nur 5 bis 6 ml/min/100g, und in der distalen Metaphyse und den Condylen 7 bis 8 ml/min/100g.

In der Tibia war der Blutfluss im Tibiakopf mit bis zu 10 ml/min/100g am höchsten und nahm nach distal ab. In der Metaphyse lag der Blutfluss bei 7 ml/min/100g, in der Diaphyse und Epiphyse der Tibia wurden nur 3 bis 4 ml/min/100g gemessen.

4.5. Knochendurchblutung nach Ischämie

4.5.1. Gesamter Knochen

Es existieren nur wenige Vergleichsstudien, die sich mit der Thematik der Knochendurchblutung nach Ischämie befassen. Hsieh et al. (2001) untersuchten in einer tierexperimentellen Studie den Einfluss der Ischämiedauer auf die Knochendurchblutung. Die Blutsperre wurde am Hinterlauf von Kaninchen für 2 Stunden angebracht und nach Lösen der Blutsperre die Durchblutung mittels Intravitalmikroskopie gemessen. 10 Minuten nach Lösen der Blutsperre war die Durchblutung im Vergleich zur Ausgangsmessung unverändert. 4

Stunden nach Eröffnen der Blutsperrung trat in Folge einer gestörten Endothelfunktion ein Paravasat auf. 14 Stunden nach der Ischämie kam es zu einem no-reflow Phänomen mit einem deutlichen Abfall der Knochendurchblutung. Bei längeren Ischämiezeiten von 4 bzw. 6 Stunden trat das no-reflow Phänomen bereits nach 10 Minuten auf. Die Knochendurchblutung normalisierte sich in allen Versuchen erst wieder nach 2 Wochen. Zusätzlich durchgeführte histologische Untersuchungen zeigten, dass mit zunehmender Ischämiedauer auch die Anzahl der aufgetretenen Osteonekrosen anstieg. Die Autoren schlossen daraus, dass das Ausmaß des Reperfusionsschadens im Knochen von der Ischämiedauer abhängt und nicht nach dem „Alles-oder-Nichts-Prinzip“ abläuft. Da sich das Ausmaß der Schäden nach einer Ischämiedauer von 4 und 6 Stunden glich, vermuteten die Autoren, dass die kritische Ischämiezeit zwischen 2 und 4 Stunden liegt.

Ein Nachteil dieser Studie ist, dass zwischen den Untersuchungszeitpunkten lange Zeitspannen lagen und die frühe Phase der Reperfusion nicht untersucht wurde.

In unserer Arbeit untersuchten wir die Durchblutung unmittelbar nach der Entfernung der Blutsperrung und konnten zeigen, dass die Dynamik der Reperfusion im Knochen und Muskel unterschiedlich ist und von der Dauer der Blutsperrung abhängt.

Nach Entfernen der Blutsperrung kam es im Knochen sofort innerhalb der ersten Minute zu einer Wiederherstellung der Durchblutung mit einer kompensatorischen Hyperperfusion. Da der arterielle Blutdruck nach Eröffnen der Blutsperrung sank, muss die Erhöhung des Blutflusses im Knochen lokal über eine Dilatation der Knochengefäße gesteuert werden. Dies erfolgte wahrscheinlich über Mediatoren, die während der Ischämie im Knochengewebe entstanden. Nach einer Ischämiezeit von einer Stunde führten sie in der Tibia zu einer Blutflusssteigerung um 25% im Vergleich zur Kontrollseite. Nach 5 Minuten war der Blutfluss wieder normal. Die Verlängerung der Ischämiezeit auf 2 Stunden führte zu einer noch stärkeren Hyperämie und sogar zu einer Blutflusserhöhung um 40%. Außerdem verlängerte sich die Dauer der Mehrdurchblutung deutlich auf über 90 Minuten.

Möglicherweise spielt diese Verlängerung der hyperämischen Phase auch eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie des no-reflow Effekts. Im Rahmen des Reperfusionssyndroms kommt es durch strukturelle Veränderungen der Gefäßwände und der Zelle während der Ischämie zu einer vermehrten Durchlässigkeit des Endothels (Cowled et al., 2001; Wakai et al., 2001a). Durch die Hyperperfusion erhöht sich der Kapillardruck im Gewebe und durch

das „löchrige“ Endothel (capillary leak) gelangt mehr Flüssigkeit in das Interstitium. Diese Beobachtung konnte auch in der oben ausführlich dargestellten Studie von Hsieh et al. (2001) gemacht werden. Intravitalmikroskopisch zeigte sich ein zunehmendes Paravasat als Ausdruck einer gestörten Endothelfunktion. Übersteigt der Gewebsdruck den intravasalen Druck, tritt eine zunehmende Behinderung der Perfusion und eine Blutstromverlangsamung auf, ein no-reflow Effekt entsteht.

Da der no-reflow Effekt nach einer Ischämiedauer von 2 Stunden erst nach 14 Stunden auftritt (Hsieh et al., 2001), konnten wir dieses Phänomen in der aktuellen Studie nicht erfassen. Hierzu sind aber, ebenso wie zur Verlängerung der Ischämiezeit, weitere Versuche geplant.

4.5.2. Einzelne Knochenregionen

Osteonekrosen treten typischerweise in bestimmten Knochenregionen auf, so z.B. am medialen Femurcondylus (Morbus Ahlbäck) oder an der medialen Talusschulter (Osteochondrosis dissecans). Ursächlich sollen regionale Durchblutungsstörungen sein (Stiller et al., 1981). Wir konnten in unseren Versuchen in der frühen Reperfusionphase keine regionalen Unterschiede feststellen. Der Verlauf der Reperfusion war in allen Knochenregionen gleich.

4.6. Anwendung fluoreszierender Mikrosphären zur Messung der Muskeldurchblutung

Das Kompartmentsyndrom beschreibt eine Drucksteigerung in der Muskulatur mit Muskelnekrose und kann auch durch eine länger andauernde Ischämie ausgelöst werden (Pschyrembel, 2002). Im Extremfall droht der betroffenen Extremität die Amputation, das durch die Muskelnekrose frei werdende Myoglobin führt häufig zu einer irreversiblen Schädigung der Nieren, der sog. Crush-Niere. Um solchen schwerwiegenden Komplikationen vorzubeugen, ist die Kenntnis der Ischämietoleranz der Muskulatur wichtig.

Es gibt zahlreiche Methoden um die Muskeldurchblutung zu messen. Die großen Muskelgefäße lassen sich gut mittels Duplexsonographie darstellen. Schwieriger ist es aber, die Mikrozirkulation zu messen. Eine geeignete Methode hierfür ist auch die MS-Methode.

Die Anwendung fluoreszierender MS zur Messung der Muskeldurchblutung wurde bisher aber noch nicht validiert. Wir konnten hierfür auf bisher nicht publizierte Daten aus den Versuchen von Anetzberger et al. (2003a) zurückgreifen.

Der Vergleich zwischen den relativen Blutflusswerten, bestimmt durch die simultane Injektion von RM oder FM ergab einen hochsignifikanten linearen Zusammenhang. Auch der

Vergleich der simultan gemessenen Blutflusswerte mit der Methode von Bland und Altman (1986) ergab eine hervorragende Übereinstimmung.

Diese Ergebnisse belegen die Zuverlässigkeit der FM-Methode auch zur Messung der Muskeldurchblutung.

4.7. Blutfluss im Muskel unter physiologischen Bedingungen

Der Blutfluss im M. gastrocnemius des Kaninchens lag bei 9 ml/min/100g, der im M. tibialis anterior bei 11 ml/min/100g. Diese gemessenen Werte stimmen mit den Werten in der Literatur überein. Burton et al. (1988) konnte im M. rectus femoris von Kaninchen einen Blutfluss von etwa 10 ml/min/100g messen. Auch an anderen Versuchstieren fanden sich ähnliche Werte. Tan et al. (1997) stellten an Lämmern einen Muskelblutfluss am Hinterlauf von 9 ml/min/100g fest, Walter et al. (1997) bei jungen Schweinen 8 ml/min/100g.

4.8. Durchblutung der Muskulatur nach Ischämie

Die strukturellen Auswirkungen einer Ischämie auf das Muskelgewebe wurden bereits gut untersucht. Nach einer Ischämiezeit von 90 Minuten kommt es zu einer Vergrößerung des Muskelfaserdurchmessers und des Faserabstandes (Savel et al., 1985; Takaki, 1988 ; Mars & Gregory, 1991). Betroffen sind vor allem oxidative Typ 1-Fasern, da sie im Gegensatz zu Typ 2-Fasern die Energie hauptsächlich über aerobe Glycolyse gewinnen. Ebenso wie an anderen Geweben ist das Ausmaß der Schäden von der Ischämiezeit abhängig (Skjeldal et al., 1993; Xing et al., 1997). Jedoch führen bereits kürzere Ischämiezeiten von unter zwei Stunden zu strukturellen Veränderungen.

In unseren Experimenten untersuchten wir die Durchblutung in der ersten Phase der Reperfusion. Nach einer Ischämiezeit von einer Stunde erfolgte eine sofortige Hyperperfusion in beiden Muskeln mit einem Anstieg um das 4-fache der Ausgangswerte auf 30 - 40 ml/min/100g. Danach fielen die Blutflüsse rasch ab und erreichten nach 15 Minuten wieder die Ausgangswerte. Verlängerte sich die Ischämiezeit auf zwei Stunden wurden die maximalen Blutflüsse erst nach 5 min gemessen und erreichten mit 30 - 55 ml/min/100g das 5-fache der Ausgangswerte. Die Dauer der Mehrdurchblutung war im Vergleich zur einstündigen Ischämie deutlich länger, Ausgangswerte wurden erst nach 90 min wieder erreicht. Interessant war, dass die Hyperperfusion im M. gastrocnemius im Vergleich zum M. tibialis anterior deutlich stärker ausgeprägt war. Der Blutfluss war im M. gastrocnemius um

das 5-fache erhöht, im M. tibialis anterior nur um das 3-fache. Die unterschiedliche Durchblutung von Muskeln unter Ruhebedingungen und die Unterschiede in der Reperfusion nach Ischämie sind interessante Befunde. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte die unterschiedliche Ruhedurchblutung und der unterschiedliche Muskelaufbau aus Typ 1 und 2 Fasern sein.

Zusammenfassend konnten wir erstmals zeigen, dass es auch in der Muskulatur zu einer deutlichen Hyperperfusion nach Ischämie kommt und dass die Verdopplung der Ischämiezeit von 1 auf 2 Stunden zu einer stärkeren und länger anhaltenden Hyperperfusion führt. Außerdem zeigte sich ein Unterschied in den beiden untersuchten Muskeln. Die Hyperperfusion nach Ischämie ist im M. gastrocnemius stärker ausgeprägt als im M. tibialis anterior.

5. Zusammenfassung

Bei Operationen an den Extremitäten wird routinemäßig wegen der besseren Übersicht eine Blutsperre angelegt. Mit zunehmender Ischämiedauer treten häufiger postoperative Komplikationen auf. Die Folgen der Ischämie sind das Auftreten von Schwellungen, Schmerzen, Störungen der Mikrozirkulation bis hin zu Gewebnekrosen. Die möglichen Auswirkungen auf das Gewebe werden als Post-Tourniquet-Syndrom bezeichnet. Ursächlich hierfür sind neben zellulären Schäden vor allem ischämiebedingte Störungen der Mikrozirkulation. Interessant für das Verständnis der pathophysiologischen Zusammenhänge ist vor allem die Wiederherstellung der Mikrozirkulation nach Ischämie.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Dynamik der Reperfusion in der Muskulatur und im Knochen nach definierten Ischämiezeiten im Tiermodell zu untersuchen. Als Messmethode wurde, aufgrund entscheidender Vorteile gegenüber den anderen Verfahren, die Mikrosphärenmethode unter Verwendung von fluoreszierenden Mikrosphären eingesetzt. Da diese Methode noch nicht für die Messung der Muskeldurchblutung validiert war, lag hierin ein weiteres Ziel der Arbeit.

Als Versuchstiere verwendeten wir insgesamt 13 weibliche New Zealand Kaninchen. Die Ischämiezeit betrug in der Versuchsreihe 1 (n=6) 60 Minuten, in Versuchsreihe 2 (n=7) 120 Minuten. In Versuchsreihe 1 wurde die erste Messung vor der Anlage der Blutsperre durchgeführt, die weiteren Messzeitpunkte waren während der Ischämie, 1, 5, 15, 30 und 60 Minuten nach Eröffnen der Blutsperre. In Versuchsreihe 2 wurden Messungen während der Ischämie sowie 1, 5, 15, 30, 60 und 90 min nach Eröffnen der Blutsperre durchgeführt. Nach Versuchsende wurden beide Femora, Tibiae, Tali und die Mm. gastrocnemicae und Mm. tibialis anteriores entnommen und nach einem festgelegten Dissektionsschema in Proben aufgeteilt. Zusätzlich wurden beide Nieren als Referenzorgane entnommen. Die Probenverarbeitung und Messung der Fluoreszenzintensität in den Proben erfolgte automatisiert mit einem am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München entwickelten Robotersystem.

Für die Validierung der Messung der Muskeldurchblutung mittels fluoreszierender Mikrosphären wurden bisher unveröffentlichte Daten aus Tierversuchen von Anetzberger et al. (2003a) aufgearbeitet. Es wurden Blutflusswerte im Muskel, die durch simultane Injektion

von fluoreszierenden und radioaktiven Mikrosphären gemessen wurden, miteinander verglichen. Die statistische Auswertung der Daten mittels Regressionsanalyse und der Methode nach Bland und Altman (1986) zeigte dabei eine hohe Übereinstimmung zwischen radioaktiven und fluoreszierenden Mikrosphären. Es konnte dadurch die Zuverlässigkeit der Methode zur Messung der Muskeldurchblutung nachgewiesen werden.

Die Auswertung der Versuchsreihen ergab einen mittleren Blutfluss im Femur von 10 ml/min/100g, in der Tibia von 6 ml/min/100g und im Talus von 3 ml/min/100g. Die Höhe der Blutflusswerte entspricht denen, die in vergleichbaren Studien angegeben werden. Unsere Befunde bestätigen die Ergebnisse anderer Untersuchungen, nach denen die Durchblutung innerhalb eines Röhrenknochens heterogen ist. Auch die Muskeldurchblutung lag im Bereich der bekannten Werte aus der Literatur. Im M. tibialis anterior betrug der Blutfluss unter Ruhebedingungen 11 ml/min/100g, im M. gastrocnemius 8 ml/min/100g.

Der Verlauf der Reperfusionphase war im Knochen und Muskel und in Abhängigkeit der Ischämiedauer unterschiedlich. In der Tibia und im Talus kam es nach Eröffnen der Blutsperre zu einer kompensatorischen Hyperämie. Der Blutfluss in der Tibia war nach einer Ischämiedauer von einer Stunde im Vergleich zur Gegenseite um 25% erhöht, nach zwei Stunden Ischämiedauer sogar um 40%. Nach einer Ischämiedauer von einer Stunde normalisierten sich die Blutflusswerte nach 15 min wieder. Nach zwei Stunden Ischämie war die Durchblutung im Vergleich zur Kontrollseite bis zum Versuchsende erhöht.

Die Dynamik der Reperfusion war in den verschiedenen Regionen innerhalb eines Röhrenknochens gleich.

Im Vergleich zum Knochen waren die Auswirkungen der Ischämie auf die Muskeldurchblutung noch bemerkenswerter. Sowohl im M. gastrocnemius als auch im M. tibialis anterior kam es zu einer beträchtlichen Hyperämie nach Entfernung der Blutsperre. Nach Verdopplung der Ischämiezeit war die Hyperämie stärker ausgeprägt und dauerte länger an. Der maximale Blutfluss im M. gastrocnemius war im Vergleich mit der Kontrollseite auf das 6-fache gesteigert, im M. tibialis anterior auf das 4-fache. Anschließend fiel die Durchblutung wieder kontinuierlich ab, die Werte der Gegenseite wurden in der ersten Versuchsreihe nach 15 min, in der zweiten erst nach 90 min erreicht.

Schlussfolgerung: Wir konnten erstmals zeigen, dass die Verwendung einer Blutsperrung mit der bei Operationen üblichen Ischämiedauer von ein bis zwei Stunden bereits zu erheblichen Veränderungen der Mikrozirkulation im Knochen und Muskel führt. Nach Entfernen der Blutsperrung kommt es sowohl im Knochen als auch im Muskel zu einer sofortigen Wiederherstellung der Durchblutung. Trotz einer Abnahme des systemischen Blutdruckes zeigt sich eine deutliche Hyperperfusion, die im Muskel stärker ausgeprägt ist als im Knochen. Das Ausmaß der Durchblutungsänderungen ist abhängig von der Ischämiezeit. Eine Verlängerung der Ischämiedauer führt zu einer stärkeren und länger andauernden Mehrdurchblutung. Diese Durchblutungsveränderungen spielen in der Pathogenese des Reperfusionssyndroms eine wichtige Rolle. Aufgrund der erhöhten Endotheldurchlässigkeit nach der Ischämie besteht die Gefahr, dass die Mehrdurchblutung zu einem zunehmenden Extravasat führt. Dies wiederum führt zu einer Störung der Mikrozirkulation mit der Gefahr der Ausbildung eines Post-Tourniquet-Syndroms.

6. Literaturverzeichnis

- Aalto K, Slatis P (1984)** Blood flow in rabbit osteotomies studied with radioactive microspheres. *Acta Orthop.Scand.* **55**, 637-639.
- Akinyoola AL, Oginni LM, Orimolade EA, Ogundele OJ (2007)** Esmarch tourniquet in orthopaedic surgery. *Trop Doct* **37**, 139-41.
- Anetzberger H, Thein E, Becker M, Walli AK, Messmer K (2003a)** Validity of fluorescent microspheres method for bone blood flow measurement during intentional arterial hypotension. *J Appl Physiol* **95**, 1153-8.
- Anetzberger H, Thein E, Walli AK, Messmer K (2003b)** Determination of regional bone blood flow by means of fluorescent microspheres using an automated sample-processing procedure. *Eur Surg Res* **35**, 337-45.
- Anetzberger H, Thein E, Becker M, Zwissler B, Messmer K (2004a)** Microspheres accurately predict regional bone blood flow. *Clin Orthop Relat Res*, 253-65.
- Anetzberger H, Thein E, Maier M, Birkenmaier C, Messmer K (2004b)** Fluorescent microspheres are reliable for serial bone blood flow measurements. *Clin Orthop Relat Res*, 241-8.
- Archie JP, Jr, Fixler DE, Ulyot DJ, Hoffman JI, Utley JR, Carlson EL (1973)** Measurement of cardiac output with and organ trapping of radioactive microspheres. *J.Appl.Physiol.* **35**, 148-154.
- Babuccu O, Peksoy I, Hosnuter M, Kargi E, Babuccu B (2004)** Evaluation by scintigraphy of hindlimb ischemia in a rat model. *J Reconstr Microsurg* **20**, 405-10.
- Baer RW, Payne BD, Verrier ED, Vlahakes GJ, Molodowitch D, Uhlig PN, Hoffman JI (1984)** Increased number of myocardial blood flow measurements with radionuclide-labeled microspheres. *Am.J.Physiol.* **246**, H418-H434.
- Benninghoff A (2008)** Anatomie 1: Makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie. 17. Auflage, München Elsevier: 149-152.
- Bhattacharya J, L.J. B (1980)** Left ventricular cannulation for microsphere estimation of rabbit renal blood flow. *Am.J.Physiol.* **238**, 736-739.
- Blaisdell FW (2002)** The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg* **10**, 620-30.
- Bland JM, Altman DG (1986)** Statistical methods for assessing agreement between two methods of clinical measurement. *Lancet* **1**, 307-310.

- Bloomfield SA, Allen MR, Hogan HA, Delp MD (2002)** Site- and compartment-specific changes in bone with hindlimb unloading in mature adult rats. *Bone* **31**, 149-157.
- Braithwaite BD, Robinson GJ, Burge PD (1993)** Haemostasis during carpal tunnel release under local anaesthesia: a controlled comparison of a tourniquet and adrenaline infiltration. *J Hand Surg [Br]* **18**, 184-6.
- Brookes M (1970)** Arteriolar blockade: a method of measuring blood flow rates in the skeleton. *J.Anat.* **106**, 557-563.
- Brookes M, Revell WJ (1998)** Blood supply of bone. Springer Verlag, London
- Buckberg GD (1975)** Studies of regional coronary flow using radioactive microspheres. *Ann.Thorac.Surg.* **20**, 46-51.
- Buckberg GD, Luck JC, Payne DB, Hoffman JI, Archie JP, Fixler DE (1971)** Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres. *J.Appl.Physiol.* **31**, 598-604.
- Bunger C, Hjerminde J, Bulow J (1983)** Hemodynamics of the juvenile knee in relation to increasing intra- articular pressure. An experimental study in dogs. *Acta Orthop.Scand.* **54**, 80-87.
- Burton HW, Stevenson TR, Dysko RC, Gallagher KP, Faulkner JA (1988)** Total and regional blood flows in vascularized skeletal muscle grafts in rabbits. *Am J Physiol* **255**, H1043-9.
- Cetinus E, Kilinc M, Uzel M, Inanc F, Kurutas EB, Bilgic E, Karaoguz A (2005)** Does long-term ischemia affect the oxidant status during fracture healing? *Arch Orthop Trauma Surg* **125**, 376-80.
- Coffield RH, Bassingthwaite JB, Kelly P (1975)** Strontium-85 extraction during transcapillary passage in tibial bone. *J Appl.Physiol* **39**, 596-602.
- Copp TH, Shim SS (1965)** Extraction ratio and bone clearance of Sr 85 as a measure of effective bone blood flow. *Circ.Res.* **16**, 461-467.
- Cowled PA, Leonardos L, Millard SH, Fitridge RA (2001)** Apoptotic cell death makes a minor contribution to reperfusion injury in skeletal muscle in the rat. *Eur J Vasc Endovasc Surg* **21**, 28-34.
- Cumming JD (1962)** A study of blood flow to bone and marrow by a method of venous effluent collection. *J.Physiol.(Lond.)* **162**, 13-20.
- Dahlback LO, Rais O (1966)** Morphologic changes in striated muscle following ischemia. Immediate postischemic phase. *Acta Chir Scand* **131**, 430-40.

- Davis RF, Jones LC, Hungeford DS (1987)** The effect of sympathectomy on blood flow in bone. Regional distribution and effect over time. *J. Bone Joint Surg.[Am.]* **69**, 1384-1390.
- Davis TR, Holloway IT, Pooley J (1990)** Effect of exposure to compressed air and elevated oxygen levels on bone blood flow in the rabbit. *Undersea.Biomed.Res.* **17**, 201-211.
- De Bruyn PP, Breen PC, Thomas TB (1970)** The microcirculation of the bone marrow. *Anat.Rec.* **168**, 55-68.
- De Tullio V, Bertini G, Celenza M, Fasciolo M, Guagnini M (1990)** A case of paralytic syndrome of the upper limb caused by tourniquet. *Minerva Med* **81**, 131-2.
- Dole WP, Jackson DL, Rosenblatt JI, Thompson WL (1982)** Relative error and variability in blood flow measurements with radiolabeled microspheres. *Am.J.Physiol.* **243**, H371-H378.
- Domenech RJ, Hoffman JIE, Noble MIM, Saunders KB, Henson JR, Subijanto S (1968)** Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microspheres in conscious and anesthetized dogs. *Circ.Res.* **25**, 581-596.
- Drescher W, Schneider T, Becker C, Hobolth J, Ruther W, Hansen ES, Bunger C (2001)** Selective reduction of bone blood flow by short-term treatment with high-dose methylprednisolone. An experimental study in pigs. *J. Bone Joint Surg.Br.* **83**, 274-277.
- Drescher W, Schneider T, Becker C, Hobolth L, Ruther W, Bunger C, Hansen ES (1999)** Reperfusion pattern of the immature femoral head after critical ischemia: a microsphere study in pigs. *Acta Orthop.Scand.* **70**, 439-445.
- Duncan CP, Shim SS (1977)** The autonomic nerve supply of bone. An experimental study of the intraosseous adrenergic nervi vasorum in the rabbit. *J. Bone Joint Surg.[Br.]* **59**, 323-330.
- Egkher E, Freund R, Kroitzsch U, Wielke B (1986)** Blood pressure-dependent, process-controlled hemostasis to minimize tourniquet syndrome. *Unfallchirurgie* **12**, 200-3.
- Ferkel RD, Heath DD, Guhl JF (1996)** Neurological complications of ankle arthroscopy. *Arthroscopy* **12**, 200-8.
- Ferrell WR, Khoshbaten A, Angerson WJ (1990)** Responses of bone and joint blood vessels in cats and rabbits to electrical stimulation of nerves supplying the knee. *J.Physiol.(Lond.)* **431**, 677-687.
- Flatt AE (1972)** Tourniquet time in hand surgery. *Arch Surg* **104**, 190-2.
- Girardis M, Milesi S, Donato S, Raffaelli M, Spasiano A, Antonutto G, Pasqualucci A, Pasetto A (2000)** The hemodynamic and metabolic effects of tourniquet application during knee surgery. *Anesth Analg* **91**, 727-31.

Glenny RW, Bernard S, Brinkley M (1993) Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J.Appl.Physiol.* **74**, 2585-2597.

Gonchar MG, Mel'man EP (1989) Morphologic changes in limb muscles under conditions of acute experimental ischemia and recirculation. *Arkh Patol* **51**, 64-70.

Gregg PJ, Walder DN (1980) Regional distribution of circulating microspheres in the femur of the rabbit. *J.Bone Joint Surg.[Br.]* **62**, 222-226.

Gross PM, Heistad DD, Marcus ML (1979) Neurohumoral regulation of blood flow to bones and marrow. *Am.J.Physiol.* **237**, H440-H448.

Gross PM, Marcus ML, Heistad DD (1981) Measurement of blood flow to bone and marrow in experimental animals by means of the microsphere technique. *J.Bone Joint Surg.[Am.]* **63**, 1028-1031.

Gross W, Schosser R, Messmer K (1990) MIC-III--an integrated software package to support experiments using the radioactive microsphere technique. *Comput.Methods Programs Biomed.* **33**, 65-85.

Grundnes O, Reikeras O (1992) Blood flow and mechanical properties of healing bone. Femoral osteotomies studied in rats. *Acta Orthop.Scand.* **63**, 487-491.

Guba M, Steinbauer M, Buchner M, Frolich D, Farkas S, Jauch KW, Anthuber M (2000) Differential effects of short-term ace- and AT1-receptor inhibition on postischemic injury and leukocyte adherence in vivo and in vitro. *Shock* **13**, 190-6.

Haimovici H (1960) Arterial embolism with acute massive ischemic myopathy and myoglobinuria: evaluation of a hitherto unreported syndrome with report of two cases. *Surgery* **47**, 739-47.

Hansen ES, Hjortdal VE, Kjolseth D, He SZ, Hoy K, Soballe K, Bunger C (1991) Arteriovenous shunting is not associated with venous congestion in bone. Knee tamponade studied with 15-microns and 50-microns microspheres in immature dogs. *Acta Orthop.Scand.* **62**, 268-275.

Harris AG, Steinbauer M, Leiderer R, Messmer K (1997) Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* **273**, H989-96.

Hsieh AS, Winet H, Bao JY, Stevanovic M (1999) Model for intravital microscopic evaluation of the effects of arterial occlusion-caused ischemia in bone. *Ann Biomed Eng* **27**, 508-16.

- Hsieh AS, Winet H, Bao JY, Glas H, Plenk H (2001)** Evidence for reperfusion injury in cortical bone as a function of crush injury ischemia duration: a rabbit bone chamber study. *Bone* **28**, 94-103.
- Hübler M, Souders JE, Shade ED, Hlastala MP, Polissar NL, Glenn RW (1999)** Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of relative blood flow in severely injured lungs. *J Appl Physiol* **87**, 2381-5.
- Hupel TM, Schemitsch EH, Kowalski MJ, Swiontkowski MF (1999)** In vitro evaluation of a Laser Doppler Flowmetry implantable fibre system: the effect of flow velocity and concentration on perfusion assessment. *Int.J Surg.Investig.* **1**, 29-37.
- Iversen PO, Nicolaysen G (1989)** Heterogeneous blood flow distribution within single skeletal muscles in the rabbit: role of vasomotion, sympathetic nerve activity and effect of vasodilation. *Acta Physiol Scand.* **137**, 125-133.
- Jones LC, Niv AI, Davis RF, Hungerford DS (1982)** Bone blood flow in the femora of anesthetized and conscious dogs in a chronic preparation, using the radioactive tracer microsphere method. *Clin.Orthop.* **170**, 286-295.
- Jones LC, Hungerford DS (2007)** The pathogenesis of osteonecrosis. *Instr Course Lect* **56**, 179-96.
- Jong De MK, Van den Bos GC, Elzinga G (1977)** Changes of microsphere density with time in myocardial infarcts in dogs. *Bibl.Anat.* **15**, 147-150.
- Junqueira LC (2002)** Histologie. 5. Aufl. Berlin, Heidelberg, Springer: 91-105
- Kahn RL, Marino V, Urquhart B, Sharrock NE (1992)** Hemodynamic changes associated with tourniquet use under epidural anesthesia for total knee arthroplasty. *Reg Anesth* **17**, 228-32.
- Kaihara S, Van Heerden PD, Migita T, Wagner HN, Jr (1968)** Measurement of distribution of cardiac output. *J.Appl.Physiol.* **25**, 696-700.
- Kane WJ (1968)** Fundamental concepts in bone-blood flow studies. *J.Bone Joint Surg.[Am.]* **50**, 801-811.
- Kane WJ, Grim E (1969)** Blood flow to canine hind-limb bone, muscle, and skin. A quantitative method and its validation. *J.Bone Joint Surg.[Am.]* **51**, 309-322.
- Kaufman RD, Walts LF (1982)** Tourniquet-induced hypertension. *Br J Anaesth* **54**, 333-6.
- Kelly PJ, Yipintsoi T, Bassingthwaighte JB (1971)** Blood flow in canine tibial diaphysis estimated by iodoantipyrin-125I washout. *J Appl.Physiol* **31**, 38-47.

- Kerachian MA, Harvey EJ, Cournoyer D, Chow TY, Seguin C (2006)** Avascular necrosis of the femoral head: vascular hypotheses. *Endothelium* **13**, 237-44.
- Kiaer T, Dahl B, Lausten GS (1993)** The relationship between inert gas wash-out and radioactive tracer microspheres in measurement of bone blood flow: effect of decreased arterial supply and venous congestion on bone blood flow in an animal model. *J. Orthop. Res.* **11**, 28-35.
- Kobrin I, Kardon MB, Oigman W, Pegram BL, Frohlich ED (1984)** Role of site of microsphere injection and catheter position on systemic and regional hemodynamics in rat. *Am.J.Physiol.* **247**, H35-H39.
- Kokki H, Vaatainen U, Penttila I (1998)** Metabolic effects of a low-pressure tourniquet system compared with a high-pressure tourniquet system in arthroscopic anterior crucial ligament reconstruction. *Acta Anaesthesiol Scand* **42**, 418-24.
- Lausten GS, Kiaer T, Dahl B (1993)** Laser Doppler flowmetry for estimation of bone blood flow: studies of reproducibility and correlation with microsphere technique. *J. Orthop. Res.* **11**, 573-580.
- Makowski EL, Meschia G, Droegemueller W, Battaglia FC (1968)** Measurement of umbilical arterial blood flow to the sheep placenta and fetus in utero. Distribution to cotyledons and the intercotyledonary chorion. *Circ. Res.* **23**, 623-631.
- Mars M, Gregory MA (1991)** A histometric analysis of skeletal myofibers following 90 min of tourniquet ischemia and reperfusion. *J Surg Res* **50**, 191-5.
- Martin W, Villani GM, Jothianandan D, Furchgott RF (1985)** Blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation of rabbit aorta by certain ferrous hemoproteins. *J Pharmacol Exp Ther* **233**, 679-85.
- McCarthy ID, Hughes SPF (1990)** Is there a blood bone barrier? In 'Bone circulation and bone necrosis'. (Eds J Arlet and B Mazieres) pp. 30-33. (Springer Verlag: Berlin)
- McCarthy ID (2006)** The physiology of bone blood flow: a review. *J Bone Joint Surg Am* **88 Suppl 3**, 4-9.
- McCuskey RS, McClugage SG, Yuonker J (1971)** Microscopy of living bone marrow in situ. *Blood* **38**, 87-95.
- McGrory BJ, Moran CG, Bronk J, Weaver AL, Wood MB (1994)** Canine bone blood flow measurements using serial microsphere injections. *Clin. Orthop.* **303**, 264-279.
- Neutze JM, Wyler F, Rudolph AM (1968)** Use of radioactive microspheres to assess distribution of cardiac output in rabbits. *Am.J.Physiol.* **215**, 486-495.

- Nolte D, Raab S, Thein E, Draenert K, Ehrenfeld M, Messmer K (1999)** Neues experimentelles Modell zur repetitiven Messung der ossaren Durchblutung. *Mund.Kiefer.Gesichtschir.* **3 Suppl 1**, S147-S150.
- Notzli HP, Swiontkowski MF, Thaxter ST, Carpenter GK, Wyatt R (1989)** Laser Doppler flowmetry for bone blood flow measurements: helium-neon laser light attenuation and depth of perfusion assessment. *J.Orthop.Res.* **7**, 413-424.
- Okubo M, Kinoshita T, Yukimura T, Abe Y, Shimazu A (1979)** Experimental study of measurement of regional bone blood flow in the adult mongrel dog using radioactive microspheres. *Clin.Orthop.*, 263-270.
- Ostman B, Michaelsson K, Rahme H, Hillered L (2004)** Tourniquet-induced ischemia and reperfusion in human skeletal muscle. *Clin Orthop Relat Res*, 260-5.
- Paradis GR, Kelly PJ (1975)** Blood flow and mineral deposition in canine tibial fractures. *J.Bone Joint Surg.[Am.]* **57**, 220-226.
- Parks BJ (1973)** Postoperative peripheral neuropathies. *Surgery* **74**, 348-57.
- Powers KM, Schimmel C, Glenny RW, Bernards CM (1999)** Cerebral blood flow determinations using fluorescent microspheres: variations on the sedimentation method validated. *J Neuroscience Methods* **87**, 159-165.
- Prinzen FW, Glenny RW (1994)** Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. *Cardiovasc.Res.* **28**, 1467-1475.
- Pschyrembel W (2002)** Klinisches Wörterbuch. 259 neu bearb. Auflage Berlin, New York, de Gruyter: S. 885
- Raab S, Thein E, Harris AG, Messmer K (1999)** A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. *Am.J.Physiol.* **276**, H1801-H1806.
- Rhineland FW (1968)** The normal microcirculation of diaphyseal cortex and its response to fracture. *J Bone Joint Surg Am* **50**, 784-800.
- Rudolph AM, Heymann MA (1967)** The circulation of the fetus in utero. Methods for studying distribution of blood flow, cardiac output and organ blood flow. *Circ.Res.* **21**, 163-184.
- Saunders KC, Louis DL, Weingarden SI, Waylonis GW (1979)** Effect of tourniquet time on postoperative quadriceps function. *Clin Orthop Relat Res*, 194-9.
- Savel'ev VS, Chekareva IA, Mishnev OD, Bogdanov OA (1985)** Morphological characteristics of changes in the skeletal muscle tissue of the extremities after experimental post-ischemic recirculation. *Biull Eksp Biol Med* **100**, 351-5.

- Schimmel C, Frazer D, Huckins SR, Glenny RW (2000)** Validation of automated spectrofluorimetry for measurement of regional organ perfusion using fluorescent microspheres. *Comput.Methods Programs Biomed.* **62**, 115-125.
- Schimmel C, Frazer D, Glenny RW (2001)** Extending fluorescent microsphere methods for regional organ blood flow to 13 simultaneous colors. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* **280**, H2496-H2506.
- Schmidt RF (2007)** Physiologie des Menschen. 30. Aufl. , neu bearb. und akt. A.; Berlin, Springer: 860f
- Schneider T, Drescher W, Becker C, Cremer D, Weile C, Heydthausen M, Ruther W, Hansen ES, Bungler C (1998)** Reperfusion capacity of the femur head after ischemia--an experimental study. *Z Orthop Ihre Grenzgeb* **136**, 132-7.
- Schossner R, Gross W, Messmer K (1990)** The evaluation of radioactive microsphere data: remarks on the use of the BMDP and SAS statistical software packages. *Comput.Biol.Med.* **20**, 445-464.
- Schoutens A, Bergmann P, Verhas M (1979)** Bone blood flow measured by ⁸⁵Sr microspheres and bone seeker clearances in the rat. *Am.J.Physiol.* **236**, H1-H6.
- Schulte am Esch J (2006)** Duale Reihe Anästhesie: Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie. Auflage: 3., vollst. überarb. u. erw. A.; Stuttgart, Thieme: 75-80
- Schweiberer L, Schenk R (1977)** Histomorphology and vascularization of secondary healing of bone fractures with emphasis on tibial shaft fractures. *Unfallheilkunde* **80**, 275-86.
- Seibel MJ (2004)** Bone metabolism, mineral homeostasis and its pharmacological modulation. *Clin Lab* **50**, 255-64.
- Shim SS, Copp DH, Patterson FP (1966)** Bone blood flow in the limb following complete sciatic nerve section. *Surg.Gynecol.Obstet.* **123**, 333-335.
- Shim SS, Copp DH, Patterson FP (1967)** An indirect method of bone blood-flow measurement based on the bone clearance of a circulating bone-seeking radioisotope. *J.Bone Joint Surg.[Am.]* **49**, 693-702.
- Shim SS, Copp DH, Patterson FP (1968)** Measurement of the rate and distribution of the nutrient and other arterial blood supply in long bones of the rabbit. A study of the relative contribution of the three arterial systems. *J.Bone Joint Surg.[Br.]* **50**, 178-183.
- Shymkiw RC, Zernicke RF, Forrester KR, Bray RC (2001)** Evaluation of laser-Doppler perfusion imaging for measurement of blood flow in cortical bone. *J.Appl.Physiol.* **90**, 1314-1318.

- Skjeldal S, Nordsletten L, Kirkeby OJ, Groggaard B, Bjerkreim I, Mowinckel P, Torvik A, Reikeras O (1993)** Perfusion in the anterior tibial muscle measured by laser Doppler flowmetry after graded periods of hindlimb ischemia in rats. *Int J Microcirc Clin Exp* **12**, 107-18.
- Solonen KA, Tarkkanen L, Narvanen S, Gordin R (1968)** Metabolic changes in the upper limb during tourniquet ischaemia. A clinical study. *Acta Orthop Scand* **39**, 20-32.
- Stiller D, Zippel H, Schwesinger G, Schlenzka D (1981)** Pathology of the spontaneous osteonecrosis of the knee in elderly patients (Morbus Ahlback). *Zentralbl Allg Pathol* **125**, 303-14.
- Swiontkowski MF, Tepic S, Perren SM, Moor R, Ganz R, Rahn BA (1986)** Laser Doppler flowmetry for bone blood flow measurement: correlation with microsphere estimates and evaluation of the effect of intracapsular pressure on femoral head blood flow. *J. Orthop. Res.* **4**, 362-371.
- Swiontkowski MF, Schlehr F, Collins JC, Sanders R, Pou A (1988)** Comparison of two laser Doppler flowmetry systems for bone blood flow analysis. *Calcif. Tissue Int.* **43**, 103-107.
- Szokoly M, Nemeth N, Hamar J, Furka I, Miko I (2006)** Early systemic effects of hind limb ischemia-reperfusion on hemodynamics and acid-base balance in the rat. *Microsurgery* **26**, 585-9.
- Takaki N (1988)** Experimental studies on a compartment syndrome caused by a tourniquet. *Nippon Seikeigeka Gakkai Zasshi* **62**, 217-30.
- Tan W, Riggs KW, Thies RL, Rurak DW (1997)** Use of an automated fluorescent microsphere method to measure regional blood flow in the fetal lamb. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **75**, 959-968.
- Thein E, Raab S, Harris AG, Messmer K (2000)** Automation of the use of fluorescent microspheres for the determination of blood flow. *Comput. Methods Programs Biomed.* **61**, 11-21.
- Thein E, Raab S, Harris AG, Kleen M, Habler O, Meisner F, Messmer K (2002)** Comparison of regional blood flow values measured by radioactive and fluorescent microspheres. *Eur. Surg. Res.* **34**, 215-223.
- Thurston T (1982)** Distribution of nerves in long bones as shown by silver impregnation. *J. Anat.* **143**, 719-728.
- Tondevoid E, Bulow J (1983)** Bone blood flow in conscious dogs at rest and during exercise. *Acta Orthop. Scand.* **54**, 53-57.

- Tothill P, Hooper G, McCarthy ID, Hughes SP (1987)** The pattern of distribution of blood flow in dog limb bones measured using microspheres. *Clin.Phys.Physiol.Meas.* **8**, 239-247.
- Valli H, Rosenberg PH (1985)** Effects of three anaesthesia methods on haemodynamic responses connected with the use of thigh tourniquet in orthopaedic patients. *Acta Anaesthesiol Scand* **29**, 142-7.
- Van Oosterhout MF, Prinzen FW, Sakurada S, Glenny RW, Hales JR (1998)** Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. *Am.J.Physiol.* **275**, H110-H115.
- von Ritter C, Hinder RA, Womack W, Bauerfeind P, Fimmel CJ, Kviety PR, Granger DN, Blum AL (1988)** Microsphere estimates of blood flow: methodological considerations. *Am.J.Physiol* **254**, G275-G279.
- Wakai A, Wang JH, Winter DC, Street JT, O'Sullivan RG, Redmond HP (2001a)** Tourniquet-induced systemic inflammatory response in extremity surgery. *J Trauma* **51**, 922-6.
- Wakai A, Winter DC, Street JT, Redmond PH (2001b)** Pneumatic tourniquets in extremity surgery. *J Am Acad Orthop Surg* **9**, 345-51.
- Walter B, Bauer R, Gaser E, Zwiener U (1997)** Validation of the multiple colored microsphere technique for regional blood flow measurements in newborn piglets. *Basic Res. Cardiol.* **92**, 191-200.
- Warren DJ, Ledingham JGG (1974)** Measurement of cardiac output distribution using microspheres. Some practical and theoretical considerations. *Cardiovasc.Res.* **8**, 570-581.
- Weiland AJ, Berggren A, Jones L (1982)** The acute effects of blocking medullary blood supply on regional cortical blood flow in canine ribs as measured by the hydrogen washout technique. *Clin Orthop Relat Res*, 265-72.
- Whiteside LA, Lesker PA, Simmons DJ (1977)** Measurement of regional bone and bone marrow blood flow in the rabbit using the hydrogen washout technique. *Clin.Orthop.* **122**, 340-346.
- Winet H, Hsieh A, Bao JY (1998)** Approaches to study of ischemia in bone. *J Biomed Mater Res* **43**, 410-21.
- Xing X, Guo E, Xu F (1997)** Influence of reperfusion following ischemia on microvessels and microcirculation of skeletal muscle. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi* **11**, 242-6.

Zager RA (1989) Studies of mechanisms and protective maneuvers in myoglobinuric acute renal injury. *Lab Invest* **60**, 619-29.

Zippel H, Schlenzka D, Stiller D, Schwesinger G (1981) Pathology, clinical aspects and therapy of spontaneous osteonecrosis of the adult knee (Ahlback disease). *Beitr Orthop Traumatol* **28**, 205-16.

7. Tabellenanhang

	Ausgangswert	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
HZV	141 ± 14	133 ± 23	125 ± 12	134 ± 13	117 ± 14	127 ± 26	113 ± 18
MAD vor MS-Injektion	83 ± 3	78 ± 2	70 ± 3 ^a	67 ± 4	66 ± 4	63 ± 5	66 ± 3
MAD nach MS-Injektion	86 ± 4	81 ± 3	69 ± 4	63 ± 5	65 ± 5	65 ± 6	62 ± 4
HF vor MS-Injektion	212 ± 9	193 ± 10	186 ± 11	171 ± 9	163 ± 9	152 ± 6	154 ± 7
HF nach MS-Injektion	193 ± 14	189 ± 9	170 ± 9	162 ± 8	156 ± 7	147 ± 5	161 ± 7
p_aO₂	232 ± 68	118 ± 5	125 ± 6	123 ± 4	122 ± 13	150 ± 21	113 ± 4
p_aCO₂	35 ± 4	36 ± 5	37 ± 5	37 ± 2	36 ± 3	34 ± 4	37 ± 4
Hb	11,1 ± 0,5	10,0 ± 0,8	9,4 ± 0,9	8,7 ± 0,7	8,0 ± 0,9	7,2 ± 0,8	6,3 ± 1,1
HK	32 ± 2	28 ± 3	27 ± 4	25 ± 3	24 ± 4	22 ± 3	21 ± 3

Tabelle 1: *Hämodynamische Parameter in der ersten Versuchsreihe*

HZV = Herzzeitvolumen [ml/min/kg], MAD = mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg], HF = Herzfrequenz [Schläge/min], p_aO₂ = arterieller Sauerstoffpartialdruck [mmHg], p_aCO₂ = arterieller Kohlendioxidpartialdruck [mmHg], Hb = Hämoglobin [g/dl], HK = Hämatokrit [%]

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM (n=6).

^a signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ischämie“

Femur	rechts	links
Caput femoris	0,49 ± 0,02	0,45 ± 0,05
Trochanter maj.	0,28 ± 0,03	0,30 ± 0,03
Collum femoris	0,65 ± 0,03	0,65 ± 0,06
Metaphysis prox.	1,75 ± 0,15	1,71 ± 0,14
Diaphysis	2,80 ± 0,28	3,01 ± 0,24
Metaphysis dist.	1,67 ± 0,14	1,56 ± 0,10
Condylus med.	1,47 ± 0,07	1,47 ± 0,08
Condylus lat.	1,50 ± 0,09	1,46 ± 0,08
Tibia		
Condylus med.	0,92 ± 0,03	0,96 ± 0,05
Condylus lat.	0,95 ± 0,02	0,82 ± 0,10
Metaphysis prox.	1,34 ± 0,14	1,33 ± 0,10
Diaphysis prox.	2,54 ± 0,12	2,45 ± 0,10
Diaphysis dist.	1,35 ± 0,07	1,39 ± 0,10
Metaphysis dist.	0,69 ± 0,03	0,69 ± 0,05
Epiphysis dist.	0,69 ± 0,04	0,70 ± 0,03
Talus	0,55 ± 0,03	0,54 ± 0,03
M. gastrocnemius	1,38 ± 0,05	1,39 ± 0,05
M. tibialis anterior	1,41 ± 0,07	1,38 ± 0,09

Tabelle 2: *Gewicht der Proben im Rechts/Links-Vergleich*

In der Tabelle ist das Gewicht [g] der Proben von Femur, Tibia, Talus und den Muskeln in der ersten Versuchsreihe aufgelistet. Die Knochen wurden nach einem festgelegten Dissektionsschema geteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=6).

Organ	Ausgangswert	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
Niere re.	221 ± 36	178 ± 19	188 ± 21	181 ± 21	166 ± 26	171 ± 27	157 ± 19
Niere li.	218 ± 39	172 ± 17	182 ± 21	168 ± 18	161 ± 26	168 ± 25	155 ± 16
Femur re.	8,8 ± 0,7	10,1 ± 0,7	8,5 ± 0,7	9,0 ± 0,6	9,4 ± 0,7	9,5 ± 0,7	8,4 ± 0,5
Femur li.	8,3 ± 0,7	7,7 ± 0,8	8,4 ± 0,7	8,5 ± 0,6	8,6 ± 0,8	8,8 ± 0,8	8,8 ± 0,7
Tibia re.	5,7 ± 0,8	5,6 ± 0,7	4,7 ± 0,6 ^{b,*}	4,9 ± 0,6	5,2 ± 0,6 [*]	5,4 ± 0,7 [*]	5,6 ± 0,6 [*]
Tibia li.	6,0 ± 0,8	0,4 ± 0,1 ^a	5,9 ± 0,7 ^b	5,7 ± 0,7	4,5 ± 0,6 ^c	4,5 ± 0,6	5,2 ± 0,7
Talus re.	3,3 ± 0,9	3,3 ± 0,7 [*]	3,0 ± 0,9	3,0 ± 0,7	2,8 ± 0,2 ^c	2,7 ± 0,5	3,4 ± 0,7
Talus li.	3,0 ± 0,5	0,4 ± 0,4 ^a	4,1 ± 1,6 ^b	5,0 ± 1,3	3,0 ± 0,4	2,3 ± 0,4	2,8 ± 0,6

Tabelle 3: Nieren- und Knochendurchblutung in der ersten Versuchsreihe

In der Tabelle sind die Blutflüsse [ml/min/100g] von Niere, Femur, Tibia und Talus für die rechte (Kontrollseite) und linke (Ischämieseite) Seite während der verschiedenen Injektionszeitpunkte in der ersten Versuchsreihe angegeben. Die Zahlen sind die Mittelwerte ± SEM (n=6).

^a signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ausgangswert“

^b signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ischämie“

^c signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „5 min“

^{*} signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „links“

	Seite	Ausgangswert	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
Caput femoris	re.	9,5 ± 2,7	10,1 ± 2,7	9,8 ± 2,7	9,6 ± 2,3	9,3 ± 2,0	9,2 ± 2,3	10,1 ± 1,2
	li.	7,6 ± 3,0	9,4 ± 3,0	8,0 ± 2,9	6,8 ± 2,2	7,6 ± 2,3	6,9 ± 2,6	7,1 ± 2,9
Trochanter major	re.	12,7 ± 3,4	11,8 ± 2,5	12,8 ± 3,4	11,8 ± 2,2	13,8 ± 2,8	12,1 ± 2,8	10,3 ± 2,3
	li.	10,5 ± 2,8	9,9 ± 2,0	10,9 ± 2,7	11,3 ± 2,5	14,3 ± 3,7	14,1 ± 3,9	14,1 ± 2,6
Collum femoris	re.	11,7 ± 2,5	14,5 ± 2,1	10,8 ± 1,9	11,4 ± 1,5	12,2 ± 2,3	12,2 ± 2,5	10,0 ± 1,4
	li.	12,0 ± 2,1	13,8 ± 1,9	11,5 ± 1,9	10,7 ± 1,5	11,8 ± 2,2	11,6 ± 2,4	10,6 ± 1,7
Metaphysis proximalis	re.	9,4 ± 0,9	12,8 ± 1,2	10,5 ± 0,8	10,8 ± 0,7	10,9 ± 1,4	10,9 ± 1,5	8,7 ± 0,9
	li.	9,3 ± 0,9	12,7 ± 1,3	9,7 ± 0,7	10,0 ± 0,6	10,4 ± 1,5	10,8 ± 1,5	10,2 ± 0,4
Diaphysis	re.	4,6 ± 0,5	6,6 ± 0,6	5,3 ± 0,7	5,4 ± 0,5	5,9 ± 0,8	5,9 ± 1,1	5,9 ± 0,9
	li.	5,5 ± 0,5*	7,1 ± 0,7	5,3 ± 0,7	5,6 ± 0,7	5,8 ± 0,8	6,3 ± 1,0	6,3 ± 0,4
Metaphysis distalis	re.	6,9 ± 0,7	9,2 ± 1,2	6,7 ± 1,1	7,3 ± 0,8	7,0 ± 1,2	7,5 ± 1,3	6,5 ± 0,9
	li.	6,9 ± 0,7	6,4 ± 1,5	6,2 ± 1,0	6,8 ± 0,9	7,3 ± 1,3	7,3 ± 1,4	6,6 ± 1,0
Condylus medialis	re.	7,8 ± 1,6	7,8 ± 1,3	6,6 ± 1,4	8,1 ± 1,6	7,9 ± 1,1	9,0 ± 1,7	8,0 ± 1,2
	li.	7,2 ± 1,6	1,1 ± 0,3 ^{*,a}	8,8 ± 2,4 ^b	9,4 ± 1,5	6,1 ± 0,9 ^{*,c}	7,0 ± 0,9	8,0 ± 1,4
Condylus lateralis	re.	7,8 ± 1,7	7,8 ± 1,3	6,5 ± 1,5	7,2 ± 1,4	8,1 ± 1,5	8,9 ± 2,1	7,7 ± 1,2
	li.	6,9 ± 1,4	1,3 ± 0,5 ^{*,a}	7,3 ± 2,2 ^b	7,5 ± 1,7	5,7 ± 1,3	6,3 ± 1,3	7,2 ± 2,4

Tabelle 4: Regionale Knochendurchblutung des Femurs (Ischämiedauer 60 min)

RKBF in [ml/min/100g] im Femur (links: Ischämieseite, rechts: Kontrollseite). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=6).

^a signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ausgangswert“

^b signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ischämie“

^c signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „5 min“

* signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „rechts“

	Seite	Ausgangswert	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
Condylus medialis	re.	10,9 ± 3,1	9,6 ± 2,3	8,2 ± 2,3	8,7 ± 2,5	9,1 ± 2,1	9,4 ± 2,4	9,7 ± 1,9
	li.	10,3 ± 3,2	0,5 ± 0,4 ^{*,a}	9,2 ± 2,3 ^b	9,3 ± 1,5	7,5 ± 1,9	7,4 ± 1,8	8,6 ± 1,6
Condylus lateralis	re.	8,6 ± 2,4	7,9 ± 2,1	7,2 ± 2,1	7,9 ± 2,1	8,1 ± 1,9	8,9 ± 2,6	8,5 ± 1,7
	li.	10,1 ± 2,8	0,3 ± 0,2 ^{*,a}	11,8 ± 2,4 ^{*,b}	12,4 ± 2,5	8,7 ± 2,2 ^c	8,7 ± 2	9,4 ± 2,1
Metaphysis proximalis	re.	7,2 ± 0,9	7,9 ± 1,1	6,1 ± 1,1	6,7 ± 1,1	6,7 ± 1,1	6,6 ± 1,2	5,3 ± 0,9
	li.	7,7 ± 1,0	0,2 ± 0,2 ^{*,a}	6,0 ± 1,3 ^c	5,5 ± 0,4	5,5 ± 0,6	5,6 ± 0,5	6,1 ± 0,5
Diaphysis proximalis	re.	3,4 ± 0,3	4,1 ± 0,4	3,4 ± 0,4	3,6 ± 0,3	3,9 ± 0,5	4,3 ± 0,7	4,1 ± 0,5
	li.	3,7 ± 0,4 [*]	0,1 ± 0,1 ^{*,a}	3,2 ± 0,5 ^b	3,3 ± 0,4	3,0 ± 0,2 [*]	3,7 ± 0,4	4,2 ± 0,4
Diaphysis distalis	re.	1,8 ± 0,6	1,7 ± 0,4	1,5 ± 0,5	1,5 ± 0,4	1,9 ± 0,3	2,1 ± 0,6	2,3 ± 0,6
	li.	3,1 ± 1,5	0,2 ± 0,2 ^{*,a}	2,0 ± 0,4 ^b	1,9 ± 0,4	1,5 ± 0,2 [*]	1,7 ± 0,4	2,1 ± 0,6
Metaphysis distalis	re.	3,5 ± 1,2	3,2 ± 0,9	2,7 ± 1,0	2,8 ± 0,8	3,1 ± 0,6	2,9 ± 0,7	3,5 ± 0,8
	li.	3,1 ± 0,9	0,6 ± 0,6 ^{*,a}	2,8 ± 1,0 ^b	2,3 ± 0,5	1,9 ± 1,4	1,6 ± 0,4 ^c	1,9 ± 0,5
Epiphysis distalis	re.	4,3 ± 1,6	4,2 ± 1,4	3,3 ± 1,2	3,2 ± 0,7	3,5 ± 0,8	3,9 ± 1,5	5,5 ± 1,7
	li.	4,2 ± 1,3	0,5 ± 0,5 ^{*,a}	6,3 ± 1,2 ^{*,b}	5,6 ± 1,0	3,7 ± 0,6	3,1 ± 0,7 ^c	3,9 ± 0,7

Tabelle 5: Regionale Knochendurchblutung der Tibia (Ischämiedauer 60 min)

RKBF in [ml/min/100g] in der Tibia (links: Ischämieseite, rechts: Kontrollseite). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=6).

^a signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ausgangswert“

^b signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ischämie“

^c signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „5 min“

* signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „rechts“

	Seite	Ausgangswert	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min
M. gastrocnemius	re.	12,0 ± 2,2	11,1 ± 3,5	8,0 ± 2,5	8,8 ± 1,7	8,3 ± 1,3	7,6 ± 1,4	7,5 ± 0,3
	li.	11,6 ± 2,1	0,6 ± 0,2 ^c	39,6 ± 5,5 ^{d,*}	19,7 ± 2 ^{e,*}	10,0 ± 1,2 ^f	6,1 ± 0,6	4,1 ± 0,4
M. tibialis anterior	re.	16,2 ± 2,3 ^a	11,9 ± 2,9	10,0 ± 3,2	10,4 ± 2,3	9,9 ± 1,7	8,6 ± 1,2	8,8 ± 1,2
	li.	15,0 ± 2,1 ^b	0,5 ± 0,2 ^c	31,0 ± 4,2 ^{d,*}	16,1 ± 1,7 ^{e,*}	10,1 ± 1,4	8,1 ± 1,5 ^g	6,5 ± 1,3

Tabelle 6: Muskeldurchblutung in der ersten Versuchsreihe

Die Blutflüsse [ml/min/100g] in den Muskeln sind als Mittelwerte ± SEM (n=6) angegeben. Links: Ischämieseite, Rechts: Kontrollseite

^a signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „rechts M. gastrocnemius“

^b signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „links M. gastrocnemius“

^c signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ausgangswert“

^d signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ischämie“

^e signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „1 min“

^f signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „5 min“

^g signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „15 min“

* signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „rechts“

	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min
HZV	138 ± 12	120 ± 6 ^a	127 ± 12	103 ± 5	96 ± 7	106 ± 3	88 ± 10
MAD vor MS-Injektion	82 ± 5	70 ± 6 ^a	64 ± 4 ^b	59 ± 5	57 ± 5 ^c	62 ± 4	58 ± 5
MAD nach MS-Injektion	78 ± 5	67 ± 3	54 ± 5	60 ± 2	57 ± 3	61 ± 3	61 ± 4
HF vor MS-Injektion	181 ± 11	176 ± 6 ^d	170 ± 6 ^b	167 ± 6	155 ± 6 ^c	151 ± 5	153 ± 6
HF nach MS-Injektion	168 ± 7	169 ± 6	167 ± 3	160 ± 3	156 ± 5	156 ± 4	157 ± 8
p_aO₂	119 ± 12	105 ± 17	103 ± 29	115 ± 16	118 ± 13	111 ± 14	119 ± 15
p_aCO₂	36 ± 3	58 ± 19	93 ± 54	50 ± 15	39 ± 4	61 ± 23	59 ± 23
Hb	13,3 ± 0,3	12,1 ± 1,0	11,5 ± 1,0	10,7 ± 0,6	10,0 ± 0,3	9,4 ± 0,2	8,7 ± 0,4
HK	39 ± 1	35 ± 2	33 ± 1	31 ± 1	29 ± 1	27 ± 1	25 ± 2

Tabelle 7: Hämodynamische Parameter in der zweiten Versuchsreihe

HZV = Herzzeitvolumen [ml/min/kg], MAD = mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg], HF = Herzfrequenz [Schläge/min], p_aO₂ = arterieller Sauerstoffpartialdruck [mmHg], p_aCO₂ = arterieller Kohlendioxidpartialdruck [mmHg], Hb = Hämoglobin [g/dl], HK = Hämatokrit [%]

Die Daten sind angegeben als Mittelwert ± SEM (n=7).

^a signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ischämie“

^b signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „1 min“

^c signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „15 min“

^d signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „HF nach MS-Inj.“

Femur	rechts	links
Caput femoris	0,54 ± 0,01	0,51 ± 0,01
Trochanter maj.	0,27 ± 0,02	0,33 ± 0,02
Collum femoris	0,63 ± 0,03	0,66 ± 0,02
Metaphysis prox.	1,87 ± 0,07	1,94 ± 0,06
Diaphysis	2,49 ± 0,08	2,36 ± 0,10
Metaphysis dist.	1,91 ± 0,08	1,92 ± 0,06
Condylus med.	1,48 ± 0,03	1,52 ± 0,05
Condylus lat.	1,50 ± 0,05	1,52 ± 0,07
Tibia		
Condylus med.	1,09 ± 0,04	1,09 ± 0,05
Condylus lat.	0,93 ± 0,04	0,93 ± 0,03
Metaphysis prox.	1,17 ± 0,05	1,08 ± 0,05
Diaphysis prox.	2,39 ± 0,06	2,18 ± 0,26
Diaphysis dist.	1,48 ± 0,06	1,64 ± 0,10
Metaphysis dist.	0,66 ± 0,05	0,75 ± 0,11
Epiphysis dist.	0,63 ± 0,02	0,66 ± 0,03
Talus	0,55 ± 0,01	0,53 ± 0,01
M. gastrocnemius	1,17 ± 0,03	1,22 ± 0,03
M. tibialis anterior	1,08 ± 0,03	1,14 ± 0,03

Tabelle 8: *Gewicht der Proben im Rechts/Links-Vergleich*

In der Tabelle ist das Gewicht [g] der Proben von Femur, Tibia, Talus und den Muskeln in der zweiten Versuchsreihe aufgelistet. Die Knochen wurden nach einem festgelegten Dissektionsschema geteilt. Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=7).

Organ	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min
Niere re.	238 ± 28	246 ± 24	211 ± 10	164 ± 18 ^c	153 ± 18	156 ± 13	120 ± 5 ^f
Niere li.	231 ± 27	244 ± 24	206 ± 9	158 ± 17	150 ± 18	152 ± 13	119 ± 5
Femur re.	11,3 ± 0,7 [*]	10,4 ± 0,8 ^a	8,6 ± 0,7 ^b	9,3 ± 0,9	11,7 ± 1,1 ^{d,*}	10,4 ± 0,8	10,4 ± 0,9
Femur li.	9,2 ± 0,9	9,5 ± 0,7	9,3 ± 0,7	8,9 ± 0,7	9,6 ± 0,9	10,2 ± 0,9 ^e	9,7 ± 0,8
Tibia re.	7,8 ± 0,8 [*]	5,9 ± 0,9 ^{a,*}	5,7 ± 0,7	5,8 ± 0,7	6,3 ± 0,8 [*]	7,3 ± 1,3 [*]	6,2 ± 0,8 [*]
Tibia li.	0,1 ± 0,1	7,3 ± 0,8 ^a	6,1 ± 0,6	7,7 ± 0,9 ^c	8,0 ± 1,1	10,2 ± 1,4 ^e	7,5 ± 0,9 ^f
Talus re.	2,5 ± 0,5 [*]	2,7 ± 1,1	3,2 ± 0,8	2,8 ± 0,4	3,6 ± 1,2 [*]	3,5 ± 1,3 [*]	4,6 ± 1,3
Talus li.	0,6 ± 0,5	2,6 ± 0,7 ^a	5,8 ± 1,7	3,4 ± 0,6	4,0 ± 1,3	4,3 ± 1,4	5,9 ± 1,3 ^d

Tabelle 9: Nieren- und Knochendurchblutung in der zweiten Versuchsreihe

Blutflüsse in [ml/min/100g] von Niere, Femur, Tibia und Talus für die rechte (Kontrollseite) und linke (Ischämieseite) Seite während der verschiedenen Injektionszeitpunkte in der zweiten Versuchsreihe. Die Zahlen sind die Mittelwerte ± SEM (n=7).

^a signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ischämie“

^b signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „1 min“

^c signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „5 min“

^d signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „15 min“

^e signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „30 min“

^f signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „60 min“

^{*} signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „links“

	Seite	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min
Caput femoris	re.	16,1 ± 0,6	14,6 ± 2,1	15,4 ± 2,0	13,3 ± 1,8	17,1 ± 3,1	16,2 ± 2,0	13,3 ± 2,5
	li.	14,8 ± 1,9	11,4 ± 2,0	14,0 ± 1,9	11,6 ± 2,2	12,1 ± 2,0	12,7 ± 2,0	11,9 ± 3,2
Trochanter major	re.	17,8 ± 1,3	17,3 ± 2,9	12,6 ± 2,7	17,5 ± 3,4	19,3 ± 4,2	16,2 ± 2,8	18,2 ± 3
	li.	18,0 ± 2,1	15,4 ± 1,7	13,7 ± 1,9	15,6 ± 1,9	16,9 ± 3,4	16,5 ± 3,7	15,0 ± 2,4
Collum femoris	re.	12,3 ± 1,9	12,7 ± 2,1	10,2 ± 2,0	11,2 ± 1,4	15,6 ± 3,0	15,3 ± 1,4	12,5 ± 1,9
	li.	13,3 ± 1,1	9,9 ± 1,9	11,3 ± 1,9	10,4 ± 1,4	12,2 ± 2,8*	13,5 ± 2,2	11,8 ± 1,9
Metaphysis proximalis	re.	10,6 ± 1,0	11,3 ± 1,7	7,5 ± 1,4	7,0 ± 1,2	9,9 ± 2,6	9,3 ± 1,3	9,8 ± 2,7
	li.	10,4 ± 0,6	8,5 ± 1,5	7,7 ± 1,3	7,7 ± 0,9	8,0 ± 1,9	8,6 ± 1,8	9,0 ± 2,3
Diaphysis	re.	4,2 ± 0,4	4,2 ± 1,1	3,0 ± 0,7	3,6 ± 0,9	4,2 ± 1,2	4,6 ± 0,7	4,6 ± 1,2
	li.	4,6 ± 0,7	3,3 ± 0,4	3,3 ± 0,9	3,4 ± 0,8	4,4 ± 1,6	4,8 ± 0,9	5,2 ± 1,5
Metaphysis distalis	re.	6,2 ± 0,5	6,0 ± 1,3	4,4 ± 0,8	4,9 ± 1,1	6,5 ± 1,7	6,3 ± 1,4	6,1 ± 1,6
	li.	3,2 ± 0,9*	5,2 ± 1,0	3,8 ± 0,9	3,8 ± 1,0	4,8 ± 1,4	5,0 ± 1,2	5,6 ± 1,6
Condylus medialis	re.	11,7 ± 0,9	8,7 ± 1,2	8,7 ± 1,3	8,3 ± 1,3	10,5 ± 1,7	8,5 ± 1,2	9,3 ± 1,3
	li.	4,9 ± 1,7*	11,1 ± 1,6	10,8 ± 1,6	9,3 ± 0,8	9,6 ± 1,7	11,9 ± 1,5*	9,9 ± 1,5
Condylus lateralis	re.	11,8 ± 0,8	9,5 ± 1,2	8,9 ± 1,2	8,8 ± 1,9	11,2 ± 1,8	9,5 ± 1,3	9,2 ± 1,2
	li.	7,6 ± 2,2	11,5 ± 1,4	10,3 ± 1,4	9,1 ± 1,0	8,8 ± 1,7	9,5 ± 2,0	8,9 ± 1,1

Tabelle 10: Regionale Knochendurchblutung des Femurs (Ischämiedauer 90 min)

RKBF in [ml/min/100g] im Femur (links: Ischämieseite, rechts: Kontrollseite). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=7).

* signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „rechts“

	Seite	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min
Condylus medialis	re.	14,8 ± 1,9	11,4 ± 2,8	10,6 ± 2,1	10,6 ± 1,7	11,6 ± 3,1	11,4 ± 3,2	10,3 ± 2,2
	li.	0,1 ± 0,1*	13,5 ± 2,1*	11,3 ± 0,9	14,3 ± 2,5	15,1 ± 3,2	18,1 ± 3,6	11,9 ± 2,4 ^c
Condylus lateralis	re.	16,2 ± 2,4	12,6 ± 2,7	11,1 ± 1,3 ^a	11,9 ± 2,0	11,3 ± 2,0	15,6 ± 4,4	11,0 ± 1,7
	li.	0,1 ± 0,1*	12,6 ± 1,8 ^a	10,2 ± 1,1	13,5 ± 1,5	14,5 ± 3,7	15,6 ± 3,1	12,4 ± 1,9
Metaphysis proximalis	re.	7,0 ± 0,7	5,5 ± 1,1	4,8 ± 0,7 ^a	5,0 ± 0,8	6,2 ± 1,5	5,1 ± 1,0	6,7 ± 1,6
	li.	0,0 ± 0,0*	8,8 ± 1,9 ^a	4,7 ± 0,9	7,1 ± 1,4	7,2 ± 2,9	8,9 ± 1,7 ^{*,b}	7,1 ± 1,9 ^c
Diaphysis proximalis	re.	3,3 ± 0,3	2,3 ± 0,4	2,3 ± 0,6 ^a	2,3 ± 0,5 ^a	2,8 ± 0,6	2,4 ± 0,5	2,8 ± 0,6
	li.	0,0 ± 0,0*	2,7 ± 0,5 ^a	2,2 ± 0,3	3,3 ± 0,9	3,8 ± 1,2	2,8 ± 1,0	3,0 ± 0,8
Diaphysis distalis	re.	2,9 ± 0,3	1,6 ± 0,4	1,5 ± 0,2 ^a	1,8 ± 0,4	2,3 ± 0,8	2,3 ± 0,2	2,5 ± 0,5
	li.	0,0 ± 0,0*	2,2 ± 0,5 ^a	2,1 ± 0,4	3,0 ± 0,8	3,3 ± 1,4	4,4 ± 2,1	2,8 ± 0,7
Metaphysis distalis	re.	4,6 ± 0,5	3,1 ± 0,8	3,1 ± 0,6	3,1 ± 0,4	4,1 ± 1,7	3,9 ± 1,3	3,3 ± 0,9
	li.	0,2 ± 0,1*	3,6 ± 1,5 ^a	3,3 ± 0,4	3,6 ± 0,7	5,2 ± 1,9	5,8 ± 1,8	4,4 ± 1,1
Epiphysis distalis	re.	5,5 ± 0,7	4,4 ± 1,1	5,3 ± 1,0	5,2 ± 0,7	6,5 ± 2,3	6,5 ± 1,7	5,5 ± 1,4
	li.	0,4 ± 0,4*	7,3 ± 1,9 ^a	7,9 ± 1,2 [*]	8,5 ± 1,3	7,9 ± 2,1	12,9 ± 6,8	11,6 ± 3,4

Tabelle 11: Regionale Knochendurchblutung der Tibia (Ischämiedauer 90 min)

RKBF in [ml/min/100g] in der Tibia (links: Ischämieseite, rechts: Kontrollseite). Dargestellt sind die Mittelwerte ± SEM (n=7).

^a signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ischämie“

^b signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „links 5 min“

^c signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „links 60 min“

* signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „rechts“

	Seite	Ischämie	1 min	5 min	15 min	30 min	60 min	90 min
M. gastrocnemius	re.	8,3 ± 1,3	7,8 ± 1,5	8,8 ± 1,3	8,5 ± 2,1	8,2 ± 1,9	7,0 ± 1,6	6,2 ± 0,8
	li.	1,4 ± 0,9 [*]	54,5 ± 8,1 ^{b,*}	55,7 ± 5,8 [*]	38,4 ± 4,5 ^{*,c}	24,1 ± 2,5 ^{*,d}	17,9 ± 3,3 [*]	9,3 ± 0,5 ^{*,e}
M. tibialis anterior	re.	9,7 ± 1,4 ^a	10,8 ± 2,3	11,7 ± 2,3	10,4 ± 3,5	9,7 ± 2,8	8,6 ± 2,5	7,4 ± 1,4
	li.	0,8 ± 0,6 ^{b,*}	28,4 ± 5,0 ^{b,*}	44,1 ± 6,4 [*]	37,2 ± 5,6 [*]	32,4 ± 2,0 [*]	26,1 ± 3,3 [*]	16,5 ± 2,9 ^{*,e}

Tabelle 12: Muskeldurchblutung in der zweiten Versuchsreihe

Die Blutflüsse [ml/min/100g] in den Muskeln (links: Ischämieseite, rechts: Kontrollseite) sind als Mittelwerte ± SEM (n=7) angegeben.

^a signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „rechts M. gastrocnemius“

^b signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „Ischämie“

^c signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „5 min“

^d signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „15 min“

^e signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „60 min“

^{*} signifikanter Unterschied (p<0,05) zu „rechts“

	1h Ischämie	2h Ischämie	Faktor
Femur Condylus medialis	9,4 ± 1,5	11,9 ± 1,5	1,3
Femur Condylus lateralis	8,9 ± 2,1	11,5 ± 1,4	1,3
Tibia Condylus medialis	9,3 ± 1,5	18,1 ± 3,6	1,9
Tibia Condylus lateralis	12,4 ± 2,5	15,6 ± 3,1	1,3
Tibia Metaphysis proximalis	6,1 ± 0,5	8,9 ± 1,7	1,5
Tibia Diaphysis proximalis	4,2 ± 0,4	3,3 ± 0,9	0,8
Tibia Diaphysis distalis	2,1 ± 0,6	4,4 ± 2,1	2,1
Tibia Metaphysis distalis	2,8 ± 1,0	5,8 ± 1,8	2,1
Tibia Epiphysis distalis	6,3 ± 1,2	12,9 ± 6,8	2,0

Tabelle 13: *Vergleich der maximalen Blutflusswerte beider Versuchsreihen*

In der Tabelle sind die maximal gemessenen Blutflusswerte [ml/min/100g] in den verschiedenen Knochenregionen für beide Versuchsreihen aufgelistet. Zusätzlich ist der Multiplikationsfaktor um den sich die Maximalwerte aus V1 und V2 unterscheiden, angegeben. Die Werte sind Mittelwerte ± SEM.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Herrn PD Dr. med. Hermann Anetzberger, ehemals leitender Oberarzt der Klinik und Poliklinik für Sportorthopädie der Technischen Universität München, für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und die Hilfe bei der Planung und Umsetzung der Versuche bedanken. Seine Kritik und Verbesserungsvorschläge beim Verfassen dieser Arbeit waren sehr hilfreich.

Besonders will ich mich bei meinem Freund Herrn Dr. med. Arne Venjakob, Mitglied der Arbeitsgruppe, bedanken. Die erfolgreiche Durchführung der Versuche im Chirurgischen Forschungszentrum war nur durch die gegenseitige Hilfestellung und gute Zusammenarbeit möglich.

Danken will ich auch Herrn Dr. vet. Eckart Thein. Als direkter Ansprechpartner im Chirurgischen Forschungszentrum half er mit großem Einsatz bei der Organisation der Tierversuche und der Auswertung der Proben.

Von ganzem Herzen danke ich auch meiner Familie, meiner Frau Barbara und meinen Kindern Nicklas und Jonas für die Geduld und moralische Unterstützung bei der Fertigstellung der Arbeit.