

Aus der Chirurgischen Klinik und Poliklinik der Ludwig-Maximilians-Universität
München

Vorstand: Prof. Dr. med. K.-W. Jauch

**ETABLIERUNG EINES NEUEN MINIMAL-INVASIVEN MODELLS ZUR
CHRONISCHEN MESSUNG DER ORGANPERFUSION AM KANINCHEN**

Dissertation

zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Sonja Steinhagen

aus

Aachen

2004

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München.

Berichterstatter: PD Dr. med. Johannes N. Hoffmann

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. A. Baethmann
PD Dr. med. J. M. Davis

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Klaus Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 21.10.2004

Inhaltsverzeichnis:

Seite

1. Einleitung	6
1.1 Mikrosphären.....	6
1.1.1 Grundlagen der Mikrosphärenmethode und Berechnung des regionalen Blutflusses	6
1.1.2 Entwicklung der Mikrosphärenmethode	8
1.1.2.1 Messung des Blutflusses mit radioaktiven Mikrosphären	8
1.1.2.1.1 Historie und Grundlagen der Mikrosphärentechnik.....	8
1.1.2.1.2 Nachteile der radioaktiven Mikrosphären.....	19
1.1.2.2 Zusammenfassung.....	20
1.1.3 Nichtradioaktive Mikrosphären.....	24
1.1.3.1 Farbige Mikrosphären	24
1.1.3.2 Fluoreszenzmarkierte Mikrosphären	25
1.1.3.3 Zusammenfassung.....	31
1.2 Sepsis	33
1.3 Ziel der Arbeit.....	37
2. Material und Methoden	38
2.1 Material	38
2.1.1 Geräte.....	38
2.1.2 Sonstige Materialien	39
2.1.3 Medikamente	41
2.1.4 Versuchstiere.....	41
2.2 Methoden	42
2.2.1 Tierhaltung.....	42
2.2.2 Design des implantierten Portkatheters	42
2.2.3 Portimplantation.....	44
2.2.4 Injektion der Mikrosphären.....	48
2.2.5 Gewinnung der Referenzprobe.....	49
2.2.6 Kontrollgruppe	50
2.2.7 Peritonitismodell	51
2.2.8 Detailliertes Vorgehen bei den einzelnen Versuchsschritten	52
2.2.9 Messzeitpunkte in der Zusammenfassung.....	54
2.2.10 Sektion.....	55

2.2.11	Probenaufarbeitung	56
2.2.12	Probenmessung.....	59
2.2.13	Bestimmung der S-100b-Werte	61
2.3	Berechnung der Blutflusswerte.....	62
2.4	Statistik.....	63
3.	Ergebnisse	64
3.1	Implantation des Portkatheters.....	64
3.2	Gewichtsverlauf und Hämodynamik der Kontrollgruppe.....	67
3.3	Hämodynamik der Peritonitisgruppe	74
3.4	Perfusionswerte.....	80
3.4.1	Vergleich Rechts – Links bei der Kontrollgruppe	80
3.4.2	Vergleich Rechts – Links bei der Peritonitisgruppe.....	87
3.4.3	Vergleich Perfusionswerte Kontrollgruppe - Peritonitisgruppe	92
4.	Diskussion	106
4.1	Auswahl der Mikrosphären – radioaktiv versus fluoreszenzmarkiert	106
4.2	Voraussetzungen für die Perfusionsmessung mit Mikrosphären.....	108
4.3	Grundsätzliches.....	111
4.3.1	Voraussetzungen für die Untersuchung.....	111
4.3.2	Auswahl der Tiere	112
4.3.3	Wahl der Narkose	113
4.3.4	Wahl der Meßmethode für die Mikrosphären.....	113
4.4	Voraussetzungen für die repetitive Injektion.....	116
4.4.1	Entwicklung eines chronischen Zugangs	116
4.4.2	Cerebrale Perfusion	118
4.4.3	Wahl des Katheterortes	119
4.5	Minimal invasiv versus invasive Messmethode	121
4.6	Validität der chronischen Messungen.....	123
4.6.1	Portimplantation.....	123
4.6.2	Kontrollgruppe	123
4.6.2.1	Hämodynamik	123
4.6.2.2	Perfusion über die Zeit	124
4.6.2.3	Perfusion im Seitenvergleich	125
4.6.2.4	Perfusionswerte im Literaturvergleich	126
4.6.3	Peritonitisgruppe.....	127

4.6.3.1 CLP-Modell	127
4.6.3.2 Perfusionswerte allgemein	128
4.6.3.3 Perfusion im Vergleich mit der Kontrollgruppe	129
4.6.3.4 Einschränkung der Ergebnisse	130
5. Zusammenfassung	131
6. Literaturverzeichnis	134
7. Danksagung	152
8. Lebenslauf	153

1. Einleitung

1.1 Mikrosphären

1.1.1 Grundlagen der Mikrosphärenmethode und Berechnung des regionalen Blutflusses

Durch die kürzlich eingeführten radioaktiven, farbig oder fluoreszenzmarkierten Mikrosphären ist die sequentielle Injektion zur Messung des Blutflusses in einzelnen Organen erst möglich geworden. Mit dieser Methode kann der kapilläre Blutfluss innerhalb eines Gewebes oder Organs durch die arterielle Injektion von Latexpartikeln verschiedener Größen, von 7 μm bis 50 μm Durchmesser (sogenannte Mikrosphären), zu verschiedenen Zeitpunkten quantitativ erfasst werden. Sie stellt somit eine Möglichkeit dar, die kapilläre Durchblutung aufgrund der Eigenschaft der Partikel, im Kapillarbett in Abhängigkeit von der Durchblutung hängen zu bleiben, zu messen (103). Dieser Vorgang wird als *trapping* bezeichnet. Das *trapping* basiert auf dem Prinzip, dass sich die Mikrosphären in Übereinstimmung mit der regionalen Durchblutung verteilen, nachdem sie in das linke Atrium oder den linken Ventrikel injiziert werden. Durch die in Atrium und Ventrikel vorherrschende turbulente Strömung ist gewährleistet, dass sich die injizierten Mikrosphären gleichmäßig im Blut verteilen. Der Anteil der Mikrosphären, die in dem Kapillarbett des jeweiligen Organs gefangen bleiben, korreliert direkt mit dem Anteil an der Auswurfleistung des Herzens und ist damit proportional zum regionalen Blutfluss (142). Sollten Mikrosphären durch arterio-venöse Anastomosen den arteriellen Kreislauf bereits vor dem Kapillarbett verlassen, so werden sie im Kapillarbett der Lunge vollständig abgefangen und so wird verhindert, dass sie ein zweites Mal in den großen Kreislauf gelangen (114).

Damit diese Methode zuverlässig den Blutfluss in den unterschiedlichen Organen messen kann, müssen mehrere Voraussetzungen erfüllt sein. Zum einen müssen die Mikrosphären vor der Injektion gut vermischt werden, um eine gleichmäßige Verteilung zu gewährleisten. Zudem sollten sie sich weiterhin nach der Injektion

proportional zum regionalen Blutfluss in den einzelnen Organen verteilen und schon während der ersten Kreislaufzeit in den Kapillargefäßen gefangen bleiben. Die Mikrosphäreninjektion sollte die Durchblutung nicht beeinflussen. Wenn diese Kriterien erfüllt sind, kann der Blutfluss in jedem Organ gemessen werden (25).

Die Messung der absoluten Werte der regionalen Blutflüsse kann prinzipiell auf zwei Arten durchgeführt werden. Zum einen kann das Herzminutenvolumen zu den Injektionszeitpunkten via Thermodilutionsmessung mit Hilfe eines Pulmonalkatheters bestimmt werden und aus den durch die Mikrosphärenmethode gewonnenen Werten prozentuale Anteile errechnet werden, welche dann mit dem Herzzeitvolumen zu absoluten Werten umgerechnet werden. Zum anderen kann der Blutfluss in einem bestimmten Organ gemessen werden und die radioaktive, Fluoreszenz- bzw. Farbtintensität dieses Organs in einen absoluten Wert umgewandelt werden. Mit Hilfe dieses Wertes können dann auch die absoluten Blutflusswerte in den anderen Zielorganen bestimmt werden. Durch die Entnahme von Blut aus einer Arterie mit einem bekannten, konstanten Fluss während einer Mikrosphäreninjektion kann dieses Organ „simuliert“ werden und so eine Referenzprobe gewonnen werden, in der die Intensität der vorhandenen Mikrosphären bestimmt wird. Dadurch kann dann mit Hilfe des bekannten Flusswertes der Blutfluss in allen anderen interessierenden Regionen zu diesem Zeitpunkt berechnet werden. Unerlässlich ist die Beachtung bestimmter Grundvoraussetzungen zur Gewinnung einer gültigen Referenzprobe: Diese muss über eine bestimmte Zeitdauer mit einer Mindestflussrate gewonnen werden und muss eine bestimmte Minimalmenge an Mikrosphären enthalten. Nur bei Erfüllung dieser Kriterien ist die Referenzprobenentnahme eine einfache und gut reproduzierbare Methode, um absolute Organflüsse zu erhalten (25).

1.1.2 Entwicklung der Mikrosphärenmethode

1.1.2.1 Messung des Blutflusses mit radioaktiven Mikrosphären

1.1.2.1.1 Historie und Grundlagen der Mikrosphärentechnik

1967 wurde erstmals eine Durchblutungsmessung mit Hilfe von Mikrosphären an einem Schafffötus durchgeführt (114). Hierzu wurden karbonisierte Mikrosphären von 50 µm Größe (3M, Minnesota, U.S.A.) verwendet. Diese Mikrosphären bestanden aus Karbon und Sauerstoff und hatten Radionuklide inkorporiert, so dass die Aktivität, die nach Injektion in einem Gewebestück vorhanden war, mit Hilfe eines γ -Counters bestimmt werden konnte. Durch die Inkorporation der Radionuklide in die Mikrosphären wurde die Ablösung verhindert, wie es bei reiner Anlagerung der Fall gewesen wäre. Die mögliche Ablösung von Radionukliden wurde von Rudolph und Heyman überprüft, indem die Radioaktivität im Überstand einer Suspension bestimmt wurde, in der die Mikrosphären über Monate gelagert waren. Es fand sich hierbei keinerlei Radioaktivität im Überstand. Diese Mikrosphären wurden in einer 20%igen Dextranlösung suspendiert, der zur Verhinderung der Aggregation Polyoxyethylen(20)-sorbitan-mono-oleat (Tween80) zugesetzt wurde (34, 114).

Mit Hilfe von Mikrosphären, die verschiedene Radionuklide beinhalten, konnten Änderungen des Blutflusses über die Zeit gemessen werden, indem für die Injektionen zu verschiedenen Zeitpunkten Mikrosphären verwendet wurden, die mit unterschiedlichen Radionukliden markiert waren.

Mit Hilfe der Gammaskopie können die Spektren der jeweiligen Nuklide in der Gewebeprobe durch Trennung einzeln ausgewertet werden.

Zur Zeit sind über die Firma NEN-Trac® Research Products, Ma, U.S.A. elf verschiedene Mikrosphären, die mit den folgenden Isotopen markiert sind, erhältlich:

- Cadmium-109 (Cd^{109} , Halbwertszeit 462,6 Tage)
- Cerium-141 (Ce^{141} , 32,5 Tage)
- Chrom-51 (Cr^{51} , 27,7 Tage)
- Cobalt-57 (Co^{57} , 271,7 Tage)
- Gadolinium-153 (Gd^{153} , 242,0 Tage)

- Indium-114 (Id^{114} , 49,5 Tage)
- Niobium-95 (Nb^{95} , 34,9 Tage)
- Ruthenium-103 (Ru^{103} , 39,3 Tage)
- Scandium-46 (Sc^{46} , 83,8 Tage)
- Strontium-85 (Sr^{85} , 64,8 Tage)
- Zink-113 (Zn^{113} , 115,1 Tage)

Diese Nuklide besitzen jeweils ein spezifisches Energiespektrum und können so auch in Anwesenheit anderer Isotope mit Hilfe der Gammaskopie zweifelsfrei voneinander differenziert werden (114). Die heute verwendeten Mikrosphären bestehen nicht mehr aus Kohlenstoff, sondern aus Polystyrol, auch hier sind die Radionuklide in das Material inkorporiert. Ihre mittlere Dichte beträgt 1,3 g/ml, sie können mit unterschiedlichen Durchmessern geliefert werden.

Für die Messung der Perfusion werden heutzutage üblicherweise Mikrosphären mit den Durchmessern 10 μm ($11,3 \mu\text{m} \pm 0,1 \mu\text{m}$) und 15 μm ($16,5 \pm 0,1 \mu\text{m}$) eingesetzt (49), da diese am zuverlässigsten in den Präkapillaren gefangen werden. Zur Bestimmung der Quantität des Blutflusses bestimmten Rudolph und Heyman die Radioaktivität der zu injizierenden Mikrosphären vor der Injektion und ermittelten am Ende des Experimentes den Anteil der injizierten Radioaktivität für jede Organregion, um so die relative Blutflussrate in Prozent zu erhalten (114).

Diese Methode erlaubt daher nur die Ermittlung eines prozentualen, nicht aber eines absoluten Wertes. Da aber nur der absolute Wert der Perfusionsrate wirkliche Vergleiche ermöglicht, musste eine Möglichkeit gefunden werden, den Blutfluss quantitativ zu bestimmen. Ein erster Ansatz wurde 1969 von Wagner et al. präsentiert. Er nahm an, dass der Anteil an Mikrosphären, welcher in der jeweiligen Organregion gefunden wurden, direkt proportional zu dem Anteil am Herzzeitvolumen war. Daraus ergab sich folgende Formel:

$$\text{BF}_{\text{reg}} = \text{HZV} * C_{\text{reg}} / C_{\text{inj}}$$

wobei BF_{reg} der regionale Blutfluss, HZV das Herzzeitvolumen, C_{reg} die Anzahl der Mikrosphären im Organ und C_{inj} die Gesamtzahl an injizierten Mikrosphären ist.

Bei bekanntem Herzzeitvolumen lässt sich der absolute Blutflusswert für jede Organregion bestimmen (145).

Eine weitere Möglichkeit zeigten Domenech et al 1968 auf. Es wurde der absolute Blutflusswert mit Hilfe einer arteriellen Referenzprobe ermittelt, welche mit einem konstanten Abzugsvolumen von 20 ml/min von Beginn der Injektion an und bis zu 15 – 30 Sekunden nach Beendigung der Injektion mit Hilfe eines in einer peripheren Arterie liegenden Katheters gewonnen wurde. Grundlage dieser Methode war die Tatsache, dass bei bekanntem Blutfluss für ein Organ dieser für alle anderen Organe und Organregionen mit Hilfe der folgenden Gleichung berechnet werden kann:

$$BF_{\text{reg}} = C_{\text{reg}} * F_{\text{ref}} / C_{\text{ref}}$$

wobei BF_{reg} der regionale Blutfluss, C_{reg} die Radioaktivität und damit die Anzahl der Mikrosphären in der Gewebeprobe, F_{ref} die Abzugsgeschwindigkeit der arteriellen Referenzprobe und C_{ref} die Radioaktivität und damit die Anzahl der Mikrosphären in der arteriellen Referenzprobe bedeutet. Somit stellt die arterielle Referenzprobe eine Art „künstliches Organ“ dar, dessen Blutfluss bekannt ist, und somit als Berechnungsgrundlage für alle anderen realen Organregionen dient (34).

Am wichtigsten ist für den Erhalt von präzisen und vergleichbaren Perfusionsmessungen allerdings vor allem die gesamte Zahl an injizierten Mikrosphären sowie die Anzahl an Mikrosphären, die in den zu untersuchenden Gewebeproben enthalten sind. Eine Arbeitsgruppe um Buckberg errechnete auf der Grundlage einer binominalen Verteilung der Mikrosphären und der daraus resultierenden Annahme, dass die Anzahl an Mikrosphären, die in einer Probe enthalten sind, proportional zum Volumen sein muss, eine Mindestanzahl von 384 Mikrosphären pro Gewebeprobe, ab der die aus einer Probe ermittelten Werte verlässlich sind (25). Diese Zahl wurde aus praktischen Gründen auf 400 erhöht. In einer Reihe von Experimenten wurde diese theoretische Annahme in vivo nachvollzogen. Der renale und koronare Blutfluss wurde bei Hunden und Schafen mit in die Gefäße eingebrachten Flussmessern ermittelt und gleichzeitig mit Hilfe der Mikrosphärenmethode bestimmt. Es ergab sich für Gewebeproben mit weniger als 400 Mikrosphären eine mittlere Abweichung von mehr als 15%, bei Gewebeproben mit mehr als 400 Mikrosphären lag die mittlere Abweichung der renalen Durchblutung bei 6%, die der koronaren Durchblutung bei 10%. Dieses Ergebnis bestätigte also die Festlegung der Mindestanzahl an Mikrosphären in einer Gewebeprobe zur sicheren und wiederholbaren Perfusionsmessung (25).

Näherungsweise kann für die verschiedenen Spezies für die einzelnen Organe der Prozentsatz des Herzzeitvolumens aus der Literatur entnommen werden (91), so dass die Menge an Mikrosphären, die zur Untersuchung der Perfusion der in Frage kommenden Organregionen injiziert werden muss, mit der folgenden Gleichung berechnet werden kann:

$$N_{\min} = 400 * n * (Q_{\text{org}} / Q_{\text{ges}})$$

wobei N_{\min} die Mindestmenge an Mikrosphären, n die Anzahl an Proben, in die das betreffende Organ unterteilt wird, und $(Q_{\text{org}} / Q_{\text{ges}})$ der Anteil am Herzzeitvolumen ist, der das Organ durchströmt (25).

In einem weiteren Experiment wurde die mittels Mikrosphären des Durchmessers 15 μm errechnete Flussrate mit der über die Para-Aminohippurat (PAH) -Clearance bestimmten Flussrate in der Niere von Hunden verglichen. Sowohl die Messungen mit PAH als auch mit den Mikrosphären wurden repetitiv durchgeführt und die so erhaltenen Mittelwerte miteinander verglichen. Es zeigte sich eine beinahe ideale Übereinstimmung beider Werte (PAH-Clearance: $129,7 \pm 6,8$ ml/min, Mikrosphären: $128,7 \pm 7,8$ ml/min) (7).

Die Frage, inwieweit die Ergebnisse von dem Durchmesser der Mikrosphären abhängen, wurde in einem Versuch beantwortet, welcher den Blutfluss des Myokards von Hunden nach linksatrialer Injektion von Mikrosphären der Durchmesser 1 – 10 μm (wobei 40 – 80% kleiner als 7 μm waren), 7 μm , 9 μm , 15 μm und 25 μm , jeweils mit einem anderen Radionuklid markiert, untersuchte. Es wurde sowohl eine arterielle wie auch eine venöse Referenzprobe entnommen, um die Shuntrate ermitteln zu können, mit der die errechneten Blutflusswerte korrigiert wurden, um vergleichbar Daten zu erhalten. In jedem Fall wurde 0 – 40 Sekunden nach den Mikrosphäreninjektionen Antipyrin zur Vasodilatation injiziert. Bei einem Teil der Tiere wurde zusätzlich eine Vasodilatation mittels ATP-Injektion durchgeführt, bei einer anderen Gruppe mittels Schrittmachern eine Herzfrequenzsteigerung erreicht, einer Gruppe wurde Methoxamin verabreicht, um eine Hypertonie herbeizuführen und bei einer weiteren Gruppe wurde mit Hilfe einer Aortenligatur eine subendokardiale beziehungsweise mit Hilfe einer Koronararterienligatur eine regionale Ischämie des Myokards herbeigeführt. Der Vergleich der über die Mikrosphärenmethode errechneten Werte untereinander wie auch mit den über die Antipyrininjektion

erhaltenen Werten ergab keine signifikanten Unterschiede, daher konnte ein signifikanter Einfluss der Vasodilatation auf die Shuntrate ausgeschlossen werden (136). Bei Vergleichen der Durchblutung der subepi-, myo- sowie subendokardialen Regionen fand sich bei größeren Mikrosphärendurchmessern eine geringe Unterschätzung im subepikardialen sowie eine geringe Überschätzung im subendokardialen Gewebe. Aus diesen Experimenten folgte, dass sich Mikrosphären des Durchmessers 9 μm am besten für Perfusionsmessungen am Herzen eignen, da sie sich am ähnlichsten zu den Erythrozyten verhalten und die Shuntrate für kleinere Mikrosphären zu hoch ist. Die Hämodynamik zeigte keine Einflussnahme auf die Ermittlung der Blutflussraten, weder bei der Antipyrin- noch bei der Mikrosphärenmethode, wichtig ist allein die Wahl des geeigneten Durchmessers der Mikrosphären (136).

Andere Studien von Fan et al, Bond et al. sowie Gelman et al. zeigten ebenfalls, dass der Shuntfluß sich mit sinkendem Durchmesser der Mikrosphären deutlich erhöht, was zu falsch-hohen Blutflusswerten führt. Besonders auffällig ist dies in der Niere, wo die Mikrosphären mit einem Durchmesser unter 15 μm durch die Kapillaren der Glomerula shunten und anschließend in den Kapillaren der Medulla gefangen bleiben, was zu einer Überschätzung der medullären Perfusion führt (38). Ebenfalls zu einer zu hohen Einschätzung des Blutflusses führt der Einsatz von kleinen Mikrosphären (9 μm Durchmesser) bei der Untersuchung der Leber, hier ist der zu hoch ermittelte Wert Folge eines Shuntings von bis zu 24% im Intestinum (20, 46).

Man kann daher feststellen, dass der Durchmesser der Mikrosphären einen entscheidenden Einfluss darauf hat, ob die ermittelte Perfusion mit der zum Zeitpunkt der Injektion auch tatsächlich vorherrschenden Perfusion übereinstimmt, da nur die in den Kapillaren hängen bleibenden Mikrosphären in die Berechnung mit eingehen. Ist der Durchmesser zu groß, besteht die Gefahr, dass sie bereits in den präkapillären Gefäßen oder sogar in den Arteriolen bleiben, bei einem zu klein gewählten Durchmesser werden sie womöglich durch die Kapillaren hindurch in das venöse Gefäßsystem transportiert. Ein Experiment von Warren et al untersuchte die Nieren von Kaninchen mikroskopisch, nachdem diesen Mikrosphären der Durchmesser 15 und 25 μm injiziert worden waren (150). Hier fanden sich 95% der 15 μm Mikrosphären in den Kapillaren, der größte Anteil der 25 μm Mikrosphären befand sich jedoch in den Interlobulararterien, das heißt also vor dem Kapillarsystem. Außerdem hatte die Verstopfung dieser Interlobulararterien durch 25 μm -

Mikrosphären eine Akkumulation weiterer 25 µm-Sphären proximal im Gefäßsystem zur Folge, was ebenfalls zu falschen Messergebnissen führte. Darüber hinaus waren Hämorrhagien aufgrund des lokal erhöhten Druckes in den Gefäßen zu beobachten (150).

Zur Gewinnung der Referenzprobe liegen verschiedene Untersuchungen vor: Zum einen wurde die Dauer der Blutentnahme nach der Mikrosphäreninjektion bestimmt, welche gewährleistet, dass alle noch zirkulierenden Mikrosphären erfasst werden. In einer Studie wurde nach linksatrialer Injektion die arterielle Referenzprobe fraktioniert in drei jeweils 30 Sekunden andauernden Intervallen aus der Arteria femoralis gewonnen. In der letzten Fraktion konnte zu keinem Zeitpunkt Radioaktivität nachgewiesen werden. Daher kann angenommen werden, dass sich 1 Minute nach der Injektion keine Mikrosphären mehr in der Zirkulation befinden, so dass dieser Zeitraum für die Gewinnung der Referenzprobe ausreichend wäre (5). Eine weitere Studie kam zu dem gleichen Ergebnis, jedoch wird hier aus Sicherheitsgründen ein Zeitraum von 3 Minuten nach Beginn der Injektion für die Gewinnung der Referenzprobe empfohlen (26).

Darüber hinaus wurde der Einfluss des Entnahmeortes der Referenzprobe auf die Variabilität der Anzahl der Mikrosphären und damit auf die Berechnung des Blutflusses untersucht. Ein Vergleich von arteriellen Referenzproben, welche mit Hilfe einer Harvard-Pumpe paarweise und gleichzeitig peripher arteriell aus der rechten und linken Arteria carotis, der Arteria carotis und der Arteria femoralis, der rechten und linken Arteria femoralis sowie zentral aus der Aorta abdominalis bei Schafen und Hunden entnommen wurden, konnte in keinem Fall systematische Unterschiede zwischen den einzelnen Entnahmeorten nachweisen (25).

Zur weiteren Validierung der Methode konnte mikroskopisch nachgewiesen werden, dass sich die Mikrosphären sowohl homogen im Blutstrom verteilen als auch aufgrund ihrer den Blutzellen ähnlichen Dichte vor allem im axialen Strombereich, ähnlich der Erythrozyten transportiert werden (103). Außerdem wurden in einer anderen Arbeit verschiedene Injektionsorte miteinander verglichen (71). Die nach linksatrialer sowie linksventrikulärer Injektion berechneten Flusswerte ergaben keinen signifikanten Unterschied für die unterschiedlichen Organe. Einzige Ausnahme bildete das Herz, wo nur die atriale Injektion vergleichbare Werte lieferte. Für Berechnungen von Werten für die anderen Organe ergibt sich somit eine freie Wahl des Injektionsortes (71).

Ferner musste ausgeschlossen werden, dass die Mikrosphären aufgrund arterio-venöser Anastomosen rezirkulieren und so zu falsch-hohen Werten und damit zu einer Überschätzung der aktuellen regionalen Perfusion führen. In einer Untersuchung von Rudolph et al. konnte sowohl eine Shuntrate und damit eine Rezirkulation durch die Lunge als auch eine signifikante Shuntrate durch das Kapillarbett der Organe ausgeschlossen werden (114).

Eine weitere Studie von Neutze et al. belegte mittels ähnlicher Untersuchungen, dass die Shuntrate durch arterio-venöse Anastomosen deutlich unter 1% liegt und damit die Rezirkulation einen zu vernachlässigenden Faktor darstellt (99).

Allerdings vergrößert sich die Shuntrate mit geringer werdendem Durchmesser der Mikrosphären, da der Vorgang des *trappings* allein von den mechanischen Eigenschaften der Mikrosphären und nicht von etwaigen biologischen oder chemischen Faktoren beeinflusst wird. In einer Studie wurden Hunden Mikrosphären mit fünf unterschiedlichen Durchmessern (25 μm , 15 μm , 9 μm , 7 μm und 1 – 10 μm (davon 40 – 80% < 7 μm)), die mit fünf verschiedenen Radionukliden markiert waren, linksatrial simultan injiziert, was bedeutet, dass die Mikrosphären mit den unterschiedlichen Durchmessern vor der Injektion in dem Injektionsgefäß vermischt wurden. Es wurde eine arterielle Referenzprobe aus der Arteria femoralis und eine venöse Referenzprobe aus dem Sinus coronarius entnommen. Hierbei ergab sich für die 1 – 10 μm -Sphären eine Shuntrate von 27,6%, die für alle weiteren Mikrosphären deutlich sank und ab den 9 μm -Sphären unter 1,1% lag. Aufgrund dieser Ergebnisse und bei nicht gemessener Shuntrate wird dazu geraten, Mikrosphären mit einem Durchmesser von mehr als 7 μm zu verwenden (136).

Marshall et al. untersuchten die Veränderung der Shuntrate durch Vasodilatation, die durch ATP am isolierten Hundeherzen induziert wurde. Hierbei wurde eine Simultaninjektion von Mikrosphären mit den Durchmessern 9 μm und 15 μm vor und nach Vasodilatation durchgeführt (87). Eine venöse Referenzprobe wurde aus dem Sinus coronarius zur Bestimmung der Shuntrate entnommen. Es ergab sich unter Normalbedingungen bei 15 μm Durchmesser eine Shuntrate von 5%, welche nach Vasodilatation einen relativen Anstieg um 2,5 % erfuhr. Bei 9 μm Durchmesser ergab sich schon unter Normalbedingungen ein Shunt von 5 – 10%, der nach Vasodilatation auf bis zu 13,5% anstieg (87). Darüber hinaus untersuchte man die Shuntrate bei Mikrosphären ebenfalls dieser zwei Durchmesser an der Hundeniere mit und ohne Vasodilatation. Hier wurde linksatrial injiziert und die venöse

Referenzprobe aus der Vena renalis entnommen. Auch hier stieg die Shuntrate der Mikrosphären mit 9 µm Durchmesser nach Vasodilatation gegenüber der der Mikrosphären mit 15 µm Durchmesser signifikant an (137). Eine umfassendere Studie (38), bei der die Vasodilatation durch Erhöhung des arteriellen p_{CO_2} auf 57,8 mmHg ($\pm 2,72$ mmHg) mittels Inhalation von CO_2 erreicht wurde, untersuchte die Shuntrate von 9 µm und 15 µm Mikrosphären in den folgenden Organen: Gehirn, Myokard, Jejunum, Niere, Leber, Milz und Lunge. Die Injektion erfolgte linksventrikulär, die arterielle Referenzproben wurden aus der Arteria thoracica und abdominalis und die venösen Referenzproben aus der Vena renalis, Vena porta, dem Sinus sagittalis sowie dem Sinus coronarius entnommen. Ähnlich der anderen Untersuchungen wurden die Mikrosphären vor Injektion gemischt und jeweils vor und nach Vasodilatation injiziert. Beide Mikrosphärendurchmesser zeigten keinen signifikanten Anstieg in der Shuntrate im Gehirn nach Vasodilatation. Im Herzen allerdings stieg der Shunt nach Vasodilatation für die 9 µm großen Mikrosphären signifikant an (von 3,3% auf 8,1%). Dies wurde jedoch für die 15 µm großen Mikrosphären nicht festgestellt, hier blieb die Shuntrate nahezu gleich. Auch in der Niere, der Milz, der Leber und dem Jejunum erhöhte sich die Shuntrate für die 15 µm Mikrosphären nicht, sowohl für Normal- wie auch für vasodilatatorische Bedingungen fanden sich unter 1% der injizierte Mikrosphären in den venösen Referenzproben. Für die 9 µm Mikrosphären fand sich hingegen in den erwähnten Organen ein signifikant höherer Shuntfluß sowohl unter physiologischen wie vor allem auch unter vasodilatatorischen Bedingungen. In der Lunge fand sich ein nur gering erhöhter Prozentsatz an geschunteten Mikrosphären mit 9 µm Durchmesser nach Vasodilatation, die Menge an geschunteten Mikrosphären mit 15 µm Durchmesser lag gleichbleibend unter 1%, unabhängig vom Gefäßdurchmesser (38).

Daraus ergibt sich, dass unter Versuchsbedingungen, welche die Möglichkeit einer Vasodilatation beinhalten, Mikrosphären mit einem Durchmesser von 15 µm verwendet werden sollten.

Eine weitere Arbeitsgruppe beschrieb das Verhalten der Mikrosphären im Hundemyokard bei Erhöhung des Blutdruckes (29). Hier wurden zunächst Mikrosphären mit einem Durchmesser von 9 µm verwendet. Mit Hilfe einer arteriellen Referenzprobe aus einer Koronararterie sowie eine venöse Referenzprobe aus dem Sinus coronarius, genauer Blutdruckeinstellung in der Arteria coronaria communis sinistra konnte festgestellt werden, dass sowohl eine alleinige Erhöhung des

Blutdruckes als auch eine Erhöhung des Blutdruckes und der inspiratorischen Sauerstoffkonzentration sowie eine isolierte Erhöhung des arteriellen Druckes in der Arteria coronaria communis sinistra ohne Druckerhöhung in der Aorta einen signifikanter Anstieg des Shunts der Mikrosphären erzeugte. Bei einer Vergleichsgruppe wurden Mikrosphären der Durchmesser 9 und 25 μm gleichzeitig injiziert und die Shuntrate bei normalen und hypertensiven Drücken (198 mmHg) verglichen. Die Shuntrate der 9 μm großen Mikrosphären stieg bei den hohen Drücken wie auch schon bei den vorangegangenen Experimenten deutlich an (von 4,3 auf 9,1%), wohingegen bei den 25 μm großen Mikrosphären zu keinem Zeitpunkt ein Shunt nachgewiesen werden konnte. Bei einer weiteren Versuchsgruppe wurde nach der Mikrosphäreninjektion der Blutdruck in einem Zeitraum von 30 Minuten intervallartig auf 200 mmHg erhöht und wieder auf 100 mmHg abgesenkt, um zu überprüfen, ob durch Blutdruckschwankungen die bereits im Gewebe gefangenen Mikrosphären disloziert werden. Hierbei konnten in den venösen Referenzproben bis zu 9,3% der zuvor im Gewebe befindlichen Mikrosphären nachgewiesen werden (29).

Eine andere Studie untersuchte den Einfluss von Narkotika sowie von Gewebeuntergang wie zum Beispiel bei Myokardinfarkten auf den Verlust von Mikrosphären, ebenfalls mit 9 μm Durchmesser (28). Hier wurde unterschieden zwischen „early loss“, welcher der Shuntrate direkt während der Injektion entspricht, dem „later loss“, dieser entspricht dem Verlust von Mikrosphären in einem Zeitraum von bis zu 15 – 30 Minuten nach der Injektion, und dem „total loss“, dem Verlust von Mikrosphären über den gesamten Versuchszeitraum, welcher mehreren Wochen entsprach. Zur Erfassung des early loss wurden venöse Referenzproben aus dem Sinus coronarius gewonnen, für den later und total loss wurde das Lungengewebe auf Radioaktivität untersucht. Die Eigenschaft der Lunge, alle ankommenden Mikrosphären abzufangen und an einem Wiedereintritt in den großen Kreislauf zu hindern, wurde in einem Vorexperiment bestätigt, bei dem der maximale „total loss“ der Lunge, unabhängig von den verwendeten Narkotika, bei 2% lag. In dem eigentlichen Versuch wurde, unter Verwendung verschiedener volatiler Anästhetika, sowie unter künstlich herbeigeführter Koronarvasodilatation und Senkung des koronaren Blutdruckes, Mikrosphären zu verschiedenen Zeitpunkten (122, 92, 62 und 2 Minuten vor Versuchsende) in die Arteria coronaria sinistra injiziert. Hier fand sich ein für Halothan deutlich gegenüber Lachgas erhöhter Verlust, insbesondere der

total loss betrug etwa das Doppelte gegenüber dem der Lachgasgruppe. Bei allen anderen Parametern ergab sich kein signifikanter Unterschied (28).

Weiterhin musste untersucht werden, inwiefern sich die injizierten Mikrosphären auf die Hämodynamik auswirken. Da das Prinzip der Perfusionsmessung mit Hilfe von Mikrosphären darauf gründet, dass diese aufgrund ihres relativ zum Kapillardurchmesser größeren Durchmessers präkapillär gefangen werden, kommt es somit zu einer Verlegung der jeweiligen Kapillare. Daher musste ausgeschlossen werden, dass durch die üblicherweise injizierten Mengen an Mikrosphären die Hämodynamik beeinflusst wird.

Hierzu wurden bereits in den ersten Versuchsgruppen die makrohämodynamischen Parameter wie Blutdruck, pH, p_{CO_2} und p_{O_2} überwacht. Obwohl hier sehr große Mikrosphären mit einem Durchmesser von 50 μm verwendet wurden, konnte trotz mehrfacher Injektionen keine Veränderung der genannten Werte gefunden werden (114). Eine weitere Versuchsgruppe diente der Untersuchung der Frage, ab welcher Menge an Mikrosphären eine Veränderung der Hämodynamik eintritt. Trotz wiederholter Versuche konnte keine Obergrenze gefunden werden, ab der eine Veränderung messbar gewesen wäre (71). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass die Mengen an Mikrosphären, die normalerweise bei Experimenten zur Perfusionsmessung eingesetzt werden, keinen Einfluss auf makrozirkulatorische Parameter (Blutdruck, Herzfrequenz, HZV) haben (145). Selbst nach mehrfachem Einsatz (bis zu sechs Injektionen mit je $1 \cdot 10^6$ Mikrosphären des Durchmessers 50 μm) der Mikrosphären veränderten sich weder Herzfrequenz noch Herzrhythmus, systolischer oder diastolischer Blutdruck, was eine Vielzahl von Studien bewies (25, 28, 34, 38, 72, 99, 136).

In einer Arbeitsgruppe wurde nach der Injektion von $5 - 8 \cdot 10^6$ Mikrosphären mit 10 μm Durchmesser beziehungsweise von $5 \cdot 10^6$ 10 μm und $1 \cdot 10^6$ 35 μm Mikrosphären am isolierten, spontan schlagenden Hundeherzen ein kurzfristiger, etwa 15 Sekunden anhaltender und spontan sistierender Blutdruckanstieg von maximal 3 mmHg beobachtet. Dies wurde jedoch am ehesten auf die den Mikrosphären zugesetzte Lösung, das Tween80, zurückgeführt (156), und kann aufgrund des sehr geringen, reversiblen Anstiegs vernachlässigt werden.

Eine weitere Studie betrachtete den Einfluss injizierter Mikrosphären des Durchmessers 15 μm am Kaninchenohr mit Hilfe eines Intravitalmikroskopes (55). Es zeigte sich, dass spätestens 30 Sekunden nach der Injektion der Mikrosphären und

der damit erfolgten Verstopfung der Kapillaren sich Kollateralgefäße öffneten und so die ungehinderte weitere Zirkulation garantierten. Es erscheint daher unwahrscheinlich, dass die Embolisierung der Gefäße auch bei hoher Mikrosphärenzahl einen Einfluss auf die Hämodynamik hat (55).

Es können bei Versuchen geringfügige Abweichungen von 3,3% (114) bis zu 10% (6) der mit Hilfe von Mikrosphären ermittelten Perfusionswerte von den mit Durchflussmessern ermittelten Werte festgestellt werden, welche sich nicht alleine durch die Shuntrate der verwendeten Mikrosphären erklären lassen, da bei allen aufgeführten Untersuchungen Mikrosphären mit Durchmessern von 15 und 50µm verwendet werden, die eine Shuntrate von kleiner als 1% besitzen. Bei gleichzeitiger Injektion von Mikrosphären, die mit unterschiedlichen Radionukliden markiert waren, ergaben sich ebenfalls unterschiedliche Werte mit Abweichungen von 4,3 (72) bis 6,4% (14). Der Grund hierfür kann daher nicht ausschließlich in der Shuntrate liegen. Eine Möglichkeit, dieses Phänomen zu erklären, liegt in der Tatsache, dass sich Mikrosphären in der Zirkulation erythrozytenähnlich verhalten. Auch Mikrosphären werden im axialen Blutstrom durch die Arterien transportiert, wie in histologischen Untersuchungen an Abschnitten der Arteria femoralis nachgewiesen werden konnte (103). In einigen Studien wurde gezeigt, dass sich die Erythrozyten im kapillären Stromgebiet nicht uniform verteilen, was dazu führt, dass einige Kapillaren zwar vom Blutplasma durchströmt werden, jedoch völlig frei von festen Blutbestandteilen sind (11, 116, 117). Mittels eines mathematischen Modells berechnet und in vivo mittels Intravital-Mikroskopie wurde an Ohrkapillaren von Kaninchen das Verhalten der Erythrozyten an Gefäßaufzweigungen untersucht. An den Aufzweigungen der Kapillaren fand sich eine Abhängigkeit der Erythrozytenverteilung vom lokal vorherrschenden Blutdruck und der Flussrate. Erythrozyten und wohl auch Mikrosphären bevorzugen den Eintritt in Kapillaren mit hoher Flussrate und niedrigem Druck (116, 117). Die sich daher in den Kapillaren ergebenden unterschiedlichen Hämatokritwerte gleichen sich im venösen Gebiet der Postkapillaren wieder an. Unter der oben genannten Voraussetzung, dass sich die Mikrosphären ähnlich den Erythrozyten verhalten, ist offensichtlich, dass die mit dieser Methode ermittelten Blutflusswerte diese Heterogenität der regionalen Durchblutung aufzeigen (14). In einer Untersuchung am Kaninchen mit Mikrosphären und einem Indikator zur Durchblutungsmessung (IMDI) wurde festgestellt, dass aufgrund der Verteilungseigenschaften der Mikrosphären es bei der Messung mit

Mikrosphären zu einer geringfügigen Überschätzung der Flusswerte in gut durchbluteten Regionen zu Ungunsten von Regionen mit geringen Flussraten kommen kann (14, 15, 156).

1.1.2.1.2 Nachteile der radioaktiven Mikrosphären

Radioaktiv markierte Mikrosphären können nur bedingt für chronische Versuche verwendet werden. Dies ist zum einen begründet durch die Halbwertszeit der Radionuklide, die von 27,7 bis zu 462,6 Tagen reichen (52), innerhalb derer die Auswertung erfolgen muss, und zum anderen dadurch, dass sich die Nuklide mit der Zeit aus den Mikrosphären lösen können und so zu falsch-niedrigen Flusswerten führen (32, 142). Bei einem Beobachtungszeitraum von 14 Tagen nach der Injektion konnten mit radioaktiv markierten Mikrosphären durch externe Detektoren kein Verlust an Radioaktivität nachgewiesen werden. Dennoch war sowohl im Urin wie auch im Fezes der Tiere bis zu fünf Tage nach der Injektion Radioaktivität detektierbar (71). Wird der Zeitraum allerdings auf zwei Monate ausgedehnt, kann ein Verlust von 40 – 50% der Ausgangsaktivität beobachtet werden, wobei schon einen Tag nach der Injektion der Mikrosphären die Radioaktivität in den Körperausscheidungen festgestellt werden kann (142). Das Problem liegt in der unterschiedlichen Verlustrate der einzelnen Isotope, so dass auch eine „Hochrechnung“ nicht erfolgen kann, da die Verlustraten für die unterschiedlichen Isotope wie auch über die Zeit starken Schwankungen unterliegen. Man kann daher davon ausgehen, dass radioaktiv markierte Mikrosphären für Versuche, die einen Zeitraum von 24 Stunden überschreiten, nicht geeignet sind (47, 105, 142).

Ein weiteres Problem ergibt sich aus der Tatsache, dass die radioaktiv markierten Mikrosphären den Bestimmungen des Atomgesetzes (ATG) und der Strahlenschutzverordnung (StrlSchV) unterliegen. Daher muss erstens für Versuche mit diesen Mikrosphären eine Genehmigung eingeholt werden (ATG, § 11, Abs.1), und zweitens müssen bestimmte räumliche, technische und personelle Voraussetzungen erfüllt sein, um Versuche mit radioaktiv markierten Mikrosphären durchzuführen. Diese sind nicht in allen Laboratorien gegeben, was bedeutet, dass nicht alle Laboratorien Messungen mit radioaktiven Mikrosphären durchführen

können. Außerdem gilt die jeweilige Genehmigung nicht für die gesamte Methode mit allen zur Verfügung stehenden Radionukliden, sondern wird für jedes Radionuklid einzeln erteilt. In den meisten Fällen wird nur die Verwendung einzelner Radionuklide genehmigt, in den allerwenigsten Fällen für alle. Radionuklide für zehn verschiedene Messzeitpunkte stehen in der Praxis daher meist nicht zur Verfügung (134), was die Möglichkeiten der repetitiven Messung deutlich einschränkt.

Ein weiterer Nachteil radioaktiv markierter Mikrosphären sind die sehr hohen Kosten, die bei Verwendung von radioaktivem Material entstehen. Eigene Räumlichkeiten, in denen nur Versuche mit radioaktiven Mikrosphären und durch diese kontaminiertem Material durchgeführt werden dürfen, müssen zur Verfügung stehen. Dazu gehören Operationssäle, Lagerungs- und Verarbeitungsräume. Auch die Entsorgung des bei diesen Versuchen entstehenden Abfalls sowie der kontaminierten Tierkörper verursachen hohe Kosten, welche für die Entsorgung eines Kilogramms von als radioaktiv kontaminierter Sondermüll deklarierten organischen Materials zum Beispiel im Jahr 1994 in den USA etwa US-\$ 12,50 (105, 142), allerdings in Deutschland 1998 etwa 147 DM betragen (134).

Des Weiteren ist zu berücksichtigen, dass durch die Radioaktivität alle an den Versuchen mitarbeitenden Personen betroffen werden, sowie bei Unfällen mit Freisetzung von Mikrosphären die Umwelt kontaminiert werden kann sowie Strahlung durch den Verursacher inkorporiert werden kann, wie zum Beispiel bei einer versehentlichen Injektion in die Hand (134).

1.1.2.2 Zusammenfassung

Die Möglichkeit, mit Hilfe radioaktiv markierter Mikrosphären die globale und regionale Perfusion zu bestimmen, ist schon seit über dreißig Jahren mit Erfolg eingesetzt worden. Viele Studien haben dazu beigetragen, dass diese Methode wegen ihrer guten Reproduzierbarkeit zum Goldstandard wurde, vor allem bei chronischen Messungen (18). Vergleiche, die eine sehr gute Übereinstimmung der mit Hilfe der Mikrosphärenmethode gewonnenen Flusswerte zu mit Durchflussmessern gemessenen Werten (8, 99) beziehungsweise mit Rollerpumpen kontrollierten Flussraten (5) zeigten, haben erreicht, dass die Mikrosphärenmethode

als verlässlich und reproduzierbar anerkannt wurde. Allerdings kann dies nur unter bestimmten Voraussetzungen gelten:

In jeder zu untersuchenden Einzelregion, sei es die Gewebeprobe selbst oder auch die Referenzblutprobe, muss eine Mindestanzahl von 400 Mikrosphären vorhanden sein, um eine zuverlässige Messung zu gewährleisten (25). Des Weiteren muss die Mikrosphärenlösung mit Polyoxyethylen(20)-sorbitan-mono-oleat versetzt sein, um zu verhindern, dass die Mikrosphären aggregieren. Die Lösung muss unmittelbar vor der Injektion im Ultraschallbad weitestgehend von Clustern befreit werden und während der Injektion muss eine gute Durchmischung der Mikrosphären durch Schütteln des Injektionsgefäßes gewährleistet sein (114). Die verwendeten Mikrosphären sollten einen Mindestdurchmesser von 12 µm besitzen, der Durchmesser sollte im Idealfall 12 - 15 µm betragen, da für Mikrosphären, die kleiner als 12 µm im Durchmesser sind, die Shuntrate und die Dislokation bereits im Gewebe gefangener Mikrosphären vor allem bei Blutdruckschwankungen überproportional und signifikant ansteigt (38, 53, 87, 112, 137). Mehr als 15 µm messende Mikrosphären unterliegen der Gefahr, präkapillär, das heißt in den Arteriolen, hängen zu bleiben und so zum einen die Mikrozirkulation des jeweiligen Organs zu stören wie auch das Messergebnis falsch zu beeinflussen (149). Bei Mikrosphären mit 15 µm Durchmesser ist die Shuntrate am geringsten (28, 90) und der Anteil an tatsächlich im Kapillarbett gefangenen Mikrosphären am größten (149), auch bei Blutdruckschwankungen werden keine bereits im Gewebe eingelagerten Mikrosphären mehr disloziert (87).

Als Injektionsort sollte bevorzugt das linke Atrium gewählt werden, da aufgrund der turbulenten Strömung eine homogene Verteilung der Mikrosphären gesichert ist (25). Die linksventrikuläre Injektion ist ebenfalls jederzeit möglich, sofern nicht unmittelbar die myokardiale Durchblutung gemessen werden soll (71). Die Hämodynamik wird durch die Injektion der Mikrosphären kaum beeinflusst (25), es sollte aber dennoch darauf geachtet werden, dass die Injektion langsam über einen gewissen Zeitraum durchgeführt wird, da ansonsten die Gefahr besteht, dass trotz stabil bleibender makrohämodynamischer Werte signifikante Änderungen in der Mikrozirkulation einzelner Organe vorkommen (93, 149). Das Verhalten der Mikrosphären in der Blutströmung, insbesondere an Gefäßbifurkationen, ist dem der Erythrozyten sehr ähnlich und ermöglicht so eine Beurteilung der Heterogenität der Mikrozirkulation in den einzelnen Organen (14). Um absolute Werte berechnen zu können, kann man

eine Referenzblutprobe gewinnen, welche aus einer zentralen oder peripheren Arterie mit einer konstanten und bekannten Abzugsgeschwindigkeit und Abzugsvolumen (99, 114) von Beginn der Injektion an während mindestens 60 Sekunden (6) bis zu 3 Minuten (26) entnommen wird.

Die radioaktiv markierten Mikrosphären sind aus unterschiedlichen Materialien hergestellt, wie zum Beispiel bei den ersten Versuchen aus Karbon und Sauerstoff (114), aus humanem Serumalbumin (71) mit dem Vorteil der Metabolisierbarkeit, diese können daher auch beim Menschen eingesetzt werden (122, 145), und, vor allem in der heutigen Zeit, aus Polystyren (55). In allen diesen Materialien sind Radionuklide inkorporiert, die γ -Strahlen emittieren und daher leicht auszuwerten sind (35), vor allem, weil die Zerfälle pro Minute durch das Gewebe hindurch gemessen werden können und so eine Verarbeitung der Probe vor der Erfassung nicht notwendig ist (114). Diese Tatsache ist von besonderer Bedeutung, da zum einen durch eine weitere Aufarbeitung der Gewebeproben weitere Kosten anfallen würden, zum anderen, da jegliche Art von Manipulationen und Weiterverarbeitungen der Proben potentiell zu einem Mikrosphärenverlust und damit zu falschen Messungen führen könnte (134).

Werden Referenzblutproben entnommen, so können diese ohne weitere Verarbeitung direkt im γ -Counter gemessen werden, wohingegen Organproben zunächst von Binde- und Fettgewebe und größeren Gefäßen befreit werden sollten, da ansonsten diese sehr schlecht durchbluteten Gewebe mit in die Messung eingehen und zu falsch-niedrigen Werten führen würden (149). Wichtig ist außerdem, dass die Unterteilung der Organe nach einem zuvor individuell festgelegten Schema durchgeführt und für jeden Versuchsteil genauestens befolgt wird, um vergleichbare Werte zu erhalten. Nach Dissektion und Gewichtsmessung werden dann auch diese Proben im γ -Counter gemessen (134).

Ein besonderer Vorteil der Mikrosphären liegt darin, dass zur Messung valider und reproduzierbarer Werte nicht das Gewicht der einzelnen Proben entscheidend ist, sondern die Anzahl der in der einzelnen Probe vorhandenen Mikrosphären (25). Dies ermöglicht eine Variation der Probengewichte von 0,03 bis zu 5 g, je nach erwarteten Flussraten in den jeweiligen Regionen. Wird die Anzahl der injizierten Mikrosphären erhöht, kann das Einzelgewicht noch weiter reduziert werden, so dass die Messung von Perfusionsraten in kleinen Organabschnitten wie zum Beispiel dem Endo- oder

Epikard (156) oder der Unterscheidung der Durchblutung von Nierenrinde und –mark (77) möglich wird.

Seit 1979 ist auch die automatische Auswertung der einzelnen Gewebeproben mit Hilfe eines Computerprogramms eingeführt, durch die die Messung schneller und verlässlicher geworden ist. Zur Auswertung einer Probe werden etwa drei Minuten benötigt, bei Messung aller Radionuklide und Ermittlung folgender Werte: Zerfälle/Minute, Zerfälle/Minute/g Gewebe und der Blutflusswert pro Minute und Gramm sowie die Anzahl von Mikrosphären in der Probe (118). Wird dieses Programm nun mit einer Computermatrix kombiniert, wird die genauere Trennung der einzelnen Radioisotopenspektren möglich, um so die Trennschärfe zu erhöhen und den Einsatz von bis zu zehn Radioisotopen gleichzeitig in einem Versuch zu ermöglichen (119, 158).

In der Praxis stehen diesen Messungen allerdings einige Nachteile gegenüber, allen voran die Tatsache, dass mit radioaktivem Material umgegangen wird, welches sowohl in der Handhabung als auch in der Entsorgung mit einigem Aufwand und vor allem auch zum Teil erheblichen Kosten (105, 134, 142) verbunden ist. Des weiteren entsteht das Problem der unterschiedlichen Halbwertszeiten, welche den Einsatz über einen unbegrenzten Zeitraum hinweg limitieren (47, 105, 142).

1.1.3 Nichtradioaktive Mikrosphären

1.1.3.1 Farbige Mikrosphären

Da die Verwendung von radioaktiv markierten Mikrosphären wie oben ausgeführt erhebliche Nachteile mit sich bringt, wurde in den weiteren Jahren versucht, alternative Methoden zur Markierung von Mikrosphären zu entwickeln. Zunächst wurden Mikrosphären eingeführt, die mit verschiedenen Farbstoffen versehen waren, welche jeweils bei einer bestimmten, für die jeweilige Farbe spezifische, Wellenlänge Licht mit einem Maximum absorbierten (76). Diese Farbstoff-markierten Mikrosphären wurden in verschiedenen Versuchen validiert. Die Messungen ergaben jedoch zum Teil, vor allem bei Erhöhung der Blutflussrate, deutliche Abweichungen von bis zu $39 \pm 4\%$ von der Referenzmethode (54). Dies wurde zum einen auf die niedrigere Dichte der farbstoffhaltigen im Vergleich zu radioaktiven Mikrosphären, zum anderen auf die wenig standardisierte Technik der Aufarbeitung der Gewebeproben zur Messung der Farbintensität zurückgeführt (54). Bei der Überprüfung der farbstoffmarkierten Mikrosphären in vitro ergab sich eine hohe Stabilität (76). Dies stellt gegenüber den radioaktiven Mikrosphären einen wesentlichen Vorteil dar, da keine Halbwertszeiten berücksichtigt werden müssen. Weniger als 0,1% der Farbstoffe gingen bei Lagerung in isotonischer Kochsalzlösung während zwei Monaten verloren. Auch bei in vivo Untersuchungen zeigten sich über einen Zeitraum von acht Stunden keine signifikanten Farbstoffverluste. Eine weitere Validierung der farbstoffhaltigen Mikrosphären im Vergleich zu radioaktiven Mikrosphären ergab unabhängig von hämodynamischen Parametern eine deutlich bessere Übereinstimmung (Korrelationskoeffizienten 0,97 – 0,98). Es kam allerdings zum Teil zu einer geringgradigen Unterschätzung des Blutflusses bei Messung mit farbstoffhaltigen Mikrosphären. Da bei diesen weiteren Versuchen eine verbesserte und deutlich verkürzte Methode zur Rückgewinnung der Mikrosphären aus den Gewebeproben angewandt wurde, kann der Hauptfehler bei früheren Bestimmungen auf die Verarbeitung zurückgeführt werden (76).

Der Einfluss der Mikrosphären auf die Hämodynamik wurde ebenfalls untersucht (75). Hier ergab sich eine gute Übereinstimmung der hämodynamischen Parameter

(Herzzeitvolumen, Blutdruck, Herzfrequenz), sofern ein Maximum von $6 \cdot 10^6$ Sphären/kg KG pro Injektion nicht überschritten wurde. Ab $6 \cdot 10^6$ Mikrosphären/kg Körpergewicht ergab sich ein reversibler Abfall der Herzfrequenz sowie ein signifikanter und irreversibler Abfall des Herzzeitvolumens. Der systemische Blutdruck wurde allerdings nicht beeinflusst. Bei wiederholten Injektionen wurde die maximale Anzahl an Mikrosphären, die insgesamt injiziert werden dürfen, ohne Veränderungen der Hämodynamik herbeizuführen, auf $2,5 \cdot 10^6$ Sphären festgelegt. Ab dieser Anzahl trat isoliert ein signifikanter Abfall des Herzzeitvolumens auf, die übrigen Werte blieben unbeeinflusst. Messungen, die bei Injektionen unterhalb der Höchstmenge erzielt wurden, ergaben dagegen verlässliche und reproduzierbare Werte (75).

Es ergeben sich auch einige Nachteile aus der Perfusionsmessung mit farbstoffmarkierten Mikrosphären. Zum einen ist die Aufarbeitung der Proben mit nicht-automatisierten Methoden früherer Experimente zeit- und arbeitsintensiv (76). Da nur Teile der aus den Gewebeproben gewonnenen Lösung ausgezählt werden, können Berechnungsfehler entstehen (105). Bei einer anderen, zeitlich verkürzten Verarbeitungsmethode wird der Aufwand verringert und der Berechnungsfehler verkleinert. Es können jedoch pro Versuch maximal drei Farben eingesetzt werden, da sich die Absorptionsspektren bis zu 70% überschneiden (105). Des Weiteren ist in der verkürzten Methode verwendete Lösungsmittel Toluol-Dimethylformamid TDMF hochgiftig und relativiert so die durch den Wegfall der Radioaktivität gewonnenen Vorteile (134).

1.1.3.2 Fluoreszenzmarkierte Mikrosphären

Aufgrund der Messproblematik mit farbigen Mikrosphären wurde nach Alternativen der Mikrosphärenmarkierung gesucht. Daher wurde in den letzten Jahren eine neue Methode etabliert, die Untersuchungen mit fluoreszenzmarkierten Mikrosphären durchführt. Es werden Polystyrenmikrosphären mit Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die je ein spezifisches, sehr enges und charakteristisches Exzitations- und Emissionsmaximum besitzen und daher gut voneinander unterschieden werden

können (47, 105). Derzeit sind als fluoreszenzmarkierte Mikrosphären so genannte Fluospheres® kommerziell in elf verschiedenen Farben erhältlich:

- Blue, Exzitationswellenlänge 365 nm, Emissionswellenlänge 415 nm
- Blue-green, Exzitationswellenlänge 430 nm, Emissionswellenlänge 465 nm
- Green, Exzitationswellenlänge 450 nm, Emissionswellenlänge 480 nm
- Yellow-green, Exzitationswellenlänge 505 nm, Emissionswellenlänge 515 nm
- Yellow, Exzitationswellenlänge 515 nm, Emissionswellenlänge 534 nm
- Orange, Exzitationswellenlänge 540 nm, Emissionswellenlänge 560 nm
- Red-orange, Exzitationswellenlänge 565 nm, Emissionswellenlänge 580 nm
- Red, Exzitationswellenlänge 580 nm, Emissionswellenlänge 605 nm
- Carmine, Exzitationswellenlänge 580 nm, Emissionswellenlänge 620 nm
- Crimson, Exzitationswellenlänge 625 nm, Emissionswellenlänge 645 nm
- Scarlet, Exzitationswellenlänge 645 nm, Emissionswellenlänge 680 nm

Das Prinzip der Fluoreszenzfarben beruht auf ihrer Eigenschaft, bei Anregung durch Licht einer bestimmten Wellenlänge, der so genannten Exzitationswellenlänge, Elektronen auf ein höheres Energieniveau springen zu lassen. Begeben sich diese Elektronen dann wieder in ihre Ruhelage zurück, geben sie die Energie in Form von Licht einer bestimmten, etwas längeren Wellenlänge, der so genannten Emissionswellenlänge, wieder ab. Meist beträgt der Unterschied etwa 10 – 60 nm. Man bezeichnet dies auch als „Stokes-Shift“, welcher sicherstellt, dass bei der Auswertung nur das emittierte und nicht auch das für die Exzitation benötigte Licht zu messen und so falsch hohe Werte zu bekommen (95). Dieses Licht wird dann im Fluoreszenzspektrometer gemessen und quantitativ analysiert (47). Die Intensität des Fluoreszenzsignals korreliert hierbei mit der Anzahl der Mikrosphären, die sich ursprünglich in der Probe befunden haben. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass bei sehr hoher Fluoreszenzintensität ein Dämpfungseffekt auftritt. Das bedeutet, dass ab einer bestimmten Menge, welche in „Arbitrary Units (AU)“ angegeben wird, der lineare Kurvenverlauf abflacht und es im weiteren Verlauf zu einer Unterschätzung der Perfusionswerte kommt. Der lineare Kurvenverlauf ist bei den meisten Fluoreszenzfarben bis 400 AU gesichert, bei „Blue“ dagegen nur bis 200 AU. Dies muss also bei der Einstellung der Exzitations- und Emissionsschlitzweiten des Spektrometers bedacht werden (48).

Da alle Farben ein für sie spezifisches Exzitations- und Emissionsmaximum aufweisen, ist eine hohe Trennschärfe (Spezifität) gegeben. Diese erlaubt den Einsatz mehrerer Fluoreszenzfarben nebeneinander. Lediglich bei Exzitation der Farbe „Green“ tritt ein „Spillover“ der Farbe „Yellow-green“ von 8,8% auf, bei Exzitation der Farbe „Blue-green“ ein „Spillover“ der Farbe „Green“ von 18,1%. Es wird daher auch herstellerseitig geraten, die Farbe „Green“ durch „Scarlet“ zu ersetzen, wenn die beiden anderen Farben gleichzeitig eingesetzt werden (47, 48). Bei den beiden Farben „Red“ und „Crimson“ tritt ein „Spillover“ von maximal 3,3% auf, der aber in Kauf genommen werden kann (48). Bei den restlichen Farben beträgt der „Spillover“ maximal 1%. Somit können bisher bis zu sieben Farben gleichzeitig verwendet werden. Es sind dies:

- Blue
- Blue-green
- Yellow-green
- Orange
- Red
- Crimson
- Scarlet (48)

Die Dichte der fluoreszenzmarkierten Mikrosphären liegt bei 1,05 g/ml und entspricht damit in etwa der der Erythrozyten (47). Dies ist, wie zuvor schon erwähnt, wichtig zur reliablen Bestimmung der Blutflussmessung, da sich so die Mikrosphären in ihrer Flusseigenschaft annähernd wie Erythrozyten verhalten (11, 14, 15, 103, 116, 117, 156).

Die Stabilität dieser Fluoreszenzfarbstoffe ist, solange sie in den Mikrosphären eingeschlossen sind, sehr gut, bei in vitro Untersuchungen konnte über einen Zeitraum von sechs Monaten bei Lagerung im Dunkeln in der herstellerseitig vorgegebenen Lösung ein Fluoreszenzfarbstoffverlust von unter 1% festgestellt werden (48). Dies ist ein entscheidender Vorteil gegenüber den radioaktiv markierten Mikrosphären, da kein Verlust der Fluoreszenzintensität und damit eine verfälschte Perfusionsmessung auftritt. Bei Lagerung im Hellen beträgt der Verlust durch Ausbleichung weniger als 10%. Auch ein Einfluss von Chemikalien und Temperaturänderungen ist nicht nachweisbar (48). Nach der Trennung der Farbstoffe

aus den Mikrosphären erhöht sich die Sensibilität gegenüber den genannten Einflüssen jedoch erheblich. Dies ist bei der Verarbeitung der Gewebeproben zu beachten. Bei Verwendung von Laugen wie zum Beispiel KOH zur Verdauung der Gewebeproben für die Isolierung der Mikrosphären (47, 107, 133, 141) müssen deshalb die resultierenden Probenreste sehr gut mit Pufferlösungen gespült werden, um eine Zerstörung der Farbstoffe bei der späteren Auslösung zu verhindern (133). Die Lösung, in welcher die Mikrosphären vom Hersteller geliefert werden, ist eine aus 0,15 M NaCl hergestellte Injektionslösung, der zur Verhinderung der Aggregation der Mikrosphären 0,02% Tween20 und 0,05% Thimerosal als Bakteriostatikum zugesetzt sind. Sie werden in Konzentrationen von $1 \cdot 10^6$ 15µm-Mikrosphären pro Milliliter und $3,6 \cdot 10^6$ 10µm-Mikrosphären pro Milliliter kommerziell vertrieben.

Bei der Fluoreszenzmessung von Gewebeproben muss berücksichtigt werden, dass die Fluoreszenzintensität nicht direkt in den Proben gemessen werden kann, wie bei der Verwendung radioaktiver Mikrosphären, sondern dass die Mikrosphären erst aus den Gewebeproben rückgewonnen werden müssen. Anschließend müssen die Farbstoffe aus den Poren der Mikrosphären ausgelöst werden. Hierbei gibt es zwei Eluatlösungen: 2,2-Ethoxy-Ethoxyethylenacetat (Ethoxy®, Aldrich Chemical Co., MI, U.S.A.) oder 2-Ethoxyethylenacetat (Cellosolve®, Aldrich Chemical Co., MI, U.S.A.). Bei Behandlung der Gewebeproben mit den genannten Lösungen bleiben die Mikrosphären selbst intakt (57, 105). Beide Substanzen beeinflussen die Fluoreszenzintensität nicht. Bei Lagerung der Fluoreszenzfarbe nach Elution aus den Mikrosphären in Cellosolve ® konnte zumindest über einen Zeitraum von sieben Tagen kein Nachlassen der Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden (47).

Die Gewebeproben müssen also aufgelöst werden, um die darin befindlichen Mikrosphären zu erhalten. Hierzu stehen verschiedene Möglichkeiten zur Verfügung: Zum einen kann die Gewebeprobe in 30%iger KOH-Lösung verdaut werden, um dann den Rückstand zu trocknen und anschließend mit Ethoxy® die Fluoreszenzfarbstoffe auszulösen und die Fluoreszenzintensität im Überstand zu messen (1). Diese Methode ist allerdings nicht in Gebrauch, da die Fluoreszenzfarbstoffe durch das zugesetzte KOH zerstört werden und somit keine verlässlichen Werte liefern (133).

Eine weitere Möglichkeit, welche allerdings relativ aufwendig ist und aufgrund der Membraneigenschaften nicht geeignet für die Verarbeitung lipophiler Gewebeproben wie Hirn oder Leber, ist die Verdauung mit 4M KOH über 24 Stunden und die

anschließende Filtration der entstehenden Suspension durch eine Polykarbonatmembran mit Hilfe von Unterdruck (47, 107, 108, 141). Das Gefäß, in dem die Verdauung stattgefunden hat, wird mehrfach mit Tween-Lösung gespült, um im Gefäß hängengebliebene Mikrosphären mit auszulösen. Die Spüllösung wird ebenfalls durch den Filter gegossen. Daraufhin wird die Filtermembran in ein anderes Behältnis verbracht und mit Cellosolve® bedeckt, um die Fluoreszenzfarbstoffe aus den Mikrosphären auszulösen (47). Auch die arterielle Blutprobe wird in gleicher Weise, allerdings mit 2M KOH, behandelt. Hier liegt der entscheidende Nachteil in der Tatsache, dass sehr viele Gefäße benötigt werden und so Mikrosphären verloren gehen, die dann bei der Auswertung zu falsch niedrigen Werten führen. Dies kann insbesondere bei Unterschätzung der Menge an Mikrosphären in der arteriellen Referenzblutprobe zu weitreichenden Fehleinschätzungen führen (47, 107, 108, 141). In einem Versuch wurde die Höhe des Verlustes an Mikrosphären mit dieser Methode gemessen. Gewebeproben wurden nach dieser Methode behandelt und mit in ein Messgefäß pipettierten, getrockneten und mit Cellosolve® ausgelösten Mikrosphären derselben Menge, bei der ein Verlust somit nicht möglich war, verglichen. Hierbei fand sich ein Unterschied zu den mit den Gewebeproben erhaltenen Werten von $5,5 \pm 1,3\%$ (27).

Für die Verarbeitung von Geweben mit geringer Dichte wie zum Beispiel die Lunge steht die so genannte Extraktionsmethode“ zur Verfügung. Die Auswertung erfolgt nach Trocknen der Proben, Einbettung in Polyurethanschaum und Aufteilung des resultierenden Blockes in kleine Würfel von ca. $1,9 \text{ m}^3$. Aus diesen Würfeln wird mit Hilfe von Cellosolve® der Fluoreszenzfarbstoff ausgelöst und die Intensität gemessen (47).

Die Sedimentationsmethode stellt eine etwas weniger aufwendige Variante zur Verarbeitung aller Gewebeproben dar (107, 133). Hier werden die Gewebeproben in 2N ethanolischer KOH verdaut. Die Dichte der 2N ethanolischen KOH ist mit 0,893 g/l geringer als die der Mikrosphären, was ein Absinken der Mikrosphären in der entstehenden Lösung zur Folge hat. Nach Zentrifugation bilden die Mikrosphären ein Pellet am Boden des Reaktionsgefäßes, welches nach Entfernen des Überstandes mit demineralisiertem Wasser und Tween80 aufgeschwemmt wird, um KOH und Gewebereste zu entfernen. Nach einer erneuten Zentrifugation wird der Farbstoff mit Cellosolve® ausgelöst und die Intensität gemessen. Bei dieser Methode besteht jedoch erstens die Möglichkeit, dass bei dem Entfernen des Überstandes

Mikrosphären mitentfernt werden, was die Ergebnisse verfälschen würde, zweitens ist nicht gewährleistet, dass das KOH rückstandslos entfernt wurde, was wiederum zur Zerstörung des Farbstoffes führt (107, 133).

Die Saccharosemethode ist eine zeit- und arbeitsintensive Methode, bei der durch aufgrund der Verarbeitung der Gewebeproben eine relativ große Fehlerquote entsteht. Die Organe werden in 10%igem Formalin fixiert und in einzelne Gewebeproben unterteilt. Diese werden mechanisch zerkleinert und mit Tris-Cl vermischt. Diese Mischung wird mit Hilfe von Protease K und Collagenase verdaut, anschließend mit 40%iger Saccharose überschichtet und zentrifugiert. Aufgrund ihrer physikalischen Eigenschaften sammeln sich die Mikrosphären in einer Schicht oberhalb der Saccharose an und können so abpipetiert werden. Diese Flüssigkeit wird reduziert und die Menge an enthaltenen Mikrosphären mit einem Durchflußzytometer oder einem Fluoreszenzmikroskop bestimmt. Hierbei entsteht allerdings beim Vergleich mit durch radioaktive Mikrosphären gewonnenen Werten ein Verlust von 27,9%, welcher am ehesten durch Zerstörung von Mikrosphären bei der mechanischen Zerkleinerung entsteht (12).

Seit 1998 ist eine Methode etabliert, welche sich als am geeignetsten für die Aufbereitung der Proben und die Messung der Fluoreszenzintensität erwiesen hat. Es handelt sich um ein Robotersystem, mit dem eine vollautomatische Bearbeitung der Gewebeproben möglich ist. Die Gewebeproben werden in einem Gefäß, der „Sample Processing Unit (SPU)“ verdaut und filtriert, was eine Überführung der Probe in ein anderes Gefäß beziehungsweise ein Abpipettieren des Überstandes überflüssig macht und somit sicherstellt, dass keine Mikrosphären aufgrund der Verarbeitungsmethode verloren gehen. Die Dauer der Verdauung der Probe ist bei dieser Methode wesentlich verkürzt, so dass sich auch der Zeitaufwand minimiert. Darüber hinaus ist der in den SPUs enthaltene Filter auch in der Lage, lipophile Flüssigkeiten zu verarbeiten. Der gesamte Verarbeitungprozeß wurde automatisiert und kann von einem Roboter durchgeführt werden, was zum einen den Arbeitsaufwand, zum anderen auch die Kosten deutlich reduziert (107, 108, 133). Die genaue Beschreibung der Methode, die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, findet sich unter 2.2.12.

Auch mit fluoreszenzmarkierten Mikrosphären wurden Versuche zur Validierung der Blutflussmessung durchgeführt. Im wesentlichen wurden vergleichende Messungen durchgeführt, bei denen mit radioaktiv markierten Mikrosphären erhaltene Werte als

Referenz dienten. Es wurden jeweils gleichzeitig radioaktiv und fluoreszenzmarkierte Mikrosphären injiziert und die Blutflusswerte der Gewebeproben und der arteriellen Referenzproben ermittelt. Die Übereinstimmung war in allen Fällen sehr gut, $r^2 = 0,98 - 0,99$, die Steigung der Regressionsgeraden betrug $0,95 - 1,02$. Auch der Vergleich verschiedener fluoreszenzmarkierter Mikrosphären untereinander ergab gute Werte ($r^2 = 0,99$) (47). Auch über längere Zeiträume, wie sie bei chronischen Experimenten erforderlich sind, zeigen die fluoreszenzmarkierten Mikrosphären eine hohe Verlässlichkeit. Mit Ausnahme von Blue-green und Crimson (10,5%) bei 37°C und Red (12,1%) bei -20°C konnte bei in vitro Testung durch Lagerung über zwei Monate bei 37°C beziehungsweise -20°C sowie bei in vivo Testung durch Injektion zwei Monate, einen Monat und fünf Minuten vor der Euthanasierung der Versuchstiere kein signifikanter Verlust an Fluoreszenzintensität nachgewiesen werden. Des Weiteren ergab sich bei Vergleich fluoreszenzmarkierter mit radioaktiv markierten Mikrosphären zum einen, dass die fluoreszenzmarkierten im kurzzeitigen Versuchsverlauf grundsätzlich valide und zu radioaktiv markierten Mikrosphären vergleichbare Werte erbringen, zum anderen, dass die fluoreszenzmarkierten Mikrosphären im Langzeitversuch eine sehr viel höhere Verlässlichkeit und Reproduzierbarkeit aufweisen als radioaktive Mikrosphären, die über längere Zeiträume einen deutlichen Verlust von Radioaktivität und damit falsch-niedrige Werte aufweisen (47, 105).

1.1.3.3 Zusammenfassung

Fluoreszenzmarkierte Mikrosphären werden seit etwa zehn Jahren in der Messung der regionalen Perfusion sowohl in kurzzeitigen wie auch in chronischen Experimenten mit großem Erfolg eingesetzt. Zur Zeit sind elf verschiedene Farben kommerziell erhältlich, von denen mindestens sieben in einem Versuchstier zur Anwendung kommen können. Bei Lagerung der Proben beziehungsweise bei Einsatz der Mikrosphären im Langzeitexperiment konnte über einen Zeitraum von sechs Monaten ein Verlust an Fluoreszenzfarbstoffen von unter 10% nachgewiesen werden (47, 48). Die Verarbeitung der Gewebe- wie auch der Blutproben zerstört die Mikrosphären nicht, sondern löst lediglich den Farbstoff aus ihnen heraus. Dennoch

ist, da die Menge an Farbstoff direkt proportional zu der Anzahl an Mikrosphären ist, eine physikalische Zählung der Mikrosphären nicht notwendig, da diese über die Messung der Fluoreszenzintensität ermittelt werden kann (47).

Der Validitätsgrad der Messung mit fluoreszenzmarkierten Mikrosphären ist mit dem der radioaktiven Mikrosphären vergleichbar (12, 27, 47, 142), und bei chronischen Experimenten aufgrund der niedrigeren Verlustrate und der höheren Stabilität der Fluoreszenzfarbstoffe im Vergleich zu den Radionukliden sogar überlegen (47, 105). Ein weiterer Vorteil ergibt sich aus der geringeren Gesundheitsgefährdung durch den Wegfall der Notwendigkeit des Umgangs mit Radioaktivität. Im Vergleich zu farbstoffmarkierten Mikrosphären müssen keine giftigen Chemikalien zur Probenaufarbeitung, wie sie bei Verwendung farbstoffhaltiger Mikrosphären benötigt werden, verwendet werden. Dadurch werden zum einen die Kosten gesenkt, zum anderen das Personal wie auch die Umwelt wesentlich weniger belastet (105).

Durch die Entwicklung einer automatisierten Methode zur Rückgewinnung der Mikrosphären unter Verwendung der Robotertechnik aus den Gewebeprobe ist die Aufarbeitungsprozedur sehr viel schneller und hochstandardisiert geworden und somit auch der anfängliche Nachteil der kosten- arbeits- und zeitintensiven Probenaufarbeitung (12, 47, 133) ausgeglichen worden. Daher kann derzeit die Bestimmung regionaler Blutflusswerte mit Hilfe fluoreszenzmarkierter Mikrosphären als Goldstandard angesehen werden (108).

1.2 Sepsis

SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome), Sepsis sowie das septische Mehrorganversagen (MOV) sind lebensbedrohliche Erkrankungen, welche die häufigste Todesursache weltweit bei chirurgischen Intensivpatienten darstellen (24, 86, 89, 123, 132, 151). In den USA sterben daran mehr als 200 000 Patienten pro Jahr (86). Die Mortalität der Sepsis ist somit vergleichbar mit der Mortalität des Myokardinfarktes (123). Durch die Behandlung von Patienten mit SIRS, Sepsis und MOV entstehen darüber hinaus enorme Kosten, welche in den USA mehr als 16 Milliarden Dollar betragen (86). Auch in Deutschland sind die Kosten, die durch septische Patienten entstehen, gewaltig. Allein die intensivmedizinische Behandlung der Patienten verursacht jährlich über 2 Milliarden Euro Kosten. Es sollte berücksichtigt werden, dass dies nur einen Teil der tatsächlichen Gesamtkosten darstellt, zu denen auch Produktivitätsverlust durch Tod der Patienten oder prolongierte Arbeitsunfähigkeit sowie Rehabilitationsmaßnahmen und weitere Folgekosten zählen. Insgesamt liegt der finanzielle Aufwand für die Behandlung der Sepsis inklusive der Folgekosten pro Jahr zwischen 3,7 und 7,9 Milliarden Euro (151). Es liegen vielfältige Behandlungsansätze wie der Einsatz von systemischen Antibiotika, aggressiver chirurgischer Intervention und ausgedehntem, sorgfältigem Monitoring von Patienten mit einem septischen Krankheitsbild (147) vor. Des Weiteren werden verschiedene neue Therapieansätze entwickelt, die zum einen versuchen, die auslösende Infektion zu bekämpfen, zum anderen spezifisch darauf abzielen, die Reaktion des Organismus auf die Infektion, wie zum Beispiel die Freisetzung von Mediatoren des Mehrorganversagens bei Sepsis, zu verhindern oder zu antagonisieren (123), und des Weiteren die klinischen Folgen dieses Prozesses zu bekämpfen (86), Trotzdem konnte bisher noch keine definitive Therapie gefunden werden, welche SIRS; Sepsis, MOV und den septischen Schock und alle damit verbundenen Komplikationen effektiv bekämpfen kann (132). Die hohe Sterblichkeit aufgrund des septischen Mehrorganversagens ist daher in den letzten zwei Jahrzehnten nicht wesentlich gesenkt worden (10, 123, 152, 155). Demzufolge muss bei Patienten mit schwerer Sepsis immer noch mit einer Mortalität von 30 – 50% gerechnet werden (37, 86, 151), bei Patienten mit septischem Schock oder Komplikationen der Sepsis wie zum Beispiel beim akuten Nierenversagen sogar mit

einer Todesrate von bis zu 90 % (58, 86). Diese Zahlen belegen, dass die Sepsis weiterhin eine sehr große Herausforderung in der intensivmedizinischen Betreuung darstellt (151). Die pathophysiologischen Mechanismen bei der Sepsis und dem septischen Schock sind in ihren Wechselwirkungen auch heute noch nicht komplett aufgeklärt (126) , und man ist von einer effektiven Therapie der Sepsis noch weit entfernt. Es gelingt zwar, beim Patienten mit septischem Mehrorganversagen einige der betroffenen Organfunktionen temporär zu substituieren, zum Beispiel durch Hämofiltration, Beatmung und andere Maßnahmen (129), bis heute erscheint es allerdings nicht möglich, die Mediatorregulation und die daraus resultierende Organdysfunktion kausal zu beeinflussen (152).

Die gemeinsame Hypothese zur Erklärung der vaskulären Veränderungen, welche bei SIRS und Sepsis aufgrund der Freisetzung inflammatorischer Mediatoren stattfinden, ist die, dass es durch diese Mediatoren zu einer ausgedehnten Aktivierung des Endothels mit nachfolgender Dysfunktion und Zerstörung und in der Folge schließlich zu Multiorganversagen kommt (138). Die meisten therapeutischen Strategien bei der Sepsis zielen aus diesem Grund bisher darauf ab, das komplexe Geschehen der septischen Mediatorentgleisung punktuell zu hemmen oder zu verringern (24, 59, 101, 152). Diese spezifische Inhibition von einzelnen Entzündungsfaktoren hatte allerdings bislang keinen Einfluss auf die persistierend hohe Mortalität dieses Krankheitsbildes.

Dies mag zum einen dadurch begründet sein, dass die Aktivierungskaskaden der verschiedenen Mediatorensysteme von der Natur redundant angelegt sind und die meisten bisherigen klinisch erprobten Anti-Sepsis-Strategien lediglich punktuell in das Geschehen eingegriffen haben (59, 101). Zum anderen könnte es auch sein, dass es beim klinisch manifesten Endotoxinschock schon zu spät ist, um die fatalen Auswirkungen der generalisierten Mediatoraktivierung nur auf der Ebene der Endotoxin- oder Zytokinfreisetzung zu blockieren (152). Vielmehr müssten in dieser Situation Maßnahmen zur Verringerung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion bzw. zur Verbesserung der kapillären Perfusion getroffen werden.

Tatsache ist, dass es bei einer schweren Infektion mit septischem Multiorganversagen zu einer überschießenden systemischen Immunantwort des Gesamtorganismus kommt und in der Folge Entzündungsmediatoren exzessiv in die Zirkulation ausgeschüttet werden. Es kommt daher zu einer generalisierten Entzündungsreaktion des Organismus, infolgedessen es durch

Zellfunktionsstörungen und konsekutivem Organversagen zu einer hohen Mortalitätsrate kommt (24, 39, 155). Die Pathophysiologie besteht in einer übermäßigen Aktivierung humoraler und zellulärer Kaskadensystemen, welche durch Toxine der Mikroorganismen aktiviert werden können (83). Einerseits führt dies zu einer generalisierten Freisetzung inflammatorischer Zytokine (Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF α), Interleukin (IL)-1, IL-6, IL-8) (10), von Plättchenaktivierungsfaktor, Arachidonsäuremetaboliten, vasoaktiven Peptiden, Komplementfaktoren, Sauerstoffradikalen, die mikrovaskuläre Gerinnung und neutrophile Granulozyten werden aktiviert (154), andererseits werden parallel dazu die im Organismus vorhandenen natürlichen Inhibitoren der Immunantwort verbraucht und niederreguliert (78). Dadurch wird unter anderem das Endothel aktiviert und über bisher unbekannte pathophysiologische Mechanismen eine generalisierte Gerinnungsaktivierung in der Mikrozirkulation in Gang gesetzt, die zu einer disseminierten intravasalen Gerinnung (DIC) führen kann.

Bisher ist das Bindeglied zwischen Mediatoraktivierung, Gerinnungsaktivierung und Organversagen unklar. Man weiß noch nicht, auf welchem Weg inflammatorische Mediatoren und Gerinnungsfaktoren zum Mikrozirkulations- und Mehrorganversagen führen, wobei der verstärkten Leukozyten-Endothelzellinteraktion eine besondere Rolle zuzukommen scheint. Die Kenntnis dieser Zusammenhänge wäre allerdings Voraussetzung für eine effektivere Therapie.

Es kommt vor allem in der Anfangsphase der polymikrobiellen Sepsis zu einer hyperdynamen Kreislaufsituation (in den ersten 2 – 10 Stunden nach dem auslösenden Ereignis), die gekennzeichnet ist durch ein erhöhtes Herzminutenvolumen, erhöhte Gewebedurchblutung und verminderten peripheren Gesamtwiderstand (154), gleichzeitig aber auch durch Ausbildung von arterio-venösen Shunts sowie einem High-Output-Failure des linken Herzens, welches vor allem zu einer Unterversorgung der Gewebe mit Nährstoffen sowie Sauerstoff trotz des erhöhten Angebotes führt (154, 155). Auch hier scheint eine Mediatoraktivierung ursächlich beteiligt zu sein, die genauen pathogenetischen Vorgänge sind nicht bekannt. Trotzdem ist die Sterblichkeit in der sich anschließenden späten, hypodynamen Phase (ab ca. 20 Stunden nach dem auslösenden Ereignis) deutlich höher als in der Frühphase. In der späten Phase ist die verminderte Gewebedurchblutung nicht mehr in der Lage, dem Energie- und Sauerstoffbedarf des ohnehin vorgeschädigten Gewebes adäquat gerecht zu werden. Das Gewebe

scheint außerdem nicht mehr in der Lage zu sein, Sauerstoff aus dem Blut aufzunehmen und zu verwerten, was zusätzlich zur Ausbildung einer azidotischen Stoffwechsellage durch den erhöhten Anfall von Laktat führt (154), welcher für sich genommen die Gewebehypoxie durch Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins noch weiter begünstigt. Diese mikrozirkulatorische Funktionsstörung wird als der fundamentale Mechanismus in der Entwicklung der Organdysfunktion und des Multiorganversagens während der Sepsis angesehen. Es ist daher eines der Hauptziele der Sepsistherapie, vor allem den Übergang der hyperdynamen in die hypodynamie Phase durch Stabilisierung der hämodynamischen und kardiovaskulären Parameter zu verhindern, um so die Gewebepfusion zu erhalten und damit möglicherweise die Sterblichkeit senken zu können (155). Zuvor muss allerdings die Perfusionsstörung quantifiziert werden.

Nach Expertenmeinung ist eine wesentliche Ursache für die enttäuschenden Ergebnisse neuer Therapieansätze bei der Sepsis das Fehlen von klinisch-relevanten experimentellen Modellen der Sepsis und des septischen Mehrorganversagens (42, 109). So beziehen sich die meisten der inzwischen publizierten Modelle auf Zeiträume von weniger als 24 Stunden und geben in keiner Weise den komplexen Ablauf des in der Klinik beobachteten septischen Krankheitsbildes wieder (42). Vielmehr entwickelt sich beim Patienten mit Sepsis das posttraumatische oder postoperative Organversagen in einem Zeitraum von Tagen und nicht von Stunden (44). Aus diesem Grund können insbesondere Untersuchungen der pathophysiologischen Abläufe und der Organperfusion bei Endotoxinämie und Sepsis über mehrere Tage helfen, die Pathogenese des Mehrorganversagens besser zu verstehen. Dies gilt auch für die modellhafte Entwicklung von Strategien für die Prävention und für die Behandlung des Mehrorganversagens (16). Daher ist es ein wesentliches Anliegen dieser Arbeit, die Messung der Organperfusion über einen Zeitraum von mehreren Tagen zu ermöglichen, um auch die späte Phase des septischen Geschehens untersuchen zu können. Insbesondere die hier vorgestellten sequentiellen Untersuchungen zur Organperfusion bei Endotoxinämie und Peritonitis könnten helfen, die pathophysiologischen Abläufe bei der generalisierten Entzündung und der Entwicklung des Mehrorganversagens besser zu verstehen.

1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein experimentelles Modell zu etablieren, das bei einfacher Handhabung die minimal invasive Messung der Organdurchblutung über mehrere Tage erlaubt. Durch für diesen Zweck eigens entwickelte Portkatheter sollte es ermöglicht werden, multiple Mikrosphäreninjektionen in den linken Ventrikel über einen längeren Zeitraum (bis zu mehreren Wochen) mittels einfacher transkutaner Punktion beim nur leicht sedierten Tier durchzuführen. Des Weiteren wurde die Messung der 0-Referenz mit fluoreszierenden Mikrosphären etabliert sowie ein Pilotprojekt der Perfusionsmessung bei Tieren mit CLP durchgeführt. Zur Testung der Durchführbarkeit der Methode wurde diese in einer Kontrollgruppe und bei Tieren mit experimenteller Peritonitis („cecal ligation and puncture“) erstmalig eingesetzt.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

Perfusoren:

Perfusor IV	B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
Becton Dickinson Program 1	Vial Medical, St.-Martin-le-Vinoux, Grenoble, Frankreich
Harvard Pump	Harvard Apparatus, South Nattick, USA

Sauerstoffinhalation:

Servo Ventilator 900C	Siemens-Elema, Solna, Schweden
-----------------------	--------------------------------

Blutdruck- und Herzfrequenzmessung:

Sirecust 404	Siemens, USA
--------------	--------------

Blutgasanalysegerät:

Radiometer	Radiometer Medical A/S, Brønshøj, Dänemark
------------	--

Zentrifuge:

Labofuge 1	Heraeus Christ GmbH, Osterode, Deutschland
------------	--

Vortex:

L24	Gesellschaft für Laborbedarf mbH, Würzburg, Deutschland
-----	--

Fluoreszenzspektrometer:

LS50B	Perkin Elmer, Überlingen, Deutschland
-------	---------------------------------------

Pipetten:

Eppendorfpipetten	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
-------------------	---------------------------------

Portkatheter:

Polyethylenkatheter	Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München
---------------------	--

Portgefäß mit Durchstichmembran:

Technische Werkstatt des Institutes für
Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern,
Ludwig-Maximilians-Universität München

Versuchsgefäße:

Sample Processing Units

Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum
Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität
München

Waage:

multina plus

Soehnle-Waagen GmbH & Co. KG, 71540
Murrhardt, Deutschland

Ultraschallbad:

Sonorex RK 31 H

Heinz Hinkel Elektronik, 66954 Pirmasens-Winzeln,
Deutschland

2.1.2 Sonstige Materialien

Mikrosphären:

FluoSpheres® polystyrene
microspheres

Molecular Probes, Inc., Eugene, Oregon,
USA

Chargennummern:

F-8837

FluoSpheres® polystyrene microspheres, 15 µm,
blue fluorescent (365/415) *for blood flow
determination* 1.0×10^6 beads/ml

F-8838

FluoSpheres® polystyrene microspheres, 15 µm,
blue-green fluorescent (430/465) *for blood flow
determination* 1.0×10^6 beads/ml

F-8839

FluoSpheres® polystyrene microspheres, 15 µm,
crimson fluorescent (625/645) *for blood flow
determination* 1.0×10^6 beads/ml

F-8841	FluoSpheres® polystyrene microspheres, 15 µm, orange fluorescent (540/560) *for blood flow determination* *1.0x10 ⁶ beads/ml
F-8842	FluoSpheres® polystyrene microspheres, 15 µm, red fluorescent (580/605) *for blood flow determination* *1.0x10 ⁶ beads/ml
F-8843	FluoSpheres® polystyrene microspheres, 15 µm, scarlet fluorescent (645/680) *for blood flow determination* *1.0x10 ⁶ beads/ml
F-8844	FluoSpheres® polystyrene microspheres, 15 µm, yellow-green fluorescent (505/515) *for blood flow determination* *1.0x10 ⁶ beads/ml

S-100b- Bestimmung:

LIA-mat® Sangtec® 100 AB Sangtec Medical, Bromma, Schweden
(Immunluminometrischer Assay)

Plastik- und Verbrauchsmaterialien wurden von folgenden Firmen bezogen: Becton Dickinson, Fraga, Spanien; Becton Dickinson, Drogheda, Irland; BOC Ohmeda AB, Helsingborg, Schweden; Ohmeda GmbH & Co. KG, Erlangen, Deutschland; Ohmeda MC., Medical Devices Division, Murray Hill, NJ, USA; Beiersdorf AG Hamburg, Deutschland; Eppendorf, Hamburg, Deutschland; Ethicon, Norderstedt, Deutschland; Feather Safety Razor Co., LTD., Medical Division, Japan; Johnson & Johnson Medical Limited, Gargrave, Skipton, Großbritannien; Rauscher, Pattensen, Deutschland; B. Braun, Melsungen, Deutschland; SAFESKIN GmbH, Neufahrn, Deutschland; Paul Hartmann AG, Heidenheim, Deutschland; Baxter Deutschland GmbH, Unterschleissheim, Deutschland; Sarstedt AG, Nümbrecht, Deutschland.

2.1.3 Medikamente

- Tutofusin® Vollelektrolytlösung 500ml Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland
- Antisedan® (Atimepazolhydrochlorid) Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
1 ml = 5 mg
- Domitor® (Medetomidinhydrochlorid) Pfizer, Karlsruhe, Deutschland
1 ml = 1 mg
- Ketavet® (Ketaminhydrochlorid) Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, Deutschland
1 ml = 100 mg
- Augmentan® (Amoxicillin-Natrium + Clavulansäure) SmithKline Beecham Pharma GmbH, München, Deutschland
- Tazobac® (Piperacillin + Tazobactam) Lederle GmbH, Deutschland
- Narcoren® (Pentobarbital-Natrium) Rhone Merieux GmbH, Laupheim, Deutschland
1 ml = 160 mg
- Scandicain® 1% Astra GmbH, Wedel, Deutschland
- Atropinsulfat Braun 0,5 mg® B. Braun AG, Melsungen, Deutschland
- Antikoagulation für Referenzblutproben:
Compoflex® BIOTRANS GmbH, Dreieich, Deutschland
(CPDA-Stabilisator: 26.3 g Natriumcitrat-Dihydrat, 3.27 g Zitronensäuremonohydrat, 31.9 g Glukosemonohydrat, 2.51 g Natriumdihydrogenphosphatdihydrat, 0.275 g Adenin, 1000 ml Aqua dest.
- Heparin Natrium® (5000 IE/ml) B. Braun AG, Melsungen, Deutschland

2.1.4 Versuchstiere

Für die Experimente wurden weibliche weiße Neuseelandkaninchen (SPF (special pathogen free) Kaninchen) der Zucht Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln verwendet.

2.2 Methoden

Alle Versuche wurden im Rahmen eines von der Regierung von Oberbayern genehmigten Antrags auf Genehmigung eines Tierversuchsvorhabens nach § 8 Abs. 1 des Tierschutzgesetzes und unter der Aufsicht des Tierschutzbeauftragten des Klinikums Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München Herrn Dr. med. vet. H. Scheuber durchgeführt.

2.2.1 Tierhaltung

Für diese Arbeit wurden weibliche weiße Neuseelandkaninchen mit einem Gewicht von $3,8 \pm 0,3$ kg der Zucht Harlan Winkelmann GmbH, Borcheln, Deutschland, unter speziellen pathogenfreien Bedingungen (SPF) in Einzelkäfigen des Käfigtyps nach Staufacher gehalten. Sie erhielten Wasser und Standardpelletfutter ad libitum. Im Versuchszeitraum wurden die Kaninchen täglich auf Krankheitszeichen kontrolliert, gewogen und der Allgemeinzustand bestimmt. Beurteilungskriterien waren gestäubtes Fell, verklebte Augen sowie eingeschränktes Trink-, Fress- sowie Spielverhalten. Traten beeinträchtigende schwere Nebenwirkungen der Portimplantation und der Operation auf, die zu einer nicht mehr vertretbaren Beeinträchtigung des Allgemeinzustandes führten (z.B. Lähmungen, Zeichen stärkster Schmerzen), so wurden die Tiere mit einer Überdosis Pentobarbital-Natrium (Narcofen®) euthanasiert.

2.2.2 Design des implantierten Portkatheters

Der verwendete Portkatheter wurde unter Leitung von PD Dr. med. Dirk Nolte, ehemals Leiter der „Arbeitsgruppe Mikrozirkulation“ am Institut für Chirurgische

Forschung am Klinikum Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München entwickelt und gefertigt. Er besteht aus einem Polyethylenkatheter mit einer Länge von 12 cm (beliebig kürzbar), einem Innendurchmesser von 0,58 mm sowie einem Außendurchmesser von 0,96 mm. Dieser wird über eine Silikonschweißstelle mit einem Standardreservoir mit einer Durchstechmembran verbunden (Abb. 2.2.1). Um eine versehentliche Diskonnektion des Katheters vom Reservoir zu verhindern, wurde der Katheter mit einer Silikonplombe eingeschweißt. Vor der Verwendung wurden die Portkatheter gassterilisiert.

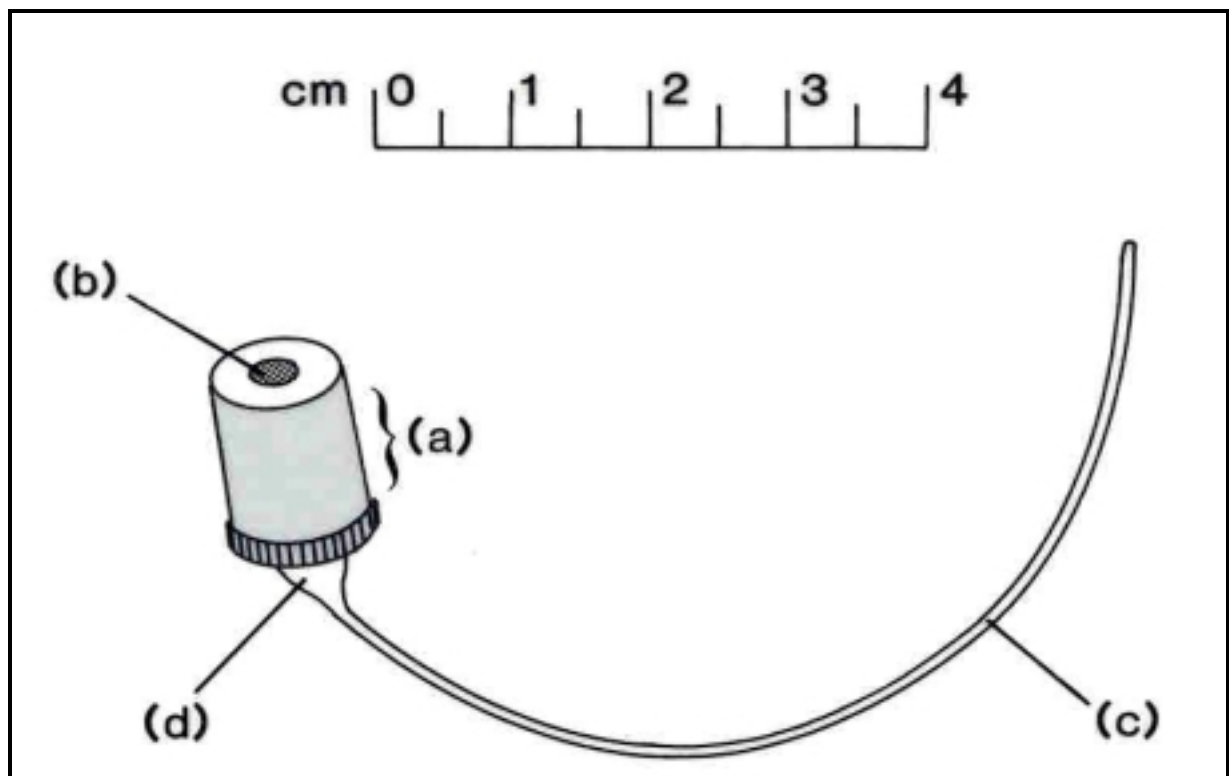


Abb. 2.2.1 für die s.c.-Implantation beim Kaninchen: a) Portreservoir, b) Durchstechmembran, c) Polyethylen Schlauch, d) Silikonplombe

2.2.3 Portimplantation

Die Kaninchen wurden an einem Ohr und im rechten vorderen Halsdreieck sowie am oberen Thorax rasiert und die Operationsgebiete mit einem alkoholischen Desinfektionsmittel desinfiziert. Nach Injektion von Ketaminhydrochlorid (Ketavet®) (20 mg/kg Körpergewicht i.m.) wurde in der Regel die rechte Ohrvene und die rechte Ohrarterie mit einem Vasculon® plus 22G Venenkatheter kanüliert. An beiden Kathetern wurde je ein Dreiwegehahn mit Verlängerung befestigt. Danach wurde zur Blutgasanalyse bei Raumluft heparinisertes Blut (10 I.E./ml Blut, Heparin Natrium®, Fa. Braun) sowie für weitere Untersuchungen Serum und mit Citrat antikoaguliertes arterielles Blut gewonnen (Messzeitpunkt B1) und die Narkose mit Medetomidin (Domitor®) (250 µg/kg Körpergewicht) eingeleitet. Medetomidin ist ein selektiver, spezifischer und stark wirksamer α -2-Rezeptor-Agonist mit dem Vorteil einer guten Steuerbarkeit und der Möglichkeit der Antagonisierung mittels eines Antagonisten in der verwendeten Medetomidin-Dosis (Antisedan®). Die Versuchstiere wurden in Rückenlage auf eine OP-Bühne verbracht und dort mit Hilfe von an der Bühne angebrachten Gurten fixiert. Der Hals wurde leicht überstreckt und weich gelagert. Über den venösen Zugang wurden kontinuierlich mit Hilfe von Perfusoren Vollelektrolytlösung (Tutofusin®) (10ml/kg Körpergewicht/h) zum Ausgleich des durch Verdunstung verlorenen Volumens und zur Kreislaufunterstützung und – stabilisierung sowie Medetomidin (30µg/kg Körpergewicht/h) zur Aufrechterhaltung der Narkose infundiert. Der arterielle Zugang diente der kontinuierlichen intraarteriellen Blutdrucküberwachung. Die korrespondierende Herzfrequenz wurde mittels EKG-Monitor aufgezeichnet. Zusätzlich war über den arteriellen Zugang die Abnahme von Serum- und Plasmaproben zur späteren Analyse möglich. Ein Endotrachealtubus (Innendurchmesser 5 mm) wurde bis zum Zungengrund eingeführt, um eine assistierte Oxygenierung mit 100% O₂, 0.5 l/min bei Spontanatmung zu gewährleisten. Die Anordnung des Versuchsaufbaus wird in Abbildung 2.2.2 dargestellt.

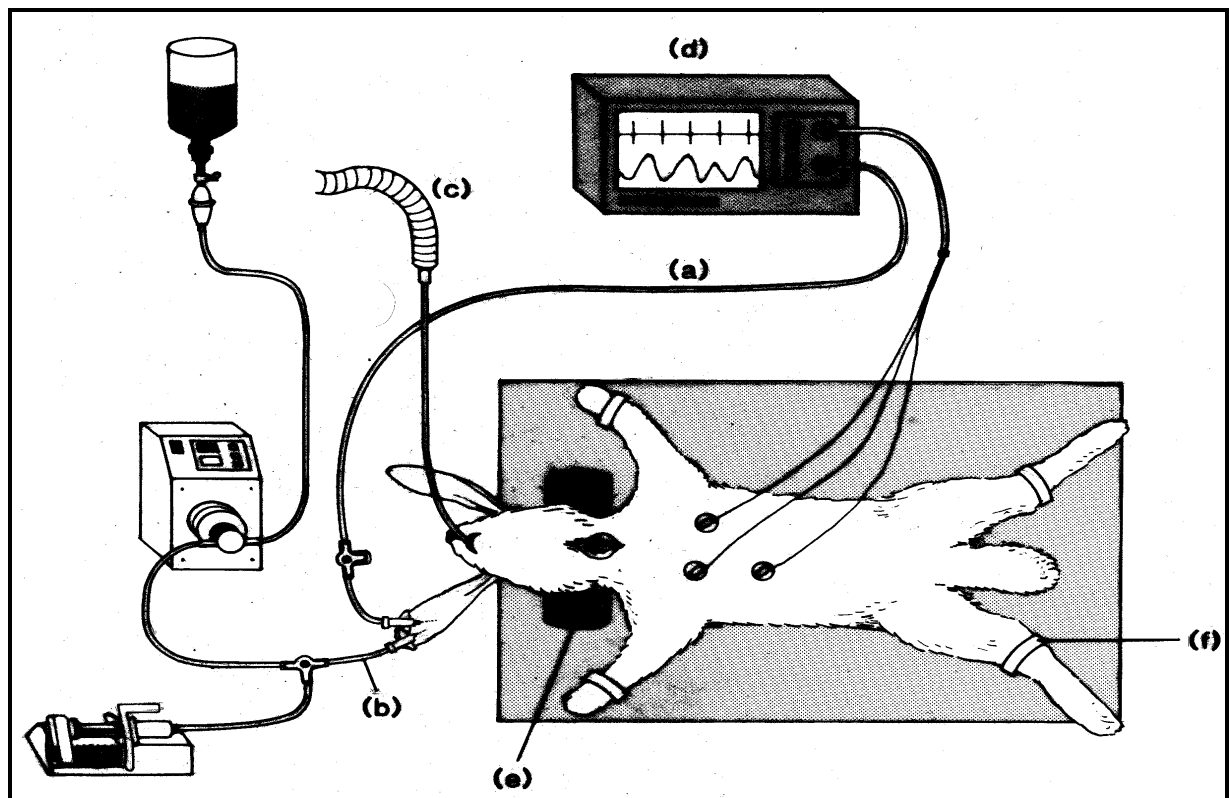


Abb. 2.2.2: Experimenteller Aufbau und Monitoring während der Portimplantation: a) Ohrarterienkatheter zur kontinuierlichen Blutdruckmessung sowie zur Gewinnung der Referenzprobe und Blutentnahmen, b) Ohrvenenkatheter zur Applikation von Anästhetika und Volumen, c) endotrachealer Tubus, welcher zur Oxygenierung ohne Intubation bis zum Zungengrund vorgeschoben wird, d) Monitor mit EKG und Blutdruckmessung, e) Nackenrolle, f) Fixierung

Zur Herabsetzung der Narkotikadosis wurden vor Beginn der Präparation die Haut und das Platysma sowie die gerade Halsmuskulatur mit einem Lokalanästhetikum (5 ml Scandicain 1% s.c.) infiltriert. Als perioperative Antibiotikaprophylaxe wurde einmalig Amoxicillin (Augmentan®) (30 mg/kg Körpergewicht) gegeben.

Die Haut wurde am Hals in der Medianlinie vom Larynx bis zum Sternum inzidiert. Die Länge des Schnittes betrug etwa 5 cm. Das Platysma wurde freipräpariert und ebenfalls längs gespalten. Nach vorsichtiger seitlicher Verdrängung der oberflächlichen longitudinalen Halsmuskulatur wurde ein Wundretractor eingebracht. Unter Schonung des Nervus vagus erfolgte die Freilegung der rechten Arteria carotis über einer Länge von 3 cm. Diese wurde isoliert, von anhängendem Bindegewebe befreit und danach angeschlossen. Nach Positionierung zweier Ligaturen (Vicryl 4-0) proximal und distal der geplanten Arteriotomie, die zur Sicherheit im Falle

unerwarteter Blutungen unverknotet liegengelassen wurden, wurde nach Abklemmung mit mikrochirurgischen Gefäßklemmen in Gefäßmitte auf einer Länge von 0.5 mm in der Vorderwand des Gefäßes quer arteriotomiert. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine intraoperative Blutentnahme aus der Ohrarterie zur Bestimmung der Blutgase durchgeführt. Eine Tabaksbeutelnaht wurde mit 6 Stichen (Prolene 8-0) rund um die Arteriotomie vorgelegt (Abb. 2.2.3).

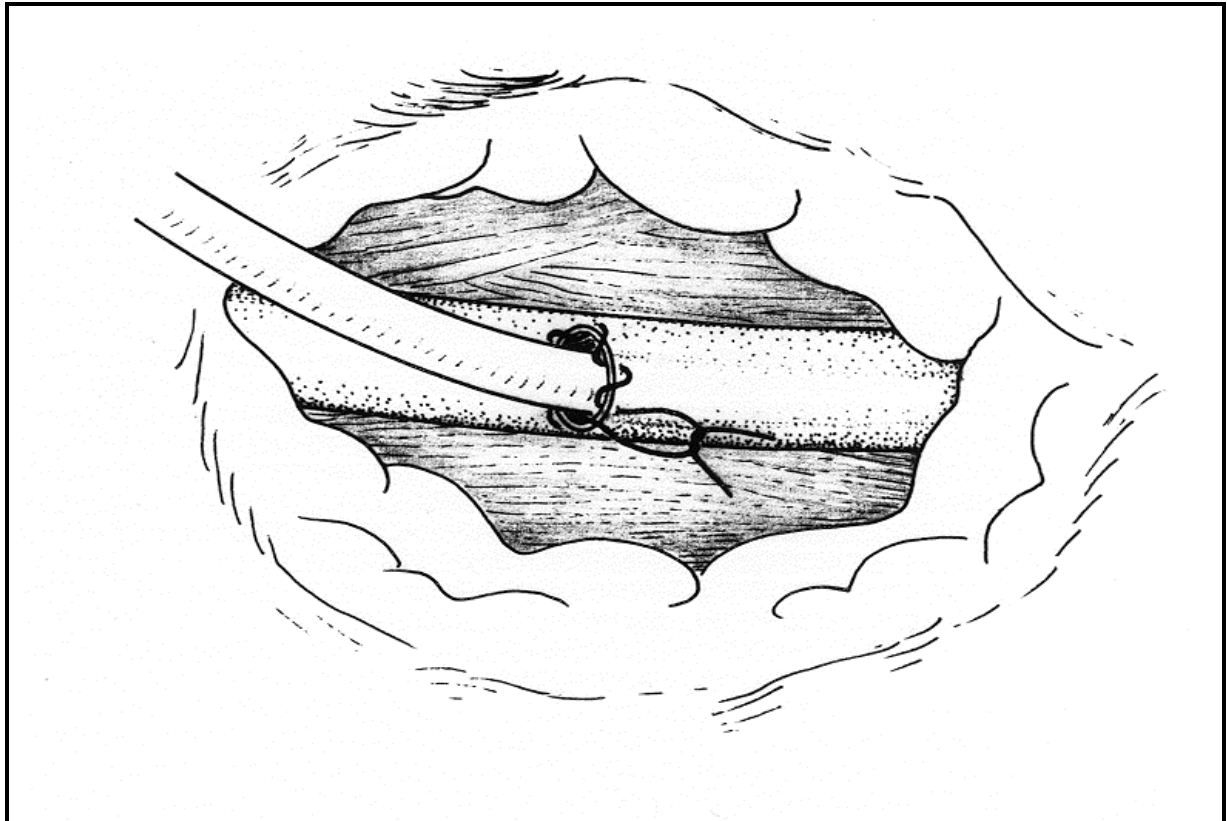


Abb. 2.2.3: Tabaksbeutelnaht zum Einknoten des Katheters (Prolene 8-0) in die Vorderwand der A. carotis communis zur Erhaltung der arteriellen Perfusion

Der Portkatheter wurde mit heparinisierter (100 IE Heparin/ml Tutofusin ®) Vollelektrolytlösung gespült und über die Arteriotomie vorgeschoben. Die Katheterspitze wurde vorsichtig bis zur proximalen Gefäßklemme eingebracht und mit der proximalen Ligatur gesichert. Dabei wurde eine komplette Okklusion des Gefäßes sorgfältig vermieden, um eine weitergehende regelrechte Perfusion über die rechte Arteria carotis zu sichern. Die Arteriotomie wurde dann durch Verknoten der Tabaksbeutelnaht verschlossen und die distale Klemme geöffnet, um einen retrograden Fluss vom Gehirn zu ermöglichen. Während dieses Vorganges war es

jederzeit möglich, eine eventuell aus der Einführungsstelle des Katheters auftretende Blutung mit einer zusätzlichen Naht (Prolene 8-0) zu stillen. Wenn keine Blutung auftrat, wurde auch die proximale Klemme geöffnet und der Katheter unter kontinuierlicher Überwachung des Blutdrucks und der Herzfrequenz vorgeschoben, bis ein elastischer Widerstand, der von der Wand des linken Ventrikels verursacht wurde, zu spüren war. Dies war üblicherweise nach ca. 8 – 9 cm Kathetervorschub der Fall und resultierte in einem typischen Pulsieren des Katheters. Meist war gleichzeitig eine linksventrikuläre Blutdruckkurve ableitbar. Falls dieses Pulsieren nicht beobachtet werden konnte, wurde der Katheter wieder zurückgezogen, bis die Spitze ca. 1 cm vor der Öffnung der Arterie lag und dann erneut vorgeschoben. Bei Auftreten der korrekten Lageanzeichen wurde der extravasale Teil des Katheters mit mindestens zwei Ligaturen (Vicryl 4-0) an den Halsmuskeln befestigt, wobei eine Einengung des Gefäß- wie auch des Katheterlumens sorgfältig vermieden wurde. Um die anterograde und retrograde Perfusion zu überprüfen, wurde das Gefäß erneut mit zwei Gefäßklemmen verschlossen und die proximale und distale Wiederauffüllung beobachtet.

Dann wurde der Katheter durch die longitudinalen Halsmuskeln ausgeleitet und das Platysma mit drei Einzelknopfnähten (Vicryl 4-0) verschlossen. Das Portreservoir wurde subkutan verlagert und mit zwei Nähten am darunterliegenden Platysma befestigt. Diese Art der Portfixation erlaubte die in der Regel problemlose und daher auch einfache und wiederholte Punktion des Reservoirs ohne Risiko einer versehentlichen Punktion der Katheterschleife. Intraoperativ wurde eine transkutane Probepunktion vorgenommen, um die korrekte Lage des Portreservoirs zu überprüfen und eventuelle Lecks des Portsystems auszuschließen. Die Durchgängigkeit des Katheters wurde durch Aspiration von Blut getestet. Durch Einbringung von 1 ml Elektrolytlösung mit 100 IE Heparin in das Katheterreservoir wurde einer Thrombosierung der präparierten Gefäße und des Portsystems vorgebeugt. Die Hautwunde wurde sodann durch eine fortlaufende Naht (Prolene 4-0) verschlossen. Nach Gabe von 5 mg Atimopazol (Antisedan®) zur vollständigen Antagonisierung des Medetomidins und einer letzten postoperativen Blutentnahme zur Blutgasanalyse und für Citratblut und Serum (Messzeitpunkt B2) wurden die Katheter aus Ohrvene und –arterie entfernt und das vollständig erwachte Tier nach eine Beobachtungszeit von 15 min wieder in den Käfig verbracht.

2.2.4 Injektion der Mikrosphären

Die Injektion der Mikrosphären wurde wie folgt durchgeführt: Bei dem sich in Narkose oder Sedierung befindlichen Tier wurde der Port transkutan mit einer 1ml-Spritze mit 24G-Kanüle punktiert (siehe Abb.2.2.4) und mit körperwarmer Vollelektrolytlösung (Tutofusin ®) die Durchgängigkeit geprüft. Die Injektionsfläschchen mit den Mikrosphären wurden für zwei Minuten im Ultraschallbad gelagert, was zu einer Auflösung der durch die Lagerung möglicherweise entstandenen Mikrosphärencluster beitragen sollte. Dann wurden sie mit Hilfe eines Vortexgerätes gut aufgeschüttelt und nochmals durchmischt und auf Körpertemperatur gebracht. Sodann wurden mittels einer 1ml-Insulinspritze möglichst genau 1 ml, das entspricht 1×10^6 Mikrosphären, aufgezogen und über einen Zeitraum von genau einer Minute gleichmäßig in den Port injiziert. Danach wurde mehrfach mit warmer Vollelektrolytlösung nachgespült und nach der letzten Mikrosphäreninjektion, um die weitere Durchgängigkeit zu sichern, 1 ml heparinisierte Vollelektrolytlösung (enthält 100 IE Heparin) in das Katheterlumen injiziert und die Kanüle wieder entfernt.

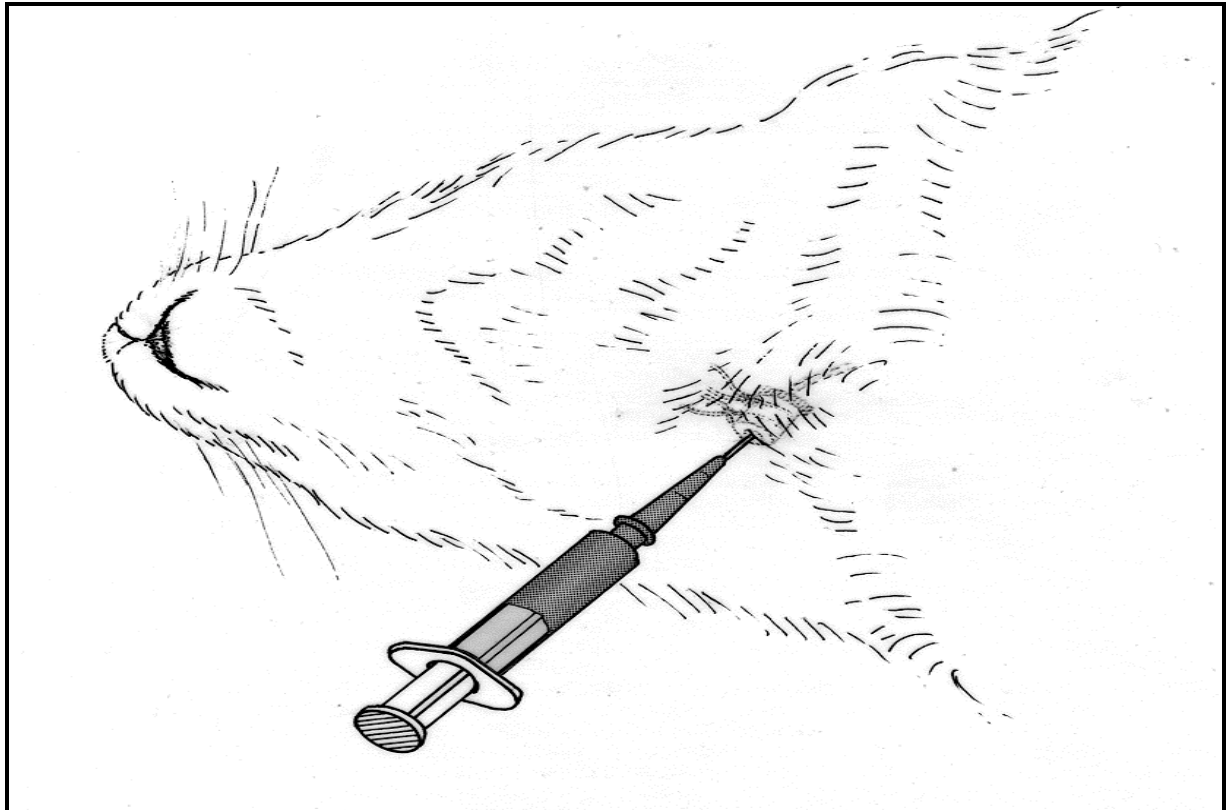


Abb. 2.2.4: Punktion bei subkutan implantiertem Portkatheter mit einer 1ml-Spritze. Zu sehen auch die subkutane Fixierung des Reservoirs zur Verhinderung einer Dislokation

2.2.5 Gewinnung der Referenzprobe

Bei jeder Mikrosphäreninjektion wurde eine Referenzblutprobe mit Hilfe einer rückwärtslaufenden Perfusorpumpe mit definierter Geschwindigkeit (1,665 ml/min) abgezogen, um die gewonnenen Informationen über die Menge an Mikrosphären der einzelnen Proben standardisieren zu können und absolute Werte zu erhalten.. Zuerst wurde während einer Minute Vorlaufzeit sichergestellt, dass sich das Schlauchsystem bis zur Spritze kontinuierlich und gleichmäßig mit Blut gefüllt hatte. Dann wurde mit der Injektion der Mikrosphären begonnen und nach Beendigung der Injektion wurde noch drei Minuten lang weiter Referenzblut gewonnen, so dass sich eine gesamte Abzugszeit von 5 Minuten ergab. Zu dem so gewonnenen Blut wurde im Verhältnis 1:5 mit Vollelektrolytlösung (Tutofusin®) verdünnter CPDA-Stabilisator

(26.3 g Natriumcitrat-Dihydrat, 3.27 g Zitronensäuremonohydrat, 31.9 g Glukosemonohydrat, 2.51 g Natriumdihydrogenphosphatdihydrat, 0.275 g Adenin, 1000 ml Aqua dest., hier als Fertiglösung Compoflex®) zugesetzt.

2.2.6 Kontrollgruppe

Nach einer Erholungsphase von 7 Tagen bis drei Wochen nach der Portimplantation wurde über 96 Stunden eine experimentelle Peritonitis induziert. Eine Gruppe gesunder Tiere diente als Kontrollgruppe.

Die Tiere der Kontrollgruppe wurden am Tag 0 einer Allgemeinanästhesie, wie in 2.2.3 beschrieben, unterzogen und für eine Zeit von 30 ± 5 min in Narkose belassen, ohne Manipulationen an dem Tier vorzunehmen. Hierdurch sollte der Einfluss der Anästhesie auf die Organperfusion untersucht werden. Zu Beginn und am Ende der Narkose wurde je eine Mikrosphäreninjektion mit je 1×10^6 Mikrosphären vorgenommen (Messzeitpunkte t_1 und t_2 mit je einer Injektion) und die dazugehörigen Referenzblutproben gewonnen (Referenz „1“ und „2“). Danach wurde die Narkose mit Hilfe von Atimepazol (Antisedan®), wie in 2.2.3 beschrieben, beendet und es wurden die vollständig erwachten Tiere wieder in den Käfig verbracht. Am postoperativen Tag 1 wurde das gleiche wieder durchgeführt, ebenfalls mit zwei Mikrosphäreninjektionen, einer am Anfang und einer am Ende der Narkose (Messzeitpunkte t_3 und t_4) und wiederum zwei Referenzblutproben abgenommen (Referenz „3“ und „4“). Die Tiere erhielten eine perioperative Antibiotikaprophylaxe (Tazobac®, 112,5 mg/kg KG). Am Tag 2, nach 48 Stunden, wurde in leichter Sedierung mit Medetomidin (Domitor®) eine Mikrosphäreninjektion durchgeführt (Messzeitpunkt t_5) mit begleitender Referenzblutprobe „5“, ebenfalls am Tag 3, nach 72 Stunden (Messzeitpunkt t_6 , Referenz „6“), und am Tag 4, nach 96 Stunden (Messzeitpunkt t_7 , Referenz „7“). Im Anschluss an diese siebte Injektion von Mikrosphären wurden die sich in Narkose befindenden Tiere mit der Injektion einer Überdosis Pentobarbital-Natrium (Narcoren®) euthanasiert. Die verwendeten Mikrosphärenfarben waren:

Tag 0, Zeitpunkt $t_1 = 0$ h, orange

Tag 0, Zeitpunkt $t_2 = 2h$, yellow-green
Tag 1, Zeitpunkt $t_3 = 24h$, red
Tag 1, Zeitpunkt $t_4 = 26h$, crimson
Tag 2, Zeitpunkt $t_5 = 48h$, blue-green
Tag 3, Zeitpunkt $t_6 = 72h$, scarlet
Tag 4, Zeitpunkt $t_7 = 96h$, blue

2.2.7 Peritonitismodell

Die Tiere der Peritonitisgruppe wurden am Tag 0 mit der unter 2.2.3 beschriebenen Vorgehensweise in Narkose versetzt. Nach Injektion von Mikrosphären zum Zeitpunkt t_1 (ebenfalls 1×10^6 Mikrosphären, verwendete Farben siehe 2.2.5, wie auch in der Kontrollgruppe wurde zu jeder Injektion eine Referenzblutprobe gewonnen, Referenz „1“) wurden die Tiere median laparotomiert (Inzisionslänge $4 \pm 0,5$ cm). Nach Durchtrennung der Linea alba wurde die Bauchhöhle eröffnet und die Appendix am Übergang des Ileums zum Colon im Bereich der Cäcums aufgesucht. Unter Sicherung der Durchgängigkeit des Darmes wurde bei ungestörter Peristaltik distal der Ileocäcalklappe abgebunden. Mit Hilfe einer 13G-Verweilkanüle wurde das Coecum mehrere Male punktiert und der Austritt von Darminhalt in die Peritonealhöhle durch leichtes Auspressen gesichert. Danach wurde die Bauchhöhle in den einzelnen Schichten wieder verschlossen. Vor Beendigung der Narkose wurde die zweite Mikrosphäreninjektion (Zeitpunkt t_2 und Referenz „2“) vorgenommen und das Tier sodann aus der Narkose erweckt und in den Käfig verbracht. Die Tiere wurden im Versuchszeitraum täglich gewogen und beobachtet. Bei Anzeichen von Schmerzen wurden Metamizol-Tropfen (Novalgine®) verabreicht.

An Tag 1, also nach 24 Stunden, wurden die Tiere erneut in Allgemeinanästhesie, wie unter 2.2.3 beschrieben, versetzt. Nach Lagerung in Rückenlage, Messung der makrozirkulatorischen Parameter und Verabreichung einer Antibiose (Tazobac®), wurde eine Mikrosphäreninjektion durchgeführt (Zeitpunkt t_3 und Referenz „3“). Danach erfolgte die Relaparotomie. Die Region der Darmperforation wurde inspiziert, wobei das Ausmaß der Peritonitis anhand des Kostaustritts in die Bauchhöhle beurteilt

werden konnte. Sodann wurde der gesamte Bauchraum mit vorgewärmter Vollelektrolytlösung lavagiert. Es wurde die tags zuvor abgebundene Appendix entfernt, um ein weiteres Austreten von Darminhalt zu verhindern und die Sanierung der Peritonitis zu erreichen. Danach wurde die Abdominalhöhle wieder schichtweise verschlossen und die Tiere bekamen an den Folgetagen (nach 48, 72 und 96 Stunden) eine antibiotische Therapie mit Tazobac® (60 mg/kg Körpergewicht). Damit war die klinisch relevante Situation einer chirurgisch sanierten sowie zusätzlich antibiotisch behandelten schweren kotigen Peritonitis modellhaft gegeben. Eine weitere Injektion von Mikrosphären wurde durchgeführt (Zeitpunkt t_4 und Referenz „4“) und die Narkose beendet.

An den Tagen 2, 3 und 4 (nach 48, 72 und 96 Stunden) wurde während einer leichten Sedierung mit Hilfe von Medetomidin (Domitor®) jeweils eine Mikrosphäreninjektion vorgenommen (Zeitpunkte t_5 , t_6 , t_7 sowie Referenzen „5“, „6“ und „7“). Im Anschluss an die letzte Injektion und Probenentnahme wurden die Tiere mit einer Injektion einer Überdosis Pentobarbital-Natrium (Narcoren®) euthanasiert.

2.2.8 Detailliertes Vorgehen bei den einzelnen Versuchsschritten

Portimplantation:

- Allgemeinanästhesie: Ketamin s.c., Gabe von Medetomidin i.v. über Ohrvenenkatheter
- Hämodynamikmessung (Blutdruck, Herzfrequenz)
- Blutentnahme: 3ml (B1)
- Operation: Portimplantation
- Hämodynamik
- Blutentnahme: 3 ml (B2)
- Antagonisierung von Medetomidin

Studiendesign:

<p>Tag 0 der Endotoxinämie bzw. Operationstag = Baseline (7 Tage nach der Portimplantation)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Allgemeinanästhesie bei beiden Versuchsgruppen (s.o.) - Ohrarterienkatheter - Hämodynamik „t₁“ - 1. Mikrosphäreninjektion und Blutentnahme: Referenzprobe „1“ - Beginn Intervention: Scheinoperation: Kontrollgruppe/ Darmperforation und Stuhlableitung nach intraabdominal: Peritonitisgruppe - Hämodynamikmessung nach 2 Stunden, „t₂“ - 2. Mikrosphäreninjektion (vor Beendigung der Narkose bei der Kontrollgruppe/ nach Ende der abdominalen Operation bei der Peritonitisgruppe) und Blutentnahme: Referenzprobe „2“
<p>Tag 1 (24 Stunden)</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Allgemeinanästhesie bei beiden Versuchsgruppen (s.o.) - Ohrarterienkatheter - Hämodynamik „t₃“ - 3. Mikrosphäreninjektion und Blutentnahme: Referenzprobe „3“ - Intervention: Peritonitisgruppe: Peritonitisbehandlung mit Relaparotomie und Spülung des Abdomens, Kontrollgruppe: nur Narkosedurchführung - Hämodynamik nach 2 Stunden Hämodynamik „t₄“

	<ul style="list-style-type: none"> - 4. Mikrosphäreninjektion (postoperativ, Aufwachphase) und Blutentnahme: Referenzprobe „4“
Tag 2 (48 Std.)	<ul style="list-style-type: none"> - Sedierung über Ohrvenenkatheter - Ohrarterienkatheter - Hämodynamik „t₅“ - 5. Mikrosphäreninjektion und Blutentnahme: Referenzprobe „5“
Tag 3 (72 Std.)	<ul style="list-style-type: none"> - Sedierung über Ohrvenenkatheter - Ohrarterienkatheter - Hämodynamik „t₆“ - 6. Mikrosphäreninjektion und Blutentnahme: Referenzprobe „6“
Tag 4 (96 Std.)	<ul style="list-style-type: none"> - Sedierung über Ohrvenenkatheter - Ohrarterienkatheter - Hämodynamik „t₇“ - 7. Mikrosphäreninjektion und Blutentnahme: Referenzprobe „7“ - Sektion der Tiere nach Euthanasierung

Tab. 2.2.1: Studiendesign zum Versuchsablauf

2.2.9 Messzeitpunkte in der Zusammenfassung

- Messzeitpunkt B1: nach Induktion der Allgemeinanästhesie vor Beginn der Portimplantation
- Messzeitpunkt B2: nach Durchführung der Portimplantation vor dem Erwachen des Tieres aus der Narkose

- Messzeitpunkt t_1 : Durchblutungsmessung vor operativer Induktion einer Peritonitis/ nach Einleitung der Narkose bei der Kontrollgruppe
- Messzeitpunkt t_2 : Durchblutungsmessung nach der operativen Induktion einer Peritonitis/ vor Beendigung der Narkose bei der Kontrollgruppe
- Messzeitpunkt t_3 : Durchblutungsmessung 24 Stunden nach Beginn der Peritonitis (vor Beginn der Revisionsoperation)/ des Versuches bei der Kontrollgruppe (bei Narkosebeginn)
- Messzeitpunkt t_4 : Durchblutungsmessung 26 Stunden nach Beginn der Peritonitis (nach Beendigung der Revisionsoperation)/ des Versuches bei der Kontrollgruppe (vor Narkoseende)
- Messzeitpunkt t_5 : Durchblutungsmessung 48 Stunden nach Peritonitisinduktion/ Versuchsbeginn
- Messzeitpunkt t_6 : Durchblutungsmessung 72 Stunden nach Peritonitisinduktion/ Versuchsbeginn
- Messzeitpunkt t_7 : Durchblutungsmessung 96 Stunden nach Peritonitisinduktion/ Versuchsbeginn

Messwerte, die im Ergebnisteil zur Analyse verwendet werden, sind alle gewonnenen hämodynamischen Parameter sowie die nach der Probenaufarbeitung erhaltenen Perfusionswerte.

2.2.10 Sektion

Vor der Euthanasierung der Tiere nach der letzten Messung (t_7) wurde bei ausgewählten Tieren zunächst noch einmal das Halsdreieck, wie in 2.2.3 beschrieben, eröffnet und die Portlage am Hals und die Durchgängigkeit der Arteria carotis sowohl nach distal wie auch nach proximal überprüft. Zusätzlich wurde die korrekte Portlage sichergestellt und auf Lecks überprüft.

Im direkten Anschluss daran wurden die Tiere euthanasiert und die Sektion vorgenommen. Gemäß dem Sektionsprotokoll wurde danach wurde die Brusthöhle median thorakotomiert, das Herz vorsichtig freipräpariert und der linke Ventrikel eröffnet, um die korrekte Lage der Katheterspitze im Ventrikel zu verifizieren. Nach

Entfernung des Herzens wurden beide Lungenflügel entnommen, wobei der rechte mit einem Faden markiert wurde, um ihn später sicher unterscheiden zu können. Nach Laparotomie wurde der Magen, ein Teil des Dünndarms, ein Teil des Dickdarms, der linke Leberlappen, beide Nieren (auch hier wurde zur sicheren Unterscheidung die rechte mit einem Faden markiert), ein Teil des rechten Musculus psoas, nach Craniotomie mit einer oszillierenden Säge bei $n = 7$ Tieren auch das Gehirn entnommen. Die Organe wurden gewogen und bis zu ihrer weiteren Verarbeitung in Formalin lichtgeschützt und gekühlt aufbewahrt.

2.2.11 Probenaufarbeitung

Die gewonnenen Blutproben wurden direkt im Anschluss mit Hilfe einer Wasserstrahlpumpe in die Reaktionsgefäße filtriert und bis zur weiteren Messung kühl und lichtgeschützt aufbewahrt.

Die in Formalin gelagerten Organe wurden mehrfach mit klarem Wasser ausgewaschen, um das Formalin zu entfernen, und dann pro Tier $n=72$ Organproben nach einem spezifischen, im folgenden angeführten Dissektionsschema standardisiert aufbereitet, geschnitten, gewogen und in die Reaktionsgefäße verbracht. Dieses standardisierte Vorgehen diente der besseren Reproduzierbarkeit und Vergleichbarkeit zwischen einzelnen Messungen und Tieren.

Zuerst wurden die linke Niere dekapsuliert und genau in der Mitte geteilt, so dass eine vordere und eine hintere Hälfte entstand. Der obere und untere Pol wurden abgetrennt und der verbleibende Mittelteil noch einmal horizontal geteilt, um einen oberen und einen unteren Teil zu erhalten. Sodann wurden der äußere und innere Cortex sowie die Medulla voneinander getrennt. Dasselbe Verfahren wurde bei beiden Nieren angewandt, so dass 32 Teile entstanden. Der Musculus psoas wurde in zwei je circa 2,5g schwere Stücke geteilt. Das Herz wurde primär in Höhe der Klappenebene in Vorhöfe und Kammern getrennt und die Klappen und die Ausflussbahnen entfernt. Die beiden Vorhöfe wurden getrennt voneinander gewogen und in Probengefäße verbracht. Die Kammern sowie das Septum wurden jeweils halbiert, somit entstanden acht Teile. Der linke Leberlappen wurde in acht nahezu gleich schwere Stücke geschnitten. Der Magen wurde von Bindegewebe gesäubert,

die Cardia und der Pylorus abgetrennt und der verbliebene Corpus in sechs Stücke geteilt. Der Dünndarm wurde in drei etwa gleich lange Teile geschnitten, der Dickdarm in vier. Bei den Lungenflügeln wurde jeweils der Oberlappen in zwei Teile getrennt, der Mittellappen und die Unterlappen wurden in einem verarbeitet.

Insgesamt ergaben sich also 72 Stücke:

1	Niere	links	ventral	oberer Pol
2	Niere	links	ventral	obere Hälfte, äußerer Cortex
3	Niere	links	ventral	obere Hälfte, innerer Cortex
4	Niere	links	ventral	obere Hälfte, Medulla
5	Niere	links	ventral	untere Hälfte, äußerer Cortex
6	Niere	links	ventral	untere Hälfte, innerer Cortex
7	Niere	links	ventral	untere Hälfte, Medulla
8	Niere	links	ventral	unterer Pol
9	Niere	links	dorsal	oberer Pol
10	Niere	links	dorsal	obere Hälfte, äußerer Cortex
11	Niere	links	dorsal	obere Hälfte, innerer Cortex
12	Niere	links	dorsal	obere Hälfte, Medulla
13	Niere	links	dorsal	untere Hälfte, äußerer Cortex
14	Niere	links	dorsal	untere Hälfte, innerer Cortex
15	Niere	links	dorsal	untere Hälfte, Medulla
16	Niere	links	dorsal	unterer Pol
17	Niere	rechts	ventral	oberer Pol
18	Niere	rechts	ventral	obere Hälfte, äußerer Cortex
19	Niere	rechts	ventral	obere Hälfte, innerer Cortex
20	Niere	rechts	ventral	obere Hälfte, Medulla
21	Niere	rechts	ventral	untere Hälfte, äußerer Cortex
22	Niere	rechts	ventral	untere Hälfte, innerer Cortex
23	Niere	rechts	ventral	untere Hälfte, Medulla
24	Niere	rechts	ventral	unterer Pol
25	Niere	rechts	dorsal	oberer Pol
26	Niere	rechts	dorsal	obere Hälfte, äußerer Cortex
27	Niere	rechts	dorsal	obere Hälfte, innerer Cortex

28	Niere	rechts	dorsal	obere Hälfte, Medulla
29	Niere	rechts	dorsal	untere Hälfte, äußerer Cortex
30	Niere	rechts	dorsal	untere Hälfte, innerer Cortex
31	Niere	rechts	dorsal	untere Hälfte, Medulla
32	Niere	rechts	dorsal	unterer Pol
33	Muskel	1		
34	Muskel	2		
35	Herz	Vorhof	links	
36	Herz		rechts	
37	Herz	linke Kammer	1	
38	Herz	linke Kammer	2	
39	Herz	Septum	1	
40	Herz	Septum	2	
41	Herz	rechte Kammer	1	
42	Herz	rechte Kammer	2	
43	Leber	1		
44	Leber	2		
45	Leber	3		
46	Leber	4		
47	Leber	5		
48	Leber	6		
49	Leber	7		
50	Leber	8		
51	Magen	Cardia	1	
52	Magen		2	
53	Magen		3	
54	Magen		4	
55	Magen		5	
56	Magen		6	
57	Magen		7	
58	Magen	Pylorus	8	
59	Darm	Dünndarm	1	
60	Darm	Dünndarm	2	

61	Darm	Dünndarm	3	
62	Darm	Dickdarm	1	
63	Darm	Dickdarm	2	
64	Darm	Dickdarm	3	
65	Darm	Dickdarm	4	
66	Lunge	links	Oberlappen	1
67	Lunge	links		2
68	Lunge	links	Untere Lappen	
69	Lunge	rechts	Oberlappen	1
70	Lunge	rechts	Oberlappen	2
71	Lunge	rechts	Mittellappen	
72	Lunge	rechts	Untere Lappen	

Tab. 2.2.2: Dissektionsschema

Alle Gewebestücke wurden gewogen und in Probengefäße zur weiteren Verarbeitung (Messung der Fluoreszenzintensität) verbracht.

2.2.12 Probenmessung

Für die Messung der Fluoreszenzintensität wurde eine am Institut für Chirurgische Forschung Klinikum Großhadern entwickelte Probenaufbereitungseinheit (Sample Processing Unit [SPU]) verwendet. Diese besteht aus drei Untereinheiten: Filterhalter, Filter und Probengefäß (Abb. 3):

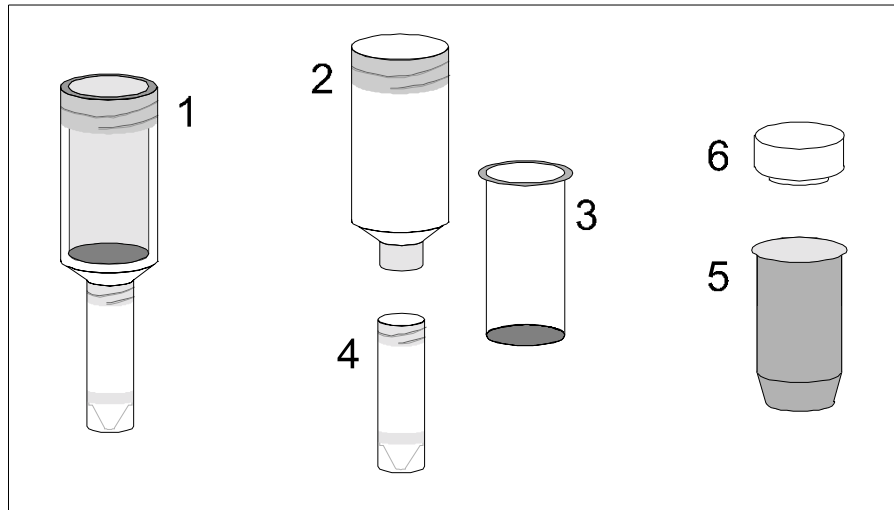


Abb. 2.2.5 Zur Messung der fluoreszenzmarkierten Blut- und Gewebeproben benötigte Gefäße: 1) SPU, bestehend aus 2) Filterhalter, 3) Filter und 4) Probengefäß, sowie 5) Edelstahlkocher und 6) Delrindeckel, die während der Verdauung gebraucht werden.

Der essentielle Bestandteil der SPU ist der Filter, der mit einem Polyamid-Filtergewebe (Maschenöffnung $7\mu\text{m}$) ausgestattet ist. Die Gewebestücke wurden in je einen Filter gelegt. Der Filter wurde dann in ein Edelstahlkochgefäß gestellt, zur Verdauung des Gewebes wurden 15 ml Digestionsflüssigkeit (4N KOH mit 0,02% Tween) und 1,5 ml Isopropanol 100% hinzugegeben. Nach 6 Stunden Inkubation bei 60°C war das organische Material vollständig aufgelöst und die fluoreszenzmarkierten Mikrosphären (FMS) schwammen in der Zwischenschicht zwischen KOH und Isopropanol. Mit Hilfe von Unterdruck wurde die Flüssigkeit durch das Filtergewebe filtriert, die Mikrosphären kamen auf der Membran zu liegen.

Der später von den fluoreszenzmarkierten Mikrosphären ausgelöste Fluoreszenzfarbstoff benötigt ein neutrales Umgebungsmilieu. Hierzu mussten alle KOH-Rückstände aus dem Filter entfernt werden. Dies geschah mittels eines Phosphatpuffers (29,9g K_2HPO_4 in 800ml Aqua dest. vermischt mit 5,88g KH_2PO_4 in 200ml Aqua dest.), der auf einen neutralen pH-Wert eingestellt ist. Mit 15 ml dieses Puffers wurde die gesamte Innenfläche des Filters abgespült. Durch kurzes Eintauchen des Filters in den Puffer wurde auch die Außenfläche von den KOH-Resten befreit.

Nach Trocknung des Filters durch Zentrifugation (4000 U/min für 4 min) wurde der Farbstoff mit 2 ml eines organischen Lösungsmittels (2-Ethoxyethyl-acetat-

Cellosolve) aus den FMS ausgelöst. Durch erneute Zentrifugation (4000 U/min für 4 min) wurde der Farbstoff im Sammelgefäß aufgefangen und die Fluoreszenzintensität in einem Fluoreszenzspektrometer bestimmt. Die Intensität lässt auf die Anzahl der Mikrosphären rückschließen, welche wiederum direkt proportional zum Blutfluss im untersuchten Gewebestück ist.

Der Proportionalitätsfaktor wurde durch eine Blutreferenzprobe bestimmt, die während der Injektion der Mikrosphären aus der Ohrarterie unter konstanter Pumpenzugeschwindigkeit mit einer rückwärts laufenden Perfusorpumpe entnommen wurde. Diese Blutprobe konnte ohne vorherige Verdauung unter Koagulationsschutz (CPDA mit dem Hauptbestandteil Citrat) direkt filtriert werden. Auch hier wurde wiederum der Farbstoff mittels Cellosolve gewonnen und die Fluoreszenzintensität bestimmt (108).

2.2.13 Bestimmung der S-100b-Werte

Zur Bestimmung der S-100b-Werte im Serum wurde ein immunluminometrischer Assay verwendet. Diese basiert auf dem „Sandwich“-Prinzip, für die Beschichtung der Festphase und für den Tracer wurde ein hochspezifischer monoklonaler Antikörper verwendet.

Der Antikörper ist an der Röhrchenwand immobilisiert, das in der Probe vorhandene S-100b wird während der ersten Inkubation an diesem gebunden. Das überschüssige Material wird durch Waschen entfernt. Bei der zweiten Inkubation reagiert der Tracerantikörper mit dem bereits gebundenen S-100b, der Überstand wird ebenfalls durch Waschen entfernt. Der Tracerantikörper besteht aus einem S-100b-Antikörper und einem kovalent gebundenen Isoluminolderivat. Dieser Komplex wird mittels Lichtreaktion sichtbar gemacht. Durch automatisch injizierte alkalische Peroxidlösung und Katalysatorlösung startet die Oxidation von Isoluminol. Dies geschieht aufgrund der sofort einsetzenden Emission der Photonen, welche nach weniger als 20 Sekunden wieder beendet ist, direkt im Luminometer. Das entstehende Licht der Wellenlänge 425 nm wird mit Hilfe eines Photomultipliers des Luminometers in RLUs (relative light units) gemessen. Das Ergebnis ist direkt proportional zu der in der Probe vorhandenen Menge des S-100b-Proteins.

2.3 Berechnung der Blutflusswerte

Die Berechnung der absoluten Blutflusswerte in den jeweiligen Organen begründet sich in der Annahme, dass die Anzahl der in der jeweils interessierenden Organregion vorhandenen Mikrosphären direkt proportional zu der dazugehörigen Organperfusion ist. Daraus lässt sich folgende Gleichung erstellen: (diese und alle folgenden Berechnungen stammen, zum Teil in leicht abgewandelter Form, aus: Thein E: Bestimmung der regionalen Organdurchblutung mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären. Modifikation, Verbesserung und vollständige Automatisierung der bestehenden Methode. Dissertation am Institut für Chirurgische Forschung der medizinischen Fakultät der LMU München, 1999) (134):

$$BF_{\text{reg}} = X * C_{\text{reg}}$$

mit: BF_{reg} : regionaler Blutfluss, C_{reg} : Anzahl der Mikrosphären in der Region, X : Proportionalitätsfaktor. Für die arterielle Referenzprobe gilt die selbe Gleichung:

$$BF_{\text{ref}} = X * C_{\text{ref}}$$

Hier ist sowohl der Blutfluss als auch die Menge an Mikrosphären bekannt, so dass sich mit Hilfe dieser Gleichung der Proportionalitätsfaktor X berechnen lässt.

$$X = BF_{\text{ref}} / C_{\text{ref}}$$

Wenn diese Gleichung in die Gleichung zur Berechnung der regionalen Perfusion eingesetzt wird, ergibt sich folgende Gleichung, mit der nun der absolute Blutfluss in jeder interessierenden Region bestimmt werden kann:

$$BF_{\text{reg}} = C_{\text{reg}} * (BF_{\text{ref}} / C_{\text{ref}})$$

Werden nun die regionalen Blutflusswerte untereinander verglichen, muss der so errechnete Wert auf das Gewicht der Probe bezogen werden. Dies geschieht mit folgender Gleichung:

$$BF_{\text{reg}} = [C_{\text{reg}} * (BF_{\text{ref}} / C_{\text{ref}})] / g$$

Es ergeben sich hiermit absolute Blutflusswerte mit der Einheit [ml/min/g] (134).

2.4 Statistik

Die statistischen Analysen wurden mit SPSS, Version 11.5 durchgeführt. Es wurde eine explorative Datenanalyse durchgeführt. Das Signifikanzniveau war festgelegt auf $p < 0,05$. Die in den Versuchen erhaltenen Werte, die außerhalb des Bereiches des Mittelwertes \pm zwei Standardfehlern lagen, wurden in Zusammenschau mit den Rohdaten sowie den Versuchsprotokollen bei fehlender Plausibilität nicht berücksichtigt. Werte, die aus versuchstechnischen Gründen (Pumpe zog nicht gleichmäßig ab, Kreislaufprobleme des Versuchstieres, Erwachen bzw. Bewegungen des Versuchstieres während der Injektion) nicht reliabel erschienen, wurden ebenfalls nicht berücksichtigt.

Die Mittelwerte wurden mit Hilfe eines allgemeinen linearen Modells für Messwiederholungen analysiert. Der statistische post-hoc Vergleich zwischen den beiden Versuchsgruppen erfolgte durch T-Tests für unabhängige Stichproben, bei signifikanten p-Werten für den Gesamtzeitraum mit Hilfe der MANOVA. Wo die Durchführung eines T-Testes nicht erlaubt war (bei signifikanten Unterschieden der Varianzen der Versuchsgruppen mit signifikanten Levene's Test), wurden nichtparametrische Tests durchgeführt. Bei verbundenen Werten wurde der T-Test für verbundene Stichproben bzw. der nicht-parametrische Wilcoxon-Test angewandt. Bei den Punktdiagrammen wurde die Berechnung der Regressionsgeraden und des Bestimmtheitsmaßes mit Hilfe des Programms EXCEL 2000 durchgeführt, die P-Werte wurden mit Hilfe einer nicht-linearen Korrelation (Spearman) mit SPSS 11.5 berechnet (MANOVA).

Die Abbildungen sind Fehlerbalkendiagramme, welche den Mittelwert sowie 2 Standardfehler des Mittelwertes angeben, bzw. Punktdiagramme, welche Fluss-Einzelwerte zu verschiedenen Zeitpunkten angeben (siehe Beschriftungen der jeweiligen Diagramme).

3. Ergebnisse

3.1 Implantation des Portkatheters

Die Implantation des Portkatheters wurde bei 29/30 Tieren (das entspricht 97%) ohne größere Komplikationen bei einer durchschnittlichen Operationsdauer von 71 ± 9 Minuten durchgeführt. Ein Kaninchen verstarb während der Operation nach unklaren Krampfanfällen. Bei den erfolgreich durchgeführten Implantationen konnten keine katheterassoziierten Arrhythmien oder bedeutsame Schwankungen des arteriellen Blutdrucks beobachtet werden (siehe Tab. 3.1.2). Aufgrund der Sauerstoffgabe stieg die arterielle Sauerstoffsättigung intra- und postoperativ signifikant im Vergleich zu den präoperativen, bei Raumluft gewonnenen Werten. Auch die Hämoglobinkonzentration im Blut veränderte sich nicht signifikant über die Zeit (siehe Tab. 3.1.2), trotz der Gabe von Volumen durch Vollelektrolytlösung sowie Blutverlust durch intraoperativen Blutungen, welche jedoch in keinem Fall 5 ml überschritten. Gemessen wurde dies durch Aspiration des Blutes mittels einer 5 ml Spritze und entspricht einem Verlust von weniger als 3% des gesamten Blutvolumens. Die in allen Tabellen angegebenen Werte haben folgende Einheiten:

Blutdruck (RR syst., diast., Mitteldruck)	mmHg
Herzfrequenz	min ⁻¹
Arterielle Sauerstoffsättigung (SaO ₂)	%
Hämoglobingehalt im Blut (Hb)	g/dl

Tab. 3.1.1: Einheiten der in der Arbeit angegebenen Werte

Werte	Zeitpunkt	Mittelwert	Standardfehler des Mittelwertes	Signifikanz
RR syst.	präop.	84	2	0,834
	postop.	84	2	
RR diast.	präop.	67	2	0,852
	postop.	71	2	
MAP	präop.	73	2	0,992
	postop.	76	2	
HF	präop.	171	3	0,014
	postop.	162	2	
SaO2	präop.	84,3	2,2	0,022
	postop.	96,7	1,6	
Hb	präop.	12,2	0,4	0,337
	postop.	10,71	0,3	

Tab. 3.1.2: hämodynamische Parameter während der Portimplantation

Der Mitteldruck wurde mit der Näherungsformel:

$$\text{diast. Druck} + [(\text{ syst. Druck} - \text{ diast. Druck}):3]$$

bestimmt.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die hämodynamischen Parameter wie systolischer, diastolischer und mittlerer Blutdruck keinen signifikanten Unterschied zwischen der prä- und der postoperativen Bestimmung aufweisen. Die Herzfrequenz sinkt signifikant ab, was zum einen der Volumengabe, zum anderen der am Ende des Versuches noch vorhandenen leichten Sedierung der Tiere zugeschrieben werden kann. Trotz einer Tendenz zu niedrigeren postoperativen Hämoglobinwerten war der Hämoglobin-Wert nicht signifikant abgesunken. Die Sauerstoffsättigung stieg signifikant an, da die präoperative Abnahme bei dem bereits leicht sedierten und daher gering atemdepressiven Tier bei Raumluft vorgenommen wurde, wohingegen die postoperative Abnahme noch im Operationssaal unter Sauerstoffinsufflation stattfand.

Die Tiere zeigten schon Stunden nach der Operation wieder normales Fress- und soziales Verhalten, sie gewannen wenige Tage später ihr Ausgangsgewicht wieder (siehe Abb. 3.1.1).

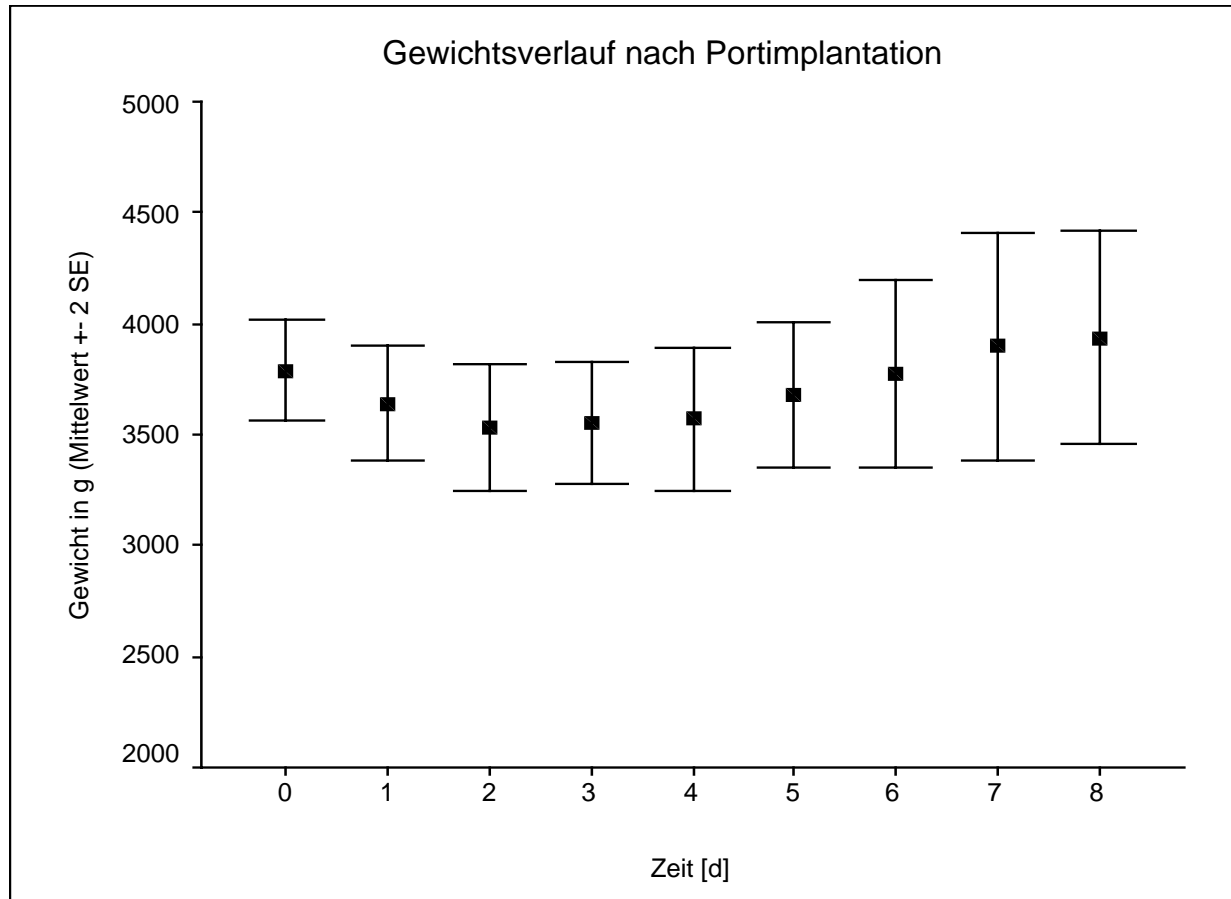


Abb. 3.1.1: Gewichtsverlauf nach Portimplantation (Mittelwerte \pm 2 SEM [g]): Das Ausgangsgewicht von 3.8 ± 0.3 kg wurde nach 3 – 7 Tagen wieder erreicht

Unter Verwendung der vorher beschriebenen speziell modifizierten mikrochirurgischen Technik einer Tabaksbeutelnaht zum sicheren Einführen des Katheterschlauches in die Arteria carotis konnte der Verschluss der Arteria carotis mit nachfolgender zerebraler Ischämie erfolgreich verhindert werden. Dies konnte durch fünf Katheterrevisionen, die vor der postmortalen Untersuchung durchgeführt wurden, bewiesen werden. In allen Tieren fand sich eine regelrechte ortho- wie auch retrograde Perfusion der rechten Arteria carotis. Es gab keinerlei Hinweis auf einen Verschluss der Arteria carotis, weder proximal noch distal der Insertionsstelle des Katheters. Gleichzeitig zeigte auch keines der Tiere postoperativ klinische Anzeichen einer zerebralen Ischämie wie zum Beispiel Lähmungen, Veränderungen der

Pupillenreaktion oder verlängerte postoperative Bewusstseinstörungen. Das Fehlen eines zerebralen ischämischen Insults während oder nach der Katheterimplantation wird auch durch die Ergebnisse der S-100b-Messungen unterstützt. S-100b ist ein Enzym, welches indikativ für zerebralen Ischämieschaden ist. Die Messungen dieses Parameters wurden am Tag 5 nach der Operation durchgeführt und zeigten keinerlei Anstieg postoperativ, wie er bei schwerer zerebraler Ischämie zu erwarten gewesen wäre (siehe Tab. 3.1.3).

	Präoperativ	Postoperativ
S100-b [ng/dl]	1,6 ± 0,4	1,8 ± 0,4

Tab. 3.1.3: Serumkonzentration des Neuroproteins S100-b vor und nach der Portimplantation, $p > 0,05$

Die korrekte Katheterlage im linken Ventrikel wurde bei 26/29 Tieren (das entspricht 90%) verifiziert. Bei einem Tier lag die Katheterspitze in der Aorta ascendens direkt hinter der Aortenklappe.

Bei zwei Tieren hatte sich das Portreservoir vom Katheterschlauch diskonnektiert, so dass die Injektionen subkutan verblieben und nicht durch den Katheter intraventrikulär gelangen konnten. Die Reservoir wurde allerdings nach wie vor von den Fixierungsnähten an Ort und Stelle gehalten, konnten also nicht durch Verlagerung dem Tier Schaden zufügen.

3.2 Gewichtsverlauf und Hämodynamik der Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe zur Mikrosphäreninjektion wurde mit 16 Tieren begonnen. Bei zwei Tieren stellte sich nach der ersten Injektion heraus, dass das Portreservoir diskonnektiert war, so dass sie aus dem Versuch genommen wurden und somit die eigentliche Gruppe nur aus 14 Tieren mit korrekter Portlage und –funktion bestand. Ein Tier verstarb aus unklarer Ursache nach Tag 0, ein weiteres während der zweiten Mikrosphäreninjektion an einem Herzstillstand. Vermutlich wurde das

Reizleitungssystem des Herzens durch die Injektion irritiert. Am Tag 1 waren folglich noch zwölf Tiere im Versuch, wovon am Tag 2 weitere drei herausgenommen werden mussten, eines, weil sich der Gesundheitszustand dramatisch verschlechtert hatte, so dass die Ergebnisse nicht mehr als Normwerte auszuwerten gewesen wären, eines, weil die Ohrarterie zur Gewinnung der Referenzprobe nicht mehr zu punktieren war und ein Tier verstarb in der Nacht nach einem apoplexähnlichen Krankheitsbild. Auch am Tag 3 verkleinerte sich die nun 9 Tiere umfassende Gruppe um zwei Tiere, wobei das eine aufgrund unklarer Krämpfe, vermutlich ausgelöst durch eine versehentliche intravasale Injektion von Xylocain, starb, und bei dem zweiten wiederum keine Arterie mehr zu punktieren war. Der Versuch wurde am Tag 4 mit diesen sieben Tieren beendet.

Diese Tiere zeigten während des Versuchsverlaufes ein normales Fressverhalten, was auch anhand des Gewichtsverlaufes deutlich wird (siehe Abb. 3.2.1). Die Tiere kamen mit einem durchschnittlichen Gewicht von $3,7 \pm 0,4\text{kg}$ in den Versuch und hatten bei Versuchsende ein mittleres Gewicht von $3,6 \pm 0,5\text{kg}$.

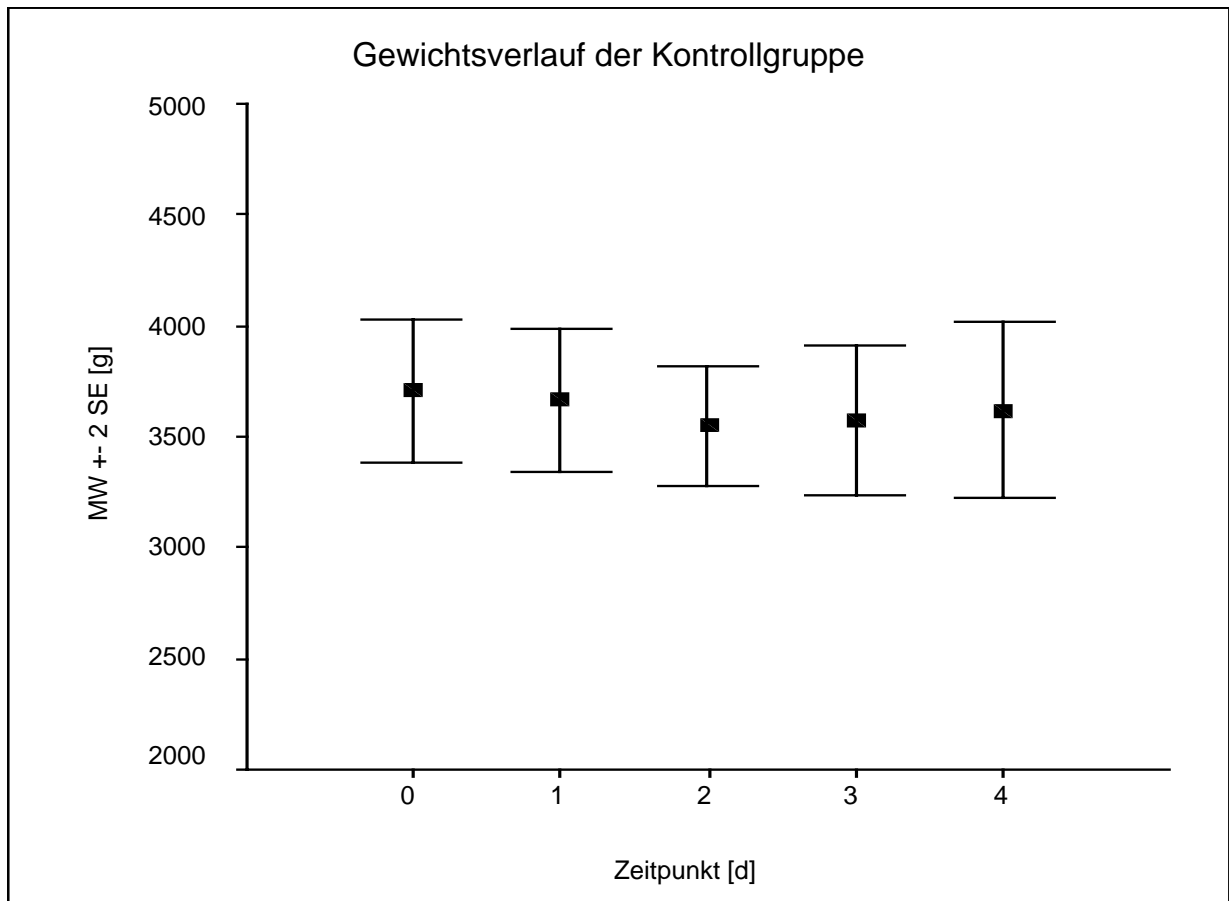


Abb. 3.2.1: Gewichtsverlauf (Mittelwerte \pm 2 SEM [g]) der Kontrollgruppe während der Versuchstage 0-4

Es traten auch keine Probleme während der Narkosen an den ersten beiden Tagen oder den Sedierungen an den Folgetagen auf. Der Hämoglobinwert betrug zum Zeitpunkt t_1 $11,4 \pm 0,31$ g/dl und zum Zeitpunkt t_6 $7,2 \pm 0,39$ g/dl und weist somit einen signifikanten Abfall auf. Der Wert war aber auch am Versuchsende noch im Toleranzbereich.

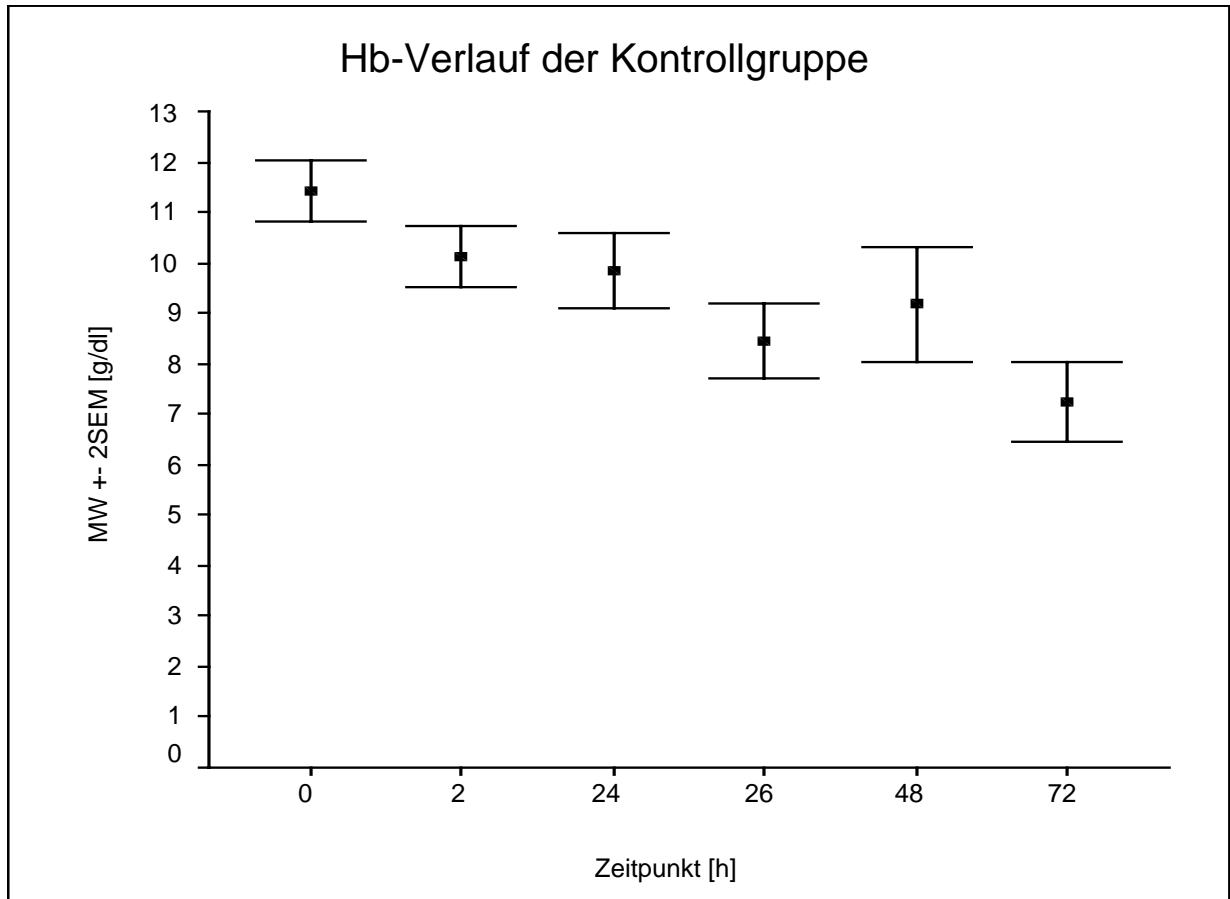


Abb. 3.2.2: Hämoglobin (Mittelwert \pm 2 SEM [g/dl]) der Kontrollgruppe während der Versuchstage 0-4 (Zeit in Stunden)

Die hämodynamischen Parameter wie Herzfrequenz, Blutdruck und auch die arterielle Sauerstoffsättigung blieben während des gesamten Versuchszeitraumes stabil und im Normbereich (siehe Tabelle 3.2.1 sowie Abb. 3.2.3 – 3.2.5).

	Zeitpunkt	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz
SaO₂	t ₁	89,2	2,4	0,733
	t ₆	86,4	5,5	
RR syst.	t ₁	84	6	0,213
	t ₆	73	2	
RR diast.	t ₁	61	5	0,985
	t ₆	53	6	
MAP	t ₁	69	6	0,587
	t ₆	60	4	

HF	t ₁	168	11	0,030
	t ₆	171	6	

Tab. 3.2.1: Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz für die Werte systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt t₁ und t₆, Einheiten: SaO₂: %, RR: mmHg, HF; min⁻¹

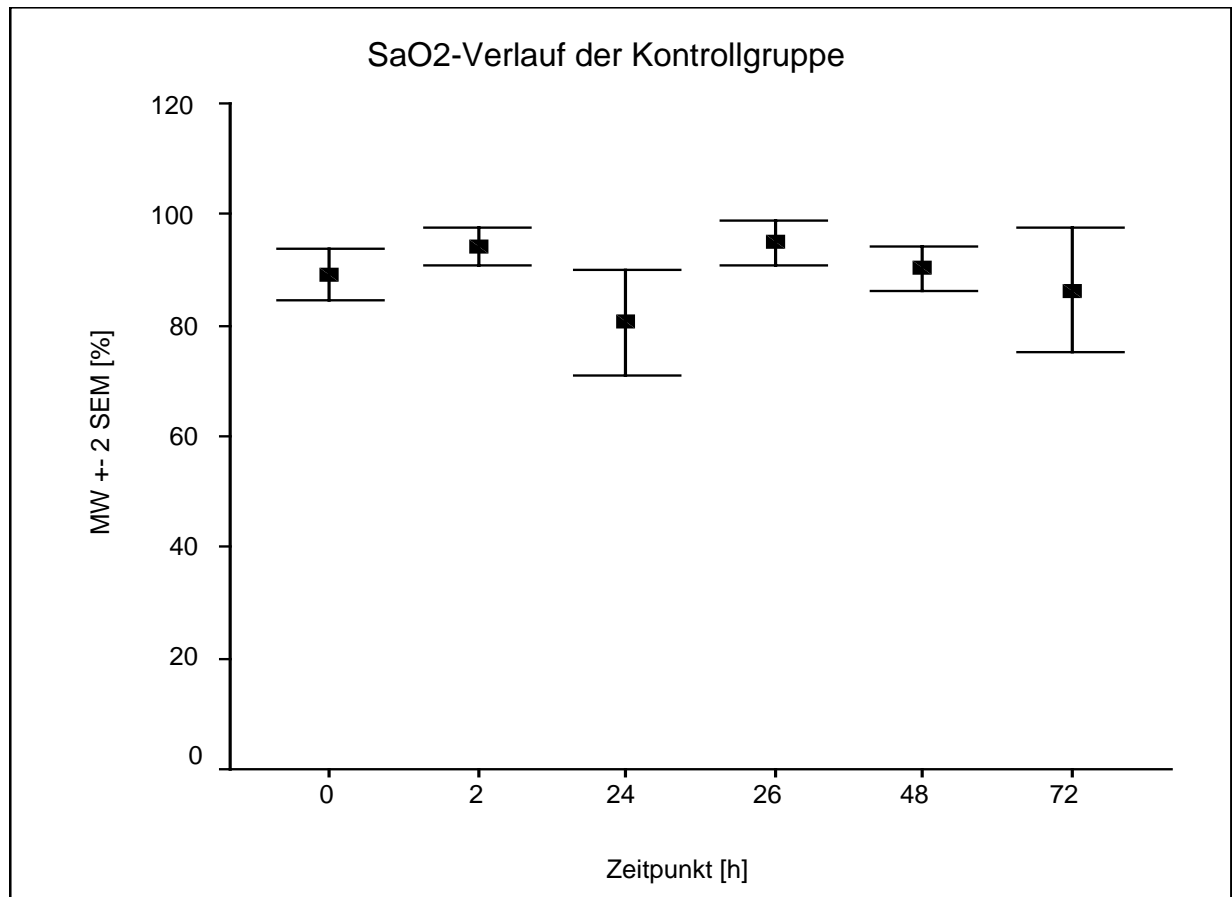


Abb. 3.2.3: Verlauf der arteriellen Sauerstoffsättigung (MW ± 2 SEM [%]) während des Versuchs bei der Kontrollgruppe (Zeit in Stunden)

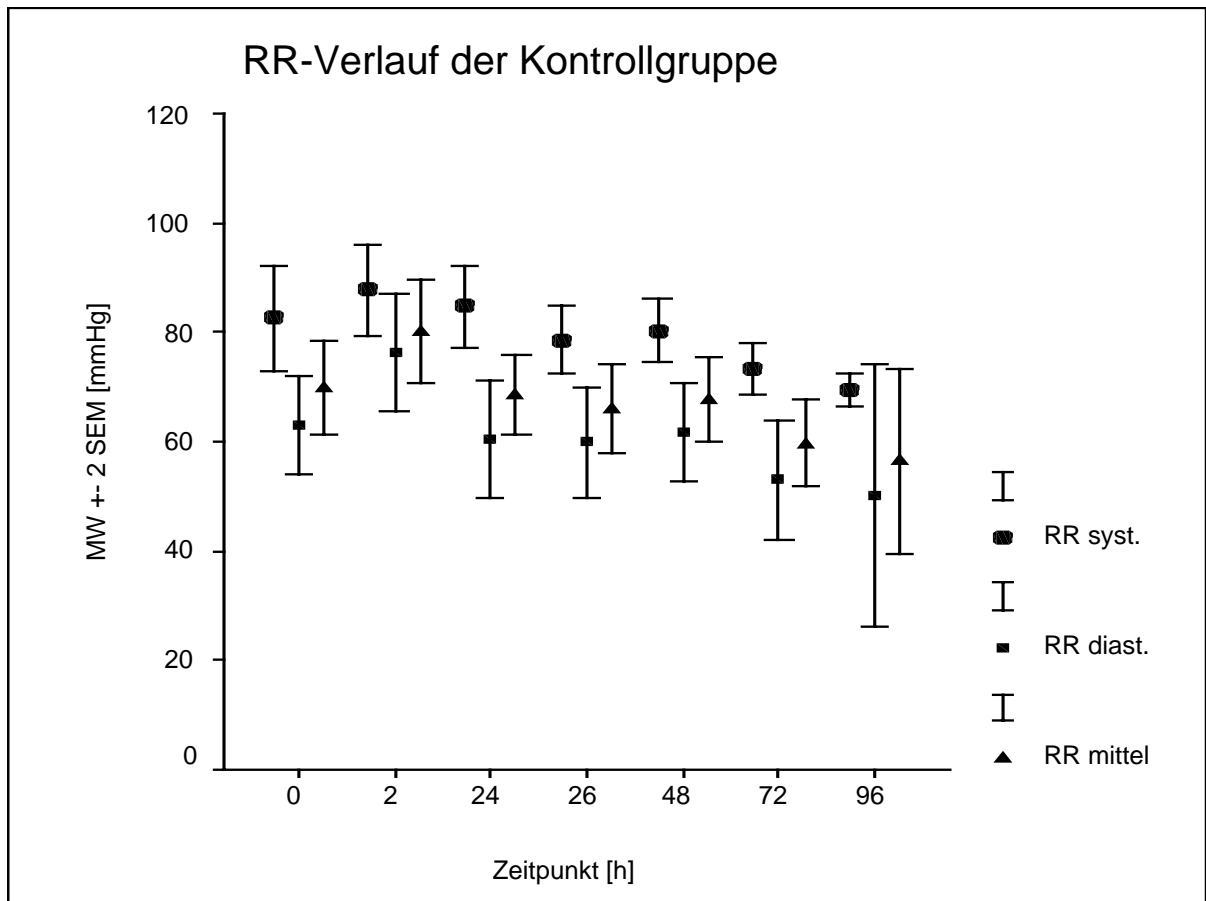


Abb. 3.2.4: Verlauf des systolischen, diastolischen und des mittleren arteriellen Blutdrucks ($MW \pm 2 \text{ SEM}$ [mmHg]) während des Versuchs bei der Kontrollgruppe (Zeit in Stunden)

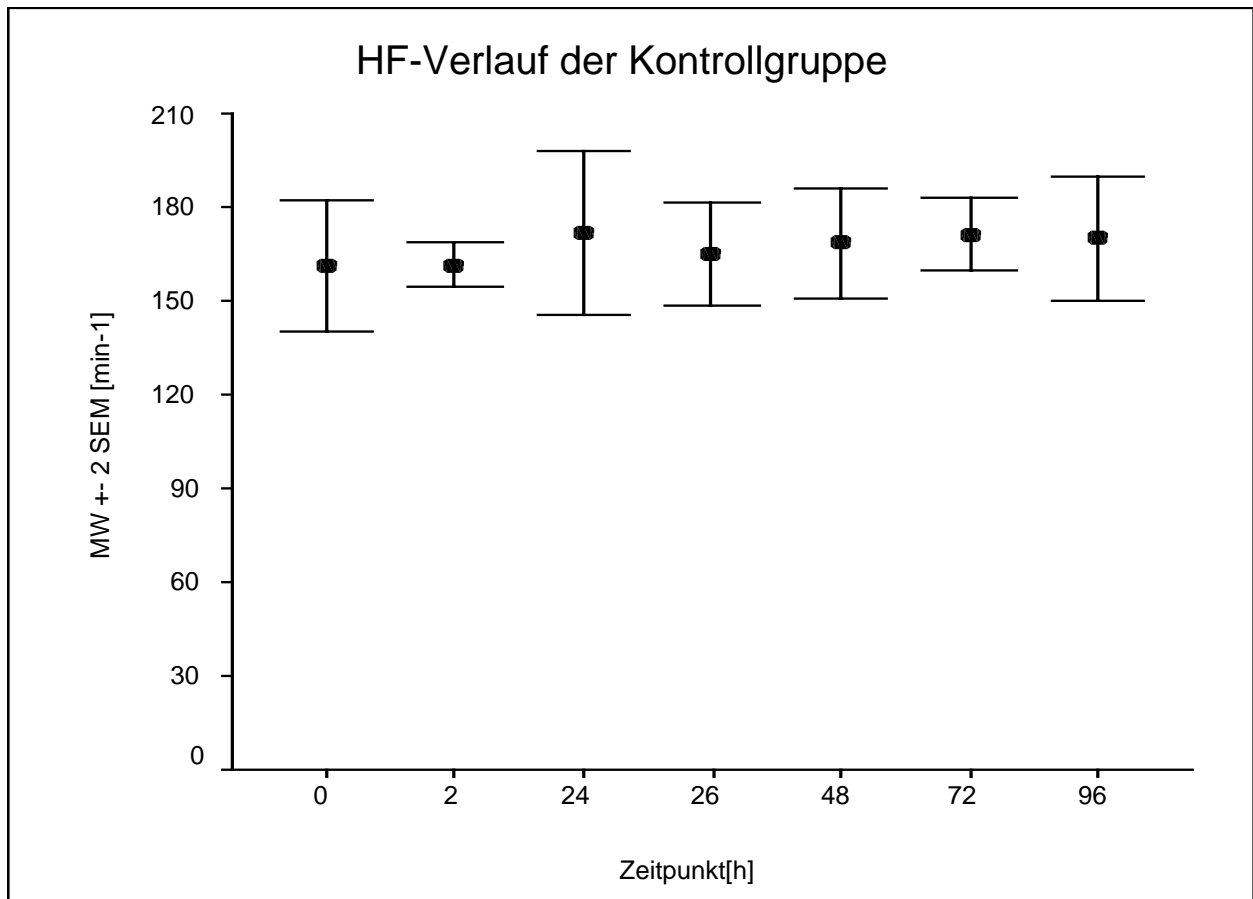


Abb. 3.2.5: Verlauf der Herzfrequenz (HF, MW \pm 2 SEM [min⁻¹]) während des Versuchs bei der Kontrollgruppe (Zeit in Stunden)

Bei der anschließenden Sektion waren die Organe bei makroskopischer Inspektion unauffällig und in Form und Größe normal. Auch die Gewichte bewegten sich stets im Normbereich, wie am Beispiel des Herzgewichtes (exemplarisch bei 9 Tieren gemessen) gezeigt werden kann. Das Normgewicht eines Kaninchenherzens beträgt 0.29 % des Körpergewichtes (127), was bei einem Durchschnittsgewicht unserer Tiere zu Versuchsbeginn von 3.6 ± 0.4 kg einem Wert von 10.3 g entspricht. Das errechnete durchschnittliche Herzgewicht der Tiere lag bei 9.4 ± 2.9 g, also im Normalbereich oder eher leicht darunter. Es fanden sich des weiteren auch keine Zeichen von systemischen Entzündungen, insbesondere zum Beispiel keine Perikard- oder Pleuraergüsse, Zeichen von Einblutungen in Niere, Leber oder Lunge oder Zeichen von Herzinsuffizienz oder Herzinfarkten. Besonderes Augenmerk wurde auch auf die Herzklappen, hier vor allem auf die vom Katheterschlauch passierte Aortenklappe gelegt, wobei auch hier alle Klappensegel zart und regelrecht

waren und keinerlei Vegetationen oder sonstige Hinweise auf Infektionen, Insuffizienzen oder Stenosen boten. Auch bei den untersuchten Gehirnen fand sich makroskopisch kein Hinweis auf Einblutungen oder Infarktgebiete.

3.3 Hämodynamik der Peritonitisgruppe

Die Peritonitisgruppe bestand aus vier Tieren. Von diesen verstarb ein Tier am Tag 2 vor den Mikrosphäreninjektionen an einem Atemstillstand, nachdem schon am Vortag ein kurzzeitiger Herz-Kreislauf-Stillstand durch mechanische und medikamentöse Reanimation beendet werden konnte. Am Tag 3 konnte bei einem weiteren Tier keine Mikrosphäreninjektion mehr durchgeführt werden, da aufgrund des Zustandes des Tieres die sofortige Tötung nicht zu umgehen war.

Bei zwei Tieren konnte somit über den gesamten Zeitraum von 72 Stunden injiziert werden, bei einem über 48 Stunden und bei einem weiteren über 24 Stunden.

Die Tiere hatten schon an Tag 1 ein schwerkrankes Erscheinungsbild, auch das soziale Verhalten war deutlich gestört, sie saßen mehr oder weniger teilnahmslos und schläfrig in der Käfigecke. Auch die Futteraufnahme war reduziert, dies wurde anhand des Gewichtsverlauf kontrolliert. Waren die Tiere mit $3,5 \pm 0,4\text{kg}$ in den Versuch gekommen, hatten sie bereits innerhalb der ersten 24 Stunden auf $3,3 \pm 0,4\text{kg}$ abgenommen (siehe Abb. 3.3.1). Bei der Revision an Tag 1 zeigten sich lokal an den Perforationsstellen des Darmes Entzündungszeichen wie Schwellungen und Hyperämie, die Darmschlingen waren zum Teil miteinander verbacken und in allen Fällen waren die am Vortag erzeugten Perforationen noch durchgängig. Nach der Revision stabilisierte sich der Zustand wie auch das Gewicht wieder, eine deutliche Apathie und ein krankes Erscheinungsbild waren aber nach wie vor zu beobachten.

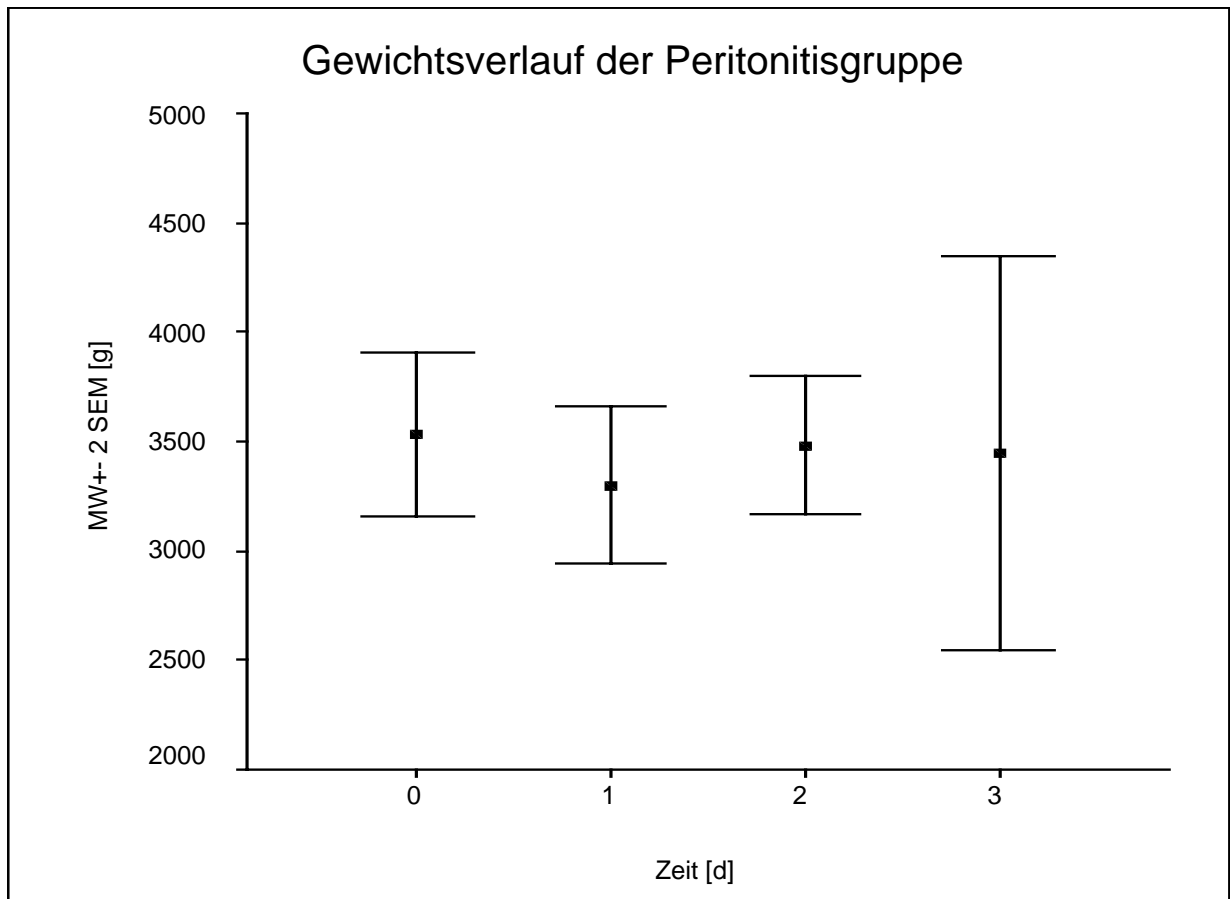


Abb. 3.3.1: Gewichtsverlauf (Mittelwerte \pm 2 SEM [g]) der Peritonitisgruppe während der Versuchstage 0-3

Man sieht bei der Betrachtung der hämodynamischen Parameter praktisch keine Änderung der Herzfrequenz wie auch der arteriellen Sauerstoffsättigung während der gesamten Versuchsdauer. Beide Werte bewegen sich im gesamten Zeitraum im Normbereich (siehe Abb. 3.3.2 und 3.3.3).

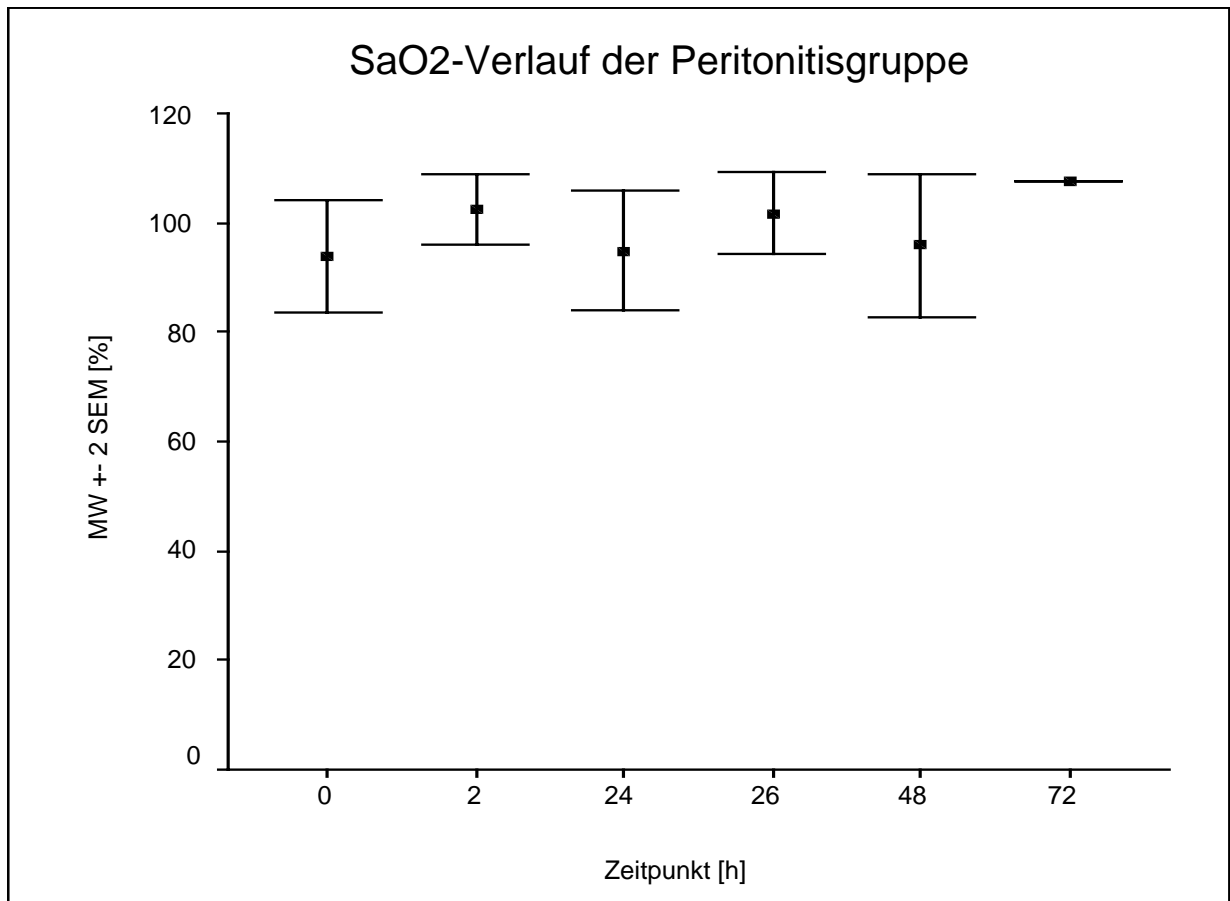


Abb. 3.3.2: Verlauf der arteriellen Sauerstoffsättigung (MW ± 2 SEM [%]) während des Versuchs bei der Peritonitisgruppe (Zeit in Stunden)

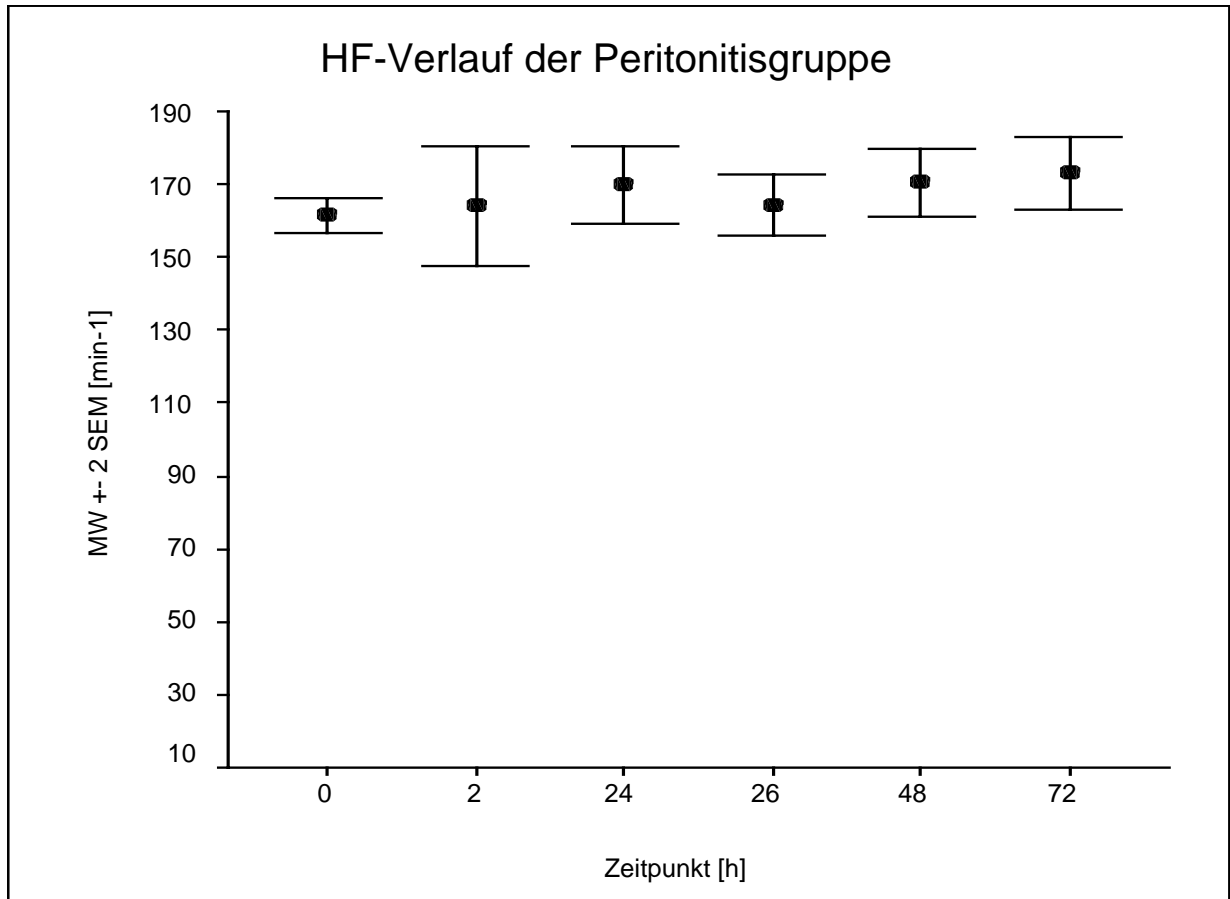


Abb. 3.3.3: Herzfrequenz (Mittelwerte \pm 2 SEM [min⁻¹]) der Peritonitisgruppe während der Versuchstage 0-3 (Zeit in Stunden)

In der nachfolgenden Tabelle sind noch einmal die Werte der hämodynamischen Parameter mit den p-Werten dargestellt.

	Zeitpunkt	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz
SaO₂	t ₁	93,9	5,1	0,078
	t ₆	107,4	0	
RR syst.	t ₁	76	5	0,956
	t ₆	64	8	
RR diast.	t ₁	64	5	0,555
	t ₆	53	9	
MAP	t ₁	68	5	0,705
	t ₆	57	9	
HF	t ₁	162	2	0,460

HF	t_6	173	5	
-----------	-------	-----	---	--

Tab. 3.2.1: Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz für die Werte systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Blutdruck der Peritonitisgruppe zum Zeitpunkt t_1 und t_6 , Einheiten: SaO₂: %, RR: mmHg, HF; min⁻¹

Der Hämoglobinwert der Tiere zeigt gegen Ende des Versuches einen deutlichen Abfall (siehe Abb. 3.3.4), der zum einen auf die auch bei der Kontrollgruppe erwähnten Gründe der Blutverdünnung durch Vollelektrolytlösung und Blutabnahmen, hier jedoch des weiteren noch auf eine infektbedingte Anämie durch die Sepsis zurückzuführen ist.

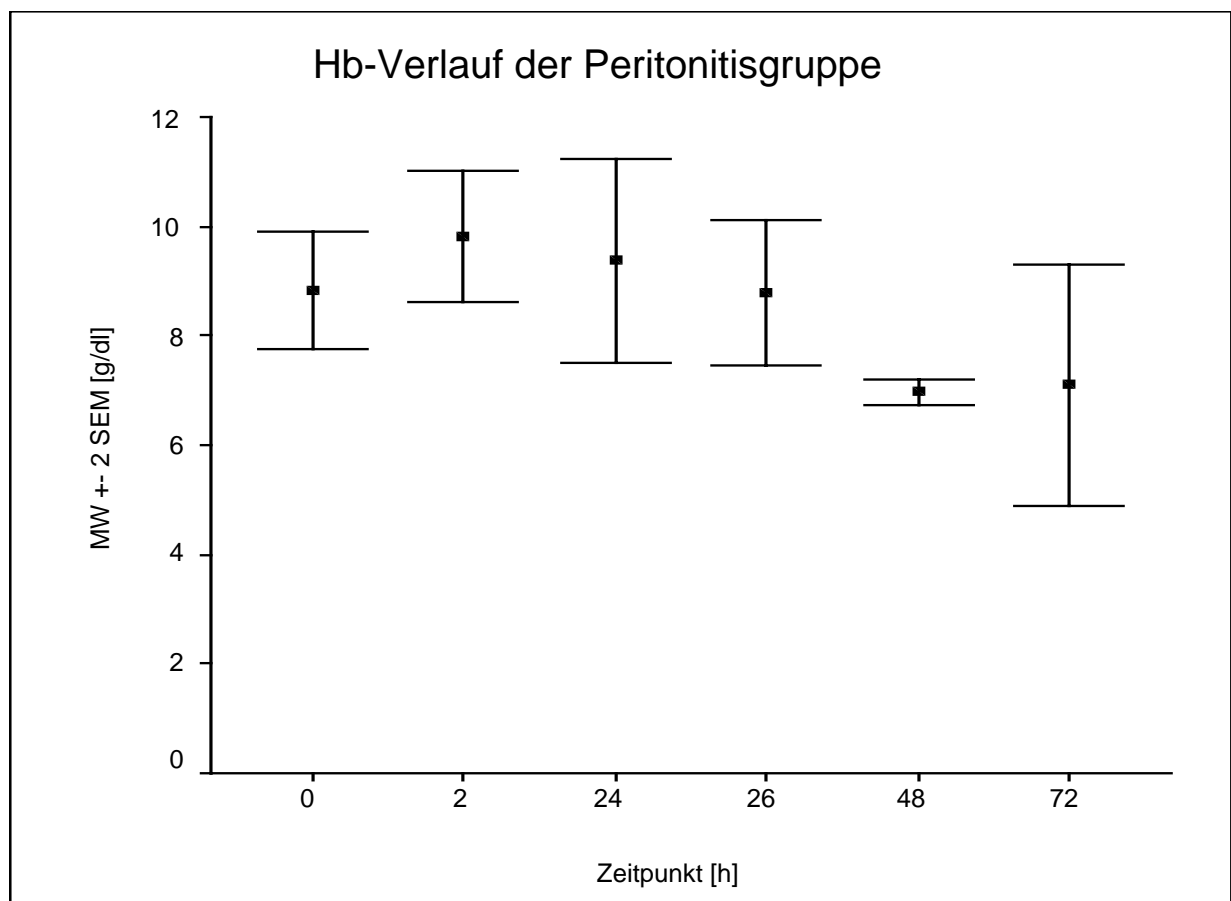


Abb. 3.3.4: Hämoglobin (Mittelwerte \pm 2 SEM [g/dl]) der Peritonitisgruppe während der Versuchstage 0-3

Bei der Betrachtung des Blutdruckverlaufes fällt ein tendenzielles Absinken der Werte auf, welches jedoch nicht signifikant ist (siehe Abb. 3.3.5).

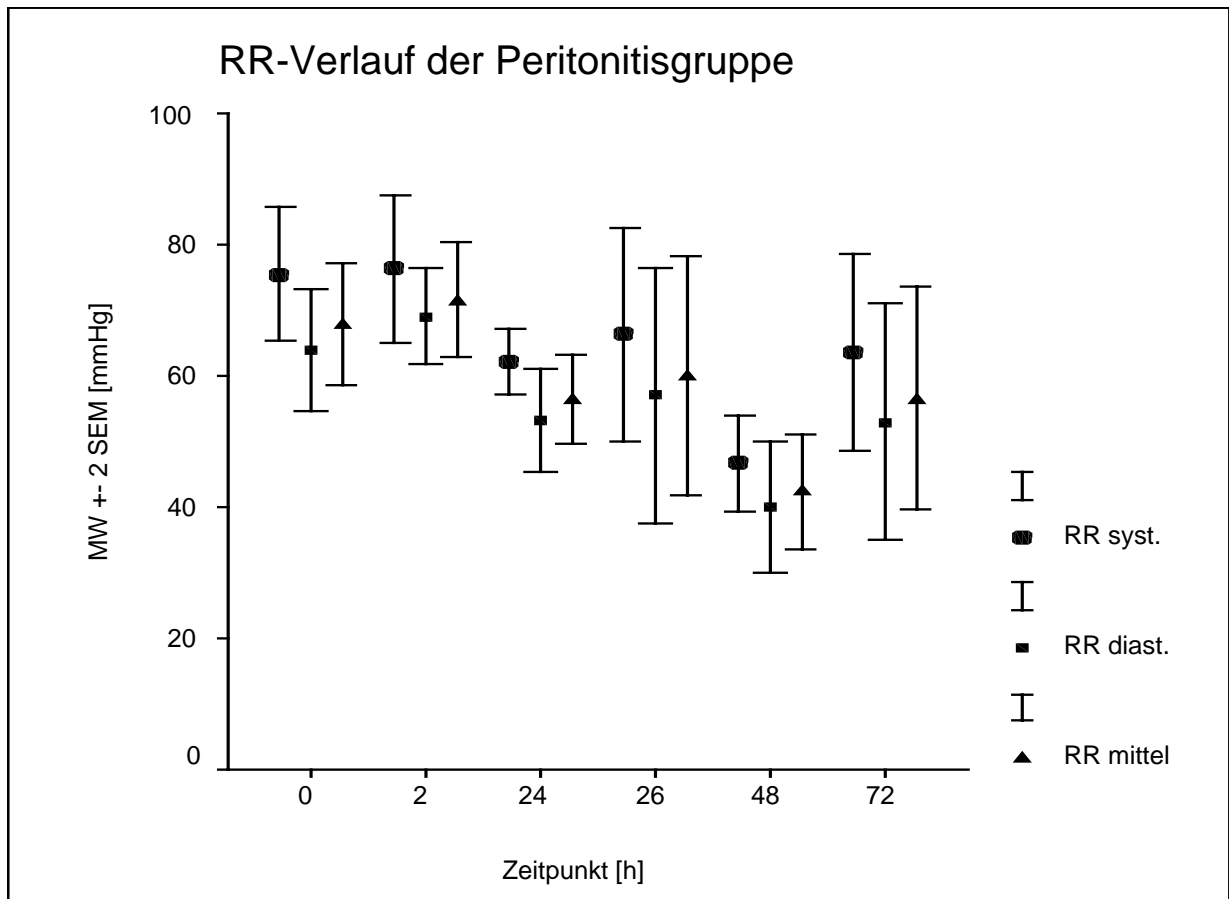


Abb. 3.3.5: Blutdruckverlauf (Mittelwerte \pm 2 SEM [mmHg]) der Peritonitisgruppe während der Versuchstage 0-3

Bei der Sektion zeigten sich bei allen Tieren im Bauchraum deutliche Peritonitiszeichen, das Peritoneum wie auch die den Darm überziehende Serosa waren hyperämisiert und geschwollen, der Darm war an den Perforationsstellen mit der Umgebung verbacken und wies ebenfalls Entzündungszeichen auf. Die Nieren waren blass, vergrößert und wiesen somit Anzeichen von Schocknieren auf, bei zwei Tieren waren makroskopisch Niereninfarkte zu sehen. Die Lebern waren geschwollen, gelblich-teigig verändert, wiesen Stauungszeichen auf und waren bei einem Tier ebenfalls mit Infarktarealen versehen. Bei diesem Tier ließ sich auch ein Perikarderguss nachweisen, bei zwei Tieren waren auch die Lungen im Sinne einer Entzündung verändert und das Gewebe mit petechialen Einblutungen versehen. Bei zwei Tieren fand sich ein Pleuraerguss.

3.4 Perfusionswerte

3.4.1 Vergleich Rechts – Links bei der Kontrollgruppe

Bei der Kontrollgruppe wurden zur Untersuchung der Reliabilität der Messungen die paarigen Organe einem Rechts-Links-Vergleich unterzogen: Lunge, Niere, und Gehirn. Im folgenden werden die Blutflusswerte als Fehlerbalkendiagramme dargestellt:

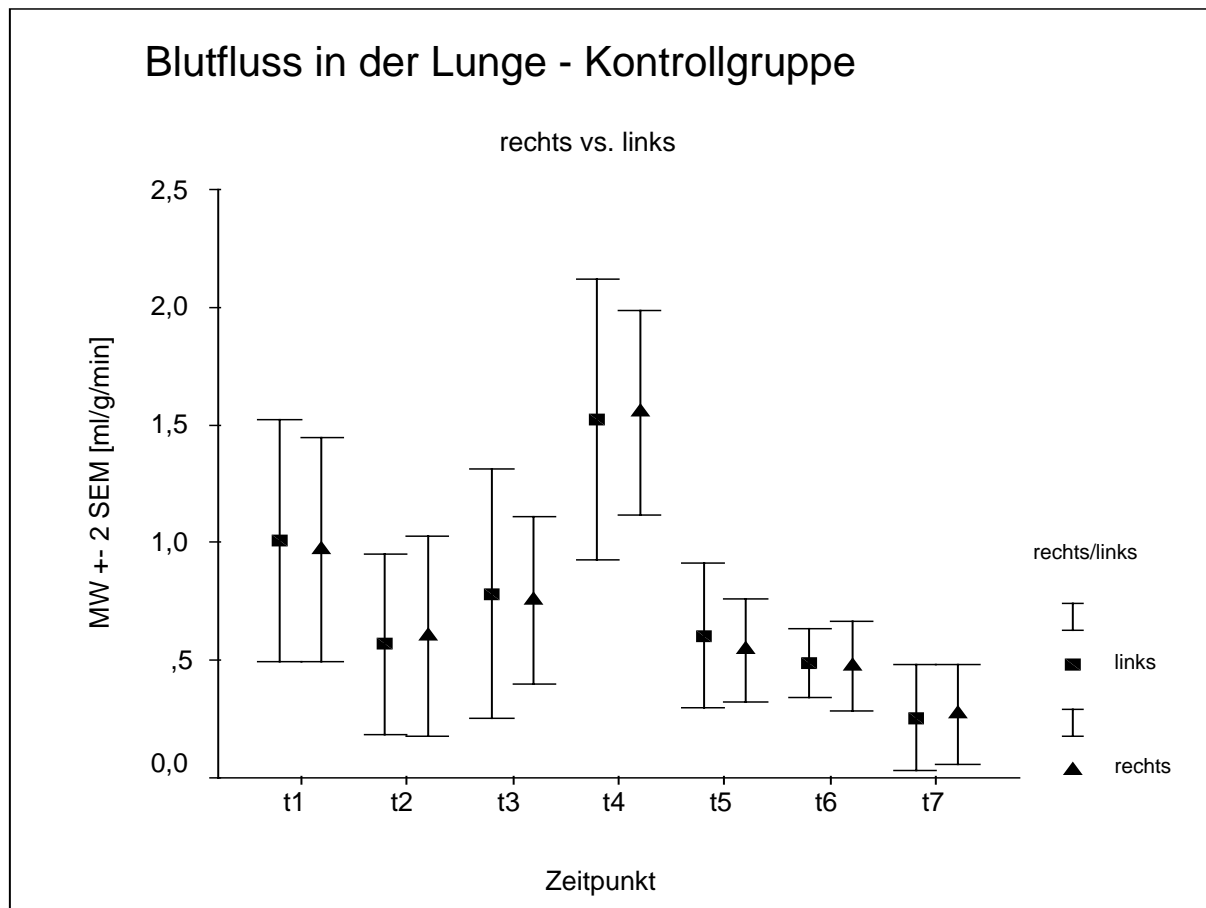


Abb. 3.4.1: Vergleich des Blutflusses in der Lunge der Kontrollgruppe, Vergleich rechter versus linker Lungenflügel

Man kann hier über den gesamten Versuchszeitraum erkennen, dass die Werte, die für die rechte beziehungsweise die linke Lunge bestimmt wurden, nicht wesentlich voneinander abweichen.

Die Mittelwerte, Standardfehler und die Signifikanzwerte sind die folgenden:

Zeitpunkt	rechts/links	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz
t ₁	rechts	0,9681	0,2377	0,754
	links	1,0106	0,2566	
t ₂	rechts	0,6022	0,2120	0,441
	links	0,5690	0,1917	
t ₃	rechts	0,8012	0,1837	0,370
	links	0,7824	0,2642	
t ₄	rechts	1,5518	0,2175	0,185
	links	1,5235	0,2992	
t ₅	rechts	0,5440	0,1086	0,903
	links	0,6058	0,1538	
t ₆	rechts	0,4752	0,0942	0,363
	links	0,4888	0,0724	
t ₇	rechts	0,2701	0,1061	0,728
	links	0,2564	0,1137	

Tab. 3.4.1: Mittelwerte der verschiedenen Zeitpunkte in Stunden für den Blutfluss in der Lunge der Kontrollgruppe, die Werte in dieser Tabelle und in allen in diesem Kapitel folgenden wurden auf vier Stellen hinter dem Komma gekürzt, die Angaben sind in ml/g/min

Man kann in keinem der Fälle zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Werten für die rechte und die linke Lunge feststellen.

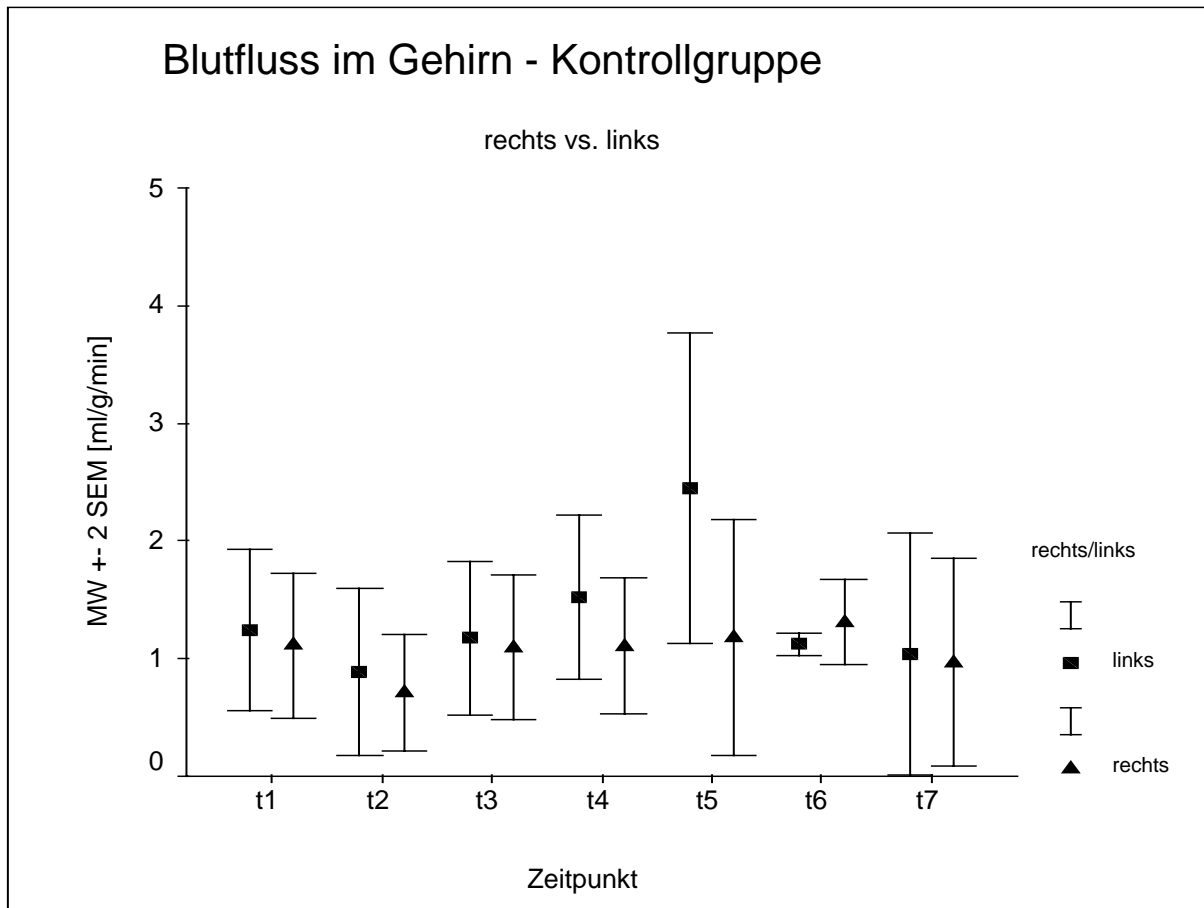


Abb. 3.4.2: Vergleich des Blutflusses im Gehirn bei der Kontrollgruppe, Vergleich rechte versus linke Gehirnhälfte

Trotz der Katheterisierung der rechten Arteria carotis lässt sich bei den Blutflusswerten des Gehirnes der Kontrollgruppe, mit Ausnahme der Zeitpunkte t_5 und t_6 , bei denen eine Abweichung zu beobachten ist, kein signifikanter Unterschied zwischen den Werten der rechten und der linken Gehirnhälfte beobachten.

Zeitpunkt	rechts/links	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz
t_1	rechts	1,1129	0,3083	0,663
	links	1,2444	0,3414	
t_2	rechts	0,7074	0,2481	0,179
	links	0,8874	0,3573	
t_3	rechts	1,0925	0,3073	0,859
	links	1,1750	0,3271	

t ₄	rechts	1,1093	0,2905	0,403
	links	1,5212	0,3471	
t ₅	rechts	1,1831	0,5004	0,012
	links	2,4494	0,6630	
t ₆	rechts	1,3115	0,1823	0,015
	links	1,1252	0,0492	
t ₇	rechts	0,9695	0,4389	0,341
	links	1,0407	0,5141	

Tab. 3.4.2: Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanzwerte des Blutflusses im Gehirn bei der Kontrollgruppe

Die Signifikanz liegt immer über dem festgesetzten Niveau von 0,05, so dass gezeigt werden kann, dass die Werte für die Durchblutung des rechten und linken Gehirnes zu jedem Zeitpunkt vergleichbar ist, auch hier mit der Ausnahme der Zeitpunkte t₅ und t₆, bei denen wohl Ausreißer vorliegen.

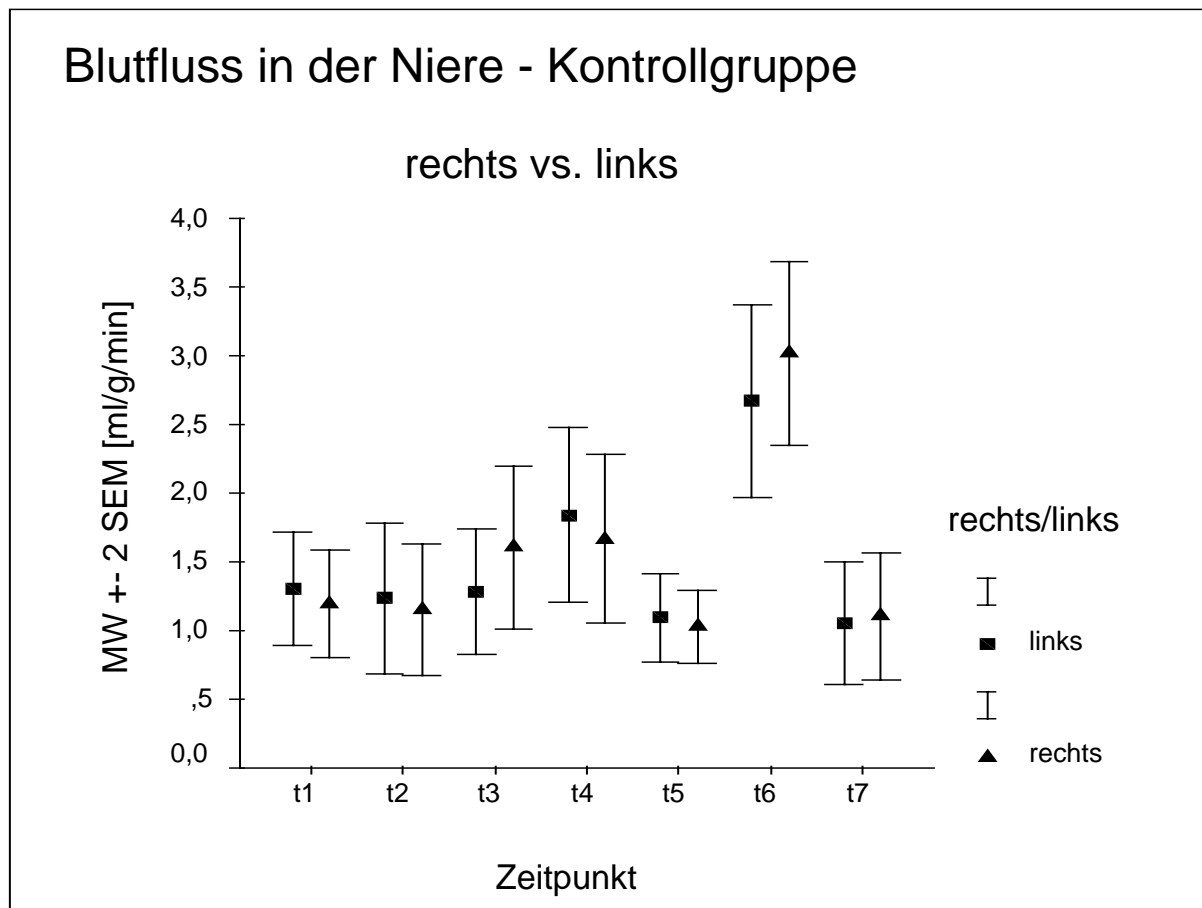


Abb. 3.4.3: Vergleich der Blutflusswerte in der Niere der Kontrollgruppe, Vergleich der rechten versus linken Niere

Hier ist die Übereinstimmung der ermittelten Werte für die rechte und die linke Seite am deutlichsten. Dies bestätigen die in der folgenden Tabelle dargestellten Mittelwerte und Standardfehler wie auch die Signifikanzwerte:

Zeitpunkt	rechts/links	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz
t ₁	rechts	1,3298	0,2087	0,361
	links	1,5322	0,2280	
t ₂	rechts	1,1507	0,2398	0,644
	links	1,2340	0,2753	
t ₃	rechts	1,7278	0,3152	0,319
	links	1,5827	0,3038	
t ₄	rechts	1,6666	0,3064	0,983

t ₄	links	1,8398	0,3183	
t ₅	rechts	0,9978	0,1309	0,224
	links	1,0960	0,1604	
t ₆	rechts	3,0177	0,3353	0,850
	links	2,6710	0,3496	
t ₇	rechts	1,1056	0,2306	0,895
	links	1,0512	0,2217	

Tab. 3.4.3: Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz des Blutflusses in der Niere bei der Kontrollgruppe

Zu keinem Zeitpunkt findet sich ein signifikanter Unterschied zwischen den für die rechte und linke Niere ermittelten Flusswerten.

In einer anderen Grafik dargestellt, zeigt sich die Vergleichbarkeit der Blutflusswerte ebenfalls sehr deutlich. Hier wurden exemplarisch der Vergleich zweier Zeitpunkte, t₂ und t₅, bei einem Tier dargestellt, da die Vergleiche bei allen Tieren der Kontrollgruppe zu allen Zeitpunkten ähnlich ausfallen.

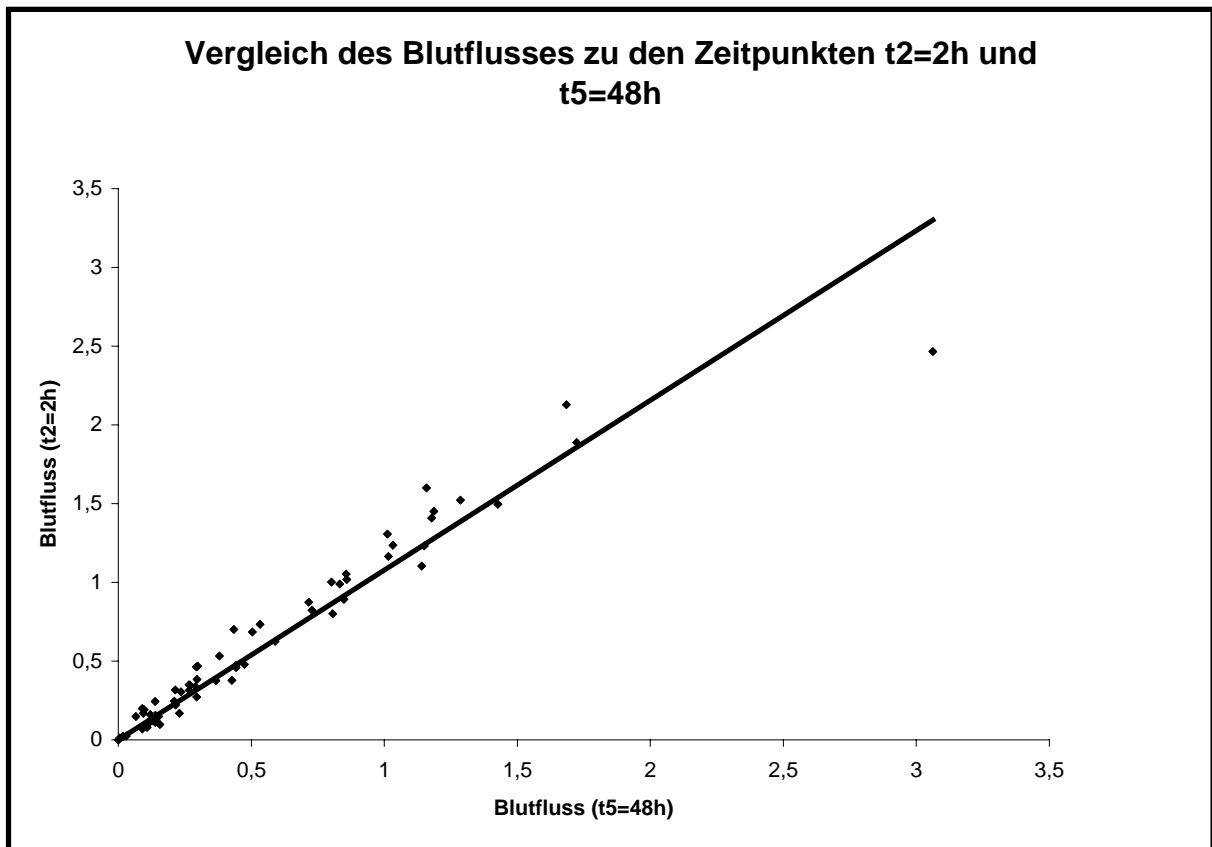


Abb. 3.4.4: Vergleich der Blutflusswerte in ml/g/min zu den Zeitpunkten $t_2=2h$ und $t_5=48h$. Es wurden alle zu den jeweiligen Zeitpunkten gewonnenen Werte der Blutflüsse miteinander verglichen. Die Gleichung der Regressionsgeraden ist: $y=1,0776x$, der p-Wert ist kleiner als 0,01.

Auch der Rechts-Links-Vergleich lässt sich in einer gleichartigen Grafik darstellen.

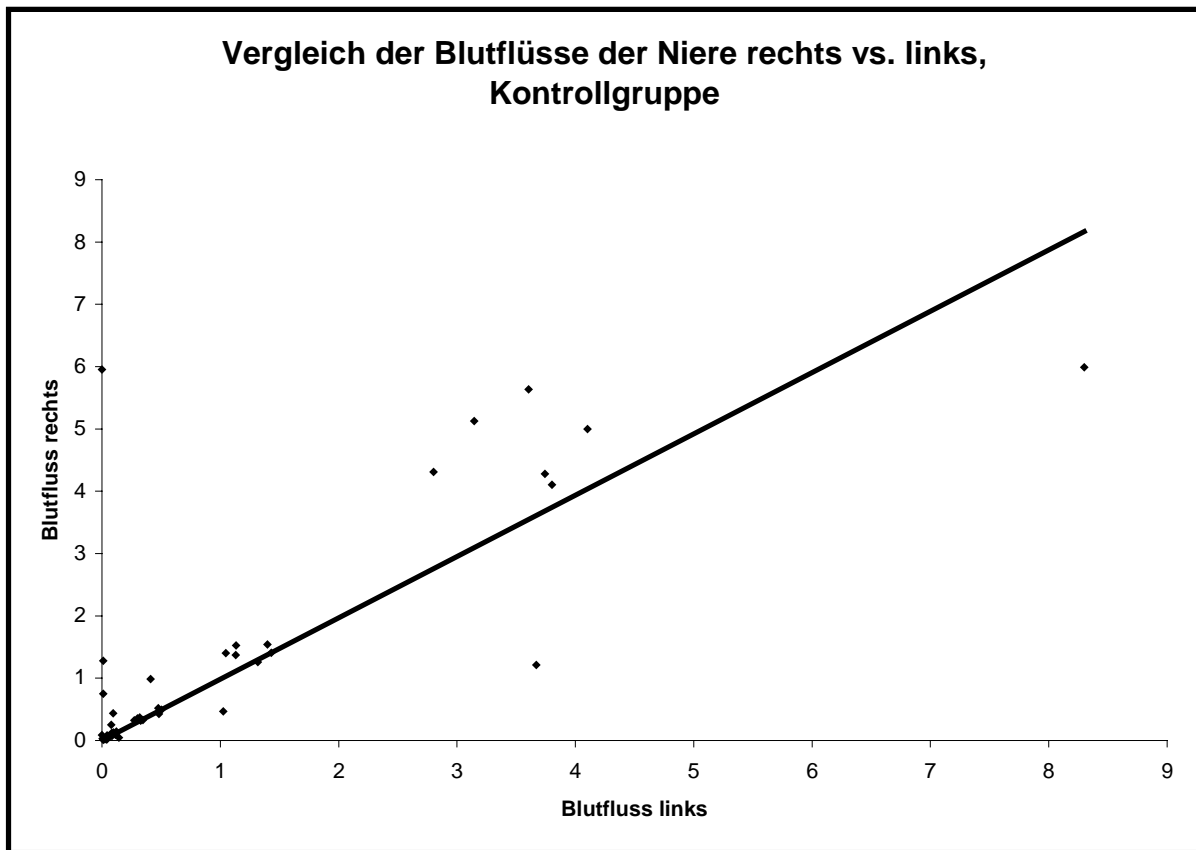


Abb. 3.4.5: Vergleich der Blutflüsse in ml/g/min der rechten und der linken Niere bei einem Tier zu verschiedenen Zeitpunkten (t_1 , t_3 , t_5), die Gleichung der Regressionsgeraden beträgt $y = 0,9845x$, der p-Wert ist kleiner als 0,01.

3.4.2 Vergleich Rechts – Links bei der Peritonitisgruppe

Bei der Peritonitisgruppe wurden die gleichen Organe einem Rechts-Links-Vergleich unterzogen wie auch bei der Kontrollgruppe, nämlich Lunge und Niere. Einzige Ausnahme bildet das Gehirn, dessen Blutflusswerte bei der Peritonitisgruppe nicht ermittelt wurden. Im folgenden werden die Blutflusswerte als Fehlerbalkendiagramme dargestellt:

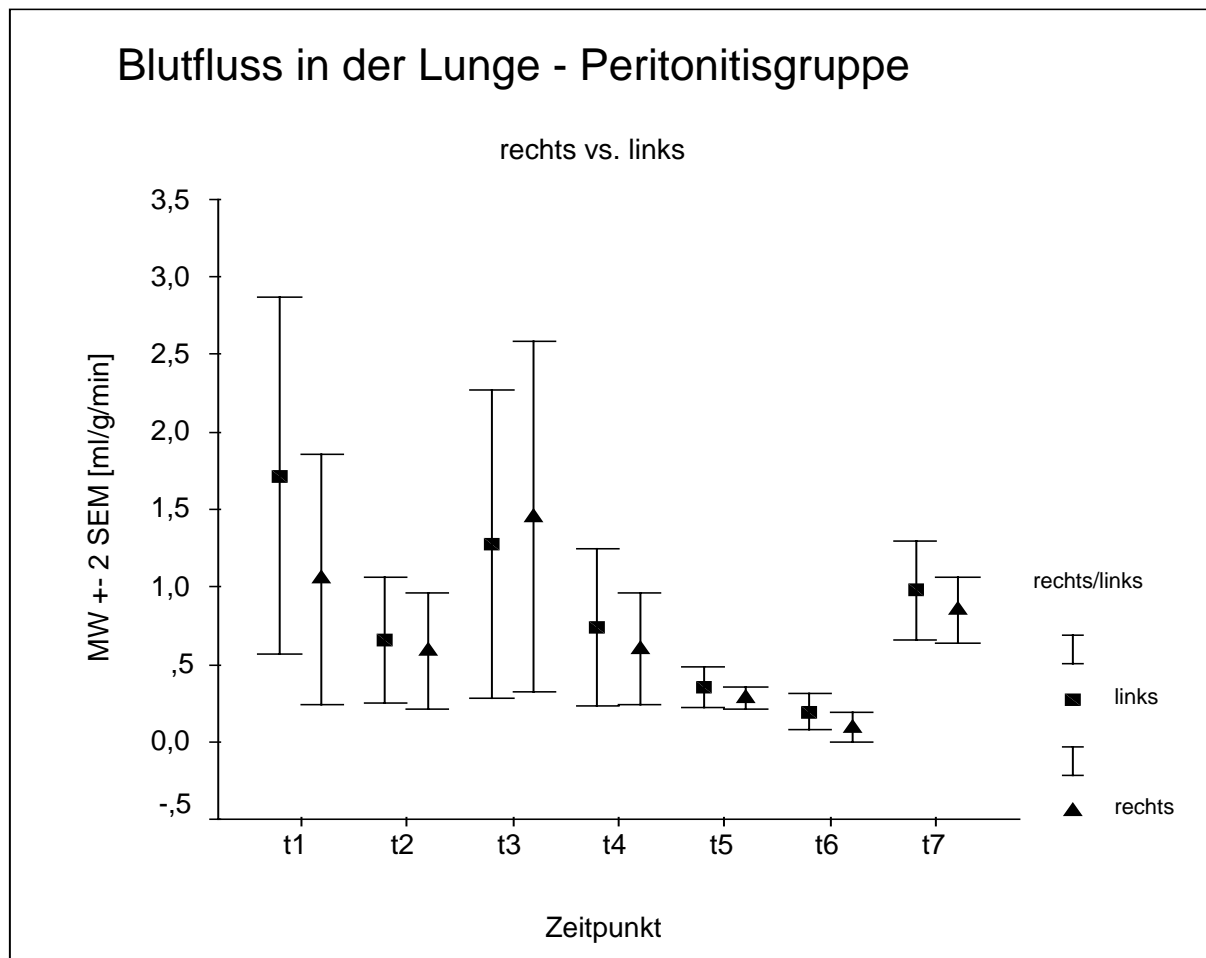


Abb. 3.4.6: Vergleich des Blutflusses in der Lunge der Peritonitisgruppe, Vergleich rechter versus linker Lungenflügel

Man kann auch hier über den gesamten Versuchszeitraum erkennen, dass die Werte, die für die rechte beziehungsweise die linke Lunge bestimmt wurden, nicht wesentlich voneinander abweichen.

Zeitpunkt	rechts/links	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz
t ₁	rechts	1,0506	0,4040	0,510
	links	1,7180	0,5783	
t ₂	rechts	0,5868	0,1888	0,952
	links	0,6573	0,2022	
t ₃	rechts	2,0790	0,8067	0,104
	links	1,2747	0,4982	
t ₄	rechts	0,5097	0,1380	0,395

t ₄	links	0,6179	0,1977	
t ₅	rechts	0,2896	0,0305	0,006
	links	0,3948	0,0941	
t ₆	rechts	0,0939	0,0494	0,542
	links	0,2401	0,0470	
t ₇	rechts	0,8535	0,1057	0,241
	links	0,9810	0,1601	

Tab. 3.4.4: Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz der Durchblutung in der Lunge bei der Peritonitisgruppe

Bei der Betrachtung der Signifikanz findet sich nur ein Wertepaar, nämlich zum Zeitpunkt t₅, bei dem ein signifikanter Unterschied der rechten zu den linken Flusswerten zu beobachten ist, alle anderen weisen keinen Unterschied auf.

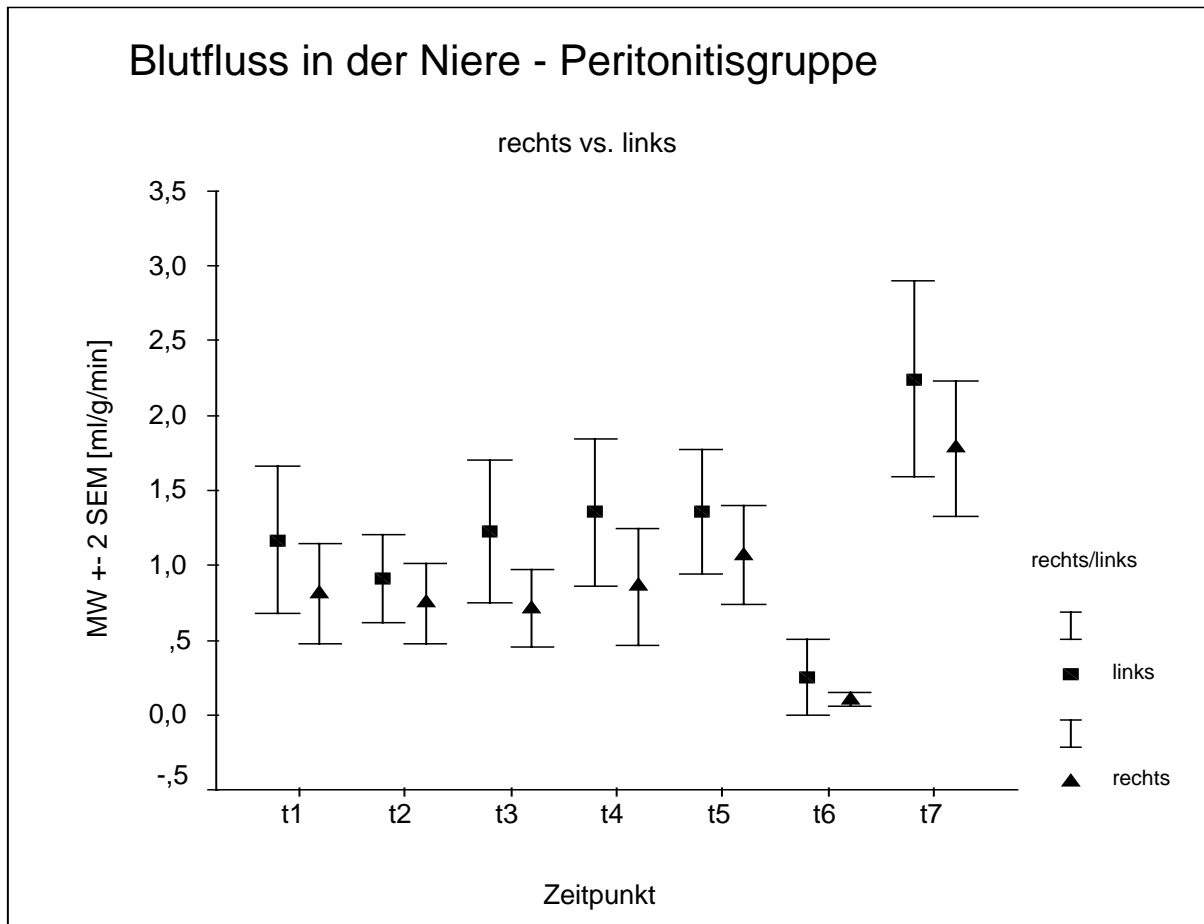


Abb. 3.4.7: Vergleich der Blutflusswerte in der Niere der Peritonitisgruppe, Vergleich der rechten versus linken Niere

Hier ist ebenfalls eine deutliche Übereinstimmung der ermittelten Werte für die rechte und die linke Niere erkennbar. Dies bestätigen auch die folgenden Werte:

Zeitpunkt	rechts/links	Mittelwert	Standardfehler	Signifikanz
t ₁	rechts	0,810146	0,1666835	0,131
	links	1,168117	0,2460686	
t ₂	rechts	0,745191	0,1347254	0,158
	links	0,915211	0,1473731	
t ₃	rechts	0,709852	0,1294653	0,023
	links	1,228061	0,2372210	
t ₄	rechts	1,210319	0,1824422	0,110
	links	1,619503	0,2088250	

t ₅	rechts	0,622930	0,1242823	0,007
	links	0,933394	0,2203162	
t ₆	rechts	0,726842	0,6264723	0,088
	links	0,248760	0,1258637	
t ₇	rechts	1,782285	0,2253979	0,024
	links	2,485874	0,3995823	

Tab. 3.4.5: Mittelwerte, Standardfehler und Signifikanz bei der Durchblutung der Niere bei der Peritonitisgruppe

Hier finden sich zu drei Zeitpunkten signifikante Unterschiede im Rechts-Links-Vergleich, wobei die Unterschiede absolut betrachtet nicht gravierend sind und beachtet werden muss, dass die Niere eines der Organe ist, welches am empfindlichsten auf ein septisches Geschehen reagiert.

Auch hier lässt sich die Korrelation der Werte für die rechte und linke Niere in einer anderen Grafik darstellen.

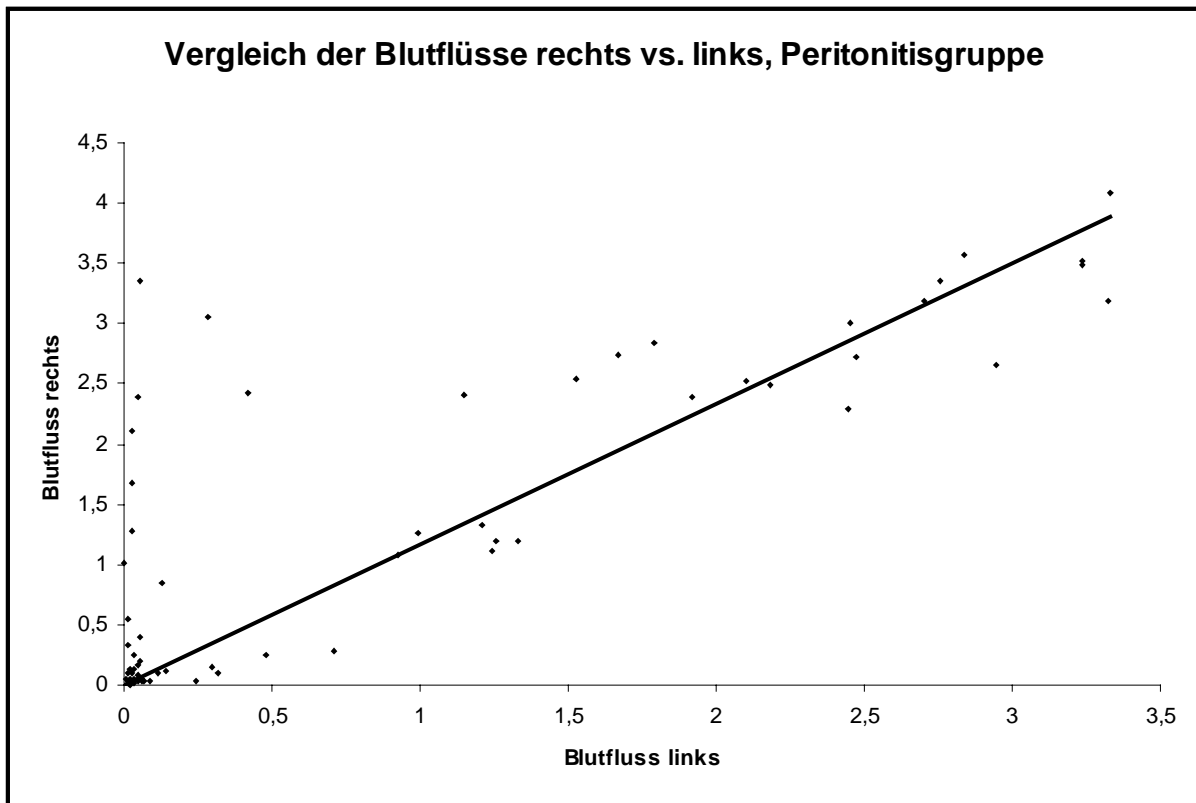


Abb. 3.4.8: Vergleich der Blutflüsse in ml/g/min der rechten und der linken Niere bei einem Tier zu verschiedenen Zeitpunkten (t_1 , t_2 , t_3 , t_4) der Peritonitisgruppe, die Gleichung der Regressionsgeraden beträgt $y = 1,1638x$, der p-Wert ist kleiner als 0,01.

Bei der Ansicht dieser Grafik wird deutlich, dass trotz der in Tab. 3.4.5 ermittelten Unterschiede die Korrelation der Werte dennoch gegeben ist.

3.4.3 Vergleich Perfusionswerte Kontrollgruppe - Peritonitisgruppe

Die folgenden Grafiken zeigen den Vergleich der Perfusionswerte verschiedener Organe von Kontroll- und Peritonitisgruppe über den gesamten Versuchszeitraum.

Zuerst erfolgt die Darstellung der Perfusionswerte im Darm der Tiere.

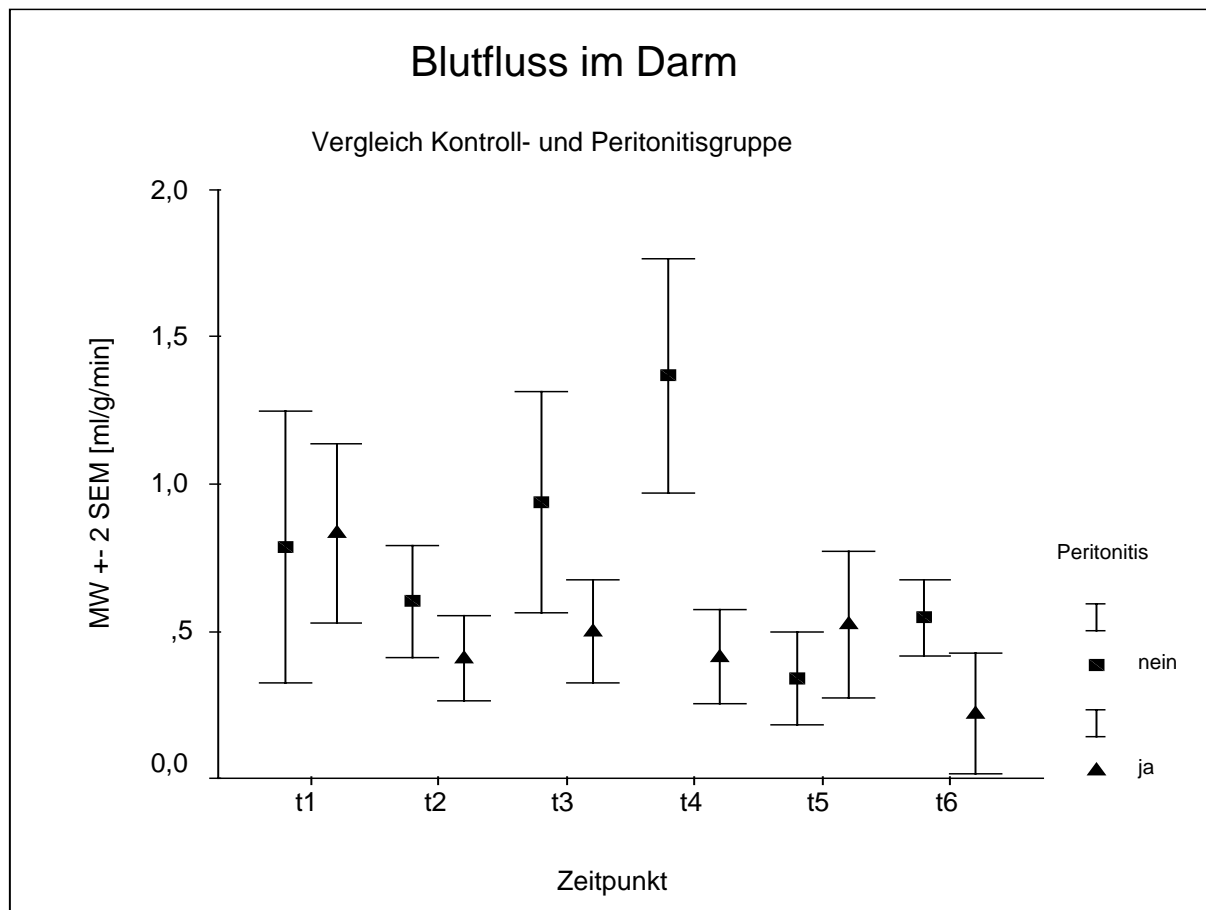


Abb. 3.4.9: Vergleich der Perfusionswerte im Darm der Kontroll- und der Peritonitisgruppe über den gesamten Versuchszeitraum

Der Mittelwertvergleich von Kontroll- und Peritonitisgruppe zu den jeweiligen Zeitpunkten ergibt die folgende Werte:

Zeitpunkt	Peritonitis ja/nein	Mittelwert [ml/g/min]	SEM	p-Wert
t ₁	nein	0,8331	0,2397	0,819
	ja	0,8335	0,1525	
t ₂	nein	0,6025	0,0959	0,131
	ja	0,4068	0,0723	
t ₃	nein	0,9368	0,1879	0,006
	ja	0,4994	0,0878	
t ₄	nein	1,3691	0,1987	0,007
	ja	0,6192	0,1007	

t ₅	nein	0,3411	0,1007	0,031
	ja	0,1929	0,0527	
t ₆	nein	0,5474	0,0651	0,580
	ja	0,2208	0,1029	

Tab. 3.4.6: p-Werte zum Vergleich der Blutflusswerte im Darm der Kontroll- und Peritonitisgruppe (in dieser und allen in diesem Kapitel folgenden Tabellen wurden die Werte auf 4 Stellen hinter dem Komma gekürzt und entsprechend auf- bzw. aufgerundet)

Man erkennt hier, dass sich die Perfusion, die anfänglich keinen Unterschied aufweist, am zweiten Versuchstag ändert, die Werte der Kontrollgruppe sind gegenüber denen der Peritonitisgruppe deutlich höher, gleichen sich aber an den darauffolgenden Versuchstagen wieder an. Der p-Wert über den gesamten Zeitraum ist 0,001 (MANOVA), es liegt ein hochsignifikanter Unterschied in der Perfusion zwischen Kontroll- und Peritonitisgruppe vor.

Der Vergleich der Perfusionswerte im Herzen liegt in der folgenden Abbildung vor:

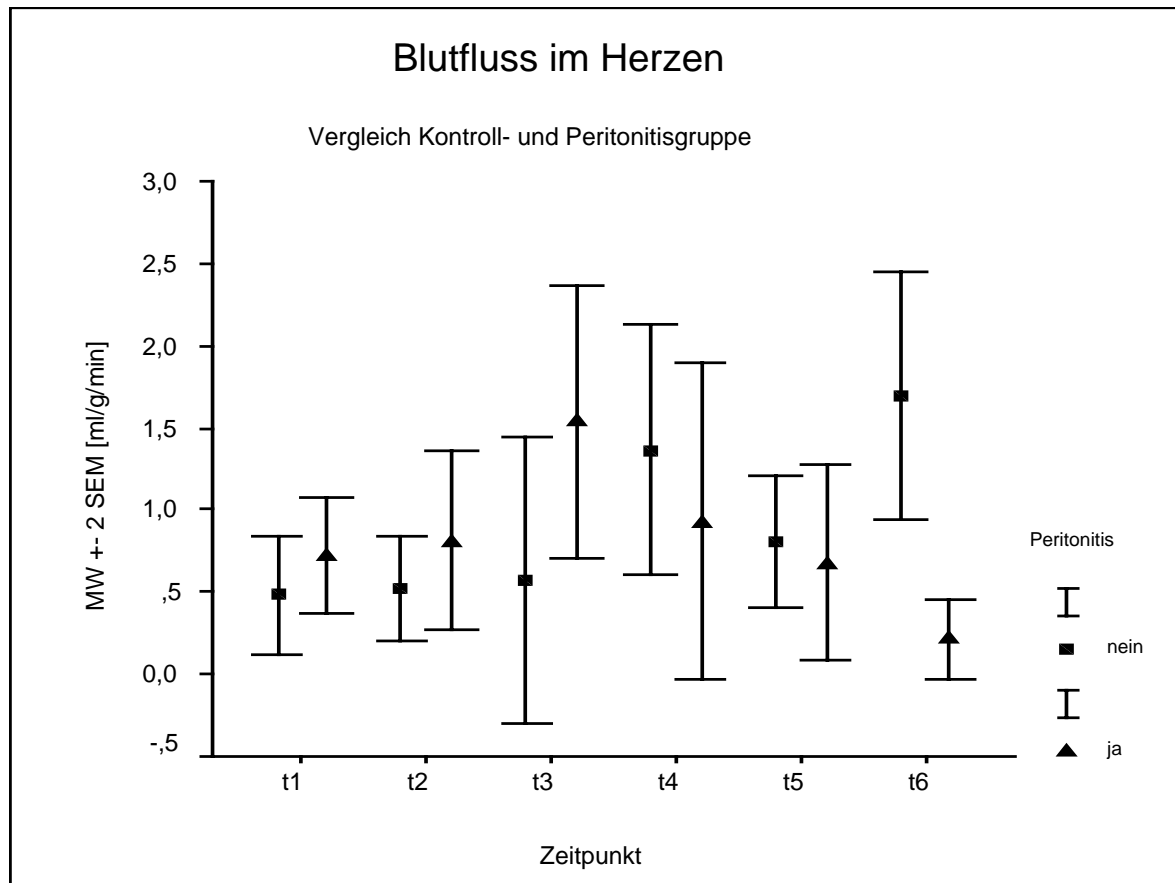


Abb. 3.4.10: Vergleich der Perfusionswerte im Herzen der Kontroll- und Peritonitisgruppe über den gesamten Versuchszeitraum

Der Mittelwertvergleich von Kontroll- und Peritonitisgruppe ergab zu den jeweiligen Zeitpunkten folgende Werte:

Zeitpunkt	Peritonitis ja/nein	Mittelwert [ml/g/min]	SEM	p-Wert
t ₁	nein	0,4815	0,1831	0,192
	ja	0,9230	0,2633	
t ₂	nein	0,5154	0,1592	0,184
	ja	0,6423	0,2256	
t ₃	nein	0,5735	0,4378	0,218
	ja	1,5387	0,4126	
t ₄	nein	1,8962	0,5162	0,573
	ja	2,3718	0,9554	

t ₅	nein	0,8040	0,2036	0,123
	ja	0,3997	0,1156	
t ₆	nein	1,2917	0,2925	0,015
	ja	0,2158	0,1208	

Tab. 3.4.7: p-Werte zum Vergleich der Blutflusswerte im Herzen der Kontroll- und Peritonitisgruppe

Hier sieht man, dass sich die Perfusionswerte über den gesamten Versuchszeitraum nicht wesentlich verändern und dass auch im Vergleich der Kontroll- mit der Peritonitisgruppe, mit Ausnahme des Zeitpunktes t₆ (= 72 h) keine signifikanten Unterschiede bestehen. Der p-Wert über den gesamten Zeitraum ist 0,234 (MANOVA), es liegt kein signifikanter Unterschied in der Perfusion zwischen Kontroll- und Peritonitisgruppe vor.

Die folgende Abbildung zeigt die Blutflusswerte in der Leber:

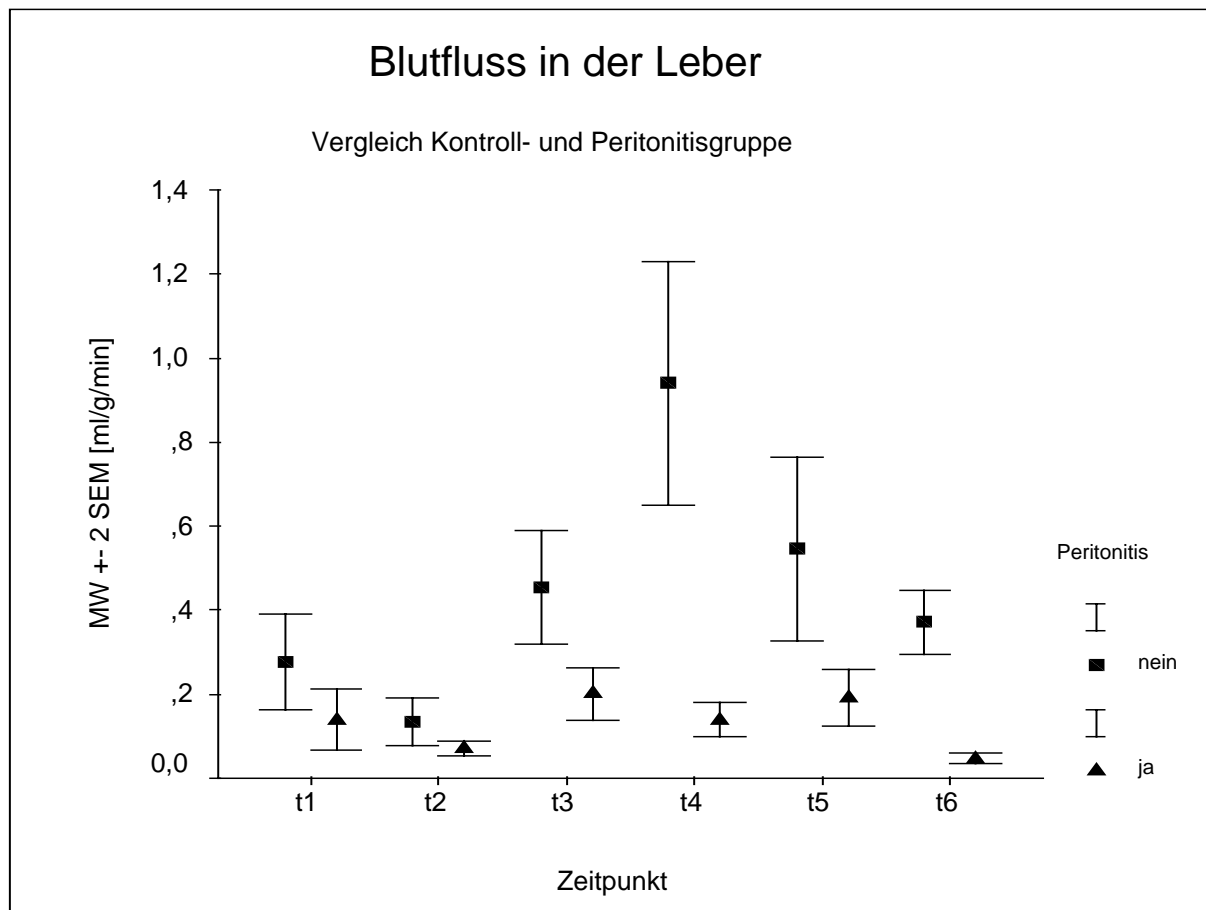


Abb. 3.4.11: Vergleich der Perfusionswerte in der Leber der Kontroll- und Peritonitisgruppe über den gesamten Versuchszeitraum

Der Mittelwertvergleich von Kontroll- und Peritonitisgruppe ergab zu den jeweiligen Zeitpunkten folgende Werte:

Zeitpunkt	Peritonitis ja/nein	Mittelwert [ml/g/min]	SEM	p-Wert
t ₁	nein	0,2774	0,0571	0,000
	ja	0,1402	0,0367	
t ₂	nein	0,1351	0,0290	0,000
	ja	0,0709	0,0087	
t ₃	nein	0,4552	0,0677	0,000
	ja	0,2015	0,0312	
t ₄	nein	0,9410	0,1450	0,000
	ja	0,1587	0,0172	

t ₅	nein	0,5459	0,1095	0,000
	ja	0,1865	0,0498	
t ₆	nein	0,3727	0,0381	0,001
	ja	0,0465	0,0062	

Tab. 3.4.8: p-Werte zum Vergleich der Blutflusswerte in der Leber der Kontroll- und Peritonitisgruppe

Die Tabelle zeigt, dass die Blutflusswerte, die zwar zu Beginn des Versuches bereits einen signifikanten Unterschied aufweisen, doch ab dem Zeitpunkt t₃ sich sehr viel deutlicher voneinander wegbewegen, wobei der Wert der Kontrollgruppe bei t₄ als Ausreißer angesehen werden muss. Der Unterschied der beiden Gruppen in der Perfusion ist während des gesamten Zeitraumes hochsignifikant (p-Wert=0,000, bei t₆ p=0,001, MANOVA).

Die Perfusionswerte der Lunge der Kontroll- und der Peritonitisgruppe zeigt die nachfolgende Abbildung:

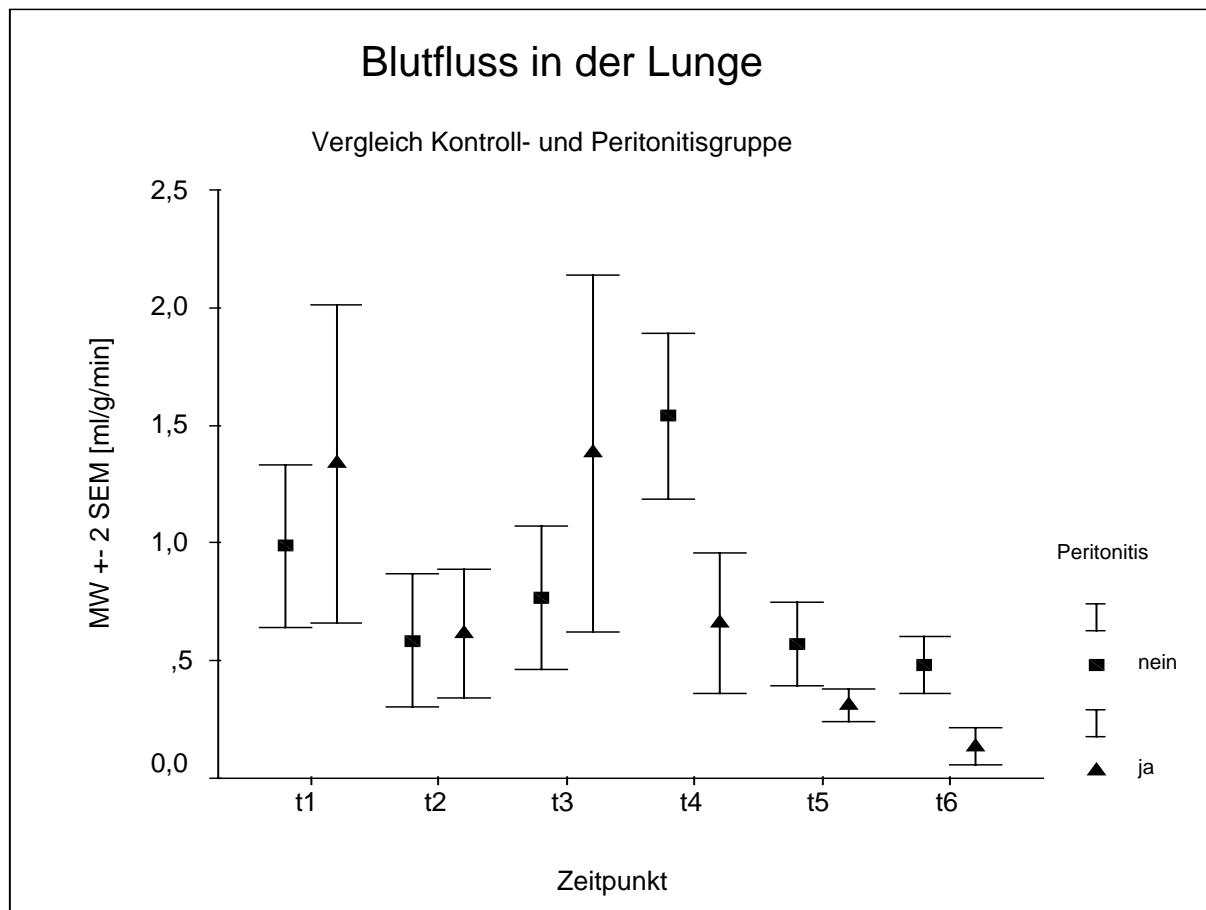


Abb. 3.4.12: Vergleich der Perfusionswerte in der Lunge der Kontroll- und Peritonitisgruppe über den gesamten Versuchszeitraum

Der Mittelwertvergleich von Kontroll- und Peritonitisgruppe ergab zu den jeweiligen Zeitpunkten folgende Werte:

Zeitpunkt	Peritonitis ja/nein	Mittelwert [ml/g/min]	SEM	p-Wert
t ₁	nein	0,9871	0,1721	0,185
	ja	1,3366	0,3380	
t ₂	nein	0,5868	0,1417	0,519
	ja	0,6170	0,1360	
t ₃	nein	0,7924	0,1546	0,001
	ja	1,7663	0,5263	
t ₄	nein	1,5395	0,1766	0,000
	ja	0,5578	0,1147	

t ₅	nein	0,5710	0,0895	0,003
	ja	0,3347	0,0442	
t ₆	nein	0,4812	0,0605	0,028
	ja	0,1471	0,0408	

Tab. 3.4.9: p-Werte zum Vergleich der Blutflusswerte in der Lunge der Kontroll- und Peritonitisgruppe

Hier erkennt man, dass die anfangs gleichen Perfusionswerte im weiteren Versuchsablauf (mit Ausnahme von Zeitpunkt t₃ (= 24 h)) bei der Peritonitisgruppe deutlich absinken, um am Ende des Versuchszeitraumes sich wieder an die Werte der Kontrollgruppe anzugleichen. Der p-Wert über den gesamten Zeitraum ist 0,000 (MANOVA), es liegt ein hochsignifikanter Unterschied in der Perfusion zwischen Kontroll- und Peritonitisgruppe vor.

Die folgende Abbildung zeigt den Verlauf der Perfusionswerte im Magen.

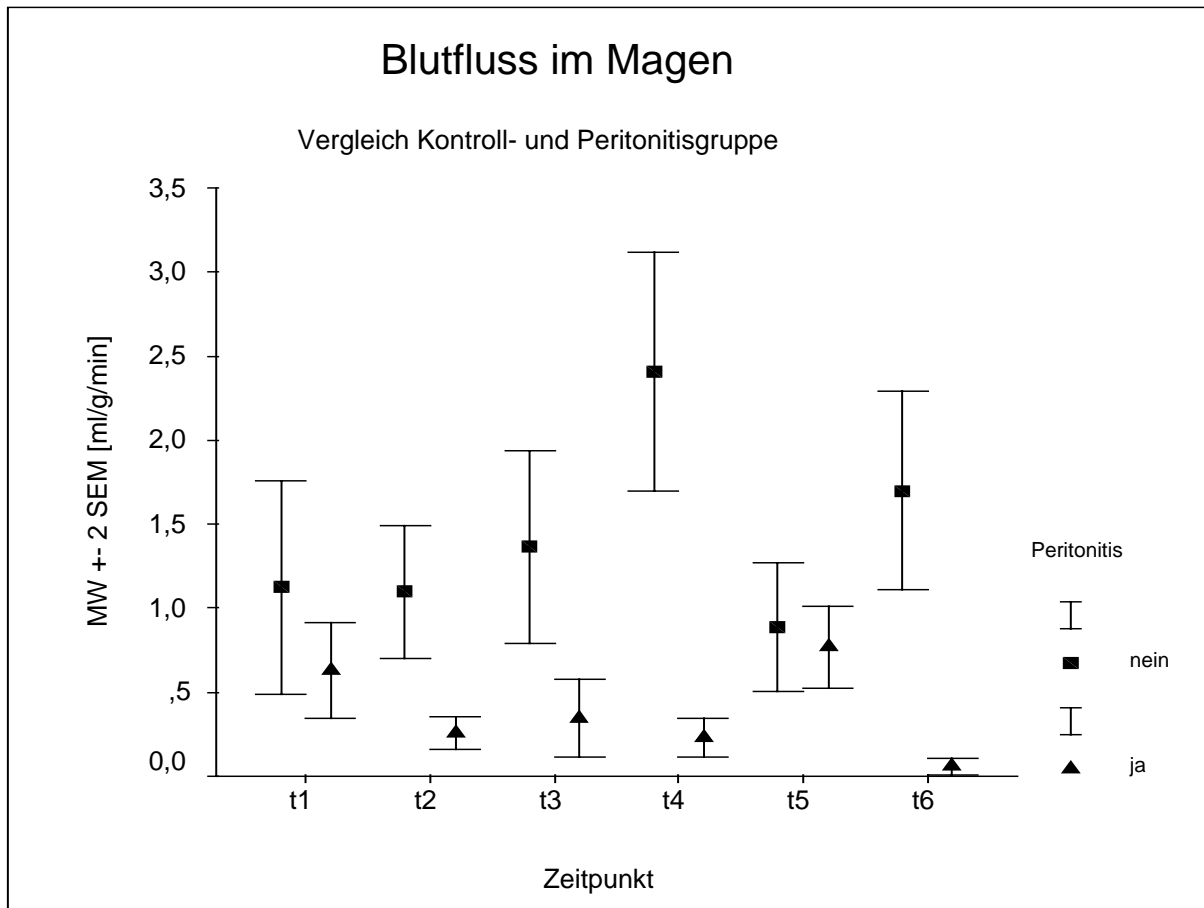


Abb. 3.4.13: Vergleich der Perfusionswerte im Magen der Kontroll- und Peritonitisgruppe über den gesamten Versuchszeitraum

Der Mittelwertvergleich von Kontroll- und Peritonitisgruppe ergab zu den jeweiligen Zeitpunkten folgende Werte:

Zeitpunkt	Peritonitis ja/nein	Mittelwert [ml/g/min]	SEM	p-Wert
t ₁	nein	1,1246	0,3161	0,050
	ja	0,6325	0,1423	
t ₂	nein	1,0975	0,1972	0,001
	ja	0,2579	0,0505	
t ₃	nein	1,3660	0,2856	0,021
	ja	0,3460	0,1148	
t ₄	nein	2,4034	0,3552	0,000
	ja	0,5210	0,1033	

t ₅	nein	0,8861	0,1910	0,002
	ja	0,4728	0,1183	
t ₆	nein	1,6999	0,2966	0,000
	ja	0,0600	0,0243	

Tab. 3.4.10: p-Werte zum Vergleich der Blutflusswerte im Magen der Kontroll- und Peritonitisgruppe

Auch hier erkennt man, dass die Werte, die anfänglich nahe beieinander liegen (hier ist der Wert für die Peritonitisgruppe bereits signifikant niedriger als der der Kontrollgruppe), im Verlauf der Zeit noch deutlicher auseinanderweichen und die Werte der Peritonitisgruppe signifikant niedriger liegen als die der Kontrollgruppe, um sich auch hier wieder am Ende des Versuchszeitraumes anzugleichen. Der p-Wert über den gesamten Zeitraum ist 0,001 (MANOVA), es liegt ein hochsignifikanter Unterschied in der Perfusion zwischen Kontroll- und Peritonitisgruppe vor.

In der folgenden Abbildung sind die Blutflusswerte im Skelettmuskel dargestellt:

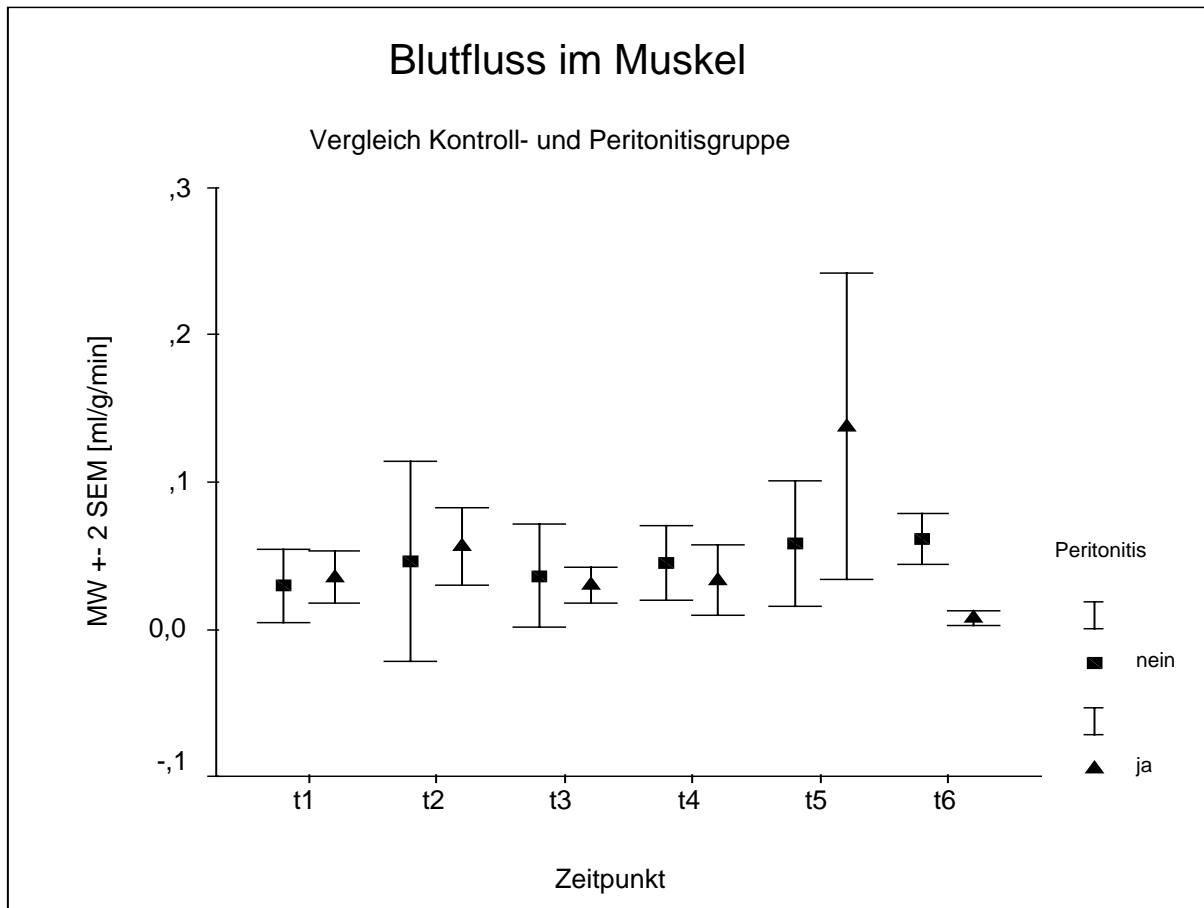


Abb. 3.4.14: Vergleich der Perfusionswerte im Skelettmuskel der Kontroll- und Peritonitisgruppe über den gesamten Versuchszeitraum

Der Mittelwertvergleich von Kontroll- und Peritonitisgruppe ergab zu den jeweiligen Zeitpunkten folgende Werte:

Zeitpunkt	Peritonitis ja/nein	Mittelwert [ml/g/min]	SEM	p-Wert
t ₁	nein	0,0297	0,0124	0,305
	ja	0,0354	0,0089	
t ₂	nein	0,0463	0,0341	0,308
	ja	0,0565	0,0132	
t ₃	nein	0,0364	0,0174	0,047
	ja	0,0301	0,0063	
t ₄	nein	0,0451	0,0126	0,469
	ja	0,0628	0,0202	

t ₅	nein	0,0585	0,0215	0,001
	ja	0,1457	0,0818	
t ₆	nein	0,0612	0,0086	0,162
	ja	0,0076	0,0025	

Tab. 3.4.11: p-Werte zum Vergleich der Blutflusswerte im Skelettmuskel der Kontroll- und Peritonitisgruppe

Bei der Durchblutung des Skelettmuskels zeigt sich bis auf den Zeitpunkt t₆ kein signifikanter Unterschied. Der p- Wert über den gesamten Zeitraum ist allerdings mit 0,013 signifikant (MANOVA).

Die Perfusionswerte der Niere liegen in der nächsten Abbildung vor.

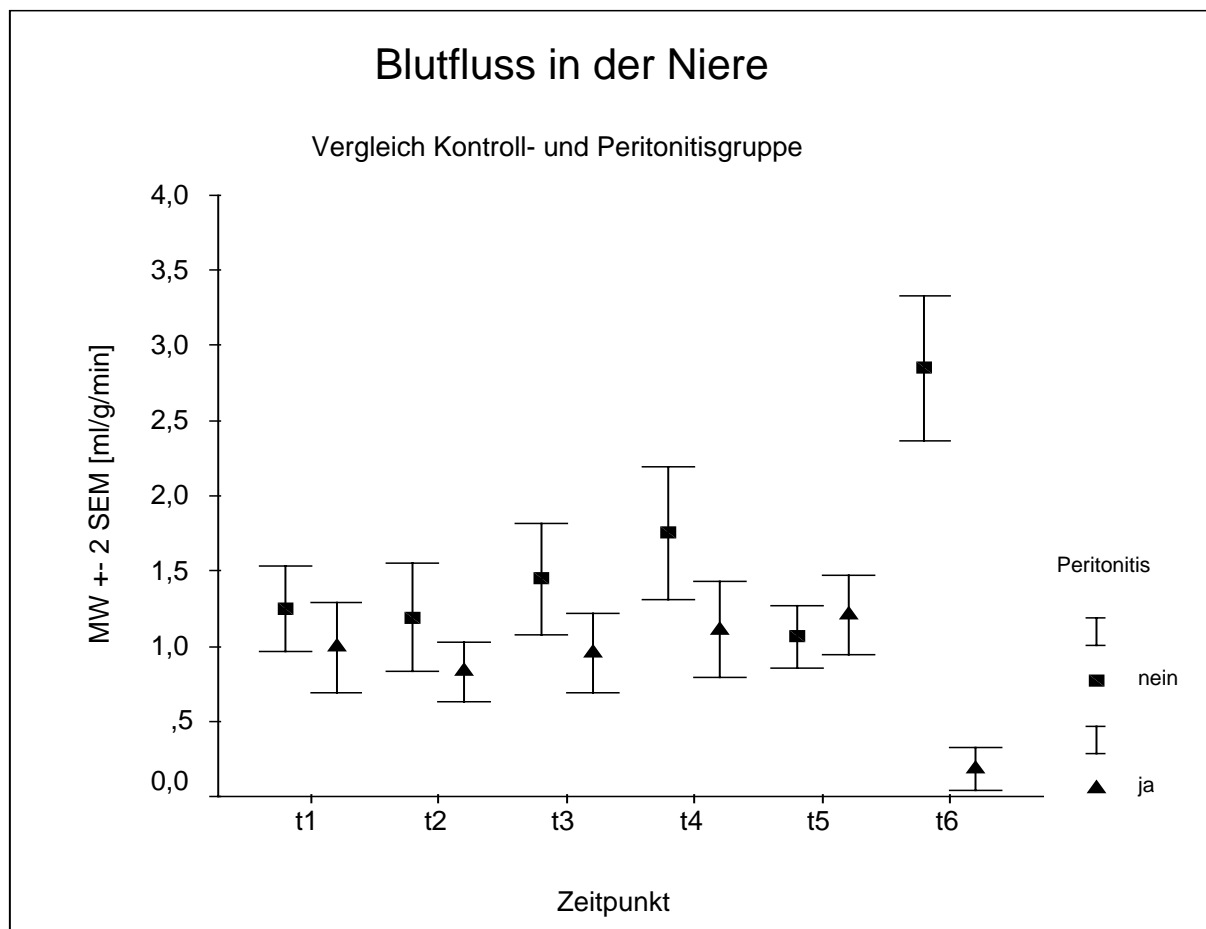


Abb. 3.4.15: Vergleich der Perfusionswerte in der Niere der Kontroll- und Peritonitisgruppe über den gesamten Versuchszeitraum

Der Mittelwertvergleich von Kontroll- und Peritonitisgruppe ergab zu den jeweiligen Zeitpunkten folgende Werte:

Zeitpunkt	Peritonitis ja/nein	Mittelwert [ml/g/min]	SEM	p-Wert
t ₁	nein	1,4291	0,1539	0,022
	ja	0,9908	0,1495	
t ₂	nein	1,1924	0,1814	0,008
	ja	0,8295	0,0997	
t ₃	nein	1,6560	0,2180	0,000
	ja	0,9512	0,1329	
t ₄	nein	1,7532	0,2198	0,000
	ja	1,4169	0,1397	
t ₅	nein	1,0477	0,1035	0,292
	ja	0,7782	0,1270	
t ₆	nein	2,8505	0,2413	0,000
	ja	0,4684	0,2937	

Tab. 3.4.12: p-Werte zum Vergleich der Blutflusswerte in der Niere der Kontroll- und Peritonitisgruppe

Die Blutflusswerte der Niere weichen (mit Ausnahme von Zeitpunkt t₆, hier liegt ein Ausreißer vor) im Laufe des Versuches immer weiter voneinander ab, die Nieren der Peritonitisgruppe werden signifikant weniger durchblutet als die der Kontrollgruppe. Am Ende des Versuchszeitraumes kehrt sich das Bild um und zum Zeitpunkt t₇ sind die Nieren der Peritonitisgruppe sogar besser durchblutet als die der Kontrollgruppe. Der p-Wert über den gesamten Zeitraum ist 0,000 (MANOVA), es liegt also insgesamt ein hochsignifikanter Unterschied in der Perfusion zwischen Kontroll- und Peritonitisgruppe vor.

4. Diskussion

Regionale Perfusion über einen längeren Zeitraum messen zu können ist eine der wesentlichen Voraussetzungen, um bestimmte Fragestellungen wie zum Beispiel die Knochenheilung oder die Entwicklung der Organperfusion bei der Sepsis verstehen und untersuchen zu können. Daher ist es zum einen notwendig, mit Hilfe der eingesetzten Materialien wie hier den Mikrosphären Messungen über mehrere Tage oder sogar Wochen verlässlich durchzuführen, zum anderen muss die Traumatisierung der Versuchstiere durch die Injektion der Mikrosphären so gering wie möglich gehalten werden, um den Einfluss auf die tatsächlichen Veränderungen, die gemessen werden sollen, so gering wie möglich zu halten. Daher war das Ziel dieser Arbeit, eine neue, minimal invasive Methode zu entwickeln, die Messungen der Organperfusion über einen längeren Zeitraum erlaubt. Hierfür musste ein neues Katheterportsystem und eine neue Technik zur Einführung desselben entwickelt werden, um einerseits das chirurgische Trauma so weit wie möglich reduzieren und andererseits modellhafte experimentelle Konditionen zu ermöglichen, ohne zusätzlichen Stress durch experimentelle Instrumentierung mit langandauernder postoperativer Krankheit auf das Tier auszuüben. Die Möglichkeit, Mikrosphären atraumatisch zu injizieren, ist eine wesentliche Voraussetzung für eine korrekte Blutflussbestimmung.

4.1 Auswahl der Mikrosphären – radioaktiv versus fluoreszenzmarkiert

Zunächst musste eine Auswahl der zu injizierenden Mikrosphären getroffen werden. Prinzipiell stehen, wie in der Einleitung ausführlich vorgestellt, drei Arten zur Verfügung: radioaktiv markierte, farbig markierte und fluoreszenzmarkierte Mikrosphären. Farbig markierte Mikrosphären schieden von vornherein aus. Trotz ihrer hohen Stabilität *in vitro* und *in vivo* (76) ist zum einen die Verarbeitung dieser Mikrosphären wenig standardisiert (54, 76), was zu ungenauen und wenig reproduzierbaren Ergebnissen führen könnte (105). Zum anderen ist der Zeit- und

Arbeitsaufwand für die Verarbeitung sehr hoch (76). Bei der verbesserten Methode müssen hochgiftige Substanzen verwendet werden (134) und es können nur maximal drei verschiedene Farben verwendet werden (105), so dass ihr Einsatz sehr limitiert wäre.

Radioaktive Mikrosphären sind schon sehr lange im Einsatz, da die Ergebnisse sehr verlässlich und reproduzierbar sind. Nichtsdestoweniger haben auch sie Nachteile, die sie speziell für chronische Messungen nur eingeschränkt einsetzbar machen. Sie verlieren über einen längeren Zeitraum aufgrund der Halbwertszeit der Radionuklide, die sie inkorporiert haben, naturgemäß an Radioaktivität. Dies führt zu einer Unterschätzung der Werte, die am Anfang des Experimentes gemessen wurden. (47, 105) Der Umgang mit radioaktiven Stoffen stellt ein Gesundheitsrisiko dar, belastet die Umwelt und verursacht aufgrund der besonderen Voraussetzungen, die für die Handhabung dieser Stoffe gegeben sein müssen, und auch wegen der besonderen Entsorgung des Abfalls und der organischen Reste enorm hohe Kosten (105).

Es erscheint daher sinnvoll, bei chronischen Experimenten fluoreszenzmarkierte Mikrosphären einzusetzen. Diese haben im Vergleich mit radioaktiv markierten Mikrosphären ihre Validität und Reproduzierbarkeit bewiesen. Es zeigte sich bei Experimenten eine hervorragende Übereinstimmung der mit Hilfe der fluoreszenzmarkierten Mikrosphären gewonnenen Werte mit denen der radioaktiven Mikrosphären (47). Die Stabilität der fluoreszenzmarkierten Mikrosphären in vitro und in vivo konnte ohne signifikanten Intensitätsverlust über mehrere Monate nachgewiesen werden (12, 27, 47, 105, 142). Dies stellt den wesentlichen Vorteil gegenüber den radioaktiv markierten Mikrosphären dar, welche nach einem längeren Zeitraum aufgrund des Nachlassens der Radioaktivität ihre Reliabilität einbüßen (47, 105). Darüber hinaus entfällt bei dem Einsatz und der Verarbeitung der fluoreszenzmarkierten Mikrosphären das Problem der Umwelt- und Gesundheitsbelastung aufgrund von Radioaktivität oder giftiger Chemikalien, was auch zu einer wesentlichen Reduktion der Kosten führt (105). Nachdem 1999 eine neue, automatisierte Methode der Gewebeprobenverarbeitung für fluoreszenzmarkierte Mikrosphären entwickelt wurde (108), ist dieser Vorgang schneller, billiger und vor allem weitgehend standardisiert worden (12, 47, 133).

4.2 Voraussetzungen für die Perfusionsmessung mit Mikrosphären

Mit Hilfe der fluoreszenzmarkierten Mikrosphären wird die chronische Evaluation der regionalen Organdurchblutung bei Wundheilung, Knochenheilung und Anastomosenheilung sowie auch bei akutem Atemnotsyndrom (ARDS) über Wochen und Monate möglich (142). Allerdings erfordert die valide Perfusionsmessung einige Voraussetzungen, die speziell bei chronischen Experimenten beachtet werden müssen. Die injizierten Mikrosphären müssen sich analog des Herzzeitvolumens verteilen, am Ort des *trappings* verbleiben und ihre Messbarkeit behalten.

Ein erster wichtiger Aspekt ist daher die Wahl der richtigen Menge an zu injizierenden Mikrosphären. Studien haben gezeigt, dass eine Mindestmenge von 400 Mikrosphären pro Gewebeprobe eingehalten werden muss, um verlässliche Ergebnisse zu erhalten (25). In einer neueren Studie von Polissar et al konnte jedoch bewiesen werden, dass, je nachdem, welche Fragestellung der Versuchsreihe zu Grunde liegt, auch eine wesentlich geringere Menge an Mikrosphären für reliabe Messungen ausreicht, solange eine gesamte Mindestmenge von 15000 Mikrosphären pro Injektion nicht unterschritten wird (104).

Auch eine Höchstmenge an zu verwendenden Mikrosphären wurde festgelegt. Obwohl eine – zumeist reversible – Beeinflussung der Hämodynamik erst ab einer Injektionsmenge von $6 \cdot 10^6$ Sphären/kg KG pro Injektion zu beobachten war, wurde aus Sicherheitsgründen eine Obergrenze von $2,5 \cdot 10^6$ Sphären pro Injektion festgelegt (75). Eine Höchstmenge der gesamten injizierten Mikrosphären im Rahmen von chronischen Experimenten konnte nicht gefunden werden, da aufgrund der Ausbildung von Kapillargefäßen bereits Sekunden nach der Injektion keine längerfristige Beeinträchtigung der Mikrozirkulation nachgewiesen werden konnte (55, 145). Im Rahmen unserer Studie wurden pro Injektion $1 \cdot 10^6$ Sphären verwendet, so dass die Höchstgrenze beachtet wurde, und auch die Mindestmenge wurde bei der Gewebeaufbereitung berücksichtigt und eingehalten.

Des weiteren muss berücksichtigt werden, dass, wenn absolute Blutflusswerte bestimmt werden sollen, eine Referenzprobe gewonnen werden muss. (s. auch 1.1.2.1.1) Dies erfordert einen arteriellen Zugang, über den kontinuierlich mit einer definierten Geschwindigkeit Blut abgezogen wird, um so eine Art „künstliches Organ“ zu erhalten, dessen Durchblutung bekannt ist, und mit Hilfe dessen die absoluten

Werte in den zu bestimmenden Regionen errechnet werden können. Dazu müssen einige Voraussetzungen beachtet werden. Zum einen muss die Dauer des Abzugs bestimmt werden, die sicherstellt, dass alle noch zirkulierenden Mikrosphären anteilmäßig von der Referenzprobe erfasst werden. In Studien wurde diese Zeit auf mindestens eine Minute festgelegt (6), aus Sicherheitsgründen wird jedoch eine Mindestabzugzeit von 3 Minuten empfohlen (26). In der vorliegenden Studie wurde eine nach einer Minute Vorlauf, um ein sicheres Ergebnis zu erhalten, eine Abzugzeit von vier Minuten gewählt, so dass diese Voraussetzung sicher erfüllt wird.

Die Frage des Abnahmeortes wurde auch in der Literatur diskutiert und mit Versuchen überprüft. Es zeigte sich, dass es keine systematischen Unterschiede zwischen den Abnahmeorten gibt, so lange die Arterie eine Mindestgröße aufweist, die es ermöglicht, die Referenzprobe mit dem gewünschten Fluss kontinuierlich zu gewinnen (25). Die in unserem Modell aus der Ohrarterie genommene Referenz erwies sich als reliabel und stabil.

Bei der Etablierung des Modells wurden Fehlermöglichkeiten bei der Messung mit Mikrosphären erkannt, die hier im Spiegel der Literatur diskutiert werden.

Eine Möglichkeit, bei der Perfusionsmessung mittels Mikrosphären falsche Werte zu erhalten, liegt in ihrer Verlagerung aus dem Präkapillarbett. Dies kann prinzipiell auf zwei Arten geschehen. Zum einen können die Mikrosphären durch arterio-venöse Anastomosen rezirkulieren, was falsch-hohe Werte ergeben würde. Jedoch konnte dieses mögliche Shunting sowohl über die Lunge als auch durch das Kapillarbett der Organe durch Untersuchungen ausgeschlossen bzw. als so geringfügig angesehen werden, dass es für die Messungen vernachlässigbar erscheint (99, 114). Wichtig ist allerdings, dass der Durchmesser der Mikrosphären richtig gewählt wird. Studien belegten, dass ein Durchmesser von 7 μm auf keinen Fall unterschritten werden darf (136), und dass bei Versuchen, die die Möglichkeit einer Vasodilatation beinhalten, ein Durchmesser von 15 μm zu empfehlen ist (38, 87, 137).

Die zweite Fehlermöglichkeit ist das nachträgliche *dislodging* der bereits in den Präkapillaren arretierten Mikrosphären. Hier bewiesen Studien, dass bei einem Durchmesser von über 10 μm dieses Phänomen nicht berücksichtigt werden muss (28). Auch die Frage, in wie weit die Hämodynamik, also Blutdruckanstiege oder –abfälle sowie Steigerung oder Senkung der Herzfrequenz Einfluss auf das *dislodging* haben, wurde beantwortet und für vernachlässigbar erachtet (20, 38, 46, 136).

Des Weiteren darf der Durchmesser nicht zu groß gewählt werden, weil dann die Gefahr besteht, dass die Mikrosphären bereits vor den Präkapillaren, zum Teil sogar schon in den Arteriolen hängen bleiben und somit die Messergebnisse verfälschen würden und teilweise auch die Hämodynamik beeinflussen könnten. Dies ist bereits bei einem Durchmesser von 25 μm der Fall (149).

Daraus folgt, dass die Reliabilität der Ergebnisse allein von dem gut gewählten Durchmesser der verwendeten Mikrosphären abhängt, welcher in dieser Studie mit 15 μm optimal ausgewählt wurde, da die vorgenannten und bereits in der Einleitung genau vorgestellten Studien diesen als empfehlenswertesten erachtet haben.

Dass diese Mikrosphären die Mikro- und Makrozirkulation nicht beeinträchtigen, wurde in vielfältigen Studien nachgewiesen. So wurde mit Hilfe der Messung der hämodynamischen Parameter (71, 114, 145) sowie unter Einsatz der Intravitalmikroskopie nachgewiesen, dass die Mikrosphären selbst keinen signifikanten Einfluss auf die Zirkulation haben (25, 28, 34, 38, 71, 72, 99, 136). Einzig der Zusatz von Tween80 zu der Mikrosphärenlösung wurde für einen kleinen Blutdruckanstieg unmittelbar nach der Injektion verantwortlich gemacht, dieser war jedoch spontan sistierend und betrug maximal 3 mmHg, so dass auch dieser als vernachlässigbar angesehen wurde (156).

4.3 Grundsätzliches

4.3.1 Voraussetzungen für die Untersuchung

Entscheidende Voraussetzung für die Untersuchung verschiedener Einflüsse auf die regionale Perfusion wie zum Beispiel Endotoxinämie und Sepsis ist, dass die Organperfusion nicht durch die artifizielle Entnahme von Organen und die Untersuchung ex vivo unterbrochen wird, sondern dass der Organismus als ganzes unbeeinflusst von Versuchsnebenwirkungen bleibt und die gemessenen Änderungen in der Perfusion alleine auf die zu untersuchenden Einflüsse zurückzuführen sind.

Eine weitere Voraussetzung beruht darauf, dass sowohl Leukozyten als auch das Endothel in voller Funktionsfähigkeit einschließlich uneingeschränkter enzymatischer Stoffwechselkompetenz erhalten sind und so einzeln und in jeweiliger Interaktion mit ihren Liganden zur mikrovaskulären Durchblutung beitragen können.

In-vitro-Untersuchungen an endothelialen Monolayern sowie die Isolation von Leukozyten führen über Milieuanpassungsvorgänge zu einer weitreichenden Verschiebung von biologischen Aktivitätsmustern (Membranfluidität, pH, Enzymaktivität) und erlauben damit keine adäquate Untersuchung der zugrundeliegenden pathophysiologischen Zusammenhänge. Weiterhin kann davon ausgegangen werden, dass unter in vivo Bedingungen biochemische Substrate sowie Stoffwechselprodukte in einem nicht zu den genannten Zellgruppen gehörenden Kompartiment (Serum, Mastzellen, Erythrozyten etc.) in die in vivo ablaufenden Reaktionen modulierend eingreifen und sich damit jeder in vitro Untersuchung entziehen. Insbesondere die Induktion einer Endotoxinämie stellt für sich eine komplexe pathophysiologische Situation dar, die in einem isolierten Zellversuch nicht nachahmbar ist, da eine zentrale Bedingung für dieses Modell darin besteht, dass die biologische Funktion der Makrophagen sowie der Blutplättchen nur in vivo, d.h. ohne die entsprechenden Zellen durch die exogene Manipulation zu verändern, adäquat zu untersuchen ist. Zur Untersuchung der pathophysiologischen Zusammenhänge unter den genannten experimentellen Bedingungen ist daher mindestens ein Drei-Kompartiment-System notwendig.

Eine besondere Schwierigkeit bei einem chronischen Sepsismodell stellt die Etablierung einer Sepsis mit Organversagen, aber ohne Verursachung des sofortigen Absterbens der Tiere dar. Des weiteren sollte eine Situation geschaffen werden, die dem tatsächlichen Geschehen in der Klinik so nahe wie möglich kommt.

4.3.2 Auswahl der Versuchstierspezies

Das Kaninchen als Versuchstier wurde für dieses Modell aus mehreren Gründen gewählt. Zum einen ist für die arterielle Infusion der Mikrosphären ein Versuchstier nötig, das ausreichend groß für zwei arterielle Zugänge ist und bei dem mehrfach etwa 5 ml Blut für Bestimmungen abgenommen werden können (42). Zum anderen sollte eine Tierart gewählt werden, die nicht von vornherein eine Endotoxinresistenz aufweist, sondern die bei den entsprechenden Endotoxinspiegeln auch mit dem Menschen vergleichbare Krankheitssymptome aufweist. Das Kaninchen eignet sich hierzu, da schon Endotoxin in einer Dosis von 100 μ g/kg Körpergewicht eine vergleichbar schwerwiegende Endotoxinämie induziert, während bei Ratten z.B. 1 - 10mg/kg Körpergewicht Endotoxin zur Induktion einer Endotoxinämie notwendig ist. Es sollte zudem möglich sein, eine Peritonitis mittels Darmperforation zu induzieren und am Folgetag den Darm auszuleiten (entsprechend der klinischen Herdsanierung). Darüber hinaus weist das Kaninchen im Gegensatz zum Schwein (ca. 25 kg) ein deutlich geringeres Körpergewicht auf, was sich in der Dosierung der verwendeten Medikamente und der Mikrosphärendosis niederschlägt (etwa 10% der Dosis beim Schwein). Der Tierpreis für Kaninchen ist ebenso deutlich geringer. Damit ist dieses Modell deutlich kostengünstiger. Gleichzeitig sind bereits chronische Untersuchungen zur Knochenperfusion am Kaninchen durchgeführt worden (100). Der Wechsel der Versuchstierspezies hätte zwingend die Neuentwicklung der arteriellen Katheterportsysteme zur Folge gehabt sowie die Neuarbeitung eines chronischen Modells mit Narkose, Operationen sowie Medikamentenverabreichungen.

Ein Nachteil kann sich beim Kaninchen allerdings daraus ergeben, dass es für bestimmte Untersuchungen der regionalen Perfusion aufgrund der Größe der Organe

nahezu unmöglich sein kann, die Proben in die gewünschten kleinen Teile zu trennen. Bei Fragestellungen, die zum Beispiel die genauen Untersuchungen des Myokards mit Unterscheidung der Perfusion von Epi-, Endo- und Mesokard berücksichtigen, wird die getrennte Aufbereitung dieser einzelnen Gewebeteile sicher sehr schwierig oder nahezu unmöglich, selbst bei Verwendung mikroskopischer Hilfsmittel.

4.3.3 Wahl der Narkose

Die Auswahl der Narkose spielt bei der Perfusionsmessung ebenfalls eine wichtige Rolle. So können bestimmte Narkotika die Makro- wie auch die Mikrozirkulation verändern und damit die Ergebnisse verändern. Es zeigte sich in mehreren Versuchen, dass vor allem volatile Anästhetika, allen voran das Halothan, einen deutlichen Einfluss auf die Zirkulation, vor allem auf das *dislodging* von Mikrosphären haben (28). In der vorliegenden Studie wurde eine intravenöse Analgosedierung durchgeführt, um zum einen diesem Effekt vorzubeugen, und zum anderen die bei einer Narkose mit volatilen Anästhetika notwendige kontrollierte Beatmung zu umgehen. Des Weiteren wurde, um einen dennoch womöglich vorhandenen Effekt gleichzuhalten, die Narkose stets auf die gleiche Weise durchgeführt. So konnte der systematische Fehler möglichst gering gehalten werden.

4.3.4 Wahl der Meßmethode für die Mikrosphären

Die Meßmethode für die in dieser Arbeit gewählten fluoreszierenden Mikrosphären spielt eine wichtige Rolle, da die Perfusionswerte anhand der in den einzelnen Gewebeproben vorhandenen Fluoreszenzintensität bestimmt werden müssen. Hierfür müssen die Proben aufbereitet und die Fluoreszenzfarbstoffe wieder ausgelöst werden. Wie bereits in der Einleitung (s. 1.1.3.2) ausführlich vorgestellt,

stehen dazu verschiedene Verarbeitungsmethoden zur Verfügung (47, 57, 105). Bei der Auswahl müssen verschiedene Faktoren berücksichtigt werden.

Zum einen dürfen die Mikrosphären sowie die Fluoreszenzfarbstoffe von den verwendeten Verarbeitungsmethoden bzw. Chemikalien nicht beeinträchtigt oder gar zerstört werden. So kann zum Beispiel die mechanische Zerkleinerung der Gewebeproben zu einer Zerstörung der Mikrosphären führen (12), die Verwendung von höherprozentiger KOH-Lösung kann den aus den Mikrosphären ausgelöstem Farbstoff zersetzen (1, 107, 133). Daher verbietet sich der Einsatz dieser Methode.

Des weiteren werden bei einigen Verarbeitungsmethoden durch Verwendung vieler Gefäße und zahlreicher Arbeitsschritte Fehlerquellen erzeugt, die zum Beispiel zu einem unnötigen Verlust von Mikrosphären bei jedem nötigen Transfer von einem Gefäß zum anderen führen würden (47). Dies führt, insbesondere bei Verwendung einer Referenzprobe und falsch-niedriger Messung der Intensität in dieser, zu einer bedeutsamen Fehleinschätzung (107, 108, 133, 141).

Wichtig ist außerdem, dass sich die eingesetzte Methode für die Verarbeitung aller gewünschten Gewebeproben eignet, so dass nicht während einer Versuchsreihe verschiedene Verarbeitungsmethoden verwendet werden müssen. Schwierig ist dabei vor allem die Verarbeitung fettreicher Gewebearten (Hirn, Leber), bei denen manche Filtermembranen nicht geeignet sind (27, 47, 107, 108, 141) sowie von Geweben mit geringer Dichte (Lunge), bei denen bestimmte Sondermethoden zum Einsatz kommen können (47).

Ein weiterer Aspekt ist der benötigte Zeit-, Arbeits- und Kostenaufwand, den viele der existierenden Methoden erfordern. Diesen gilt es ebenfalls zu minimieren (12).

Im vorliegenden Fall haben wir uns für die seit 1998 etablierte automatisierte Aufbereitung der Proben mit Hilfe eines Robotersystems entschieden, bei welcher alle oben erwähnten Problematiken weitestgehend berücksichtigt werden. Es wird nur ein Gefäß verwendet, in welchem die Gewebeproben aufbereitet, die Farbstoffe aus den Mikrosphären ausgelöst und die Intensität bestimmt werden kann. Durch die Automatisierung wird der zeitliche, finanzielle wie auch der personelle Aufwand minimiert. Es können alle Gewebearten sowie die Referenzblutproben verarbeitet werden, und die verwendeten Verarbeitungsmethoden und Chemikalien führen zu keinem Verlust von Mikrosphären oder Farbstoffen (107, 108, 133). Diese Methode präsentiert sich somit als die geeignetste, vor allem bei der Verarbeitung vieler Gewebeproben.

Ein Nachteil all dieser Verarbeitungsmethoden ist unzweifelhaft die Tatsache, dass durch die maschinelle Aufarbeitung und vollständige Auflösung der einzelnen Gewebeproben im nachhinein keine Möglichkeit mehr besteht, die Ergebnisse zu überprüfen bzw. bei unplausiblen Werten Fehleranalyse anhand der Gewebeproben zu betreiben oder die Messungen zu wiederholen, sollte ein Messfehler oder ein technischer Defekt während der Messungen aufgetreten sein. Auch eine mikroskopische Untersuchung der Gewebeproben ist nur alternativ, nicht zusätzlich zu den Perfusionsmessungen möglich, da nach der Prozessierung die Gewebe vollständig aufgelöst sind und somit nicht mehr für weitere Untersuchungen zur Verfügung stehen, während die Aufarbeitung der Proben für mikroskopische Zwecke die nachträgliche Prozessierung aufgrund der verschiedenen notwendigen Fixierungen unmöglich macht. So kann die Gewinnung von mikroskopischen Erkenntnissen nur durch Verzicht auf Proben zur Perfusionsmessung zustande kommen.

4.4 Voraussetzungen für die repetitive Injektion

4.4.1 Entwicklung eines chronischen Zugangs

Bislang mussten die Mikrosphären zu jeder Messung entweder intrakardial injiziert werden oder aber für jede Messung Injektionskatheter in das Herz eingebracht werden (142). Beide Vorgehensweisen erfordern invasive Maßnahmen (Thorakotomie und tiefe Allgemeinnarkose) (40). Dies stellt zum einen für die Versuchstiere eine sehr hohe Belastung dar, zum anderen können dadurch verfälschte Messergebnisse entstehen, da große chirurgische Traumen wie Thorakotomie oder Kardiotomie zur Einbringung von Messsonden sowie langandauernde Anästhesie massive Veränderungen mit Freisetzung von Entzündungsmediatoren sowie Störungen in der Mikrozirkulation induzieren (121, 146). Diese Veränderungen der Immunantwort und Störungen der hämodynamischen Parameter mit darauffolgenden Veränderungen der Mikrozirkulation bleiben über Tage und Wochen bestehen (125).

Eine Grundvoraussetzung für einen chronischen Versuchsansatz ist also eine Vermeidung von sekundären Effekten auf die Messung der Perfusion wie eben den Einfluss tiefer Narkosen und/oder großer chirurgischer Traumata (92, 142, 144).

Es wurden schon früher linksventrikuläre Katheter beschrieben, welche auf einer retrograden Einführung des Katheters über die Arteria carotis durch die Aortenklappe in den linken Ventrikel beruhen (142). Ein Hauptproblem dieser Katheter ist die Tatsache, dass sie wegen ihrer einmaligen Verwendbarkeit zu jedem Messzeitpunkt neu eingeführt und wieder entfernt werden mussten (142). Die punktierte Wand der Arterie musste daher wiederholt genäht werden, um die weitere Durchgängigkeit zu sichern, oder sie musste ligiert werden. Diese Nähte wie auch die Reoperationen sind schwierig und erhöhen so das Gesamtrisiko der Operation. Darüber hinaus stellt die wiederholte Notwendigkeit tiefer Allgemeinnarkosen mit ihren bekannten unerwünschten Effekten auf die Makro- wie auch die Mikrozirkulation mögliche Fehlerquellen speziell bei Kaninchen dar (125). Es besteht die Möglichkeit der Verwendung von Kathetern mit subkutanem Zugang, welche in die Hauptstammkoronararterie implantiert werden, diese können allerdings lediglich bei

größeren Tieren wie zum Beispiel Hunden angewandt werden, und auch bei diesem Modell muss eine Thorakotomie durchgeführt werden. Außerdem kann bei dieser Technik ausschließlich die Perfusion des Herzmuskels untersucht werden (84). Des weiteren bestand in den Fällen, in denen aufgrund der Insertion des Katheters die Arteria carotis communis ligiert werden musste, die Gefahr einer cerebralen Ischämie mit nachfolgender Störung der Hämodynamik.

Unser neues implantierbares Portsystem hingegen erlaubt wiederholten Zugang zum linken Ventrikel zur Injektion von Mikrosphären oder zur Gewinnung von arteriellen Blutproben unter leichter Sedierung durch einfache transkutane Punktion des arteriellen Portreservoirs auch bei kleineren Versuchstieren wie dem Kaninchen und vermeidet somit eine Thorakotomie sowie wiederholte Allgemeinnarkosen. Dadurch reduziert diese Technik den perioperativen Stress der Tiere erheblich. Dadurch werden wiederholte Blutflussmessungen in Organen über Wochen und Monate bei einem einzigen Tier möglich, sodass zudem die Zahl der Versuchstiere, die bei chronischen Fragestellungen und langfristigen Experimenten bisher erforderlich war, drastisch reduziert wird.

Die Versuchstiere tolerieren die Implantation des Portsystems sehr gut. Während der Operation zeigen sich keinerlei schwerwiegende hämodynamische Abweichungen wie zum Beispiel ein Anstieg der Herzfrequenz und der Blutdruckes, was im Sinne einer Stressreaktion gedeutet werden müsste (siehe Tab. 3.1.2). Auch der Blutverlust ist sehr gering, der leichte Abfall des Hämoglobins (siehe Tab. 3.1.2) ist am ehestens auf die Verdünnung durch die intraoperative Volumengabe zu erklären. Die Kaninchen erholen sich innerhalb weniger Tage von der Operation, dies konnte zum einen aufgrund des normalen Fress- und Spielverhaltens der Tiere wie auch der raschen Wiedergewinnung des Ausgangsgewichtes (siehe Abb. 3.1.1) verifiziert werden. Darüber hinaus ist die Technik der Operation verhältnismäßig einfach und schnell zu erlernen, so dass keine lange Einarbeitungszeit und Vorversuche notwendig werden.

4.4.2 Cerebrale Perfusion

Die vorbeschriebene Implantationstechnik beeinträchtigt zudem die Perfusion der Arteria carotis communis nicht. Die Tatsache, dass rechte und linke Gehirnhälfte gleichmäßig perfundiert werden (s. Abb. 3.4.2 und Tab. 3.4.2), weist darauf hin, dass die Einführung des Portkatheters über die Arteria carotis und der Verbleib des Katheters in diesem Gefäß keine Auswirkungen auf die Gehirndurchblutung hat. Klinisch ließen sich keine Hinweise auf das Vorliegen einer cerebralen Minderperfusion finden, weder intraoperativ durch das kurzfristig notwendige Abklemmen der Arteria carotis, noch postoperativ oder während der Versuchsreihen. Diese würden zum einen von einer Veränderung der makrohämodynamischen Parameter begleitet, was bei unseren Kontrolltieren nicht nachzuweisen war (s. Tab. 3.1.2) Zum anderen würden die Tiere nach der Operation bei Vorliegen einer cerebralen Ischämie klinisch auffällig werden. Bei den Perfusionswerten der rechten und linken Hemisphäre waren mit wenigen Ausnahmen keine signifikanten Unterschiede festzustellen, insbesondere kein signifikanter Abfall der Durchblutung der rechten Gehirnhälfte (siehe Abb. 3.4.2 und Tab. 3.4.2).

Die Durchgängigkeit der Arterie an der Stelle der Portinsertion wurde bei selektierten Tieren nach Beendigung der Versuchsreihe und vor der Euthanasierung überprüft. Es ergab sich stets eine gute Perfusion des Gefäßes, sowohl orthograd wie auch retrograd. Somit konnte auf eine intakte Durchblutung der nachfolgenden Gewebe und damit auch des Gehirns geschlossen werden.

Des Weiteren wurde die Plasmakonzentration des Neuroproteins S100-b überprüft. Das Neuroprotein S100-b ist ein hochspezifischer und sensitiver Marker für zerebrale Ischämie bzw. für Schädigungen des zentralen Nervensystems (2), welches von den Astrogliazellen bei Schädigung in das Serum abgegeben wird und gut mit dem Grad der Gehirnschädigung in verschiedenen klinischen und experimentellen Studien korreliert (9, 13). Das Ausmaß der Schädigung wird bereits durch eine frühe Bestimmung der S-100b-Konzentration erfasst und ist daher bei Erhöhung der Werte ein wichtiger Prognosefaktor (2). Es fand sich bis zum fünften Tag nach der Implantation kein signifikanter Anstieg der Plasmakonzentration (s. Tab. 3.1.3). Daher ergab sich kein Hinweis auf eine durch die Arteriotomie und die im Rahmen der Portinsertion notwendigen kurzzeitigen Abklemmung der Arteria carotis

entstandene zerebrale Schädigung. Daher erscheint eine relevante zerebrale Ischämie sehr unwahrscheinlich.

Dies ermöglicht auch Studien, welche die Gehirndurchblutung im einzelnen und in unterschiedlichen Regionen untersuchen wollen. Ebenso werden Versuche über einen längeren Zeitraum, wie in diesem Modell 96 Stunden, aber auch über Wochen und Monate (100) möglich, da sich zu verschiedenen Zeitpunkten, abhängig von der Menge an unterschiedlich fluoreszenzmarkierten Mikrosphären, Perfusionswerte gewinnen und am Ende des Versuches auswerten lassen.

4.4.3 Wahl des Katheterortes

Die Wahl des Katheterortes ergibt sich aus der Forderung, ein minimal invasives Modell zu schaffen, welches ohne Thorakotomie oder ähnlich invasive Maßnahmen auskommt. Da man das linke Herz nur retrograd über eine Arterie erreicht und auch nur in den linken Ventrikel, nicht aber in den linken Vorhof vordringen kann, muss der Katheter also in den linken Ventrikel inseriert werden. In einer Studie von Degens et al. wurde der Einfluss des Katheterortes auf die gleichmäßige Verteilung der Mikrosphären nach der Injektion untersucht. Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied in der Verteilung der Mikrosphären nach Injektion in den linken Vorhof oder den linken Ventrikel (31). In einer weiteren Arbeit (71) wurde Vorhof mit Ventrikel verglichen, auch hier stellte sich kein signifikanter Unterschied heraus, mit der Ausnahme der kardialen Perfusionsmessung, bei der eine Platzierung des Katheters im linken Vorhof vorzuziehen ist (71). Eine Arbeit von Schrock et al zeigte jedoch, dass für die Messung der regionalen Perfusion die Injektion in den linken Ventrikel gleichwertig zu der Injektion in den linken Vorhof ist, und dass auch für die koronare Perfusion keine signifikanten Unterschiede zu beobachten sind (120). Für die Wahl des Injektionsortes kann also der linke Ventrikel als ausreichend angesehen werden (31).

Da der Portkatheter bei der Einführung die Aortenklappe in den linken Ventrikel passiert, ergibt sich die Frage, ob dadurch eventuell eine Aorteninsuffizienz und damit eine hämodynamische Instabilität mit Störung der physiologischen Verteilung der Mikrosphären entstehen könnte. Eine andere Möglichkeit, den Katheter mittels

einer minimal-invasiven Methode in den linken Ventrikel oder den linken Vorhof einzubringen, steht momentan nicht zur Verfügung und die Platzierung des Katheters an einer anderen Stelle, etwa der Aorta ascendens, garantiert nicht dieselbe sichere und gleichmäßige Vermischung der Mikrosphären bei der Injektion.

Die Wahl eines extrem dünnen Katheters von 0,96 mm Außendurchmesser, welcher im Vergleich zu dem Durchmesser der Aortenklappe eines Kaninchens von etwa 3 Kilo Körpergewicht vernachlässigbar erscheint, macht eine Aorteninsuffizienz unwahrscheinlich.

Des Weiteren konnte durch die Messung der hämodynamischen Parameter (arterieller Blutdruck, Herzfrequenz, arterielle Sauerstoffsättigung), welche während aller Versuchsreihen durchgeführt wurden, kein Hinweis auf eine signifikante Aorteninsuffizienz gefunden werden (siehe Tab. 3.1.1, Abb. 3.2.3 – 3.2.5). Es wurden keine mit der Einführung des Portkatheters durch die Aortenklappe in zeitlichem oder ursächlichem Zusammenhang stehenden Veränderungen der oben genannten Parameter beobachtet, wie sie bei der Ausbildung einer Aorteninsuffizienz zu erwarten gewesen wären, wie zum Beispiel ein Anstieg der Herzfrequenz oder ein Abfall des diastolischen Blutdruckes aufgrund des insuffizienten Schlusses der Aortenklappe. Darüber hinaus konnten bei den Versuchstieren keine klinischen Zeichen für die Entwicklung einer Aorteninsuffizienz gefunden werden. So waren bei den Kontrolltieren postoperativ keine klinischen Zeichen eines Lungenödems oder pleuraler Ergüsse nachweisbar. Die postmortale Untersuchung der Herzen ergab in keinem Fall perikardiale oder pleurale Ergüsse oder eine Lungenstauung (30). Die Herzen, die ja im Falle einer Aorteninsuffizienz über eine so lange Zeit (mehr als 4 Wochen) eine Vergrößerung und Hypertrophie hätten aufweisen müssen (30), zeigten im Vergleich mit der Literatur eine normale Größe und normales Gewicht ($9,34 \pm 2,90\text{g}$, das entspricht $0,26 \pm 0,08\%$ des Gesamtkörpergewichtes, das durchschnittliche normale Herzgewicht beträgt $0,29\%$ des Gesamtkörpergewichtes (127)). Die Herzklappen, insbesondere die Aortenklappen, waren bei der Sektion zart und frei von Auflagerungen oder anderen Veränderungen.

Zudem konnte im Vergleich mit anderen Modellen, bei denen Mikrosphären direkt in den linken Vorhof injiziert wurden, kein wesentlicher Unterschied in der Verteilung der Mikrosphären festgestellt werden (31). Somit erscheint ein signifikanter Einfluss der retrograden Katheterisierung des linken Ventrikels auf die Makro- und Mikrodynamik sehr unwahrscheinlich.

4.5 Minimal invasiv versus invasive Messmethode

Eines der Hauptmerkmale des vorliegenden Modells ist die geringe Invasivität. Diese stellt, wie oben demonstriert, eine Grundvoraussetzung für die chronische Bestimmung von Perfusionswerten ohne Beeinflussung durch größere chirurgische Eingriffe oder tiefe Vollnarkosen mit der Notwendigkeit der künstlichen Beatmung dar.

Einige Werte könnten auch mit Hilfe anderer Möglichkeiten gewonnen werden. Der absolute Blutfluss kann zum Beispiel auch statt mittels der Gewinnung einer Referenzprobe auch durch die Messung des jeweiligen Herzminutenvolumen zum Zeitpunkt der Injektion errechnet werden. Da diese Bestimmung aber zur Zeit noch invasive Methoden wie zum Beispiel die Einführung eines Pulmonalkatheters erfordert, widerspricht dies dem minimal-invasiven Ansatz dieses Modells. Obwohl der Pulmonalkatheter unzweifelhaft einige wertvolle weitere hämodynamische Informationen liefern würde, die auch für die Untersuchungen im Rahmen der Sepsisstudien zusätzliche Aussagen zur Verfügung stellen würden, kann unter der Voraussetzung, minimal-invasiv arbeiten zu wollen, diese sehr invasive Maßnahme nicht durchgeführt werden. Zur Einführung eines Pulmonalkatheters beim Kaninchen muss eine Venae sectio durchgeführt werden, welche zum einen ein chirurgisches Trauma darstellt, zum anderen eine Vertiefung der Narkose erfordert. (85). Darüber hinaus müsste diese zu mehreren Zeitpunkten repetitiv durchgeführt werden. Dies würde zu einem unerwünschten zusätzlichen Einfluss auf die regionale Perfusion führen, wie es sie für die objektive Messwertgewinnung zu vermeiden gilt. Bei der Kontrollgruppe, die vor allem der Verifizierung der Qualität und der Reproduzierbarkeit der Messwerte in einem chronischen Versuchsaufbau sowie zusätzlich dem Vergleich mit der Peritonitisgruppe diente, zeigte sich, dass das Modell reliabel und reproduzierbar ist. Im Vergleich der Durchblutungsdaten über die Zeit wie auch im Vergleich von paarig angelegten Organen zu den einzelnen Zeitpunkten sind die Flüsse vergleichbar und weichen nicht signifikant voneinander ab (siehe Abb. 3.4.1 – 3.4.5). Dies beweist, dass die äußeren Einflüsse wie die vorher erfolgte Portanlage sowie der dann liegenden Port an sich keinen signifikanten Einfluss auf die Mikrozirkulation haben. Auch die für die einzelnen Injektionen notwendigen repetitiven Sedierungen, die in dem vorliegenden Modell in

einem sehr engen Zeitraum stattfinden (sieben Injektionen innerhalb von 96 Stunden) zeigen keine signifikante Änderung der Werte. Dadurch wird erst die Beurteilbarkeit von zu untersuchenden Einflüssen, wie in diesem Projekt eine durch „cecal ligation and puncture“ induzierten Peritonitis mit Sepsis, möglich. Auch die Hämodynamik bleibt unbeeinflusst, wie anhand der gleichbleibenden Durchblutungswerte für das Herz (siehe Abb. 3.4 10) sowie der sich nicht ändernden makrohämodynamischen Parameter wie Herzfrequenz und Blutdruck der Kontrollgruppe deutlich wird (siehe Abb. 3.2.3 – 3.2.5), ist dieses Modell in hohem Maße für Studien geeignet, welche die Einflüsse verschiedenster Parameter auf die Mikrozirkulation in vivo über einen längeren Zeitraum mit repetitiven Messungen untersuchen wollen.

4.6 Validität der chronischen Messungen

4.6.1 Portimplantation

Die vorgestellten Ergebnisse belegen die Validität des Modells für chronische Versuche unter minimal invasiven Bedingungen. Die vor den Versuchen notwendige Portimplantation wurde von den Tieren gut toleriert und hatte nach einer Erholungsphase von ca. 7 Tagen keinen Einfluss auf die während der Versuche gemessenen Werte. Auch die cerebrale Perfusion konnte, wie bereits in 4.4.2 vorgestellt, unbeeinträchtigt gemessen werden.

Während der Portimplantation zeigten sich keinerlei schwerwiegende hämodynamische Abweichungen wie zum Beispiel ein Anstieg der Herzfrequenz und der Blutdruckes, was im Sinne einer Stressreaktion hätte gedeutet werden müssen (siehe Tab. 3.1.1). Auch der Blutverlust war sehr gering (siehe Tab. 3.1.1), der leichte Abfall des Hämoglobins war am ehestens auf die Verdünnung durch die intraoperative Volumengabe zu erklären. Die Kaninchen erholten sich innerhalb weniger Tage von der Operation (siehe Abb. 3.1.1). Auch klinisch zeigten die Tiere nach dem ersten postoperativen Tag keine wesentliche Beeinträchtigung mehr (s. 3.2). Außerdem ist die Technik der Operation verhältnismäßig einfach und schnell zu erlernen, so dass keine lange Einarbeitungszeit und Vorversuche notwendig sind.

4.6.2 Kontrollgruppe

4.6.2.1 Hämodynamik

Bei den Kontrollgruppenversuchen zeigte sich, dass das Modell für chronische Versuche zur Perfusionsmessung hervorragend geeignet ist, da die Injektionen und die dafür benötigten leichten Sedierungen des Versuchstieres keinen signifikanten

Einfluss auf die Makro- und Mikrozirkulation hatten und von den Tieren klinisch gut vertragen wurden (s. 3.2). Dies wurde insbesondere durch die gleichbleibenden hämodynamischen Parameter verdeutlicht, die während der Versuche gemessen wurden (siehe Tab. 3.2.1, Abb. 3.2.3 – 3.2.5). Einzig der Hämoglobinwert zeigte einen signifikanten Abfall über die Zeit, was durch die wiederholten Blutabnahmen und die Verdünnung durch die perioperative bzw. periinjectionelle Infusionstherapie zu erklären ist und keinerlei Einfluss auf die Hämodynamik zeigte (s. Abb. 3.2.2).

4.6.2.2 Perfusion über die Zeit

In diesem Modell wurde die Perfusion einzelner Organe über einen Zeitraum von 96 Stunden gemessen. Es zeigte sich, dass sich die Perfusion über die Zeit zwar änderte, diese Veränderungen allerdings nicht signifikant und im Rahmen biologischer Vorgänge erklärbar waren (s. Abb. 3.4.9 – 3.4.15, Tab. 3.4.6 – 3.4.12). Bei der Betrachtung der Blutflüsse im Gehirn (s. Abb. 3.4.2 und Tab. 3.4.2), in der Lunge (Abb. 3.4.12 und Tab. 3.4.9), im Skelettmuskel (Abb. 3.4.14 und Tab. 3.4.11) und in der Niere (Abb. 3.4.15 und Tab. 3.4.12) waren, bis auf drei aus der Reihe fallende Werte (Lunge bei t_4 , Gehirn bei t_5 , Niere bei t_6) über den gesamten Versuchszeitraum keine signifikanten Unterschiede zu beobachten. Es gibt Organe, die im Gegensatz zu den vorgenannten mehr einer tageszeitlichen und „Ereignis-abhängigen“ Durchblutungsschwankung unterliegen, wie zum Beispiel Magen (Abb. 3.4.13 und Tab. 3.4.10), Darm (Abb. 3.4.9 und Tab. 3.4.6) und Leber (Abb. 3.4.11 und Tab. 3.4.8). Hier zeigte sich auch in der Kontrollgruppe der eine oder andere Unterschied, im Gesamten waren die Flüsse aber durchaus vergleichbar und die Schwankungen im Rahmen biologischer Vorgänge erklärbar (Nahrungsaufnahme kurz vor dem Versuch, Abbauvorgänge in der Leber(Medikamentengabe!) etc.). Man kann anhand dieser Kontrollgruppenstudie also zeigen, dass die Injektionen unter leichter Sedierung keinen signifikanten Einfluss auf die Organperfusion ausüben. Die nachfolgend in der Peritonitisgruppe gemessenen Veränderungen und auch in weiteren Versuchen zu messende Werte und Einflüsse können also störungsfrei beurteilt werden. Die Ausreißer bei den Verläufen können einerseits durch vielfältige, nicht berechenbare Einflüsse bei biologischen Modellen durchaus

einmal vorkommen. Andererseits sind auch Fehler bei der Gewinnung der Referenzprobe, ungenaue Sektion, fehlerhafte Gewichtsangaben oder sonstige Unwägbarkeiten im Rahmen der Versuchsdurchführung oder der Probenaufbereitung nicht ausgeschlossen, wobei bei der Erhöhung aller Werte zu einem bestimmten Zeitpunkt zuallererst von einer fehlerhaften Referenzprobe ausgegangen werden muss.

4.6.2.3 Perfusion im Seitenvergleich

Bei der Betrachtung der Perfusionswerte der paarigen Organe Lunge, Niere und Gehirn zeigte sich eine sehr gute Korrelation der beiden Seiten bei allen paarigen Organen (siehe Abb. 3.4.1 – 3.4.5, Tab. 3.4.1 – 3.4.3). Dies ist, wiederum unter der Berücksichtigung der Tatsache, dass es sich um ein biologisches Modell handelt, ein hervorragendes Ergebnis und unterstützt die Validität. Bei der Durchblutung der Lunge (Abb. 3.4.1 und Tab. 3.4.1) liegt bei t_4 wohl eine falsch-hohe Messung vor, die allerdings für beide Seiten gleich ist, so dass von einer fehlerhaften Gewinnung der Referenzprobe ausgegangen werden muss. Dies scheint im vorliegenden Fall unwahrscheinlich, da dann auch die Werte der anderen Organe der Kontrollgruppe zu diesem Zeitpunkt falsch-hoch gewesen sein müssten. Es kann durchaus auch einmal zu einem Zeitpunkt die Durchblutung in den einzelnen Organen aus verschiedensten Ursachen erhöht sein, ohne dass diese im einzelnen im Nachhinein noch nachvollziehbar wären. Die Perfusion des Gehirns (Abb. 3.4.2 und Tab. 3.4.2) ist, bis auf den Zeitpunkt t_5 , ohne signifikanten Unterschied der beiden Seiten, was auch wesentlich zur Untermauerung der minimalen Invasivität des Modells beiträgt, zeigt dies doch, wie bereits oben näher ausgeführt, die erhaltene Durchgängigkeit der Arteria carotis, in welche der Port implantiert wurde. In der Niere (Abb. 3.4.3 – 5 und Tab. 3.4.3) ist die Korrelation der beiden Seiten wohl am deutlichsten sichtbar. Bis auf den Zeitpunkt t_6 sind die Werte nahezu identisch, selbst die Standardfehler unterscheiden sich kaum.

4.6.2.4 Perfusionswerte im Literaturvergleich

Der Vergleich der hier vorgestellten Werte mit der Literatur ergibt unterschiedliche Aussagen. Der Blutfluss in der Niere liegt bei den hier vorgestellten Werten im Mittel bei $1,34 \pm 0,22 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ (s. Tab. 3.4.3 und 3.4.12), in der Literatur finden sich Angaben von $0,88 - 0,92 \pm 0,15 - 0,17 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ (31), in einer anderen Studie allerdings höhere Werte von $2,47 - 4,06 \pm 0,18 - 0,20 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ (110). In einer weiteren Studie findet sich ein noch weitaus höherer Wert, hier wird der Blutfluss in der Niere mit $5,54 - 10,27 \pm 0,83 - 1,87 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ angegeben (150). Der Blutfluss im Skelettmuskel betrug im Schnitt $0,047 \pm 0,017 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ (s. Tab. 3.4.11), Degens et al maßen in verschiedenen Skelettmuskeln Werte von $0,014 - 0,055 \pm 0,007 - 0,016 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ (31). Im Darm wurde in dieser Arbeit bei der Kontrollgruppe eine mittlere Durchblutung von $0,74 \pm 0,14 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ gemessen, der vergleichbare Wert in der Literatur liegt zwischen $0,62 - 0,70 \pm 0,03 - 0,05 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ (110). Die Perfusion der Leber, in diesem Modell mit $0,41 \pm 0,07 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ gemessen, wird in der Literatur höher angegeben, in einer Studie mit $1,71 - 1,87 \pm 0,08 - 0,11 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ (110). Der Magen hatte einen durchschnittlichen Blutfluss von $1,33 \pm 0,27 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$, der Literaturvergleichswert beträgt $1,05 - 1,09 \pm 0,05 - 0,12 \text{ ml} \cdot (\text{min} \cdot \text{g})^{-1}$ (110).

Man sieht an diesen beispielhaften Vergleichen, dass in den meisten Fällen die hier vorgestellten Werte gut mit den in der Literatur vorhandenen Werten korrelieren. Allerdings schwanken die Flusswertangaben auch in der Literatur zum Teil erheblich. Dies ist bei biologischen Modellen zu erwarten, da die gemessenen Werte wesentlich von äußeren Faktoren abhängen, die vor allem zwischen den einzelnen Arbeitsgruppen erhebliche Unterschiede aufweisen (z.B. Tierhaltung, örtliche Gegebenheiten, Tageszeiten, zu denen die Werte gemessen wurden, verwendete Techniken und Medikamente/Narkotika etc.). So wurde vor allem bei dem hier vorgestellten Modell im Gegensatz zu den meisten in der Literatur beschriebenen Modellen zur Gewinnung der Flusswerte keine Allgemeinnarkose und Beatmung notwendig. Wichtig ist daher bei allen Messungen vor allem, dass bei den verglichenen Gruppen die Bedingungen stets die selben sind, um eine gute intraexperimentelle Korrelation und Vergleichsmöglichkeit zu erreichen. So können

auch dann signifikante Aussagen über Veränderungen in dem Versuch getroffen werden, wenn sich die Absolutwerte von den Literaturangaben unterscheiden.

4.6.3 Peritonitisgruppe

4.6.3.1 CLP-Modell

Wir haben uns in dieser Sepsisstudie für ein durch „cecal ligation and puncture“ hervorgerufenen Peritonitismodell entschieden, um die Versuchsbedingungen an der tatsächlichen klinischen Situation zu orientieren. Es handelte sich um eine durch eine (in diesem Fall künstlich hervorgerufene) Darmperforation entstandene kotige Peritonitis (45, 153), wie sie im klinischen Alltag zu beobachten ist. Diese wurde – analog der Vorgehensweise bei erkrankten Menschen – durch Entfernung des perforierten Darmstückes sowie Lavage der Peritonealhöhle chirurgisch saniert und durch perioperative Volumen- und Antibiotikagabe therapiert.

Eine septische Reaktion kann auch durch intravenöse oder intraperitoneale Injektion von Endotoxinen (42), welche zu einem Hauptprozentatz aus dem Glykolipid Lipopolysaccharid (LPS), welches in der Wand von gramnegativen Bakterien zu finden ist, sowie des weiteren aus Teilen der Zellwände (Proteine, Fette und Lipoproteine) besteht (42), induziert werden. Dies wurde in vielen vorangegangenen Studien durchgeführt (21). Hier kann vor allem eine genaue Aussage über die Menge an injizierten LPS getroffen werden. Bei der Verwendung von Bakterien oder dem CLP-Verfahren kann dies erst im Nachhinein näherungsweise bestimmt werden. Dies kann einen potentiellen Nachteil darstellen, da es relativ schwierig ist, das Ausmaß der mit Hilfe des CLP-Verfahren induzierten Sepsis genau zu kontrollieren.

Es bestehen jedoch trotzdem erhebliche Zweifel an der klinischen Relevanz von Endotoxinmodellen, da eine Sepsis sich wesentlich von einem Endotoxinschock unterscheidet (42, 153). Deshalb muss der Nutzen der aus solchen Modellen gewonnenen Einsichten für den klinischen Alltag in Frage gestellt werden (42, 153). Des weiteren ist eine einmalige „Bolus-Gabe“ von Sepsis-verursachenden

Substanzen klinisch in den seltensten Fällen zu beobachten. Meist entsteht ein septischer Herd, welcher über eine gewisse Zeit kontinuierlich Bakterien und septische Substanzen an den Organismus abgibt (42, 153). Dies kann, neben dem oben beschriebenen Modell, auch durch eine kontinuierliche Infusion von Bakterien intravenös oder intraperitoneal über eine gewisse Zeit erreicht werden. Dabei handelt es sich allerdings auch um einen Ansatz, der der klinischen Realität auch nicht gerecht wird, zumal es sich bei klinischen Peritonitiden meist um eine Mischflora handelt, welche im experimentellen Ansatz nur schwer nachzuahmen ist (42). Darüber hinaus ist das CLP-Modell sehr viel einfacher durchzuführen, da es sich um eine simple chirurgische Vorgehensweise handelt (42), bei der die Notwendigkeit der Aufbewahrung und Anzucht der Bakterien entfällt (42).

Es zeigte sich bei den Versuchen, dass die für die Injektionen wie auch die chirurgische Sanierung notwendige Sedierung trotz des zum Teil schwer kranken Zustandes von den Tieren relativ gut toleriert wurden. Die Tiere zeigten nach der Herdsanierung eine deutliche Verbesserung des klinischen Zustandes, so dass zum einen dieses Vorgehen als ausreichend angesehen werden muss, zum anderen damit ein Überleben länger als 24 Stunden, gewährleistet wird. Dies ist für chronische Versuche eine Grundvoraussetzung und steht im Gegensatz zu den bisher in der Literatur vorgestellten Sepsismodellen, in denen die Versuche meist nach weniger als 24 Stunden (73, 74, 79, 88, 94, 96), selten nach länger als 48 Stunden (21, 45, 115) beendet wurden.

4.6.3.2 Perfusionswerte allgemein

Bei der Betrachtung der Perfusionswerte war zum einen zunächst festzustellen, dass trotz der veränderten Versuchsbedingungen eine noch zufriedenstellende Rechts-Links-Korrelation gegeben war, sodass die Versuche verwertbar sind, da die Mikrosphäreninjektionen gleichmäßig waren und sich auch gleichmäßig im Organismus verteilten (siehe Abb. 3.4.6 – 3.4.8 und Tab. 3.4.4 und 3.4.5).

Es stellen sich verschiedene Veränderungen bei den unterschiedlichen Organen heraus. Zunächst fiel auf, dass sich die Durchblutung des Herzens über den gesamten Versuchszeitraum nicht signifikant von der bei der Kontrollgruppe

unterschied (siehe Abb. 3.4.10, Tab. 3.4.7), was zum einen ein Hinweis darauf war, dass das Herz selber nicht unmittelbar von der Sepsis betroffen war, und dass damit auch alle anderen bei diesem Versuch gewonnenen Werte verwertbar waren, da sich, wäre das Herz während des septischen Versuches ischämisch gewesen, durch die veränderte Herzarbeit Abweichungen in der Makro- und Mikrozirkulation ergeben hätten. Diese hätten zu einer falschen Einschätzung der Perfusionswerte geführt und somit keine objektive Messung des Einflusses der Sepsis mehr zugelassen.

4.6.3.3 Perfusion im Vergleich mit der Kontrollgruppe

Bei der Betrachtung der Darmdurchblutung fiel auf, dass nach Durchführung der Perforation am ersten Versuchstag bei den darauffolgenden beiden Messungen die Perfusionswerte signifikant unter denen der Kontrollgruppe lagen, sich aber nach der Revision, wie zu erwarten gewesen, wieder zu erholen begannen und keinen signifikanten Unterschied mehr aufwiesen (siehe Abb. 3.4.9, Tab. 3.4.6). Bei der Durchblutung der Leber stellte sich ein ähnliches Bild dar, auch hier sank die Durchblutung zum Zeitpunkt t_3 signifikant ab, brauchte aber länger als der Darm, um sich nach der Herdsanierung wieder anzugleichen, dies fand erst am vierten Versuchstag statt (siehe Abb. 3.4.11, Tab. 3.4.8). Bei der Lungenperfusion fiel auf, dass die Durchblutung zunächst bei t_3 ansteigt, um dann aber auch wie bei den anderen Organen signifikant abzufallen (siehe Abb. 3.4.12, Tab. 3.4.9). Der Magen zeigte überraschenderweise bereits nach der Perforationsoperation an Tag 1 zum Zeitpunkt t_2 einen signifikanten Abfall in der Durchblutung gegenüber der Kontrollgruppe, so dass davon ausgegangen werden musste, dass die Operation per se schon einen Einfluss auf die Magenperfusion haben muss. Dies ist am ehesten im Rahmen einer Stressreaktion der Tiere zu deuten. Hier zeigten sich über den gesamten Versuchszeitraum signifikante Unterschiede zur Kontrollgruppe (siehe Abb. 3.4.13, Tab. 3.4.10). Im Skelettmuskel fand sich kein signifikanter Unterschied zwischen Kontroll- und Peritonitisgruppe, was die Stabilität des Modells unterstützt und darüber hinaus beweist, dass etwaige Schwankungen in der Makrohämodynamik nicht für die Minderperfusion der einzelnen Organe verantwortlich sind. Die Niere als klassisches von der Sepsis betroffenes Organ zeigte während des gesamten

Versuchszeitraumes einen signifikanten Abfall der Durchblutung gegenüber der Kontrollgruppe. Bei Betrachtung der Absolutwerte fällt auf, dass sich der am Anfang geringe Unterschied über die Zeit deutlich vergrößert (siehe Abb. 3.4.15, Tab. 3.4.12).

4.6.3.4 Einschränkung der Ergebnisse

Insgesamt zeigte sich also, dass sich bei der Sepsis die Durchblutung von lebenswichtigen Organen deutlich verändert, die Herdsanierung jedoch für einige der genannten Organe eine deutliche Besserung der mikrozirkulatorischen Situation ergibt, dass aber die Erholungszeit der einzelnen Organe unterschiedlich war und dass zum Beispiel die Niere sich in dem vorliegenden Zeitraum von 96 Stunden noch nicht vollständig erholt hatte.

Dieser Versuch wurde allerdings als Pilotstudie mit vier Tieren durchgeführt und diente dazu, die Umsetzbarkeit eines minimal-invasiven Modells bei septischen Tieren zu zeigen und erste Anhaltspunkte für Veränderungen der Parameter zu erhalten.

Sicherlich ist eine Versuchsgruppe von 4 Tieren zu klein, um definitive Aussagen bezüglich der Mikrozirkulation bei Sepsis machen zu können. Die vorliegenden Ergebnisse müssen daher durch weitere Untersuchungen bestätigt werden. Aufgrund der geringen Zahl der Tiere erscheint auch die statistische Auswertung problematisch.

Dennoch ergeben die Daten bereits erste Anhaltspunkte dafür, wie eine Peritonitis die Perfusion bestimmter Organe verändert. Die Pilotstudie zeigt außerdem, dass die Perfusionsmessung auch bei kranken Tieren durchführbar ist.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein chronisches Modell zur minimal-invasiven Organperfusionsmessung am Kaninchen vorzustellen. Hierzu musste als Voraussetzung für die chronischen Messungen die Implantation eines Portkathetersystems in den linken Ventrikel etabliert werden. Mit Hilfe der Portkatheter wurde der regionale Blutfluss zu verschiedenen Zeitpunkten bei gesunden Kontrolltieren und in einer Pilotstudie bei Tieren mit experimentell induzierter Peritonitis bestimmt. Die Messung der Perfusion erfolgte mit fluoreszenzmarkierten Mikrosphären (Latexkugeln mit 15 μm Durchmesser). Aus der Anzahl der im präkapillären Stromgebiet arretierten Mikrosphären kann der regionale Blutfluss in verschiedenen Organen qualitativ und, bei gleichzeitiger Gewinnung einer Referenzprobe, quantitativ in ml pro g Organgewebe pro Minute erfasst werden.

Die Implantation des Portsystems wurde unter perioperativer Antibiotikaphylaxe bei weiblichen weißen Neuseeland-Kaninchen ($n = 30$, $3,8 \pm 0,3$ kg KG) in Medetomidin/Ketamin-Anästhesie durchgeführt. Speziell entwickelte Portkatheter wurden über die Arteria carotis communis mit der Katheterspitze in den linken Ventrikel eingeführt. Perioperativ erfolgte die kontinuierliche intraarterielle Blutdruckmessung sowie eine Bestimmung der Herzfrequenz und der Sauerstoffsättigung. Prä- und postoperativ wurden Blutproben zur Bestimmung der S100-b-Serumkonzentration als Marker einer cerebralen Ischämie entnommen.

Nach einem Erholungszeitraum von 2 bis 4 Wochen wurden zwei Versuchsgruppen untersucht. Zunächst wurde bei einer Versuchsgruppe ($n = 16$, $3,7 \pm 0,4$ kg) zu sieben Zeitpunkten (0, 2, 24, 26, 48, 72 und 96 Stunden nach Versuchsbeginn, $t_1 - t_7$) je eine Mikrosphäreninjektion durchgeführt. Bei einer zweiten Versuchsgruppe, der Peritonitisgruppe ($n = 4$, $3,5 \pm 0,4$ kg) wurde zu den gleichen Zeitpunkten unter den gleichen Narkosen bzw. Sedierungen je eine Mikrosphäreninjektion durchgeführt, darüber hinaus wurde zwischen den Zeitpunkten t_1 und t_2 eine „cecal ligation and puncture“ zur Auslösung einer kotigen Peritonitis mit nachfolgender septischer Allgemeinerkrankung durchgeführt, welche dann zwischen den

Zeitpunkten t_3 und t_4 revidiert, die Bauchhöhle gespült und der Peritonitisherd saniert wurde.

Die Anlage der linksintraventrikulär inserierten Portkatheter war bei 29/30 (97%) Tieren innerhalb von 71 ± 9 Minuten problemlos möglich. Weder intra- noch postoperativ kam es zu signifikanten, katheterassoziierten Rhythmusstörungen, Blutdruckabfällen (MAP präop. 73 ± 2 mmHg vs. postop. 71 ± 2) oder Hypoxieereignissen (SaO_2 präop. $84 \pm 2\%$ vs. postop. 95 ± 2). Durch eine speziell modifizierte mikrochirurgische Technik war das Einbringen des Katheters im Bereich der Vorderwand der Arteria carotis communis unter Aufrechterhaltung der Durchgängigkeit des Gefäßes und somit unter Erhalt der zerebralen Perfusion möglich. So war klinisch bei keinem der Tiere eine postoperative zerebrale Ischämie nachweisbar. Die S100-b-Serumkonzentration zeigte postoperativ keinen signifikanten Anstieg (präop. $1,6 \pm 0,4$ ng/dl vs. postop. $1,8 \pm 0,4$). Das Ausgangsgewicht der Tiere wurde innerhalb weniger Tage wieder erreicht. Durch Sektion wurde die korrekte Katheterlage bei 26/29 Tieren (90%).

In der Kontrollgruppe konnte gezeigt werden, dass minimal-invasive Messungen der Perfusion gut toleriert werden. Es war keine Beeinflussung des Blutflusses durch die Mikrosphäreninjektionen und die damit verbundenen notwendigen Narkosen bzw. Sedierungen zu beobachten. Die Perfusion der paarigen Organe Lunge, Gehirn und Niere war im Rechts-Links-Vergleich nicht unterschiedlich. Auch die Analyse der Werte über den gesamten Zeitraum zeigte eine gleichmäßige und nicht signifikant unterschiedliche Perfusion. So betrug die Durchblutung beispielsweise im Gehirn zum Zeitpunkt t_1 rechts $1,11 \pm 0,31$ ml/g/min, links $1,25 \pm 0,34$, zum Zeitpunkt t_7 rechts $0,97 \pm 0,44$ ml/g/min, links $1,04 \pm 0,52$, in der Niere bei t_1 $1,33 \pm 0,21$ ml/g/min (rechts) vs. $1,53 \pm 0,23$ (links), bei t_7 $1,11 \pm 0,23$ ml/g/min (rechts) vs. $1,05 \pm 0,22$ ml/g/min (links). Bei der Peritonitisgruppe ließ sich zunächst im Rechts-Links-Vergleich zu den einzelnen Zeitpunkten eine gute Korrelation der Perfusion nachweisen, so dass die vorliegenden Werte reliabel erschienen. In der Lunge war die Durchblutung bei t_2 rechts $0,59 \pm 0,19$ ml/g/min, links $0,66 \pm 0,20$. Im Vergleich mit der Kontrollgruppe zeigte sich bei stabiler Hämodynamik ein signifikanter Abfall der Durchblutung der von dem septischen Geschehen betroffenen Organe (Niere, Leber, Magen, Lunge), welche sich zum Versuchsende nur langsam wieder erholte. Die Perfusion des Magens fiel zum Beispiel von anfänglich (t_1) $0,63 \pm 0,14$ ml/g/min

auf $0,35 \pm 0,12$ (t_3) ab. Die Muskeldurchblutung war jedoch über den gesamten Zeitraum vergleichbar (z.B. t_1 $0,04 \pm 0,01$ ml/g/min vs. t_4 $0,06 \pm 0,02$).

Die hier beschriebene Technik erlaubt somit erstmals die minimal-invasive Messung der Organperfusion beim leicht sedierten Versuchstier über mehrere Tage. Dadurch wird zum einen das bisher erforderliche erhebliche operative Trauma einer intrakardialen Injektion bzw. einer Thorakotomie vermieden und zum anderen die Notwendigkeit einer repetitiven Allgemeinanästhesie. Somit wird die Belastung für die Tiere sowie die unerwünschte Beeinflussung der Untersuchungsergebnisse durch die erwähnten Prozeduren vermindert. Die Insertion des Portkatheters unter der Aufrechterhaltung der zerebralen Perfusion trägt zur Verminderung des Risikos zerebraler Ischämien und kardiozirkulatorischer Dysregulationen bei. Die in diesem Modell notwendige Applikation von Sedativa hatte in der Kontrollgruppe per se keinen Einfluss auf die Organdurchblutung. Bei der experimentell induzierten Peritonitis fand sich eine Umverteilung der Perfusion zu Ungunsten der von der Sepsis betroffenen Organe bei stabiler Makrohämodynamik.

Die repetitive Messung des regionalen Blutflusses kann in Zukunft für chronische Untersuchungen zur Perfusionsänderung, z.B. bei der Wundheilung oder in Sepsismodellen, eingesetzt werden.

6. Literaturverzeichnis

1. Abel FL, Cooper RH, Beck RR: Use of fluorescent latex microspheres to measure coronary blood flow distribution. *Circ Shock* 41:156-161, 1993
2. AB Sangtec Medical: LIA-mat® Sangtec® 100, Immunoluminometric assay for the quantification of protein S-100B, Ref.: 344.700, Instructions for use; Version: 25.01.2001, AB Sangtec Medical, Bromma, Schweden. S.7
3. Albert RK, Lamm WJ: Left atrial pressure can be accurately transmitted to the pulmonary artery despite zone 1 conditions. *Am J Respir Crit Care Med* 167(7):1016-20, 2003
4. Anetzberger H, Thein E, Becker M, Walli AK, Messmer K: Validity of fluorescent microspheres method for bone blood flow measurement during intentional arterial hypotension. *J Appl Physiol* 10:1152, 2003
5. Archie JP, Fixler DE, Ulliyot DJ, Hoffman JIE, Utley JR, Carlson EL: Measurement of cardiac output with and organ trapping of radioactive microspheres. *J Appl Physiol* 35:148-154, 1973
6. Archie JP: Equations for the determination of major regional blood flow in the mammalian fetus with radioactive microspheres. *Cardiovasc Res* 8:81-85, 1974
7. Arruda JAL, Boonjarern S, Westenfelder C, Kurtzman NA: Measurement of renal blood flow with radioactive microspheres. *Soc Exp Biol Med* 146:263-264, 1974
8. Ashley KD, Herndon DN, Traber LD, Traber DL, Deubel-Ashley K, Stothert JC, Kramer GC: Systemic blood flow to sheep lung: comparison of flow probes and microspheres. *J Appl Physiol* 73:1996-2003, 1992

9. Ashraf S, Bhattacharya K, Tian Y, Watterson K: Cytokine and S100b levels in pediatric patients undergoing corrective cardiac surgery with or without total cardiac arrest. *Eur J Cardiothorac Surg* 16:32, 1999
10. Astiz ME, Rackow EC: Septic shock. *Lancet* 351:1501-1505, 1998
11. Audet DM, Olbricht WL: The motion of model cells at capillary bifurcations. *Microvasc Res* 33:377-396, 1987
12. Austin GE, Martino-Salzman D, Justicz AG, Brooks AC, Tuvlin MB, Hunter RL, King hompson L: Determination of regional myocardial blood flow using fluorescent microspheres. *Am J Cardiovasc Pathol* 4(4):352-357, 1993
13. Babin-Ebell J, Mishon M, Mullges W, Neukam K, Reese J, Elert O: Intraoperative embolus formation duringg cardiopulmonary bypass affects the release of S100-b. *Thorac Cardiovasc Surg* 47:166, 1999
14. Bassingthwaithe JB, Malone MA, Moffett TC, King RB, Little SE, Link JM, Krohn KA: Validity of microsphere depositions for regional myocardial flows. *J Appl Physiol* 253:H184-H193, 1987
15. Bassingthwaithe JB, Malone MA, Moffett TC, King RB, Chan IS, Link JM, Krohn KA: Molecular and particulate depositions for regional myocardial flows in sheep. *Circ Res* 66, 1328-1344, 1990
16. Baue AE, Durham RM, Mazuski JE: Clinical trials of new and novel agents. *World J Surg* 20:493-498, 1996
17. Bauer R, Walter B, Wurker E, Kluge H, Zwiener U: Coloured microsphere technique as a new method for quantitative multiple estimation of regional hepatic and portal blood flow. *Exp Toxicol Pathol* 48:415, 1996
18. Beck KC: Regional trapping of microspheres in the lung compares well with regional blood flow. *J Appl Physiol* 63:883-889, 1987

19. Bishai JM, Blood AB, Hunter CJ, Longo LD, Power GG: Fetal lamb cerebral blood flow (CBF) and oxygen tensions during hypoxia: a comparison of laser Doppler and microsphere measurements of CBF. *J Physiol* 546(3):869-878, 2003
20. Bond, JH, Levitt MD: Use of microspheres to measure small intestinal villus blood flow in the dog. *Am J Physiol* 236:E577-E583, 1979
21. Bone HG, Schenarts PJ, Fischer SR, McGuire R, Traber LD, Traber DL: Pyridoxylated hemoglobin polyoxyethylene conjugate reverses hyperdynamic circulation in septic sheep. *J Appl Physiol*, 84(6):1991-1999, 1998
22. Bone RC: Modulators of coagulation. A critical appraisal of their role in sepsis. *Arch Intern Med* 152:1381, 1992
23. Bone RC: Sepsis and coagulation: an important link. *Chest* 101:594, 1992
24. Bone RC: The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med* 115:457, 1991
25. Buckberg GD, Luck JC, Payne DB, Hoffman JIE, Archie JP, Fixler DE: Some sources of error in measuring regional blood flow with radioactive microspheres. *J Appl Physiol* 31:598, 1971
26. Buckberg GD: Studies of regional coronary flow using radioactive microspheres. *Ann Thoracic Surg* 20:46-51, 1975
27. Chien GL, Anselone CG, Davies RF, van Winkle DM: Fluorescent vs. radioactive microsphere measurement of regional myocardial blood flow. *Cardiovasc Res* 405-412, 1995
28. Consigny PM, Verrier ED, Payne BD, Edelist G, Jester J, Baer RW, Vlahakes GJ, Hoffman JIE: Acute and chronic microsphere loss from canine left ventricular myocardium. *Am J Physiol* 242:H392-H404, 1982

29. Crystal GJ, Boatwright RB, Downey HF, Bashour FA: Shunting of microspheres across the canine coronary circulation. *Am J Physiol* 236:H7-H12, 1979
30. Danetz JS, Davies RD, Clemo HF, Baumgarten CM: Rabbit ventricular myocyte volume changes as a direct result of crystalloid cardioplegia in congestive heart failure induced by aortic regurgitation. *J Thorac Cardiovasc Surg* 119:826-33, 2000
31. Degens H, Craven AJ, Jarvis JC, Salmons S: The use of colour dye-extraction microspheres to measure blood flow in rabbit skeletal muscle: A validation study with special emphasis on repeated measurements. *Exp Physiol* 81:239, 1996
32. De Jonge MK, van den Bos GC, Elzinga G: Changes of microsphere density with time in myocardial infarcts in dogs. *Bibl Anat* 15:147-150, 1977
33. De Visscher G, Haseldonckx M, Flameng W, Borgers M, Reneman RS, van Rossem K: Development of a novel fluorescent microsphere technique to combine serial cerebral blood flow measurements with histology in the rat. *J Neurosci Methods* 122(2):149-156, 2003
34. Domenech RJ, Hoffman JIE, Noble MIM, Saunders KB, Henson JR, Subijanto S: Total and regional coronary blood flow measured by radioactive microspheres in conscious and anaesthetized dogs. *Circ Res* 25:581-596, 1968
35. Dupont: Technical Data. Begleitinformation zu NEN-Trac Microspheres, Juni 1998
36. Early MC, Vogt RF, Shapiro HM, Mandy FF, Kellar KL, Bellisario R, Pass KA, Marti GE, Stewart CC, Hannon WH: Report From a Workshop on Multianalyte Microsphere Assays. *Cytometry* 50:239-242, 2002
37. Ely EW, Kleinpell RM, Goyette RE: Advances in the understanding of clinical manifestations and therapy of severe sepsis: an update for critical care nurses. *Am J Crit Care* 12(2):120-33; quiz 134-5, 2003

38. Fan FC, Schiessler GB, Chen RY, Chien S: Determinations of blood flow and shunting of 9- and 15-micrometer spheres in regional beds. *Am J Physiol* 237:H25–H33, 1979
39. Faist E, Hoffmann JN: Systemic inflammatory response syndrome (SIRS) und Sepsis, in Lippert H (ed): *Praxis der Chirurgie*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, S.231, 1998
40. Franzen D, Conway RS, Zhang H, Sonnenblick EH, Eng C: Spatial heterogeneity of local blood flow and metabolite content in dog hearts. *Am J Physiol* 254 (Heart Circ Physiol 23): H344-H353, 1988
41. Fiedler VB, Loof I, Sander E, Voehringer V, Galanos C, Fournel MA: Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha prevents lethal endotoxin sepsis in adult rhesus monkeys. *J Lab Clin Med* 120:574, 1992
42. Fink MP, Heard SO: Laboratory models of sepsis and septic shock. *J Surg Res* 49:186, 1990
43. Fish RF, Burns AH, Lang CH, Spitzer JA: Myocardial dysfunction in a nonlethal, nonshock model of chronic endotoxemia. *Circ Shock* 16:241, 1985
44. Fourrier F, Chopin C, Goudemand J, Hendrycx S, Caron C, Rime A, Marey A, Lestavel P: Septic shock, multiple organ failure and disseminated intravascular coagulation. Compared patterns of antithrombin III, protein C and protein S deficiencies. *Chest* 101:816, 1992
45. Fox GA, Lam CJ, Darragh WB, Neal AM, Inman KJ, Rutledge FS, Sibbald WJ: Circulatory sequelae of administering CPAP in hyperdynamic sepsis are time dependent. *J Appl Physiol* 81(2):976-984, 1996
46. Gelman S, Granger DN, Fowler K, Smith LR: Clearance of 9-micron spheres and rubidium in the intestinal circulation. *Am J Physiol* 247:G13-G18, 1984

47. Glenn RW, Bernard S, Brinkley M: Validation of fluorescent labeled microspheres for measurement of regional organ perfusion. *J Appl Physiol* 74:2585, 1993
48. Glenn RW: Manual for using fluorescent microspheres to measure regional organ perfusion. Manual for the 2nd European workshop on the fluorescent microsphere method, 42, ICF, 1995
49. Glenn RW: Measuring regional organ blood flow with microspheres. <http://fmrc.pulmcc.washington.edu>, 1996
50. Glusa E: Vascular effects of thrombin. *Semin Thromb Hemost* 18:296, 1992
51. Granger DN, Kubes P: The microcirculation and inflammation: Modulation of leucocyte-endothelial cell interaction. *J Leucoc Biol* 55:662, 1994
52. Greenfield SP, Lewis W, Perry B, Wan J, Morrin F: Regional renal blood flow measurements using radioactive microspheres in a chronic porcine model with unilateral vesicoureteral reflux. *J Urol* 154:816-819, 1995
53. Greenway CC, Murthy VS: Effects of vasopressin and isoprenaline infusion on the distribution of blood flow in the intestine: criteria for the validity of microsphere studies. *Br J Pharmacol* 46:177-188, 1972
54. Hale SL, Alker KJ, Kloner RA: Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation* 78:428-434, 1988
55. Hales JR, King RB, Fawcett AA: Observations on the validity of using "NEN-TRAC" microspheres for measuring organ blood flow. *Pflügers Arch* 379:295-296, 1979
56. Harper PL: The clinical use of antithrombin concentrate in septicaemia. *Br J Hosp Med* 1995;52:571-574

57. Hecht R: Manual for blood flow measurements. 2nd European workshop on the fluorescent microsphere method, 1-11, ICF, 1995
58. Hoffmann JN, Faist E: Neue Therapieansätze bei der Sepsis, in Bünthe H, Junginger T (eds): Jahrbuch der Chirurgie 1996, Zülpich, Biermann Verlag, S.101, 1996
59. Hoffmann JN, Hartl WH, Deppisch R, Faist E, Jochum M, Inthorn D: Hemofiltration in human sepsis: evidence for elimination of immunomodulatory substances. *Kidney Int* 48:1563, 1995
60. Hoffmann JN, Steinhagen S, Inthorn D, Schildberg FW, Nolte D: Repetitive Messung der Organperfusion mittels Mikrosphären: Minimal-invasive Technik unter Verwendung arterieller Ports. *Intensivmedizin und Notfallmedizin* 37 Suppl 2, 2000
61. Hoffmann JN, Steinhagen S, Inthorn D, et al: Chronic left heart catheterization for microvascular blood flow determination in the rabbit: A minimally invasive technique using specially designed port devices. *J Surg Res* 102 (2): 119-125, 2002
62. Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD: A chronic model for intravital microscopic study of microcirculatory disorders and leukocyte/endothelial cell interaction during normotensive endotoxemia. *Shock*;12 (5):355-364, 1999
63. Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD: Antithrombin prevents endotoxin-induced leukocyte/endothelial cell interaction and microvascular perfusion failure: involvement of the cyclooxygenase pathway. *Am J Physiol* 279:C98-107, 2000
64. Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD: Antithrombin - Mehr als ein Thrombininhibitor. *J Anäst Intensivbehand*;1:67-68, 2000

65. Hoffmann JN, Vollmar B, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD: The thrombin antagonist hirudin fails to inhibit endotoxin-induced leukocyte/endothelial cell interaction and microvascular perfusion failure. *Shock* 14:528-34, 2000
66. Hoffmann JN, Werdan K, Hartl WH, Jochum M, Faist E, Inthorn D: Hemofiltrate from patients with severe sepsis and depressed left ventricular contractility contains cardiotoxic compounds. *Shock* 12:174-180, 1999
67. Hübler M, Souders JE, Shade ED, Hlastala MP, Polissar NL, Glenny RW: Validation of fluorescent-labeled microspheres for measurement of relative blood flow in severely injured lungs. *J Appl Physiol* 87(6):2381-2385, 1999
68. Inthorn D, Hoffmann JN, Hartl WH, Mühlbayer D, Jochum M: Effect of antithrombin III supplementation on inflammatory response in patients with severe sepsis. *Shock* 10:90-96, 1998
69. Jaschke WR, Cogan MG, Sievers R, Gould R, Lipton MJ: Cine-CT measurement of cortical renal blood flow. *J Comput Assist Tomogr*;11:779-784, 1987
70. John E, McDevitt M, Cassady G: Cardiac Output and Organ Blood Flow in Young Rabbits during Intermittent Positive-Pressure Ventilation, *Biol Neonate* 44:58-64, 1983
71. Kaihara S, van Heerden PD, Migita T, Wagner HN: Measurement of distribution of cardiac output. *J Appl Physiol* 25:696-700, 1968
72. Kleen M, Zwissler B, Schosser R, Messmer K: Determination of regional pulmonary blood flow with systematically injected nonentrapped microspheres. *J Appl Physiol* 81:695-705, 1996
73. Klemm K, Moody FG: Regional intestinal blood flow and nitric oxide synthase inhibition during sepsis in the rat. *Ann Surg* 227:126-133, 1998

74. Kreimeier U, Ruiz-Morales M, Messmer K: Comparison of the effects of volume resuscitation with dextran 60 vs. Ringer's lactate on central hemodynamics, regional blood flow, pulmonary function, and blood composition during hyperdynamic endotoxemia. *Circ Shock* 39:89-99, 1993
75. Kobayashi N, Kobayashi K, Kouno K, Horinaka S, Yagi S: Effects of intra-atrial injection of colored microspheres on systemic hemodynamics and regional blood flow in rats. *Am J Physiol* 266:H1910-H1917, 1994
76. Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Pfaffhausen W, Gross R, Heusch G: Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation* 83:974-982, 1991
77. Lameire NH, Ringoirs S, Lensen I, Stein JH: The validity of the radioactive microsphere method (RM) for the measurement of intrarenal blood flow distribution. *Bibl Anat* 44:60-65. 1977
78. Lamy M, Deby-Dupont G: Is sepsis a mediator-inhibitor mismatch? *Intensive Care Med* 21:S250, 1995
79. Law WR, Mourelatos MG, Krahmer R, Dziki AJ, Lynch WH, Ferguson JL: Effects of phentolamine or yohimbine on naloxone's actions during endotoxin shock in rats. *Shock* 7:217-224, 1997
80. Lerman LO, Flickinger AL, Sheedy PF, Turner ST: Reproducibility of human kidney perfusion and volume determinations with electron beam computed tomography. *Invest Radiol*;31:204-210, 1996
81. Levi M, ten Cate H, van der Poll T, van Deventer SJ: Pathogenesis of disseminated intravascular coagulation in sepsis. *JAMA* 270:975, 1993
82. Lo SK, Lai L, Cooper JA, Malik AB: Thrombin-induced generation of neutrophil activating factors in blood. *Am J Pathol* 102:22, 1988

83. Lowry SF: Cytokine mediators of immunity and inflammation. *Arch Surg* 128:1235, 1993
84. Magovern JA, Christlieb IY, Badylak SF, Lantz GC, Kao RL: A model of left ventricular dysfunction caused by intracoronary adriamycin. *Ann Thorac Surg* 53:861, 1992
85. Mai VM, Hagspiel KD, Altes T, Goode AR, Williams MB, Berr SS: Detection of Regional Pulmonary Perfusion Deficit of the Occluded Lung Using Arterial Spin Labeling in Magnetic Resonance Imaging, *Magn Resn Imaging* 11:97-102, 2000
86. Marshall JC: Such stuff as dreams are made on: mediator-directed therapy in sepsis. *Nat Rev Drug Discov* 2(5):391-405, 2003
87. Marshall WG, Boatman GB, Dickerson G, Perlin A, Todd EP, Utley JR: Shunting, release and distribution of nine and fifteen micron spheres in myocardium. *Surgery* 79:631-637, 1976
88. Martin CM, Sibbald WJ: Modulation of hemodynamics and organ blood flow by nitric oxide synthase inhibition is not altered in normotensive, septic rats. *Am J Respir Crit Care Med*, 150:1539-1544, 1994
89. Martins GA, Da Gloria Da Costa Carvalho M, Rocha Gattass C: Sepsis: A follow-up of cytokine production in different phases of septic patients. *Int J Mol Med* 11(5):585-91, 2003
90. Matsumoto MK, Kimura A, Fujisawa A, Matsuyama T, Asai T, Uyama O, Yoneda S, Abe H: Regional blood flows measured in Mongolian gerbil by a modified microsphere method. *Am J Physiol* 242:H990-H995, 1982
91. McDevitt DG, Nies AS: Simultaneous measurement of cardiac output and its distribution with microspheres in the rat. *Card Res* 10:494-498, 1976

92. Menger MD, Vollmar B, Messmer K: Sepsis and nutritional blood flow. Aus: Reinhart K, Eyrich K, Sprung C (Hrsg.): Sepsis: Current Perspectives in Pathophysiology and Therapy. Springer Verlag, Berlin 163-173, 1996
93. Messmer K: Radioactive microspheres for regional blood flow measurements. Actual state and perspectives. 10th Europ Conf Cagliari, Bibl Anat 18:194-197, 1979
94. Meyer J, Hinder F, Stothert JR, Traber LD, Herndon DN, Flynn JT, Traber DL: Increased organ blood flow in chronic endotoxemia is reversed by nitric oxide synthase inhibition. J Appl Physiol 76(6):2785-2793, 1994
95. Molecular Probes. Fluospheres ® Fluorescent microspheres for blood flow determination. MP, Begleitinformationen zu fluoreszierenden Mikrosphären, 2002
96. Motew SJ, Mourelatos MG, Miller RN, Ferguson JL, Law WR: Evidence that adenosine contributes to maintenance of hepatosplanchnic blood flow during peritoneal sepsis in rats. Shock, 7:439-446, 1997
97. Motew SJ, Sam II AD, Mourelatos MG, Sharma AC, Alden KJ, Ferguson JL, Law WR: Adenosine receptor antagonism affects regional resting vascular resistance during rat peritoneal sepsis. J Surg Res 80:326-332, 1998
98. Mulder MF, van Lambalgen AA, van den Bos GC, Thijs LG: The fall of cardiac output in endotoxemic rats cannot explain all changes in organ blood flow: a comparison between endotoxin and low venous return shock. Shock 5:135-140, 1996
99. Neutze JM, Wyler F, Rudolph AM: Use of radioactive microspheres to assess distribution of cardiac output in rabbits. Am J Physiol 215:486-495, 1968
100. Nolte D, Raab S, Thein E, Draenert K, Ehrenfeld M, Messmer K: Ein neues experimentelles Modell zur repetitiven Messung der splanchnischen Perfusion. Mund-Kiefer-Gesichtschir. ;Suppl. 1:S147-S150, 1999

101. Opal SM: Clinical trials for novel therapeutic agents: Why did they fail? in Vincent J-L (ed): Yearbook of intensive care and emergency medicine 1995, Berlin, Heidelberg, New York, Springer Verlag, 1995, p 425
102. Parillo JE: Pathogenetic mechanisms of septic shock. N Engl J Med 328:1471, 1993
103. Phibbs RH, Wyler F, Neutze J: Rheology of microspheres injected into circulation of rabbits. Nature 216:1339, 1967
104. Polissar NL, Stanford DC, Glenn RW: The 400 microsphere per piece "rule" does not apply to all blood flow studies. Am J Physiol Heart Circ Physiol 278:H16-25, 2000
105. Prinzen FW, Glenn RW: Developments in non-radioactive microsphere techniques for blood flow measurement. Cardiovasc Res;28(10):1467-1475, 1994
106. Prinzen FW, Bassingthwaite JB: Blood flow distribution by microsphere deposition methods. Cardiovasc Res 45:13-21, 2000
107. Raab S, Thein E, Harris AG, Kleen M, Habler O, Meisner F, Pape A, Messmer K: Validierung eines Filtrationsgefäßes, um den regionalen Blutfluss des Herzens mittels fluoreszierender Mikrosphären zu bestimmen. Biomed Tech 43, 538-539, 1998
108. Raab S, Thein E, Harris G, Messmer K: A new sample-processing unit for the fluorescent microsphere method. Am J Physiol 276:H1801-H1806, 1999
109. Redl H, Schlag G, Bahrami S, Yao YM: Animal models as the basis of pharmacologic intervention in trauma and sepsis patients. World J Surg 20:487, 1996

110. Reeves PT, Minchin RF, Ilett KF: Measurement of Organ Blood Flow in the Rabbit. *J Pharmacol Methods* 20(3):187-196, 1988
111. Reffelmann T, Kloner RA: Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit. *Am J Physiol* 283:H1099-H1107, 2002
112. Renemann RS, Verheyen SA, van Greven W, Stijnen L, Jagenau AHM: The importance of size and diameter distribution of the microspheres for accurate determination of regional myocardial blood flow (MBF). *Bibl Anat* 15:30-34, 1977
113. Roman J, Velasco F, Fernandez F, Fernandez M, Villalba R, Rubio V, Vicente A, Torres A: Coagulation, fibrinolytic and kallikrein systems in neonates with uncomplicated sepsis and septic shock. *Haemostasis* 23:142, 1993
114. Rudolph AM, Heyman MA: 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, 1967
115. Sakurai H, Traber LD; Traber DL: Altered systemic organ blood flow after combined injury with burn and smoke inhalation. *Shock* 9(5):369-374, 1998
116. Schmidt-Schönbein GW, Salaki R, Usami S, Chien S: Cell distribution in capillary networks. *Microvasc Res* 19:18-44, 1980 (I)
117. Schmidt-Schönbein GW, Usami S, Salaki R, Chien S: The interaction of leukocytes and erythrocytes in capillary and postcapillary vessels. *Microvasc Res* 19:45-70, 1980 (II)
118. Schosser R, Arfors KE, Messmer K: MIC-II – a program for the determination of cardiac output, arterio-venous shunt and regional blood flow using the radioactive microsphere method. *Comp Prog Biomed Res* 9:19-38, 1979

119. Schosser R, Arfors KE, Messmer K: Data reduction in multiple flow measurements using the radioactive microsphere-technique. 10th Europ Conf, Cagliari, Bibl Anat 18:198-200, 1979
120. Schrock GD, Krahmer RL, Ferguson JL: Coronary flow by left atrial and left ventricular microsphere injection in the rat. Am J Physiol 259:H635-H638, 1990
121. Seiffge D, Kremer E: Effects of different mediators or cytokines and monoclonal antibodies to adhesion molecules on leucocyte adhesion in rat mesenteric venules. Int J Microcirc 15:301, 1995
122. Selwyn AP, Shea MJ, Foale R, Deanfield JE, Wilson R, de Landsheere CM, Turton DL, Brady F, Pike VW, Brookes DI: Regional myocardial and organ blood flow after myocardial infarction: application of the microsphere principle in man. Circ Res 73:433-443, 1986
123. Sharma VK, Dellinger RP: Recent developments in the treatment of sepsis. Expert Opin Investig Drugs 12(2):139-52, 2003
124. Sharma S, Kumar A: Septic shock, multiple organ failure, and acute respiratory distress syndrome. Curr Opin Pulm Med 9(3):199-209, 2003
125. Snyder DS, Harasawa Y, Sagawa K, Hunter WC: Effect of pentobarbital on the inotropic state of isolated canine left ventricle. Hearts Vessels 8:128, 1993
126. Sommers MS: The cellular basis of septic shock. Crit Care Nurs Clin North Am, 15(1):13-25, 2003
127. Starck, D.: Vergleichende Anatomie der Wirbeltiere: auf evolutionsbiolog. Grundlage, Bd. 3, S. 1035, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York, 1982
128. Steinhagen S, Hoffmann JN, Inthorn D, et al: Introduction of a new minimally invasive model for the repetitive measurement of organ perfusion in rabbits. Chirurgisches Forum 29:569-572, 2000

129. Storck M, Hartl WH, Inthorn D: Comparison of pump-driven and spontaneous continuous hemofiltration in postoperative acute renal failure. *Lancet* 337:452, 1991
130. Sutcliff RL, Gayheart-Walsten PA, Snyder DL, Roberts J, Johnson MD: Cardiovascular effects of acute and chronic cocaine administration in pregnant and nonpregnant rabbits. *Toxicol Appl Pharmacol* 158:278, 1999
131. Tanaka T, Tsujinaka T, Kambayashi J, Higashiyama M, Sakon M, Mori T: Sepsis model with reproducible manifestations of multiple organ failure (MOF) and disseminated intravascular coagulation (DIC). *Thromb Res* 54:53, 1989
132. Tetta C, Bellomo R, Ronco C: Artificial Organ Treatment for Multiple Organ Failure, Acute Renal Failure, and Sepsis: Recent New Trends. *Artificial Organs*, 27(3):202, 2003
133. Thein E, Raab S, Harris AG, Kleen M, Habler O, Meisner F, Pape A, Messmer K: Validierung eines Roboters für die Bestimmung der regionalen Perfusion mittels fluoreszierender Mikrosphären. *Biomed Tech* 43:536-537, 1998
134. Thein E: Bestimmung der regionalen Organdurchblutung mit Hilfe fluoreszierender Mikrosphären. Modifikation, Verbesserung und vollständige Automatisierung der bestehenden Methode. Dissertation am Institut für Chirurgische Forschung der medizinischen Fakultät der LMU München, 1999
135. Thein E, Raab S, Harris AG, Kleen M, Habler O, Meisner F, Messmer K: Comparison of Regional Blood Flow Values Measured by Radioactive and Fluorescent Microspheres. *Eur J Surg Res* 34:215-223, 2002
136. Utey JR, Carlson EL, Hoffman JIE, Martinez HM, Buckberg GD: Total and regional myocardial blood flow measurements with 25 μm , 15 μm , 9 μm and filtered 1 – 10 μm diameter microspheres and antipyrone in dogs and sheep. *Circ Res* 34:391-405, 1974

137. Uitley JR, Marshall WG, Boatman GB, Dickerson G, Ernst CB, Daugherty ME: Trapping, nontrapping and release of nine and fifteen micron spheres in dog kidneys. *Surgery* 87:222-229, 1980
138. Vallet B: Bench-to-bedside review: Endothelial cell dysfunction in severe sepsis: a role in organ dysfunction? *Critical Care* 7(2):130-138, 2003
139. van der Poll T, Levi M, Hack CE, ten Cate H, van Deventer SJ, Eerenberg AJ, de Groot ER, Jansen J, Gallati H, Buller HR, et al: Elimination of Interleukin 6 attenuates coagulation activation in experimental endotoxemia in chimpanzees. *J Exp Med* 179:1253, 1994
140. van der Poll T, Levi M, van Deventer SJ, ten Cate H, Haagsmans BL, Biemond BJ, Buller HR, Hack CE, ten Cate JW: Different effects of anti-tumor necrosis factor monoclonal antibodies on systemic inflammatory responses in experimental endotoxemia in chimpanzees. *Blood* 83:446, 1994
141. van Oosterhout MFM, Willigers HMM, Reneman RS, Prinzen FW: Fluorescent microspheres to measure organ perfusion: validation of a simplified sample processing technique. *Am J Physiol* 169:H725-H733, 1995
142. van Oosterhout MFM, Prinzen FW, Sakurada S, Glenn RW, Hales JRS: Fluorescent microspheres are superior to radioactive microspheres in chronic blood flow measurements. *Am J Physiol*;275:H110-H115, 1998
143. van Oosterhout MFM, Arts T, Bassingthwaite JB, Reneman RS, Prinzen FW: Relation between local myocardial growth and blood flow during chronic ventricular pacing. *Cardiovasc Res* 53:831-840, 2002
144. Vollmar B, Corleta O, Habazettl H, Kreimeier U, Menger MD: Delay phenomenon of the jejunum. Studies of nutritional blood supply and oxygen supply of the jejunum in the rabbit. *Zentralbl Chir* 117:495, 1992

145. Wagner HN, Rhodes BA, Sasaki Y, Ryan JP: Studies of the circulation with radioactive microspheres. *Invest Radiol* 4:374-386, 1969
146. Walvatne CS, Johnson AS, Wojcik LJ, Cerra FB: Cardiovascular response to acute and chronic endotoxemia in awake, volume-resuscitated canine model. *Shock* 3:301, 1995
147. Wang P, Ba ZF, Chaudry IH: Increase of hepatic blood flow during early sepsis is due to increased portal blood flow. *Am J Physiol* 261:R1507-1512, 1991
148. Wang Q, Santizo R, Baughman VL, Pelligrino DA: Estrogen provides neuroprotection in transient forebrain ischemia through perfusion-independent mechanisms in rats. *Stroke*, 30:630-637, 1999
149. Warren DJ, Ledingham JGG: Measurement of intrarenal blood-flow distribution in the rabbit using radioactive microspheres. *Clin Scien Mol Med* 48:51-60, 1975
150. Warren DJ, Ledingham JGG: Renal circulatory response to general anaesthesia in the rabbit: studies using radioactive microspheres. *Clin Scien Mol Med* 48:61-67, 1975
151. Weigand MA, Bardenheuer HJ, Bottiger BW: Klinisches Management bei Patienten mit Sepsis. *Anaesthesist* 52:3-22, 2003
152. Wheeler AP, Bernard GR: Treating patients with severe sepsis. *N Engl J Med*;340:207-214, 1999
153. Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH: Sepsis and septic shock – A review of laboratory models and a proposal. *J Surg Res* 29:189, 1980
154. Yang S, Cioffi WG, Bland KI, Chaudry IH, Wang P: Differential alterations in systemic and regional oxygen delivery and consumption during the early and late stages of sepsis. *J Trauma* 47:706, 1999

155. Yang S, Zhou M, Koo DJ, Chaudry IH, Wang P: Pentoxifylline prevents the transition from the hyperdynamic to hypodynamic response during sepsis. *Am J Physiol* 277:H1036-H1044, 1999
156. Yipintsoi T, Dobbs WA, Scanlon PD, Knopp TJ, Bassingwaithe JB: Regional distribution of diffusible tracers and carbonized microspheres in the left ventricle of isolated dog hearts. *Circ Res* 33:573-587, 1973
157. Zhang P, Bagby GJ, Stoltz DA, Summer WR, Nelson S: Enhancement of peritoneal leukocyte function by granulocyte colony-stimulating factor in rats with abdominal sepsis. *Crit Care Med*, 26:315, 1998
158. Zwissler B, Schosser R, Weiss C, Iber V, Weiss M, Schwickert C, Spengler P, Messmer K: Methodological error and spatial variability of organ blood flow measurements using radiolabeled microspheres. *Res Exp Med* 191:47-63, 1991

7. Danksagung

Herrn PD Dr. med. J. N. Hoffmann danke ich für die Überlassung des interessanten Themas, die Unterstützung und Zusammenarbeit im Labor und während der Auswertungen, für die stete Diskussionsbereitschaft, die vielen Anregungen, Ideen und Denkanstöße, die Geduld und die kritische Durchsicht der Manuskripte sowie für alles, was ich während dieser Arbeit über Sepsis, Mikrosphären und vor allem wissenschaftliches Arbeiten gelernt habe.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn PD Dr. med. Dirk Nolte, Herrn Dr. med. Stefan Raab und Frau Dr. med. dent. Christina Kast für die hervorragende Zusammenarbeit während der Versuche.

Frau Prof. Dr. M. Jochum und Frau Dr. rer. nat. Cornelia Gippner-Steppert danke ich herzlich für die Bearbeitung der Serumproben und die Bestimmung der S100-b-Konzentration.

Herrn Dr. med. vet. Eckart Thein und dem Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München danke ich für die Bearbeitung der Gewebeproben.

Frau Grau danke ich für die detailgetreuen Zeichnungen, die auch in dieser Arbeit freundlicherweise verwendet werden durften.

Ich danke darüber hinaus dem Tierlabor der Chirurgischen Klinik Innenstadt der Ludwig-Maximilians-Universität München, in dem die Versuche durchgeführt wurden, für die Bereitstellung der Räumlichkeiten und eines Teils der technischen Ausrüstung. Besonderer Dank gilt Herrn Dr. med. vet. H. Scheuber für die Unterstützung und Beratung sowie den Tierpflegern für ihre Bemühungen.

8. Lebenslauf

Sonja Steinhagen

geb. am 16.10.74 in Aachen

Eltern:

Dr. ing. Wolfgang Steinhagen, geb. am 28.10.1944, Entwicklungsingenieur

Renate Steinhagen, geb. Specht, geb. am 11.08.1948, MTRA

Schulbildung

Sept. 1980 – Juli 1984	Grundschule Mauern
Sept. 1984 – Juli 1993	Karl-Ritter-von-Frisch-Gymnasium Moosburg
09.07.1993	Abitur

Studium

Nov. 1994 – Okt. 1996	Studium der Biologie an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
April 1996 – März 1998	Studium der Humanmedizin – Vorklinik – an der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
31.03.1998	Ärztliche Vorprüfung
April 1998 – Dez. 2002	Studium der Humanmedizin – Klinik – an der Ludwig-Maximilians-Universität München
23.03.1999	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
09.04.2001	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Okt. 2001 – Sept. 2002	Praktisches Jahr: Chirurgie: Städt. Krankenhaus München Harlaching Innere Medizin: Städt. Krankenhaus München Harlaching Anästhesiologie: Klinikum Großhadern, München
31.10.2002	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

