



INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

FRAUKE OHNSMANN-BISCHOFF

**EINFLUSS VON EXOGEN SUBSTITUIERTEM
STICKSTOFFMONOXID AUF SCHOCKINDUZIERTEN
HEPATISCHEN MIKROZIRKULATIONSTÖRUNGEN
NACH HÄMORRHAGISCHEN SCHOCK**

Intravitalmikroskopische Studie an Ratten

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung des Autors oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2006

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Author or the Publishers.

1st Edition 2006

© 2006 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, WETTENBERG
Printed in Germany



VVB LAUFERSWEILER VERLAG
édition scientifique

GLEIBERGER WEG 4, D-35435 WETTENBERG
Tel: 06406-4413 Fax: 06406-72757
Email: VVB-IPS@T-ONLINE.DE

www.doktorverlag.de

Aus der Klinik für Anästhesiologie, Intensivmedizin und Schmerztherapie der
Universitätskliniken des Saarlandes

Betreuer: PD Dr. med. Clemens Bauer

Eingereicht über das Institut für Veterinärpathologie der
Justus-Liebig-Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. med. vet. Dirk Seiffge

**EINFLUSS VON EXOGEN SUBSTITUIERTEM
STICKSTOFFMONOXID AUF SCHOCKINDUZIERTE
HEPATISCHE MIKROZIRKULATIONSSTÖRUNGEN
NACH HÄMORRHAGISCHEM SCHOCK -
INTRAVITALMIKROSKOPISCHE STUDIE AN RATTEN**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Doktorgrades beim
Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

FRAUKE OHNSMANN-BISCHOFF

Tierärztin aus Mannheim (Baden-Württemberg)

Gießen 2006

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Manfred Reinacher

1. Berichterstatter: PD Dr. Clemens Bauer

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Dirk Seiffge

Tag der mündlichen Prüfung: 01.02.2006

Gras wächst auch nicht schneller,
wenn man daran zieht.
(aus Afrika)

Meinen Eltern,
Ivo
und den Tieren

Inhaltsverzeichnis

1. Abkürzungsverzeichnis.....	IX
2. Abbildungsverzeichnis.....	XI
3. Tabellenverzeichnis.....	XII
<u>I. Einleitung.....</u>	1
<u>II. Literaturüberblick.....</u>	3
1. Spezielle Pathophysiologie des Schocks.....	3
1.1 Pathogenetische Grundmechanismen des hämorrhagischen Schocks.....	3
1.2 Ischämie und Reperfusionssyndrom als Ausgangspunkt von SIRS.....	4
1.2.1 Allgemeine Pathophysiologie der Ischämie.....	4
1.2.2 Reperfusion und Reperfusionsschaden.....	5
1.2.3 Leukozyten/Endothelinteraktionen.....	7
2. Störungen der Organfunktionen durch SIRS im hämorrhagischen Schock.....	9
2.1 Die Rolle der Leber im Schock.....	9
2.1.1 Besonderheit der hepatischen Mikrozirkulation.....	10
2.1.2 Die hepatische Mikrozirkulation im hämorrhagischen Schock.....	10
2.1.3 Manifestation der Leberzellschädigung.....	11
2.2 Die Folgen für den Gesamtorganismus.....	12
3. Vasoaktive Mediatoren und ihre Bedeutung im hämorrhagischen Schock.....	13
3.1 Endothelin (ET).....	14
3.2 Kohlenmonoxid (CO).....	15
3.3 Stickstoffmonoxid (NO).....	15
3.3.1 Wirkungsmechanismus von NO.....	16
3.3.2 Bildung von NO.....	17
3.3.2.1 Stimulation der Bildung von NO.....	17
3.3.2.2 Einfluss der NO-Synthetasen (NOS) bei der Bildung von NO.....	17
3.3.2.2.1 Die neuronale/Gehirn-NO-Synthetase (b-NOS = Typ 1).....	18
3.3.2.2.2 Die induzierbare/Makrophagen-NO-Synthetase (i-NOS = Typ 2).....	18
3.3.2.2.3 Die konstitutive/Endothelzellen-NO-Synthetase (ec-NOS = Typ 3).....	20
3.3.3 Folgen der exzessiven Produktion von NO.....	21
3.3.3.1 Bildung von Peroxinitrit im hämorrhagischen Schock.....	21
3.3.3.2 Auswirkungen von Peroxinitrit auf den Organismus.....	22
3.3.4 Exogene Regulation der NO-Menge im hämorrhagischen Schock.....	23
3.3.4.1 Blockade der NO-Synthetasen.....	23
3.3.4.1.1 Unselektive Blockade der NO-Synthetasen.....	23
3.3.4.1.2 Selektive Blockade der ec-NOS.....	22

3.3.4.1.3 Selektive Blockade der i-NOS	25
3.3.4.2 Stimulation der NO-Produktion	27
4. Fragestellung.....	29
III. Material und Methoden	31
1. Versuchsvorbereitung	31
1.1 Versuchstiere	31
1.2 Anästhesie	31
1.3 Präparation der Tiere.....	32
1.3.1 Präparation der 5h Tiere.....	32
1.3.2 Präparation der 24h Tiere.....	34
1.4 Testsubstanzen	35
1.4.1 S-NO-HSA (Medikament)	35
1.4.2 HSA (Placebo)	35
1.5 Versuchsgruppen.....	36
2. Versuchsdurchführung.....	36
2.1 Phase des hämorrhagischen Schocks	37
2.2 Phase der Reperfusion.....	37
2.3 Monitoring.....	38
2.3.1 Mittlerer Arterieller Blutdruck (MABD)	39
2.3.2 Herzfrequenz (HF)	39
2.3.3 Körpertemperatur (T)	39
2.3.4 Herzzeitvolumen (HZV)	39
2.3.5 Zentraler Venendruck (ZVD).....	40
2.4 Blutprobenentnahmen zur Blutgasanalyse	40
2.5 Zeitprofile zum Versuchsaufbau	42
3. Intravitalmikroskopie.....	45
3.1 Technik der Laparatomie	46
3.2 Durchführung der Mikroskopie.....	47
3.2.1 Mikroskop	48
3.2.2 Videoeinheit	49
3.2.3 Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe	49
3.2.3.1 Anfärbung der Erythrozyten mit Fluoresceinisothiocyanat	49
3.2.3.2 Anfärbung der Leukozyten mit Acridine Orange	49
3.2.4 Beobachtungsabläufe zur Videodokumentation.....	50
3.2.4.1 Erythrozytengeschwindigkeit.....	50
3.2.4.2 Leukozytengeschwindigkeit und Leukozyten-Endothel-Interaktionen.....	51
3.2.4.3 Anzahl der Sinusoide/nicht perfundierten Sinusoide	52

3.2.4.4 Sinusoidweiten	52
4. Auswertung	52
4.1 Computergestütztes Bildanalysesystem	52
4.2 Mikrozirkulation der Leber	53
4.2.1 Bestimmung der sinusoidalen Erythrozytengeschwindigkeit	53
4.2.2 Bestimmung der sinusoidalen Leukozytengeschwindigkeit	53
4.2.3 Bestimmung des Geschwindigkeitsquotienten	53
4.2.4 Messung der Sinusoidweiten	54
4.2.5 Bestimmung des sinusoidalen Blutflusses	54
4.3 Leukozyten-Endothel-Interaktionen in der Leber	55
4.3.1 Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten	55
4.3.2 Anzahl der permanent adhärenenten Leukozyten	56
4.3.3 Anzahl der Sinusoide/nicht-perfundierten Sinusoide	56
5. Statistik	57
<u>IV. Ergebnisse</u>	59
1. Makrohämodynamische Parameter und Ergebnisse der Laboruntersuchungen	59
1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD)	59
1.2 Herzfrequenz (HF)	61
1.3 Herzzeitvolumen (HZV)	62
1.4 Zentraler Venendruck (ZV)	63
1.5 Säure-Basen-Haushalt	64
1.5.1 pH-Wert	64
1.5.2 Basenabweichung (BE, base excess)	66
1.6 Parameter der respiratorischen Funktion	67
1.6.1 CO ₂ -Partialdruck (pCO ₂)	67
1.6.2 O ₂ -Partialdruck (pO ₂)	69
1.7 Blutbildveränderungen	70
1.7.1 Hämatokrit (Hk)	70
1.7.2 Hämoglobin (Hb)	72
2. Ergebnisse der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie	73
2.1 Mikrozirkulation	74
2.1.1 Intrasinusoidale Erythrozytengeschwindigkeit	74
2.1.2 Intrasinusoidale Leukozytengeschwindigkeit	75
2.1.3 Geschwindigkeitsquotient	76
2.1.4 Sinusoidweiten	77
2.1.5 Sinusoidaler Blutfluss	78
2.1.5.1 Fluss der Erythrozyten	78

2.1.5.2 Fluss der Leukozyten	80
2.1.6 Perfusionsrate hepatischer Sinusoide	81
2.2 Beurteilung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen	82
2.2.1 Temporär adhärenente Leukozyten	82
2.2.2 Permanent adhärenente Leukozyten	84
<u>V. Diskussion</u>	87
1. Kritische Bemerkungen zur Methode	87
1.1 Einfluss von Narkosemittel und Präparation	88
1.2 Einfluss der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe	88
2. Makrohämodynamik und Laborparameter	89
2.1 Auswirkungen von S-NO-HSA auf die Makrohämodynamik	89
2.2 Auswirkungen von S-NO-HSA auf die Laborparameter	90
3. Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothelinteraktionen der Leber	91
3.1 Auswirkungen von S-NO-HSA auf die Mikrozirkulation der Leber	91
3.2 Auswirkungen von S-NO-HSA auf die Leukozyten/Endothelinteraktionen in der Leber ...	93
3.2.1 Einfluss von S-NO-HSA auf die temporäre Leukozytenadhärenenz in der Leber	93
3.2.2 Einfluss von S-NO-HSA auf die permanente Leukozytenadhärenenz in der Leber	94
4. Schlussfolgerung	95
<u>VI. Zusammenfassung</u>	97
<u>VII. Summary</u>	99
<u>VIII. Literaturverzeichnis</u>	XIII

1. Abkürzungsverzeichnis

A	Arteria
ADP	Adenosindiphosphat
ATP	Adenosintriphosphat
AMP	Adenosinmonophosphat
ANOVA	Analysis of variance
BE	base excess (Basenabweichung), [mmol/l]
BGA	Blutgasanalyse
bNOS	neuronale/Gehirn-NO-Synthetase
CO	Kohlenmonoxid
CoA	Coenzym A
EAE	allergische Encephalomyelitis
ecNOS	konstitutive/Endothelzellen-NO-Synthetase
EDRF	endothel derived relaxing factor
ELAM	endothelial leukocyte adhesion molecule
ET	Endothelin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
GMP	Guanosinmonophosphat
GTP	Guanosintriphosphat
HB	Hämoglobin, [g/dl]
Hct	Hämatokrit, [%]
HF	Herzfrequenz, [l/min]
HO	Hämoxigenase
HSA	Humanserumalbumin
HSP-32	Hitzeschockprotein 32
HZV	Herzzeitvolumen, [ml/min]
ICAM	intercellular adhesion molecule
IF γ	Interferon γ
IL	Interleukin
iNOS	induzierbare/Makrophagen-NO-Synthetase
Lig	Ligamenta
LNAME	N ^G -Nitro-L-Arginin
L-NIL	N ⁶ -iminoethyl-L-lysin
LNMA	N ^G -Methyl-L-Arginin
L-NOARG	N(Omega)-Nitro-L-Arginin
M	Musculus
MABD	mittlerer arterieller Blutdruck, [mmHg]
MAG	Mercaptoalkylguanidin
MEG	Mercaptoethylguanidin
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
N	Nervus
NADP	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthetasen
OH	Hydroxylradikal
paCO ₂	Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck, [mmHg]
PAF	Plättchenaktivierungsfaktor
paO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck, [mmHg]
PG	Prostaglandin
RES	Retikuloendotheliales System

ROS	reaktive Sauerstoffspezies
Sham	<u>scheinoperierte</u> Tiere (Kontrollgruppe)
SIN-1	Sydnonimine
SIRS	systemic inflammatory response syndrom
SNAP	S-Nitroso-N-acetylpenicillamin
S-NO-HSA	S-Nitroso-Humanserumalbumin
SOD	Superoxiddismutase
T	Körpertemperatur, [°C]
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
V	Vena
ZVD	Zentraler Venedruck, [mmHg]

2. Abbildungsverzeichnis

Abb. II.1	Bildungswege für freie O ₂ -Radikale über die Xanthinoxidase (endothelial) (ergänzt nach Granger 1986 und 1988).....	6
Abb. II.2	Mechanismus der NO-Entstehung.....	18
Abb. III.1	Arterielle und venöse Zugänge der präparierten Ratten.....	35
Abb. III.2	S-NO-HSA 5h-Gruppe bzw. HSA (Placebo) 5h-Gruppe	42
Abb. III.3	S-NO-HSA 24h-Gruppe bzw. HSA (Placebo) 24h-Gruppe	43
Abb. III.4	Sham-Kontrollgruppe 5h.....	44
Abb. III.5	Sham-Kontrollgruppe 24h.....	45
Abb. III.6	Laparotomierte Ratte in Linksseitenlage.....	47
Abb. III.7	Ratte unter dem Mikroskop während der Videoaufnahme.....	48
Abb. III.8	Intravitalmikroskopische Aufnahme FITC-markierter Erythrozyten	51
Abb. III.9	Intravitalmikroskopische Aufnahme mit Overlay. Einteilung in periportales, midzonales und perizentrales Feld	56
Abb. III.10	One Way Analysis of Varianz („Multiple Comparison Options“)..	57
Abb. III.11	Two Way Analysis of Varianz („Multiple Comparison Options“).	58
Abb. IV.1a	MABD (5h)	60
Abb. IV.1b	MABD (24h)	60
Abb. IV.2a	HF (5h)	61
Abb. IV.2b	HF (24h)	62
Abb. IV.3	HZV	63
Abb. IV.4	ZVD.....	64
Abb. IV.5a	pH-Wert (5h)	65
Abb. IV.5b	pH-Wert (24)	65
Abb. IV.6a	BE (5h)	66
Abb. IV.6b	BE (24)	67
Abb. IV.7a	pCO ₂ (5h).....	68
Abb. IV.7b	pCO ₂ (24h).....	68
Abb. IV.8a	pO ₂ (5h)	69
Abb. IV.8b	pO ₂ (24h)	70
Abb. IV.9a	HK (5h).....	71
Abb. IV.9b	HK (24h).....	71
Abb. IV.10a	Hb (5h).....	72
Abb. IV.10b	Hb (24h).....	73
Abb. IV.11	Intrasinusoidale Erythrozytengeschwindigkeit (5h und 24h).....	74
Abb. IV.12	Intrasinusoidale Leukozytengeschwindigkeit (5h und 24h).....	75
Abb. IV.13	Geschwindigkeitsquotient (5h und 24h).....	76
Abb. IV.14	Intravitalmikroskopische Aufnahme 24h nach Schock. Signifikant erweiterte Sinusoide nach Gabe von S-NO-HSA.....	77
Abb. IV.15	Sinusoidweiten (5h und 24h).....	78
Abb. IV.16	Fluss der Erythrozyten (5h und 24h).....	79
Abb. IV.17	Fluss der Leukozyten (5h und 24h).....	80
Abb. IV.18	nicht-perfundierte hepatische Sinusoide (5h und 24h).....	81
Abb. IV.19a	Temporär adhärente Leukozyten (5h)	83
Abb. IV.19b	Temporär adhärente Leukozyten (24h)	83
Abb. IV.20	Intravitalmikroskopische Aufnahme. Signifikant erhöhte Leukozytenadhärenz in der HSA-Placebogruppe 5h nach Schock .	84
Abb. IV.21a	Permanent adhärente Leukozyten (5h).....	86
Abb. IV.21b	Permanent adhärente Leukozyten (24h).....	86

3. Tabellenverzeichnis

Tab. III.1	Versuchsreihe 5h	36
Tab. III.2	Versuchsreihe 24h	36
Tab. IV.1	Intrasinusoidale Erythrozytengeschwindigkeit.....	74
Tab. IV.2	Intrasinusoidale Leukozytengeschwindigkeit.....	75
Tab. IV.3	Geschwindigkeitsquotient	76
Tab. IV.4	Sinusoidweiten	77
Tab. IV.5	Fluss der Erythrozyten.....	79
Tab. IV.6	Fluss der Leukozyten.....	80
Tab. IV.7	nicht-perfundierte hepatische Sinusoide.....	81
Tab. IV.8	Temporär adhärente Leukozyten pro mm ² Leberoberfläche.....	82
Tab. IV.9	Permanent adhärente Leukozyten pro mm ² Leberoberfläche.....	85

I. Einleitung

In der Pathogenese des multiplen Organversagens nach hämorrhagischem Schock, Trauma und Sepsis sind Störungen im Bereich der Mikrozirkulation mit fokaler Minderperfusion und Hypoxie vitaler Organe, einschließlich der Leber (Bihari, 1989 und Wang 1992), eine der Hauptursachen für die Entstehung generalisierter inflammatorischer Reaktionen des Organismus. Dieses „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) (ACCP/SCCM Society of Critical Care Medicine, 1992) ist die Folge einer massiven Immunantwort, die als septiforme Entzündung erscheint, primär allerdings nichtinfektiöser Natur ist und bis zum kompletten Organversagen führen kann. Zielzellen des SIRS sind vor allem Endothelzellen lebenswichtiger Organe, aber auch organspezifische Zellen wie Hepatozyten und Kupffer'sche Sternzellen (Schlag, 1994). Charakteristisch im hämorrhagischen Schock sind sowohl die exzessive Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren wie Zytokine, Eicosanoide und Komplement, als auch die Aktivierung von Makrophagen und Leukozyten (Carrico, 1986) mit ausgeprägter Störung von Mikrozirkulation und Zellstoffwechsel (Goris, 1985 und Nuytinck, 1986), wobei in der Pathologie des SIRS die Beeinträchtigung der Stickstoffmonoxid (NO)-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt und weiter zur schlechteren Organdurchblutung und letztlich zur Gewebischämie beiträgt (Szabo, 1994).

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erlaubt eine genaue Analyse der hepatischen Mikrozirkulation, welche im Schock besonders durch ein sinusoidales Perfusionsdefizit und eine mikrovaskuläre Akkumulation von Leukozyten bestimmt wird. Hierbei ist insbesondere die Adhärenz von Leukozyten am Endothel postsinusoidaler Venolen, die über Adhäsionsmoleküle vermittelt ist, von pathogenetischer Bedeutung. Den Störungen der hepatischen Mikrozirkulation folgen eine Beeinträchtigung der Funktion und des Energiestoffwechsels der Leber.

In der folgenden Arbeit werden kurz die wesentlichen Pathomechanismen nach hämorrhagischem Schock und die pathophysiologischen Vorgänge in der Leber dargestellt, insbesondere die endothelabhängigen, NO-vermittelten Störungen der Durchblutungsregulation und die pharmakologischen Modifikationen der NO-Bioverfügbarkeit. Therapieansätze sollten die pathophysiologischen Veränderungen der Mikrozirkulation im Schock berücksichtigen, so dass eine entsprechende Modulation der inflammatorischen Reaktion sowie eine angepasste nutritive Perfusion und Sauerstoffversorgung zur Aufrechterhaltung der Organfunktion gewährleistet werden kann.

II. Literaturüberblick

1. Spezielle Pathophysiologie des Schocks

1.1 Pathogenetische Grundmechanismen des hämorrhagischen Schocks

Eine akute, nicht oder nur kurzfristig kompensierbare Störung des Gleichgewichts zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf (Gewebehypoxie) in allen oder allen lebenswichtigen Organen wird als Schock bezeichnet. Das Vollbild des Schocks stellt eine akute lebensbedrohliche Situation dar, die mit zunehmender Dauer organübergreifend und damit generalisiert wird, sich selbst unterhält und im schwersten Fall unbeherrschbar bleiben kann. Dem Schock liegt eine Minderperfusion der kapillären Strombahn zugrunde, die meist auf einem herabgesetzten Herzzeitvolumen infolge eines akuten Pumpversagens (kardiogener Schock) oder eines Blutvolumenmangels (hypovolämischer/hämorrhagischer Schock) beruht. Als Parameter für die fehlende Anpassung von Zirkulation und Metabolismus im Schock werden das Sauerstoffangebot und der Sauerstoffverbrauch angesehen. Der Sauerstoffverbrauch kann bereits in der Frühphase des Schocks infolge der Verminderung des Sauerstoffangebots reduziert sein; ursächlich sind das erniedrigte Herzzeitvolumen bei Hypovolämie bzw. die ungenügende Sauerstoffsättigung des Blutes bei Vorliegen einer pulmonalen Gasaustauschstörung. Unabhängig von der auslösenden Ursache werden bei jedem Schocksyndrom Veränderungen der Makro- und Mikro-zirkulation beobachtet. Die ungenügende Gewebepfusion lässt sich beim hämorrhagischen Schock auf eine Verminderung des zirkulierenden Blutvolumens und eine Zentralisation des Kreislaufes zurückführen. Unter der Zentralisation des Kreislaufs wird eine Umverteilung des reduzierten Herzzeitvolumens zugunsten der Versorgung von Herz und Gehirn, auf Kosten des Splanchnikusgebiets, der Muskulatur, der Nieren und der Haut verstanden (Messmer, 1967).

Im hämorrhagischen Schock findet eine Aktivierung verschiedener Kaskadensysteme und eine Interaktion zwischen ihnen statt, die zu einer Regulationsstörung der Mikro-zirkulation führt. Diese ist klinisch häufig nicht sofort erfassbar; erst durch Progression des Krankheitsbildes mit anhaltend unzureichendem Sauerstoffangebot, inhomogener Gewebepfusion, ischämiebedingten zellulären Veränderungen und mit der Freisetzung von Schockmediatoren wird das Schocksyndrom auch klinisch offenbar.

Wichtigstes Ziel ist es, die Dauer der kritischen Hypoxiephase („whole body ischemia“) und damit des Schockzustandes schnellstmöglich durch adäquate Volumensubstitution zu verkürzen. Durch Reoxigenierung und Reperfusion der ischämischen Mikro-zirkulation wird

allerdings eine Kaskade zellulärer Veränderungen induziert, die unter dem Begriff Ischämie/Reperfusionssyndrom zusammengefasst werden und eine systemische Entzündungsreaktion (SIRS) mit sequentiellm Versagen lebenswichtiger Organe nach sich ziehen können (Rose, 1996).

1.2 Ischämie und Reperfusionssyndrom als Ausgangspunkt eines SIRS

1.2.1 Allgemeine Pathophysiologie der Ischämie

Von einer Ischämie spricht man, wenn eine im Verhältnis zum Sauerstoff- und Nährstoffbedarf eines Organs unzureichende Blutversorgung besteht. Die Konsequenzen einer solchen Mangel durchblutung für die Organfunktion sind besonders gravierend für solche Organe, die schon unter Ruhebedingungen einen hohen Energiebedarf haben und/oder ihre Sauerstoff- und Substratzufuhr durch Gefäßdilatation nur begrenzt steigern können. Dies gilt besonders für das Herz und das Zentralnervensystem. Von entscheidender Bedeutung für das Überleben eines Organs im Zustand der Ischämie ist die Ischämietoleranz (Ferreira, 1972). Diese beträgt in Organen mit hohem Sauerstoffverbrauch, wie dem Zentralnervensystem, wenige Minuten. Die Konsequenzen der Ischämie für den Zellstoffwechsel resultieren aus der Umschaltung von aeroben auf anaeroben Stoffwechsel. Fehlt Sauerstoff, so wird die Umsetzung von Pyruvat zu Acetyl-CoA gehemmt und Pyruvat zu Laktat umgesetzt. Folge ist eine intrazelluläre Azidose und im weiteren Verlauf der Tod der Zelle. Damit sind die Akkumulation von Laktat und die Entstehung einer intrazellulären Azidose obligate Konsequenzen eines Sauerstoffmangels und werden durch den fehlenden Abtransport dieser Metabolite bei einem Gefäßverschluss zusätzlich verstärkt.

Als weitere Ursache des Zelltods bei Ischämie wird ein Adenosintriphosphat (ATP)-Mangel diskutiert, der für den Strukturhalt der Zellmembran, z.B. die Phosphorylierung von Porenproteinen und damit die Ionenhomöostase wichtig ist (Poole-Wilson, 1984). ATP stellt die Energie für Ionenpumpen sowie für die Relaxation der Myofibrillen im Herzen bereit. Diskutiert wird außerdem die direkte Zellmembranschädigung durch Ischämie. Eine Aktivierung von Phospholipasen infolge Abfall des pH-Wertes und/oder Anstieg der freien Ca^{++} -Konzentration führt zur Spaltung von Membranphospholipiden unter Bildung von Lysophospholipiden und freien Fettsäuren. Diese sind nicht nur Detergenzien, sondern auch Vorstufen biologisch aktiver Mediatoren wie PAF und Fettsäureperoxiden. Fettsäureperoxide können sogenannte „transmembranäre Peroxy-Cluster“ bilden, die als Ionenkanäle besonders

für Ca^{++} Ionen dienen und zur Ca^{++} -Überladung des Zytosols führen – ein Vorgang, der gemeinsam mit der Bildung reaktiver Sauerstoffspezies vor allem bei Wiederherstellung der Sauerstoffzufuhr während der Reperfusion stattfindet (Meerson, 1982). Die dadurch ausgelöste Peroxidation von Membranlipiden beeinträchtigt Transportprozesse und führt zu gesteigerter Permeabilität. Es kommt zu einer Störung der Ionenhomöostase, insbesondere zu einer Ca^{++} -Überladung des Zytosols und der Mitochondrien, die zum Zelltod führt.

1.2.2 Reperfusion und Reperfusionsschaden

Schädigung von Zellen und Geweben bei Ischämie mit nachfolgender Reperfusion ergeben sich aus der Summe der Zellschäden, die durch Ischämie hervorgerufen werden und den Schädigungen bei der Reoxygenierung der Gewebe, d. h. im Zuge der Schocktherapie (Kreimeier, 1987). Die initialen Veränderungen nach Reperfusion eines ischämischen Gewebes fasst man häufig unter dem Begriff Reperfusionsschaden („reperfusion injury“) zusammen. Reperfusion nach Wiedereröffnung eines verschlossenen Gefäßes kann die ischämischen Zellschädigung demaskieren oder sogar verstärken. Die frühe Phase der Reperfusion eines ischämischen Gewebes ist in der Regel durch eine kurzdauernde reaktive Hyperämie infolge einer Akkumulation saurer Metabolite gekennzeichnet. Nach dieser initialen Phase kann die Durchblutung erneut unter den Ausgangswert absinken. Als Ursache dieser postischämischen Hypoinfusion werden mikroembolische Störungen der Mikrozirkulation (Granulozyten, Plättchenaggregate) sowie die Freisetzung vasokonstriktorischer Faktoren aus dem ischämisch geschädigten Endothel oder gefäßadhärente Leuko- und Thrombozyten angenommen (Siesjö, 1981 und Schaper, 1983).

Die schädigende Wirkung der Reperfusion erfolgt dabei durch den Wiederseinstrom von Sauerstoff in bereits vorgeschädigtes Gewebe, wobei die schwerste Schädigung die Gefäßendothelzellen betrifft (Bartlett, 1996). Der wichtigste Parameter dafür ist die Bildung reaktiver Sauerstoffspezies (ROS). Unter ROS versteht man Sauerstoff-Radikale und stark reaktive Verbindungen, die zur Radikalbildung führen. Im gesunden Organismus gehört ihre Bildung zu den physiologischen Reaktionsabläufen, z.B. im Rahmen der Atmungskette. Neben ihrer für den Organismus nutzbringenden Wirkungen in der Infektabwehr (Bakterizidie) und bei Entzündungen führen ROS bei vermehrter Bildung durch ihre oxidative Wirkung zu starken Zellschäden. Für die Entstehung freier Radikale werden mehrere Mechanismen verantwortlich gemacht (Müller-Peddinghaus, 1987). Als Folge der Ischämie wird im Endothel die Xanthindehydrogenase proteolytisch in die Sauerstoffradikale produzierende Xanthinoxidase umgewandelt (Parks, 1988). Mit der Reperfusion wird

Sauerstoff als Substrat für eine verstärkte Bildung von Superoxidanionen durch dieses Enzym geliefert, welche durch das zelluläre Schutzenzym Superoxiddismutase (SOD) nicht mehr ausreichend inaktiviert werden können (Thompson, 1986 und Kontos, 1989). Hohe Aktivitäten dieses Enzyms wurden im Dünndarm, vor allem in der Mucosa, gefunden (Granger, 1981). Zusätzlich findet bei der Reperfusion eine verstärkte Granulozytenadhäsion an der Gefäßwand statt, die wiederum von einer Aktivierung der Granulozyten-NADPH-Oxidase, dem zentralen O_2^- -bildenden Enzym, begleitet ist. Zugleich sezernieren am Endothel adhärerende Thrombozyten ADP und ATP, die wiederum als Substrate für die Xanthinoxidase dienen und so die Sauerstoffradikalbildung potenzieren können.

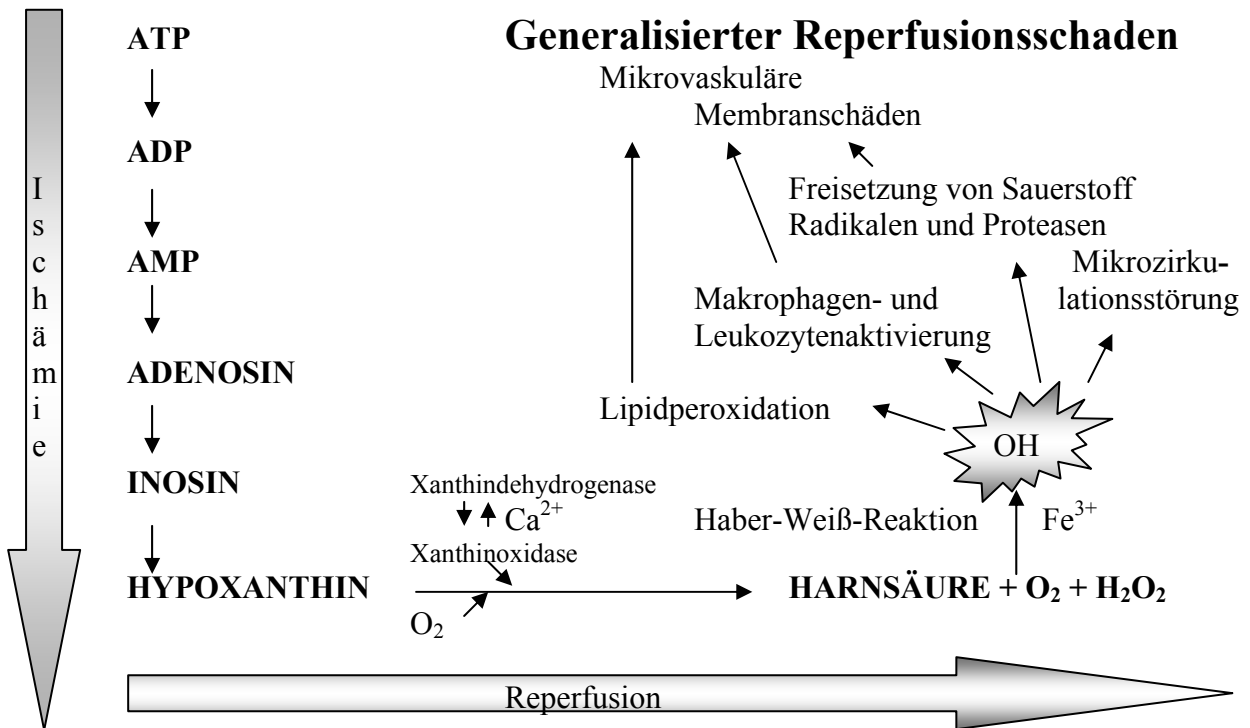


Abb. II.1 Bildungswege für freie O_2 -Radikale über die Xanthinoxidase (endothelial) (ergänzt nach Granger 1986 und 1988).

1.2.3 Leukozyten/Endothelinteraktionen

Ein Vergleich der Vorgänge in der Reperfusionphase mit der zellulären Phase der unspezifischen Entzündungsreaktion liegt nahe (Lucchesi, 1986), weil beiden die biochemische Interaktion zwischen Blutzellen und Gefäßendothel bei verlangsamer Strömung gemeinsam ist. Die Adhäsion von Granulozyten, Monozyten und Makrophagen an das Endothel der Mikrozirkulation, vornehmlich im Bereich der postkapillären Venolen, stellt bei der Entzündungsreaktion einen frühen entscheidenden Schritt für die Auswanderung dieser Zellen aus dem Blut in das Gewebe dar. Dementsprechend wird die Leukozytenaktivierung und -adhäsion als prognostischer Index für das Überleben eines hämorrhagischen Schocks angesehen (Barroso-Aranda, 1989). Spezifisch leukozytäre wie auch endotheliale Bindungsproteine sind an der Adhäsion beteiligt.

Die Leukozyten-Endothelinteraktion ist wesentlicher Bestandteil des postischämischen Reperfusionssyndroms und somit auch wesentlich an der Entwicklung des Reperfusionsschadens beteiligt. Die Mikrohämodynamik im Bereich der Venolen, die den Hauptort der Leukozytenadhäsion darstellen, ist charakterisiert durch eine rheologische Interaktion zwischen strömenden Leukozyten und Erythrozyten bei niedrigen Wandschubspannungen (Gaechtgens, 1987). Die flussabhängige Margination erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Leukozyten direkt mit dem Endothel interagieren, so dass die für die folgenden Aktivierungsschritte im Entzündungsgeschehen und bei Reperfusion wesentliche Adhäsion zustande kommen kann. In der Plasmamembran neutrophiler Granulozyten wie auch anderer Leukozyten lässt sich ein Adhäsionskomplex (CD 18-Komplex) identifizieren, der aus drei nichtkovalent assoziierten Glykoproteinen besteht.

Um die Leukozyten-Endothelinteraktionen auszulösen, ist eine Stimulation der Granulozyten mit Thrombin oder mit Mediatoren der Entzündungsreaktion wie Zytokine (Interleukin-1, Interleukin-6 und TNF- α), PAF, Leukotrien B₄ oder Komplementfaktoren (C_{5a}) notwendig und führt über die Translokation des Adhäsionskomplexes von subzellulären Granula an der Plasmamembran zu einem Anstieg der spezifischen Membranintegrität. Weitgehend die gleichen inflammatorisch wirksamen Stimuli, die für die verstärkte Expressierung der granulozytären Bindungsproteine verantwortlich sind (Zytokine, O₂-Radikale, Komplement und Endotoxin), induzieren die Bildung endothelialer Bindungsproteine. Diese an unstimulierten Zellen nicht nachweisbaren Bindungsproteine sind für die Adhäsion von Granulozyten, Monozyten, aber auch Tumorzellen am Endothel verantwortlich (Bevilaqua, 1987). So reagieren in einer eher lockeren temporären Adhäsion endotheliale

Adhäsionsmoleküle wie P-Selektin (GMP 140) und in der Leber E-Selektin (ELAM-1, endothelial leukocyte adhesion molecule) mit leukozytären Rezeptoren wie L-Selektin (LECAM-1 oder (Sialyl-)Lewis-X) (Ley, 1991 und Rose, 1993). Während sich diese Leukozyten-Endothelinteraktion auf Ebene der Mikrozirkulation als „Slow-Rolling Phänomen“ darstellt, kommt es zu einer Signalübertragung unter Beteiligung des Plättchenaktivierungsfaktors (PAF) und PAF-Rezeptoren (Marzi, 1994a) sowie verschiedener Zytokine (IL-8, IL-1, TNF- α). Die Folge ist ein Abstoßen (shedding) der an dieser initialen Adhäsion beteiligten P- oder L-Selektin Rezeptoren, die im Blut später als zirkulierende Adhäsionsmoleküle erscheinen (Kuijpers, 1992). Durch eine Aktivierung der Endothelzellen mit Proteinneusynthese und Expression neuer Adhäsionsrezeptoren der Immunglobulinsuperfamilie kann sich dann eine feste Adhäsion zwischen Leukozyten und Endothel entwickeln (Carlos, 1994). Dabei treten die basal am Endothel nachweisbaren ICAM-2 und ICAM-1 Rezeptoren (intercellular adhesion molecule-1) mit den leukozytären Integrinen CD11a /CD18 (LFA-1 Komplex) bzw. CD11b/CD18 (MAC-1 Komplex) in Kontakt. Einerseits ist diese Adhäsion Voraussetzung für die Migration der Leukozyten in das interstitielle Gewebe. Andererseits beeinträchtigen diese mikrorheologischen Veränderungen, das heißt die Abweichungen der Fließeigenschaften einzelner Blutzellen, die Blutströmung vor allem in der Mikrozirkulation. Diese wird bei akuten arteriellen Durchblutungsstörungen, aber auch bei chronischer Minderperfusion als pathophysiologisch angesehen (Schmid-Schönbein, 1986). Die infolge ischämischer Freisetzung von Entzündungsmediatoren gesteigerte Adhäsion von Granulozyten am Endothel vor allem postkapillärer Venolen kann eine weitere Störung der lokalen Durchblutung bedingen. Aber auch die Zellaktivierung und Freisetzung aktiver Wirkstoffe (Proteasen, O₂-Radikale) kann zu einer direkten Gewebeschädigung führen. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen, dass nach induzierter Leukopenie, nach Hemmung der Leukozytenaktivierung oder Blockade der Adhäsionsfähigkeit von Granulozyten am Endothel des Ausmaß des Gewebeuntergangs bei experimentellem Myokardinfarkt und die Häufigkeit ischämiereduzierter Rhythmusstörungen vermindert wird. Untersuchungen am Hirnkreislauf legen die Schlussfolgerung nahe, dass die mechanischen und/oder biochemischen Folgen der Verlegung des Kapillarsystems durch Granulozyten bei vermindertem Perfusionsdruck zu dem postischämischen No-reflow-Phänomen (delayed hypoperfusion) beitragen (Schmid-Schönbein, 1987). Neuere Studien sprechen für eine systemische Expression von ICAM-1 nach Ischämie und Reperfusion als einen entscheidenden Schritt für die nachfolgenden Organschädigungen (Cuzzocrea, 2002 und Olanders, 2002).

2. Störungen der Organfunktionen durch SIRS im hämorrhagischen Schock

Die fokale Ischämie als Ausgangspunkt mit der Aktivierung humoraler Systeme - insbesondere der Komplementkaskade - und der Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen als Ausdruck eines SIRS führen zu einer zunehmenden Störung nutritiver Organdurchblutung und zum Beginn einer Organdysfunktion (Goris, 1985 und Kreimeier, 1987). Eine wichtige Rolle kommt dabei den Zytokinen (vor allem IL-1, IL-6 und TNF- α) zu. Diese stimulieren Granulozyten zur Bildung von Sauerstoffradikalen, fördern die Adhäsion von Neutrophilen an Endothelzellen und erhöhen deren Zytotoxizität. In tierexperimentellen Studien konnte ein multiples Organversagen allein durch die Infusion von Zytokinen induziert werden. Die Funktionsminderung oder der Funktionsverlust meist mehrerer Organe tritt häufig mit einer zeitlichen Verzögerung von Stunden bis Tagen nach dem auslösenden Schockereignis auf (Carmona, 1984). Das Organversagen nach Schock betrifft vorwiegend die Lunge, die Nieren, die Leber und den Magen-Darm-Trakt.

2.1 Die Rolle der Leber im Schock

Besonders exponiert und empfänglich für schockinduzierte Veränderungen ist der Gastrointestinaltrakt. Das Versorgungsgebiet der A. mesenterica superior ist bei der sympathikoadrenergen Reaktion im Schock von der Verminderung der Durchblutung am stärksten betroffen (Messmer, 1967). Hier kann es trotz Schocktherapie zu Mucosaschäden des Darmes, Translokation von Bakterien und Endotoxin und damit zu einer Aktivierung insbesondere der Lebermakropagen kommen. Während der Darm auch als „Motor of Organ Failure“ bezeichnet wird, kann die Leber als Modulator und Verstärker des SIRS und eines Organversagens angesehen werden (Bauer, 1994). Zum einen bedingt durch die Lage im Abstromgebiet des schocksensiblen Darmes stellt die Leber die erste Filterstation des endotoxin- und bakterienreichen intestinalen Blutstromes dar. Zum andern reagiert die Leber durch die Zugehörigkeit zum Retikuloendothelialen System (RES) und ihrem daraus resultierenden Reichtum an Makrophagen, Granulozyten und Monozyten mit einer massiven Ausschüttung von Mediatoren und Radikalen, die erhebliche lokale Auswirkungen auf die Lebermikrozirkulation und Hepatozytenfunktion haben.

2.1.1 Besonderheit der hepatischen Mikrozirkulation

Das Besondere an der hepatischen Mikrozirkulation ist zum einen die duale, das heißt portale und arterielle Gefäßversorgung, zum anderen die spezialisierte, kapilläre Morphologie mit Sinusoiden, fenestriertem Endothel und dichtem Besatz mit Kupfferschen Sternzellen. Die mikrozirkulatorische Einheit stellt der Acinus dar, in deren Zentrum eine zuführende portale Venole mit begleitender Arteriole und einem Gallengang liegt. Der acinäre Verlauf der Sinusoide ist in drei Zonen unterteilt (Rappaport, 1973). Zone 1 (periportal) hat den geringsten Durchmesser und die größte Tortuosität der Sinusoide (Komatsu, 1990), die höchste Gluconeogeneseaktivität und den höchsten Sauerstoffpartialdruck (Rappaport, 1973). Die Zone 2 (midzonal) stellt topographisch, morphologisch und funktionell den Übergang (Rappaport, 1973 und Komatsu, 1990) zur Zone 3 (perizentral) dar. Die Zone 3 hat den größten Durchmesser und die geringste Tortuosität der Sinusoide (Komatsu, 1990), die höchste Aktivität mikrosomaler Enzyme und den niedrigsten Sauerstoffpartialdruck (Rappaport, 1973). Das Blut strömt über die kapillären Sinusoide der Leber in peripher liegende, postsinusoidale Venolen.

Die Leber besitzt keinerlei muskuläre Sphinkteren, trotzdem muss die sinusoidale Perfusion geregelt werden. Einerseits geschieht dies über netzartige, perisinusoidale Filamente der Ito-Zellen, die im Disséschen Raum um das sinusoidale Endothel gespannt sind, unter Zuhilfenahme lokaler Mediatoren der Kupfferschen Sternzellen (Kawada, 1993 und Takei 1993). Andere Untersuchungen zeigen eine Verengung des sinusoidalen Raumes durch eine Schwellung der Kupfferschen Sternzellen und Endothelzellen (McCuskey, 1993).

2.1.2 Die hepatische Mikrozirkulation im hämorrhagischen Schock

Die direkte Darstellung der hepatischen Mikrozirkulation mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Beobachtung, dass es nach einem hämorrhagischen Schock während der Reperfusion zum Perfusionsausfall einzelner Sinusoide kommt. Die Ausfallrate ist abhängig von der Dauer des Schocks. Hierbei kann man perfundierte Sinusoide direkt neben nicht-perfundierten Sinusoiden nachweisen (Heterogenität der Perfusion) (Vollmar, 1995), die über mehrere Tage sichtbar sind und teilweise sogar zur Ausschaltung einzelner Leberazini aus dem Blutkreislauf führen (Bauer, 1997 und Kuntz, 1997). Es ist sogar möglich, dass die Gesamt-Organperfusion im Normbereich liegt, da es durch extrem dilatierte Sinusoide zu einem „transhepatischen Shunt“ kommen kann.

Für die Störung der hepatischen Mikrozirkulation im hämorrhagischen Schock sind vor allem der reduzierte Perfusionsdruck bei vermindertem zirkulierendem Blutvolumen mit Verschlechterung der Fließeigenschaften und der Fließbedingungen verantwortlich. Dazu gehören die Hypoxie-bedingte Endothelzellschwellung mit Verlegung des kapillären Lumens (Mazzoni, 1990) und der erhöhte Gefäßwiderstand durch aktivierte Kupffersche Sternzellen und Leukozyten. Über die schockbedingte Sympathikusaktivierung kommt es zudem noch zu einer Reduktion des sinusoidalen Durchmessers (Koo, 1977) und somit zu einem Perfusionsdefizit. Der reduzierte Perfusionsdruck hat eine Verlangsamung der Leukozyten-Fließgeschwindigkeit zur Folge (Vollmar, 1995). Während unter normotensiven Bedingungen Leukozyten ungehindert durch Sinusoide fließen und keine Interaktionen mit dem Gefäßendothel zeigen, führt eine schockbedingte Reduktion der Fließgeschwindigkeit und eine hypoxiebedingte Einschränkung der Verformbarkeit der Leukozyten zu einer sinusoidalen Stase, die mit einer Aktivierung der Leukozyten (Barroso-Aranda, 1989) und einer vermehrter Leukozyten/Endothelzell-Interaktion einhergeht (Vollmar, 1993 und 1994). Am stärksten ausgeprägt ist diese Stase in den periportalen und midzonalen Abschnitten der Sinusoide. Dies beweist eine morphologisch-mechanisch bedingte Akkumulation von Leukozyten in den kapillären Gefäßsegmenten der Leber (Vollmar, 1994). Gleichzeitig besteht auch eine Akkumulation und Adhärenz von Leukozyten am Endothel postsinusoidaler Venolen, die über Adhäsionsmoleküle vermittelt ist (Vollmar, 1993 und 1994).

2.1.3 Manifestation der Leberzellschädigung

Im Schock ist sowohl der Zufluss über die V. portae als auch über die A. hepatica vermindert. Das Lebergewebe, vor allem die nicht-parenchymatösen Zellen (Endothelzellen, Makrophagen (Kupffer'sche Sternzellen), Ito-Zellen und Pit-Zellen), ist gegenüber Hypoxie relativ empfindlich. Es kommt zur perizentralen Hepatozytennekrose (Dinges, 1993), Vakuolisierung und später zentraler Verfettung. Die Leberschädigung wird meist erst nach einigen Tagen klinisch manifest. Angriffspunkte der Leberzellschädigung sind die Zellmembran (sinusoidal, lateral, kanalikulär), die Zellorganellen, das Zellskelett, zytoplasmatische Strukturen und der Zellkern. Konsequenzen sind Funktionsstörungen (z.B. Synthese-, Sekretions- und Transformationsleistungen) und morphologische Veränderungen (hydropische und eosinophile Degeneration, Netzdegeneration, Verfettung, Zytoplasmaeinschlüsse, Nekrosen, Veränderungen des Endoplasmatischen Retikulums und anderer Organellen).

Man geht einerseits von einer direkten Schädigung der Endothelzellen und Hepatozyten durch freigesetzte Sauerstoffradikale und Proteasen aus (Bankey, 1993). Andererseits von einer indirekten Schädigung über chemotaktische Auswirkungen, die zu einer Leukozytenadhäsion am Endothel führen was über Adhäsionsrezeptoren vermittelt ist (Marzi, 1993, Steinhoff, 1993 und Bauer, 1999). Bei hypoxischen Leberzellschädigungen zeigt sich die Heterogenität der Leberzellen in den einzelnen Zonen des Acinus. Aufgrund des abfallenden Sauerstoffgradienten von portal nach zentral, sind die perizentralen Zellnekrosen bei persistierender Hypoxie erklärbar. Durch das Ischämie/Reperfusionssyndrom muss jedoch auch mit einer frühen midzonalen Schädigung gerechnet werden (Marotto, 1988). Ursache hierfür ist die hohe Konzentration freier Sauerstoffradikale in dieser Region, da die Substrate für eine Radikalentstehung von portal nach perizentral zunehmen, während der Sauerstoffpartialdruck abnimmt. Durch diese Voraussetzungen wird die Entstehung freier Sauerstoffradikale zusätzlich begünstigt (Marotto, 1988). Eine bedeutende Rolle bei der Entstehung des Reperfusionsschadens im Verlauf des hämorrhagischen Schockgeschehens spielen die hepatischen Makrophagen (Kupffer'sche Sternzellen). Bedingt durch die Hypoxie werden die Kupffer'schen Sternzellen im Rahmen des Detoxifikationsvorganges aktiviert und synthetisieren zahlreiche hochpotente Mediatoren, vor allem Prostaglandine, Leukotriene, PAF, TNF- α , Interleukine 1 und 6 (Wake, 1989). Diese Synthesesteigerung wird unter Hypoxie/Reoxygenationsbedingungen weiter potenziert und führt zur weiteren direkten Schädigung der Endothelzellen und Hepatozyten. Es kommt zu einer Verstärkung des SIRS durch exzessive Mediatorausschüttung der Kupfferschen Sternzellen sowie aktivierter mononukleärer Zellsysteme (Granulozyten, Lymphozyten, Monozyten). Die Freisetzung dieser zytotoxischen Mediatoren durch Kupferzellen und neutrophile Granulozyten ist maßgeblich an der Entstehung von Zellschäden beteiligt (Jaeschke, 1990).

2.2 Die Folgen für den Gesamtorganismus

Die Funktionsstörung der Leberzellen führt zu einer Verminderung der Syntheseleistung und der Clearancefunktion des RES. Daraus resultiert der Übertritt von Bakterien und Endotoxinen in die systemische Zirkulation („spill-over“-Effekt) und es kann zu einem generalisierten Entzündungsprozess („whole body inflammation“) kommen (Border, 1987). So kann sich aus einem primär nicht-septischen Schockgeschehen (z.B. hypovolämischer Schock) ein septischer Schock entwickeln (Carmona, 1984 und Border, 1987). Beim

Menschen wird dieser im Tierexperiment gesicherte Vorgang als eine der mögliche Ursachen des Multiorganversagens angesehen (Kreimeier, 1987 und Messmer, 1989).

3. Vasoaktive Mediatoren und ihre Bedeutung im hämorrhagischen Schock

Im Schock werden das Gerinnungs-, Komplement- und Kallikrein-Kinin-System aktiviert. Diese Systeme können sich gegenseitig stimulieren und den Arachidonsäuremetabolismus aktivieren. Die Gesamtheit der daran beteiligten, biologisch zum Teil hochwirksamen Substanzen bezeichnet man als Schockmediatoren.

Für die vorliegende Arbeit sind insbesondere vasoaktive und die Gefäßpermeabilität beeinflussende Mediatoren, die aus aggregierenden Thrombozyten, aktivierten und adhärenen Leukozyten und aus geschädigten Endothelzellen freigesetzt werden, von Bedeutung. Vor allem das Endothel kann sowohl körpereigene vasoaktive Wirkstoffe aktivieren (z.B. Angiotensin I zu Angiotensin II) und inaktivieren (z.B. Bradykinin) als auch selbst solche synthetisieren (z.B. Stickstoffmonoxid, Endothelin, Prostaglandin). Aufgrund dieser Aufgaben ist es einleuchtend, dass ein Verlust der Integrität des Endothels im Rahmen des hämorrhagischen Schocks Auswirkungen auf die Durchblutung haben wird. So kann zwar beispielsweise durch die erhöhte Ausschüttung vasokonstriktorischer Mediatoren im hämorrhagischen Schock der systemische Blutdruck bis auf Normalwerte ansteigen. Die Vasokonstriktion verstärkt aber auch die bestehende Minderperfusion des Gewebes und damit ischämie-bedingte funktionelle und strukturelle Gewebeveränderungen.

Auch in der Leber ist das Endothel an der Regulation der sinusoidalen Konstriktion und Dilatation beteiligt. Dies erreicht es zum einen durch Aufnahme und/oder Abbau mit dem Blut zirkulierender vasoaktiver Substanzen wie Noradrenalin, Serotonin, Angiotensin, Bradykinin, Kohlenmonoxid (CO) sowie Adeninnukleotide (Bassenge, 1988, McCuskey, 1993 und De Maio, 1995), zum anderen durch Synthese und Freisetzung vasoaktiver Lokalhormone (Autakoide), wie z.B. NO (Stickstoffmonoxid), ET (Endothelin) und PG (Prostaglandin E₂ und F_{2α}).

Als endogene Mediatoren mit vasoaktiver Wirkung, die für die Dysregulation der hepatischen Mikrozirkulation im hämorrhagischen Schock ursächlich verantwortlich sind, werden Endotheline (ET), Kohlenmonoxid (CO) und Stickstoffmonoxid (NO), diskutiert (Pannen, 1998 und Scommatou, 1999). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen diesen vasodilatierenden und vasokonstriktorisches Mediatoren,

wodurch eine adäquate Durchblutung des Gewebes sichergestellt wird (Kawada, 1993 und Scommotau, 1999).

3.1 Endothelin (ET)

Das Endothel synthetisiert eine der am stärksten vasokonstriktorisches Substanzen des Organismus, das Endothelin-1 (ET-1). Endotheline, von denen die Typen 1-3 unterschieden werden können, sind Isopeptide mit 21 Aminosäuren. In Endothelzellen wird ausschließlich Endothelin-1 gebildet. Bei entsprechender Zellstimulation (z.B. infolge Hypoxie oder Ischämie) erfolgt die Transkription der mRNA und damit die Synthese von Endothelin-1 innerhalb von Minuten. Endothelin stellt einen sehr potenten und in seiner Wirkung langanhaltenden Konstriktor der glatten Muskulatur dar. Darüber hinaus wirkt Endothelin gefäßwachstumsfördernd (Yanagisawa, 1988). Seine pathophysiologische Bedeutung bei akuten und chronischen Formen der Hypertonie sowie seine mögliche Beteiligung an der Entwicklung von Koronar- und Zerebralspasmen ist noch nicht restlos geklärt. Eine Zunahme der Endothelinrezeptoren an der glatten Muskulatur von Koronargefäßen tritt nach Ischämiezuständen auf. Erhöhte Endothelinkonzentrationen im Plasma finden sich im kardiogenen Schock, beim Koronarinfarkt, bei Patienten mit pulmonaler Hypertonie, aber auch bei kreislaufstabilen, urämischen Hämodialysepatienten (Yanagisawa, 1989). Endothelin hat auch Einfluss auf die Mikrozirkulation der Leber nach hämorrhagischem Schock (Marzi, 1994), so konnte bei Ratten eine Erhöhung des ET-1-Spiegels im hämorrhagischen Schock nachgewiesen werden (Vemulapalli, 1994 und Zimmermann, 1994). Eine Blockade des ET_A-Rezeptors in der frühen Phase nach hämorrhagischem Schock resultiert in einem niedrigerem systemischen vaskulären Widerstand und einem niedrigeren mittleren arteriellen Blutdruck (Zimmermann, 1994). Unter physiologischen Bedingungen konnte in einem Tiermodell eine signifikante Erhöhung des Pfortaderdrucks und damit des Gefäßwiderstandes durch intraportale Gabe von ET-1 nachgewiesen werden (Bauer, 1994a und 1994b). Intravitalmikroskopisch sah man eine Sinusoidkonstriktion und eine Zunahme der Perfusionsheterogenität. Studien zeigen, dass während der Reperfusion nach hämorrhagischem Schock die NO vermittelte Vasodilatation den systemischen Gefäßwiderstand reduziert und den hepatischen Blutfluss aufrechterhält. Im Gegensatz dazu bewirken Endotheline eine Vasokonstriktion über die Stimulation der ET_A-Rezeptoren, was den Effekten von NO entgegenwirkt und gleichzeitig verbessern sie über ET_B-Rezeptoren den Blutfluss zur Leber (Pannen, 1997). Neuere Untersuchungen lassen vermuten, dass

Endothelin in verschiedenen Gefäßabschnitten unterschiedlich stark wirkt (Liu, 2003) und zusätzlich NO die Bindung von Endothelin an seinen Rezeptor beeinflussen kann (Wiley, 2001).

3.2 Kohlenmonoxid (CO)

Kohlenmonoxid (CO) entsteht als Intermediärstoffwechselprodukt im Hämabbau und wirkt nach neuesten Erkenntnissen über die Stimulation der Guanylatzyklase vasodilatatorisch (Bauer, 1997b). Die mikrosomale Hämoxigenase (HO), die für die Entstehung von endogenem CO verantwortlich ist, liegt zum einen als konstitutives Enzym (HO-2) vor, das permanent vorhanden ist. Zum anderen ist es in einer stressinduzierten Isoform (HO-1) nachzuweisen, die auch als Hitzeschockprotein 32 (HSP-32) bezeichnet wird, deren Ausschüttung aber ein besonderer Reiz, z.B. in Form eines besonderen Stressereignisses, vorausgehen muss (Erwing, 1991). Es konnte gezeigt werden, dass grundsätzlich alle Zellen zur Bildung von HO-1 fähig sind (De Maio, 1995). Eine lokale Minderperfusion der Niere bewirkt beispielsweise eine systemische Induktion der HO-1 (Raju, 1996). Bei Ratten, die einem hämorrhagischen Schock ausgesetzt wurden, wird vermehrt HO-1 in der Leber ausgeschüttet (Bauer, 1997b). Eine Hemmung des Hämstoffwechsels nach hämorrhagischem Schock und Volumentherapie ruft keinerlei vasokonstriktorische Wirkungen in der systemischen Zirkulation hervor, führt aber zu einer spezifischen Zunahme des Pfortaderwiderstandes. Dies legt den Schluss nahe, dass die Ausschüttung von HO-1 in der Leber nach Hämorrhagie und anschließender Volumensubstitution einen stressinduzierbaren Vasodilatator darstellt, der zur Aufrechterhaltung der Leberperfusion nach hämorrhagischem Schock beiträgt (Bauer, 1997b). Dieser protektive Effekt von endogenem CO wird höchstwahrscheinlich über eine Relaxation der Ito-Zellen der Leber ausgelöst (Pannen, 1998a). Möglicherweise hat CO eine ähnliche schützende Wirkung auf die Lebermikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock wie NO (Pannen, 1998a). Es scheint, dass NO einen größeren vasodilatierenden Effekt im arteriellen hepatischen System und CO im Gegensatz dazu im venösen hepatischen Gefäßen auslöst (Pannen, 1998).

3.3 Stickstoffmonoxid (NO)

NO ist ein lipophiles, hochdiffusionsfähiges, membranpermeables Molekül, das ohne Hilfe von Membranproteinen durch Zellmembranen diffundieren kann. Es hat eine kurze

biologische Halbwertszeit zwischen 10 und 40s. Dies erklärt sich aus seiner raschen Umwandlung zu NO_2 und NO_3^- in Gegenwart von Sauerstoff bzw. Superoxidanionen. Bei dem in der Umwelt- und Krebsforschung als toxisch eingestuften Gas NO handelt es sich um ein phylogenetisch sehr altes Regulationsprinzip, das im Organismus in einer Reihe von Zellsystemen die Funktion eines interzellulären Signalmoleküls besitzt. Im Jahr 1980 wurde erstmals die Wirkung von NO unter einem endogenen Autakoid beschrieben, der als „endothel derived relaxing factor“ (EDRF) bezeichnet wurde. Dieser labile Mediator wird im intakten Endothel von Arterien, Arteriolen und Venen gebildet, und führt zu einer Relaxation der glatten Gefäßmuskelzellen in Reaktion auf Acetylcholin (Furchgott, 1980). Einige Jahre später wird EDRF als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Ignarro, 1987 und Palmer, 1987). Die endothelabhängige Relaxation in Arterien ist größer als in Venen. Dies legt den Schluss nahe, dass die Endothelzellen der Arterien im Vergleich zu den Venen eine größere Menge an NO produzieren (Moncada, 1993). Die Synthese von NO findet aber nicht nur in Endothelzellen statt, sondern in einer Vielzahl von Zellen, wie in Makrophagen, neutrophilen Granulozyten (Mastzellen), Thrombozyten, Hepatozyten, Endocardzellen, Retinazellen, Mesangialzellen, Chondrozyten, Neuronen des Groß- und Kleinhirns, Zellen der Nebenniere und in Zellen nicht-adrenerger-nicht-cholinerges Nerven (Moncada, 1991).

3.3.1 Wirkungsmechanismus von NO

Viele der biologischen Wirkungen von NO sind durch das Guanylatcyclase/cGMP-System vermittelt. NO stimuliert direkt die cytosolische, lösliche Guanylatcyclase in der glatten Muskulatur, indem es am Eisen der Hämkomponente der Guanylatcyclase bindet und dabei das Eisen aus der Ebene des Porphyrinrings herauslöst (Salvemini, 1996). Die so aktivierte Guanylatcyclase katalysiert die Bildung von cyclischem Guanosinmonophosphat (cGMP) aus Guanosintriphosphat (GTP). Erhöhte Spiegel von cGMP bewirken dann ihrerseits eine Abnahme der intrazellulären Calciumionen-Konzentration, durch verstärktes Austreten von Ca^{2+} und der Speicherung von Ca^{2+} im intrazellulären Vorrat. Die geringe verfügbare intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration ist verantwortlich für die NO-vermittelte Vasodilatation tonisierter Gefäße und Relaxation anderer glatter Muskelzellen (Cherry, 1987). Zusätzlich wird die Thrombozytenadhäsion und -aggregation herabgesetzt, gleichzeitig kommt es zur Hemmung der neutrophilen Chemotaxis und zu einer Signal-Transduktion in das zentrale- und periphere Nervensystem (Ignarro, 1991, Moncada, 1991, Dusting, 1995). Über den gleichen Mechanismus lösen auch Nitrovasodilatoren wie Nitroprussid-Natrium und

Glyceroltrinitrat eine Relaxation aus, wobei auch hier NO das aktive stimulierende Prinzip darstellt (Ignarro, 1989). Außer der Vasodilatation besitzt NO noch eine Reihe von c- GMP-unabhängigen Effekten. So hat NO in höheren lokalen Konzentrationen sowohl zytostatische als auch zytotoxische Wirkung auf Pilze, Bakterien, Protozoen, Würmer und Tumorzellen. Die zytotoxischen Effekte von NO haben die Hemmung von mitochondrialen Fe-S-Schlüsselenzymen, NADH-Ubichinon- und NADH-Succinat-Oxidoreductase zur Folge (Nathan 1992). Über die direkte Reaktion mit NADPH-Oxidase kann NO die Produktion von zellschädigenden Superoxidanionen hemmen und so als extrazellulärer Radikalfänger dienen (Clancy, 1992). Auch die Aktivität des Enzyms Zytochrom P-450 kann von NO gehemmt werden (Khatsenko, 1993). Zusätzlich ist es möglich, dass NO die Gen-Transkription und – Translation in Endothelzellen moduliert (Felley-Bosco, 1994).

Allerdings sind die spezifischen Wirkungen von NO weitestgehend abhängig davon, in welcher Menge NO gebildet wird.

3.3.2 Bildung von NO

3.3.2.1 Stimulation der Bildung von NO

Verschiedene Neurotransmitter (Acetylcholin, Adenosintriphosphat und Substanz P) sowie an der Hämostase beteiligte Faktoren (Adenosindiphosphat, Serotonin, Bradykinin und Thrombin), aber auch biogene Amine (Noradrenalin und Histamin) induzieren über einen rezeptorgekoppelten Mechanismus die Bildung und Freisetzung von NO (Bassenge, 1988). Die durch Angiotensin induzierte NO-Freisetzung stellt nur einen speziellen Fall der NO-vermittelten Gefäßtonusmodulation dar, denn auch in Abwesenheit von Angiotensin wird vom Endothel ständig NO abgegeben. Am meisten beeinflussen physikalische Stimuli die endotheliale Freisetzung von NO. Die beiden physiologisch wichtigsten physikalischen Faktoren für diese basale NO-Freisetzung sind die durch das strömende Blut an der luminalen Endothelzelloberfläche erzeugte Wandschubspannung und die pulsatorische Dehnung der Gefäßwand bzw. des Endothels. Dies ist die Grundlage des seit langem bekannten Phänomens der flussinduzierten Vasodilatation (Szabo, 1999).

3.3.2.2 Einfluss der NO-Synthetasen (NOS) bei der Bildung von NO

NO wird gebildet von der terminalen Guanidin-Gruppe des L-Arginins. Diese liefert dabei den Stickstoff für die im Zytosol der Endothelzellen ablaufende NO-Synthese. Die Bildung von NO ist gekoppelt an die Aufnahme von molekularem Sauerstoff in das Molekül. Durch Oxidation von L-Arginin entsteht über die Bildung von N^G-Hydroxy-L-Arginin Citrullin und NO (Palmer 1988 und Marletta, 1993).

Katalysiert wird diese Reaktion durch eine Familie von Enzymen, die NO-Synthetasen (NOS) genannt werden. Alle NOS sind abhängig von NADPH und Calmodulin und beinhalten fünf prosthetische Gruppen: Flavin-Adenin-Dinucleotid, Flavin-Mononucleotid, Tetrahydrobiopterin, einen Häm-Komplex (Eisenprotoporphyrin IX) und Zink (Szabo, 1999). Drei Isoformen (Typ 1, 2 und 3) der NO-Synthetasen, die sich anhand ihrer Aminosäuresequenz und ihrer Lokalisation unterscheiden lassen, sind bekannt (Förstermann, 1991 und Moncada 1991).

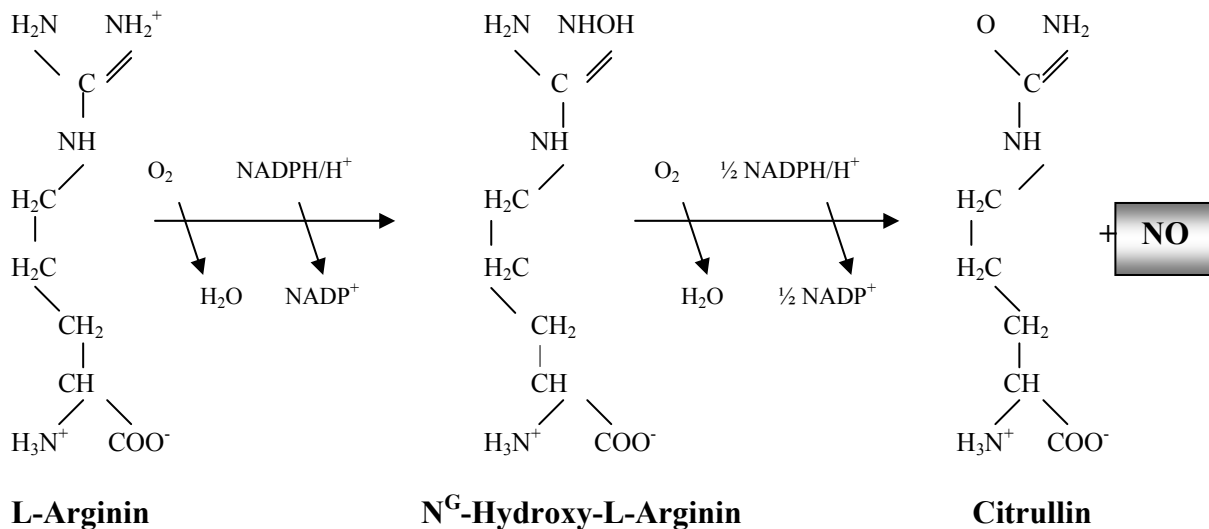


Abb. II.2 Mechanismus der NO-Entstehung

3.3.2.2.1 Die neuronale/Gehirn-NO-Synthetase (b-NOS = Typ 1)

Aktivitäten der b-NOS wurden nachgewiesen bei neurologischen Effekten im zentralen und peripheren Nervensystem. Die b-NOS ist nicht nur Calmodulin und NADPH-abhängig,

sondern auch auf Calcium angewiesen und wird konstitutiv exprimiert (Marletta 1993, Stuehr 1997 und Geller 1998).

3.3.2.2 Die induzierbare/Makrophagen-NO-Synthetase (i-NOS = Typ 2)

Die iNOS ist als Dimer aktiv, welches aus zwei 131 kDa-schweren NOS-Einheiten besteht, ist NADPH- und calmodulinabhängig, jedoch calciumunabhängig (Marletta, 1993, Stuehr, 1997 und Geller, 1998). Erstmals identifiziert in Makrophagen kann sie in allen Zelltypen exprimiert werden, darunter Fibroblasten, Gliazellen, Hepatozyten und Herzmyozyten ebenso wie vaskuläre und nicht-vaskuläre glatte Muskelzellen (Nathan, 1992). Jedoch wurde die konstitutive Expression der iNOS lokalisiert in der Niere, im Darm und im Bronchialepithel. Die iNOS wird typischerweise in Antwort auf immunologische Stimuli exprimiert, z.B. in Antwort auf Bakterien-Lipopolysaccharide und proinflammatorische Zytokine (Moncada 1993). Sie produziert daraufhin nanomolare Mengen an NO, die an der Entstehung von Zell- und Organdysfunktionen beteiligt sind und bei Hämorrhagie (Nussler, 1994), Anaphylaxie und Trauma beobachtet werden können (Szabó, 1994). TNF- α und IL-1 können die Expression der i-NOS stimulieren, was zu einer NO-Überproduktion in verschiedenen Organen (z.B. Leber, Lunge und Milz) in vivo führt (Thiemermann, 1993). Die i-NOS ist an der physiologischen, sogenannten Wirts- Abwehr- Reaktion beteiligt. So trägt sie z. B. zur Abtötung von Bakterien durch aktivierte Makrophagen bei.

Die Beobachtung, dass NO auch durch Hypoxie in vitro induziert werden kann (Melillo, 1995 und Palmer, 1998) kann relevant sein für die Expression der iNOS im hämorrhagischen Schock. Die Expression der i-NOS ist sowohl auf der Ebene der Transkription als auch auf der Ebene der Stabilität der i-NOS-mRNA reguliert. Der Mechanismus der i-NOS-Induktion beinhaltet die de-novo-Transkription und die Biosynthese neuer Proteine (Nathan, 1994, DeVera, 1996, Linn, 1997). Die Vorstellung, dass der hämorrhagische Schock mit einer Überproduktion von NO assoziiert ist, ist nicht neu. Bei der Messung von NO-Hb-Komplexen in Blutproben von Ratten mit hämorrhagischem Schock mittels Elektronen-Spinn-Resonanz-Spektroskopie (Westenberger, 1990) sind bereits zwei Stunden nach Schockinduktion erhöhte Werte messbar. Dieses Ergebnis wurde bestätigt und erweitert durch die Messung der kontraktilen Antwort des Aortenrings und erhöhte i-NOS-Aktivität ex vivo (Thiemermann, 1993 und Kelly, 1997). In Makrophagen von Mäusen, die einem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden, konnte eine gesteigerte Fähigkeit von Zellen, die i-NOS-mRNA zu induzieren gezeigt werden (Zhu, 1995). In der späteren Schockphase, der Phase der

vasculären Dekompensation, wird die i-NOS in verschiedenen Geweben induziert (Thiemermann, 1993 und Kelly, 1997).

Die Hypothese, dass eine Überproduktion von NO durch die i-NOS eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks spielt, wurde durch Szabo und Thiemermann zusammengefasst (Szabo, 1994). Die Induktion der i-NOS ist assoziiert mit der Induktion der Arginin-Succinat-Synthetase, welche die i-NOS mit ihren Substraten aus den intrazellulären Quellen durch Recycling von L-Arginin aus L-Citrullin versorgt (Nussler, 1994). In einigen Zelltypen fördern die gleichen Stimuli, welche die i-NOS induzieren, auch das Membran-Transport-System für L-Arginin zur Ergänzung des intrazellulären L-Arginins aus extrazellulären Quellen.

Die Induktion der i-NOS kann sowohl toxische als auch protektive Effekte haben. Faktoren, welche die Konsequenzen der i-NOS Expression zu diktieren scheinen, umfassen den Typ des Insultes, den Gewebe-Typ, die Höhe und die Dauer der i-NOS-Expression und möglicherweise den Redox-Status des Gewebes (Szabó, 1999). Viel Aufmerksamkeit muss der Toxizität des durch die i-NOS gebildeten NO geschenkt werden. So produziert zum Beispiel die Induktion der i-NOS in Endothelzellen eine Endothelschädigung (Palmer, 1992). Es konnte gezeigt werden, dass sie die Zellatmung in Makrophagen und glatten Muskelzellen hemmt, was zur Zelldysfunktion und zum Zelltod führen kann. Wenn solche Prozesse in glatten Muskelzellen ablaufen, spielen sie eine Schlüsselrolle in der Pathogenese der vaskulären Hyporeaktivität und der progressiven vaskulären Dekompensation, die mit verschiedenen Formen des Kreislaufschocks assoziiert sind (Szabó, 1995). In deutlichem Kontrast dazu unterdrückt die Expression der i-NOS in Leberzellen die Endotoxin- und TNF α -induzierte Toxizität (Kim, 1997a und 1997b, Ou, 1997). Die Überexpression der i-NOS durch Gentransfer schränkt auch die LPS-induzierte Toxizität in Endothelzellen ein (Tzeng, 1997).

Die Rolle der i-NOS im hämorrhagischen Schock bzw. nach Ischämie/Reperfusion unterscheidet sich deutlich von anderen Insult-Typen. Sogar ein niedriger Spiegel kurzzeitiger i-NOS-Expression hat nachteilige Konsequenzen in Form direkter Toxizität, einer entzündlichen Antwort mit einer gesteigerten Sekretion proinflammatorischer Zytokine und einer erhöhten endothelialen Expression von P-Selektin- und ICAM-1-Rezeptoren (Cuzzocrea, 2002 und Olanders, 2002).

3.3.2.2.3 Die konstitutive/Endothelzellen-NO-Synthetase (ec-NOS = Typ 3)

Die ec-NOS ist membrangebunden in Endothelzellen lokalisiert (Michel, 1993), bildet kontinuierlich geringe Mengen NO und ist wie die b-NOS abhängig von Calmodulin, NADPH und Calcium (Marletta, 1993, Stuehr, 1997, Geller, 1998). Aktivitäten der ec-NOS wurden nachgewiesen bei der Regulation der Organdurchblutung und bei der Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Homöostase (Moncada, 1991). Das von der ec-NOS in picomolaren Mengen gebildete NO hat Einfluss auf den Blutdruck und den Gefäßtonus im Ruhestadium und sorgt für einen Zustand aktiver Vasodilatation (Rees, 1989). Es verringert den O₂-Bedarf durch Vasodilatation-induzierte Hypotonie (Nonami, 1997) und inaktiviert Oxidantien in Gefäßendothelzellen (Linass, 1997). Daneben verhindert das von der ec-NOS gebildete NO die Thrombozytenaggregation und macht dadurch die Endotheloberfläche antithrombogen. Gleichzeitig vermindert es die Lipidoxidation und hemmt die Leukozyten-Adhäsion am Endothel bzw. die Granulozyteneinwanderung (Vane, 1994, Kanwar, 1995 und Naito, 1998). Während Ischämie und Reperfusion wird von der ec-NOS ebenfalls vermehrt NO gebildet (Nonami, 1997). So konnte in einem Ischämie/Reperusionsmodell der hinteren Extremitäten des Kaninchens gezeigt werden, dass es während der Reperfusion zu einem massiven NO-Mangel kommt. Aufgrund der ischämischen Situation und der dadurch bedingten initialen Überproduktion von NO durch die ec-NOS kommt es in späterer Folge zur lokalen Argininverarmung um die NO-Synthetase. Dies wiederum kann zu Konformationsänderungen von ec-NOS-Untereinheiten führen, wobei molekularer Sauerstoff als Substrat bevorzugt wird. Dies resultiert in einem Mangel an NO und einer O₂-Radikalproduktion, die wiederum zu Organschäden führen kann (Hallström, 2002). In Ischämie/Reperusionsstudien des Intestinaltraktes wurde ebenfalls ein schützender Effekt für die Leber durch das über die ec-NOS gebildete NO bewiesen (Liu, 2002).

3.3.3 Folgen der exzessiven Produktion von NO

Neben den protektiven Wirkungen von NO kann eine übermäßige NO-Bildung für das Wirtsgewebe auch negative Auswirkungen haben (Gaboury, 1993). So führt die exzessive Bildung von NO zur Synthese von Peroxinitrit, indem NO mit den in der Hämorrhagie entstandenen Superoxidanionen reagiert.

3.3.3.1 Bildung von Peroxinitrit im hämorrhagischen Schock

Eine direkte Beobachtung der Rolle von Peroxinitrit im hämorrhagischen Schock unter experimentellen Bedingungen gestaltet sich äußerst schwierig. Aus theoretischer Sicht spricht einiges dafür, dass Peroxinitrit produziert wird, wenn NO und Superoxid gleichzeitig im Gewebe vorhanden sind (Beckmann, 1996 und Szabó, 1996). O₂-Radikale werden während der Reperfusion in großen Mengen produziert und bewirken eine verstärkte Umwandlung von NO in Peroxinitrit und damit eine geringere Aktivierung der Guanylatcyclase.

Unter verschiedenen Bedingungen können die NO-Synthetasen, beide Vorläufer von Peroxinitrit, NO und Superoxid, produzieren. Solche Bedingungen können unter normalen Umständen nicht gefunden werden, aber sie können bei der Verringerung von L-Arginin entstehen (Huk, 1997 und Mayer, 1998). Niedrige Spiegel von L-Arginin können infolge Reperfusion mit kristalliner Lösung erwartet werden (Angele, 1998), trotz der Aktivierung eines Enzym-Systems, welches das Endprodukt L-Citrullin zurück zu L-Arginin recycelt. Bei niedriger zellulärer Arginin-Konzentration produzieren die NO-Synthetasen sowohl NO als auch Superoxid (Fleckenstein, 1991, Tan, 1993, Kapoor, 1994 und Huk, 1997) und die daraus resultierende Bildung von Peroxinitrit kann zur Zytotoxizität beitragen. Dieser Mechanismus wurde in Neuronen und in Makrophagen, die i-NOS exprimieren, bestätigt (Xia, 1996 und 1997).

3.3.3.2 Auswirkungen von Peroxinitrit auf den Organismus

Peroxinitrit gilt generell als ein hochreaktives, zytotoxisches Molekül, das u. a. Lipidperoxidation bewirkt, die Membran-Ionenpumpen und die mitochondriale Zellatmung hemmt und verschiedene Proteine modifiziert. Folge dieser Wirkungen sind zelluläre Energieverarmung, zelluläre Dysfunktion und letztendlich Zelltod (Beckmann, 1996). Peroxinitrit kann aber in niedriger Konzentration in Anwesenheit eines intakten antioxidativen Systems auch physiologische Effekte vermitteln. Zur Zeit sind nur wenige Informationen verfügbar bezüglich dieser physiologischen Rollen von Peroxinitrit, während sich die Beweise für die Rolle von Peroxinitrit unter pathologischen Bedingungen ausdehnen. Kleine Mengen Peroxinitrit werden auch unter physiologischen Bedingungen ständig produziert, weil die meisten Zellen permanent niedrigen NO-Spiegeln infolge der konstitutiven NO-Produktion ausgesetzt sind und gleichzeitig auch Superoxid von Mitochondrien und anderen zellulären Quellen produziert wird (Nohl, 1994). Im intakten

Organismus reichen die endogenen antioxidativen Systeme aus, um solch niedrige Spiegel von Peroxinitrit zu neutralisieren. Es konnte zudem gezeigt werden, dass eine niedrige Konzentration von Peroxinitrit die neutrophile Adhäsion hemmt (Lefer, 1997). Hierbei bildet Peroxinitrit NO-Addukte mit Glucose, Thiolen und anderen Spezies (Moro, 1995), welche als NO-Donatoren agieren können und die Guanylatcyclyase aktivieren (Mayer, 1995 und Tarpey, 1995).

Nach Erkenntnissen aus in vitro-Experimenten bestimmt das Verhältnis von Superoxid und NO die offensichtliche Reaktivität von Peroxinitrit (Szabó, 1998). Während Peroxinitrit manche Enzyme inaktiviert, wird die katalytische Aktivität einiger Enzyme durch Peroxinitrit erhöht. Ein Hauptbeispiel dafür ist die Cyclooxygenase. Peroxinitrit induziert die Oxidation von Sulfhydrylgruppen und Thioethern und die Nitrierung und Hydroxylierung von aromatischen Verbindungen, wie Tyrosin, Tryptophan und Guanin. Diese Reaktionen können, wenn sie während der Reaktion von Peroxinitrit mit verschiedenen Zellenzymen stattfinden die katalytische Aktivität dieser Enzyme deutlich unterdrücken und eine Reihe entscheidender Enzyme der mitochondrialen Atmungskette hemmen. Ein Übermaß an NO reduziert die Oxidation, die durch Peroxinitrit verursacht wird (Rubbo, 1994, Szabó, 1995 und Miles, 1996).

3.3.4 Exogene Regulation der NO-Menge im hämorrhagischen Schock

3.3.4.1 Blockade der NO-Synthetasen

Die oben genannten Studien zeigen, dass NO eine Schlüssel-Signal-Funktion im hämorrhagischen Schock hat. Die Quellen der NO-Produktion im hämorrhagischen Schock beinhalten sowohl die ec-NOS als auch die i-NOS. Um einen genaueren Aufschluss über die unterschiedlichen Konsequenzen, ob positiv oder negativ, des von der ec-NOS und der i-NOS gebildeten NO im hämorrhagischen Schock zu bekommen und die Frage zu beantworten, welche Effekte durch eine niedrigere NO-Produktion entstehen können, wurden experimentelle Studien durchgeführt, welche die NO-Synthetasen blockiert haben.

3.3.4.1.1 Unselektive Blockade der NO-Synthetasen

Alle NOS-Isoformen können zu einem unterschiedlichen Grad durch N^G -substituierte L-Arginin-Analoga gehemmt werden, z.B. N^G -Methyl-L-Arginin (L-NMA) oder N^G -Nitro-L-

Arginin (L-NAME). L-NAME-Infusion, welche die ec-NOS etwas mehr als die i-NOS hemmt, erhöht die Schäden an Organen von Ratten, die einem hämorrhagischen Schock und Reperfusion unterzogen wurden (Harbrecht, 1995 und 1997, Adachi, 1998 und Todorovic, 1998). Im Gegensatz dazu schützen niedrige Dosen L-NMA vor Organschädigungen und verbessern die Überlebensrate (Yao, 1996). Günstige Effekte von NOS-Inhibitoren im hämorrhagischen Schock beinhalten einen Anstieg des Cardiac-output (Klabunde, 1993 und Yao, 1996), eine Verbesserung des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate (Lieberthal, 1991) und bieten Schutz vor der Entwicklung gastrischer Läsionen (Zingarelli, 1992.) Mit dem NOS-Blocker N(Omega)-Nitro-L-Arginin (L-NOARG) konnte keine signifikante Verbesserung des Blutflusses und der Vasomotorik im Diaphragma von Ratten während des hämorrhagischen Schocks bestätigt werden (Chen, 1999).

Es ist wahrscheinlich, dass die protektiven Effekte von NOS-Inhibitoren im hämorrhagischen Schock mit der Vorbeugung von zytotoxischen Effekten, die durch Peroxynitrit begünstigt werden, zusammenhängen. Allerdings stellt die unspezifische Hemmung der NO-Synthetasen mittels der oben genannten gängigen Inhibitoren L-NAME und L-NMA eine Gratwanderung bei der Dosisfindung dar, da die totale Unterdrückung der NO-Produktion zu unerwünschten Nebeneffekten führen kann (Harbrecht, 1995 und Hobbs, 1999). Aus diesem Grund wurden Studien durchgeführt, welche die ec-NOS oder die i-NOS selektiv blockierten.

3.3.4.1.2 Selektive Blockade der ec-NOS

Wird die kontinuierliche NO-Freisetzung aus dem Endothel experimentell durch die kompetitive Inhibitorsubstanz der ec-NOS, Monomethylarginin, reduziert, so kommt es zu deutlichen Steigerungen des peripheren Widerstands und des arteriellen Blutdrucks (Rees, 1989). Auch der Koronartonus, gemessen an epikardialen Arterien und myokardialen Widerstandsgefäßen, wird durch den Inhibitor deutlich gesteigert (Amezcuca, 1989). Daraus ergibt sich, dass die endothelvermittelte Dilatation einen wichtigen Faktor für die Regulation des Blutdrucks darstellt. Entsprechend findet man bei akutem und chronischem Bluthochdruck eine Abnahme der endothelabhängigen Dilatation. Bei akuten, kurzzeitigen Hochdruckkrisen kommt es durch die damit verbundene Überdehnung der Gefäßwand unmittelbar zu einer Reduktion der basalen NO-Freisetzung mit einer Zunahme des Gefäßtonus. Bei chronischem Hochdruck ist, abhängig von der Genese, nicht nur die endotheliale NO-Bildung abgeschwächt, sondern auch die Empfindlichkeit der Gefäße gegenüber dem freigesetzten NO. Hemmung der endothelialen NO-Produktion kann eine

mikrovasculäre Störung induzieren, was eine Rolle von NO bei der Kontrolle der vasculären Permeabilität impliziert (Amezcuca, 1989).

Dieses Phänomen hat eine wichtige Auswirkung für die Pathogenese des hämorrhagischen Schocks, wo eine niedrigere Aktivität der ec-NOS unerwünschte Effekte hat (Szabo, 1992). Studien zeigen, dass der Organismus im hämorrhagischen Schock sehr empfindlich auf die Hemmung der ec-NOS reagiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass der hämorrhagische Schock assoziiert ist mit einer Beeinträchtigung der endothelialen NO-Bildung und Reduktion der endothelabhängigen Relaxation (Wang, 1993 und Szabo, 1994). Setzt man dann noch einen Inhibitor der ec-NOS ein, resultiert daraus eine zusätzliche Hemmung der endothelialen NO-Synthese, was schwerwiegende Konsequenzen für die Mikrozirkulation hat (Salzmann, 1998). So wird in einer Studie, die mögliche Effekte der NO-Synthetase-Hemmung auf die Leber in einem Darm-Ischämie/Reperfusionsmodell untersucht, dem über die ec-NOS produzierten NO sogar eine deutliche Leberprotektive Wirkung zugeschrieben (Liu, 2002), so dass in einer Hemmung der ec-NOS negative Folgen speziell für die Leber resultieren.

3.3.4.1.3 Selektive Blockade der i-NOS

Um zu erfahren, welche Effekte die i-NOS-Hemmung alleine hervorrufen kann, wurden in verschiedenen Studien selektive i-NOS-Inhibitoren in einem hämorrhagischen Schockmodell getestet. Es zeigte sich, dass Aminoguanidin, ein Inhibitor mit niedriger Stärke aber hoher Selektivität für die i-NOS, die Überlebensrate bei Nagetieren erhöht (Thiemermann, 1997 und Hua, 1999). Mercaptoalkylguanidin (MAG) repräsentiert eine andere Klasse von i-NOS-Inhibitoren (Southan, 1996), die eine zusätzliche unabhängige, pharmakologische Wirkung haben, nämlich die Hemmung der durch Peroxinitrit induzierten Oxidationen (Szabó, 1997). Ein weiteres Mitglied der Klasse dieser Verbindungen, Mercaptoethylguanidin (MEG), hat deutlich protektive Effekte in Nagetiermodellen mit hämorrhagischem Schock, wenn es kurz vor der Reperfusion gegeben wird (Zingarelli, 1997). So erhielt MEG den systemischen Blutdruck aufrecht, verhinderte in vivo die vaskuläre Dekompensation und hemmte die Reduktion der vaskulären Kontraktilität ex vivo. Diese Effekte beruhen höchstwahrscheinlich sowohl auf der Hemmung der i-NOS als auch auf dem Abfangen von Peroxinitrit, wobei der relative Beitrag dieser beiden Faktoren noch festzustellen bleibt (Zingarelli, 1997). Die Effekte von MEG im hämorrhagischen Schock wurden auch in einem Großtiermodell an Schweinen untersucht. Die Behandlung mit MEG verbesserte signifikant den Blutdruck

während der Reperfusion. Der Druck der A. pulmonalis, der Gefäßwiderstand sowie der O₂-Verbrauch stiegen in Antwort auf die MEG-Behandlung. Außerdem stieg unter der Gabe von MEG die Überlebensrate der Tiere deutlich an (Szabó, 1999a).

Um zu ermitteln, ob induziertes NO an den pro-inflammatorischen Signalen infolge der Reperfusion beteiligt ist, wurden zwei Untersuchungen durchgeführt. Ratten, die einem hämorrhagischen Schock und Reperfusion unterzogen wurden, erhielten eine Infusion mit dem i-NOS Inhibitor N⁶-iminoethyl-L-lysin (L-NIL), die vor der Reperfusion begann (Hierholzer, 1998). Die nächste Studie verglich die Antworten von i-NOS-knocked-out Mäusen auf einen hämorrhagischen Schock mit den Antworten von Wild-Typ Mäusen mit dem gleichen genetischen Background (Moore, 1994). In beiden Studien war die Hemmung der i-NOS assoziiert mit einer deutlichen Reduktion der Neutrophilen-Infiltration in der Lunge, die als ein wichtiger Effektor der Gewebeschädigung im reperfundierten hämorrhagischen Schock betrachtet wird, und ebenso eine reduzierte Leber- und Lungenschädigung (Hierholzer, 1998, Suzuki, 2000 und Han 2003). Ähnlich protektive Effekte wurden auch bei der Verwendung des NO-Fängers NOX 100 beobachtet (Szabó, 1999). Diese Verbindung entfernt effektiv das extrazelluläre Übermaß an NO und bestätigt, dass NOX effektiv die NO-Verfügbarkeit reduziert. Weitere Studien zeigten einen schützenden Effekt der i-NOS Inhibitoren bei Blasenschädigung und Aufrechterhaltung von geringer Blasenmotilität infolge hämorrhagischen Schocks (Szabó, 1999).

Die Rolle des von der i-NOS freigesetzten NO als ein Verstärker der inflammatorischen Antwort wird auch durch die Beobachtungen gestützt, dass eine Hemmung der i-NOS die TNF-Produktion in der verzögerten Phase der allergischen Encephalomyelitis (Brenner, 1997) und die IL-1-Produktion bei Arthritis supprimiert (Pelletier, 1998 und Brahn, 1998). In einem Leishmanien-Mäuse-Modell wird durch eine i-NOS-Hemmung die IF γ -Produktion (Diefenbach, 1998) und bei einer Peritonitis die Chemokinen-Expression supprimiert (Ajuebor, 1998). Wichtig dabei ist aber, dass die Rolle der i-NOS weitgehend von den entzündlichen Bedingungen abhängig ist. Die Beteiligung der i-NOS geht vom Verstärker und letztendlichen Mediator der Gewebeschädigung bis hin zu zytoprotektiven oder antiinflammatorischen Rollen. Ein Hauptbeispiel dafür ist die allergische Encephalomyelitis (EAE), bei der Studien darauf hindeuten, dass die i-NOS ein pathologischer Faktor in der Induktionsphase der EAE ist, aber eine hemmende Rolle in der progressiven Phase der EAE spielt (Zielasek, 1995, Brenner, 1997, Okuda, 1998 und Fenyk-Melody, 1998). Ein weiteres Beispiel sind verschiedene Formen von Virus-Infektionen mit assoziierter Entzündung, wobei die Induktion der i-NOS nötig und ausreichend für einen antiviralen Effekt von IF γ ist. So

erhöht die i-NOS-Hemmung die Virusreplikation und führt zu einem Anstieg der Letalität in einem systemischen Virus-Infektions-Modell (Karupiah, 1993). Mit anderen Worten: der mögliche antiinflammatorische Effekt der i-NOS-Hemmung wird durch die ungünstigen Wirkungen der i-NOS-Hemmung zunichte gemacht.

Auf diese Weise vervollständigt sich das Bild, dass es sowohl direkt durch die Bildung von Peroxinitrit mit seiner assoziierten Toxizität als auch indirekt durch die Verstärkung der inflammatorischen Antwort zur Organschädigung kommen kann. So scheinen selektive i-NOS-Inhibitoren im hämorrhagischen Schock protektiv zu sein (Southan 1996, Szabó, 1997, Thiernemann, 1997, Zingarelli, 1997 und Hua, 1999).

3.3.4.2 Stimulation der NO-Produktion

Ausgehend von der Feststellung, dass NO sowohl protektive Wirkungen in der Initialphase des hämorrhagischen Schocks aufgrund seiner Fähigkeit als Radikalfänger hat als auch als ein potenter Hemmstoff der Adhäsion von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten am Endothel gilt (Gaboury, 1993, Vane, 1994, Daughters, 1996, Naito, 1998 und Jourdeuil, 2001) und eine Hemmung der NO-Produktion durchaus auch negative Folgen haben kann (Salzmann, 1998), wurden experimentelle Studien begonnen, welche die NO-Bildung mittels NO-Donatoren stimulieren.

Wie oben schon beschrieben hängen die spezifischen Wirkungen von NO weitestgehend davon ab, in welcher Menge NO gebildet wird. Erste Studien kamen zu dem Schluss, dass die Verfügbarkeit von L-Arginin, dem Ausgangsprodukt von NO, häufig der limitierende Faktor bei der NO-Produktion ist. Dies betrifft die Entstehung von NO durch die i-NOS stärker als durch die ec-NOS (Thiernemann, 1994). So wurde bei Ratten unter physiologischen Bedingungen schon nach der ersten Injektion von L-Arginin ein deutlicher Anstieg der sinusoidalen Perfusion gemessen (Bauer, 1997a). Ausgehend von dieser Beobachtung folgten Studien, die die Auswirkungen nach exogener Gabe von L-Arginin im hämorrhagischen Schock untersuchten. So verringert eine L-Arginin-Gabe signifikant die Radikal-Entstehung durch die ec-NOS, da immer genügend Substrat für die NO-Bildung zur Verfügung steht (Huk, 1997 und Anaya-Prado, 2003). Da dies die verfügbare Menge an NO erhöht, ist somit auch ein Schutz vor Vasokonstriktion und Ödemen in der Reperfusionphase gegeben. Eine neuere Studie kommt zu dem Ergebnis, dass L-Arginin sogar direkt als Radikalfänger wirken kann (Lass, 2002). Gleichzeitig verbessert die Gabe von L-Arginin signifikant die Makrophagen-Funktion bei Ratten nach hämorrhagischem Schock (Angele, 1999), stärkt

damit das Immunsystem, verbessert die Wundheilung (Angele, 2002) und schützt die Leber (Uhlmann, 1998 und Angele, 2000). Dies alles ist wahrscheinlich bedingt durch die Abnahme der erhöhten Interleukin-6-Spiegel und die verbesserte Organdurchblutung.

Eine andere Möglichkeit bieten die schon seit langem bekannten Nitrovasodilatoren wie zum Beispiel Nitroprussidnatrium und S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP), wobei auch hier NO das aktive stimulierende Prinzip darstellt (Ignarro, 1989). Die Infusion von SNAP bei Ratten nach hämorrhagischem Schock verringert signifikant die Infiltration von polymorphkernigen neutrophilen Leukozyten und die Entstehung endothelialer Dysfunktionen im Splanchnikusgebiet (Symington, 1992). Die Gabe von Nitroprussidnatrium im hämorrhagischen Schock kann die Leberfunktion verbessern und die Schäden im Gesamtorganismus reduzieren (Anaya-Prado, 2003). Erklärbar ist dies einerseits durch die Wirkung des vermehrten NO als Radikalfänger und andererseits durch die Blockade von TNF- α und anderer inflammatorischer Zytokine. Weitere NO-Donatoren wie zum Beispiel Spermine-NO und Sydnominine (SIN-1) reduzieren ebenfalls die Leukozyten-Endothelinteraktionen und Mastzelldegranulationen nach Ischämie und Reperfusion (Kurose, 1994).

Ein neuartiger NO-Donor, der NO graduell und konzentrationsabhängig freisetzt, ist S-Nitroso-Humanserumalbumin (S-NO-HSA). Erste Studien am Ischämie/Reperusionsmodell eines isolierten Kaninchenherzens (Gasser, 1997 und Hallström, 1997), der hinteren Extremität eines Kaninchens (Hallström, 2002), des Epigastriums bei Ratten (Mittermayr, 2003) sowie am Herzmuskel bei Schweinen (Dworschak, 2004) scheinen die Hypothese zu stützen, dass durch den Einsatz von S-NO-HSA die ec-NOS über ein negatives Feedback die Produktion von NO verringert (Griscavage, 1995). So reicht der ec-NOS die lokale Arginin-Konzentration zur NO-Bildung aus und es kommt nicht zur Konformationsänderung und Radikalbildung. Gleichzeitig wird ein NO-Mangel am Ende der Ischämie und zu Beginn der Reperfusion durch das von S-NO-HSA freigesetzte NO abgefangen. Damit ist immer genügend NO im Organismus vorhanden um Radikale abzufangen, einer endothelialen Dysfunktion und somit einer Mikrozirkulationsstörung vorzubeugen und Muskelödeme zu verhindern (Neumayer 1999, Hallström, 1999 und 2002, Mittermayr, 2003 und Dworschak, 2004).

4. Fragestellung

Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen müssen neben freien Sauerstoffradikalen und direkt toxisch wirkendem NO als wesentliche Ursachen hepatozellulärer Schädigungen diskutiert werden. Bisherige Untersuchungen am Langzeitmodell des hämorrhagischen Schocks haben gezeigt, dass es nach hämorrhagischem Schock sowohl zu einer anhaltenden Leukozytenadhäsion als auch zu einer signifikanten Verschlechterung der hepatischen Mikrozirkulation kommt, die noch Tage nach Schock nachweisbar ist.

Wie oben ausführlich beschrieben kann man aus den vorausgegangenen Studien den Schluss ziehen, dass

1. dem NO eine wichtige Rolle während des hämorrhagischen Schocks zukommt und
2. in Abhängigkeit von der Dosierung und des Einsatzzeitpunktes NOS-Inhibitoren positive oder negative Auswirkungen haben können und
3. der basale NO-Spiegel, wahrscheinlich durch die ec-NOS geliefert, organschützende Effekte haben soll aber
4. die Aktivität der ec-NOS durch die Verfügbarkeit von L-Arginin im reperfundierten hämorrhagischen Schock limitiert wird.

Deshalb kann es im hämorrhagischen Schock sinnvoll sein, bereits in der frühen Reperfusionphase NO aufgrund seiner protektiven Wirkung auf die Organe exogen zuzuführen.

In der vorliegenden Studie werden erstmalig in einem hämorrhagischen Schockmodell mit anschließender Intravitalmikroskopie der Leber die Wirkungen des neuartigen exogenen NO-Donors S-NO-HSA auf die schockinduzierten morphologischen Veränderungen in der Lebermikrozirkulation und die Leukozyten/Endothelinteraktionen der Leber untersucht.

Von besonderer Bedeutung waren die Effekte des exogenen NO im Hinblick auf die

- pathologisch gesteigerte Leukozytenadhäsion in den Sinusoiden der Leber und
- die hepatische Mikrozirkulation

im hämorrhagischem Schock

- nach fünf Stunden und
- nach vierundzwanzig Stunden.

Folgende Fragestellungen sollten mit der vorliegenden Studie beantwortet werden:

- Ist es möglich, durch den Einsatz des exogenen NO-Donors S-NO-HSA, der NO graduell und konzentrationsabhängig freisetzt, den bestehenden NO-Mangel am Ende der Ischämie zu Beginn der Reperfusion zu beheben (Verbesserung des Vasotonus)?
- Kann die exogene Gabe von S-NO-HSA die schockinduzierten Alterationen der Leber verhindern?
- Ist eine effektive Prophylaxe der späten hepatischen Mikrozirkulationsstörung und Leukozytenadhäsion nach hämorrhagischem Schock durch exogene S-NO-HSA-Gabe während der frühen Reperfusionsphase möglich?

III. Material und Methoden

1. Versuchsvorbereitung

1.1 Versuchstiere

Der Antrag auf Genehmigung des Versuchsvorhabens wurde gemäß §8 des Tierschutzgesetzes (Genehmigungspflicht bei Wirbeltierversuchen) von der zuständigen Tierschutzkommission überprüft und vom Landrat des Saarpfalzkreises genehmigt.

Zur Versuchsdurchführung wurden weibliche Ratten des Sprague-Dawley Aufzuchtstammes verwendet, die vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover bezogen wurden. Die Tiere hatten ein Körpergewicht von 180-200g und waren 9-11 Wochen alt. Bis zum Versuchsbeginn waren die Tiere im Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universitätskliniken des Saarlandes in Homburg eingestellt. Die Unterbringung erfolgte in Gruppen zu 2-3 Tieren in Edelstahlkäfigen mit durchsichtigem Plastikboden und Sägespaneinstreu bei einer Raumtemperatur von 20-24°C und 70% Luftfeuchtigkeit bei einem festen Tag-Nacht-Zyklus von je 12 Stunden. Die Ratten hatten ständig Zugang zu pelletiertem Trockenfutter (Altromin[®] GmbH, Lage, Deutschland) und Leitungswasser stand ad libitum zur Verfügung. In die Versuchsreihe wurden nur Tiere aufgenommen, die keine Anzeichen von Erkrankungen sowie ein normales Futteraufnahme- und Putzverhalten zeigten (Hollmann, 2000).

1.2 Anästhesie

Um eine Beunruhigung durch eine neue Umgebung zu vermeiden, wurden die Ratten unverzüglich, nachdem sie den Tierstall verlassen hatten, gewogen und anästhesiert. Die Narkose wurde durch eine intraperitoneale Gabe von Pentobarbital-Natrium (Narcoren[®], Rhone Merieux GmbH, Laupheim, Deutschland) in einer Dosierung von 50mg/kg Körpergewicht eingeleitet. Zur Aufrechterhaltung der Narkose wurde bei Bedarf Pentobarbital in Einzeldosen zwischen 1,25 und 2,5 mg/kg KG intravenös nachinjiziert. Die Tiere der 5h Versuchsgruppen waren während der gesamten Versuchsdauer von 5h in Narkose. Die Tiere der 24h Versuchsgruppen wachten nach 5h auf, wurden über Nacht in Käfige eingestallt und nach 24h erneut für 1h anästhesiert. Alle Versuchstiere wurden am Ende des Versuches mit einer Überdosis Pentobarbital eingeschläfert (Gärtner, 1993).

1.3 Präparation der Tiere

1.3.1 Präparation der 5h Tiere

Sobald ein tiefes Toleranzstadium der Narkose eingetreten war erfolgte eine sorgfältige Rasur des Abdomens von der letzten Rippe bis zur Symphyse. Ebenfalls geschoren wurden der Bereich zwischen den Mandibularästen und dem Manubrium Sternii sowie die linke Inguinalregion. Anschließend erfolgte eine gründliche Desinfektion der rasierten Hautgebiete und des Schwanzes mit alkoholischer Lösung (Kodan[®], Schülke & Mayer GmbH, Norderstedt, Deutschland). Um einen periphervenösen Zugang zur exakteren Narkosenachdosierung und zur Volumensubstitution in der Reperfusionphase zu erhalten, wurde zuerst eine sterile Venenverweilkanüle (Optiva*2, 0,9mm, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) in die Vena caudalis mediana des Schwanzes gelegt (Greene, 1963). Damit während des Versuches eine konstante Körpertemperatur von 37°C gewährleistet werden konnte und die Tiere nicht auskühlten, wurden sie in Rückenlage auf eine Temperatur-kontrollierte Korkplatte mit Wärmefolie (Conrad Electronic, Hirschau, Deutschland) gelagert. Danach wurde das gesamte Operationsfeld mit sterilen Tüchern abgedeckt und ausschließlich mit sterilem Instrumentarium gearbeitet, um die Sterilität der Präparation zu gewährleisten und jegliche bakterielle Kontamination zu vermeiden. Die Präparation begann mit einem circa zwei Zentimeter langen Hautschnitt an der ventralen Halsseite von der Mandibula bis zum Manubrium sternii. Danach konnte durch stumpfes Spalten der langen Zungenbeinmuskeln (Mm. sternohyoidei, Mm. sternothyroidei, Mm. omohyoidei und Mm. thyreohyoidei) und der prätrachealen Gefäße die Trachea freigelegt und vorgelagert werden. Ein Faden (3,0 metric, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) wurde caudal um die Trachea geschlungen und möglichst weit rostral zwischen zwei Knorpelspangen quer tracheotomiert. In diese Öffnung konnte nun ein circa vier Zentimeter langer Polyethylenschlauch (1,8 x 2,4 mm, Braun, Melsungen, Deutschland) als Tubus eingeführt werden, der eine ausreichende Ventilation beider Lungenflügel während des gesamten Versuches gewährleistete und ein Absaugen von im Übermaß produzierten Bronchialschleim möglich machte. Die caudal liegende Fadenschlinge wurde verknotet um den Tubus zu fixieren. Anschließend wurde die Arteria carotis communis sinistra stumpf zwischen den langen Zungenbeinmuskeln und dem M. sternomastoideus freipräpariert. Vorsichtig wurden anliegende Teile des Truncus vagosympathicus von der Arterie gelöst. Danach wurde rostral eine Fadenschlinge um die Arterie gelegt und sofort ligiert. Nun wurde soweit caudal wie

möglich eine mikrochirurgische Gefäßklemme auf die Arterie gesetzt, um jeglichen Blutstrom zu unterbrechen. Rostral der Gefäßklemme wurden nochmals zwei Fadenschlingen vorgelegt. Jetzt konnte die A. carotis communis rostral der Mikroklemme und der Fadenschlingen inzidiert und der Thermodilutionskatheter (Typ 9490 E Microprobe F#1.5.THMP, Columbus Instruments, Ohio, USA) zur transpulmonalen Messung des Herzzeitvolumens bis zur Mikroklemme vorgeschoben werden. Nacheinander wurden beide Fadenschlingen mit dem Katheter verknötet und dann die Gefäßklemme entfernt. Nun konnte die Spitze des Katheters, die mit einer Thermistorsonde versehen ist, bis zum Arcus aortae vorgeschoben werden. Dann wurde der Katheter über eine Steckverbindung mit dem Cardiac Output-Computersystem (Cardiotherm 500, Columbus Instruments, Ohio, USA) verbunden.

Im Anschluss daran wurde der mediale Hautschnitt am distalen Ende nach rechts lateral erweitert um die Vena jugularis externa dextra zwischen dem M. sternomastoideus und dem M. clavotrapezius darzustellen. Nach einer stumpfen Freipräparation wurde die Vene ebenfalls rostral mit einem Faden ligiert, caudal mit einer Gefäßklemme abgeklemmt und eine Fadenschlinge vorgelegt. Nun konnte das Gefäß inzidiert werden und ein mit physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland) gefüllter Polyethylenkatheter (0,4 x 0,8 mm, Portex, Hythe, England) nach Fixierung mit der Fadenschlinge und Öffnung der Gefäßklemme die Vena vava cranialis passierend bis in das Atrium dextrum vorgeschoben werden. Dieser zentrale Venenkatheter, an seinem außenliegenden Ende mit einer Kanüle versorgt, diente zur Verabreichung des Thermoindikators (0,15 ml 0°C kalte NaCl-Lösung 0,9%) zur Messung des Herzzeitvolumens. Hierbei war es wichtig, dass der Polyethylenschlauch möglichst kurz gehalten wurde, damit die kalte NaCl-Lösung nicht im Katheter selbst stehen blieb, sondern einen kurzen Temperaturabfall im Blut bewirken konnte. Dieser zentralvenöse Zugang diente außerdem während der Intravitalmikroskopie dazu, die Fluoreszenzfarbstoffe zu applizieren.

Zuletzt wurde noch die Arteria femoralis sinistra kanüliert, um kontinuierlich den arteriellen Blutdruck und die Pulsfrequenz aufzeichnen zu können. Die A. femoralis verläuft sehr oberflächlich an der medialen Oberschenkelseite zwischen dem M. adductor brevis und dem M. caudofemoralis und wurde bis zum Leistenband freipräpariert. Zu achten war auf eine sorgfältige Trennung der Arterie von den begleitend mitverlaufenden Vena und Nervus femoralis. Auch hier erfolgte, nachdem distal abgebunden und proximal mit der Mikroklemme abgeklemmt war, eine Inzision der Arterie und dann konnte ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllter Polyethylenkatheter (0,4 x 0,8 mm, Portex, Hythe, England), an dessen Ende wiederum eine Kanüle befestigt war, in die Arterie vorgeschoben

werden. Eine Ligatur mit einem vorgelegten Faden sicherte diesen arteriellen Zugang und die Verbindung mit einem Druckaufnehmer (Statham-Element, P32 Db, Gould, Oxford, California, USA) konnte hergestellt werden. So konnte während des ganzen Versuchs der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz überwacht werden. An der A. femoralis wurden zudem alle während des Versuchs durchgeführten Blutentnahmen zur Schockinduktion, zur Messung der Hämodynamik und der klinischen Chemie, vorgenommen.

1.3.2 Präparation der 24h Tiere

Während die Präparation der 5h Tiere exakt in der eben beschriebenen Weise erfolgte, wurde bei den 24 h Tieren die gleiche Technik nur in einer etwas anderen Reihenfolge angewendet. Bei diesen Tieren wurde am ersten Tag nur die A. femoralis kanüliert, die Versuchsdauer von 5h eingehalten und danach der Katheter aus der Arterie entfernt und die Arterie ligiert. Anschließend wurde die Haut mit einem Faden (Dexon II 3-0, geflochten&resorbierbar, Braun, Melsungen, Deutschland) mittels Einzelheften vernäht und die Aufwachphase eingeleitet. Die Blutversorgung der unteren Gliedmaße war durch lateral verlaufende Äste der A. femoralis nicht beeinträchtigt und auch die Bewegung der linken Hintergliedmaße war bei vorsichtiger Präparation unter Schonung des N. femoralis nicht gestört. Die Tiere wurden dann über Nacht in Käfige eingestellt, bei freiem Zugang zu Futter und Wasser, und nach 24 h erneut anästhesiert. Nun konnte zuerst eine Tracheotomie und anschließend die A. carotis communis sinistra kanüliert werden. In diesem Fall diente sie für 1h dem invasiven Kreislaufmonitoring und der Blutentnahmen.

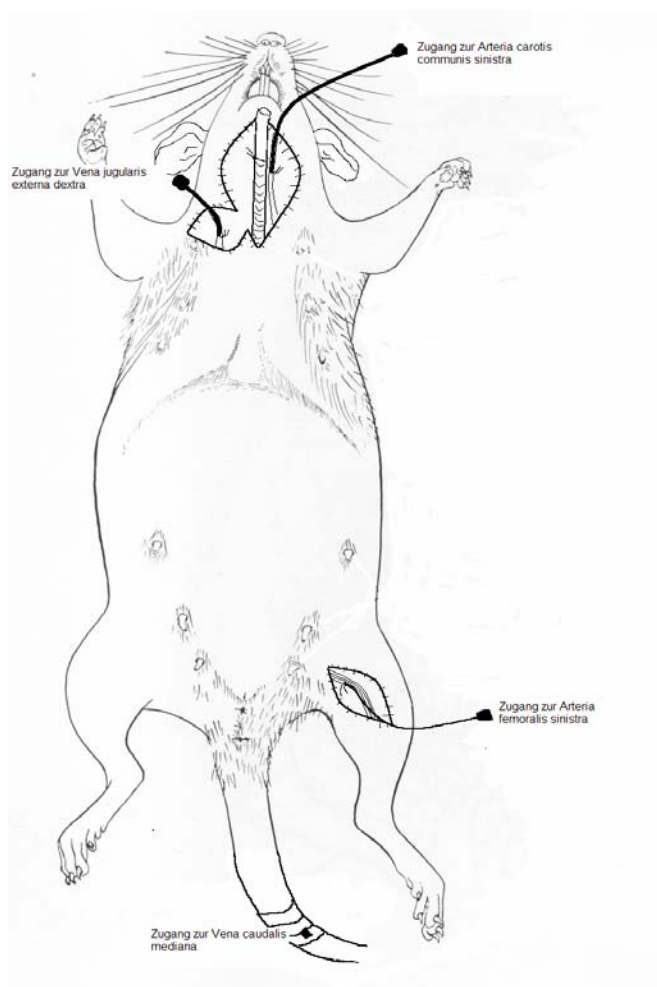


Abb. III.1 Arterielle und venöse Zugänge der präparierten Ratten

1.4 Testsubstanzen

1.4.1 S-NO-HSA (Medikament)

S-Nitroso Human Serum Albumin (S-NO-HSA), ein neues, stabiles Nitrosyl-Humanalbumin (> 0.80 mol S-NO/mol protein), das in vivo kontinuierlich NO freisetzt, wurde am Ludwig-Boltzmann-Institut für Traumatologie (Prof. Dr. Redl) in Wien nach einer neuen Technik synthetisch hergestellt (Gasser, 1997 und Hallström, 1997) und für diese Studie zur Verfügung gestellt.

1.4.2 HSA (Placebo)

Als Placebo stand unverändertes Human-Serum-Albumin (HSA) zur Verfügung (Baxter-Immuno AG, Wien, Österreich).

1.5 Versuchsgruppen

Innerhalb dieser Studie wurden zwei Versuchsreihen, unterteilt nach der Zeitdauer der Versuche in 5h und 24h, mit je drei Versuchsgruppen (S-NO-HSA-Schockgruppe, HSA-Placeboschockgruppe und Kontrollgruppe ohne Schock) gebildet.

Versuchsgruppen	Anzahl der Tiere	Testsubstanzen	Schockphase	Reperfusionenphase 5h	Intravitalmikroskopie
S-NO-HSA 5h	n= 8	5ml einer Lösung 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml	60 min	60% Citrat-Blut + Ringerlösung	nach 5h
HSA 5h	n= 8	5 ml einer 1,5%igen HSA-Lösung	60 min	60% Citrat-Blut + Ringerlösung	nach 5h
Kontrolle 5h	n= 8	Ringer-Lösung	kein Schock	10ml/kg/h Ringerlösung	nach 5h

Tab. III.1 Versuchsreihe 5h

Versuchsgruppen	Anzahl der Tiere	Testsubstanzen	Schockphase	Reperfusionenphase 5h	Intravitalmikroskopie
S-NO-HSA 24h	n= 6	5ml einer Lösung 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml	60 min	60% Citrat-Blut + Ringerlösung	nach 24h
HSA 24h	n= 8	5 ml einer 1,5%igen HSA-Lösung	60 min	60% Citrat-Blut + Ringerlösung	nach 24h
Kontrolle 24h	n= 8	Ringer-Lösung	kein Schock	10ml/kg/h Ringerlösung	nach 24h

Tab. III.2 Versuchsreihe 24h

2. Versuchsdurchführung

Die Versuchsdurchführung erfolgte randomisiert und verblindet. Bei den 5h und 24h Kontrollgruppen wurde kein hämorrhagischer Schock induziert. Es erfolgte lediglich die gleiche Katheterisierung wie bei den Versuchsgruppen zur Aufzeichnung der Kreislaufwerte und für die Blutentnahmen zur Laboruntersuchung. Unterstützend erhielten die Ratten

während der gesamten Versuchsdauer eine Infusion mit 10 ml/kg/h Ringer-Lösung (Ringer, Braun, Melsungen, Deutschland) über den peripheren Katheter mittels eines Perfusors. Dies entspricht dem Erhaltungsbedarf der Tiere und gleicht das Volumendefizit während der Narkose aus.

2.1 Phase des hämorrhagischen Schocks

An die Präparation der 5h und 24h Versuchsgruppen wurde eine 10-minütige Stabilisierungsphase (Steady state) angeschlossen, die zur Erholung der Ratten diente. Danach wurde mit der Einleitung des hämorrhagischen Schocks begonnen. Dazu musste der arterielle Blutdruck innerhalb von fünf Minuten auf 40 ± 2 mmHg gesenkt werden. Dies wurde durch fraktionierte Blutentnahmen aus dem arteriellen Zugang in der A. femoralis erreicht. Zuerst wurden 2,0 ml Blut auf einmal abgenommen, anschließend erfolgte die Abnahme in 0,5 ml-Schritten, unterbrochen von Kontrollmessungen des Blutdruckes, um nicht zu viel Blut abziehen. Um während der 60-minütigen Schockphase den mittleren arteriellen Blutdruck (MABD) konstant auf 40 ± 2 mmHg zu halten, wurde den Tieren intermittierend Blut entnommen, wenn der MABD den Grenzwert von 42 mmHg überschritt, beziehungsweise mit 0,9%iger NaCl-Lösung infundiert, wenn der MABD unter 38 mmHg sank (druckkontrolliertes Wiggersches Schockmodell (Wiggers, 1946), modifiziert nach Bühren (Bühren, 1989)). Damit 60% des entnommenen Blutes im Anschluss an den Schock den Tieren wieder zurückgegeben werden konnten, musste dem Blut 0,1 ml Citratpuffer (CPDA-1, Transmed, Braun Medical SA, Barcelona, Spanien) pro ml Blut zum Schutz vor Koagulation zugefügt werden.

2.2 Phase der Reperfusion

Nach Beendigung der 60minütigen Schockphase wurde den Tieren zuerst über den peripheren Katheter in der Schwanzvene 60% des entnommenen und mittels Citrat ungerinnbar gemachten Blutes innerhalb von 10 Minuten zurückgegeben. Direkt im Anschluss wurde eine Dauerinfusionstherapie mit Ringerlösung (Ringer, Braun, Melsungen, Deutschland) eingeleitet. Hierbei wurden den Tieren ebenfalls über den peripheren Katheter in der ersten Stunde der Reperfusion eine dem doppelten Blutentnahmenvolumen entsprechende Menge Ringerlösung infundiert. Parallel dazu wurden in der ersten Stunde die Testsubstanz beziehungsweise das Placebo verabreicht, wobei diese Gaben (jeweils 5 ml) bei

der Berechnung der Infusionsmenge von der Ringerlösung abgezogen wurden. S-NO-HSA wurde über den peripheren Katheter in einer Dosierung von $10\mu\text{mol/kg}$ Körpergewicht verabreicht (bei im Durchschnitt 200 g Körpergewicht entspricht dies $2\mu\text{mol/Tier}$, verabreicht in einer 5ml -Lösung mit einer Konzentration von $0,4\mu\text{mol/ml}$). Von dem Placebo wurden ebenfalls zu diesem Zeitpunkt 5 ml einer $1,5\%$ igen Lösung gegeben. Die Präparate wurden über einen Perfusor infundiert, um eine kontinuierliche Gabe über eine Stunde zu gewährleisten. Während der zweiten und dritten Stunde nach dem Schock erhielten die Tiere Ringerlösung in Höhe des einfachen entnommenen Blutvolumens, in der vierten und fünften Stunde der Reperfusion nur noch 10 ml/kg/h .

Während die 5h -Tiere im Anschluss an die Reperfusion direkt zur Intravitalmikroskopie laparotomiert wurden, wachten die 24h Tiere wieder auf. In der Aufwachphase erhielten sie weiterhin eine Infusion mit Ringerlösung zur Stabilisierung des Kreislaufs, bis sie in der Lage waren, selbständig Wasser und Futter aufzunehmen.

2.3 Monitoring

Während der gesamten Versuchszeit wurden zur Beurteilung des Kreislaufstatus bei den Tieren der 5h Versuchsreihe der mittlere arterielle Blutdruck (MABD), die Herzfrequenz (HF), die Körpertemperatur (T), das Herzzeitvolumen (HZV) und der Zentrale Venendruck (ZVD) kontinuierlich überwacht. Bei den Tieren der 24h Versuchsreihen beschränkte sich die Messung auf MABD und HF. Alle diese Parameter wurden zu definierten Zeiten aufgezeichnet:

Versuchsreihe 5h:

- Zu Versuchsbeginn (baseline, $t_{-10\text{min}}$)
- Während der Schockphase und in den ersten zwei Stunden der Reperfusion viertelstündlich (bis $t_{180\text{min}}$)
- In der dritten, vierten und fünften Stunde der Reperfusion halbstündlich (bis $t_{330\text{min}}$)

Versuchsreihe 24h:

- Am ersten Tag des Versuches entsprechend der 5h Versuchsreihe
- Am zweiten Tag des Versuches zu Versuchsbeginn (baseline, $t_{-10\text{min}}$)
- Während der einstündigen Liegedauer bis zur Intravitalmikroskopie viertelstündlich (bis $t_{45\text{min}}$)

2.3.1 Mittlerer Arterieller Blutdruck (MABD)

Um den arteriellen Blutdruck messen zu können, wurde der Katheter in der A. femoralis nach initialem Nullabgleich auf Herzhöhe des Tieres an einen Druckaufnehmer (Statham P23 Db, Gould, Oxford, California, USA) angeschlossen. Eine Membran nimmt die Druckwelle auf, die durch den Blutausswurf des Herzens entsteht und wandelt sie in ein elektrisches Signal um, das als Kurve über einen Blutdruckmonitor (Servomed, Hellige, Heiligenwald, Deutschland) kontinuierlich abgelesen werden kann.

2.3.2 Herzfrequenz (HF)

Die Herzfrequenz wurde durch Auszählen der auf dem Monitor angezeigten Pulsdruckkurve erfasst.

2.3.3 Körpertemperatur (T)

Durch die Thermistorsonde, die an der Spitze des Herzzeitvolumenkatheters angebracht ist, war es über den venösen Zugang in der V. jugularis möglich, die Kerntemperatur der Ratten während der gesamten Versuchszeit aufzuzeichnen. Da die Tiere in Rückenlage auf eine Temperatur-kontrollierte Korkplatte mit Wärmefolie (Conrad Electronic, Hirschau, Deutschland) gelagert waren, konnte die Temperatur nahezu konstant bei 37°C gehalten werden.

2.3.4 Herzzeitvolumen (HZV)

Das Herzzeitvolumen entspricht dem pro Minute vom Herzen geförderte Blutvolumen und kann mittels der transpulmonalen Thermodilutionsmethode gemessen werden. Als Indikator wurde ein Kältebolus verwendet, der in diesem Fall aus 0,15 ml einer eisgekühlten (zwischen 1°C und 2°C) 0,9%igen NaCl-Lösung bestand. Der Bolus musste rasch zentralvenös in die V. jugularis externa dextra injiziert werden, worauf der nachfolgende kurzfristige Temperaturabfall im Blut über die Thermistorsonde an der Spitze des Herzzeitvolumenkatheters, der im Aortenbogen platziert war, registriert und an den Herzzeitvolumencomputer (Cardiotherm 500, Columbus Instruments, Ohio, USA)

weitergegeben werden konnte. Dieser berechnet nach der Stewart-Hamilton-Formel den Blutfluss.

2.3.5 Zentraler Venendruck (ZVD)

Der zentrale Venendruck bezeichnet den Blutdruck in beiden Hohlvenen und den venae brachiocephalica und subclavia und entspricht weitgehend dem Druck im rechten Vorhof. Um den zentralen Venendruck messen zu können wurde der Katheter in der V. jugularis externa dextra nach initialem Nullabgleich auf Herzhöhe des Tieres an einen Druckaufnehmer (Statham P23 Db, Gould, Oxford, California, USA) angeschlossen. Eine Membran nimmt die Druckwelle auf und wandelt sie in ein elektrisches Signal um, das als Kurve über einen Blutdruckmonitor (Servomed, Hellige, Heiligenwald, Deutschland) abgelesen werden kann.

2.4 Blutprobenentnahmen zur Blutgasanalyse

Die Blutprobenentnahmen zur Laboranalyse wurden bei den Tieren der 5h Versuchsreihe aus dem arteriellen Zugang der A. femoralis vorgenommen, bei den Tieren der 24h Versuchsreihe am ersten Tag ebenfalls aus der A. femoralis, am zweiten Tag aus der A. carotis. In folgenden Abständen wurden die Blutproben zur Messung der Blutgasanalyse (200µl Vollblut) gezogen:

Bei den Tieren der 5h Versuchsreihe:

- Erstmalig zur Erhebung der Ausgangswerte bei Schockeinleitung nach zehn minütiger Ruhephase ($t_{0\text{min}}$)
- Nach der einstündigen Schockphase ($t_{60\text{min}}$)
- Nach der ersten Stunde der Reperfusion ($t_{120\text{min}}$)
- Nach der dritten Stunde der Reperfusion ($t_{240\text{min}}$)

Bei den Tieren der 24h Versuchsreihe:

- Am ersten Tag des Versuches entsprechend der 5h Versuchsreihe
- Am zweiten Tag des Versuches nach zehn minütiger Ruhephase ($t_{0\text{min}}$)

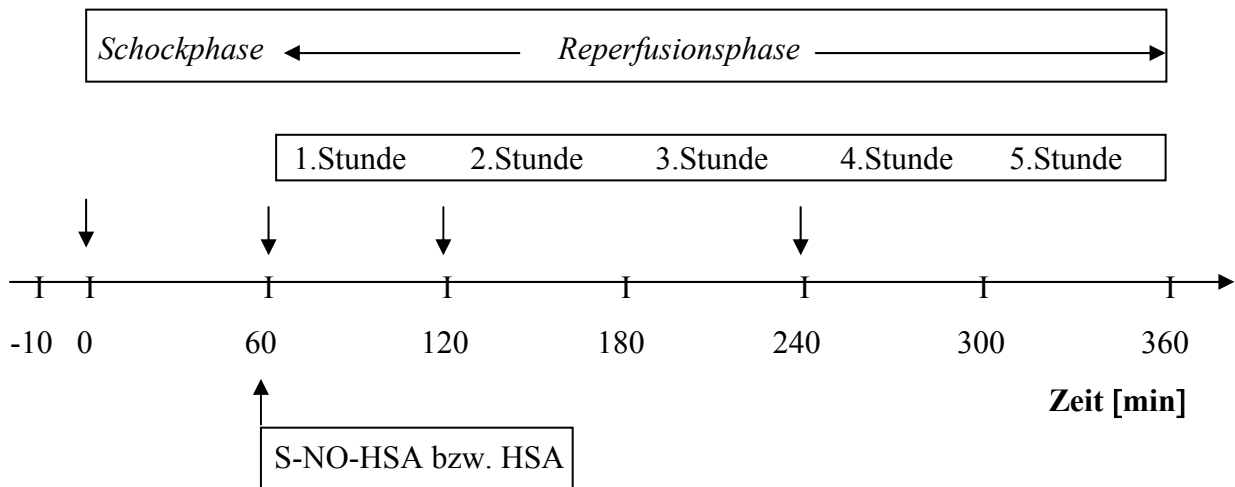
Während das für die Laboranalysen entnommene Blutvolumen bei den Schockgruppen durch sofortige intravenöse Rückgabe des im Schock entzogenen Blutes in gleicher Menge (je

200µl) ersetzt wurde, wurde bei den Kontrollgruppen der Blutverlust durch 0,9%ige NaCl-Lösung substituiert. Nachdem das Blut abgenommen war, wurden die Bestimmungen unverzüglich aus dem Vollblut mittels eines Blutgasanalysegerätes (Astrup ABL 30, Radiometer Copenhagen, Niederlande) durchgeführt. Es wurden folgende Parameter gemessen:

- Blut-pH-Wert
- Basenabweichung (base excess, BE, in mmol/l)
- Arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO₂, in mmHg)
- Arterieller Kohlenstoffdioxidpartialdruck (paCO₂, in mmHg)
- Hämatokrit (Hct in %)
- Hämoglobin (cHB, in g/dl)

2.5 Zeitprofile zum Versuchsaufbau

Abb. III.2 **S-NO-HSA 5h-Gruppe bzw. HSA (Placebo) 5h-Gruppe**



-10 min: Versuchsbeginn

0 min: **Blutentnahme** (BGA)

Schockinduktion

60 min: **Blutentnahme** (BGA)

Ende der Schockphase

Verabreichung von S-NO-HSA bzw. HSA (Placebo) kontinuierlich über 1h

Beginn der Reperfusionphase

Volumentherapie in der 1. Stunde:

60% des entnommenen Blutvolumens + Ringerlösung in doppelter Höhe des Entnahmevolumens abzüglich der Medikamentenmenge

120 min: **Blutentnahme** (BGA)

Volumentherapie in der 2. Stunde:

Ringerlösung entsprechend der Menge des Entnahmevolumens

180 min: Volumentherapie in der 3. Stunde:

Ringerlösung entsprechend der Menge des Entnahmevolumens

240 min: **Blutentnahme** (BGA)

Volumentherapie in der 4. Stunde:

Ringerlösung gemäß Erhaltungsbedarf (10ml/kg/h)

300 min: Volumentherapie in der 5. Stunde:

Ringerlösung gemäß Erhaltungsbedarf (10ml/kg/h)

360 min: Intravitalmikroskopie

Euthanasie der Tiere

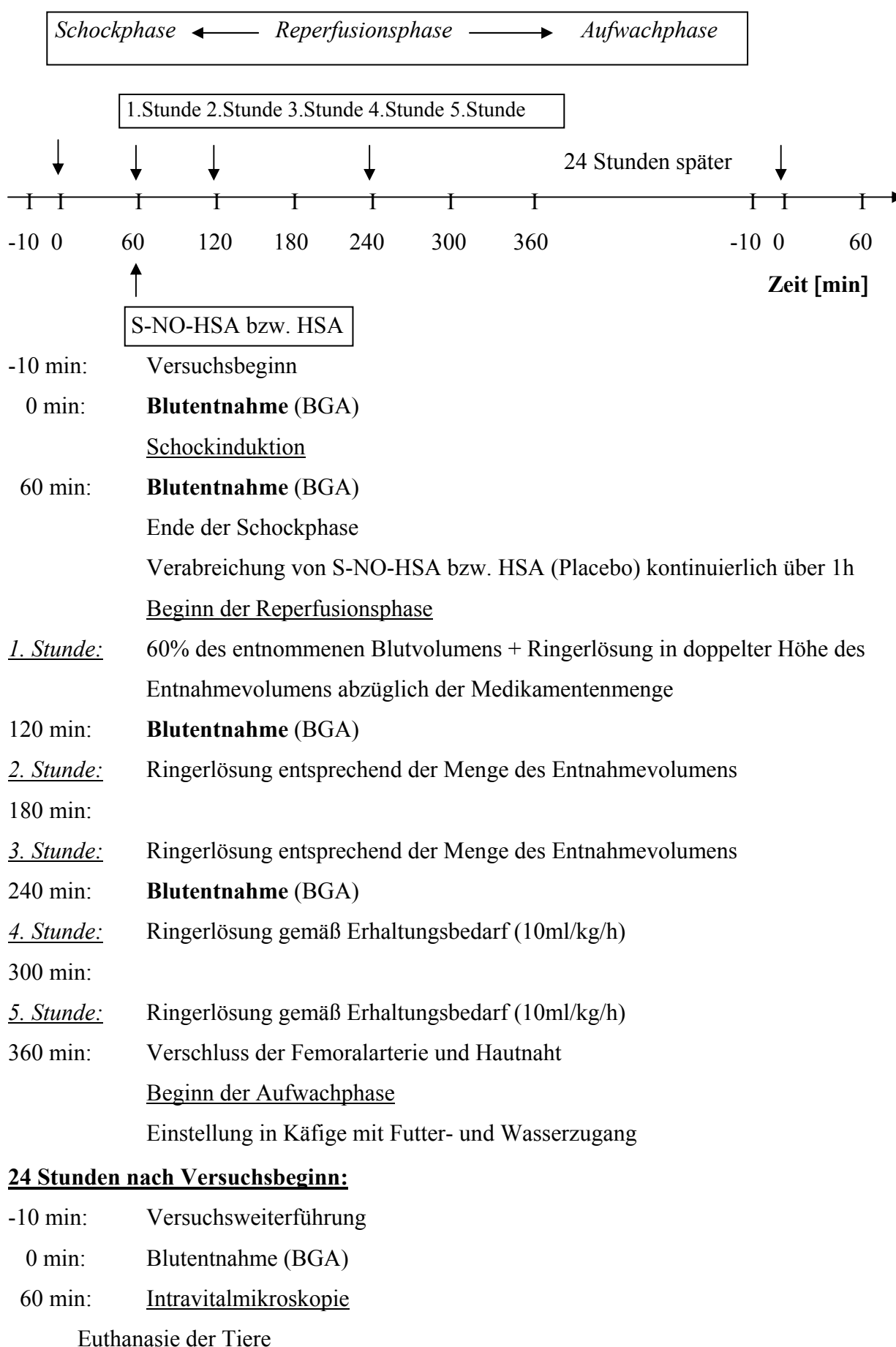
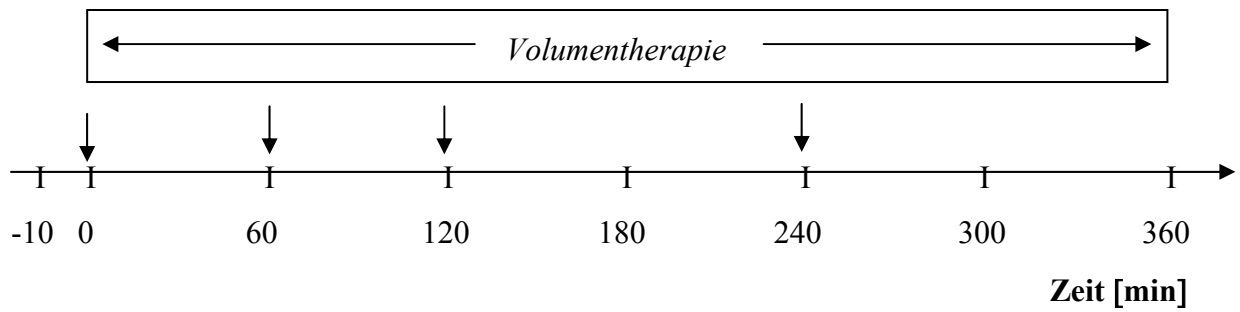
Abb. III.3 S-NO-HSA 24h-Gruppe bzw. HSA (Placebo) 24h-Gruppe

Abb. III.4 **Kontrollgruppe 5h**

-10 min: Versuchsbeginn

0 min: **Blutentnahme (BGA)**

Beginn der Volumentherapie 10 ml/kg/h Ringerlösung

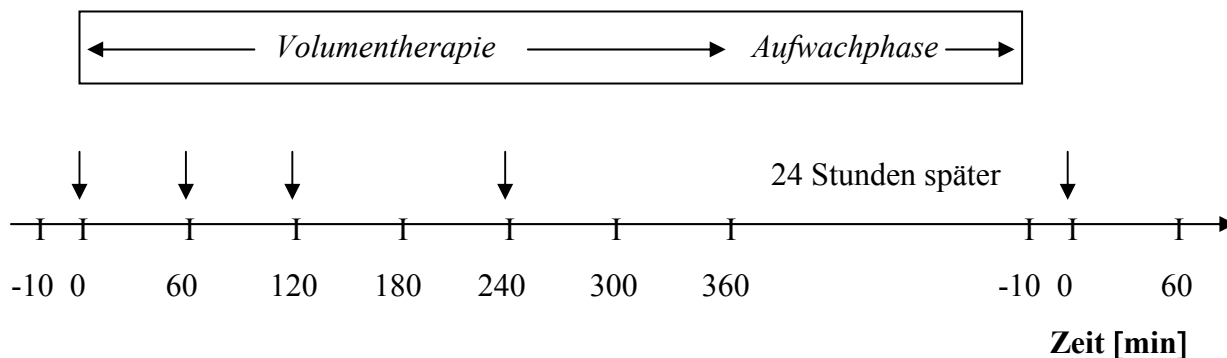
60 min: **Blutentnahme (BGA)**

120 min: **Blutentnahme (BGA)**

240 min: **Blutentnahme (BGA)**

360 min: Intravitalmikroskopie

Euthanasie der Tiere

Abb. III.5 **Kontrollgruppe 24h**

-10 min: Versuchsbeginn

0 min: **Blutentnahme (BGA)**

Beginn der Volumentherapie 10 ml/kg/h Ringerlösung

60 min: **Blutentnahme (BGA)**

120 min: **Blutentnahme (BGA)**

240 min: **Blutentnahme (BGA)**

360 min: Verschluss der Femoralarterie und Hautnaht

Beginn der Aufwachphase

Einstellung in Käfige mit Futter- und Wasserzugang

24 Stunden nach Versuchsbeginn:

-10 min: Versuchsweiterführung

0 min: **Blutentnahme (BGA)**

60 min: Intravitalmikroskopie

Euthanasie der Tiere

3. Intravitalmikroskopie

Die Untersuchung der Lebermikrozirkulation erfolgte mittels der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie, die es neben der morphologischen Darstellung der Leber erlaubt, nach spezieller Anfärbung der Blutzellen auch die hepatische Mikrozirkulation in vivo sichtbar zu machen (Marzi, 1990, Marzi 1991, Marzi, 1993a und Menger, 1991).

3.1 Technik der Laparatomie

In der letzten halben Stunde des Versuchs wurden die Tiere nach 5h bzw. 24h Versuchsdauer für die intravitalmikroskopische Untersuchung vorbereitet. Zur Vorbereitung der Mikroskopie wurde eine mediane Laparatomie des Abdomens beginnend mit einem Hautschnitt vom Processus xiphoideus des Sternums bis vor die Symphyse und zwei bogenförmigen Entlastungsschnitten caudal der Rippenbögen durchgeführt. Nun konnte die Bauchdecke in der Linea alba eröffnet werden und nach Thermokoagulation der Venae epigastricae superior die Schnitterweiterung beidseits der Rippenbögen fortgesetzt werden. Um die Leber zu mobilisieren und den linken Leberlappen (Lobus hepatis sinister) später besser auslagern zu können, mussten die Verbindungsbänder zum Magen bzw. Duodenum (Ligamenta (Lig.) hepatogastricum und hepatoduodenale), die Zwerchfellbänder (Lig. coronarium hepatis und falciforme hepatis), die intrahepatischen Leberbänder (Lig. intrahepatica) und die Verbindung des linken Leberlappens mit dem Zwerchfell (Lig. triangulare sinistrum) durchtrennt werden (Greene, 1963). Um das Darmkonvolut im Abdomen zurückzuhalten wurde eine mit 0,9%iger körperwarmer NaCl-Lösung (Braun, Melsungen, Deutschland) getränkte und anatomisch zugeschnittene Mullkompressen über das Intestinum gespannt. Nach Abschluss der Laparatomie wurde mehrfach mit isotonischer Kochsalzlösung gespült, um die Leberoberfläche frei von Blutkoagula zu halten. Bevor die Ratte nun auf eine eigens zur Mikroskopie konstruierte Plexiglasbühne gelegt werden konnte, mussten alle arteriellen (A. femoralis) und venösen (V. jugularis externa, V. caudalis mediana) Zugänge von den Geräten gelöst, angespült und mit einem Verschlusskonus (Combi ROT, Braun, Melsungen, Deutschland) verschlossen werden. Auch die Verbindung des HZV-Katheters (A. carotis) mit dem Computer wurde gelöst. Das Tier wurde nun auf dem Plexiglastisch in Linksseitenlage fixiert und ein in alle Richtungen drehbarer Teil der Bühne bis vor das Abdomen herangefahren. Auf dem vorderen Teil der Bühne befindet sich ein variabel verformbares Plastillinstück, das genau der individuellen anatomischen Form der konvexen Fläche des größeren linken Leberlappens angepasst werden kann. Der schwierige Teil der Auslagerung des nun frei beweglichen und von allen Bändern getrennten linken Leberlappens wurde mit zwei in isotonischer Kochsalzlösung angefeuchteten Tupferträgern vorgenommen. Durch vorsichtiges Berühren der Leberoberfläche gelang ein völlig atraumatisches Auslagern der Leber, ohne dass wichtige hepatische Gefäße stranguliert wurden, was eine Beobachtung der Mikrozirkulation unmöglich gemacht hätte. Schlussendlich kam die konvexe Facies diaphragmatica der Leber in dem Plastillinstück zu liegen und die glatte, konkave Facies

visceralis konnte zur Mikroskopie vorbereitet werden. Damit der Leberlappen durch die Atembewegungen nicht so leicht verrutschen konnte, musste er auf dem Plastillin mit Gewebekleber fixiert werden. Wiederum wurde die Leberoberfläche mit körperwarmer isotonischer Kochsalzlösung gespült und mit einem passend zugeschnittenem Stück transparenter Cellophanfolie bedeckt, das einerseits die Leber vor Austrocknung und Organschäden schützt, andererseits ermöglicht dies sehr scharfe Bilder bei der Mikroskopie.

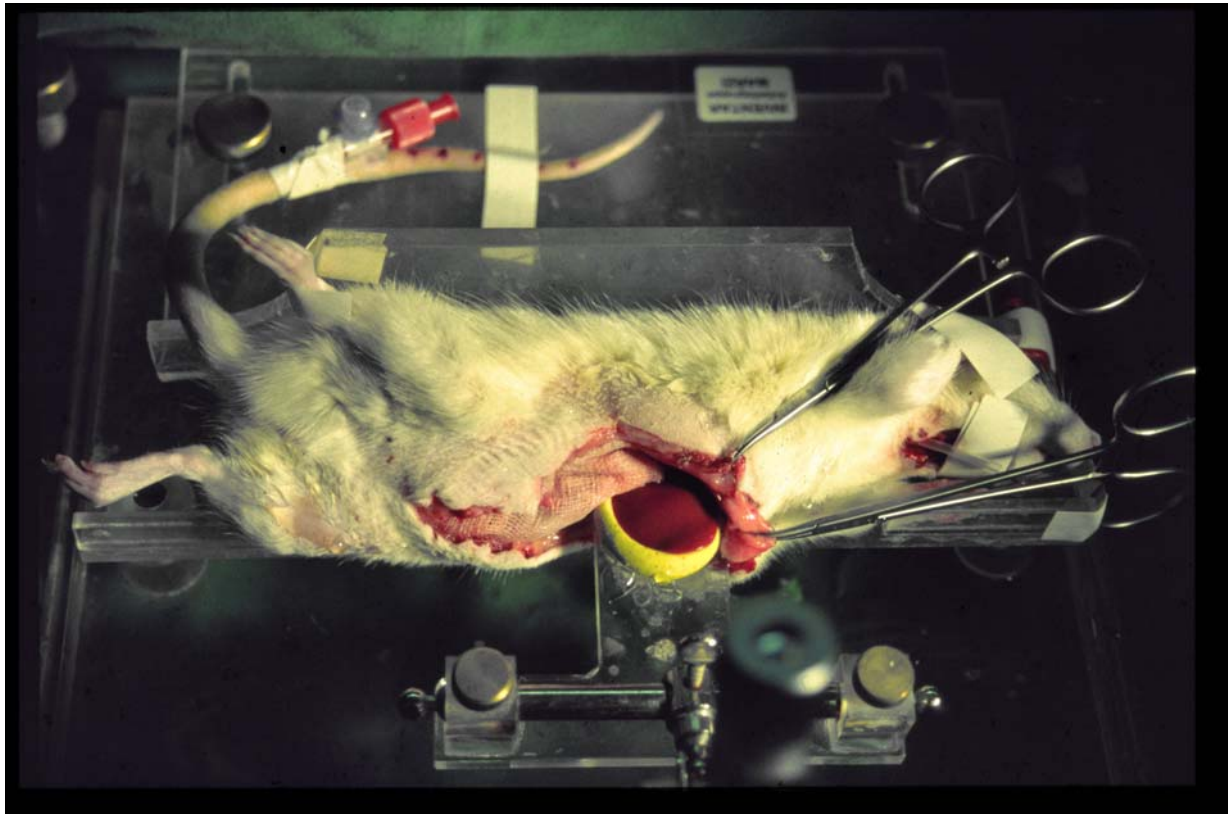


Abb. III.6 Laparotomierte Ratte in Linksseitenlage

3.2 Durchführung der Mikroskopie

3.2.1 Mikroskop

Die intravitalen, fluoreszenzmikroskopischen Untersuchungen wurden mittels eines Epifluoreszenzmikroskopes (Nikon MM-11, Modell HB, 10101, AF, Tokio, Japan) durchgeführt. Um die Auflichtfluoreszenzmikroskopie durchzuführen, ist seitlich am Mikroskop zusätzlich ein Epi-Illuminator (Nikon MM-11U, Tokio, Japan) mit einer 100 Watt starken Quecksilberdampfampe angebracht. Im Strahlengang dieses Illuminators wurde eine

Fluoreszenz-Filterkombination (Nikon, B-2A Blue) integriert. Diese bestand aus dem Anregungsfilter (EX 450-490 nm) zur Anregung des Fluoreszenzfarbstoffes Acridinorange, aus einem Sperrfilter (Ba 520 nm), der den Durchgang für nicht absorbiertes Licht sperrt und lediglich das Fluoreszenzlicht überträgt und einem dichromatischen Spiegel (DM 510), der bei einer Neigung von 45° zur Beleuchtungsquelle ein hohes Reflexionsvermögen für Anregungs-Lichtwellenlängen und ein hohes Transmissionsvermögen für Fluoreszenz-Lichtwellenlängen aufweist. Zum Ausgleich der auftretenden Helligkeitsunterschiede beim Objektivwechsel waren zusätzlich zwei ND-Filter mit verschiedenen Grauabstufungen (Nikon, ND2, ND4) zwischen das Auflicht-Fluoreszenz-Filtersystem und die Quecksilberdampf Lampe geschaltet. Das optische System besteht aus einem Okular (10x), einem Wasserimmersionsobjektiv (10x/0,3) und einem Zoomobjektiv (0,7 – 2,25x), das eine 330fache Vergrößerung gewährleistet. Um die Wasserimmersion aufrechtzuerhalten, tropft kontinuierlich eine auf 37°C erwärmte 0,9%ige NaCl-Lösung über einen Infusionsschlauch auf die Leberoberfläche. Dies schützt zusätzlich die Leberoberfläche vor Austrocknung.

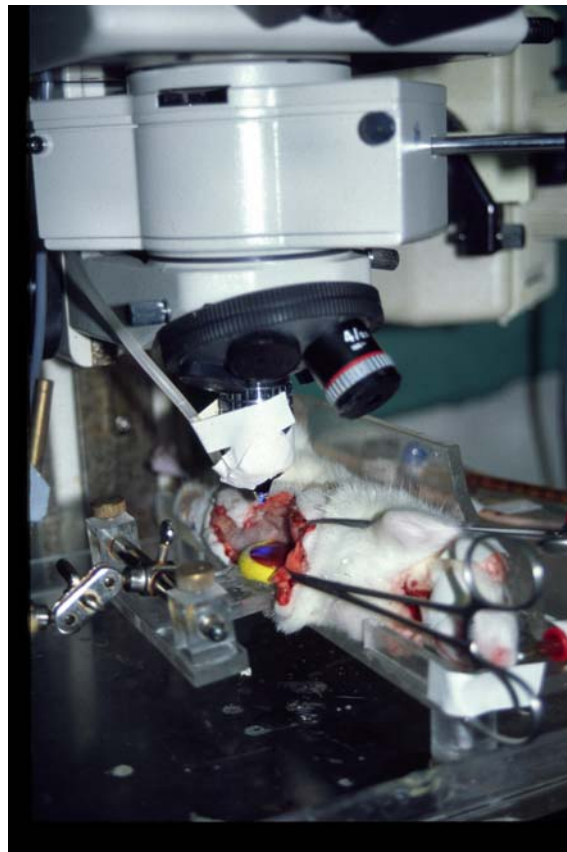


Abb. III.7 Tier unter dem Mikroskop während der Videoaufzeichnung

3.2.2 Videoeinheit

Die mit dem Intravitalmikroskop eingestellten Ausschnitte der Leber konnten mittels einer über einen Adapter an das Mikroskop angeschlossenen CCD-Kamera (Charge Coupled device, FK 6990, Pieper, Schwerte, Deutschland) auf einen Monitor übertragen werden. Ein angeschlossener S-VHS Videorekorder (Panasonic, FS1, Tokyo, Japan) diente der Aufzeichnung der Bilder zur späteren Auswertung auf ein Videoband. Zusätzlich erfolgte eine kontinuierliche Zeitregistrierung auf dem Videoband über einen Time-Date-Generator (VTG 33, FOR-A Company, Tokyo, Japan).

3.2.3 Injektion der Fluoreszenzfarbstoffe

Um den sinusoidalen Blutfluss der Leber sichtbar zu machen, war es notwendig, sowohl die Erythrozyten als auch die Leukozyten selektiv nacheinander anzufärben. Dazu wurden zwei Fluoreszenzfarbstoffe verwendet, die bei einer bestimmten Wellenlänge angeregt werden und fluoreszieren. Diese mit Fluoreszenzfarbstoffen markierten Blutzellen wurden nacheinander in kurzen Abständen in die Vena jugularis externa dextra injiziert.

3.2.3.1 Anfärbung der Erythrozyten mit Fluoresceinisothiocyanat

Die Anfärbung der Erythrozyten erfolgte wie von *Zimmerhackl* beschrieben. Hierbei wurden 2ml heparinisiertes Blut von einem artgleichen Spendertier gewonnen und sofort abzentrifugiert, um reine Erythrozyten zu erhalten. Diese wurden mehrfach mit verschiedenen Puffern gewaschen, verdünnt und anschließend für drei Stunden mit 4 mg/ml Fluoresceinisothiocyanat (FITC, Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland) bei 25°C inkubiert. Anschließend wurden die Erythrozyten nochmals mit einer Pufferlösung gewaschen und 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt und 0,14 ml Citrat/ml zugegeben um eine Koagulation der Erythrozyten zu verhindern (*Zimmerhackl*, 1983).

3.2.3.2 Anfärbung der Leukozyten mit Acridine Orange

Die Fluoreszenzmarkierung der Leukozyten erfolgte direkt intravenös mittels Acridin Orange (Sigma Chemicals, Deisenhofen, Deutschland). Acridin Orange gehört zur Stoffgruppe der Fluorochrome, die sich dadurch auszeichnen, dass mit niedrigen Konzentrationen gearbeitet

werden kann, so dass es nur zu einer geringgradigen Beeinflussung der Zellfunktionen kommt (1mg Acridin Orange/ml NaCl). Ein weiterer Vorteil ist, dass Acridin Orange selektiv an Nucleinsäuren bindet, so dass nur die kernhaltigen Leukozyten angefärbt werden (JAHANMEHR, 1987). Ein Nachteil dieses Fluoreszenzfarbstoffes ist eine zunehmende Helligkeit des umliegenden Lebergewebes hauptsächlich der periportalen Region, da die Leukozyten den Farbstoff schnell wieder abgeben und dieser von den Hepatozyten aufgenommen wird. Diesem Phänomen kann nur durch eine möglichst geringe fraktionierte Gabe der Farbstoffe in einer Dosierung von 0,1 ml pro untersuchtem Leberläppchen und über eine Anpassung der Kameraempfindlichkeit mittels zwischengeschalteter Graufilter entgegengewirkt werden.

3.2.4 Beobachtungsabläufe zur Videodokumentation

Durch den zur Intravitalmikroskopie verwendeten basischen Farbstoff Acridine-Orange kann es zur Produktion von Sauerstoffradikalen mit nachfolgender zytotoxischer Wirkung kommen (Houba-Herin, 1984). Bei einer längeren Anwendung bedeutet dies einen oxidativen Stress mit Membranschäden und einer eventuellen zusätzlichen Rezeptorexpression (Patel, 1991). Aus diesem Grund wurde die Belichtungszeit während der Intravitalmikroskopie zur Vermeidung von artifiziell bedingten Organschäden in allen Versuchen möglichst kurz gehalten und dauerte, in allen Gruppen identisch, nie länger als zehn Minuten, wobei sich die effektive Belichtungszeit noch kürzer gestaltete.

3.2.4.1 Erythrozytengeschwindigkeit

Zur Bestimmung der Geschwindigkeit der Erythrozyten wurde unmittelbar nach Fokussierung und Scharfstellung eines Beobachtungsfeldes jeweils 0,1 ml FITC-markierte Erythrozyten intravenös in die Vena jugularis externa dextra verabreicht. Als Beobachtungsfelder dienten gestreckt verlaufende Lebersinusoiden mit dazugehörigem Periportalfeld und angrenzender Zentralvene. Sekunden später erschienen die markierten Erythrozyten als hell leuchtende schnell fließende Punkte, aus dem Portalfeld kommend und durch die Lebersinusoiden in die Zentralvene fließend. Nach einer Videoaufzeichnung von 30 Sekunden wurden in gleicher Weise vier weitere Beobachtungsfelder pro Tier nach gleichen Kriterien ausgewählt.



Abb. III.8 Intravitalmikroskopische Aufnahme FITC-markierter Erythrozyten

3.2.4.2 Leukozytengeschwindigkeit und Leukozyten-Endothel-Interaktionen

Direkt im Anschluss wurde mit der Aufzeichnung der Leukozytengeschwindigkeit und den Leukozyten-Endothel-Interaktionen begonnen. Die Beobachtungsfelder entsprachen denen der Erythrozytenaufzeichnung. Auch hier wurden fünf Mikroskopeinstellungen von je 30 Sekunden pro Tier ausgewählt, denen eine jeweilige intravenöse Injektion von 0,1 ml Acridin Orange in die Vena jugularis externa dextra vorausging. Die Leukozyten erschienen ebenfalls als sehr grell leuchtende frei fließende oder am Endothel anhaftende Punkte. Da in den ersten beiden Aufzeichnungen zur Leukozytenbeobachtung nicht auszuschließen war, dass noch vereinzelt mitfließende Erythrozyten fälschlicherweise mitbestimmt wurden, kamen hierbei nur die letzten drei Beobachtungsfelder von je 30 Sekunden zur Auswertung.

3.2.4.3 Anzahl der Sinusoide/nicht perfundierten Sinusoide

In den gleichen Auswertungsabschnitten wurden zusätzlich die Anzahl der Sinusoide und die Menge der nicht-perfundierten Sinusoide ausgezählt.

3.2.4.4 Sinusoidweiten

Zum Abschluss erfolgte noch eine Aufzeichnungsphase zur Bestimmung der Sinusoidweiten. Hierbei wurden pro Tier fünf verschiedene Zentralvenen mit ihren einmündenden Sinusoiden zentral nacheinander eingestellt und für jeweils zwei Sekunden aufgezeichnet.

4. Auswertung

4.1 Computergestütztes Bildanalysestystem

Die Auswertung der per Videoband aufgezeichneten Beobachtungseinheiten während der Intravitalmikroskopie erfolgten mittels eingebendetem Timer mit einem SVHS Videorecorder (Panasonic FS 100, Tokio, Japan) mit exakter Zeitlupenfunktion, so dass eine Analyse der einzelnen Bilder im 20 ms Abstand erfolgen konnte. Zur Bestimmung des Flusses und der Geschwindigkeit der Erythrozyten bzw. Leukozyten sowie zur Messung der Sinusoidweiten wurden die Bilder zunächst digitalisiert (Personal Computer 486, 33 MHz) und dann mit Hilfe des computergegestützten Bildverarbeitungssystems (LOBULUS, Medical Vision Systems, Saarlouis, Deutschland) verarbeitet. So war es möglich die Bilder qualitativ zu verbessern, indem man sie skalieren und linearisieren und auch die Helligkeit regulieren konnte. Die Bestimmung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen erfolgte an einem 51 cm messenden Bildschirm (TM-210 PS, JVC Colour Monitor) mit 880-facher Vergrößerung. Die Auswertung orientierte sich an dem theoretisch hexagonalen Acinuskonzept von *Rappaport* (Rappaport, 1973).

4.2 Mikrozirkulation der Leber

4.2.1 Bestimmung der sinusoidalen Erythrozytengeschwindigkeit

Zur Auswertung kamen pro Tier 50 Erythrozyten (je 10 Erythrozyten pro Beobachtungsfeld), die sich in möglichst gestreckt verlaufenden Sinusoiden bewegten und welche die Sinusoide ohne Adhäsion durchflossen. Mit Hilfe des Computerprogramms wurde die Anfangsposition der Erythrozyten mittels eines Graphiktablets (Summasketch 2, Summagraphics, Saarlouis, Deutschland) mit der Maus markiert. Um die Atembewegungen des Tieres auszugleichen wurde ein markanter Referenzbereich umrissen, so dass man das Bild immer wieder in die gleiche Position zurückverbringen konnte. Nun wurde das Bild mittels der Zeitlupenfunktion um ca. 20-60 ms weiterbewegt und die Position des Erythrozyten als Endpunkt gekennzeichnet. Nach der Überprüfung des Referenzbereiches und gegebenenfalls einer Replazierung wurde die zurückgelegte Strecke markiert.

Die Berechnung der Geschwindigkeit erfolgte nach folgender Formel:

$$V = \Delta s / \Delta t$$

V = Geschwindigkeit des Erythrozyten bzw. Leukozyten

Δs = zurückgelegte Strecke

Δt = Zeitänderung

4.2.2 Bestimmung der sinusoidalen Leukozytengeschwindigkeit

Die Bestimmung erfolgte exakt der Geschwindigkeitsberechnung der Erythrozyten. Zur Auswertung kamen pro Tier 30 Leukozyten (je 10 pro Beobachtungsfeld). Aufgrund der stärkeren Adhärenzneigung der Leukozyten an das Endothel musste hier besonders darauf geachtet werden, dass die Zellen frei fließen.

4.2.3 Bestimmung des Geschwindigkeitsquotienten

Da sowohl die Erythrozytengeschwindigkeit als auch die Leukozytengeschwindigkeit bestimmt wurden, ist es durch Bildung eines Quotienten möglich, eine Abschätzung zwischen

adhäsiven und dispersiven Kräften der Leukozyten-Endothel-Interaktionen zu erhalten. Dieser Quotient berechnet sich nach folgender Formel:

$$X = v_{(\lambda)} / v_{(\epsilon)}$$

X = Geschwindigkeitsquotient

$v_{(\lambda)}$ = Geschwindigkeit der Leukozyten

$v_{(\epsilon)}$ = Geschwindigkeit der Erythrozyten

4.2.4 Messung der Sinusoidweiten

Zur Messung der Sinusoidweiten wurden die Durchmesser aller radiär zur Zentralvene zulaufenden Sinusoide senkrecht zur Epithelwand gemessen. Hierbei musste über das Graphiktablett (Summasketch 2, Summagraphics, Saarlouis, Deutschland) eine Zentralvene markiert werden. Der Computer errechnete anhand dieser Markierung einen Abstand zur Zentralvene von 90 μm und zeigte diesen durch eine durchgehende elektronische Markierungslinie an. Es wurden bei einer ca. 1050-fachen Vergrößerung nur solche Sinusoide gemessen, die von der Markierung geschnitten wurden und in diesem Bereich keine Aufzweigungen aufwiesen. Pro Tier wurden 5 Zentralvenen gekennzeichnet und jeweils der Durchmesser von ca. 25 Sinusoiden bestimmt (das heißt ca. 125 Sinusoide von einem Tier vermessen).

4.2.5 Bestimmung des sinusoidalen Blutflusses

Die Beurteilung des sinusoidalen Blutflusses kann nur als Näherungswert zum tatsächlichen Fluss angesehen werden, da in der Berechnung von einem kreisförmigen Sinusoiddurchmesser ausgegangen wird, der eine Vereinfachung der realen Form darstellt. Hierzu ist es notwendig, neben der Bestimmung der Geschwindigkeit der Erythrozyten bzw. der Leukozyten auch den Durchmesser des durchflossenen Sinusoidabschnittes zu messen. Hierzu wurde in dem von den Zellen passierten Bereich zusätzlich an 8 – 10 Stellen das Lot von einer Gefäßwand zur anderen gefällt. Aus der Geschwindigkeit und der Sinusoidbreite konnte der Blutfluss dann näherungsweise nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{Flow} = \pi \cdot (\Delta s / \Delta t) \cdot (\Phi/2)^2$$

Flow = Sinusoidaler Blutfluss

Δs = zurückgelegte Strecke des Erythrozyten bzw. Leukozyten

Δt = Zeitänderung

Φ = Sinusoiddurchmesser

4.3 Leukozyten-Endothel-Interaktionen in der Leber

Die Beobachtungen der Leukozyten-Endothel-Interaktionen orientierten sich an dem theoretisch hexagonalen Acinuskonzept von *Rappaport* (Rappaport, 1973). Bei dieser morphologischen Einteilung eines Lobulus hepatis mit einer Vena centralis im Zentrum und mit periportalen Feldern in der Peripherie, bezeichnet man den von einem einzelnen Terminalast einer A. oder V. interlobularis versorgten Bezirk, der aus je einem Sektor zweier benachbarter Lobuli hepatici besteht, als Acinus. Innerhalb des Acinus durchfließt das Blut - von innen aus dem Periportalfeld kommend nach außen in die Zentralvene mündend - drei Segmente: ein periportales, ein midzonales und ein perizentrales Feld, deren Flächeninhalte sich wie 1 : 1,4 : 1 verhalten. So kann das Adhärenzverhalten der Leukozyten für jedes Feld einzeln bestimmt werden. Zur vereinfachten Darstellung des Verlaufs der Sinusoide innerhalb eines Acinus eignet sich die Form einer Ellipse, deren Flächeninhalt somit einem Sechstel der gesamten Läppchenoberfläche entspricht. Zum Auszählen der adhärenenten Leukozyten wurde je nach Größe des Beobachtungsfeldes das ellipsoide Overlay ausgewählt, bei dem die Endpunkte der Ellipse exakt im Mittelpunkt des Periportalfeldes und direkt am Rand der Zentralvene lagen und die Folie mit Klebestreifen auf dem Bildschirm befestigt.

Folgende Parameter wurden getrennt nach periportalem, midzonalem und perizentralem Feld ausgewertet:

4.3.1 Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten

In drei Auswertungsabschnitten von je 30 Sekunden wurden diejenigen Leukozyten gezählt, die alle drei Felder durchflossen und deren Adhäsionszeit am sinusoidalen Endothel zwischen 0,2 und 20 Sekunden beträgt (Marzi, 1990a).

4.3.2 Anzahl der permanent adhärennten Leukozyten

Parallel zu den temporär adhärennten Leukozyten wird in den selben Beobachtungsfeldern auch die absolute Zahl der permanent adhärennten Leukozyten durch auszählen bestimmt. Als permanent adhärennt werden die Leukozyten definiert, die mehr als 20 Sekunden am sinusoidalen Endothel haften (Marzi, 1990a).

4.3.3 Anzahl der Sinusoide/nicht-perfundierten Sinusoide

In den gleichen Auswertungsabschnitten werden zusätzlich noch die einzelnen Sinusoide gezählt und die Zahl der nicht-perfundierten Sinusoide prozentual dazu angegeben.

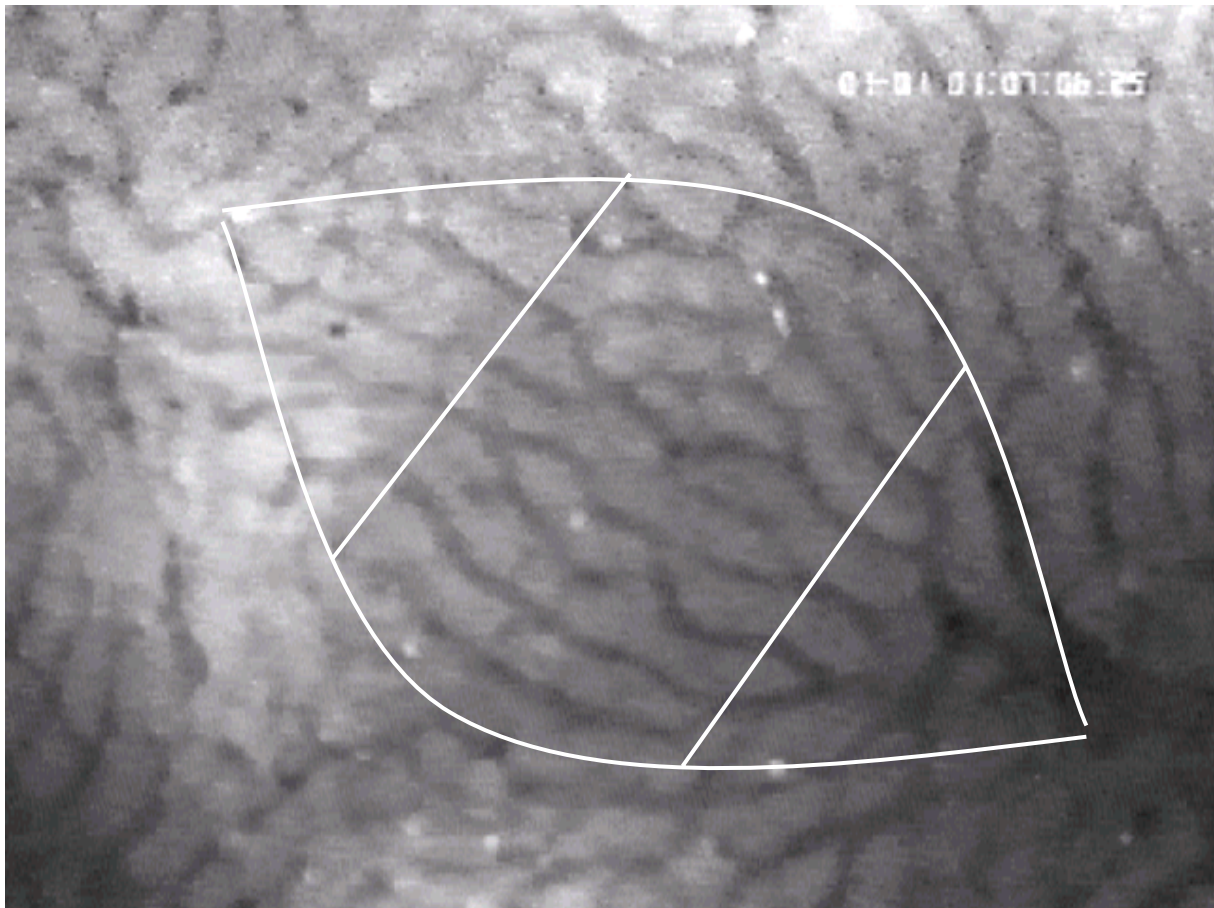


Abb. III.9 Intravitalmikroskopische Aufnahme mit Overlay. Einteilung in periportales, midzonales und perizentrales Feld

5. Statistik

Die Fragestellung dieser Studie untersuchte die Auswirkungen von exogen zugeführtem NO auf mögliche Veränderungen der Lebermikrozirkulation fünf und vierundzwanzig Stunden nach hämorrhagischem Schock. Zur Beantwortung dieser Fragen wurde die Kontrollgruppe (Kontrolle 5h) mit der HSA-Placeboschockgruppe (HSA 5h) und der NO-HSA-Schockgruppe (NO-HSA 5h) bzw. die Kontrollgruppe (Kontrolle 24h) mit der HSA-Placeboschockgruppe (HSA 24h) und der NO-HSA-Schockgruppe (NO-HSA 24h) verglichen. Zusätzlich wurden die HSA-Placeboschockgruppen und die NO-HSA-Schockgruppen getrennt nach 5h und 24h untereinander verglichen.

Die Datenauswertung wurde auf einem Personalcomputer (Pentium II) unter Verwendung des Statistikprogrammpaketes Jandel Scientific SigmaStat™ 2,0 (Jandel Corporation, USA) durchgeführt. Die graphischen Abbildungen entstanden mit Hilfe des Programms Jandel Scientific SigmaPlot™ 3,0 (Jandel Corporation, USA). Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Prüfung auf „Normalverteilung“ und auf „Gleichheit der Varianz“ je nach Erfüllung dieser Kriterien wahlweise mittels einer einfaktoriellen Varianzanalyse („One way ANOVA“) und einem Test nach „Student Newman Keuls“ oder mit einem Rangsummentest nach „Kruskal-Wallis“ und einem paarweisen Vergleich nach „Dunn“ (siehe Abbildung).

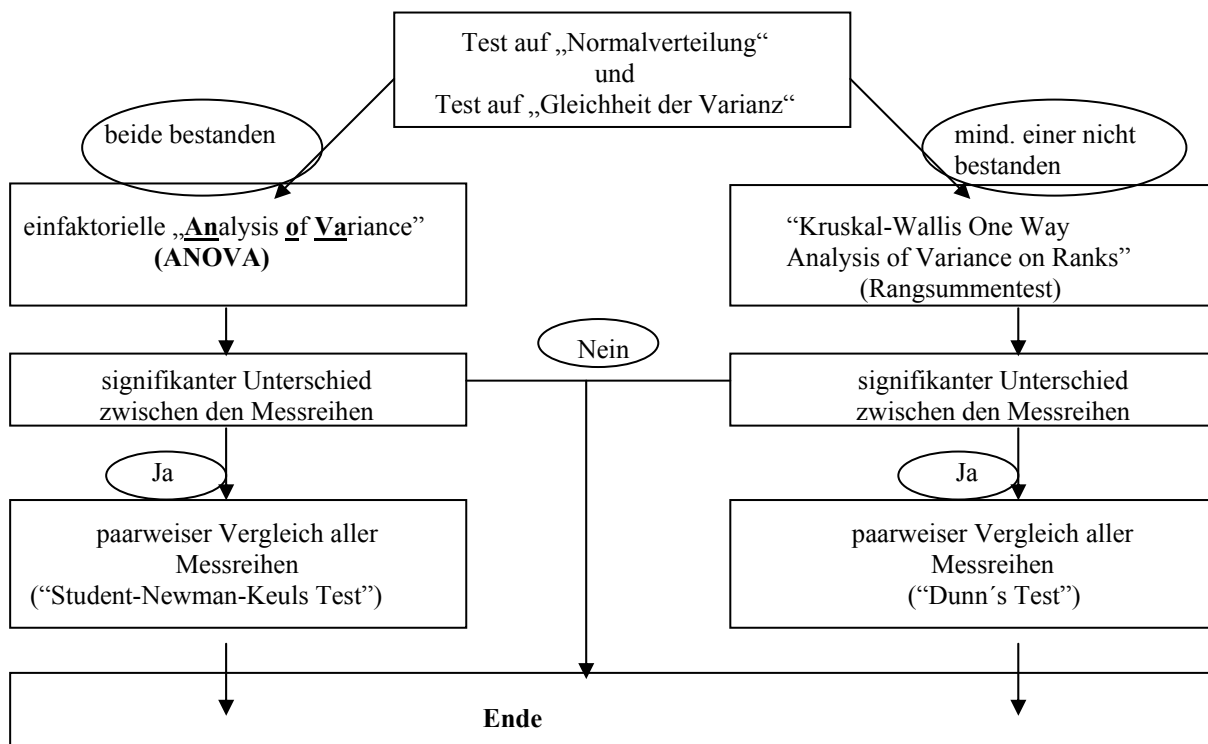


Abb.III.10 One Way Analysis of Varianz („Multiple Comparison Options“)

Spezialfälle unter den Messungen, in denen es Werte gab, die von zwei Faktoren beeinflusst wurden, wie zum Beispiel die temporäre und permanente Leukozytenadhäsion mit unterschiedlichen Versuchsgruppen und drei verschiedenen Orten (periportal, midzonal, perizentral) der Auswertung, wurden nach der Prüfung auf „Gleichheit der Varianz“ mittels einer zweifaktoriellen Varianzanalyse („Two Way ANOVA“) ausgewertet. Im Falle eines signifikanten Unterschiedes zwischen den Messreihen wurde der „Student-Newman-Keuls Test“ angewandt.

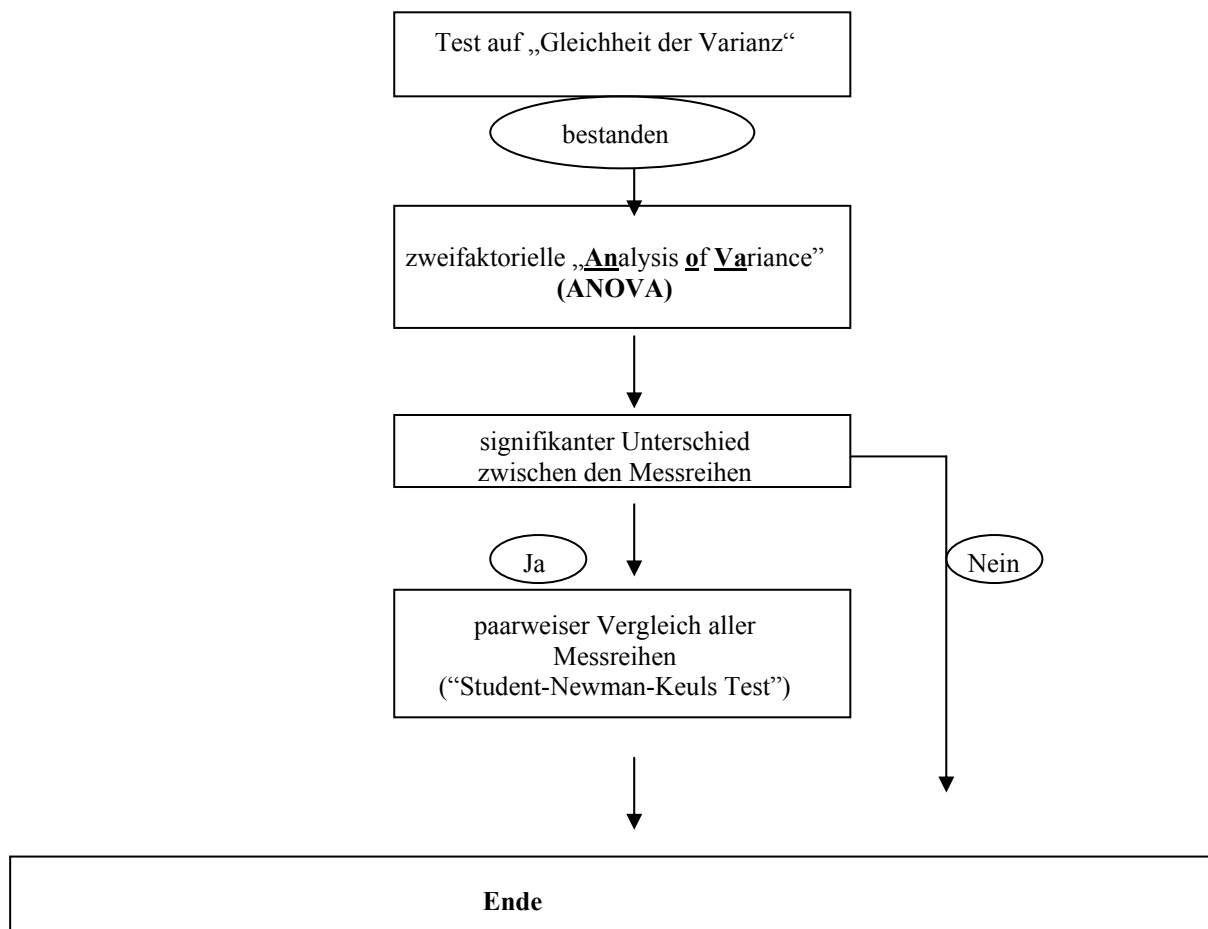


Abb.III.11 Two Way Analysis of Varianz („Multiple Comparison Options“)

Für alle statistischen Tests dieser Studie wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

IV. Ergebnisse

1. Makrohämodynamische Parameter und Ergebnisse der Laboruntersuchungen

Von allen Tieren wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MABD), die Herzfrequenz (HF), in der 5h Versuchsreihe zusätzlich das Herzzeitvolumen (HZV) und der Zentrale Venendruck (ZV) gemessen, sowie Blutproben zur Analyse des Säure-Basen-Haushaltes (pH-Wert, Basenabweichung (BE)), der respiratorischen Funktion (pCO₂, pO₂) und des Blutbildes (Hämatokrit und Hämoglobin) genommen. Die Messung dieser Parameter diente dazu festzustellen, ob während der anschließenden Intravitalmikroskopie vergleichbare systemische Bedingungen zwischen den Versuchsgruppen der 5h und 24h Versuchsreihe vorlagen.

1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD)

Der mittlere arterielle Blutdruck gilt in diesem Modell als wichtigster Schockparameter. Da das Schockmodell dieser Versuchsreihe druckgesteuert ist und somit der MABD die Zielgröße darstellt, sinkt der MABD der Schockgruppen bei Schockinduktion einheitlich auf systolische Blutdruckwerte im Bereich von 40 ± 2 mmHg mit relativ geringer Standardabweichung ab. Während der 60-minütigen Schockphase wurde dieser Wert konstant beibehalten. In der anschließenden Reperfusionphase erreichte der MABD in den HSA-Placebogruppen 5h und 24h nahezu die Ausgangswerte und hielt sich bis zum Versuchsende auf dem MABD-Niveau der Kontrollgruppen. In den S-NO-HSA-Gruppen 5h und 24h fiel der MABD während der Gabe von S-NO-HSA zunächst noch einmal signifikant gegenüber den HSA-Placebogruppen ab, der Verlauf der MABD-Werte zeigt jedoch, dass die Gabe von S-NO-HSA nicht zu einer längerfristigen makrohämodynamischen Beeinträchtigung des MABD führen.

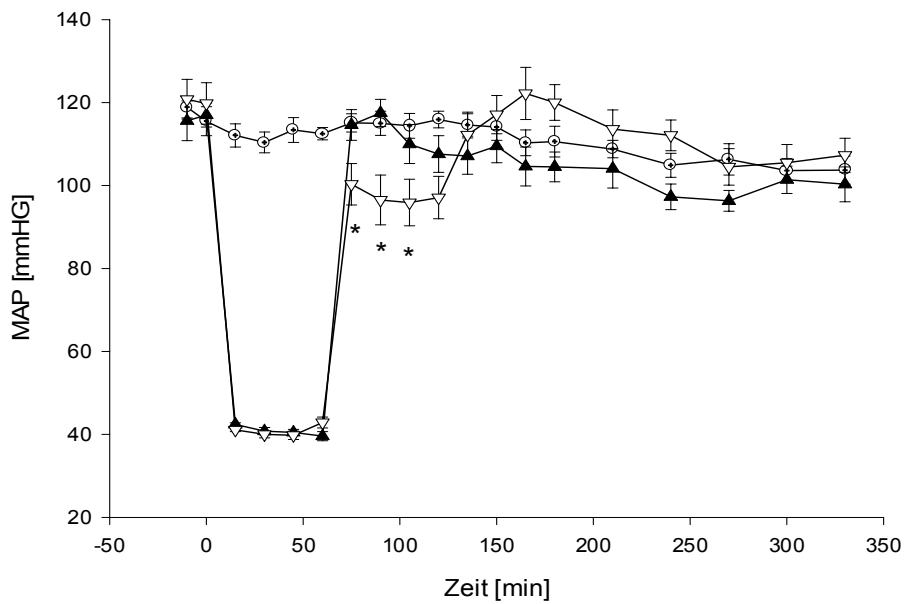


Abb. IV.1a MABD (5h) * $p < 0,05$ vs. HSA 5h

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

--▲-- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 5h

--▽-- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 5h

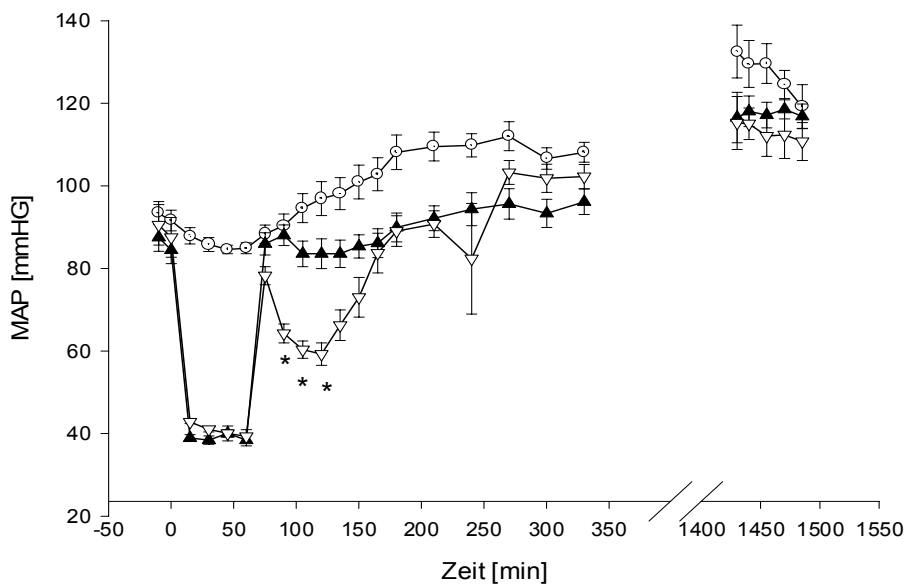


Abb. IV.1b MABD (24h) * $p < 0,05$ vs. HSA 24h

--o-- Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

--▲-- HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 24h

--▽-- S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe: 5 ml 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 24h

1.2 Herzfrequenz (HF)

Die Herzfrequenz zeigte bei den Tieren der Placebo- und S-NO-HSA-Gruppen einen deutlichen Abfall während der 60 minütigen Schockphase. Zu Beginn der Reperfusionphase stieg die Herzfrequenz unverzüglich bei allen vier Schockgruppen kompensatorisch wieder an. Hierbei erreichten die HSA-Placebogruppen sehr schnell wieder den Ausgangswert. In den S-NO-HSA-Gruppen 5h und 24h kam es kurzzeitig zu einer signifikant höheren Herzfrequenz im Vergleich zu den HSA-Placebogruppen. Insgesamt war die Herzfrequenz bei allen vier Schockgruppen im Vergleich zu den Kontrollgruppen im Verlauf der Reperfusionphase höher.

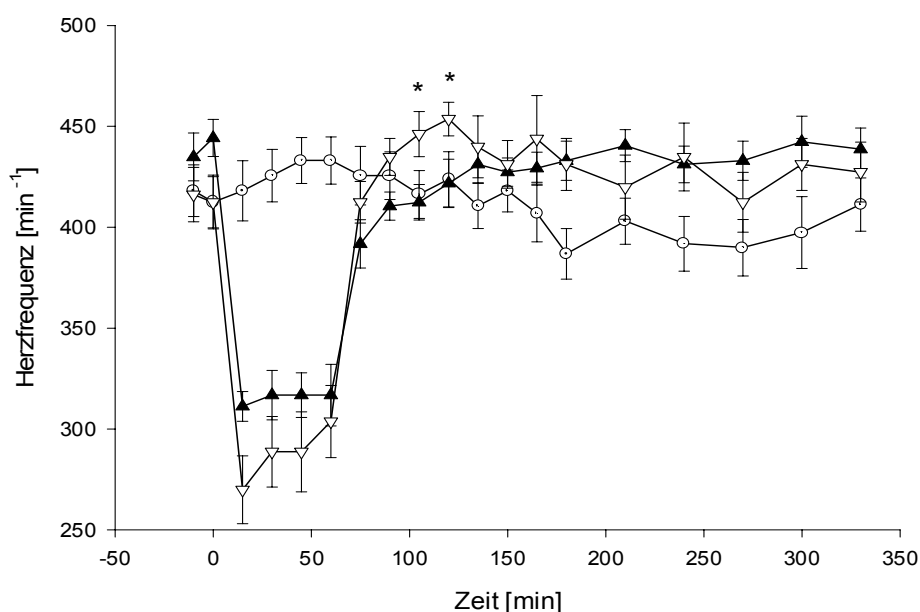


Abb. IV.2a HF (5h) * $p < 0,05$ vs. HSA 5h

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

-▲- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 5h

--▽- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 5h

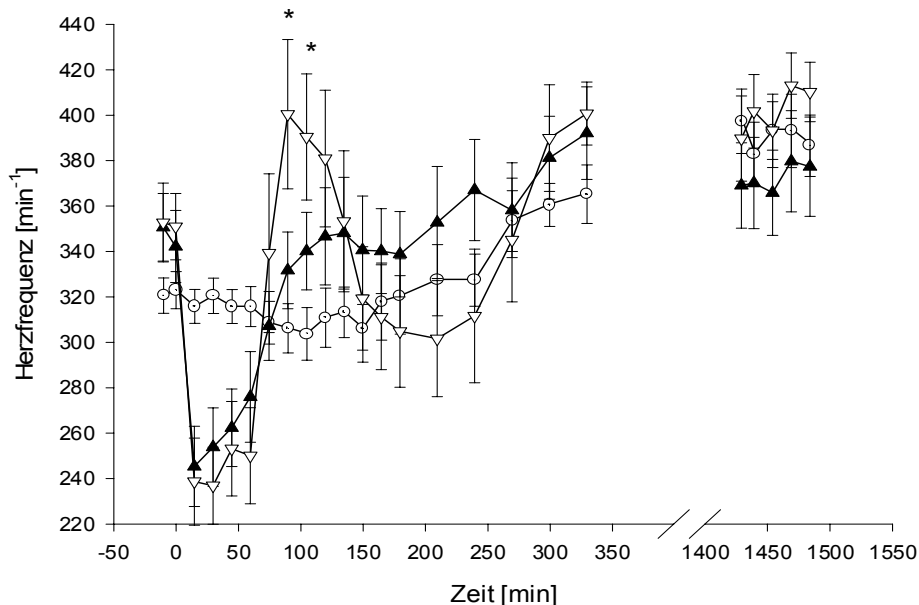


Abb. IV.2b HF (24h) * $p < 0,05$ vs. HSA 24h

--o-- Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

--▲-- HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 24h

--▽-- S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe: 5 ml 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 24h

1.3 Herzzeitvolumen (HZV)

Das Herzzeitvolumen konnte aus operationstechnischen Gründen nur bei einer Versuchsdauer von 5h gemessen werden. Während der Schockphase lag bei der Placebo- und der S-NO-HSA-Gruppe ein deutlich vermindertes Herzzeitvolumen gegenüber der Kontrollgruppe vor. Zu Beginn der Reperfusionserphase erfolgte bei beiden Schockgruppen (HSA 5h und S-NO-HSA 5h) ein schneller Anstieg des Herzzeitvolumens auf höhere Werte als in der zehnminütigen Stabilisierungsphase. Die Werte der S-NO-HSA-Gruppe lagen dabei signifikant höher als die der HSA-Placebogruppe. Die Werte sanken allerdings im weiteren Verlauf der Reperfusion ab, so dass sie bis zum Versuchsende wieder im Bereich der Ausgangswerte lagen.

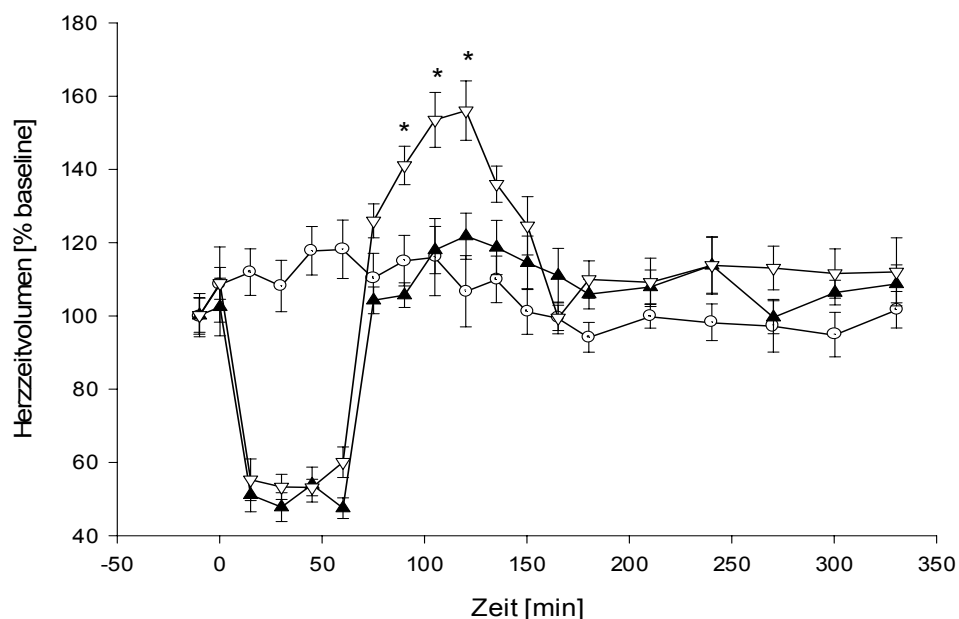


Abb. IV.3 HZV *P<0,05 vs. HSA 5h

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

-▲- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

--▽- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

1.4 Zentraler Venendruck (ZVD)

Auch der Zentrale Venendruck konnte aus operationstechnischen Gründen nur bei einer Versuchsdauer von 5h gemessen werden. Bei normaler Herz- und Lungenfunktion ist der zentrale Venendruck ein geeignetes Maß zur Abschätzung des Volumenstatus. Während der hämorrhagischen Schockphase lagen bei der HSA-Placebo- und der S-NO-HSA-Gruppe ein geringgradig verminderter Zentraler Venendruck und damit ein verminderter venöser Rückstrom gegenüber der Kontrollgruppe vor. In der Folge sinkt das Schlagvolumen („Frank-Starling-Mechanismus“).

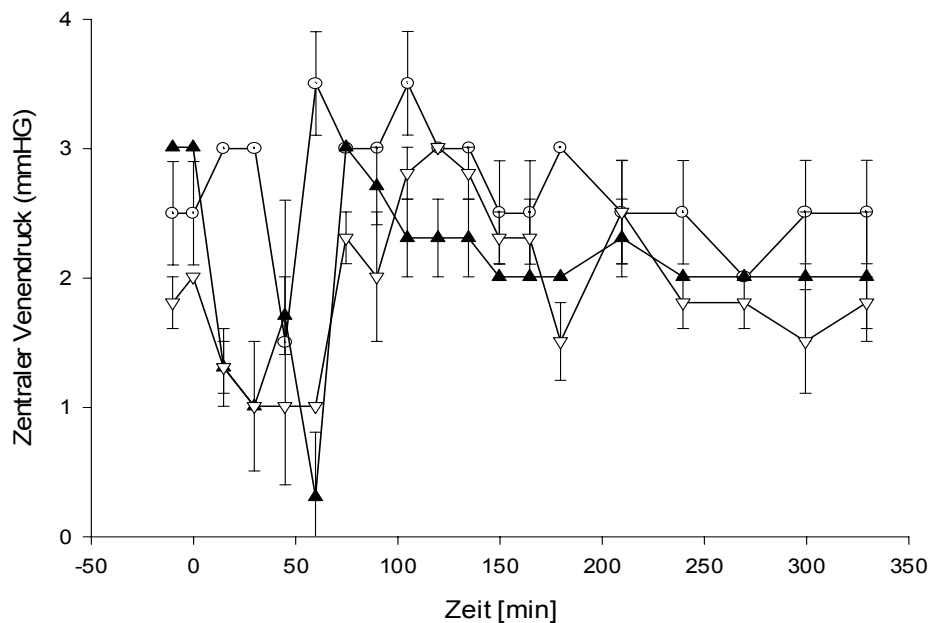


Abb. IV.4 ZVD

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

-▲- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

--▽- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

1.5 Säure-Basen-Haushalt

1.5.1 pH-Wert

Während der pH-Wert der Kontrollgruppen bis zum Versuchsende auf höhere Werte anstieg sank der pH-Wert in den vier Schockgruppen aufgrund des Schocks zuerst stark ab. Zum Versuchsende lagen aber auch hier höhere Werte als zu Versuchsbeginn vor.

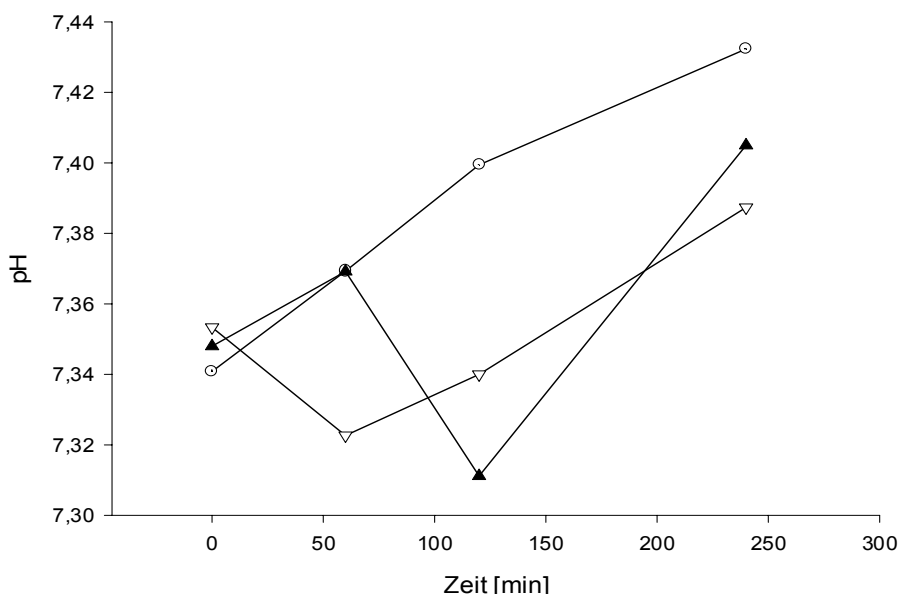


Abb. IV.5a pH-Wert (5h)

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

-▲- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

--▽- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

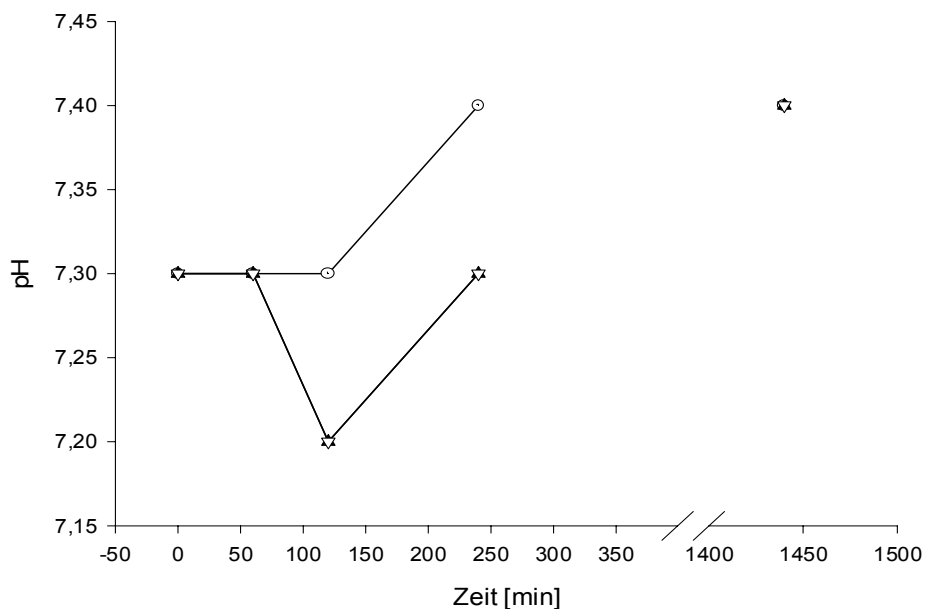


Abb. IV.5b pH-Wert (24h)

--o-- Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

-▲- HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 24h

--▽- S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe: 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 24h

1.5.2 Basenabweichung (BE, base excess)

Die Basenabweichung ergibt sich aus der Differenz der aktuellen und der physiologischerweise vorliegenden Pufferbasen. In den Kontrollgruppen zeigte der BE nur minimale Schwankungen. Die Werte der vier Schockgruppen (HSA und S-NO-HSA 5h und 24h) sind durch den hämorrhagischem Schock deutlich in den negativen Bereich abgesunken und befanden sich auch nach 5h noch auf niedrigerem Niveau. Bei allen Gruppen der 24h Versuchsreihe konnten hingegen höhere Werte als zu Versuchsbeginn festgestellt werden.

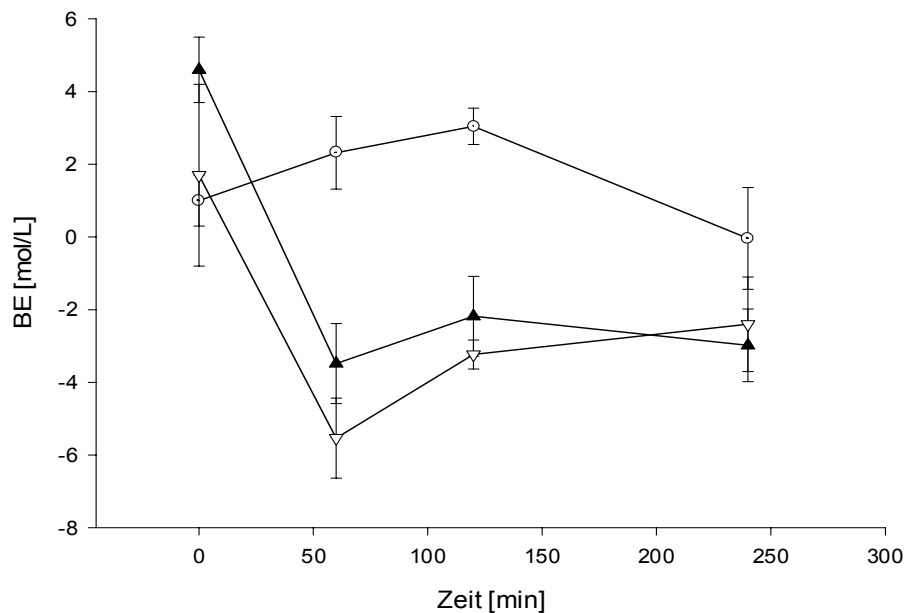


Abb. IV.6a BE (5h)

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

-▲- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

--▽- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

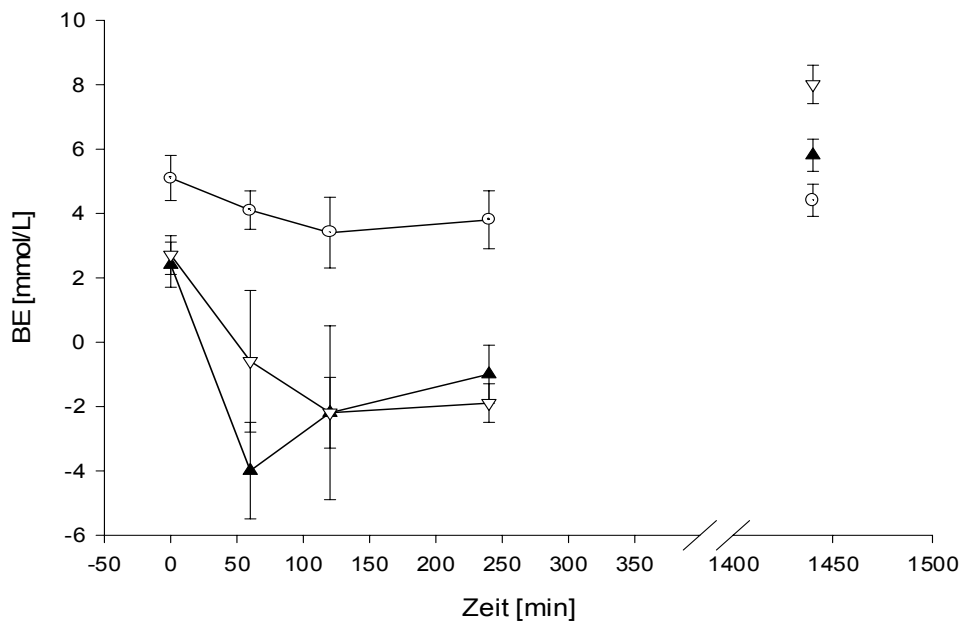


Abb. IV.6b BE (24)

--o-- Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

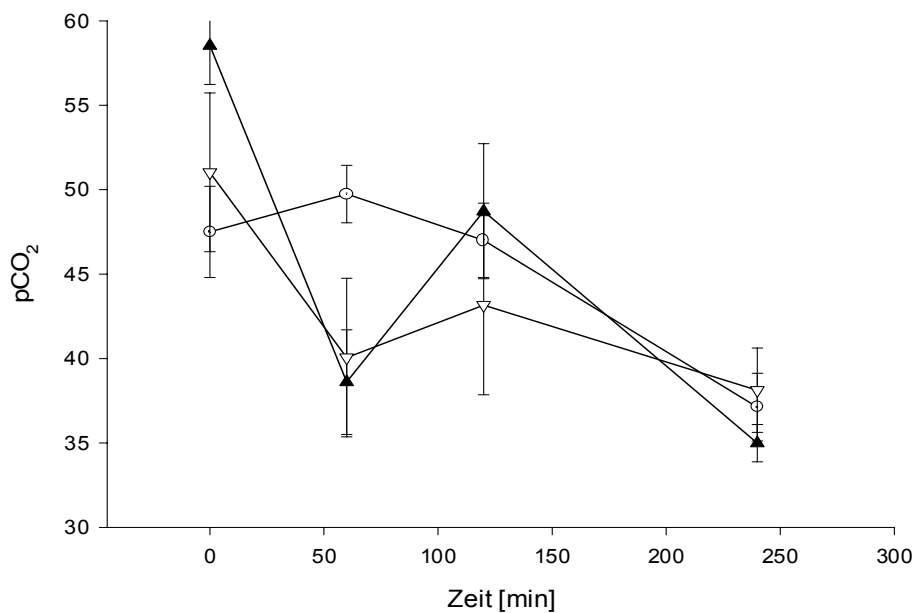
-▲- HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 24h

--▽- S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe: 5 ml 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 24h

1.6 Parameter der respiratorischen Funktion

1.6.1 CO₂-Partialdruck (pCO₂)

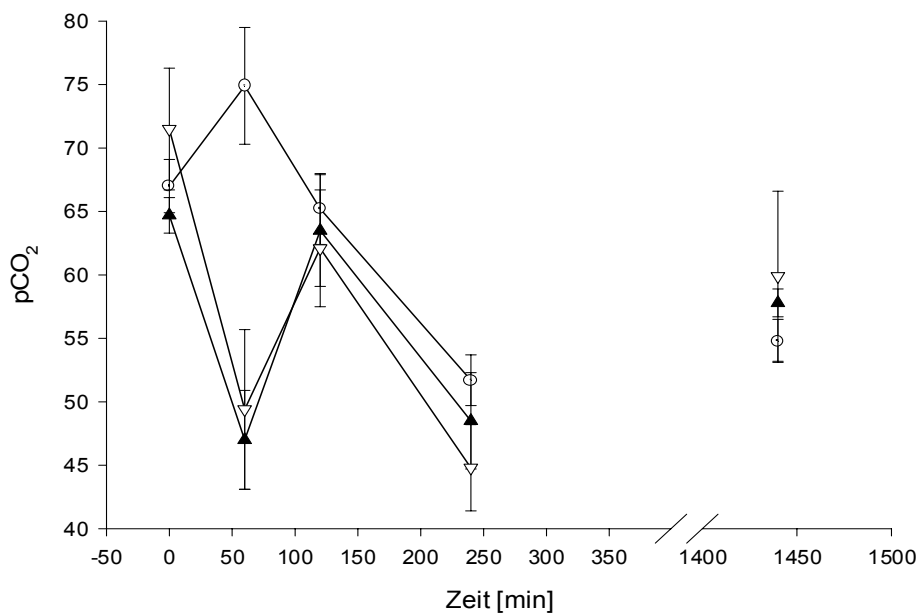
In den Kontrollgruppen sank der pCO₂ nach einem zu Beginn des Versuchs leichten Anstieg kontinuierlich ab. In den vier Schockgruppen kam es zu einem starken Abfall des pCO₂-Wertes während des Schocks. Nach dem Schock stieg der pCO₂ wieder auf Kontrollgruppen-Niveau um dann gleichermaßen abzufallen.

Abb. IV.7a pCO₂ (5h)

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

-▲- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

--▽- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

Abb. IV.7b pCO₂ (24h)

--o-- Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

-▲- HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 24h

--▽- S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe: 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 24h

1.6.2 O₂-Partialdruck (pO₂)

In den Kontrollgruppen stieg der pO₂ bis zum Versuchsende gleichmäßig an. Ein deutlicher Anstieg war bei den vier Schockgruppen während des Schocks zu beobachten. Zu Beginn der Reperfusionphase pendelten sich die Werte wieder auf Kontrollgruppen-Niveau ein und stiegen, außer bei der HSA-Placebogruppe (24h), parallel mit ihnen.

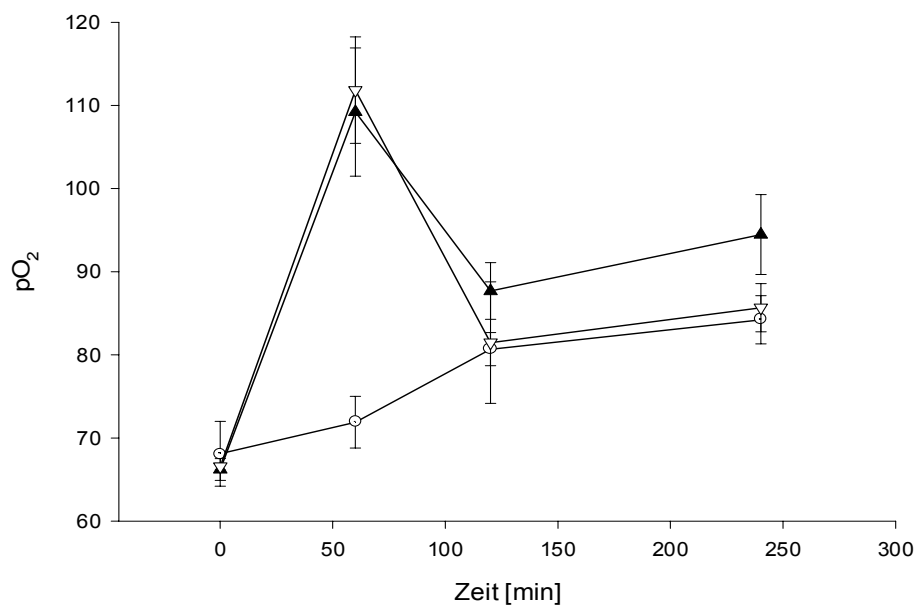


Abb. IV.8a pO₂ (5h)

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

-▲- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

--▽- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

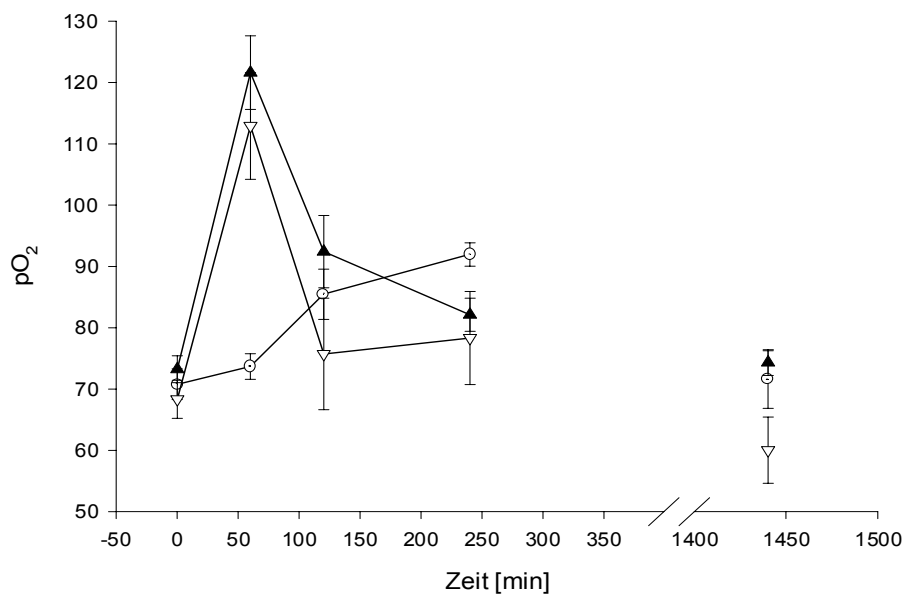


Abb. IV.8b pO₂ (24h)

--o-- Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

-▲- HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 24h

--▽- S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe: 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 24h

1.7 Blutbildveränderungen

1.7.1 Hämatokrit (Hk)

Der Hämatokritwert sank bei den Tieren der Kontrollgruppen im Verlauf der Narkose infusionsbedingt bis zum Versuchsende ab. Zu einem starken Abfall des Hämatokrits kam es erwartungsgemäß bei den Schockgruppen während des hämorrhagischen Schocks durch die Abnahme des Blutvolumens. Nach der Rückgabe von 60% Citrat-Blut stieg der Hämatokrit wieder leicht an, erreichte jedoch aufgrund der zusätzlichen Infusion von Ringerlösung (Hämodilution) nicht wieder die Ausgangswerte.

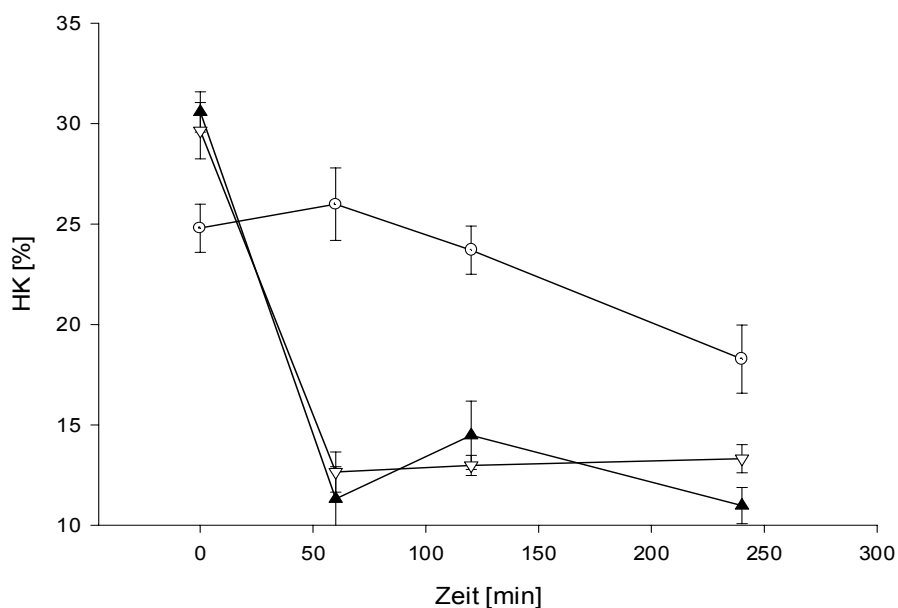


Abb. IV.9a HK (5h)

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

-▲- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

--▽- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

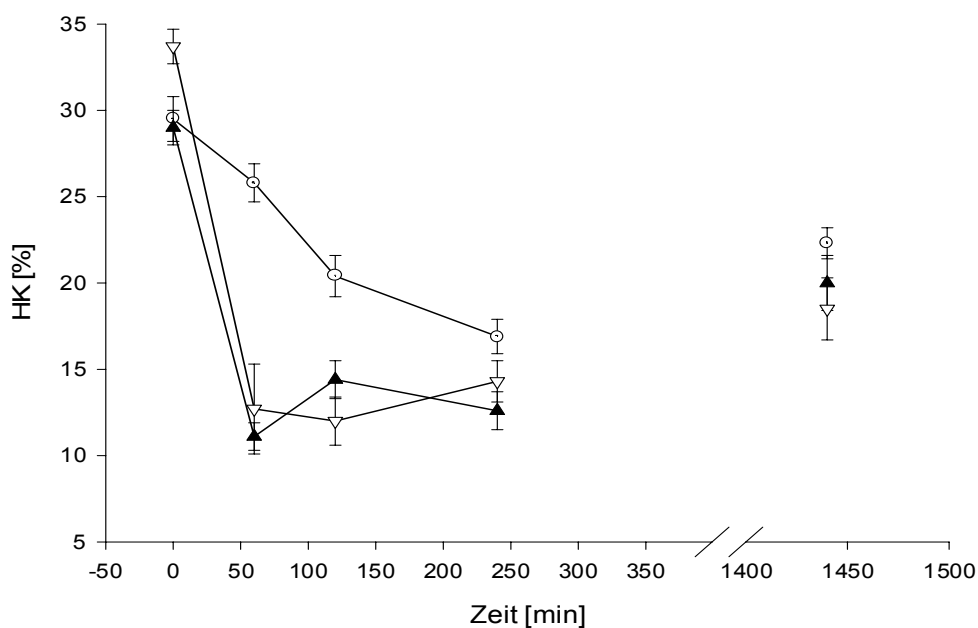


Abb. IV.9b HK (24h)

--o-- Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

-▲- HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 24h

--▽- S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe: 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 24h

1.7.2 Hämoglobin (Hb)

Der Hämoglobingehalt sank bei den Kontrollgruppen im Verlauf der Narkose bis zum Versuchsende ab. Parallel zu dem Abfall des Hämatokrits kam es erwartungsgemäß bei den Schockgruppen während des hämorrhagischen Schocks zu einem deutlichen Abfall des Hämoglobins durch Verlust an Erythrozyten. Nach der Rückgabe von 60% Citrat-Blut stieg das Blutzellvolumen wieder leicht an und damit auch der Hämoglobingehalt. Die Ausgangswerte konnten aber durch die Infusion von Ringerlösung auch nach 24 h nicht mehr erreicht werden.

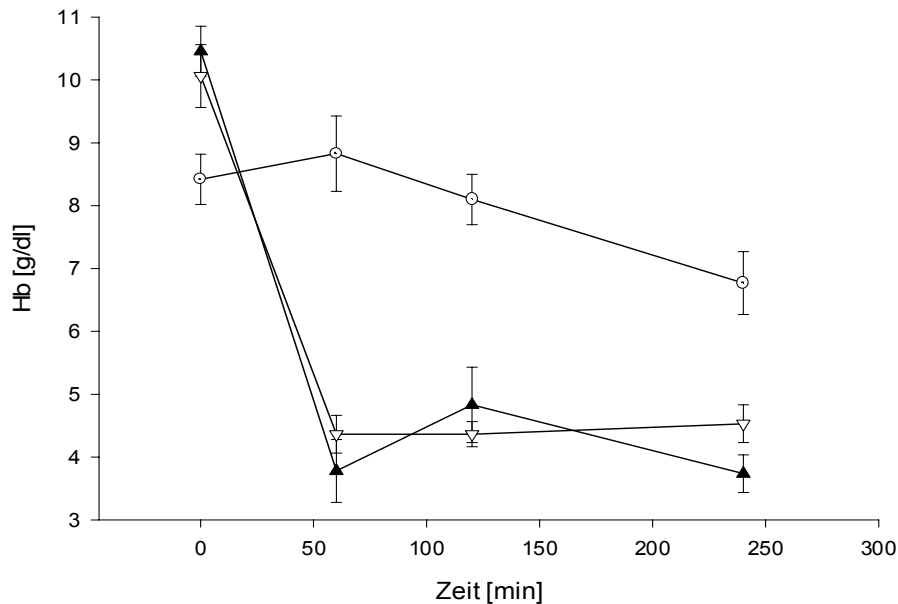


Abb. IV.10a Hb (5h)

--o-- Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

-▲- HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

--▽- S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

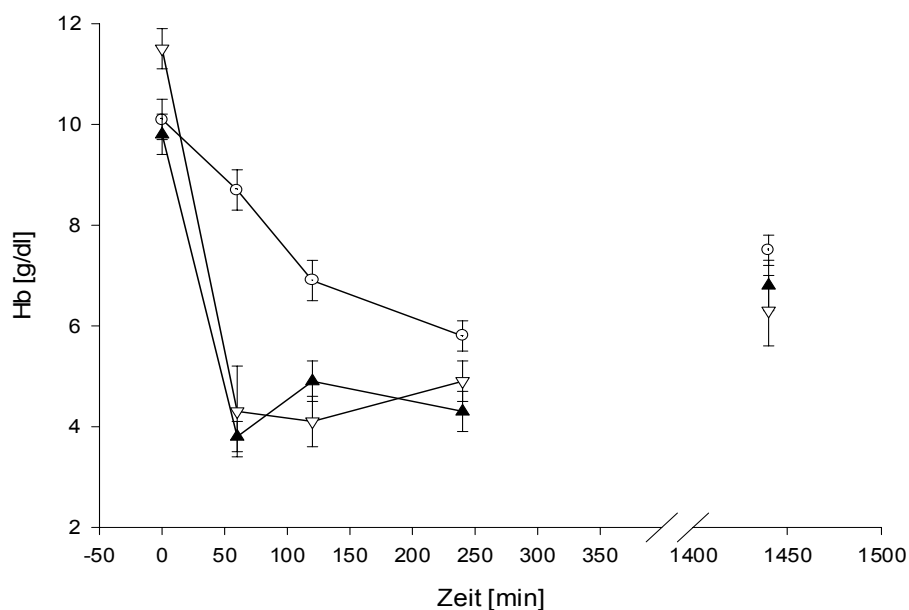


Abb. IV.10b Hb (24h)

--o-- Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

-▲- HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 24h

--▽- S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe: 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 24h

2. Ergebnisse der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie in Verbindung mit einer computergestützten Auswertung bietet die Möglichkeit, die Mikrozirkulation der Leber sichtbar zu machen. Zur Beurteilung, inwieweit die hepatische Mikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock beeinflusst wird und ob eine NO-Gabe zu Beginn der Reperfusionstherapie sinnvoll sein kann, standen mehrere intravitalemikroskopische Parameter nach standardisierter Auswertung zur Verfügung. Bestimmt wurden die intrasinusoidale Erythrozyten- und Leukozytengeschwindigkeit und der daraus zu ermittelnde Geschwindigkeitsquotient, die Sinusoidweiten, der sinusoidale Erythrozyten – bzw. Leukozytenfluss und die Anzahl der nicht perfundierten Sinusoide. Zur Beurteilung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen wurden die Anzahl der temporär und permanent adhärenenten Leukozyten getrennt nach periportalem, midzonalem und perizentralem Feld ausgewertet.

2.1 Mikrozirkulation

2.1.1 Intrasinusoidale Erythrozytengeschwindigkeit

Die morphometrische Geschwindigkeitsmessung der Erythrozyten zeigte, dass sich die Erythrozyten der Kontrollgruppe (5h) geringgradig langsamer als die Erythrozyten der S-NO-HSA-Gruppe (5h) und der HSA-Placebogruppe (5h) bewegten. In der Kontrollgruppe (24h) war die Geschwindigkeit im Durchschnitt höher als die der HSA-Placebogruppe (24h), aber geringer als die der S-NO-HSA-Gruppe (24h).

	<i>Kontrolle</i> <i>5h</i>	<i>HSA</i> <i>5h</i>	<i>S-NO-HSA</i> <i>5h</i>	<i>Kontrolle</i> <i>24h</i>	<i>HSA</i> <i>24h</i>	<i>S-NO-HSA</i> <i>24h</i>
Mittel [$\mu\text{m}/\text{sek}$]	885,8	1083,3	995,0	1077,2	938,7	1160,1
\pmSEM	70,0	70,5	132,5	69,8	63,0	54,0

Tab. IV.1 Intrasinusoidale Erythrozytengeschwindigkeit

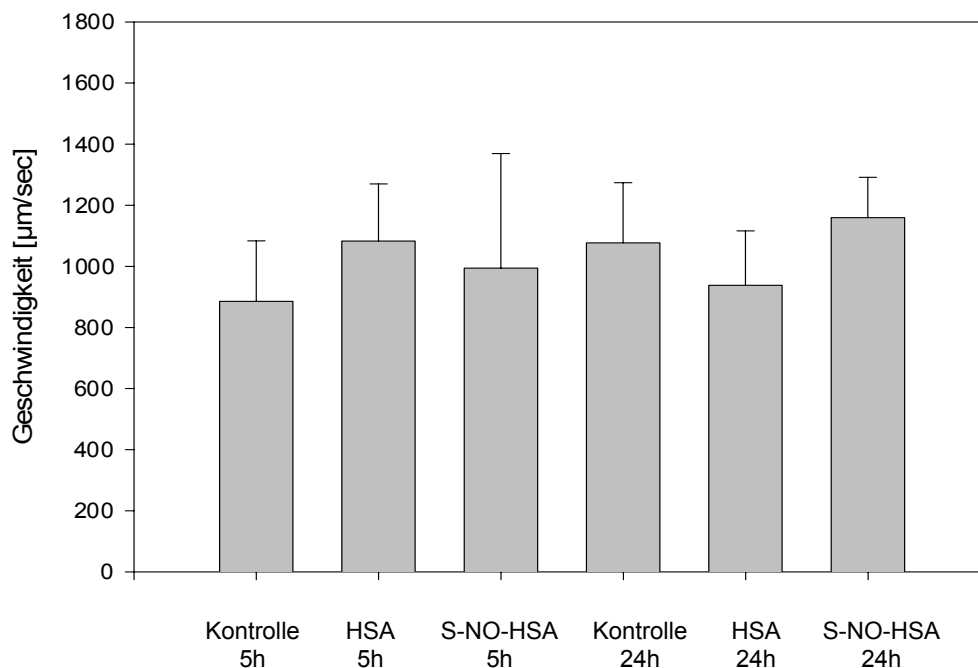


Abb. IV.11 Intrasinusoidale Erythrozytengeschwindigkeit (5h und 24h)

Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 5h

S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μmol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 5h

Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 24h

S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μmol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 24h

2.1.2 Intrasinusoidale Leukozytengeschwindigkeit

Die Geschwindigkeitsmessung der frei passierenden Leukozyten lies erkennen, dass sich sowohl in den 5h Versuchsgruppen als auch in den 24h Versuchsgruppen die Leukozyten der HSA-Placebogruppen (5h und 24h) tendenziell langsamer bewegten als in den anderen Gruppen, sich aber zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede zeigten.

	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>
	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>
Mittel	530,8	499,8	532,8	576,1	427,2	477,6
[$\mu\text{m}/\text{sek}$]						
$\pm\text{SEM}$	36,7	21,8	48,6	42,9	30,3	35,2

Tab. IV.2 Intrasinusoidale Leukozytengeschwindigkeit

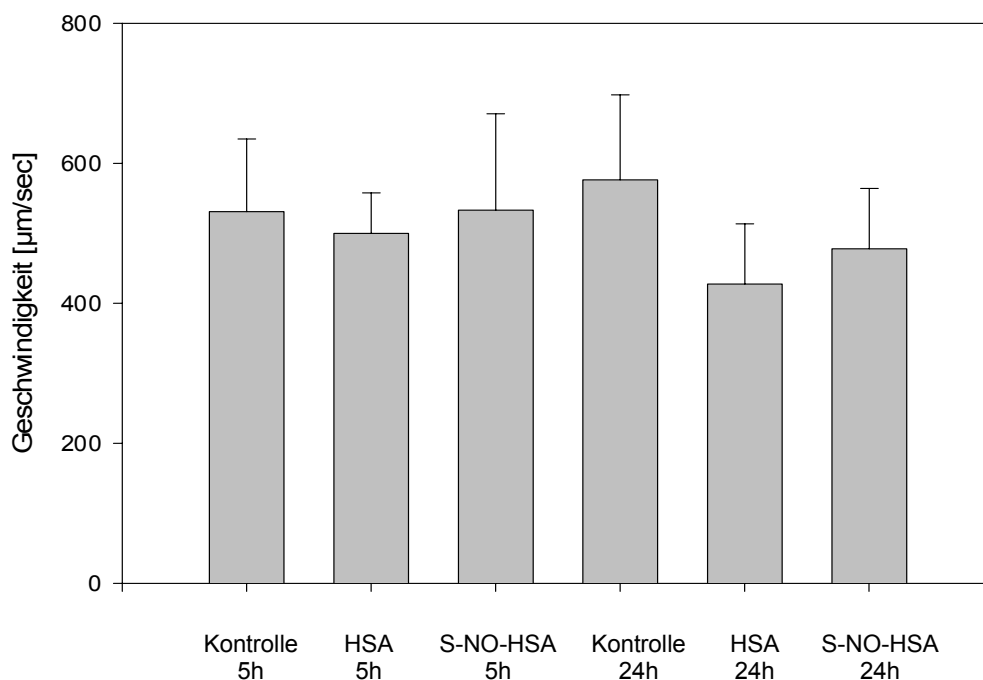


Abb. IV.12 Intrasinusoidale Leukozytengeschwindigkeit (5h und 24h)

Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 5h

S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μmol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 5h

Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 24h

S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μmol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 24h

2.1.3 Geschwindigkeitsquotient

Da sowohl die Erythrozyten- als auch die Leukozytengeschwindigkeit bestimmt wurde, war es möglich, aus diesen Werten einen Quotienten zu bilden, der diese Differenz graphisch darstellt. Es zeigte sich, dass der Quotient in beiden Kontrollgruppen höher als in den HSA-Placebogruppen und S-NO-HSA-Gruppen lag.

	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>
	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>
Mittel [$\mu\text{m}/\text{sek}$]	0,638	0,469	0,566	0,539	0,463	0,416
\pmSEM	0,09	0,03	0,05	0,03	0,03	0,04

Tab. IV.3 Geschwindigkeitsquotient

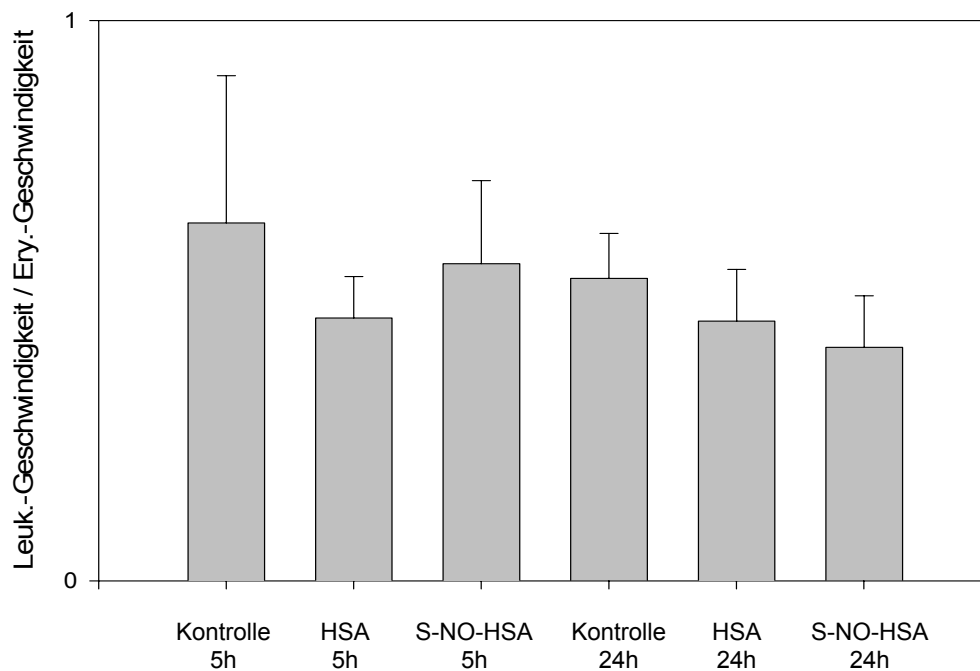


Abb. IV.13 Geschwindigkeitsquotient (5h und 24h)

Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 24h

NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 24h

2.1.4 Sinusoidweiten

Die morphometrische Auswertung der Sinusoidweiten ergab sowohl bei den 5h Versuchsgruppen als auch bei den 24h Versuchsgruppen signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. So lag in der 5h Versuchsreihe die mittlere Sinusoidweite der HSA-Placebogruppe (5h) signifikant unter der Sinusoidweite der Kontrollgruppe (5h) und der S-NO-HSA-Gruppe (5h). Den größten Durchmesser erreichte in diesem Vergleich die S-NO-HSA-Gruppe und lag damit sogar noch signifikant über der Kontrollgruppe. Ähnlich verhielt es sich in der 24h Versuchsreihe. Auch hier war die Sinusoidweite im Durchschnitt bei der HSA-Placebogruppe (24h) signifikant geringer als in der Kontrollgruppe (24h) und der S-NO-HSA-Gruppe (24h). Allerdings zeigte sich zwischen der S-NO-HSA-Gruppe und der Kontrollgruppe keine Signifikanz.

	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>
	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>
Mittel [µm]	8,786§	7,232*	9,514#	9,422	7,151*	9,138#
±SEM	0,190	0,165	0,208	0,125	0,108	0,244

Tab. IV.4 Sinusoidweiten

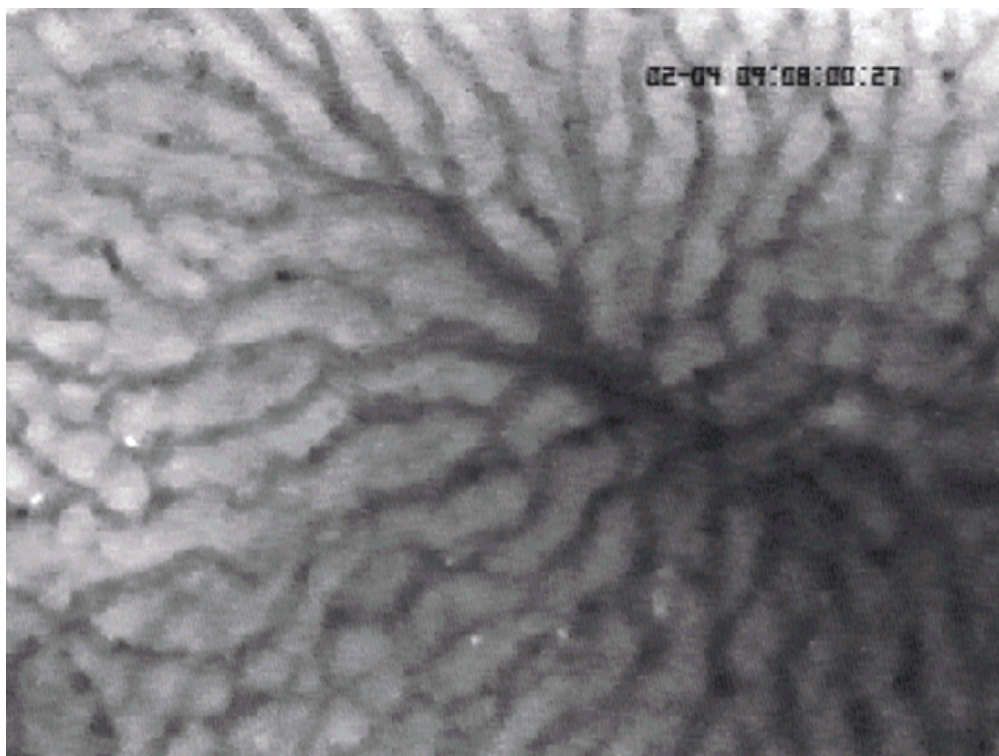


Abb. IV.14 Intravitalmikroskopische Aufnahme 24h nach Schock. Signifikant erweiterte Sinusoide nach Gabe von S-NO-HSA

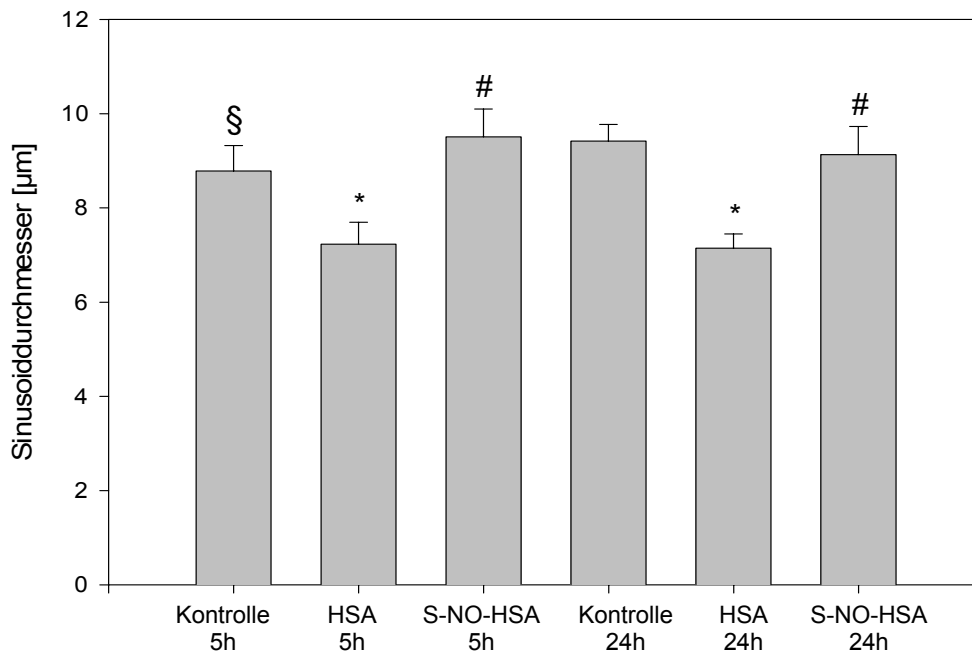


Abb. IV.15 Sinusoidweiten (5h und 24h) * $p < 0,05$ vs. Kontrolle 5h u. $p < 0,05$ vs. Kontrolle 24h
$p < 0,05$ vs. HSA 5h und $p < 0,05$ vs. HSA 24h
§ $p < 0,05$ vs. S-NO-HSA 5h

Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 5h

S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 5h

Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 24h

S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 24h

2.1.5 Sinusoidaler Blutfluss

Die annäherungsweise berechnete Größe des sinusoidalen Blutflusses aus Geschwindigkeit der Blutzellen und Sinusoidweiten wurde wiederum getrennt als Erythrozytenfluss und Leukozytenfluss berechnet.

2.1.5.1 Fluss der Erythrozyten

Eine deutliche Reduzierung des Erythrozytenflusses zeigte sich bei beiden HSA-Placebogruppen. So war in der 5h Versuchsreihe der Fluss der Erythrozyten der HSA-Placebogruppe (5h) signifikant geringer als bei der Kontrollgruppe (5h) und der S-NO-HSA-Gruppe (5h). Auch in der 24h Versuchsreihe war der Fluss der HSA-Placebogruppe (24h)

signifikant geringer gegenüber der Kontrollgruppe (24h) und der S-NO-HSA-Gruppe (24h). Die Werte der S-NO-HSA-Gruppen (5h und 24h) bewegten sich nahezu im Bereich der Kontrollgruppen.

	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>
	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>
Mittel [$\mu\text{m}^3/\text{sek}$]	73159,4	50933,6*	78119,5#	77686,7	46689,2*	72623,1#
\pmSEM	6029,9	3030,9	6435,2	5663,1	3124,2	3903,7

Tab. IV.5 Fluss der Erythrozyten

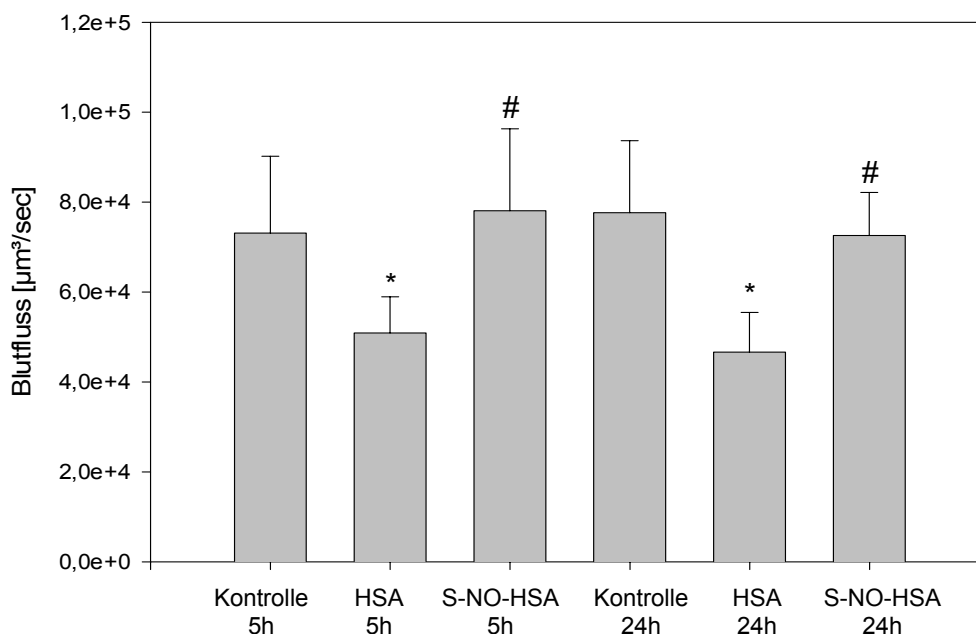


Abb. IV.16 Fluss der Erythrozyten (5h und 24h)

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle 5h und $p < 0,05$ vs. Kontrolle 24h

$p < 0,05$ vs. HSA 5h und $p < 0,05$ vs. HSA 24h

Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 5h

S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μmol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 5h

Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 24h

S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μmol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 24h

2.1.5.2 Fluss der Leukozyten

Auch bei den Leukozyten zeigten sich signifikante Unterschiede im Fluss zwischen den HSA-Placebogruppen und den Kontrollgruppen. In beiden Versuchsreihen (5h und 24h) war der Fluss der Leukozyten der HSA-Placebogruppen signifikant geringer als der der Kontrollgruppen. Keine Signifikanzen zeigten sich beim Vergleich zwischen den Kontrollgruppen und den S-NO-HSA-Gruppen der 5h und 24h Versuchsreihen.

	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>
	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>
Mittel [$\mu\text{m}^3/\text{sek}$]	41532,5	22169,3*	40150,6	37848,9	19322,7*	24339,7
\pmSEM	3982,3	1371,7	4784,4	2958,3	1310,9	2428,7

Tab. IV.6 Fluss der Leukozyten

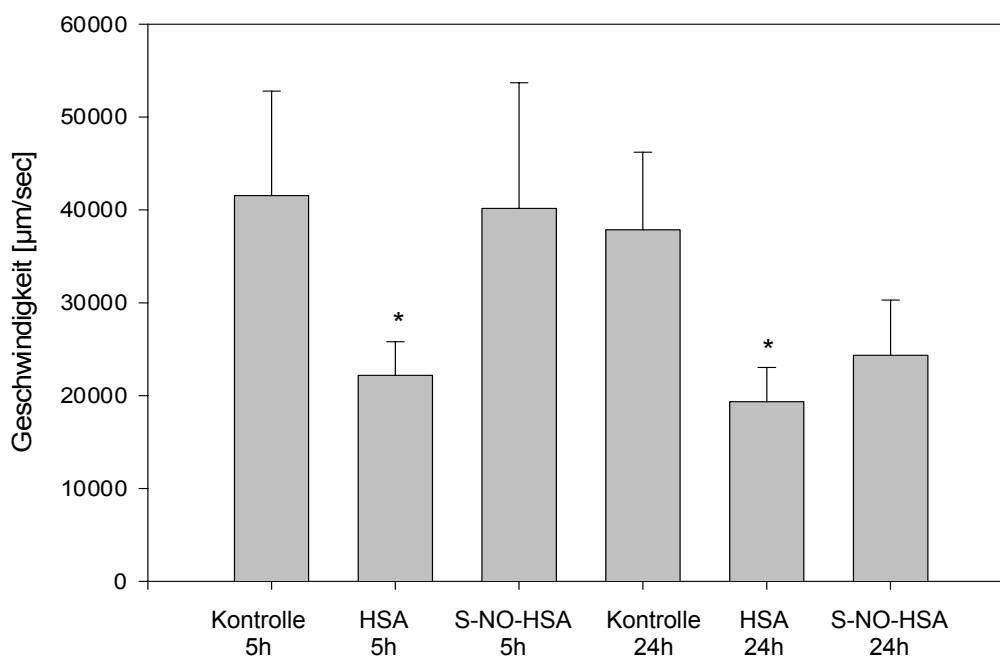


Abb. IV.17 Fluss der Leukozyten (5h und 24h)

*p<0,05 vs. Kontrolle 5h und p<0,05 vs. Kontrolle 24h

Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 24h

S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 24h

2.1.6 Perfusionsrate hepatischer Sinusoide

In allen Versuchsgruppen wurde als zusätzlicher Parameter die Anzahl der Sinusoide gezählt und der prozentuale Anteil der nicht-perfundierten Sinusoide dazu angegeben. Die überwiegende Mehrzahl der Sinusoide war in beiden Versuchsreihen (5h und 24h) perfundiert. So lag der Anteil der perfundierten Sinusoide in allen Versuchsgruppen im Durchschnitt über 82%. Es zeigte sich sowohl bei den 5h als auch bei den 24h Versuchsgruppen, dass der höchste Anteil der nicht-perfundierten Sinusoide bei den HSA-Placebogruppen lag.

	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>	<i>Kontrolle</i>	<i>HSA</i>	<i>S-NO-HSA</i>
	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>5h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>	<i>24h</i>
Mittel	0,122	0,179	0,115	0,0938	0,126	0,0895
±SEM	0,0181	0,0269	0,0217	0,0188	0,0267	0,0178

Tab. IV.7 nicht-perfundierte hepatische Sinusoide

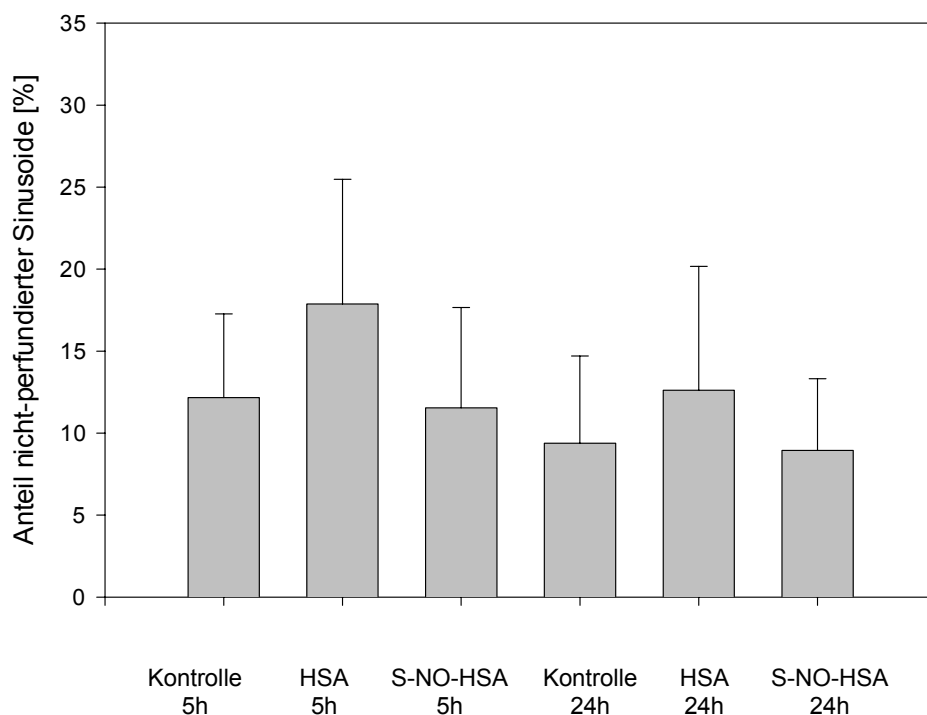


Abb. IV.18 nicht-perfundierte hepatische Sinusoide (5h und 24h)

Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 5h

S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 5h

Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei t = 60 min, Vd 24h

S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4µmol S-NO-HSA/ml bei t = 60 min, Vd 24h

2.2 Beurteilung der Leukozyten-Endothel-Interaktionen

Zur Beurteilung der Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel wurde die Anzahl der temporär und permanent adhärenenten Leukozyten getrennt nach periportalem, midzonalem und perizentralem Feld ausgewertet.

2.2.1 Temporär adhärenente Leukozyten

In der 5h Versuchsreihe ergab sich in der HSA-Placebogruppe (5h) eine signifikant gesteigerte temporäre Leukozytenadhärenz am Sinusoidepithel gegenüber der Kontrollgruppe (5h) und der S-NO-HSA-Gruppe (5h). Die Adhärenz der Leukozyten der S-NO-HSA-Gruppe (5h) lag auf annähernd gleichem Niveau wie die der Kontrollgruppe (5h). Die Ergebnisse innerhalb der 24h Versuchsreihe zeigten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Jedoch war auch hier eine gesteigerte Adhärenz der Leukozyten in der HSA-Placebogruppe (24h) im Vergleich zur Kontrollgruppe (24h) zu erkennen. Die Werte der S-NO-HSA-Gruppe (24h) lagen in der Mitte. Die absolute Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten pro mm² Leberoberfläche war 24h nach Schock in der HSA-Placebogruppe (24h) und der S-NO-HSA-Gruppe (24h) signifikant geringer als 5h nach Schock in den beiden vergleichbaren Gruppen (HSA 5h und S-NO-HSA 5h). Lediglich in der Kontrollgruppe (24h) und der S-NO-HSA-Gruppe (24h) lag eine typische Adhärenzverteilung in den sublobularen Regionen mit der größten Leukozytenadhärenz im periportalen Feld und der geringsten im perizentralen Feld vor. In allen anderen Gruppen wurden höhere Werte des perizentralen Feldes im Vergleich zum midzonalen Feld gemessen. Im Bezug auf das Verhältnis des periportalen Feldes zum perizentralen Feld ergab sich kein einheitliches Bild.

<i>Sublobulare Region</i>	<i>Kontrolle 5h</i>		<i>HSA 5h*</i>		<i>S-NO-HSA 5h#</i>		<i>Kontrolle 24h</i>		<i>HSA 24h</i>		<i>S-NO-HSA 24h</i>	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
Periportal	426,1	27,7	580,0	64,3	432,5	52,1	307,9	43,6	373,5	50,4	333,5	93,1
Midzonal	351,1	53,2	558,3	97,2	323,5	33,6	246,8	18,1	309,4	44,7	277,8	60,7
perizentral	393,5	53,6	664,4	170,1	555,4	65,0	206,3	37,2	329,1	41,8	220,8	93,2

Tab. IV.8 Temporär adhärenente Leukozyten pro mm² Leberoberfläche

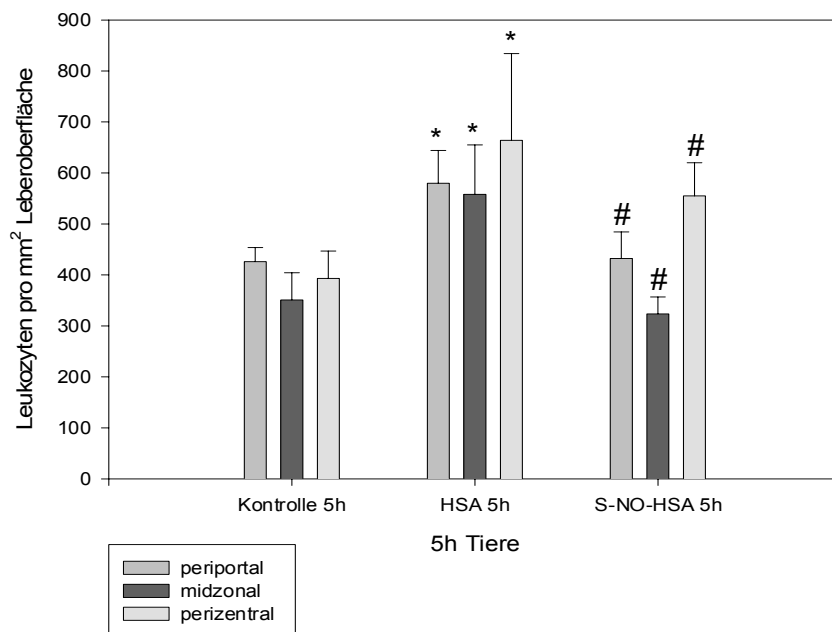


Abb. IV.19a Temporär adhärenente Leukozyten (5h)

* $p < 0,05$ vs. Kontrolle 5h
 # $p < 0,05$ vs. HSA 5h

Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 5h

S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 5h

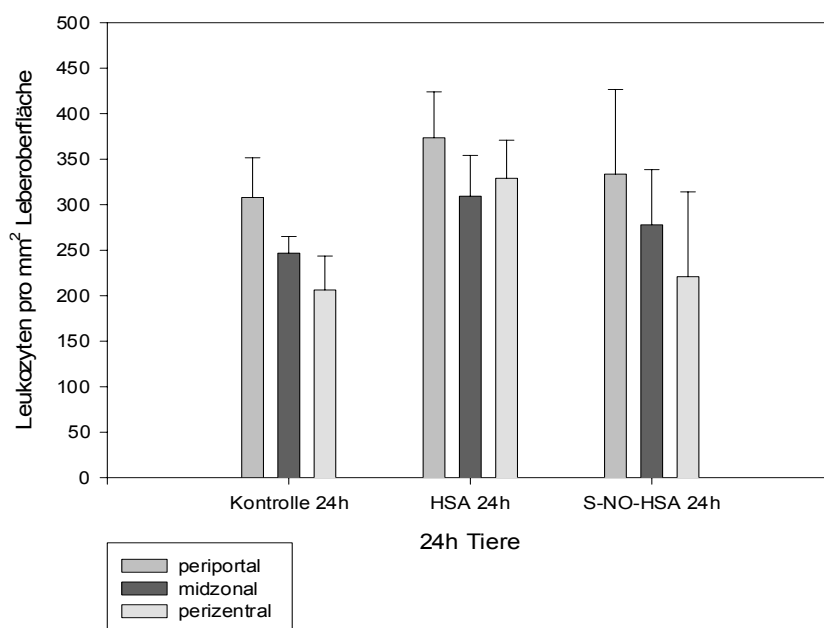


Abb. IV.19b Temporär adhärenente Leukozyten (24h)

Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 24h

S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 24h



Abb. IV.20 Intravitalmikroskopische Aufnahme. Signifikant erhöhte Leukozytenadhärenz in der HSA-Placebogruppe 5h nach Schock

2.2.2 Permanent adhärenente Leukozyten

Die quantitative Auswertung der permanent adhärenenten Leukozyten, die länger als 20 Sekunden am Sinusoidendothel haften, ergab sowohl in der 5h Versuchsreihe als auch in der 24h Versuchsreihe in den drei sublobularen Regionen des Leberacinus eine typische Adhäsionsverteilung in allen Versuchsgruppen. So lagen die signifikant höchsten Adhäsionsraten im periportal Feld gegenüber den Werten der midzonalen und den Werten der perizentralen Bereiche. Signifikant niedriger war die Adhäsion der Leukozyten auch im perizentralen Feld gegenüber dem midzonalen Bereich (Verhältnis periportal:midzonal:perizentral = 2,7:1,9:1,0 bei der HSA-Placebogruppe (5h) und 1,7:1,3:1,0 bei der HSA-Placebogruppe (24h) und 3,6:1,6:1,0 bei der S-NO-HSA-Gruppe (5h) und 3,2:1,7:1,0 bei der S-NO-HSA-Gruppe (24h)). Ein signifikanter Unterschied der Adhärenzrate zwischen den Gruppen zeigte sich nur innerhalb der 5h Versuchsreihe. Hier ergab sich eine

signifikante Erhöhung der permanent adhärenenten Leukozyten in der S-NO-HSA-Gruppe (5h) im Vergleich zur Kontrollgruppe (5h). In der 24h Versuchsreihe ließen sich keine Signifikanzen zwischen den Gruppen mehr feststellen. Es zeigte sich hier die höchste Adhärenzrate in allen drei sublobularen Regionen bei der HSA-Placebogruppe (24h). Die Werte der S-NO-HSA-Gruppe (24h) lagen in etwa auf dem Niveau wie die Werte der Kontrollgruppe (24h). Die absolute Anzahl der permanent adhärenenten Leukozyten pro mm² Leberoberfläche blieb in den Kontrollgruppen (5h und 24h) und den HSA-Placebogruppen (5h und 24h) annähernd auf gleichem Niveau. Nur in den beiden S-NO-HSA-Gruppen (5h und 24h) war die Anzahl der permanent adhärenenten Leukozyten 24h nach hämorrhagischem Schock signifikant geringer als 5h nach dem Schock.

<i>Sublobulare Region</i>	<i>Kontrolle 5h§</i>		<i>HSA 5h</i>		<i>S-NO-HSA 5h</i>		<i>Kontrolle 24h</i>		<i>HSA 24h</i>		<i>S-NO-HSA 24h</i>	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
Periportal	139,5	27,3	182,1	34,4	291,5	67,6	119,3	18,6	159,1	34,5	128,0	33,0
Midzonal	107,8	24,7	127,0	21,3	129,5	33,9	84,8	18,1	119,9	19,6	68,0	19,6
perizentral	64,8	15,1	68,6	11,5	80,6	15,0	72,1	15,3	94,8	24,1	39,8	9,7

Tab. IV.9 Permanent adhärenente Leukozyten pro mm² Leberoberfläche

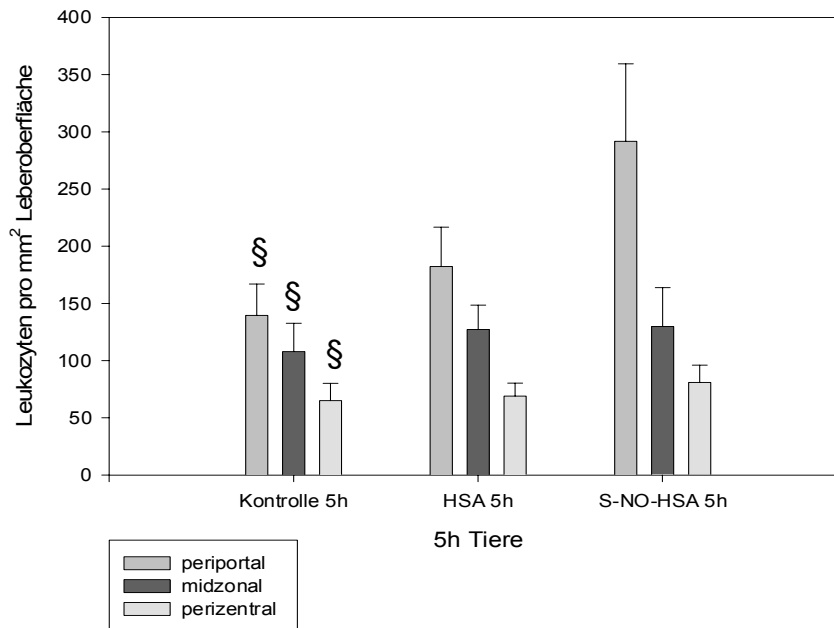


Abb. IV.21a Permanent adhärente Leukozyten (5h) § $p < 0,05$ vs. S-NO-HSA 5h

Kontrolle 5h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 5h (Vd 5h)

HSA 5h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 5h

S-NO-HSA 5h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 5h

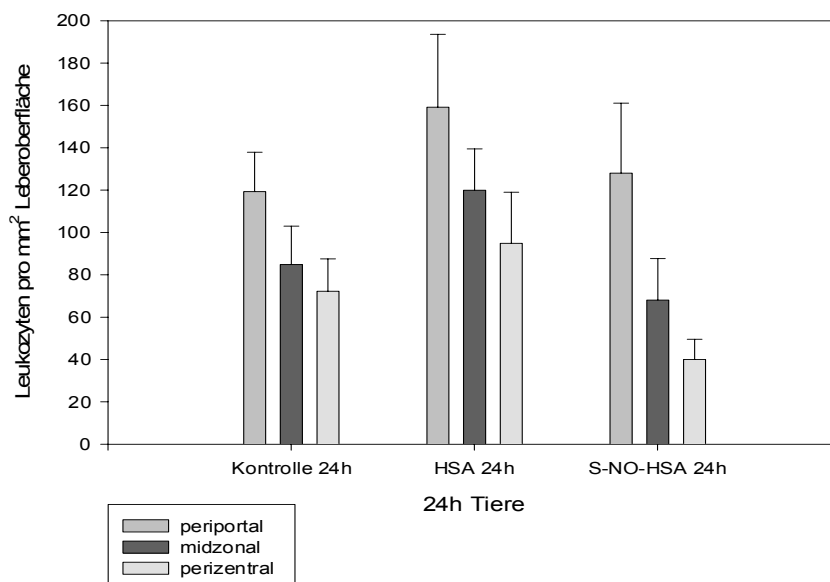


Abb. IV.21b Permanent adhärente Leukozyten (24h)

Kontrolle 24h: Kontrollgruppe ohne Schockinduktion, Versuchsdauer von 24h (Vd 24h)

HSA 24h: Placebogruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 1,5%ige HSA-Lösung bei $t = 60$ min, Vd 24h

S-NO-HSA 24h: S-NO-HSA-Gruppe mit Schockinduktion, Gabe von 5 ml 0,4 μ mol S-NO-HSA/ml bei $t = 60$ min, Vd 24h

V. Diskussion

Die vorliegende randomisierte und verblindete Studie untersuchte die Auswirkungen des NO-Donors S-NO-HSA auf die pathologisch gesteigerte Leukozytenadhärenz in den Sinusoiden der Leber und die schockinduzierten Alterationen der hepatischen Mikrozirkulation fünf und vierundzwanzig Stunden nach hämorrhagischem Schock.

1. Kritische Bemerkungen zur Methode

In dieser Studie wurde das von Bühren modifizierte (Bühren, 1989) Wigger'sche Schockmodell angewandt, in welchem der mittlere arterielle Blutdruck die Zielgröße darstellt (Wiggers, 1946). Die sich in dieser Studie nach sechzig minütiger Schockphase und mehrstündiger Reperfusion anschließende Intravitalmikroskopie der Leber nach fünf bzw. vierundzwanzig Stunden erlaubt eine direkte Visualisierung und Quantifizierung der sinusoidalen Leukozyten/Endothelinteraktionen und der schockbedingten Veränderungen der hepatischen Mikrozirkulation.

Die Untersuchung der hepatischen Mikrozirkulation in vivo mittels Intravitalmikroskopie ist seit vielen Jahren als Untersuchungsmethode etabliert und wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen modifiziert und weiterentwickelt. Der Zeit- und Arbeitsaufwand dieser Untersuchungen ist jedoch sehr hoch. Die ersten Arbeiten von McCuskey gaben Aufschluss über die Verteilung adrenerger, cholinerg und histaminerg Rezeptoren entlang der Sinusoide (McCuskey, 1978) sowie der Reaktionen nach systemischer Verabreichung von Endotoxin (McCuskey 1982 und 1984). In den letzten Jahren wurden zunehmend Veränderungen der Lebermikrozirkulation nach Lebertransplantation (Marzi, 1992 und 1993a) und nach hämorrhagischem Schock (Hower, 1990, Marzi, 1993b und Bauer 1995a und 1995b) systematisch untersucht. Für verschiedene Mediatoren (Sauerstoffradikale, PAF, TNF- α , u.a.) wurde so die qualitative und quantitative Beteiligung am Ischämie/Reperfusionsschaden in enger zeitlicher Korrelation näher beschrieben (Marzi, 1990 und 1992a). Im Zusammenhang mit S-NO-HSA wurden bisher noch keine intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Leber nach hämorrhagischem Schock durchgeführt.

1.1 Einfluss von Narkosemittel und Präparation

Da die Studien aus tierschutzrechtlichen Gründen am narkotisierten Tier durchgeführt werden (Gärtner, 1993), kann ein Einfluss des Narkosemittels, in diesem Fall Pentobarbital-Natrium, auf die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel nicht ganz ausgeschlossen werden. So wurde bereits ein Einfluss von Anästhetika auf die Thrombozytenfunktion bei Ratten beschrieben (Laux und Seiffge, 1993).

Die Technik der Präparation (siehe Kapitel III.1.3 und III.3.1) der in dieser Studie verwendeten Sprague-Dawley-Ratten ist mit etwas Übung gut durchführbar und gut geeignet, den Schock und die Reperfusion durchzuführen und anschließend die Leber der intravitalmikroskopischen Beobachtung zugänglich zu machen, ohne die Integrität der zu- und abfließenden Blutgefäße zu beeinträchtigen. Kritischer Punkt hierbei ist die durch die Präparation verursachte Manipulation, die alleine schon zu einer verstärkten Adhäsion von Leukozyten am Endothel führen kann (Seiffge, 1995). Um diesen Einfluss gering zu halten, wurde eine möglichst schnelle Präparation angestrebt und die Messungen erst nach einer kurzen Stabilisierungsphase (10 Min.) begonnen.

Hervorzuheben ist, dass durch eine exakt dosierte Narkose verbunden mit einer sorgfältigen Präparation und einer permanenten Überwachung der Tiere während der gesamten Narkosedauer, bei den 24h Tieren auch während der Aufwachphase, hohe Ausfallraten der Tiere vermieden werden können. So war es möglich, dass in dieser Studie 83,6 % der für den Versuch vorgesehenen Tiere die Präparation, die sich anschließende Schock- und Reperfusionsphase und aus den 24h Versuchsgruppen alle auch die Aufwachphase überlebten. Alle diese Tiere konnten dann nach 5h bzw. 24h mikroskopiert werden und gingen zu 100% in die Auswertung ein.

1.2 Einfluss der verwendeten Fluoreszenzfarbstoffe

Durch die Anwendung der für die Intravitalmikroskopie notwendigen Farbstoffe Acridine-Orange zur Anfärbung der Leukozyten und Fluorescein-Isothiocyanat (FITC) zur Anfärbung der Erythrozyten können toxische und photochemische Effekte induziert werden. So kann Acridine-Orange selektiv an Nukleinsäuren binden und durch die Produktion von Sauerstoffradikalen eine zytotoxische Wirkung entfalten (Houba-Herlin, 1984) mit der Folge von Membranschäden und zusätzlicher Rezeptorexpression (Patel, 1991). Von FITC ist bekannt, dass durch Lichtanregung Radikale und andere reaktive Zwischenprodukte entstehen

können, die nach Endothelschädigung eine Thrombozytenaggregation verursachen können (Herrmann, 1983). In einer Studie an Hamstern konnte nach nur dreißigminütiger Einwirkung von FITC-Dextran eine vermehrte Leukozytenadhäsion am Endothel beobachtet werden (Gawlowski, 1989). Es ist sehr wahrscheinlich, dass hohe Konzentrationen aller Fluorochrome in Verbindung mit Licht photodynamische Effekte im Organismus induzieren. Da hierbei die Zeitdauer der Strahlenexposition eine große Rolle für die Entstehung von Schäden spielt, wurde in dieser Studie die Belichtungszeit so kurz wie möglich (≤ 10 Min.) gehalten.

2. Makrohämodynamik und Laborparameter

In beiden Versuchsreihen (5h und 24h) zeigten die Basisdaten der makrohämodynamischen Parameter und der Laboruntersuchungen während der zehn-minütigen Stabilisierungsphase („steady state“) keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Messwerte während des Schocks zeigen, dass ein hämorrhagischer Schock mit vergleichbaren Blutdruckwerten von 40 ± 2 mmHg und einer um etwa 50% reduzierten Herzfrequenz induziert wurde. Daran anschließend wurde eine Infusionstherapie, kombiniert aus Blut und Ringerlösung, zur Wiederherstellung der ursprünglichen systemischen hämodynamischen Situation durchgeführt.

2.1 Auswirkungen von S-NO-HSA auf die Makrohämodynamik

In der ersten Stunde der Reperfusionphase, während der Infusion von S-NO-HSA, entwickelten die Tiere der 5h und 24h S-NO-HSA Gruppen eine hyperdynamische Kreislaufreaktion. Dies äußerte sich in einer signifikanten Erhöhung der Herzfrequenz, einer signifikanten Steigerung des Herzzeitvolumens und in einem signifikant erniedrigten arteriellen Blutdruck gegenüber den 5h und 24h HSA Placebogruppen. Solch eine hyperdynamische Kreislaufsituation wurde auch in anderen Studien nach hämorrhagischem Schock beschrieben und ist ein typisches Zeichen einer Abnahme des peripheren Gefäßwiderstandes (Fabian, 1994 und Bauer, 1996).

In diesem Fall ist die Abnahme zusätzlich bedingt durch die von NO ausgelöste Vasodilatation infolge einer massiven Freisetzung von NO während der Infusion von $10 \mu\text{mol/kg/h}$ S-NO-HSA (Cherry, 1987). Damit bestätigen die aktuellen Ergebnisse die Studien am Ischämie/Reperusionsmodell der hinteren Extremität des Kaninchens und am

Herzmuskel bei Schweinen, bei denen die Dosierung von $1\mu\text{mol/kg/h}$ S-NO-HSA ebenso zu einem Absinken des Blutdrucks führt. Dieser Effekt wird nicht beobachtet bei einer niedrigeren Dosierung von $0,1\mu\text{mol/kg/h}$ S-NO-HSA (Hallsröm, 2002 und Dworschak, 2004). Die Vasodilatation ist ein zusätzlicher Beweis dafür, dass zu Ende der Ischämie und zu Beginn der Reperfusion der NO-Mangel, der durch den Mangel an L-Arginin ausgelöst wird (Huk, 1997), in dieser Studie durch die exogene Gabe von S-NO-HSA behoben war.

2.2 Auswirkungen von S-NO-HSA auf die Laborparameter

Die Parameter des Säure-Basen-Haushaltes, der respiratorischen Funktionen und die Hämatokrit- und Hämoglobinwerte zeigten die typischen Veränderungen bei den Schockgruppen während der Schockphase (siehe Kapitel IV.1.5, 1.6 und 1.7). Während der Minderperfusion im hämorrhagischen Schock kommt es zur Anhäufung saurer Stoffwechselprodukte und zum Verbrauch von Pufferbasen im Blut. Um diese metabolische Acidose im Schock respiratorisch zu kompensieren, zeigten die Tiere eine deutliche Hyperventilation mit einem signifikanten Abfall des CO_2 -Partialdruckes und einem signifikanten Anstieg des O_2 -Partialdruckes. Durch diesen Kompensationsmechanismus stieg nach hämorrhagischem Schock auch der pH-Wert wieder an. Die Hämatokrit- und Hämoglobinwerte sanken erwartungsgemäß im hämorrhagischen Schock durch die Blutabnahme, konnten sich nach Rückgabe von 60% des entnommenen Blutes aber stabilisieren. Durch die Infusion mit Ringer-Lösung erreichten die Tiere aller Versuchsgruppen jedoch nicht mehr die Ausgangswerte.

Nach Beendigung der S-NO-HSA-Infusion zeigte sich, dass die Gabe von S-NO-HSA keine großen Auswirkungen auf die hämodynamische und laborchemische Situation der Versuchstiere hatte. So waren bei der entscheidenden letzten Messung aller Werte vor der Intravitalmikroskopie keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchstieren der verschiedenen Gruppen zu erkennen. Damit lagen sowohl bei den 5h Tieren als auch bei den 24h Tieren vergleichbare systemische Bedingungen für die abschließend durchgeführte intravitalmikroskopische Untersuchung der Leber vor.

3. Mikrozirkulation und Leukozyten-Endothelinteraktionen der Leber

Wie im Literaturüberblick beschrieben spielt NO eine wichtige Rolle bei der Regulation der hepatischen Mikrozirkulation (siehe Kapitel II.3.3 ff.). Physiologischerweise gibt es ein ausgeglichenes Verhältnis zwischen den verschiedenen vasoaktiven Mediatoren (Kawada, 1993 und Scommotau, 1999). Im hämorrhagischen Schock scheint dieses Verhältnis durch eine initiale Überproduktion von NO und einem dann folgenden NO-Mangel zu Ende der Ischämie und Beginn der Reperfusion zugunsten der Mediatoren, die eine Vasokonstriktion auslösen, verschoben zu sein (Huk, 1997 und Scommotau, 1999). Der NO-Mangel in der frühen Reperusionsphase wird dadurch ausgelöst, dass das initial in großer Menge gebildete NO durch freie Sauerstoffradikale inaktiviert wird und in der Folge ein Mangel an L-Arginin entsteht. Damit fehlt das Substrat, um NO überhaupt bilden zu können (Huk, 1997). Die Folgen sind eine Minderdurchblutung der Leber durch Sinusoidkonstriktion und eine erhöhte Adhäsion von Leukozyten am Endothel (Marzi, 1993). Dies führt zu irreversiblen Leberschäden mit gravierenden Folgen für den Gesamtorganismus.

3.1 Auswirkungen von S-NO-HSA auf die Mikrozirkulation der Leber

Zur Beurteilung der hepatischen Mikrozirkulation wurde die sinusoidale Erythrozyten- und Leukozytengeschwindigkeit, der daraus ermittelte Geschwindigkeitsquotient, die Sinusoidweiten, der sinusoidale Blutfluss und die Anzahl der nicht-perfundierten Sinusoide bestimmt.

Die Konstriktion der Lebersinusoide nach hämorrhagischem Schock dient der Umverteilung des Blutes im Organismus zugunsten wichtiger Organe wie der Niere oder des Gehirns. Über netzartige perisinusoidale Filamente regulieren die Ito-Zellen den Tonus der Lebersinusoide. Eine Kontraktion der Ito-Zell-Filamente wird offensichtlich über lokal wirkende Mediatoren wie Prostaglandin $F_{2\alpha}$ und Endothelin ausgelöst (Kawada, 1993 und Takei, 1993). In der Leber führt diese Verengung zu einer heterogenen Perfusion, bei der man perfundierte Sinusoide direkt neben nicht-perfundierten Sinusoiden nachweisen kann (Vollmar, 1995). Diese heterogene Perfusion ist über mehrere Tage sichtbar und kann zur Ausschaltung einzelner Leberazini führen (Bauer, 1997 und Kuntz, 1997) oder durch extrem dilatierte Sinusoide zu einem transhepatischen Shunt, so dass die Gesamt-Organperfusion sogar im Normbereich liegt (Vollmar, 1995).

Die vorliegende Studie zeigt, dass die Gabe von S-NO-HSA einen großen Einfluss auf die sinusoidale Perfusion ausübt. Hinsichtlich der Perfusionsrate der hepatischen Sinusoide dieses Modells fiel auf, dass im Durchschnitt über 82% der Sinusoide in allen Gruppen perfundiert waren. Der höchste Anteil der nicht-perfundierten Sinusoide ließ sich erwartungsgemäß bei den HSA-Placebogruppen nachweisen. Auffallend war, dass nicht bei den Kontrollgruppen ohne Schock sondern bei den S-NO-HSA-Gruppen die geringste Anzahl an nicht-perfundierten Sinusoiden gefunden wurde.

In die Berechnung der sinusoidalen Perfusion gehen die Sinusoidweiten und die Geschwindigkeit der Leukozyten bzw. der Erythrozyten ein. Während sich hinsichtlich der Geschwindigkeit der einzelnen Blutzellen keine großen Unterschiede ergaben, zeigten sich deutliche Veränderungen bei den Sinusoidweiten. So wurden in der 5h Versuchsreihe durch die S-NO-HSA-Gabe Sinusoiddurchmesser erreicht, die signifikant über denen der Kontrollgruppe und der HSA-Placebogruppe lagen. Nach 24h waren die Sinusoide immer noch signifikant weiter als die der HSA-Placebogruppe und vergleichbar mit den Sinusoidweiten der Kontrollgruppe. Für die sinusoidale Perfusion in dieser Studie bedeutete dies, dass die einzelnen Blutzellen nicht schneller flossen, sich aber durch die dilatierten Sinusoide der S-NO-HSA-Gruppe das Volumen pro Zeiteinheit, das heißt der Blutfluss der Leukozyten bzw. der Erythrozyten, erhöhte. So war der Fluss der Erythrozyten in den S-NO-HSA-Gruppen 5h und 24h nach Schock signifikant höher als bei den HSA-Placebogruppen und lag auf annähernd gleichem Niveau wie bei den Kontrollgruppen ohne Schock.

Diese Ergebnisse zeigen, dass die sinusoidale Perfusion nach Gabe von S-NO-HSA in der frühen Reperfusionphase schon nach 5h komplett wiederhergestellt war und auch nach 24h vergleichbar ist mit der Perfusion einer Leber ohne hämorrhagischen Schock. Es ist weniger wahrscheinlich, dass dieser Effekt direkt auf das von S-NO-HSA abgegebene NO zurückzuführen ist, da in der Studie von Hallström für dieses NO eine Halbwertszeit von 16 Minuten gemessen wurde (Hallström, 2002) und die Messungen hier 5h oder 24h nach hämorrhagischem Schock durchgeführt wurden. Viel wahrscheinlicher ist es, dass durch das vorhandene NO zu Beginn der Reperfusion eine negative Rückkopplung auf die eNOS ausgeübt wurde (Griscavage, 1995), weshalb im weiteren Verlauf immer genügend L-Arginin vorhanden war, um eine ausreichende Menge NO zu bilden (Huk, 1997). Dieses NO diente als lokaler Mediator für die Dilatation der Ito-Zell-Filamente (Kawada, 1993). So war nach 5h und sogar noch nach 24h eine signifikante Vasodilatation in den S-NO-HSA-Gruppen nachzuweisen.

3.2 Auswirkungen von S-NO-HSA auf die Leukozyten/Endothelinteraktionen in der Leber

Zur Beurteilung der hepatischen Leukozyten/Endothelinteraktionen wurden in dieser Studie die temporär und permanent adhärenenten Leukozyten 5h und 24h nach hämorrhagischem Schock bestimmt. Dass die entzündliche Antwort der Leber nach hämorrhagischem Schock durch erhöhte Leukozyten/Endothelzellinteraktionen charakterisiert ist, wurde schon in mehreren intravitalmikroskopischen Untersuchungen nachgewiesen (Marzi, 1993b und Bauer 1999). Die flussabhängige Margination erhöht die Wahrscheinlichkeit, dass Leukozyten direkt mit dem Endothel reagieren und eine temporäre bzw. permanente Adhäsion über spezifische Adhäsionsmoleküle zustande kommen kann (siehe Kapitel II.1.2.3). Einerseits ist diese Adhäsion Voraussetzung für die Migration der Leukozyten in das interstitielle Gewebe, andererseits beeinträchtigen diese adhärenenten Leukozyten durch Verengung vor allem der postkapillären Venolen wiederum die Mikrozirkulation und schädigen durch Radikalbildung direkt das Gewebe.

3.2.1 Einfluss von S-NO-HSA auf die temporäre Leukozytenadhärenenz in der Leber

In der 5h Versuchsreihe der vorliegenden Studie zeigt sich, wie erwartet, eine signifikant gesteigerte temporäre Leukozytenadhärenenz am Sinusoidepithel in der HSA-Placebogruppe im Vergleich mit der Kontrollgruppe. In der Gruppe, die nach hämorrhagischem Schock mit S-NO-HSA behandelt wurde, ergibt sich hingegen eine signifikante Reduktion der temporär adhärenenten Leukozyten gegenüber der HSA-Placebogruppe. Die Zahl der temporär adhärenenten Leukozyten in der S-NO-HSA-Gruppe zeigt keine großen Unterschiede zur Zahl der Kontrollgruppe. Gleiche Tendenz zeigt sich auch innerhalb der Gruppen der 24h Versuchsreihe, wobei hier zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede mehr messbar sind. Die Menge der temporär adhärenenten Leukozyten in allen drei sublobularen Regionen liegt auch 24h nach hämorrhagischem Schock in der mit S-NO-HSA behandelten Gruppe unter der der HSA-Placebogruppe. Die Anzahl der temporär adhärenenten Leukozyten der 24h Versuchsreihe ist aber insgesamt in den Schockgruppen (HSA 24h und S-NO-HSA 24h) signifikant gegenüber den Schockgruppen (HSA 5h und S-NO-HSA 5h) der 5h Versuchsreihe gefallen.

Diese Ergebnisse sprechen für eine eindeutig positive Wirkung des von S-NO-HSA freigesetzten NO in der frühen Reperfusionphase 5h und auch noch 24h nach

hämorrhagischem Schock. Sie untermauern die Aussagen von Nishida und Kanwar, dass NO neben seiner Eigenschaft als Vasodilatator auch als antientzündlicher Mediator (Nishida, 1994) und als möglicher antiadhäsiver Faktor auf Leukozyten wirken kann (Kanwar, 1995). Außerdem lässt sich vermuten, dass das immer in ausreichender Menge vorhandene L-Arginin, das nicht zur Bildung von NO gebraucht wurde, zusätzlich direkt als Radikalfänger gewirkt (Lass, 2002) und so zu einer verminderten Leukozyten/Endothelinteraktion beigetragen hat (Uhlmann, 1998).

3.2.2 Einfluss von S-NO-HSA auf die permanente Leukozytenadhärenz in der Leber

Schwieriger sind die Ergebnisse in Bezug auf die permanent adhärennten Leukozyten in den verschiedenen Versuchsgruppen zu interpretieren. In der 5h Versuchsreihe sind signifikant mehr permanent adhärennte Leukozyten in der mit S-NO-HSA behandelten Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe zu finden. Nach 24h ist die Anzahl der Leukozyten in der S-NO-HSA-Gruppe (24h) hingegen wieder signifikant geringer als in der S-NO-HSA-Gruppe (5h). Besonders deutlich zeigt sich dies bei der Betrachtung des periportalen Feldes. In etwa gleich liegen die Werte der midzonalen und perizentralen Regionen in allen drei 5h Versuchsgruppen. Innerhalb der 24h Versuchsreihe zeigen sich keinerlei Signifikanzen zwischen den Versuchsgruppen. So sind die meisten permanent adhärennten Leukozyten in allen drei sublobularen Regionen in der HSA-Placebogruppe (24h) zu finden. Die Zahl der permanent adhärennten Leukozyten in der mit S-NO-HSA behandelten Gruppe liegt 24h nach Schock in der periportalen Region geringgradig über und in der midzonalen und perizentralen Region ähnlich der Zahl der Kontrollgruppe.

Erklärbar sind diese Ergebnisse über die Expression der Rezeptoren, die für die Adhäsion der Leukozyten am Endothel verantwortlich sind. So werden beispielsweise von dem Rezeptor ICAM-1, der für eine feste Bindung der Leukozyten am Endothel, die Voraussetzung für die Migration ins Gewebe, zuständig ist, die höchsten konstitutiven Werte in der Leber gemessen, aber es gibt keine signifikante Steigerung der Expression am Sinusoidepithel nach Ischämie und Reperfusion (Olanders, 2002). Diese Tatsache bestätigen auch die Messungen der permanent adhärennten Leukozyten in dieser Studie. So sind keine signifikanten Unterschiede zwischen den Kontrollgruppen und den HSA-Placebogruppen 5h und 24h nach hämorrhagischem Schock zu messen. Die einzige Ausnahme ist die periportale Region der 5h Versuchsgruppe, welche mit S-NO-HSA behandelt wurde, gegenüber der Kontrollgruppe (5h). Eine mögliche Erklärung hierfür ist die hochdosierte Gabe von 10 μ mol/kg/h S-NO-

HSA, die eventuell einen direkten Einfluss auf die Anzahl der Rezeptoren der periportalen Region 5h nach hämorrhagischem Schock ausübt. Wenn in vorherigen Studien eine geringgradige Steigerung der ICAM-1 Rezeptoren nachgewiesen werden konnte, dann war dies zwischen 3h und 6h nach Ischämie und Reperfusion (Henninger, 1997 und Olanders, 2002). Der Beweis für diesen Effekt, ausgelöst durch S-NO-HSA, muss allerdings noch erbracht werden. So kann dieses Ergebnis in der vorliegenden Studie auch durch einen niedrigen Spiegel kurzzeitiger i-NOS Expression entstanden sein, der zu einer erhöhten Expression von P-Selektin- und ICAM-1-Rezeptoren geführt hat (Cuzzocrea, 2002).

4. Schlussfolgerung

Das in dieser Studie verwendete hämorrhagische Schockmodell mit anschließender Intravitalmikroskopie der Leber ist eine gut geeignete Methode zur Erforschung schockbedingter morphologischer Alterationen der Leber. Der Effekt des exogenen NO-Donors S-NO-HSA auf die hepatische Mikrozirkulation und die Leukozyten/Endothelinteraktionen kann reproduzierbar in vivo gemessen werden. Durch die sehr geringe Ausfallrate von Versuchstieren wird dieses Modell auch tierschutzrechtlichen Anforderungen gerecht.

In Übereinstimmung mit vorausgegangenen intravitalmikroskopischen Untersuchungen wird klar, dass dem NO eine wichtige, aber noch nicht restlos geklärte, Rolle im Rahmen der inflammatorischen Reaktionen des Organismus nach hämorrhagischem Schock zukommt. Es ist wahrscheinlich, dass der NO-Mangel zu Ende der Ischämie und Beginn der Reperfusion, resultierend aus Verbrauch von L-Arginin und Inaktivierung von NO durch freie Sauerstoffradikale, zu Störungen der Mikrozirkulation und Leukozyten/Endothelinteraktionen führt. Diese Entzündungsreaktion des Organismus ist der Beginn eines „Circulus vitiosus“, der sich selbst unterhält und durch Freisetzung weiterer Radikale und Entzündungsmediatoren zu den schockinduzierten Alterationen der Leber beiträgt.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von S-NO-HSA in der frühen Reperfusionsphase diesen Pathomechanismus durchbricht und einen positiven Effekt auf die hepatische Mikrozirkulation und Entzündungsreaktion ausübt. So erweitert das von S-NO-HSA abgegebene NO als vasodilatierender Mediator signifikant die Sinusoide und sorgt damit für einen verbesserten Blutfluss 5h und auch noch 24h nach hämorrhagischem Schock. Gleichzeitig reduziert NO in seiner Eigenschaft als antientzündlicher Mediator signifikant die temporären Leukozyten/Endothelinteraktionen in den Lebersinusoiden. Beide Effekte

schützen vor einer Minderperfusion der Leber und beugen schockinduzierten Organschäden vor.

Durch die hier gezeigten Ergebnisse wird deutlich, dass in der Verabreichung des NO-Donors S-NO-HSA in der frühen Reperfusionphase zu Zeiten eines NO-Mangels möglicherweise ein therapeutischer Ansatz zur Verhinderung der posttraumatischen Entzündungsreaktion in der Leber zu sehen ist.

Diese Studie bietet interessante Ansatzpunkte für weitere Forschung. So ist eine effektive Prophylaxe der hepatischen Mikrozirkulationsstörung über eine Stimulation der NO-Produktion mittels NO-Donatoren oder eine Blockade der NO-Produktion über selektive iNOS-Inhibitoren eine Frage der richtigen Dosierung bzw. des richtigen Einsatzzeitpunktes in der frühen oder späten Reperfusionphase. Möglicherweise sollte über eine Kombination von Substanzen, die NO in der frühen Reperfusionphase stimulieren und NO in der späten Reperfusionphase hemmen, nachgedacht werden.

VI. Zusammenfassung

In der Pathogenese des multiplen Organversagens nach hämorrhagischem Schock, Trauma und Sepsis sind Störungen im Bereich der Mikrozirkulation mit fokaler Minderperfusion und Hypoxie vitaler Organe, einschließlich der Leber, eine der Hauptursachen für die Entstehung generalisierter inflammatorischer Reaktionen des Organismus. Dieses „Systemic Inflammatory Response Syndrome“ (SIRS) ist die Folge einer massiven Immunantwort, die bis zum kompletten Organversagen führen kann. Zielzellen des SIRS sind vor allem Endothelzellen lebenswichtiger Organe, aber auch organspezifische Zellen wie Hepatozyten und Kupffer'sche Sternzellen. Charakteristisch im hämorrhagischen Schock sind sowohl die exzessive Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren als auch die Aktivierung von Makrophagen und Leukozyten mit ausgeprägter Störung von Mikrozirkulation und Zellstoffwechsel, wobei in der Pathologie des SIRS die Beeinträchtigung der Stickstoffmonoxid (NO)-Biosynthese eine entscheidende Rolle spielt und weiter zur schlechteren Organdurchblutung und letztlich zur Gewebischämie beiträgt.

In der hier vorliegenden Arbeit wurde in einer tierexperimentellen Studie der Einfluss von exogen substituiertem Stickstoffmonoxid (S-NO-HSA) auf die Mikrozirkulation und die Leukozyten-Endothel-Interaktionen in den hepatischen Sinusoiden nach hämorrhagischem Schock untersucht. Im gewählten verblindeten und randomisierten Versuchsmodell wurde an weiblichen Sprague-Dawley-Ratten ein hämorrhagischer Schock induziert und unter „in vivo“ Bedingungen eine Fluoreszenzmikroskopie der Leber nach 5h und nach 24h durchgeführt. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erlaubt eine genaue Analyse der hepatischen Mikrozirkulation, welche im Schock besonders durch ein sinusoidales Perfusionsdefizit und eine mikrovaskuläre Akkumulation von Leukozyten bestimmt wird.

In dieser Studie konnte gezeigt werden, dass der Einsatz von S-NO-HSA in der frühen Reperfusionphase diesen Pathomechanismus durchbricht und einen positiven Effekt auf die hepatische Mikrozirkulation und Entzündungsreaktion ausübt. So erweitert das von S-NO-HSA abgegebene NO als vasodilatierender Mediator signifikant die Sinusoide und sorgt damit für einen verbesserten Blutfluss 5h und auch noch 24h nach hämorrhagischem Schock. Gleichzeitig reduziert NO in seiner Eigenschaft als antientzündlicher Mediator signifikant die temporären Leukozyten/Endothelinteraktionen in den Lebersinusoiden. Beide Effekte schützen vor einer Minderperfusion der Leber und beugen schockinduzierten Organschäden vor.

Durch die hier gezeigten Ergebnisse wird deutlich, dass in der Verabreichung des NO-Donors S-NO-HSA in der frühen Reperfusionphase zu Zeiten eines NO-Mangels möglicherweise ein therapeutischer Ansatz zur Verhinderung der posttraumatischen Entzündungsreaktion in der Leber zu sehen ist.

VII. Summary

After hemorrhagic shock, trauma and sepsis, alterations in the microcirculation including low perfusion and hypoxia of vital organs cause multiple organ failure. This in turn is a major cause for systemic inflammatory response syndrome (SIRS). SIRS is caused by a massive response of the immune system which in some cases leads to total organ failure. SIRS primarily affects the endothelial cells of vital organs in addition to hepatocytes and Kupffer cells. In hemorrhagic shock, the disturbed microcirculation and cell metabolism results from the emission of proinflammatory mediators and the activation of macrophages and leucocytes. Especially the disturbances in the biosynthesis of nitric oxide (NO) play a vital role in the pathology of SIRS and contribute to the deficits in the blood perfusion of organs and finally ischemia of tissue.

The current study was designed to investigate the exogenous substitution of NO by nitrosylated oxidized human albumin (S-NO-HSA) in the prevention of microvascular alterations and leucocytes-endothelial cell interactions in hepatic sinusoids of hemorrhagic shock. In the blinded and randomized experimental set-up, a hemorrhagic shock was induced to female Sprague-Dawley-rats. After 5 respectively 24 hours, an intravital fluorescence microscopy was performed. This procedure permits a detailed analysis of the hepatic microcirculation during shock by observing deficits in the sinusoidal perfusion and a microvascular accumulation of leucocytes.

The present study shows that exogenously supplement S-NO-HSA given only in the period of early reperfusion can prevent the abovementioned effects, improve hepatic microcirculation and reduce inflammatory reactions. The NO emitted by S-NO-HSA serves as a vasodilating mediator. It increases the vascular diameter significantly and thereby restores sinusoidal perfusion 5h as well as 24 h after hemorrhagic shock. Simultaneously, the inflammatory response is significantly attenuated as indicated by a reduction of temporary leucocytes adhesion by S-NO-HSA administration. Both effects offer protection against an insufficient perfusion of the liver and thus prevent shock-induced organic damage.

In sum, the results suggest that the donation of S-NO-HSA in the period of early reperfusion may represent a therapy to prevent posttraumatic inflammatory reactions in the liver.

VIII. Literaturverzeichnis

ACCP (AMERICAN COLLEGE OF CHEST PHYSICIANS)/SCCM (SOCIETY OF CRITICAL CARE MEDICINE) CONSENSUS CONFERENCE
Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis.
Chest 101: 1644-1655, 1992

ADACHI T., HORI S., MIYAZAKI K., NAKAGAWA M., INOUE S., OHNISHI Y., NAKAZAWA H., AIKAWA N., OGAWA S.
Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates myocardial ischemia in hemorrhagic shock in constant pressure model.
Shock 9: 204-209, 1998

AJUEBOR M.N., VIRÁG L., FLOWER R.J., PERRETTI M., SZABÓ C.
Role of inducible nitric oxide synthase in the regulation of neutrophil migration in symosan-induced inflammation: relationship to IL-10 and chemokine production.
Immunology 95: 625-630, 1998

AMEZCUA J.L., PALMER R.M.J., DE SOUZA B.M., MONCADA S.
Nitric oxide synthesized from L-arginine regulates vascular tone in the coronary circulation of the rabbit.
Br. J. Pharmacol. 97: 1119-1124, 1989

ANAYA-PRADO R., TOLEDO-PEREYRA L.H., GUO R.F., REUBEN J., WARD P.A., WALSH J.
The attenuation of hemorrhage-induced liver injury by exogenous nitric oxide, L-Arginine, and inhibition of inducible nitric oxide synthase.
J. Invest. Surg. 16 (5):247-261, 2003

ANGELE M.K., FITZAL F., SMAIL N., KNOFERL M.W., SCHWACHA M.G., AYALA A., WANG P., CHAUDRY I.H.
L-Arginine attenuates trauma-hemorrhage-induced liver injury.
Crit. Care Med. 28: 3242-3248, 2000

ANGELE M.K., NITSCH S.M., HATZ R.A., ANGELE P., HERNANDEZ-RICHTER T., WICHMANN M.W., CHAUDRY I.H., SCHILDBERG F.W.
L-arginine: a unique amino acid for improving depressed wound immune function following hemorrhage.
Eur. Surg. Res. 34 (1-2): 53-60, 2002

ANGELE M.K., SMAIL N., AYALA A., CIOFFI W.G., BLAND K.I., CHAUDRY I.H.
L-arginine: a unique amino acid for restoring the depressed macrophage functions after trauma-hemorrhage.
J. Trauma 46 (1): 34-41, 1999

- ANGELE M.K., SMAIL N., WANG P., CIOFFI W.G., BLAND K.I., CHAUDRY I.H.
L-Arginine restores the depressed cardiac output and regional perfusion after trauma-hemorrhage.
Surgery 124: 394-401, 1998
- BANKEY P.E., CERRA F.B.
Hepatic dysfunction in shock and organ failure.
In: Pathophysiologie of shock, sepsis and organ failure
Schlag, G., Redl, H. (Hrsg.), Springer, Berlin, Heidleberg, 948-960, 1993
- BARROSO-ARANDA J. SCHMID-SCHÖNBEIN G.W.
Transformation of neutrophils as indicator of irreversibility in hemorrhagic shock.
Am. J. Physiol. 257: H846-H852, 1989
- BARTLETT R.L.
Leukozyte mediated reperfusion injury: What role HBO?
Hyperbaric Medicine Update, Newsletter
www.baromdeical.com/newsletter/010101.html, 1996
- BASSENGE E., BUSSE R.
Endothelial modulation of coronary tone.
Progr. Cardiovasc. Dis. 30: 349-380, 1988
- BAUER C. WALCHER F., HOLANDA M., MERTZLUFFT F., LARSEN R., MARZI I.
Antioxidative resuscitation solution prevents leucocyte adhaesion in the liver after hemorrhagic shock.
J. Trauma 46: 886-893, 1999
- BAUER C., ROTH W., BAHRAMI S., MARZI I.
Attenuation of shock-induced inflammation in the rat liver depends on the time of TNF α -inhibition.
J. Mol. Med. 74(1), 51-58, 1996
- BAUER C., TSCHIRCH F., KUNTZ W., MARZI I.
Anhaltende Veränderungen der Lebermikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock: Einfluss einer frühen Leukozytenadhäsionsblockade.
Unfallchirurg 61: 832-835, 1997b
- BAUER C., WALCHER F., KALWEIT U., LARSEN R., MARZI I.
Role of nitric oxide in the regulation of the hepatic microcirculation.
J. of Hepatology 27:1089-1095, 1997a
- BAUER M., MARZI I.
Leukozyten-Endothel-Interaktion als Ausdruck einer hepatischen Entzündungsreaktion im experimentellen Schocksyndrom.
Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 29: 41-46, 1994

- BAUER M., RENSING H., BAUER C., BAUER I., LARSEN R.
Organ-spezifisches Expressionsmuster eines Kohlenmonoxid-generierenden Stressproteins (Hämoxigenase-1/Hitzeschockprotein 32) nach hämorrhagischem Schock.
Der Anästhesist 46: 339-342, 1997b
- BAUER M., ZHANG J.X., BAUER I., CLEMENS M.G.
Endothelin-1 as a regulator of hepatic microcirculation: sublobular distribution of effects and impact on hepatocellular secretory function.
Shock 1: 1-9, 1994a
- BAUER M., ZHANG J.X., BAUER I., CLEMENS M.G.
ET-1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action.
Am. J. Physiol. 267: G143-G149, 1994b
- BECKMAN J.S., KOPPENOL W.H.
Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly.
Am. J. Physiol. 271: C1424-1437, 1996
- BEVILAQUA M.P., POBER J.S., MENDRICK D.L., COTRAN R.S., GIMBRONE A.
Identification of an inducible endothelialspaceleukozyte adhesion molecule.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 9238-9242, 1987
- BIHARI D.J., CERRA F.B.
Multiple organ failure.
Society of Critical Care Medicine, Fullerton CA, 25-36, 1989
- BORDER J.R., HASSETT J., LADUCA J., SEIBEL R., STEINBERG S., MILLS b.,
LOSI P., BORDER D.
The gut origin septic states in blunt multiple trauma in the ICU.
Ann. Surg. 206: 427-448, 1987
- BRAHN E., BANQUERIGO M.L., FIRESTEIN G.S., BOYLE D.L., SALZMAN A.L.,
SZABÓ C.
Collagen-induced arthritis: reversal by mercaptoethylguanidine, a novel anti-inflammatory agent with a combined mechanism of action.
J. Rheumat 25: 1785-1793, 1998
- BRENNER T., BROCKE S., SZAFER F., SOBEL R.A., PARKINSON J.F., PEREZ
D.H., STEINMAN L.
Inhibition of nitric oxide synthetase for treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis.
J. Immunol 158: 2940-2946, 1997
- BÜHREN V.
Hohe Aortenblockade nach Trauma.
Habilitationsschrift, Homburg, 1989

- CARLOS T.M., HARLAN J.M.
Leukocyte-endothelial adhesion molecules.
Blood 84: 2068-2101, 1994
- CARMONA R., CATALANO R., TRUNKEY D.D.
Septic shock.
In: Shires G.T. (ed) Shock and related problems. Livingstone, Edinburgh 156-177, 1984
- CARRICO C.J., MEAKINS J.L., MARSHALL J.C., FRY D., MAIER R.V.
Multiple-Organ-Failure Syndrome.
Arch. Surg. 121(2): 196-208, 1986
- CHEN C.W., HSIUE T.R., CHANG H.Y.
Effects of N(omega)-nitro-L-arginine (L-NOARG) on blood flow and vasomotion in rat diaphragm microcirculation during hemorrhagic hypotension.
Shock 12 (1): 69-74, 1999
- CHERRY P.D., GILLIS C.N.
Evidence for the role of endothelium-derived relaxing factor in acetylcholine-induced vasodilatation in the intact lung.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 241: 516-520, 1987
- CLANCY R.M., LESZCZYNSKA P.J., ABLAMSON S.B.
Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via direct action on the NADPH oxidase.
J. Clin. Invest. 90: 1116, 1992
- CUZZOCREA S., CHATTERJE P.K., MAZZON E., DUGO L., DE SARRO A., VAN DE LOO F.A.J., CAPUTI A.P., THIEMERMANN C.
Role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after posts ischemic injury.
Shock Vol. 18, 2: 169-176, 2002
- DAUGHTERS K., WAXMANN K., NGUYEN H.
Increasing nitric oxide production improves survival in experimental hemorrhagic shock.
Resuscitation 31: 141-144, 1996
- DE MAIO A.
The heat shock response.
New Horizons 3: 198-207, 1995
- DEVERA M.E., SHAPIRO R.A., NUSSLER A.K., MUDGETT J.S., SIMMONS R.L., MORRIS S.M., BILLIAR T.R.
Transcriptional regulation of human inducible nitric oxide synthase gene by cytokines: initial analysis of human NOS2 promoter.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 1054-1059, 1996

- DIEFENBACH A., SCHINDLER H., DONHAUSER N., LORENZ E., LASKAY T.,
MACMICKING J., ROLLINGHOFF M., GRESSER I., BOGDAN C.
Type 1 interferon (IF-alpha/beta) and type 2 nitric oxide synthase regulate the
innate immune response to a protozoan parasite.
Immunity 8: 77-87, 1998
- DINGES H.P., SCHLAG G., REDL H.
Morphology of the liver in shock.
In: Pathophysiologie of shock, sepsis and organ failure
Schlag G., Redl. H. (Hrsg.) Springer, Berlin, Heidelberg, 257-264, 1993
- DUSTING G.J.
Nitric oxide in cardiovascular disorders.
J. Vasc. Res. 32: 143-161, 1995
- DWORSCHAK M., FRANZ M., HALLSTRÖM S., SEMSROTH S., GASSER H.,
HAIJACKL M., PODESSER B.K., MALINSKI T.
S-nitroso human serum albumin improves oxygen metabolism during
reperfusion after severe myocardial ischemia.
Pharmacology 72 (2): 106-112, 2004
- ERWING J.F., MAINES M.D.
Rapid induction of heme oxygenase-1 mRNA and protein by hyperthermia in
rat brain: Heme oxygenase-2 is not a heat shock protein.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 5364-5368, 1991
- FABIAN T.C., CROCE M.A., STEWART R.M., DOCKTER M.E. PROCTOR K.G.
Neutrophil CD18 expression and blockade after traumatic shock and
endotoxin challenge.
Ann. Surg. 220(4): 552-561, 1994
- FELLEY-BOSCO E., AMBS S., LOWENSTEIN C.J., KEEFER L.K., HARRIS C.C.
Constitutive expression of inducible nitric oxide synthase in human bronchial
epithelial cells induces c-fos and stimulates the cGMP pathway.
Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol. 11: 159-164, 1994
- FENYK-MELODY J.E., GARRISON A.E., BRUNNERT S.R., WEIDNER J.R., SHEN
F., SHELTON B.A., MUDGETT J.S.
Experimental autoimmune encephalomyelitis is exacerbated in mice lacking
the NOS2 gene.
J. Immunol. 160: 2940-2946, 1998
- FERREIRA S.H.
Prostaglandins, aspirin-like drugs and analgesia.
Nature [New Biol.] 240: 200-203, 1972
- FLECKENSTEIN A.E., SMITH S.L., LINSEMAN K.L., BEUVING L.J., HALL E.D.
Comparison of the efficacy of mechanistically different antioxidants in the rat
hemorrhagic shock model.
Circ. Shock 35: 223-230, 1991

- FÖRSTERMANN U., SCHMIDT H.H.H.W., POLLOK J., SHENG H., MITCHELL J.A., WARNER T.D., NAKANE M., MURAD F.
Isoforms of nitric oxide synthetase: Charakterization and and purification from different cell types.
Biochem. Pharmacol. 42: 1849-1857, 1991
- FURCHGOTT R.F., ZAWADSKI J.V.
The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of erterial smooth muscle by acetylcholine.
Nature 288, 373-376, 1980
- GABOURY J., WOODMAN R.C., GRANGER D.N., REIMHARD P., KUBES P.
Nitric oxide prevents leucozyte adherence: Role of superoxide.
Am. J. Physiol. 265: H862-H867, 1993
- GAEHTGENS P.
Pathways and interactions of white cells in the microcirculation.
Progr. Appl. Microcirc. 12: 51-66, 1987
- GÄRTNER K., MILITZER K.
Zur Bewertung von Schmerzen, Leiden und Schäden bei Versuchstieren
Schriftenreihe Versuchstierkunde Heft 14, 1993
- GASSER H., HALLSTRÖM S., KROPIK K., CAO W., THURNHER M., SCHLAG G.
Decompositon of S-Nitrosated Human Serum Albumin (S-NO-HSA) induces transnitrosation reactions. Studies in the isolated rabbit heart perfused with a tyrode-albumin-erythrocyte suspension.
Shock 8, Suppl. 54, 1997
- GAWLOWSKI D.M., HARDING N.R., GRANGER H.J.
Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-dextran 150 and epi-illumination in the microcirculation of hamster cheek pouch.
Micovasc. Res. 37: 1-15, 1989
- GELLER D.A., BILLIAR T.R.
Molecular biology of nitric oxide synthases.
Cancer Metastasis Rev. 17: 7-23, 1998
- GORIS R.J.A., TE BOEKHORST T.P.A., NUYTINCK J.K.S., GIMBRÈRE J.S.F.
Multiple-organ failure – generalized autodestructive inflammation?
Arch. Surg. 120: 1109-1115, 1985
- GRANGER D.N.,
Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury
Am. J. Physiol. 255: H1269-H1275, 1988
- GRANGER D.N., HÖLLWARTH M.E., PARKS D.A.
Ischemia reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals.
Acta Physiol. Scand. [Suppl] 584: 47-63, 1986

- GRANGER D.N., RUTILI G., McCORD J.M.
Superoxide radicals in feline intestinal ischemia.
Gastroenterology 81: 22-29, 1981
- GREENE E.C.
Anatomy of the rat
Hafner Publishing Company, Vol. XXVII New York and London, 1963
- GRISCAVAGE J.M., HOBBS A.J., IGNARRO L.J.
Negative modulation of nitric oxide synthase by nitric oxide and nitroso compounds.
Adv Pharmacol. 34: 215–234, 1995
- HALLSTRÖM S., GASSER H., KROPIK K., FÜRST W., KRÖSL P., THURNHER M., SCHLAG G.
Effect of different NO-donors in the isolated rabbit heart perfused with a tyrode-albumin-erythrocyte suspension.
Shock 8, Suppl. 53, 1997
- HALLSTRÖM S., GASSER H., NEUMAYER C., FUGL A., NANOBASHVILI J., JAKUBOWSKI A., HUK I., SCHLAG G., MALINSKI T.
S-nitroso human serum albumin treatment reduces ischemia/reperfusion injury in skeletal muscle via nitric oxide release.
Circulation. 25;105(25):3032-3038, 2002
- HALLSTRÖM S., GASSER H., NEYMAYER C., FÜGL A., WEBER C., NANOBASHVILI J., THURNHER M., KROPIK K., BROVKOVYCH V., HUK I., MAKLINSKI T.
S-nitroso human serum albumin treatment in ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle – biochemical aspects.
Shock 12, Suppl. 41; 1999
- HAN X., FINK M.P., DELUDE R.L.
Proinflammatory cytokines cause NO-dependent and –independent changes in expression and localization of tight junction proteins in intestinal epithelial cells.
Shock Vol. 19, 3: 229-237, 2003
- HARBRECHT B.G., WU B., WATKINS S.C., BILLIAR T.R., PEITZMAN A.B.
Inhibition of nitric oxide synthesis during severe shock but not after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats.
Shock 8: 415-421, 1997
- HARBRECHT B.G., WU B., WATKINS S.C., MARSHALL H.P.Jr., PEITZMAN A.B., BILLIAR T.R.
Inhibition of nitric oxide synthase during hemorrhagic shock increase hepatic injury.
Shock 4: 332-337, 1995

- HENNINGER D.D., PANES J., EPIHIMER M.
Cytokine-induced VCAM-1 and ICAM-1 expression in different organs of the mouse.
J. Immunol. 158: 1825-1832, 1997
- HERRMANN K.S.
Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanat-dextran.
Microvasc. Res. 26: 238-249, 1983
- HIERHOLZER C., HARBRECHT B., MENEZES J.M., KANE J., MACMICKING J., NATHAN C.F., PEITZMAN A.B., BILLIAR T.R., TWEARDY D.J.
Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock.
J. Exp. Med. 187: 917-928, 1998
- HOBBS A.J., HIGGS A., MONCADA S.
Inhibition of nitric oxide synthase as a potential therapeutic target.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 39: 191-220, 1999
- HOLLMANN P.
Chromodakryorrhoe – Das Geheimnis der Roten Träne bei Nagern
Kleintier konkret: 25-27, 3/2000
- HOUBA-HERIN N., CALBERG-BACQ C.M., VAN DE VORST A.
Photodynamic activity of acridine orange: peroxide radical induction in DNA and synthetic polynucleotides.
Int. J. Radiat. Biol. 45: 487-495, 1984
- HOWER R., KIEFER B., MARZI I., BÜHREN V., HARBAUER G., TRENTZ O.
Lobular distribution and activation of hepatic macrophages following hemorrhagic shock in the rat.
Circ. Shock 31: 52-61, 1990
- HUA T.C., MOOCHHALA S.M.
Influence of L-arginine, aminoguanidine and N^G-nitro-L-arginine methyl ester on the survival rate in a rat model of hemorrhagic shock.
Shock 11: 51-57, 1999
- HUK I., NANOBASHVILI J., NEUMAYER C., PUNZ A., MUELLER M., AFKHAMPOUR K., MITTLBOECK M., LOSERT U., POLTERAUER P., ROTH E., PATTON S., MALINSKI T.
L-Arginine Treatment alters the Kinetics of Nitric Oxide and Superoxide Release and Reduces Ischemia/Reperfusion Injury in Skeletal Muscle.
Circulation 96: 667-675, 1997
- IGNARRO L.J.
Biological actions and properties of endothelium-derived nitric oxide formed and released from artery and vein.
Circ. Res. 65: 1-21, 1989

- IGNARRO L.J.
Signal transduction mechanisms involving nitric oxide.
Biochem. Pharmacol. 41: 485-490, 1991
- JAESCHKE H., FARHOOD A., SMITH C.W.
Neutrophils contribute to ischemia/reperfusion injury in rat liver in vivo.
FASEB J. 4: 3355, 1990
- JAHANMEHR S.A.H., HYDE K., GEARY C.G., CINKOTAI K.I., MACIVER J.E.
Simple technique for fluorescence staining of blood cells with acridine orange.
J. Clin. Path. 40: 926-929, 1987
- JOURD'HEUIL D., JOURD'HEUIL F.L., KUTCHUKIAN P.S., MUSAH R.A., WINK D.A., GRISHAM M.B.
Reaktion of superoxide and nitric oxide with peroxynitrite. Implications for peroxynitrite-mediated oxidation reactions in vivo.
J. Biol. Chem. 276: 28799-28805, 2001
- KANWAR S., KUBES P.
Nitric oxide is an anti-adhesive molecule for leukocytes.
New Horiz. 3: 93-104, 1995
- KAPOOR R., PRASAD K.
Role of oxyradicals in cardiovascular depression and cellular injury in haemorrhagic shock and reinfusion: effect of SOD and catalase.
Circ. Shock 43: 79-94, 1994
- KARUPIAH G., CHEN J.H., MAHALINGAM S., NATHAN C.F., MACMICKING J.D.
Rapid interferon gamma-dependent clearance of influenza A virus and protection from consolidating pneumonitis in nitric oxide synthase 2-deficient mice.
J. Exp. Med 188: 1541-1546, 1998
- KAWADA N., KLEIN H., DECKER K.
Concentration and relaxation of hepatic stellate cells in culture.
In: Cells of the hepatic sinusoids
Von Knook, D.L., Wisse, E. (Hrsg), Leiden, NL
The Kupffer Cell Foundation, 161-164, 1993
- KELLY E., SHAH N.S., MORGAN N.N., WATKINS S.C., PEITZMAN A.B., BILLIAR T.R.
Physiologic and molecular characterization of the role of nitric oxide in hemorrhagic shock.
Shock 7: 157-163, 1997
- KHATSENKO.O., GROSS S.S., RIFKIND A.B., VANE J.R.
Nitric oxide is a mediator of the decrease in cytochrome P450-dependent metabolism caused by immunostimulants.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 11147-11151, 1993

- KLABUNDE R.E., SLAYTON K.J., RITGER R.C.
N^G-methyl-L-arginine restores arterial pressure in hemorrhaged rats.
Circ. Shock 40: 47-52, 1993
- KOMATSU H., KOO A., GUTH P.H.
Leukocyte flow dynamics in the rat liver microcirculation.
Microvasc. Res. 40: 1-13, 1990
- KONTOS H.A.
Oxygen radicals in cerebral ischemia.
In: Ginsberg, M.D., Dietrich W.D. (eds) Cerebrovascular diseases. Raven, New York: 365-386, 1989
- KOO A., LIANG I.Y.S.
Blood flow in hepatic sinusoids in experimental hemorrhagic shock in the rat.
Microvasc. Res. 13: 315-325, 1977
- KREIMEIER U., MESSMER K.
New perspectives in resuscitation and prevention of multiple organ system failure.
In: Baethmann A., Messmer K. (eds) Surgical research: recent concepts and results. Springer, Berlin, Heidelberg, New York 39-50, 1987
- KUIJPERS T.W., HAKKERT B.C., HART M.H.L., ROOS D.
Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: A role for platelet-activating factor and IL-8.
J. Cell Biol 117: 565-572, 1992
- KUNTZ W., MARZI I., BAUER C.
Prolonged alterations of the hepatic microcirculation after hemorrhagic shock in the rat.
In: Cells of the hepatic sinusoid edited by E. Wisse, D.L. Knook, C. Balabaud. Leiden, NL The Kupfer Cell Foundation, 231-233, 1997
- KUROSE I., WOLF R., GRISHAM M.B., GRANGER D.N.
Modulation of ischemia/reperfusion-induced microvascular dysfunction by nitric oxide.
Circ. Res. 74 (3): 376-382, 1994
- LASS A., SUESSENBACHER A., WOLKART G., MAYER B., BRUNNER F.
Functional and analytical evidence for scavenging of oxygen radicals by l-arginine.
Mol. Pharmacol. 61: 1081-1088, 2002
- LAUX V., SEIFFGE D.
Platelet function in the dorsal skin fold chamber of the rat.
In Vivo 7: 45-51, 1993

- LEFER D.J., SCALIA R., CAMPBELL B., NOSSULI T., HAYWARD R., SALAMON M., GRAYSON J., LEFER A.M.
Peroxynitrite inhibits leukocyte-endothelial interactions and protects against ischemia-reperfusion injury in rats.
J. Clin. Invest. 99: 684-691, 1997
- LEY K., CERRITO M., ARFORS K.E.
Sulfated polysaccharides inhibit leukocyte rolling in rabbit mesentery venules.
Am. J. Physiol. 260: H1667-H1673, 1991
- LIEBERTHAL W., MCGARRY A.E., SHEILS J., VALERI C.R.
Nitric oxide inhibition in rats improves blood pressure and renal function during hypovolemic shock.
Am. J. Physiol. 261: F868-F872, 1991
- LINAS S.L., REPINE J.E.
Endothelial cells protect vascular smooth muscle cells from H₂O₂ attack.
Am. J. Physiol. 272(6Pt2): F767-773, 1997
- LINN C., MORELLI P.J., EDRY I., COTTONGIM S.E., SZABO C., SALZMAN A.L.
Promotor analysis of the human inducible nitric oxide synthase gene suggests both transkriptional and post-transkriptional regulation.
Am. J. Physiol. 272: G11499-1508, 1997
- LIU L.M., WARD J.A., DUBICK M.A.
Hemorrhage-induced vascular hyporeactivity to Norepinephrine in select vasculatures of rats and the roles of nitric oxide and endothelin.
Shock Vol. 19, 3: 208-214, 2003
- LIU T.H., ROBINSON E.K., HELMER K.S., WEST S.D., CASTANEDA A.A., CHANG L., MERCER D.W.
Does upregulation of inducible nitric oxide synthase play a role in hepatic injury?
Shock Vol. 18, 6: 549-554, 2002
- LUCCHESI B.R., MULLANE K.M.
Leukozytes and ischemia induced myocardial injury.
Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol. 26: 201-224, 1986
- MARLETTA M.A.
Nitric oxide synthase structure and mechanism.
J. Biol. Chem. 268: 12231-12234, 1993
- MAROTTO M.E., THURMANN R.G., LEMASTERS J.J.
Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated, perfused rat liver: protection by allopurinol.
Hepatology 8: 585-590, 1988

- MARZI I., BAUER C., HOWER R., BÜHREN V.
Leucozyte-endothelial cell interactions in the liver after hemorrhagic shock in the rat.
Circ. Shock 40: 105-114, 1993b
- MARZI I., BAUER M., REISDORF E., WALCHER F.
Beteiligung des Plättchenaktivierungsfaktors (PAF) an pathologischen Leukozyten-Endothel-Interaktionen in der Leber nach hämorrhagischem Schock.
Zentralbl. Chir. 119: 814-821, 1994
- MARZI I., BAUER M., SECCHI A., HOWER R., LARSEN R., BÜHREN V.
Time course and pattern of hepatic leukocyte-endothelial interaction after hemorrhagic shock in the rat.
Circ. Shock 37: 15-21, 1992a
- MARZI I., BAUER M., SECCHIA A., REDL H., BÜHREN V.
Tumor necrosis factor α and leukocyte adhesion to the sinusoidal endothelium after hemorrhagic shock in the rat.
Kupfer Cell Foundation, 1993
- MARZI I., HERZOG M., MAIER M., BAUER C.
Effects of anti-endothelin-1 on liver microcirculation after hemorrhagic shock.
Shock 2: 29-35, 1994
- MARZI I., KNEE J., BÜHREN V., MENGER M.D., TRENTZ O.
Reduction by superoxide dismutase of leukocyte-endothelial adherence after liver transplantation.
Surgery 111: 90-97, 1992
- MARZI I., KNEE J., MENGER M., HARBAUER G., BÜHREN V.
Hepatic microcirculatory disturbances due to portal vein clamping in the orthotopic rat liver transplantation model.
Transplantation 52(3):432-436, 1991
- MARZI I., KNEE J., MENGER M.D., BÜHREN V., TRENTZ O., HARBAUER G.
Reduction of leukocyte adherence and improvement of microcirculation following liver transplantation in the rat by rh-SOD.
Eur. Surg. Res. 22 (S1): 19-24, 1990
- MARZI I., REHKOPF A., HOWER R., BÜHREN V.
Superoxide dismutase reduces leukocyte adherence in hepatic sinusoids following hemorrhagic shock in the rat
Circulatory Shock, 31: 38-42, 1990a
- MARZI I., TAKEI Y., KNEE J., MENGER M., GORES G.J., BÜHREN V., TRENTZ O., LEMASTERS J.J., THURMAN R.G.
Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat.
Transplantation Proceedings 22(4):2004-2005, 1990

- MARZI I., WALCHER F., BÜHREN V.
Macrophage activation and leucocyte adhesion after liver transplantation.
Am. J. Physiol. 265: G172-G177, 1993a
- MAYER B., ANDREW P.
Nitric oxide synthases: catalytic function and progress towards selective inhibition.
Arch. Pharmacol. 358: 127-133, 1998
- MAYER B., SCHRAMMEL A., KLATT P., KOESLING D., SCHMIDT K.
Peroxynitrite-induces accumulation of cyclic GMP in endothelial cells and stimulation of purified soluble guanylyl cyclase: Dependence on glutathione and possible role of S-nitrosation.
J. Biol. Chem. 270: 17355-17360, 1995
- MAZZONI M.C., BORGSTRÖM P., INTAGLIETTA M., ARFORS K.E.
Capillary narrowing in hemorrhagic shock is rectified by hyperosmotic saline-dextran reinfusion.
Circ. Shock 31: 407-418, 1990
- MCCUSCEY R.S., REILLY F.D.
Hepatic microvasculature: Dynamic structure and its regulation.
Semin Liver Dis. 13: 1-12, 1993
- MCCUSKEY R.S., MCCUSKEY P.A., URBASCHEK R., URBASCHEK B.
Species differences in Kupffer cells and endotoxin sensitivity.
Infect. Immun. 45: 278-280, 1984
- MCCUSKEY R.S., REILLY F.D., MCCUSKEY P.A., DIMLICH R.V.W.
In vivo microscopy of the hepatic microvascular system.
Bibliothca. Anat. 18: 73-79, 1978
- MCCUSKEY R.S., URBASCHEK R., MCCUSKEY P.A., URBASCHEK B.
In vivo microscopic studies of the responses of the liver to endotoxin.
Klin. Wochenschr. 60: 749-751, 1982
- MEERSON F.Z., KAGAN V.E., KOZLOV Y.P., BELKIN L.M., ARKHIPENKO Y.V.
The role of lipid peroxidation in pathogenesis of ischemic damage and antioxidant protection of the heart.
Bas. Res. Cardiol. 77: 465-485, 1982
- MELILLO G., MUSSO T., SICA A., TAYLOR L.S., COX G.W., VARESI L.
A hypoxia-responsive element mediates a novel pathway of activation of the inducible nitric oxide synthase promoter.
J. Exp. Med. 182: 1683-1693, 1995
- MENGER M.D., MARZI I., MESSMER K.
In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats.
Eur. Surg. Res. 23: 158-169, 1991

- MESSMER K.
Intestinale Faktoren im Schock: Intestinaler Kreislauf.
Langenbecks Arch. Chir. 319: 890-909, 1967
- MESSMER K., KREIMEIER U.
Microcirculatory therapy in shock.
Resuscitation [Suppl.] 18: S51-S61, 1989
- MICHEL T., LI G.K., BUSCONI L.
Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase.
Proc. Natl. Acad. Sci. 90: 6252-6256, 1993
- MILES A.M., BOHLE D.S., GLASSBRENNER P.A., HANSERT B., WINK D.A., GRISHAM M.B.
Modulation of superoxides-dependent oxidation and hydroxylation reactions by nitric oxide.
J. Biol. Chem. 271: 40-47, 1996
- MITTERMAYR R., VALENTINI D., FITZAL F., HALLSTRÖM S., GASSER H., REDL H.
Protective effect of a novel NO-donor on ischemia/reperfusion injury in a rat epigastric flap model.
Wound Repair Regen. 11(1), 3-10, 2003
- MONCADA S., HIGGS A.
The l-arginine-nitric oxide pathway.
N. Engl. J. Med. 329: 2002-2012, 1993
- MONCADA S., PALMER R.M.J., HIGGS E.A.
Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology.
Pharmacol. Rev. 43: 109-141, 1991
- MOORE W.M., WEBBER G.M., JEROME F.S., TJOENG T.P., CURRIE M.G.
L-N⁶-(1-iminoethyl)lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase.
J. Med. Chem. 37: 3886-3888, 1994
- MORO M.A., DARLEY-USMAR V.M., LIZASOAIN I., SU Y., KNOWLES R.G., RADOMSKI M.W., MONCADA S.
The formation of nitric oxide donors from peroxynitrite.
Br. J. Pharmacol. 116: 1999-2004, 1995
- MÜLLER-PEDDINGHAUS R.
Pathophysiologie und Pharmakologie reaktiver Sauerstoffspezies bei der Entzündung.
Arzneim.-Forsch./Drug.Res. 37(1) 5a: 589-600, 1987

- NAITO Y., YOSHIKAWA T., MATSUYAMA K., YAGI N., ARAI M., NAKAMBRA Y., KANEKO T., YOSHIDA N., KONDO M.
Neutrophils, lipid Peroxidation, and nitric oxide in gastric reperfusion injury in rats.
Free Radic. Biol. Med. 24(3): 494-502, 1998
- NATHAN C.
Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells.
FASEB J. 6: 3051-3064, 1992
- NATHAN Q., XIE Q.
Nitric oxide synthases: roles, tolls and controls.
Cell. 78: 915-918, 1994
- NEUMAYER C., FÜGL A., NANOBASHVILI J., HALLSTRÖM S., GASSER H., BROVKOVYCH V., POLTERAUER P., MALINSKI T., HUK I.
S-nitroso human serum albumin (S-NO-HSA) reduces ischemia/reperfusion injury of skeletal muscle – histomorphometric aspects.
Shock 12 Suppl. 58, 1999
- NISHIDA J., MCCUSKEY R.S., MCDONELL D., FOX E.S.
Protective role of NO in hepatic microcirculatory dysfunction during endotoxemia.
Am. J. Physiol. 267: G1135-G1141, 1994
- NOHL H.
Generation of superoxide radicals as byproduct of cellular respiration.
Ann. Biol. Clin. 52: 199-204, 1994
- NONAMI Y.
The role of nitric oxide in cardiac ischemia-reperfusion injury.
Jpn. Circ. J. 61(2): 119-132, 1997
- NUSSLER A.K., BILLIAR T.R., LIU Z.Z., MORRIS S.M.
Coinduction of nitric oxide synthase and arginosuccinate synthetase in a murine macrophage cell line.
J. Biol. Chem. 269: 1257-1261, 1994
- NUYTINCK J.K.S., GORIS R.J.A., REDL H., SCHLAG G., VAN MUNSTER P.J.J.
Posttraumatic complications and inflammatory mediators.
Arch. Surg. 121: 886-890, 1986
- OKUDA Y., SAKODA S., FUJIMURA H., YANAGIHARA T.
Aminoguanidine, a selective inhibitor of the inducible nitric oxide synthase, has different effects on experimental allergic encephalomyelitis in the induction and progression phase.
J. Neuroimmunol. 81: 201-210, 1998

- OLANDERS K., SUN Z., BÖRJESSON A., DIB M., ANDERSSON E., LASSON A.,
OHLSSON T. ANDERSON R.
The effect of intestinal ischemia and reperfusion injury on ICAM-1 expression,
endothelial barrier function, neutrophil tissue influx, and protease inhibitor
levels in rats.
Shock, Vol. 18, 1: 86-92, 2002
- PALMER L.A., JOHNS R.A.,
Hypoxia upregulates inducible (Typ II) nitric oxide synthase in an HIF-1
dependent manner in rat pulmonary microvascular but not aortic smooth
muscle cells.
Chest. 114: 33S-34S, 1998
- PALMER R.M.J., FERRIDGE A.G., MONCADA S.
Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived
relaxing factor.
Nature 327: 524-526, 1987
- PALMER R.M.J., REES D.D., ASHTON D.S., MONCADA S.
L-Arginine is the physiological precursor for the formation of nitric oxide in
endothelium-dependent relaxation.
Biochem. Biophys. Res. Commun. 153: 1251-1256, 1988
- PANNEN B.H., BAUER M.
Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance
by nitric oxide and carbon monoxide in rats.
Life Sci. 62 (22): 2025-2033, 1998
- PANNEN B.H., KOHLER N., HOLE B., BAUER M., CLEMENS M.G., GEIGER K.K.
Protective role of endogenous carbon monoxide in hepatic microcirculatory
dysfunction after hemorrhagic shock in rats.
J. Clin. Invest. 15, 102 (6): 1220-1228, 1998a
- PANNEN B.H.J., BAUER M., NÖLDGE-SCHOMBURG G.F.E., ZHANG J.X.,
ROBOTHAM J.L., CLEMENS M.G., GEIGER K.K.
Regulation of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock:
role of NO and endothelins.
Am. J. Physiol. 272: H2736-H2745, 1997
- PARKS D.A., GRANGER D.N.
Ischemia-reperfusion injury: a radical view.
Hepatology 8: 680-682, 1988
- PATEL K.D., ZIMMERMANN G.A., PRESCOTT S.M., McEVER R.P., McINTYRE
T.M.
Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP-140 and bind
neutrophils.
J. Cell. Boil. 112: 749-759, 1991

- PELLETIER J.P., JOVANOVIC D., FERNANDES J.C., MANNING P., CONNOR J.R.,
CURRIE M.G., DI BATTISTA J.A., MARTEL-PELLETIER J.
Reduced progression of experimental osteoarthritis in vivo by selective
inhibition of inducible nitric oxide synthetase.
Arthritis Rheum. 41: 1275-1286, 1998
- POOLE-WILSON P.A.
What causes cell death?
*In: Haerse D.J., Yellon D.M. (eds) Therapeutic approaches to myocardial
infarct size limitation. Raven, New York: 43-60, 1984*
- RAJU V:S., MAINES M.D.
Renal ischemia/reperfusion injury upregulates heme oxygenase-1 (HSP-32)
expression and increases cGMP in rat heart.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 277: 1814-1822, 1996
- RAPPAPORT A.M.
The microcirculatory hepatic unit.
Microvasc. Res. 6: 212-228, 1973
- REES D.D., PALMER R.M.J., MONCADA S.
Role of endothelium-derived nitric-oxide in the regulation of blood pressure.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86: 3375-3378, 1989
- ROSE S., DIKE J., FIEBRICH M., WEBER P., BÜHREN V.
Xanthinoxidase: Mediator der Aktivierung polymorphkerniger Granulozyten
nach Trauma?
*In: Becker, Beger, Hartel (Hrsg.): Chirurgisches Forum 1993 für
experimentelle und klinische Forschung. Berlin-Heidelberg-New York,
Springer, 299-303, 1993*
- ROSE S., MARZI I.
Das Polytrauma
Zentralbl. Chir. 121: 896-913, 1996
- RUBBO H., RADI R., TRUJILLO M., TELLERI R., KALYANARAMAN B., BARNES
S., KIRK M., FREEMAN B.A.
Nitric oxide regulation of superoxide and peroxynitrite-dependent lipid
peroxidation.
Formation of novel nitrogen-containing oxidized lipid derivatives.
J. Biol. Chem. 269: 26066-26075, 1994
- SALVEMINI D., MASFERRER J.L.
Interactions of nitric oxide with cyclooxygenase: in vitro, ex vivo and in vivo
studies.
Methods Enzymol. 269: 12-25, 1996
- SALZMANN A.L.
Endotoxic nitrospenia.
Intensive Care Med. 24: 1239-1241, 1998

- SCHAPER J., SCHAPER W.
Reperfusion of ischemic myocardium: ultrastructural and histochemical aspects.
J. Am. Coll. Cardiol. 1: 1037-1046, 1983
- SCHLAG G., REDL H., BAHRAMI S.
SIRS following trauma and during sepsis.
Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. 29(1): 37-41, 1994
- SCHMID-SCHÖNBEIN G.W.
Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation.
Fed. Proc. 46: 2397-2401, 1987
- SCHMID-SCHÖNBEIN G.W., ENGLER R.L.
Granulocytes as active participants in acute myocardial ischemia and infarction.
Am. J. Cardiovasc. Pathol. 1: 15-30, 1986
- SCOMMOTAU S., UHLMANN D., LÖFFLER B.M., BREU V., SPIEGEL H.U.
Involvement of endothelin/nitric oxide balance in hepatic ischemia/reperfusion injury.
Arch. Surg. 384: 65-70, 1999
- SEIFFGE D., BISSINGER T., KREMER E., LAUX V., SCHLEYERBACH R.
Inhibitory effects of pentoxifylline on LPS-induced leucocyte adhesion and macromolecular extravasation in the mikrocirculation.
Inflamm. Res. 44: 281-286, 1995
- SIESJÖ B.K.
Cell damage in the brain – a speculative hypothesis.
J. Cereb. Blood Flow Metabol. 1: 155-185, 1981
- SOUTHAN G.J., ZINGARELLI B., O'CONNOR M., SALZMANN A.L., SZABÓ C.
Spontaneous rearrangement of aminoalkylguanidines into mercaptoalkylguanidines – a novel class of nitric synthase inhibitors with selectivity towards the inducible isoform.
Br. J. Pharmacol. 117: 619-632, 1996
- STEINHOFF G., BEHREND M., SCHRADER B., PICHELMAYR R.
Intercellular immune adhesion molecules in human liver transplants: Overview on expression patterns of leucocyte receptor and ligand molecules.
Hepatology 18: 440-453, 1993
- STUEHR D.J.
Structure-function aspects in the nitric oxide synthases.
Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 37: 339-359, 1997

- SUZUKI Y., DEITCH E.A., MISHUMA S., LU Q., XU D.
Inducible nitric oxidase synthase gene knockout mice have increased resistance to gut injury and bacterial translocation after an intestinal ischemia-reperfusion injury.
Crit. Care Med. 28: 3692-3696, 2000
- SYMINGTON P.A., MA X.L., LEFER A.M.
Protective actions of S-nitroso-N-acetylpenicillamine (SNAP) in a rat model of hemorrhagic shock.
Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol. 14:789-797, 1992
- SZABÓ A., HAKE P., SALZMAN A.L., SZABÓ C.
Beneficial effects of mercaptoethylguanidine, an inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase and a scavenger of peroxynitrit, in a porcine model of delayed hemorrhagic shock.
Crit. Care Med. 27(7): 1343-1350, 1999a
- SZABÓ C.
Potential role of peroxynitrite-poly (ADP-ribose) synthetase pathway in a rat model of severe hemorrhagic shock.
Shock 9: 341-344, 1998
- SZABÓ C.
The role of peroxynitrite in the pathophysiology of shock, inflammation and ischemia-reperfusion injury.
Shock 6: 79-88, 1996
- SZABÓ C., BILLIAR T.R.
Novel Roles of Nitric oxide in hemorrhagic shock.
Shock 12(1): 1-9, 1999
- SZABÓ C., FARAGO M., HORVATH I., LOHINAI Z., KOVACH A.G.B.
Hemorrhagic hypotension impairs endothelium-dependent relaxations in the renal artery of the cat.
Circ. Shock 36: 238-241, 1992
- SZABÓ C., FERRER-SUETA G., ZINGARELLI B., SOUTHAN G.J., SALZMAN A.L., RADI R.
Mercaptoethylguanidine and related guanidine nitric oxide synthase inhibitors react with peroxynitrite and protect against peroxynitrite-induced oxidative damage.
J. Biol. Chem. 272: 9030-9036, 1997
- SZABÓ C., SALZMAN A.L., ISCHIROPOULOS H.
Endotoxin triggers the expression of an inducible isoform of nitric oxide synthase and the formation of peroxynitrite in the rat aorta in vivo.
FEBS Lett. 363: 235-238, 1995

SZABO C., THIEMERMANN C.

Invited opinion: Role of nitric oxide in hemorrhagic, traumatic and anaphylactic shock and thermal injury.

Shock 2(2), 145-155, 1994

TAKEI Y., OSHITA M., TSUJI S., HIJIOKA T., KAWANO S., GOTO M., MASUDA E., FUKUI H., NISHIMURA Y., FUSAMOTO H., KAMADA T.

Endothelin-1 and nitric oxide as mediators regulating sinusoidal tone in the presence of ethanol.

In: Cells of the hepatic sinusoids, Von Knook, D.L., Wisse, E. (Hrsg), Leiden, NL

The Kupffer Cell Foundation 4: 385-387, 1993

TAN L.R., WAXMAN K., CLARK L., ELOI L., CHHIENG N., MILLER B., YOUNG A.

Superoxide dismutase and allopurinol improve survival in an animal model of hemorrhagic shock.

Am. Surg. 59: 797-800, 1993

TARPEY M.M., BECKMAN J.S., ISCHIROPOULOS H., GORE J.Z., BTROCK T.A.

Peroxynitrite stimulates vascular smooth muscle cell cyclic GMP synthesis.

FEBS Lett. 364: 314-318, 1995

THIEMERMANN C., SZABO C., MITCHELL J.A., VANE J.R.

Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and haemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide.

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90: 267-271, 1993

THIEMERMANN C., WU C.C., PIPER J., CHEN S.J., SZABO C., VANE J.R.

Aminoguanidine attenuates the delayed circulatory failure in endotoxic and haemorrhagic shock in the anaesthetized rat.

Ca. J. Physiol. Pharmacol. [Suppl 1]: 471, 1997

THIEMERMANN C:

The role of the L-Arginine: Nitric Oxide Pathway in Circulatory shock.

Pharmacology 28: 45-79, 1994

THOMPSON J.A., HESS M.L.

The oxygen free radical system: a fundamental mechanism in the production of myocardial necrosis.

Progr. Cardiovasc. Dis. 28: 449-462, 1986

TODOROVIC Z., PROSTRAN M.S., VARAGIC V., ZUNIC G., SAVIC J., VUJNOV S.

The cardiovascular effects of the administration of L-NAME during the early posthemorrhagic period.

Gen. Pharmacol. 30: 763-769, 1998

- UHLMANN D., SCOMMOTAU S., WITZIGMANN H., SPIEGEL H.U.
Exogenous L-arginine protects liver microcirculation from ischemia
reperfusion injury.
Eur. Surg. Res. 30(3):175-184, 1998
- VANE J.R.
The endothelium: Maestro of blood circulation.
Proc. R. Lond. B 343: 225-246, 1994
- VEMULAPALLI S., CHIU P.J., GRICHTI K., BROWN A., KUROWSKI S.; SYBERTZ
E.J.
Phosphoramidon does not inhibit endogenous endothelin-1 release stimulated
by hemorrhage, cytokines and hypoxia in rats.
Eur. J. Pharmacol 257: 95-102, 1994
- VOLLMAR B.
Mikrozirkulation und Sauerstoff-Versorgung der Leber bei hämorrhagischem
Schock und Sepsis.
Ästhesisol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. Sonderheft 1, 30: S52-S54,
1995
- VOLLMAR B., LANG G., MENGER M.D., MESSMER K.
Hypertonic hydroxyethylstarch rewtors hepatic microvascular perfusion in
hemorrhagic shock.
Am. J. Physiol. 266: H1927-H1934, 1994
- VOLLMAR B., LANG G., POST S., MENGER M.D., MESSMER K.
Die Mikrozirkulation der Leber im hämorrhagischen Schock der Ratte und
ihre Bedeutung für Energiestoffwechsel und Funktion.
Zentralbl. Chir. 118: 218-225, 1993
- WAKE K., DECKER A., KIRN A., KNOOK D.L., MCCUSKEY R.S., BOUWENS E.,
WISSE E.
Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver.
Int. Rev. Cytol. 118: 173-229, 1989
- WANG P., BA Z.F., BURKHARDT J., CHAUDRY I.H.
Measurement of hepatic blood flow after severe hemorrhage: Lack of
restoration despite adequate resuscitation.
Am. J. Physiol. 262: G92-G98, 1992
- WESTENBERGER U., THANNER S., RUF H.H., GERSONDE K., SUTTER G.,
TRENTZ O.
Formation of free radicals and nitric oxide derivative of hemoglobin in rats
during shock syndrome.
Free Radical Res. Comm. 11: 167-178, 1990
- WIGGERS H.C., INGRAHAM R.C.
Hemorrhagic shock: Definition and criteria for its diagnosis.
J. Clin. Invest 25: 30-36, 1946

- WILEY K.E., DAVENPORT A.P.
Nitric-oxide mediated modulation of the endothelin-1 signalling pathway in the human cardiovascular system.
Br. J. Pharmacol. 132: 213-220, 2001
- XIA Y., DAWSON V.L., DAWSON T.M., SNYDER S.H., ZWEIER J.L.
Nitric oxide synthase generates superoxide and nitric oxide in arginine-depleted cells leading to peroxynitrite-mediated cellular injury.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 6770-6774, 1996
- XIA Y., ZWEIER J.L.
Superoxide and peroxynitrite generation from inducible nitric oxide synthase in macrophages.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 94: 6954-6958, 1997
- YANAGISAWA M., KURIHARA H., KIMURA S., TOMOBE y., KOBAYASHI M., MITUSI Y., YAZAKI y., GOTO, K., MASAKI T.
A novel potent vasokonstriktor peptide produced by vascular endothelial cells.
Nature 332: 411-415, 1988
- YANAGISAWA M., MASAKI T.
Endothelin, a novel endothelium-derived peptide : pharmacological activities, regulation and possible roles in cardiovascular control.
Biochem. Pharmacol. 38: 1877-1883, 1989
- YAO Y.M., BAHRAMI S., LEICHTFRIED G., REDL H., SCHLAG G.
Significance of NO in hemorrhage-induced hemodynamic alterations, organ injury, and mortality in rats.
Am. J. Physiol. 270: H1616-1623, 1996
- ZIELASEK J., JUNG S., GOLD R., LIEW F.Y., TOYKA K.V., HARTUNG H.P.
Administration of nitric oxide synthase inhibitors in experimental autoimmune neuritis and experimental autoimmune encephalomyelitis.
J. Neuroimmunol. 58: 81-99, 1995
- ZIMMERHACKL B., PAREKH N., BRINKHUS H., ET AL.
The use of fluorescent labeled erythrocytes for intravital investigation of flow and local hematocrit in glomerular capillaries in the rat.
Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 2: 119-129, 1983
- ZIMMERMANN R.S., MAYMIND M., BARBEE R.W.
Endothelin blockades lowers total peripheral resistance in hemorrhagic shock recovery.
Hypertension 23: 205-210, 1994
- ZINGARELLI B., ISCHIROPOULOS H., SALZMAN A.L., SZABÓ C.
Improved vascular contractility and cellular energetics in the delayed phase of hemorrhagic shock by mercaptoethylguanidine, a novel inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase.
Eur. J. Pharmacol. 338: 55-65, 1997

ZINGARELLI B., SQUADRITO F., ALTAVILLA D., CALAPAI G., CAMPO G.M., CALO M., SAITTA A., CAPUTI A.P.

Evidence for a role of nitric oxide in hypovolemic hemorrhagic shock.

J. Cardiovasc. Pharmacol. 19: 982-986, 1992

ZUH X.H., ZHU X.L., ZELLWEGER R., AYALA A., CHAUDRY I.H.

Inducible nitric oxide synthase mRNA expression in murine peritoneal macrophages, splenic macrophages and Kupffer cells following hemorrhage.

Shock 3 [Suppl]: 13, 1995

Danksagung

Nach Beendigung dieser Arbeit möchte ich allen Danke sagen, die zum Gelingen dieser Dissertation beigetragen haben.

Herzlich danken möchte ich zuerst Herrn PD Dr. Clemens Bauer für die Überlassung des interessanten Themas und die mir stets gewährte Unterstützung und schnelle Hilfe während der Erstellung der Arbeit.

Für die Übernahme des Zweitgutachtens möchte ich mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Dirk Seiffge bedanken.

Herrn Prof. Dr. Michael D. Menger danke ich für die freundliche Aufnahme am Institut für Klinisch – Experimentelle Chirurgie und die Überlassung seiner Laborräume und Herrn Prof. Dr. Ingo Marzi für die Bereitstellung seiner Geräte.

Des Weiteren danke ich Herrn Dr. Wolfgang Kuntz für seine freundliche Anleitung und die mir jederzeit entgegengebrachte Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Intravitalmikroskopie.

Ebenfalls danken möchte ich den medizinisch technischen Assistentinnen am Institut, insbesondere Frau Martina Jennewein, für die Bearbeitung der Blutproben.

Schließlich gilt mein ganz besonderer Dank allen Freunden, die mit großem Verständnis, liebevollen Worten und hilfreichen Taten die Zeit der Anfertigung dieser Arbeit begleitet haben und mich bei guter Laune hielten.

Letztendlich gilt mein herzlichster Dank meinen Eltern, die mich persönlich unterstützt und jederzeit aufgemuntert haben und meinem Ehemann Ivo, der immer dann da war, wenn ich ihn gebraucht habe, und der für die statistische Auswertung unersetzlich war.

Linden, den 6. Februar 2006

Frauke Ohnsmann-Bischoff

édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
GLEIBERGER WEG 4
D-35435 WETTENBERG

Tel: +49-(0)6406-4413 Fax: -72757
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN 3-8359-5011-8



9 783835 950108