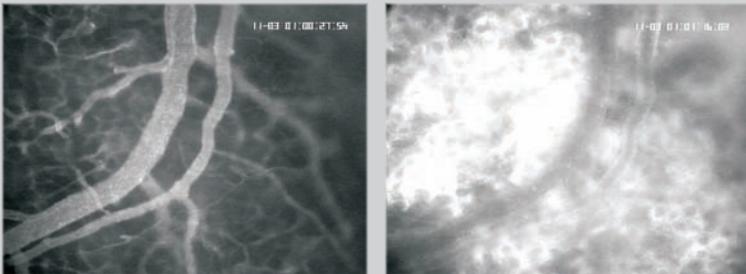


Experimentelle Untersuchungen zum mesenterialen Ischämie-/Reperfusionsschaden:

Der Einfluss von Atherosklerose und Erythropoietin

FRANK APPEL



INAUGURAL-DISSERTATION zur Erlangung des Grades eines **Dr. med. vet.**
beim Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen



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 2011

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 2011

© 2011 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen
Printed in Germany



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890
email: redaktion@doktorverlag.de

www.doktorverlag.de

Aus dem Institut für Veterinär-Pathologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. M. Reinacher
und
dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie
der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar
Betreuer: Priv.-Doz. Dr. R. Schramm, PhD

**Experimentelle Untersuchungen zum mesenterialen
Ischämie-/Reperfusionsschaden: Der Einfluss von
Atherosklerose und Erythropoietin**

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

eingereicht von

FRANK APPEL

Tierarzt aus Kaiserslautern (Rheinland-Pfalz)

Gießen 2011

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Manfred Reinacher
PD Dr. René Schramm, PhD

Tag der Disputation: 15.03.2011

Meiner Frau und unseren Kindern

Inhaltsverzeichnis

<u>1. Zusammenfassung</u>	01
1.1 Deutsch	01
1.2 Englisch	02
<u>2. Einleitung</u>	04
2.1 Anatomische Grundlagen	04
2.2 Mesenteriale Ischämie	05
2.2.1 Akute mesenteriale Ischämie (AMI)	06
2.2.1.1 Wesen der Erkrankung und prädisponierende Faktoren	06
2.2.1.2 Symptomatik	09
2.2.1.3 Diagnostik	09
2.2.1.4 Therapie	13
2.2.2 Chronische mesenteriale Ischämie	17
2.3 Ischämie – Reperfusionsschaden (I/R-Schaden)	18
2.3.1 Allgemeines	18
2.3.2 I/R-Schaden am Darm	20
2.4 Atherosklerose	28
2.4.1 Definition der Atherosklerose	28
2.4.2 Bedeutung der Atherosklerose	28
2.4.3 Pathophysiologie der Atherosklerose	30
2.5 Erythropoietin (Epo)	34
2.6 Fragestellungen	37
<u>3. Material und Methoden</u>	39
3.1 Tiere	39
3.2 Versuchsmodell	39
3.2.1. Narkose	40
3.2.2. Zentralvenöser Zugang	40
3.2.3 Präparation des terminalen Ileums	42

3.3	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	43
3.4	Parameter der Mikrozirkulation	45
3.5	Blutanalyse	47
3.6	Histologie	48
3.7	Myeloperoxidase	51
3.8	Epo-Behandlung	52
3.9	Experimentelle Gruppen	52
3.10	Statistische Auswertung	54
4.	<u>Ergebnisse</u>	55
4.1	Die Bedeutung generalisierter Atherosklerose beim mesenterialen I/R-Schaden	55
4.1.1	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des terminalen Ileums	56
4.1.1.1	Mikrovaskuläre Perfusion	56
4.1.1.2	Postischämische Entzündung	60
4.1.1.3	Histologie	63
4.1.2	Blutbild	66
4.2	„Remote Injury“ in Leber und Lunge	67
4.2.1	„Remote Injury“ in der Leber	67
4.2.2	„Remote Injury“ in der Lunge	68
4.3	Die Effekte von Erythropoietin beim mesenterialen I/R-Schaden	70

4.3.1	Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des terminalen Ileums	70
4.3.1.1	Mikrovaskuläre Perfusion	70
4.3.1.2	Postischämische Entzündung	74
4.3.1.3	Histologie	75
4.3.2	Blutbild	76
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse	78
<u>5. Diskussion</u>		79
5.1	Diskussion des experimentellen Modells	79
5.2	Diskussion der Untersuchungstechniken	80
5.3	Diskussion der Ergebnisse	82
5.3.1	Die Bedeutung einer generalisierten Atherosklerose beim mesenterialen I/R-Schaden	82
5.3.2	Die Bedeutung von Erythropoietin beim mesenterialen I/R-Schaden	87
5.4	Zusammenfassende Beurteilung und Perspektiven	91
<u>6. Anlagen</u>		93
<u>7. Literaturverzeichnis</u>		99
<u>8. Danksagung</u>		123
<u>9. Erklärung</u>		124

Abkürzungen

ALT	Alaninaminotransferase
AMC	Arteria mesenterica cranialis (Tier)
AMI	Akute Mesenterialischämie
AMS	Arteria mesenterica superior (Mensch)
AST	Aspartataminotransferase
ATP	Adenosintriphosphat
aU	arbitrary Unit (dimensionslose Einheit)
BGA	Blutgasanalyse
CT	Computertomographie
dMR	durchschnittliche Mortalitätsrate
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assay
eNOS	endotheliale NO-Synthase
Epo	Erythropoietin
EpoR	Erythropoietin Rezeptor
ET-1	Endothelin 1
FCD	Funktional capillary density
FCDZ	Funktional capillary density of zotts
HABR	hepatic arterial buffer response
HDL	high density lipoprotein
HE	Hämatoxylin-Eosin
Hgb	Hämoglobin
hrEpo	humanes rekombinantes Erythropoietin
HTAB	Hexadecyltrimethylammoniumbromid
i.p.	intra peritoneal
I/R	Ischämie/Reperfusion
ICAM-1	intercellular adhesion molecule 1
IE	Internationale Einheit
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
iNOS	induzierbare NO-Synthase

KGW	Körpergewicht
KHK	Koronare Herzkrankheit
LDL	low density lipoprotein
MCP-1	Makrophagen chemoattraktives Protein 1
MCSF	Makrophagen Colonie stimulierender Faktor
MPO	Myeloperoxidase
NO	Stickstoffmonoxyd
NOMI	Nicht okklusive Mesenterialischämie
PAF	Plättchen aktivierender Faktor
PDGF	platelet-derived growth factor
PLT	platelets (Thrombozyten)
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
pCO ₂	Kohlendioxidpartialdruck
RAR	relativer Alveolarraum
RBC	red blood cells (Erythrozyten)
s.c.	subcutan
SD	Standardabweichung (standard deviation)
SEM	Standardfehler (standard error of the mean)
SIRS	systemic inflammatory response syndrome
SO ₂	Sauerstoffsättigung
TGF-β	Tissue growth factor β
TNF-α	Tumornekrosefaktor α
TxA ₂	Thromboxan A ₂
VCAM-1	vascular cell adhesion molecule 1
VLDL	very low density lipoprotein
VV	Vasa vasorum
WBC	white blood cells (Leukozyten)

1. Zusammenfassung

1.1 Experimentelle Untersuchungen zum mesenterialen Ischämie-/Reperfusionsschaden: Der Einfluss von Atherosklerose und Erythropoietin

Diese Studie untersucht den Einfluss einer prävalenten Atherosklerose auf einen mesenterialen Ischämie-/Reperfusionsschaden (I/R-Schaden) sowie auf den assoziierten Folgeschaden in Leber und Lunge.

Eine Mesenterialischämie wurde durch ein 30-minütiges Abklemmen der Arteria mesenterica cranialis (seu superior) induziert, und zwar in atherosklerotischen Apolipoprotein E-defizienten Mäusen (ApoE^{-/-}) und in Kontrollmäusen (C57Bl/6). Mittels intravitraler Fluoreszenzmikroskopie (IVM) wurden im terminalen Ileum die Dysfunktion der mesenterialen Mikrozirkulation und die Leukozytenantwort studiert. Die histologischen Analysen beinhalteten die quantitative Beurteilung des mukosalen Schadens des terminalen Ileums und des Parenchymschadens in der Leber und der Lunge.

Am Darm zeigte die IVM des terminalen Ileums eine gesteigerte, postischämische Dysfunktion der intestinalen Mikrozirkulation und es fehlte die durch eine reaktive Hyperämie induzierte Vasodilatation in den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen verglichen mit den Kontrollen. Zusätzlich waren die Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen, d.h. das „Rolling“ und die feste Leukozytenadhäsion, in den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren signifikant erhöht. Dies ging einher mit einem deutlich gesteigerten, mukosalen Gewebeschaden im Darm der Knockoutmäuse. Des Weiteren war bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren der durch die mesenteriale Ischämie und Reperfusion provozierte, assoziierte Folgeschaden im Leberparenchym signifikant erhöht und im Lungengewebe zeigte sich eine gesteigerte Infiltration mit neutrophilen Granulozyten.

Eine prävalente generalisierte Atherosklerose steigert also im Zuge einer mesenterialen Ischämie und Reperfusion nicht nur die Dysfunktion der intestinalen Mikrozirkulation, sondern verschlimmert auch den mukosalen Gewebeschaden im Darm und den assoziierten Folgeschaden in der Leber und der Lunge.

In einer zweiten Versuchsreihe sollte ein potenziell protektiver Effekt des Hormons Erythropoietin (Epo) beim mesenterialen I/R-Schaden untersucht werden.

Die IVM zeigte keine relevanten Effekte einer Epo-Behandlung auf die postischämische intestinale Mikrozirkulation. Die postischämische Leukozytenreaktion wurde sowohl von der hohen als auch von der niedrigen Epo-Dosierung gehemmt, die Unterschiede zu den Kontrollen waren aber nicht signifikant. Ebenso fand sich kein Effekt einer Epo-Behandlung auf den histologisch zu detektierenden Mukosaschaden.

Obwohl sich Akutbehandlungen mit nicht-hämatopoetischen Epo-Dosierungen in verschiedenen Modellen akut und chronisch ischämischer Zustände als potent gewebeprotectiv zeigten, scheint dies beim mesenterialen I/R-Schaden keine zufrieden stellende Behandlungsoption zu sein.

1.2 Experimental analysis of mesenteric ischemia/reperfusion injury: Influence of atherosclerosis and of human recombinant erythropoietin

This study investigates whether mesenteric ischemia/reperfusion (I/R)-associated gut injury and remote liver and lung damage are affected by prevalent atherosclerosis.

Mesenteric ischemia was induced in atherosclerotic ApoE-deficient (ApoE) and control C57Bl/6 mice by clamping the superior mesenteric artery for 30 min. Mesenteric microcirculatory dysfunction and leukocytic inflammation were studied in the terminal ileum by intravital fluorescence microscopy (IVM). Histological analyses included quantitative assessment of parenchymal injury in the terminal ileum, liver and lung.

In the gut, IVM of the terminal ileum revealed aggravated postischemic microcirculatory dysfunction and abolished reactive hyperemia-induced vasodilation in atherosclerotic mice compared to controls. In addition, leukocyte-endothelial cell adhesive interactions, i.e. rolling and firm adhesion, were significantly increased in atherosclerotic animals. This was associated with enhanced mucosal tissue damage in ApoE^{-/-} mice. Moreover, mesenteric I/R-provoked remote parenchymal injury in the liver was found significantly aggravated

in atherosclerotic mice. This was accompanied by enhanced neutrophilic lung inflammation in ApoE^{-/-} mice.

In conclusion, prevalent generalized atherosclerosis not only aggravates splanchnic microcirculatory dysfunction and leukocytic inflammation in response to mesenteric I/R, but also exacerbates mucosal tissue damage and remote injury in the liver and the lung.

A second set of experiments was meant to study the potentially protective effects of erythropoietin (Epo) in mesenteric I/R injury.

IVM showed no relevant effects of Epo treatment on the postischemic intestinal microcirculatory perfusion. The postischemic leukocyte response was inhibited by low- and high-dose pretreatment with Epo, however, differences to controls were not significant. In line with these data, there was also no effect of Epo treatment on the postischemic mucosal damage detected by histology.

Thus, although acute treatment with non-hematopoietic doses of Epo has been demonstrated to exert potent tissue protection in various models of acute and chronic ischemia, it appears to be no beneficial treatment option in mesenteric I/R injury.

2. Einleitung

2.1 Anatomische Grundlagen

Beim Menschen entspringen der Bauchaorta (Pars abdominalis aortae) drei kräftige, unpaare Äste zur Versorgung der Eingeweide:

- a) der Truncus coeliacus
- b) die Arteria mesenterica superior (AMS)
- c) die Arteria mesenterica inferior (AMI)

Der Truncus coeliacus versorgt die Organe des Oberbauchs, den Magen, die Leber, die Gallenblase, das Pankreas, das orale Duodenum und die Milz.

Die Arteria mesenterica superior versorgt ebenfalls Teile des Pankreas, den distalen Abschnitt des Duodenums, das gesamte Jejunum und Ileum sowie den Dickdarm bis etwa zum zweiten Drittel des Colon transversum.

Die Arteria mesenterica inferior versorgt die übrigen Abschnitte des Dickdarms und den größten Teil des Rectums [SCHIEBLER und SCHMIDT, 2002].

In der Veterinärmedizin werden die beiden Mesenterialarterien entsprechend dem quadripeden Gang der meisten Säugerspezies als Arteria mesenterica cranialis et caudalis bezeichnet. Ihre Versorgungsgebiete entsprechen, tierartlich aber etwas unterschiedlich, in etwa denen des Menschen. Bei der Maus im Speziellen versorgt die Arteria mesenterica cranialis analog der AMS beim Menschen den gesamten Dünndarm und den größten Teil des Dickdarmes. Das Abklemmen der Arteria mesenterica cranialis reduziert die mikrovaskuläre Perfusion des Mauscolons zu mehr als 85 % [RIAZ et al., 2002].

Die Blutversorgung der Darmzotten erfolgt über Endarterien, die durch die Tunica serosa und durch die Tunica muscularis ziehen und in der Tela submukosa einen Plexus bilden. Von hier aus treten die Äste durch die Lamina muscularis mucosae in die Lamina propria mucosae und weiter in die Zotten (Villi). Je nach Größe des einzelnen Villus enthält er eine oder mehrere Arteriolen, die bis zur Zottenspitze reichen und sich dort in Blutkapillaren mit fenestriertem Endothel aufzweigen. Diese Kapillaren verbinden sich subepithelial netzartig, verlaufen entlang der Zottenseitenfläche zur Zottenbasis und sammeln sich über postkapilläre Venolen in einer oder mehreren größeren Venolen. Diese vereinigen

sich in den Venen des submukosalen Gefäßplexus. Arteriovenöse Anastomosen regulieren den Blutfluß [JUNQUERA UND CARNEIRO, 1996; LIEBICH, 1999].

Im Mikroperforationsgebiet der Darmmukosa sind vor allem drei anatomische Gegebenheiten von besonderem Interesse bezüglich einer gesteigerten Vulnerabilität: Zum Einen verlaufen Arteriolen und Venolen in den Villi räumlich eng beieinander, so dass ein vorzeitiger Sauerstoffaustausch im Gegenstromprinzip möglich ist. Dieser Vorgang wird als „Counter-Current-Exchange“ bezeichnet [LUNDGREN und HAGLUND, 1978]. Das bedeutet im Gegenzug, je langsamer die Durchflusszeit des Blutes, desto mehr Zeit verbleibt für die vorzeitige Sauerstoffdiffusion in die Venole. Folglich kommt es zum O₂-Shunting an der Villusspitze vorbei und damit dort zu einer extrem ausgeprägten Hypoxie oder gar Anoxie [LUNDGREN und HAGLUND, 1978; SHEPHERD und KIEL, 1992]. Zum Zweiten führt der rechtwinklige Abgang der Zottenarteriole aus dem vorgeschalteten Gefäß zu einer physiologischen Hämodilution aufgrund der Massenträgheit der korpuskulären Blutbestandteile, die dem rechtwinkligen Abgang nur eingeschränkt folgen können [DRYJA, 2007]. Drittens besteht aufgrund der hohen Resorptions- und Regenerationsrate der Darmschleimhaut an der Zottenspitze (hohe metabolische Aktivität), per se ein erhöhter Sauerstoffbedarf.

2.2 Mesenteriale Ischämie

Bei der mesenterialen Ischämie unterscheidet man klinisch eine akute und eine chronische Verlaufsform. Dem anatomischen Aufbau folgend, teilt man in der Human- und ebenso in der Veterinärpathologie das Darmrohr in zwei strukturell und funktionell unterschiedliche Anteile auf – in das Dünndarmsegment (Enteron) und das Dickdarmsegment (Colon). Ebenso unterscheidet man das Mesenterium vom Mesocolon. In klinischen Publikationen hingegen wird diese stringente pathologisch-morphologische Einteilung oft aufgeweicht. So hat auch die akute mesenteriale Ischämie in der klinischen Literatur viele verschiedene, aus der Sicht der Pathologie auch oft ungenaue, Synonyme, wie akuter mesenterialer Infarkt, acute ischemic bowel disease, mesenteriale Infarzierung oder akute mesenteriale vaskuläre Okklusion.

Diese Arbeit beschäftigt sich mit den akuten Folgen ischämischer Zustände im Versorgungsgebiet der Arteria mesenterica superior (AMS) seu cranialis (AMC)

und möglicher präventiver Strategien zur Minderung des konsekutiven Reperfusionsschadens nach Beendigung der Ischämie. Auf die chronische mesenteriale Ischämie wird nur am Rande eingegangen. Im Folgenden werden die Begriffe AMS und AMC synonym verwendet, je nachdem, ob vom Menschen oder von Tieren die Rede ist. Auch richtet sich der Focus auf Insulte im Versorgungsgebiet der AMS, wohl wissend, dass sich ischämische Ereignisse auch im Colonsegment des Darmrohres abspielen können.

2.2.1 Akute mesenteriale Ischämie (AMI)

2.2.1.1 Wesen der Erkrankung und prädisponierende Faktoren

Eine akute mesenteriale Ischämie ist in der humanen chirurgischen und internistischen Intensivmedizin ein wichtiges, aber dennoch häufig unterschätztes Krankheitsbild [SCHWARTZKOPFF und HENNERSDORF, 2005]. Sie tritt als Erstsymptom bei Krankenhauseinweisung auf, ist aber ebenso eine dramatische und folgenschwere Komplikation nach chirurgischen Eingriffen. Auch in der Veterinärmedizin steigt die Erkenntnis über ihre Bedeutung zunehmend [MOORE et al., 1995; VAN HOOGMOED et al., 2002; LITTLE et al., 2005; LITTLE et al., 2007].

Die akute mesenteriale Ischämie tritt mit einer Inzidenz von 1/100 000 Einwohner und Jahr auf [KORTMANN und KLAR, 2005]. Bei 0,4 – 1 % aller Patienten mit akutem Bauchschmerz ist sie die Ursache der Beschwerden [ANTES, 2005; KORTMANN und KLAR, 2005], in der Altersklasse über 80 Jahre steigt der Anteil auf ca. 3,8 % [van GELOVEN et al., 2000]. Dies wiederum legt den Schluss nahe, dass in Zukunft, in Anbetracht der momentanen demographischen Entwicklung, mit einem vermehrten Auftreten zu rechnen ist [WOLF und HENNE-BRUNS, 2003].

Trompeter [Trompeter et al., 2002] und Ghosh [Ghosh et al., 2002] sprechen von Mortalitätsraten von weit über 50 % bei postoperativ auftretender AMI, andere Quellen ermittelten eine durchschnittliche Mortalitätsrate der AMI von 70 % (50 – 93%) aus retrospektiven Studien [KORTMANN und KLAR, 2005]. Bei der Aufteilung des Krankheitsbildes der AMI in vier Gruppen, welche auf die möglichen Ursachen der akuten Mesenterialischämie abzielen, zeigt sich, dass für die **Mesenterialarterienembolie** eine durchschnittliche Mortalitätsrate (dMR) von 59 %, für die **Mesenterialarterienthrombose** eine dMR von 66 %, für die

Mesenterialvenenthrombose 25% und für die **nicht okklusive Mesenterialischämie (NOMI)** eine dMR von 72 % besteht [ECKSTEIN, 2003; KORTMANN und KLAR, 2005]. Die Häufigkeit des Auftretens arterieller Verschlüsse, also Mesenterialarterienembolie und -thrombose zusammen, beträgt 60%, die NOMI hat einen Anteil von 25 % und eine Störung der venösen Perfusion spielt mit 15% eher eine untergeordnete Rolle [Trompeter et al., 2002; KORTMANN und KLAR, 2005]. Diese kausale Aufspaltung der AMI trägt der Komplexität des Krankheitsbildes Rechnung [BÖTTGER et al., 1990; SCHWARTZKOPFF und HENNERSDORF, 2005]. Die Bezeichnung „nicht okklusiv“ impliziert bereits, dass es sich hierbei ätiologisch um einen ischämischen Zustand des Darmes in Folge einer Malperfusion handelt, der nicht auf einer partiellen oder totalen Verlegung von Gefäßen beruht (definitio per exclusionem). Hierbei spielt die Einengung der Gefäßlumina z.B. durch reversible, sympathikusvermittelte Vasokonstriktion eine entscheidende Rolle (relative Hypoxie). Diese durch das vegetative Nervensystem vermittelte Vasokonstriktion ist konsekutiver Natur und als Konsequenz einer vorangegangenen erheblichen Minderperfusion der Mesenterialgefäße zu sehen [LOCK, 2002 a]. Eine kritische mesenteriale Vasokonstriktion kann aber auch durch exzessiven Gebrauch von Vasokonstriktoren (z.B. Katecholamine mit primärer Wirkung auf alpha-Rezeptoren wie Adrenalin und Noradrenalin) bedingt sein.

Als prädisponierende Faktoren für das Auftreten einer AMI gelten alle Umstände, die zu einer initialen, oft längere Zeit andauernden Minderperfusion der Mesenterialgefäße führen können. Es sind dies vor allem die Linksherzinsuffizienz unterschiedlicher Genese, Aortenklappeninsuffizienz, Leber- und Nierenerkrankungen. Insbesondere kardiochirurgische Patienten tragen ein erhöhtes Risiko für das postoperative Auftreten einer NOMI [Trompeter et al., 2002]. Auch Hypotonie und die dadurch verminderte Darmperfusion sowie septischer Schock können eine Rolle spielen [KORTMANN und KLAR, 2005]. Als Hormone wirken Vasopressin, Angiotensin II, Prostaglandin F und Endothelin vasokonstriktorisch. Eine für eine NOMI ursächliche Hypotonie kann auch medikamentös bedingt sein. So wirken z.B. Ca-Antagonisten, Nitrate und Diuretika Blutdruck senkend [SCHWARTZKOPFF und HENNERSDORF, 2005]. Digitalisglykoside führen zu einer vermehrten myogenen Antwort der Gefäße des Splanchnikusgebietes und so zur Vasokonstriktion und konsekutiver Minderperfusion [Ende, 1958]. Ischämische Zustände des Darmkonvolutes

können aber auch iatrogen auftreten, z.B. bei allen Formen der Darmtransplantation respektive Darmresektion.

Der NOMI gilt spezielle Aufmerksamkeit, weil sie die höchste durchschnittliche Mortalitätsrate besitzt und jeder vierte Patient der an einer akuten mesenterialen Ischämie leidet davon betroffen ist. Ghosh et al. [GHOSH et al., 2002] geben das Risiko für das Auftreten einer AMI nach Herzoperationen mit < 1% an. Luther et al. [LUTHER et al., 2004] fanden in einer retrospektiven Studie an über 7000 Patienten mit einer kardiochirurgischen Operation mit extrakorporaler Unterstützung, dass 0,34 % eine postoperative Darmischämie entwickelten. Dabei handelte es sich in 56 % um eine NOMI. Es wurden aber nicht alle Patienten ad vitam bzw. post mortem komplett ausdiagnostiziert. Der Anteil der Patienten mit einer NOMI an den vaskulär definierten Patienten war deutlich höher und betrug 73,7 %. Die Gesamtleblichkeit aller postoperativ Erkrankten belief sich auf 92 %. Die Autoren folgern daraus, dass ischämisch gastroenterologische Komplikationen nach Herzoperationen zwar selten auftreten, sie aber wegen ihrer äußerst schlechten Prognose eine besondere Relevanz haben. Hier sei nochmals erwähnt, dass nicht zuletzt auch aufgrund des demographischen Wandels das durchschnittliche Alter der Patienten, die einer herzchirurgischen Operation zugeführt werden, ansteigt und somit auch das Risiko für eine postoperative NOMI aufgrund vermehrter Co-Morbidität zunimmt. Katz et al. [KATZ et al., 2006] untersuchten das Auftreten von non-okklusiver mesenterialer Ischämie bei Herzoperationen ohne extrakorporale Zirkulation. Sie stellen die Behauptung auf, dass eine "Off-pump" Bypassoperation, also eine Bypassoperation ohne Einsatz der Herz-Lungen-Maschine, das postoperative Auftreten einer NOMI bei retrospektiv prädisponierten Patienten begünstigt. Der Grund dafür liegt wohl an den intraoperativ möglichen hämodynamischen Schwankungen, die gegebenenfalls "On-pump" geringer sind. Im Gegensatz dazu halten wiederum andere Autoren es für möglich, dass der kontinuierliche, nicht pulsatile Blutfluß während extrakorporaler Zirkulation bei kardiochirurgischen Eingriffen einen Vasospasmus der Mesenterialstrombahn in der postoperativen Phase verursachen könnte [ALLEN et al., 1992; TSIOTOS et al., 1994].

2.2.1.2 Symptomatik

Bei der akuten Mesenterialischämie finden wir bei ätiologisch arteriellem Verschluss eine Krankheitssymptomatik, die klassisch in drei aufeinander folgende Phasen [BRAUN, 1985; HAGLUND und BERGQVIST, 1999; WOLF und HENNE-BRUNS, 2003] unterteilt wird:

1. In der ersten Phase (Initialphase) treten symptomatisch starke bis kolikartige Schmerzen in der Regel periumbilical auf, begleitet von Übelkeit, Erbrechen, Schwindelgefühl, Meteorismus und Verstopfung. Aber auch schleimig-blutige Diarrhöe ist möglich [LOCK, 2002 a]. Die Zeitdauer dieser Phase beträgt 1-6 Stunden [DIRKS, 2004].

2. Während der zweiten Phase (Intermediär- oder Latenzstadium) klingen die Schmerzsymptome typischerweise deutlich ab, der Allgemeinzustand des Patienten verschlechtert sich aber weiter. Deshalb wird diese Phase auch als „schmerzfrees Intervall“ oder „fauler Friede“ bezeichnet [DIRKS, 2004] und dauert ca. 2 bis 12 Stunden.

3. In der dritten Phase (Endstadium) erfolgt eine erneute Zunahme der Beschwerdesymptomatik verbunden mit Schmerzhaftigkeit, Zeichen des paralytischen Ileus sowie anschließender Durchwanderungsperitonitis, die im Schock endet.

2.2.1.3 Diagnostik

Übereinstimmend kommen alle Autoren zu der Schlussfolgerung, dass die Hauptdeterminante des Überlebens bei mesenterialer Ischämie das Zeitintervall bis zur Diagnosestellung und damit die Krankheitsprogredienz zum Zeitpunkt des Therapiebeginns ist. Der erste Zeitverlust findet immer präklinisch durch den Patienten selbst oder durch verzögerte Klinikeinweisung bei unklarer und/oder zwischenzeitlich gebesserter Symptomatik (Latenzstadium!) statt. Die Zeitspannen von der Erstsymptomatik bis zum Kontaktieren eines Arztes bzw. stationärer Aufnahme, variieren von 6 bis 40,6 Stunden [BÖTTGER et al., 1990; CZERNY et al., 1997; LUTHER et al., 2002].

Bei der Anamneseerhebung ist besonderes Augenmerk auf das Alter des Patienten, frühere Embolien, Atherosklerose und Medikamenteneinnahme zu legen.

Bei der klinischen Untersuchung zeigt sich in der Regel eine unspezifische Symptomatik. Es imponiert oftmals ein druckempfindliches und zuweilen aufgetriebenes Abdomen. Die Darmgeräusche sind meist deutlich vermindert und die Patienten oftmals dehydriert. Klinische Anzeichen einer Peritonitis sprechen für ein bereits eingetretenes intestinales Gangrän [LOCK, 2002 a]. Gerade bei Patienten nach kardiochirurgischen Eingriffen, die zunehmenden abdominellen Schmerz/Druckschmerz beklagen und prädisponierende Co-Morbiditätsfaktoren aufweisen, muss zwingend an eine NOMI gedacht werden. Luther et al. [LUTHER et al., 2004] fordern, jedem Verdacht notfallmäßig wie bei einem Herzinfarkt oder bei einem Apoplex nachzugehen.

Bei unklaren Abdominalbeschwerden folgt dann in der Regel ein konsekutiver Algorithmus von klinischer Untersuchung, Laboruntersuchung, Röntgenuntersuchung und gegebenenfalls Sonographie des Abdomens. In zweiter Linie werden dann bei weiterhin unklarer Diagnose aufwendigere Untersuchungen, wie die Computertomographie (CT), die Magnetresonanztomographie (MRT) oder eine Angiographie durchgeführt [KORTMANN und KLAR, 2005]. Endoskopische Verfahren sind bei der Diagnostik der mesenterialen Ischämie nur von eingeschränkter Hilfe, da das betroffene Segment im Allgemeinen jenseits der Reichweite des Endoskops im Dünndarm liegt. In Einzelfällen kann jedoch in den distalen (aboralen) Dünndarmsegmenten und eventuell im Colon eine Ischämie diagnostiziert werden. Die Gastroskopie kann differentialdiagnostisch hilfreich sein, um Magen- und Duodenalulzera auszuschließen [LOCK, 2004 a].

Bei der Labordiagnostik des Blutes werden bei der AMI eine Leukozytose, hohes C-reaktives Protein (CRP) eine Erhöhung des Serumlaktatspiegels, Hyperkaliämie und eine metabolische Azidose beschrieben. Alle diese Parameter besitzen jedoch weder eine hohe Sensitivität noch Spezifität [BÖTTGER et al., 1990]. Zudem kann eine AMI auch ohne jegliches labor-chemische Korrelat vorliegen. KLEIN et al. [1995] fanden keinen signifikanten Unterschied in der Höhe der Serumlaktatwerte zwischen den Überlebenden (23) und den an einer AMI Verstorbenen (35) in einem Kollektiv von 58 Patienten. In jüngster Zeit wird der

Bestimmung der alpha-Glutathion S-Transferase (alpha-GST) bei der frühzeitigen Detektion einer AMI immer mehr Beachtung geschenkt. In Kombination mit einer Erhöhung des Serumlaktatspiegels und/oder einer Leukozytose steigt die Sensitivität auf über 97 % und somit der positive prädiktive Wert der alpha-GST Bestimmung [GEARHART et al., 2003]. Ein weiterer Ansatz mittels Laboranalyse möglichst schnell einen möglichst potenten Marker für das Vorliegen einer AMI zu bekommen, könnte womöglich auch die Bestimmung der Alkoholdehydrogenase (ADH) sein [GUMASTE et al., 2005].

Wenn die Laboruntersuchungen unspezifische Ergebnisse erbracht haben, werden als weiterführende Untersuchung mittels konventioneller Röntgentechnik Abdomenübersichtsaufnahmen in zwei Ebenen (Rückenlage und Linksseitenlage) und Thoraxaufnahmen in zwei Ebenen im Stehen angefertigt. Zusätzlich kann eine sonographische Untersuchung des Abdomens durchgeführt werden [ANTES, 2005]. Diese Maßnahmen zeigen allerdings erst in der Spätphase einer AMI spezifische Ergebnisse [PROBST et al., 1980] und speziell die Sonographie dient eher dem Ausschluss anderer Ursachen für die Abdominalbeschwerden.

Bei der Frage, ob als weiterführende Untersuchung eine Computertomographie (CT) oder eine Angiographie eher zu einer schnellen Diagnosefindung beiträgt, differieren die Meinungen verschiedener Autoren. Hauptstreitpunkt ist die Invasivität der Angiographie.

Bei der CT zur Detektion pathologischer Befunde im Digestionsapparat, wird dem Patienten ein Röntgenkontrastmittel entweder oral (z.B. Gastrografin) oder intravenös (z.B. Meglumin Ioxitalamat) verabreicht. Beim Verdacht des Vorliegens einer AMI empfiehlt sich die intravenöse Anwendung, da nur so die Gefäße der Darmwand und eventuell bestehende murale Schädigungen mit Gefäßarrosion (Einblutungen in die Darmwand) erkannt werden können [KLEIN et al., 1995]. Die CT hat eine maximale Sensitivität von 80 bis 82 % in Bezug auf die AMI insgesamt [KLEIN et al., 1995; TAUREL et al., 1996; CZERNY et al., 1997]. Angaben zur Sensitivität und Spezifität der Computertomographie bei den jeweiligen vier unterschiedlichen Formen der AMI sind in der Literatur nicht differenziert [ANTES, 2005]. Bei der Diagnostik der Mesenterialvenenthrombose gilt die kontrastverstärkte CT aber als sehr zuverlässig und als diagnostische Methode der Wahl [BRANDT und BOLEY, 2000], die NOMI ist computertomographisch hingegen nur schlecht erfassbar [KORTMANN und KLAR, 2005].

Die selektive und superselektive Darstellung der mesenterialen Arterien mittels Angiographie wird Mesenterikographie genannt. Diese wird seit vielen Jahren schon in Form der digitalen Subtraktions-Angiographie (DAS) durchgeführt [ANTES, 2005]. Je nach Untersuchungsmethode wird ein geeignetes Kontrastmittel gewählt und, im Unterschied zur Kontrastmittel-CT, direkt mittels eines Katheters in dem zu untersuchenden Gefäßsystem (Arterien, Venen, Lymphgefäße) in das bzw. vor den Abgang des interessierenden Blutgefäßes injiziert. In schneller Abfolge werden dann Aufnahmen angefertigt, von denen, sofern eine digitale Technik benutzt wird, bei der DSA die vor der Kontrastmittelinjektion geschossene Leeraufnahme subtrahiert wird. So kommt eine detaillierte Gefäßdarstellung zu Stande.



Abbildung1: **a)** Angiographisches Bild einer okklusiven mesenterialen Ischämie beim Mensch. Abrupter Kontrastmittelabbruch in einem Ast der Arteria mesenterica superior (AMS) (kleiner Pfeil); **b)** Non-okklusive Mesenterialischämie. Nur wenig Kontrastmittel gelangt ins rechte Versorgungsgebiet der AMS. Äste der AMS diffus verengt (kleiner Pfeil). **a) +b)** Kontrastmittelrückstau in der AMS auf Grund des erhöhten Gefäßwiderstandes (große Pfeile). Freundlichst überlassen von Herrn PD Dr. med. R. Schramm, Herzchirurgische Klinik und Poliklinik, LMU München.

Der arterielle Zugang für eine Mesenterikographie ist, wie für fast alle Arteriographien, die Arteria femoralis. Erwähnt werden muss das Risiko des Auftretens von schwer zu stillenden Nachblutungen, Hämatomen, Aneurysmata und Fisteln etc. Die hohe Sensitivität der Angiographie mit 87,5 % bei der

Auffindung einer AMI und die eventuell unmittelbare therapeutische Interventionsmöglichkeit durch direkte intraarterielle Infusion von vasoaktiven Substanzen sehen viele Autoren aber als absolute Überlegenheit der Angiographie gegenüber der Computertomographie an, und fordern ihren schnelleren und aggressiveren Einsatz im Untersuchungsalgorithmus der AMI [KLEIN et al., 1995; LUTHER et al., 2002; KORTMANN und KLAR, 2005]. Speziell zur Detektion einer NOMI stellt die selektive Angiographie des gesamten mesenterialen Stromgebietes das Verfahren der Wahl dar und wird als "Goldstandard" gesehen [LOCK, 2002 a; TROMPETER et al., 2002; ERNST et al., 2003].

Die Diagnosemethode mit der höchsten Invasivität stellt naturgemäß die explorative Laparotomie dar. Im Hinblick auf die weiter oben beschriebene Notwendigkeit möglichst wenig Zeit für die Diagnosefindung bei einer AMI zu verlieren, wird teilweise gefordert, dass, wenn die Möglichkeit einer angiographischen Untersuchung innerhalb einer Stunde nicht verfügbar ist, zur Vermeidung irreversibler Schäden die explorative Laparotomie umgehend indiziert sei [KORTMANN und KLAR, 2005]. Sollte bei einer vorangegangenen computertomographischen oder angiographischen Untersuchung der Verdacht einer relevanten Mesenterialischämie bestehen, so ist ebenfalls die Indikation für eine umgehende explorative Laparotomie gegeben [ECKSTEIN, 2003]. Infarzierte respektive avitale Darmsegmente können hierbei direkt reseziert werden.

2.2.1.4 Therapie

Die Therapie bei einer AMI zielt auf die Wiederherstellung der arteriellen Perfusion ischämischer, aber potentiell lebensfähiger Darmteile, auf die Resektion infarzierter Darmabschnitte und auf die Vermeidung weiterer Ischämien bzw. Infarzierungen ab [ECKSTEIN, 2003]. Das Mukosagewebe reagiert extrem empfindlich auf Sauerstoffmangel. Die Erhaltung und Optimierung der intestinalen Perfusion und Sauerstoffversorgung durch Volumentherapie, Kreislaufunterstützung und künstlicher Beatmung auch in Hinblick auf eine Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion ist daher intensivmedizinisch von höchster Bedeutung [GENNARI und ALEXANDER, 1996]. Dabei unterscheidet sich

das therapeutische Vorgehen bei einer okklusiven und einer non-okklusiven Mesenterialischämie auf Grund ihrer unterschiedlichen Ätiologie erheblich.

Der initiale therapeutische Schritt bei allen Patienten mit AMI ist die Kreislaufstabilisation. Durch Volumentherapie können dabei gleichzeitig Flüssigkeitsdefizite und eventuelle Imballancen des Elektrolyt- und/oder Säure-Basen-Haushaltes ausgeglichen werden. Befindet sich die AMI bereits in einem fortgeschrittenen Stadium, so ist auch eine fachgerechte Breitspektrum-Antibiose umgehend indiziert [LOCK, 2002 a und b]. Dies liegt darin begründet, dass eine inadäquate Perfusion des Splanchnikusgebiets und die damit verbundene Hypoxie oder Ischämie des Darmes zur Nekrose führt, da die Toleranzdauer für eine Darmischämie nur 120 bis 180 Minuten beträgt [LANGE, 1989]. Die Folgen sind die Translokation von Darmbakterien in Bauchhöhle und Blutbahn, sowie konsekutiv Peritonitis, Sepsis und Multiorganversagen.

Bei einer **Embolie der Arteria mesenterica** superior richten sich die Therapieempfehlungen nach dem Vorhandensein bzw. dem Fehlen peritonitischer Zeichen beim Patienten. Generell gelten in beiden Fällen eine rasche explorative Laparotomie mit chirurgischer Embolektomie und Resektion infarzierter Areale als Standardtherapieverfahren [LOCK, 2002 a]. Wenn der Patient aber noch keine Anzeichen einer Peritonitis hat, so ist laut den Empfehlungen der American Gastroenterological Association (AGA) in dieser Situation auch die Thrombolyse als Alternativverfahren möglich [AGA MEDICAL POSITION STATEMENT: GUIDELINES ON INTESTINAL ISCHEMIA, 2000]. Eine Resektion infarzierter Darmanteile mit sofortiger Gefäßrekonstruktion oder Bypassanlage zieht Eckstein der alleinigen Darmresektion vor, sofern noch keine irreversible Ischämie oder Sepsis vorliegt [ECKSTEIN, 2003]. Da bei einer Gefäßembolie reflektorisch immer eine Vasokonstriktion auftritt, die auch nach Embolektomie weiter bestehen kann [LOCK, 2002 a], empfiehlt die AGA bei größeren Mesenterialarterienembolien generell eine Papaverininfusion vor und nach der Embolektomie zur konsekutiven Vasodilatation. Auch ist bei einigen ausgesuchten Fällen mit Mesenterialarterienembolie eine alleinige Vasodilatation mittels Papaverin durchgeführt worden, auch wenn die Erfahrungen damit noch ausgesprochen gering sind [BRANDT und BOLEY, 2000]. Papaverin ist ein potenter Phosphodiesteraseinhibitor und führt über eine Erhöhung der cAMP-Konzentration zu einer Vasodilatation [LOCK, 2002 a]. Vorzugsweise wird das Papaverin direkt

über den bereits liegenden Angiographiekatheter infundiert. Während der Papaverininfusion muss eine kontinuierliche Überwachung von Blutdruck, Herzfrequenz und Herzrhythmus gewährleistet sein. Bei korrekter Lage des Infusionskatheters in der Arteria mesenterica superior kommt es allerdings nur selten zu systemischen Blutdruckabfällen, da das Papaverin während der ersten Leberpassage abgebaut wird. Hier sei zusätzlich erwähnt, dass auch andere Vasodilantien zum Einsatz kommen können, wie z.B. Prostaglandinanaloga.

Auch bei einer **Thrombose der Arteria mesenterica superior** wird von der AGA eine präoperative Papaverininfusion empfohlen. Festsitzende Thromben müssen chirurgisch excidiert werden [LOCK, 2002 a]. Köhler et al. [KÖHLER et al., 1985] beschreiben den erfolgreichen Einsatz von Urokinase als Thrombolytikum bei einem Patienten mit partieller thrombotischer Okklusion der Arteria mesenterica superior. Pietura et al. [PIETURA et al., 2003] berichten über den Einsatz eines Stents bei einem Patienten, bei dem eine vorher durchgeführte percutane transluminale Angioplastie nicht den erwünschten Erfolg brachte. In allen Fällen ist eine anschließende orale Antikoagulations-Therapie geboten.

Die **Mesenterialvenenthrombose** stellt wie oben beschrieben die seltenste Form der AMI dar. Auch das klinische Bild kann sehr unterschiedlich ausfallen. Nach Diagnosestellung wird in der Regel sofort mit einer Antikoagulation begonnen, es sei denn, eine Indikation für eine Laparotomie, z.B. Anzeichen einer Peritonitis, mit Excision thrombosierter Venen und Kollateralenbildung und gegebenenfalls Resektion infarzierten Darmes ist bereits gegeben. Postoperativ werden Heparin und Papaverin empfohlen [LOCK, 2002 a]. Bei fehlenden peritonitischen Anzeichen kann eine unmittelbar per infusionem beginnende, aber bis zu 6 Monaten oral prolongierte [BRANDT und BOLEY, 2000] oder evtl. lebenslange orale Antikoagulation [RHEE und GLOVICZKI, 1997] mit engmaschiger Überwachung ausreichen. Als alternative, aber mit hohem Risiko behaftete Therapiemöglichkeit wird die medikamentöse Thrombolyse (über die Arteria mesenterica superior, retrograd über die Vena jugularis interna oder transhepatisch über die Vena portae) vorgeschlagen [LOCK, 2002 a].

Als wesentliche protektive Maßnahme zur Verhinderung einer **NOMI** bei kardial insuffizienten Patienten wird von vielen Autoren der Einsatz von herzwirksamen Medikamenten, die den Kreislauf nicht negativ beeinträchtigen, postuliert [MONETA et al., 1985; HALM, 1996; HEINO et al., 2000]. Es gilt, vereinfacht

dargestellt, das Kausalitätsprinzip „kardiale Insuffizienz – Hypotonie – mesenteriale Minderdurchblutung – NOMI“ [LUTHER et al., 2004].

Als primäre therapeutische Maßnahme hat sich die intraarterielle Infusionstherapie mit lokaler Applikation von Vasodilatoren und gegebenenfalls Antioxidantien in die Arteria mesenterica superior bewährt [KRÄMER et al., 2003; LUTHER et al., 2004]. Hierfür kann der für die Mesenterikographie benötigte arterielle Zugang genutzt werden. Der Mesenterialkatheter verbleibt im Hauptstamm der AMS. Bei Patienten ohne Anzeichen für eine beginnende Peritonitis können sich die Therapiemaßnahmen auf die intraarterielle Infusion beschränken. Brandt und Boley [BRANDT und BOLEY, 1991] beschreiben eine Infusion mit heparinisierter Ringer-Lösung und Vasodilantien über mehrere Tage.

Zur Pharmakologischen Behandlung stellen Prostaglandin E1 (PGE1) und Papaverin die am häufigsten verwendeten Vasodilatoren dar [LUTHER et al., 1996; TROMPETER et al., 2002]. Sie werden in der Regel erst dann abgesetzt, wenn bei einer Kontrollangiographie, nach in der Regel 24 - 48 Stunden, keine Zeichen der mesenterialen Vasokonstriktion mehr ersichtlich sind [LOCK, 2002 a]. Die Infusionstherapie kann aber ohne Probleme bis zu 72 Stunden durchgeführt werden [TROMPETER et al., 2002; ERNST et al., 2003].

Krämer et al. [KRÄMER et al., 2000] beschreiben überdies den postangiographischen Einsatz von Stickstoffmonoxid (NO) als Vasodilator mittels intraarterieller Infusion. Muss chirurgisch interveniert werden, wird die Infusion von Vasodilantien vor, während und nach der Operation empfohlen [LOCK, 2002 a].

Auch der weiter oben bereits erwähnte Einsatz von Antioxidantien wie z.B. Oxypurinol, Superoxiddismutase, Prostaglandine, Tokopherole oder Ascorvit ist direkt über den Zugang für die Mesenterikographie möglich. Sie gelangen somit direkt an den Ort der Minderperfusion, wo sie schädliche Sauerstoffradikale neutralisieren sollen [LUTHER et al., 1996; LUTHER et al., 2004].

Abhängig vom intraoperativen Befund und/oder bei fraglich ausreichender Reperfusion kann bei allen Formen der AMI die Indikation zu einer „Second-Look“-Operation oder alternativ zur „Second-Look“-Laparoskopie gestellt werden [DENECKE und STIEGLER, 1990; TOLA et al., 1997; ECKSTEIN, 2003]. Nach 12-24 Stunden sind durch die Wiederherstellung der „normalen“ Perfusion und gleichzeitig eingeleiteter allgemein stabilisierender Maßnahmen, avitale

Darmsegmente demarkiert und besser von vitalem Darm zu differenzieren [LOCK, 2002 a].

2.2.2 Chronische mesenteriale Ischämie

Wenn wir den oben beschriebenen Krankheitskomplex der akuten mesenterialen Ischämie in die Kardiologie übertragen, so käme sie einem akuten Myokardinfarkt gleich. Analog entspricht etwa die chronische mesenteriale Ischämie der koronaren Herzkrankheit [LOCK, 2002 a] und wird auch als Angina abdominalis bezeichnet [BÜRGER und LUTHER, 1990]. Bei etwa 1% der Patienten, die mit abdominaler Schmerzsymptomatik medizinische Zentren aufsuchen, ist sie ätiologisch verantwortlich [VIDIM und TOSOVSKY, 2006].

Leitsymptome der chronischen Angina abdominalis sind postprandial auftretende, krampfartige, abdominelle Schmerzen, Malabsorptions Symptome und Gewichtsverlust [BETZLER, 1998]. Zuweilen ist nur eine progrediente Gewichtsabnahme zu verzeichnen [LOCK, 2002 a]. Bei symptomatischen Patienten kommt der Gewichtsverlust hauptsächlich dadurch zustande, dass die Patienten Angst vor der Nahrungsaufnahme wegen nachfolgender Schmerzsymptomatik entwickeln, wohingegen der Appetit in der Regel, in Abgrenzung zu Tumorpatienten, nicht reduziert ist [HAGLUND und BERGQVIST, 1999].

Das langsame Fortschreiten chronischer Verschlussprozesse ermöglicht die Entwicklung ausgeprägter Anastomosen, sodass der Verschluss nur eines Gefäßes asymptomatisch bleiben kann [SANDMANN et al., 1994]. Im Gegenzug kann eine ausgiebige Kollateralisierung der distalen Äste der Arteria mesenterica superior, gut ersichtlich in einer DSA-Aufnahme, für einen chronischen Verschluss sprechen. Diese Kollateralen sind der Grund für eine häufig eher subakute Symptomatik. Auch bestehen die Beschwerden meist schon längere Zeit, zum Teil über Jahre [SANDMANN et al., 1994].

Bei der Therapie der chronischen mesenterialen Ischämie wird prinzipiell, je nach Schweregrad der bereits eingetretenen Schädigungen am Darm und der eventuell bestehenden Komorbidität, ähnlich verfahren wie bei der AMI. Das Spektrum reicht von einer einfachen Lysetherapie über die medikamentelle Vasodilatation hin zur aorto-mesenterialen-Bypass-Operation und wenn nötig Darmresektion [THORWARTH, 2006].

Die Prognose quo ad vitam wird übereinstimmend als durchaus positiv bewertet. Die chirurgische Intervention mit vaskulärer Rekonstruktion resultiert in einer hohen Anzahl symptomfreier Patienten. Sogar wenn nach mehreren Jahren der Symptombefreiheit durch eine wiederkehrende Obstruktion ein erneuter chirurgischer Eingriff von Nöten ist, wird die Prognose als gut angesehen [SANDMANN et al., 1994; BETZLER, 1998]. Die Überlebensrate von Patienten mit chronischer Mesenterialvenenthrombose (MVT) ist sogar höher als die der Patienten mit akuter MVT [RHEE und GLOVICZKI, 1997].

2.3 Ischämie – Reperfusionsschaden (I/R-Schaden)

2.3.1 Allgemeines

Als Ischämie (gr. ischein = zurückhalten) sind alle Zustände verminderter Durchblutung der Kreislaufperipherie definiert. Es wird dabei zwischen der relativen und der absoluten Ischämie unterschieden. Bei der absoluten Ischämie ist die Blutzufuhr völlig unterbunden. Bei der relativen Ischämie reicht die noch vorhandene Blutmenge aus, um ein Zielorgan oder ein Zielgewebe im Ruhezustand noch zu versorgen, kommt es aber zu besonderen Anforderungen, so ist die Blutzufuhr unzureichend und es können Ausfallserscheinungen auftreten. Das Anfangsstadium der Ischämie wird als hypoxische respektive anoxische Phase bezeichnet, das Spätstadium, bei dem Gewebealterationen nach erneutem Blutzufluss resultieren, als postischämische Phase oder Reperusionsphase [POHLENZ und VON SANDERSLEBEN, 1990]. In der hypoxischen Phase ist die auftretende Schädigung der betroffenen Zellen zunächst reversibel, wird später jedoch bei andauernder Ischämie irreversibel und führt schlussendlich zu deren Zelltod. Eine ischämische Schädigung ist somit primär als ein überwiegend intrazellulär ablaufendes Geschehen zu verstehen [DE GROOT, 2005].

Das Wort Reperfusionsschaden impliziert bereits, dass es sich um eine Schädigung handelt, die im Zuge der Wiederdurchblutung eines zuvor von der Blutversorgung ganz oder teilweise abgeschnittenen Gewebes oder Organs, entsteht. Eltzschig und Collard definieren den I/R-Schaden als „zelluläre Schädigung von vormals noch lebensfähigem, ischämischem Gewebe im Zuge von dessen Reperfusion“ [ELTZSCHIG und COLLARD, 2004].

Obwohl die Wiederherstellung der Blutversorgung eines ischämischen Organs respektive Gewebes essentiell ist, um einen irreversiblen Schaden abzuwenden, vermag die Reperfusion eine lokale und/oder systemische, inflammatorische Reaktion auszulösen, welche einen heftigeren Gewebeschaden zu produzieren im Stande ist, als es die Ischämie alleine könnte. Daran beteiligt sind die Bildung von Sauerstoffradikalen, die Aktivierung des Komplementsystems, Leukozyten-Endothelzellinteraktionen, Thrombozyten-Leukozyten-Agglomerate, eine gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität und eine verminderte Fähigkeit des Kapillarendothels, sich zu relaxieren. Im schlimmsten Fall kann ein I/R-Schaden zum Multiorganversagen und zum Tod des Patienten führen [CARDEN und GRANGER, 2000; ;ELTZSCHIG und COLLARD, 2004; MANGI et al., 2005]. Im Gegensatz zur intrazellulär ablaufenden, rein ischämischen (Zell)Schädigung bei Ischämie kommt also bei Reperfusion noch erschwerend ein Prozess, der als inflammatorische, extrazelluläre Gewebereaktion bezeichnet wird, hinzu [DE GROOT, 2005]. Eine Reperfusionsschädigung ist also kein bloßes Offenlegen der in der Ischämie bereits abgelaufenen, schädigenden Prozesse, sondern ein in weiten Teilen eigenständiges Geschehen, wenngleich sie um so stärker ausgeprägt ist, je länger die ischämische Phase zuvor gedauert hat. Sie verliert erst dann ihre Bedeutung, wenn der Zelluntergang im betroffenen Organ während der Ischämie bereits sehr weit fortgeschritten ist und eine Funktionsaufnahme dieses Organs bei Reperfusion auch ohne Reperfusionsschädigung nicht mehr erreicht werden kann [DE GROOT, 2005]. Die in Verbindung mit Sauerstoffmangel und Reperfusion einhergehenden Veränderungen sind von der Empfindlichkeit (Vulnerabilität) und dem Zustand des betroffenen Gewebes, von Dauer und Grad der ischämischen Schädigung und der Gefäßarchitektur des betroffenen Gebietes abhängig [POHLENZ und VON SANDERSLEBEN, 1990]. Im Darm sind die vulnerabelsten Zellen die Enterozyten, die glatten Muskelzellen und die Zellen des enteralen und des vegetativen Nervensystems [DE GROOT, 2005].

2.3.2 I/R-Schaden am Darm

Im Folgenden soll genauer auf die Pathophysiologie des I/R-Schadens am Darm eingegangen werden, wobei die Ausdrücke Reperfusion und Reoxygenierung als Synonyma zur Anwendung kommen.

Bei hypoxischen bzw. anoxischen Zuständen kommt es durch das Fehlen von ausreichend Sauerstoff zum Ausfall der O_2 -abhängigen mitochondrialen Atmungskette und damit der mitochondrialen ATP-Synthese. Der zelluläre ATP-Gehalt sinkt. Können betroffene Zellen in Phasen des O_2 -Mangels überdies ihren Energiebedarf nur sehr eingeschränkt über die anaerobe Glykolyse decken, wie es z.B. bei Enterozyten der Fall ist, so gehen sie innerhalb kurzer Zeit zugrunde. Nahezu alle weiteren intrazellulären Veränderungen, die bei O_2 -Mangel auftreten und letztendlich den Untergang dieser O_2 -abhängigen Zellen mit bedingen, sind Folge des gestörten Energiestoffwechsels. Im Vordergrund stehen hierbei Veränderungen des zytosolischen Ionenhaushalts (Anstieg der Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} -Konzentration) und des zytosolischen pH-Wertes sowie die Bildung großer Poren in den Mitochondrienmembranen (sog. mitochondrialer Permeabilitätsübergang) [DE GROOT, 2005]. Der intrazelluläre Anstieg der K^+ - und Ca^{2+} -Konzentration im Enterozyten hat einen Wasserinflux zu Folge, der zur Schwellung betroffener Zellen und zur intravaskulären Hämokonzentration führt [MENGER et al., 1988]. Eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Ionenkonzentration führt zu einer vermehrten Kontraktion vaskulärer glatter Muskelzellen, was die Ischämie noch verstärkt. Durch das Fehlen des Energieträgers ATP werden u.a. auch die Funktionen von Enzymen gestört. Beispielhaft sei hier die H^+ /ATPase genannt. Ihr Ausfall bewirkt einen intrazellulären Anstieg der H^+ -Ionenkonzentration was eine intrazelluläre Azidose zur Folge hat. Ein saurerer pH-Wert bedingt wiederum eine verminderte Visco-Elastizität von Erythrozyten und Leukozyten was ihre Fließeigenschaften negativ beeinträchtigt [RIAZ, 2002].

Der hypoxische Zelltod wird von der überwiegenden Mehrheit der Autoren den nekrotischen Formen des Zelluntergangs zugeordnet [DE GROOT, 2005]. Beim Zelluntergang in der Phase der Reoxygenierung hingegen ist sich die Fachwelt uneins, wenngleich sich bei Studien, die Leber, Darm und Pankreas betreffen, der Trend zur Deklaration als Apoptose abzeichnet [FUJIMOTO et al., 1997; CURSIO et al., 1999; WU et al., 2002]. Die Autoren führen morphologische Befunde an, wie

beispielsweise Kern- und Chromatinkondensation, der Nachweis der Zytochrom-C-Freisetzung aus den Mitochondrien, die Aktivierung von Caspasen und die Fragmentierung der DNA. Gegen diese Annahme, dass die bevorzugte Form des Zelluntergangs in der Phase der Reperfusion die Apoptose ist, sprechen z. B. Ergebnisse von Jaeschke und Mitarbeitern. In ihrem Modell zeigten mehr als 98% der Hepatozyten und Endothelzellen einen Zelluntergang, der morphologisch eindeutig eine Nekrose war, und überdies hatte z.B. der Einsatz eines Caspase-Inhibitors keinen signifikanten Effekt auf den entstandenen I/R-Schaden [GUJRAL et al., 2001].

Den Löwenanteil an den intrazellulären Veränderungen in der Phase der Reperfusion hat die vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies und es werden pathogenetische Netzwerke wesentlich von der Anwesenheit dieser reaktiven Sauerstoffspezies beeinflusst [GRISHAM et al., 1986; DE GROOT, 2005]. Dies konnte eindeutig nachgewiesen, sowie der protektive Einsatz von Antioxidantien zur Minderung von Reperfusionsschäden gezeigt werden [WU et al., 1991; COLANTONI et al., 1998; GÜNEL et al., 1998; DIMAKAKOS et al., 2002]. Dabei können die reaktiven Sauerstoffspezies intrazellulär von den reperfundierten Zellen selbst gebildet werden oder aus dem Extrazellulärraum stammen. In der Hauptsache handelt es sich um das Superoxidanion-Radikal ($\cdot\text{O}_2^-$), um das Hydroxyl-Radikal ($\cdot\text{OH}$) und um das gasförmige Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$). Das Hydroxyl-Radikal ist extrem reaktiv und entsteht durch die Umsetzung des weniger reaktiven Wasserstoffperoxyd-Moleküls (H_2O_2) durch Aktivatoren, wie z.B. dem redoxaktiven Fe^{2+} [PETRAT et al., 2002; DE GROOT, 2005]. Es folgt dabei der Gleichung:



Wesentlicher intrazellulärer Bildungsort von reaktiven Sauerstoffspezies ist die geschädigte mitochondriale Atmungskette. Hier werden bereits in der Phase der Ischämie Enzyme aktiviert, die die O_2 -Radikal Bildung begünstigen, wie z.B. die Xanthin-Oxidase [JAESCHKE und MITCHELL, 1989; LITTAUER und DE GROOT, 1992]. Dieses Enzym ist in den Enterozyten an den Villusspitzen besonders stark exprimiert [DRYJA, 2007]. Des Weiteren entstehen reaktive Sauerstoffspezies bei der chemischen Oxidation reduzierter Zellbestandteile, ferner werden sie durch Enzyme aktivierter Makrophagen und Granulozyten (NADPH-Oxidase,

Myeloperoxidase) gebildet [JAESCHKE und SMITH, 1997; DE GROOT, 2005]. Auch ist davon auszugehen, dass die Aktivierung von Makrophagen und die damit verbundene vermehrte Zytokinproduktion in einem engen Zusammenhang mit der Induktion eines Enzymes steht, welches erst bei fortgeschrittener Reperfusion auftritt (im Pankreas nach 6 Stunden [AYUB et al., 2001]) und dann für die gesteigerte Synthese von NO verantwortlich ist. Es handelt sich hierbei um die iNOS (induzierbare NO-Synthase). Eine selektive Hemmung der iNOS war im Darm protektiv bezüglich eines IR-Schadens [WU et al., 2002]. Hier bestehen klare Zusammenhänge mit der inflammatorischen Gewebereaktion in der Reperusionsphase. Dabei übt das Stickstoffmonoxid (NO) sowohl protektive als auch destruktive Funktionen bei der Reperfusion der viszeralen Organe aus. Eine basale Freisetzung von NO ist für den Erhalt der Vitalität bei Reperfusion essentiell. Diese wird in der Regel über die endotheliale NO-Synthase (eNOS) gesteuert [DE GROOT, 2005] und durch die Gabe eines NO-Donors kann sogar eine Verminderung der Reperfusionsschädigung im Darm erreicht werden [KALIA et al., 2001; KAWATA et al., 2001]. Eine überschießende NO-Bildung hingegen kann die Schädigungen in der Phase der Reperfusion verstärken. Als Ursache für solch eine Überproduktion von NO wird auch eine Überstimulation sog. konstitutiver NO-Synthasen durch erhöhte zytosolische Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen, wie sie bei der hypoxischen Zellschädigung auftreten, diskutiert [DE GROOT, 2005]. Grund dafür ist, dass auch schon zu Beginn der Reperusionsphase eine verstärkte NO-Bildung auftritt (s.o. iNOS erst später!), deren Erniedrigung durch einen NO-Synthase-Hemmstoff auf basale Werte protektiv bezüglich eines mukosalen Schadens nach Ischämie-Reperfusion ist [TAKADA et al., 1998]. Dies ist gleichzeitig ein Beispiel für die Kausalität von Reperfusionsschäden (ausgelöst durch NO) und vorangegangener Veränderungen während der Ischämie (Erhöhung der zytosolischen Ca^{2+} -Ionenkonzentrationen).

Die an der Zellschädigung bei Reperfusion beteiligten und extrazellulär gebildeten reaktiven Sauerstoffspezies wirken wie Toxine auf die Zellen. Sie entstehen beispielsweise durch die von geschädigten Zellen in den Extrazellularraum freigesetzte Xanthin-Oxidase [DE GROOT und LITTAUER, 1988].

In der Endstrecke der Bildung der O_2 -Spezies kommt es durch Zellschädigung bedingt zum Verlust der Barrierefunktion der Mukosa, wodurch die

Translokation von Bakterien und Bakterienbestandteilen aus dem Darmlumen begünstigt wird [DRYJA, 2007].

Alle Ereignisse der inflammatorischen Gewebereaktion sind netzartig miteinander verbunden. Zu ihren zentralen Ereignissen gehören die Aktivierung von Makrophagen, neutrophilen Granulozyten, Lymphozyten, Endothelzellen und des Komplementsystems, die Bildung von Thrombozytenaggregationen, proinflammatorischer Zytokine und anderer Mediatoren und die oben beschriebene vermehrte Bildung reaktiver Sauerstoffspezies sowie von Stickstoffmonoxid ($\cdot\text{NO}$) [DE GROOT, 2005].

Generell gilt, dass die Ischämie von Geweben mit einem Perfusionsausfall und der Gewebeeinfiltration von Leukozyten während der Reperfusionphase einhergeht. Die Leukozyten treten dabei Adhäsionsmolekül-vermittelt (s.u.) mit dem aktivierten Endothel postkapillärer Venolen in Kontakt und transmigrieren in die extravaskuläre Gewebematrix, wo sie u.a. durch Ausschütten von Proteasen eine zusätzliche Gewebeschädigung bewirken [CARLOS und HARLAN, 1994].

Zu den proinflammatorischen Mediatoren die an der Reperfusionsschädigung des Darmes beteiligt sind gehören u.a. Zytokine, Eikosanoide und Wachstumsfaktoren sowie die Signalmoleküle NO und Endothelin-1. Dass das Oligopeptid Endothelin-1 (ET-1) als proinflammatorischer Mediator an der Ausbildung eines IR-Schadens beteiligt ist, konnte indirekt über die Gabe eines ET_A -Rezeptorantagonisten (BQ123) und eines Endothelin-Converting-Enzym-Inhibitors (Phosphoramidon) vor der Reperfusion gezeigt werden. Hierbei verminderte sich das Ausmaß des Reperfusionsschadens in beiden Fällen signifikant [ANADOL et al., 1998]. Aus der Gruppe der Eikosanoide sind vor allem die Leukotriene von Bedeutung (s.u.). Besonders hervorzuheben sind aus der Gruppe der Zytokine der Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) und das Interleukin-6 (IL-6). Es konnte gezeigt werden, dass TNF- α und IL-6 nach Ischämie-Reperfusion vom Darm selbst gebildet werden, und dass diese Zytokin-Produktion positiv mit der Schwere des IR-Schadens korreliert. Als Quellen dieser Zytokin-Produktion werden intestinale Lymphozyten und Makrophagen sowie Epithelzellen diskutiert [GROTZ et al., 1999]. Zudem scheint der TNF- α und weitere Zytokine als Induktoren für die vermehrte Expression von Adhäsionsmolekülen (v.a. ICAM-1 und E-Selektin) zu fungieren [DE GROOT, 2005]. Auch vermögen reaktive Sauerstoffspezies wohl Endothelzellen endogen zu aktivieren und damit

deren Adhäsionsmolekülexpression zu steigern, gleichzeitig schädigen sie den Zellverband auch im Gefäßendothel, was einen unmittelbaren Zugang der Blutelemente in das umliegende Gewebe zu Folge hat [NATARAJAN et al., 2002; DE GROOT, 2005]. Auf die damit in Zusammenhang stehende vermehrte Leukozytenextravasation wird später noch genauer eingegangen.

Von den korpuskulären Anteilen des Blutes sind an der Reperfusionsschädigung vor allem neutrophile Granulozyten und Lymphozyten beteiligt. Dabei ist es nicht ausschließlich so, dass durch die Minderperfusion in der Phase der Ischämie Leukozyten oder kleine Thromben in den Kapillaren festsitzen und dadurch keine Wiederherstellung normaler Flussverhältnisse möglich ist, es kommt vielmehr zum sog. "capillary no-reflow" durch eine Verengung des Kapillarlumens und konsekutiver Erhöhung des Gefäßwiderstandes von Seiten des geschwollenen extravasalen Gewebes [MENGER et al., 1997]. Dadurch ist eine adäquate Reperfusion von vormals ischämischen Arealen nur eingeschränkt oder gar nicht mehr möglich, obwohl es bei einer Inflammation nach einer vorübergehenden Vasokonstriktion, vornehmlich von Arteriolen, nach einer kurzen Zeit schon zu einer reflektorischen Vasodilatation kommt. Dabei werden auch präkapilläre Sphinkter geöffnet, es stellt sich eine aktive Hyperämie ein [WEISS, 1990]. Der Pathomechanismus des "capillary no-reflow" stellt sich komplex dar:

Zu der Verengung von Kapillarlumina kommt es in erster Linie durch einen erhöhten interstitiellen Druck. Er ist die Folge eines sich formierenden interstitiellen Ödems, welches durch die bereits weiter oben beschriebene Gefäßendothelschädigung begünstigt wird [MENGER et al., 1997].

Ebenfalls kommt es in der Reoxygenierungsphase zu einem vermehrten Übertritt von Leukozyten, hier aber vornehmlich aus dem postkapillär venösen System, in das umliegende Gewebe. Der erste Schritt in der Extravasations-Kaskade ist das Annähern eines frei fließenden Leukozyten an das Gefäßendothel [TEDDER et al., 1995]. Kontakte mit dem Gefäßendothel bedingen eine Reduzierung seiner Flussgeschwindigkeit, was wiederum zu immer längeren Phasen des Zellkontaktes und der Zellinteraktion mit dem Gefäßendothel führt – der Leukozyt beginnt auf der Endothelzelloberfläche der Gefäßwand zu rollen (Abb. 2B). Das „Rolling“ wird in erster Linie von Adhäsionsmolekülen aus der Selektin-Familie (P-, E- und L-Selektin) reguliert, wobei dem P-Selektin hierbei

wohl in der Zirkulation nicht-lymphatischer Gewebe die größte Bedeutung zukommt [MÅNSSON et al., 2000; WAN et al., 2002]. Die Selektine bedingen reversible Interaktionen des Leukozyten mit dem Gefäßendothel, die, kommt es zu keiner Aktivierung des Leukozyten, jederzeit wieder lösbar sind. Durch diese kurzen Verweildauern am Endothel vermindert sich aber die Flußgeschwindigkeit des Leukozyten drastisch (ca. 50-fach) [RIAZ, 2002], was ihn überhaupt erst befähigt Signale, die vom Gefäßendothel und vom extravasalen Gewebe exprimiert werden, wahrzunehmen [LAWRENCE und SPRINGER, 1991; EBNET und VESTWEBER, 1999]. Bei diesen chemoattraktiven Signalen handelt es sich z.B. um Chemokine (chemotaktische Zytokine), Leukotriene, den Thrombozyten aktivierenden Faktor (platelet activating factor (PAF)) und um reaktive Sauerstoffspezies [TESSIER et al., 1997].

Diese Signale aktivieren (Abb. 2C) die Leukozyten, wodurch es zu einem Umstellen der spezifischen Expression von Adhäsionsmolekülen (vornehmlich β_2 -Integrine aus der Familie der Integrine) an der Oberfläche der Leukozyten kommt. Entsprechende rezepptive Adhäsionsmoleküle, die von den Gefäßendothelzellen exprimiert werden, sind z.B. ICAM-1 und VCAM-1 [LAWRENCE und SPRINGER, 1991; CARLOS und HARLAN, 1994; RIAZ, 2002]. Zusammen vermitteln sie eine feste Adhäsion der Leukozyten mit der Gefäßwand ("sticking") (Abb. 2D).

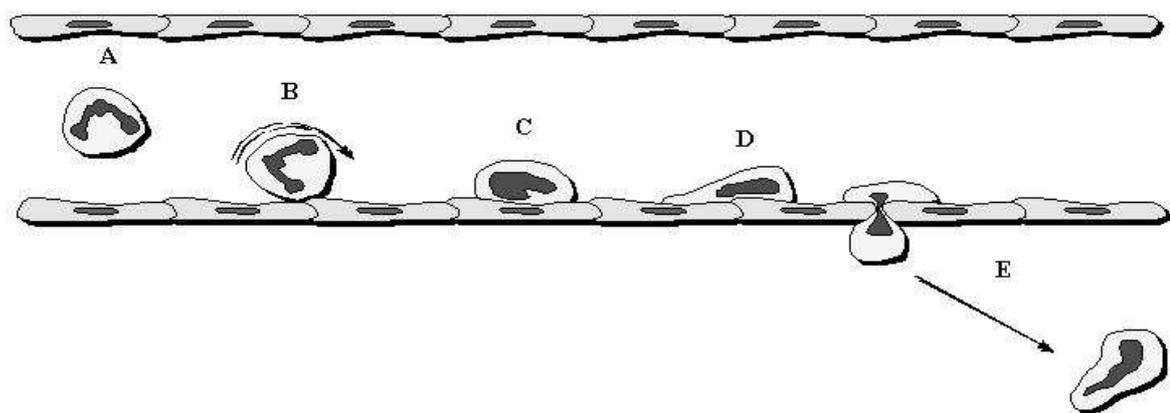


Abbildung 2: Schematische Sequenz der Leukozyten-Rekrutierung in einer postkapillären Venole. Die Extravasation der zirkulierenden Leukozyten im Zuge einer Entzündung kann wie folgt eingeteilt werden: **A)** frei fließender Leukozyt, **B)** Rolling, **C)** Aktivierung, **D)** Adhäsion **E)** Transmigration. Blutfluß von links nach rechts.

Der finale Schritt im Rekrutierungsprozess ist die Transmigration der Leukozyten durch die Gefäßwand hindurch ins extravasale Gewebe (Abb. 2E). Wie in der Abbildung 2 gezeigt, geschieht dies vornehmlich durch ein "Hindurchquetschen" der Leukozyten durch den Interzellularspalt benachbarter Endothelzellen. Diese Lücken entstehen wahrscheinlich durch das Einwirken von Entzündungsmediatoren. Dabei können Endothelzellzwischenräume bis zu 0,4 µm betragen [WEISS, 1990]. Die Transmigration ist hierbei interessanterweise eine von Leukozyten aktiv verrichtete Tätigkeit. Sie bohren sich förmlich in die bereits geweiteten Interzellularräume des Gefäßendothels ein, erweitern diese dadurch und verlassen so das Gefäß unter starken Formveränderungen (Einschnürung des Zelleibes einschließlich des Zellkerns von ca. 10 µm Durchmesser auf unter 1 µm) mittels amöboider Lokomotion. Die Basalmembran, als letzte Barriere zwischen Intravasal- und Extravasalraum, lösen sie durch lytisch wirkende Enzyme ebenfalls auf einer Strecke von maximal 1 µm auf, was ihren völligen Durchtritt erst ermöglicht. Diese Lücke schließt sich wieder unmittelbar nach erfolgter Emigration und die Integrität der Basalmembran ist somit wieder hergestellt. Für die Transmigration wurde beim neutrophilen Granulozyten eine Zeitdauer von 2-9 Minuten ermittelt [WEISS, 1990]. Über die Bedeutung transzellulärer Passagewege von sowohl Plasmabestandteilen als auch Leukozyten im Zuge einer Entzündung, ist sich die Fachwelt uneins [WEISS, 1990; FENG et al., 1998].

Sind diese aktivierten Leukozyten im perivaskulären Gewebe angelangt, so bewegen sie sich mit 10-40 µm/Minute direkt auf den Entzündungsherd zu. Dazu werden sie durch chemotaktisch wirkende Entzündungsmediatoren, wie z.B. Prostaglandine, Leukotriene, Interleukine, den TNF- α, den PAF u.v.m. angezogen. Hierbei reagiert jede Leukozytenfraktion (wie z.B. Lymphozyten, neutrophile Granulozyten, eosinophile Granulozyten etc.) individuell auf Chemotaxine [WEISS, 1990]. Je nach dem welche Leukozytenspezies dominiert, bestimmt diese dann den Charakter der Entzündung. Es kommt zu einer gesteigerten Produktion von Entzündungsmediatoren und von für die Lyse bzw. spätere Phagozytose potenzieller Antigene notwendiger Reagenzien im inflammatorischen Gewebe selbst (u.a. Proteasen, reaktive Sauerstoffspezies, NO etc.) [CARLOS und HARLAN, 1994]. Durch die vermehrt einwandernden Leukozyten und den daraus resultierenden Gewebeschaden kommt es zur entzündlichen Schwellung – eines der Kardinalsymptome jeder Entzündung. Daraus resultiert wiederum ein erhöhter

interstitieller Druck, welcher maßgeblich für das bereits oben erwähnte “capillary no-reflow” verantwortlich ist.

Dadurch wird die Zeit der Sauerstoffminderversorgung oder gar der Anoxie weiter verlängert. Obwohl die Regenerationsleistung der Darmmukosa durchaus enorm ist, ist ab einer Ischämiedauer von mehr als 6 Stunden die daraus resultierende Mukosadestruktion irreversibel [KNICHWITZ et al., 2005]. Boley et al. geben 8 Stunden als absolutes Maximum an [BOLEY et al., 1997]. Durch das in der Folge vermehrte Absterben der Enterozyten steigt die Permeabilität der intestinalen Mukosa rapide, was zum Verlust ihrer eigentlichen Barrierefunktion führt. Der oben beschriebenen Anatomie des Darmes folgend, können auch Zottenkapillare direkt arrodirt werden. Es kommt zum Übertritt von Bakterien und Endotoxinen in die intestinalen Lymphbahnen, die V. portae sowie in den systemischen Blutkreislauf. Endotoxine bewirken eine Umverteilung des Blutflusses mit Störungen der mikrovaskulären Perfusion und eine Stimulation von Lebermakrophagen. Diese setzen ihrerseits wiederum Zytokine wie TNF- α , Interleukin-1 und Interleukin-6 frei, welche dann ebenfalls proinflammatorisch in den Entzündungsprozess eingreifen [FONG et al., 1990].

Des weiteren führt die relativ hohe Dichte an α -Rezeptoren im Splanchnikusgebiet [KNICHWITZ et al., 1998] dazu, dass es unter septischen oder hämorrhagischen Bedingungen zu einer sympathoadrenergen Gegenregulation kommt, wodurch die Durchblutung in diesem Gebiet auf kapillarer Ebene verstärkt gedrosselt wird [MESSMER, 1968]. Diese, zusätzlich zur bereits bestehenden Darmischämie, erschwerend wirkende Vasokonstriktion der Mesenterialgefäße kann auch nach Wiederherstellung der Durchblutung das Ausmaß der I/R-Schäden vergrößern [MACDONALD, 2002].

2.4 Atherosklerose

2.4.1 Definition der Atherosklerose

Die Vermehrung kollagener Fasern bzw. des kollagenen Bindegewebes in Organen und Geweben wird als Induration, Fibrose oder Sklerose bezeichnet. Pathologisch anatomisch gesehen, entspricht die Arteriosklerose einer (primär) nicht entzündlichen Fibrose und Sklerose von Arterienwänden, also einer Stoffwechselstörung des Bindegewebes. Werden bei dieser Fibrosierung und Sklerosierung Lipide mit abgelagert, so spricht man von Atherosklerose (gr. *athere/athyre* = Mehlbrei, Fettbrei) [DÄMMRICH und LOPPNOW, 1990]. Laut aktueller WHO-Definition ist die Atherosklerose eine variable Kombination von Veränderungen der Arterienintima. Sie kann mit einer herdförmigen Anhäufung von Lipiden, komplexen Kohlenhydraten, Blut und Blutbestandteilen, sowie mit der Bildung von fibrösem Gewebe und mit Kalkablagerungen einhergehen und mit Veränderungen der Arterienmedia verbunden sein [WHO, 2007]. Es kommt zur Verdickung und zum Elastizitätsverlust der betroffenen Gefäßwände. Obwohl streng genommen nicht korrekt, werden Atherosklerose und Arteriosklerose oft als Synonyma verwendet.

Die Pathogenese der Atherosklerose, kurz Atherogenese genannt, konnte bis heute nicht restlos aufgeklärt und zu einem zusammenhängenden Konzept gefügt werden. Allgemein wird davon ausgegangen, dass die Entstehung atherosklerotischer Veränderungen multifaktoriell bedingt ist. Hierbei wirken exogene Faktoren, wie Rauchen, falsche Ernährung und Bewegungsmangel, sowie endogene Faktoren, wie Hypertonie, Diabetes und eine eventuelle genetische Prädisposition, gleichrangig mit- und nebeneinander [BHAKDI, 2006]. Allgemein unbestritten ist die Rolle des im Volksmund auch „das schlechte Cholesterin“ genannten LDL (low density lipoprotein).

2.4.2 Bedeutung der Atherosklerose

Die Atherosklerose ist in allen westlichen Industrienationen die Volkskrankheit Nr. 1 [BHAKDI, 2006]. An ihren Folgeerkrankungen, wie koronarer Herzkrankheit (KHK) und Apoplexie, sterben mehr Menschen, als an allen

anderen Krankheiten zusammen, und das trotz bewussterer Lebensweise und der Anwendung neuer Pharmaka zur Blutfettreduzierung (z.B. Statine) [ROSS, 1999; BHAKDI, 2006].

In der Gesundheitsberichterstattung des Bundes von 2006 dominieren bei den Sterbeziffern nach Haupttodesursachen die zwei Erkrankungsgruppen Herz-Kreislauf-Erkrankungen und Krebs mit weitem Abstand. So starben pro 100.000 Einwohner in Deutschland von 525,07 Frauen 236,58 (45,05%) an Herz-Kreislauf-Krankheiten, und von 841,06 Männern 348,82 (41,47 %). Im Durchschnitt betrachtet sind das 42,85 % aller Todesfälle. Zum Vergleich hatte Krebs als zweite Haupttodesursache einen Anteil von 27,02 % [DESTATIS, 2006]. Im Durchschnitt der letzten Jahrzehnte verlieren jedoch erfreulicherweise die Herz-Kreislauf-Krankheiten, wenn auch auf hohem Niveau, an Bedeutung in Bezug auf ihren Anteil an der Gesamtsterblichkeitsrate. So ging die Sterblichkeitsrate bei Herz-Kreislauf-Krankheiten von 1990 bis 2004 bei Frauen um 33,1% und bei Männern um 38,2% zurück. Die Gesamtsterblichkeit sank hingegen nur um 25,3 % respektive 29,4%. Dessen ungeachtet verursacht die Gruppe der Herz-Kreislauf-Erkrankungen aber die höchsten Behandlungskosten, wobei vor allem die KHK und die Apoplexie zu Buche schlagen [DESTATIS, 2006]. Im Jahr 2006 entstanden in Deutschland nach der Krankheitskostenrechnung des Statistischen Bundesamtes durch Herz-Kreislauf-Erkrankungen Kosten von 35,18 Mrd. Euro. Das entsprach rund 15 % der gesamten Krankheitskosten im Jahr 2006 in Höhe von 236,02 Mrd. Euro (DESTATIS 2006).

Die Prävalenz der Atherosklerose steigt mit dem Alter der Patienten [WONG et al., 1995]. Die Lebenserwartung einer heute 60 jährigen Frau beträgt statistisch gesehen weitere 24,6 Jahre, die eines heute 60 jährigen Mannes weitere 20,7 Jahre nach der Sterbetafel 2005/2007 [DESTATIS, 2008]. In Anbetracht des demographischen Wandels respektive der längeren Lebenserwartung eines heute geborenen Kindes (Mädchen: 82,3 Jahre; Junge: 76,9 Jahre) [DESTATIS, 2008], der oft sehr langen Progressionsphase der Atherosklerose und der zunehmenden Bedeutung der Atherosklerose als Co-Morbidität bei einer Reihe anderer Erkrankungen, ist von einer weiter zunehmenden Relevanz auch Atherosklerose-assoziiertes Begleiterkrankungen auszugehen.

2.4.3 Pathophysiologie der Atherosklerose

Bei der Infiltrations-Hypothese geht man davon aus, dass es auf Grund von hohen Blutlipid-Spiegeln zur Migration von Blutfetten aus dem luminalen in den subintimalen Raum kommt. Dort reichern sich die Lipide an und ihre Oxidationsprodukte schädigen die Endothelzellen dann von basal. Es kommt zu Läsionen im Gefäßendothel, was wiederum das Einwandern von Lipiden aus der Blutbahn begünstigt – ein *Circulus vitiosus* ist entstanden [WOLFRAM, 1990].

Die Response to injury–Hypothese besagt, dass die Atherosklerose als eine Reaktion auf eine vorausgegangene Noxe verstanden wird. Diese primäre Noxe ist eine initiale Gefäßendothelschädigung. Sie kann mechanischer, chemischer oder viraler Natur sein. Verbunden mit zeitgleich hohen Lipid-Serumspiegeln kommt es zur Anreicherung von LD-Lipoproteinen in der Intima. Durch oxidative Prozesse, die z.B. auch durch $\cdot O_2^-$ -Radikale initiiert werden, entsteht oxidiertes LDL, was seinerseits inflammatorische Prozesse auslöst [ROSS, 1993; ROSS, 1999; BHAKDI, 2006]. Auf diesen Entzündungsreiz reagiert das Gewebe mit einer Fibro- und Myeloblastenproliferation, Proteoglykansekretion und Zubildung kollagener Fasern. Folge ist eine Verhärtung, eine Sklerose. Außerdem kann Kalk eingelagert werden. Die Anreicherung mit Serumlipiden führt zu herdförmigen Fettablagerungen in der Intima und Media. Die Fette liegen als Lipoproteine und Cholesterin extrazellulär oder in später wiederum zerfallenden Lipophagen (Schaumzellen) und Myozyten gespeichert vor. Aus Fettansammlungen und Nekrosen entstehen die Atherome (gr. *athere* = Mehlbrei) der Intima, die gelegentlich auch verkalken (Fettkalk) [DÄMMRICH und LOPPNOW, 1990].

Nach dem „Mainzer Konzept“ werden in der Intima gestrandete LDL-Moleküle durch die Einwirkung von Enzymen derart umgebaut, dass die Lipoproteine Signale an das Immunsystem abgeben können, um von Fresszellen aufgenommen werden zu können. Nachfolgend wird das Cholesterin aus den Fresszellen von HDL-Molekülen abtransportiert. Somit wird die Gefäßwand von unlöslichem Cholesterin befreit. Dieser Vorgang ist primär physiologisch und auch sinnvoll, denn geringe Mengen an Lipoprotein gelangen auch unter normalen Bedingungen in arterielle Gefäßwände hinein, und so wird das dort abgelagerte Cholesterin durch Fresszellen entfernt. Erst bei einer Überlastung dieses Transportsystems kommt es aufgrund der dauerhaften Aktivierung des

Immunsystems zu einer chronischen Entzündung und zur Gefäßverkalkung. Die Atherosklerose stellt also nach der Mainzer Hypothese eine neue Art von immunologischer Erkrankung dar, und kann als Folge einer Überlastung des physiologischen Lipid-Abtransportsystems aus den Gefäßwänden verstanden werden [BHAQDI, 2006]. Nach dieser These gibt es also eine greifbare Ursache der Atherosklerose – das im Übermaß in der Gefäßwand abgelagerte (weil nicht abtransportierte) LDL.

Die in der Literatur zur Zeit am häufigsten zu findende Ansicht zur Atherogenese ist die Formierung einer Inflammation mit immunologischer Reaktion [LIBBY, 2000; REINER und TEDESCHI-REINER, 2001; YUONG et al., 2002]. Ein Entzündungsgeschehen steht als Bindeglied zwischen Dyslipidämie und atherosklerotischer Plaqueformation [LIBBY, 2002]. Irgendwann im Laufe des Lebens wird die Atherogenese möglicherweise initiiert (Initiation), sie progrediert über einen meist langen Zeitraum, oft über Jahrzehnte hinweg (Progression), und eventuell kommt es dann später zu Komplikationen im Sinne von kompletten Gefäßverschlüssen oder Thrombosen. Möglicherweise bleiben Patienten mit atherosklerotischen Plaqueformationen auch lebenslang symptomfrei [LIBBY, 2000].

In der Phase der Initiation laufen ähnliche Prozesse wie bei der inflammatorischen Gewebereaktion im Rahmen der Reperfusion beschrieben ab, nur befinden sich die hierbei betroffenen Gefäße im arteriösen Hochdrucksystem. Die Entwicklung eines atherosklerotischen Plaques ist ein komplexer Prozess, der mit einer endothelialen Dysfunktion, getriggert durch Faktoren wie Hypercholesterolämie, Rauchen, Bluthochdruck, Hyperhomocysteinämie oder gestörtem Glucosestoffwechsel beginnt. Diese Dysfunktion führt zu einer gesteigerten endothelialen Permeabilität für Lipoproteine und andere Plasmabestandteile. Die Triggerfaktoren üben ihren Einfluss über Mediatoren wie Stickstoffmonoxid (NO), den platelet-derived growth factor (PDGF), Prostacyclin, Angiotensin II und Endothelin aus [REINER und TEDESCHI-REINER, 2001]. Auf der Endothelzelloberfläche arterieller Gefäße werden spezifische Adhäsionsmoleküle exprimiert, die das Einwandern von Leukozyten mediierten, z.B. Selektine, VCAM-1 und ICAM-1 [LIBBY, 2000; REINER und TEDESCHI-REINER, 2001]. Als chemoattraktive Stoffe (Chemokine) wirken hierbei z.B. das Makrophagen chemoattraktive Protein-1 (MCP-1), der PDGF und der Makrophagen Colonie

stimulierende Faktor (MCSF) [LIBBY, 2000; REINER und TEDESCHI-REINER, 2001]. Auch oxidiertes LDL bewirkt eine Rekrutierung mononukleärer Leukozyten in die Intima [LIBBY, 2000; REINER und TEDESCHI-REINER, 2001]. Hier wird ersichtlich, dass eine oben erwähnte Hypercholesterolemie eine endotheliale Dysfunktion nicht nur triggert, sondern sie auch aufrecht erhalten oder gar verschlimmern kann. Oxidiertes LDL, der MCSF, TNF- α sowie IL-1 bewirken ebenfalls die Einlagerung von Lipiden und Lipoproteinen in bereits extravasal befindliche mononukleäre Leukozyten. Aus Makrophagen formieren sich so die Schaumzellen (s.o.) [DÄMMRICH und LOPPNOW, 1990; LIBBY, 2000]. Zusammen mit einer T-Zellaktivierung (stimuliert durch den TNF- α und IL-2), Plättchenaggregation (stimuliert durch Thromboxan A₂ (TxA₂)) und dem Einwandern glatter Muskelzellen (stimuliert durch PDGF und den Gewebe-Wachstumsfaktor-beta (TGF- β)) kommt es zur Ausbildung eines atherosklerotischen Plaques [LIBBY, 2000; REINER und TEDESCHI-REINER, 2001]. Myozyten und Fibrozyten bilden hierbei einen fibrösen Überzug („fibrous cap“), der mechanische Stabilität verleiht und das fettreiche und potentiell hoch thrombogene Material im Plaqueinneren, den sog. Kern („core“), vom zirkulierenden Blutstrom des Gefäßlumens trennt [REINER und TEDESCHI-REINER, 2001]. In diesem Kern befinden sich neben freien, extrazellulären Lipoproteinen auch eine immense Menge mit Lipiden/Lipoproteinen beladener Makrophagen – die oben erwähnten Schaumzellen [LIBBY, 1996]. Diese fettige Masse im Plaqueinnern ist der sogenannte „Mehlbrei“ [DÄMMRICH und LOPPNOW, 1990]. Die Schaumzellen im Plaquekern bilden große Mengen an Gewebethromboplastin, ein hoch potentes Koagulans, kommt es mit dem Blutstrom in Kontakt [WILCOX et al., 1989]. Überdies induziert oxidiertes LDL in Gefäßendothelzellen die Expression von Gewebethromboplastin und erhöht gleichzeitig die Konzentration von Plasminogenaktivator-Inhibitoren [BERLINER et al. 1995].

Natürlich gibt es physiologischer Weise bei inflammatorischen Reaktionen immer eine Balance zwischen wachstumsfördernden (proinflammatorischen) und wachstumshemmenden (antiinflammatorischen) Faktoren. In der Progressionsphase der Atherogenese überwiegen definitionsgemäß die wachstumsfördernden Faktoren [LIBBY, 2000]. Wachsende atherosklerotische Plaques haben die Tendenz Calcium einzulagern, was die mechanisch-

elastischen Eigenschaften der Arterienwand negativ beeinflusst [DÄMMRICH und LOPPNOW, 1990; BERLINER et al. 1995; LIBBY, 2000].

Eine Störung der Blutzirkulation nachgeschalteter Organe oder gar des Herzens selbst geht dabei primär nicht von einer kritischen Verengung von Arterien aus [LIBBY, 2009]. In angiographischen Untersuchungen wurde entdeckt, dass die Mehrheit akuter myokardialer Infarkte von Atheromen verursacht wurde, die ihrerseits weniger als 50 % des arteriellen Gefäßlumens verschlossen [SMITH, 1996; LIBBY, 2009]. Zu Komplikationen kommt es, wenn solche atherosklerotischen Plaques instabil werden. Ob ein Plaque stabil oder instabil ist hängt dabei nicht von seiner Größe, sondern von der Dicke und der Konsistenz seines fibrösen Überzuges ab [REINER und TEDESCHI-REINER, 2001]. Man spricht auch vom Übergang von der chronischen in die akute Phase der Atherosklerose [LIBBY, 1995]. Angelockt von Entzündungszellen wandern vermehrt Makrophagen in den „fibrous cap“ ein. Nach spezifischer Aktivierung produzieren diese proteolytisch wirkende Enzyme, die wiederum das kollagene Bindegewebe und die vaskulären Myozyten des „fibrous cap“ angreifen [LIBBY, 2000; REINER und TEDESCHI-REINER, 2001]. Es kommt zur Erosion oder gar zur Ruptur des „fibrous cap“ und somit zum direkten Kontakt des Blutstroms mit dem hoch thrombogenen Zellmaterial des Plaquekerns (s.o.). Die daraus resultierende Thrombose oder der gegebenenfalls sich einstellende Infarkt in dem nunmehr minderversorgten Gebiet der betroffenen Arterie bestimmen die klinische Symptomatik des Patienten [BERLINER et al. 1995; LIBBY, 1995; VIRMANI et al., 2006].

Eine andere Hypothese der Entstehung der Atherosklerose besagt folgendes: In der Adventitia der Coronararterien des Menschen und unserer Haussäugetiere existiert ein feines Netzwerk mikrovaskulärer Gefäße, das der nutritiven Versorgung der äußeren Gefäßschichten dient. Diese Gefäße werden Vasa vasorum (VV) genannt [WOLINSKY und GLAGOV, 1967]. Experimentelle und humanpathologische Studien haben ein vermehrtes Vorkommen adventitieller Vasa vasorum bei bestehender coronarer Atherosklerose gezeigt [BAGER et al., 1984; WILLIAMS et al., 1988]. Es wird vermutet, dass die oben erwähnte Leukozytenextravasation mit all ihren Folgen für die Entstehung von Atheromen gar nicht in den großen arteriellen Gefäßen selbst, sondern in den venösen Vasa vasorum der Adventitia stattfindet [LENTSCH und WARD, 2000; MOOS et al., 2005; LANGHEINRICH et al., 2007]. Man vermutet, dass Leukozyten also nicht aus dem

arteriellen Lumen in die Gefäßwand, sondern sozusagen „von außen“ aus den VV in die Media und Intima übertreten.

2.5 Erythropoietin (Epo)

Erythropoietin ist ein monomeres Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von ~34–37 kDa. Es ist im Allgemeinen ein Vertreter der Großen Gruppe der Hormone, und hierunter im Speziellen in der funktionellen Gruppe der Zytokine angesiedelt. Es ist nicht artspezifisch und wird zu 90 % in der Niere (v.a. peritubuläre Nierenzellen) gebildet. Seine vornehmliche Funktion ist die Stimulation der Differenzierung hämatopoetischer Stammzellen des Knochenmarks zu Erythrozyten (Erythropoese) [*PETRIDES*, 1998]. Daraus resultierten die letzten zwanzig Jahre viele Publikationen, die sich mit den positiven Effekten der Substitution von humanem rekombinantem Erythropoietin (hrEpo) bei Patienten mit Anämie unterschiedlicher Genese befassen. Beispielhaft seien hier Hämodialyse-Patienten auf Grund chronischer Niereninsuffizienz genannt [*DIMKOVIĆ*, 2001; *LAZAREVIĆ* et al., 2007]. Dennoch können auch hierbei potentielle, teils immunvermittelte Nebenwirkungen auftreten, und auch die Applikationsart (s.c. vs. i.v.) scheint eine Rolle zu spielen [*PLJESA*, 2004].

Juul und Mitarbeiter fanden heraus, dass die Behandlung von Epithelzellen des Dünndarms von Ratten mit humanem rekombinantem Erythropoietin das Auftreten von Cytokin-induzierter Apoptose abschwächte, und gleichzeitig sich die Zellmigrationsrate steigerte. Dabei war es egal, ob das hrEpo vor oder zeitgleich zur Noxe verabreicht wurde. Sie fanden weiter, dass Epo-Rezeptoren bereits im postnatalen Ratten- und humanen Dünndarm exprimiert wurden. Daraus leiten sie die Vermutung ab, dass auch das in humaner Muttermilch vorhandene Epo positive Auswirkungen auf die intestinale Funktion von Säuglingen hat [*JUUL* et al., 1999; *SEMBA* und *JUUL*, 2002]. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass Epo bei der Entwicklung des Dünndarmes von neonatalen Ratten trophische Funktionen besitzt. Bei täglicher Verabreichung von hrEpo über mindestens eine Woche wiesen die Versuchstiere gegenüber einer Kontrollgruppe einen längeren Dünndarm (bezogen auf das Körpergewicht) auf und die absorptive Oberfläche des Mikrovillisaumes vergrößerte sich ebenfalls; Letzteres vornehmlich begründet durch eine Zunahme der Villuslänge. Dabei machte es keinen Unterschied, ob das

Erythropoietin enteral oder parenteral verabreicht wurde [JUUL et al., 2001]. Bei enteraler Applikation wurde aber kein erythropoetischer Effekt festgestellt, was auf eine fehlende Absorption oder evtl. auf eine Absorption von einer funktionell inaktiven hrEPO-Form schließen lässt. Auch andere Forschungsergebnisse weisen auf mögliche weitere positive Eigenschaften des Erythropoietins hin. Im Tierversuch zeigte sich, dass bei über zwei Wochen mit rEpo intra peritoneal (i.p.) vorbehandelten Rattenbabys nach Hypoxie und Reoxigenierung ein signifikant geringerer hypoxischer Zellschaden im Darm im Vergleich zu einer mit Kochsalz i.p. vorbehandelten Kontrollgruppe zu finden war. Auch waren die intestinalen NO-Konzentrationen bei den mit hrEpo vorbehandelten Tieren gegenüber der Kochsalz-Kontrollgruppe und einer unbehandelten Kontrollgruppe signifikant reduziert [KUMRAL et al., 2003].

Ferner konnte im Tierversuch an Ratten gezeigt werden, dass einmalig exogen zugeführtes Erythropoietin eine Endotoxin-induzierte Apoptose in den lymphatischen Geweben Thymus und Milz abschwächt [KOROGLU et al., 2006]. Auch reduziert Epo das Ausmaß eines akuten myokardialen Infarktes durch Herabsetzen der Apoptoserate [CALVILLO et al., 2003]. Dieser Effekt konnte auch mit einem nicht-hämatopoetisch aktiven Derivat des Erythropoietins erreicht werden [FIORDALISO et al., 2005]. Der zu Grunde liegende Mechanismus scheint eine antiinflammatorische Wirkung des Epos via Reduzierung postischämischer Leukozytenadhäsion, u.a. durch verminderte ICAM-1 Expression, eine verminderte Freisetzung proinflammatorischer Zytokine, wie z.B. IL-6, TNF- α , und eine gleichzeitig vermehrte Expression des antiinflammatorisch wirkenden IL-10 zu sein [LIU et al., 2006].

Darüber hinaus scheint der Epo-Rezeptor generell von vielen unterschiedlichen Geweben exprimiert zu werden, und auch die Epo-Produktion findet in den verschiedensten Geweben als Antwort auf physikalischen oder metabolischen Stress statt [BRINES und CERAMI, 2006; SCHÖFFEL et al., 2008]. Dazu gehören neben der Niere, dem Darm und dem Herzmuskel auch das Nervengewebe, wo das Epo im Zuge der Regeneration auch für das Einwandern von Stammzellen in geschädigte Areale zuständig zu sein scheint [CALVILLO et al., 2003]. Epo wirkt also nicht nur als potenter Stimulator der Erythropoese, sondern fungiert auch cardioprotektiv, neuroprotektiv und vermindert die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Dabei gibt es in experimentellen Modellen Anzeichen für

ein breites therapeutisches Zeitfenster für die Gewebeprotektion, v.a. wenn singulär eine hohe Dosis (5000 IE/kg KGW) verabreicht wird [CONTALDO et al., 2007]. Der Einsatz von Epo vor, während oder nach einem Insult war effektiv [BRINES und CERAMI, 2006].

Der antiinflammatorische respektive antiapoptotische Effekt des Erythropoietins scheint hingegen schon bei Behandlungsdosen aufzutreten, bei denen noch keine erythropoetische Stimulation zu detektieren ist. Harder et al. konnten zeigen, dass in ihrer Versuchsanordnung eine Dosis von 500 IE/kg KGW i.p. über vier Tage (24 Stunden ante operationem und drei konsekutive Tage) einen verminderten apoptotischen Zelltod, eine herabgesetzte Leukozytenrekrutierung und die Aufrechterhaltung des mikrovaskulären Blutflusses in chronisch ischämischem Gewebe zu Folge hatte. Eine chronisch applizierte Dosis von 5000 IE/kg KGW i.p über denselben Zeitraum bewirkte zusätzlich einen signifikanten Anstieg des Hämatokrits gegenüber der Kontrollgruppe und der Epo500-Gruppe [HARDER et al., 2009]. Es liegen zur Zeit noch zu wenig Informationen vor, bis zu welcher Dosis, welcher Behandlungsfrequenz und bis zu welchem Behandlungszeitraum gerade noch nicht mit hämatopoetischen Effekten zu rechnen ist. Ein zu hoher Hämatokrit birgt immer auch die Gefahr einer konsekutiven Thrombose [CONTALDO et al., 2007].

2.6 Fragestellungen

Die akute mesenteriale Ischämie ist eine seltene aber lebensbedrohende Erkrankung, und tritt auch als Komplikation nach Operationen auf [VENKATESWARAN et al., 2002; HASAN et al., 2004; MANGI et al., 2005]. Hypoxie und Ischämie provozieren eine Dysfunktion der intestinalen Zirkulation, eine Entzündung, Gewebenekrose und die Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen ins umliegende Gewebe. In der Folge kann es zu systemischen, inflammatorischen Reaktionen und zum septischen Schock kommen. Werden nachgeschaltete Organe wie Leber und Lunge mit involviert, führt dies nicht selten zu einem kompletten Zusammenbruch der Hämodynamik, Multiorganversagen und anschließendem Tod des Patienten [VENKATESWARAN et al., 2002]. Es existieren sehr viele experimentelle und auch klinische Daten über die Entzündungseigenschaften einer sich formierenden Atherosklerose [LIBBY, 2002], und es wurde bereits beobachtet, dass eine Atherosklerose für sich genommen durch transienten oder permanenten arteriellen Verschluss einen I/R-Schaden von nachgeschalteten Gewebekompartimenten verursacht [LIBBY, 2002]. Im Gegensatz dazu existiert bis jetzt nur wenig Datenmaterial zur Frage, ob eine prävalente, generalisierte und bis dato klinisch noch asymptomatische Atherosklerose einen akuten I/R-Schaden verschlimmert. Am Rattenintestinum konnte gezeigt werden, dass eine Hypercholesterolämie die durch einen I/R-Schaden induzierte Leukozytenantwort und die Albuminleakage vergrößert [KUROSE et al., 1997]. Neben diesen Ergebnissen auf dem Mikrozirkulationslevel bleibt die Frage nach einem möglichen verstärkten intestinalen Gewebeschaden auf zellulärer Ebene offen. Des Weiteren ist nicht bekannt, ob im Zuge eines mesenterialen I/R-Schadens die parenchymale Gewebemöostase in nachgeschalteten Organen wie Leber und Lunge ebenfalls durch Hypercholesterinämie und Atherosklerose in Mitleidenschaft gezogen wird.

In der vorliegenden Arbeit sollen daher in einem in vivo Modell folgende Fragen geklärt werden:

- Verstärkt eine präexistente atherosklerotische Grunderkrankung die Ausprägung eines Ischämie-/Reperfusionsschadens im Bereich der Mikrozirkulation des Dünndarms?
- Bedingt eine präexistente atherosklerotische Grunderkrankung eine verstärkte Ausprägung eines "remote injury" in Leber und Lunge?

Die Therapie von Ischämie/Reperfusions-assoziierten Gewebeschäden und korrespondierenden Organdysfunktionen stellt immer noch eine große Herausforderung dar. Dabei ist das gezielte Angehen einzelner Entzündungsmediatoren oft nicht praxistauglich und hat sich deshalb auch nicht etabliert. Auf der Suche nach pharmakologischen Substanzen, die singulär verabreicht vielschichtig in die Gewebeprotektion nach einem I/R-Schaden eingreifen, so genannte pleiotrope Substanzen, könnte Erythropoietin ein aussichtsreicher, weil potenter Kandidat sein [*MENGER* und *VOLLMAR*, 2007].

Es galt daher in einem zweiten Versuchsteil zu klären:

- Hat eine singuläre, präischämische Gabe von humanem rekombinantem Erythropoietin intraperitoneal einen protektiven Effekt auf den entstehenden Ischämie-/Reperfusionsschaden bei akuter Mesenterialischämie?

3. Material und Methoden

3.1 Tiere

Bei der Versuchsdurchführung wurden zwei verschiedene Mäusespezies verwendet. Mäuse vom C57BL/6-Stamm dienten als Kontrollen {Charles River, Sulzfeld, Deutschland}. Zur Untersuchung der Bedeutung der Atherosklerose beim Ischämie-/Reperfusionsschaden im Darm wurden Apolipoprotein E-defiziente Mäuse (ApoE^{-/-}) {Taconic Europe A/S, Tornbjerg, Dänemark} benutzt. Da der alleinige Gendefekt für das Apolipoprotein E nicht zu einer ausgeprägten Atheroskleroseentwicklung führt, wurden letztere Mäuse ab einem Lebensalter von 6-8 Wochen auf eine Cholesterin-reiche Diät (Anlage 2; ssniff[®] SM R/M-H, 10mm, incl. 20,85% Rohfett, 19,5% Casein und 1,25% Cholesterin (mit Kokosfett), ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland) gesetzt. Die fettreiche Diät führt innerhalb von ca. 8-10 Wochen zu einer generalisierten Atherosklerose [WASSMANN et al., 2004]. Die gleichaltrigen C57BL/6 Kontrolltiere erhielten normales Standardfutter (Anlage1; Altromin 1320 Standarddiät, Altromin, Lage, Deutschland). Alle Tiere erhielten normales Trinkwasser ad libitum und waren in den institutseigenen Versuchstierzuchträumen {Institut für Klinische und Experimentelle Chirurgie, Universitätsklinik Homburg/Saar, Deutschland} in einem 12-Stunden Tag- und 12-Stunden Nacht-Zyklus aufgestellt. Nur Versuchstiere, welche keine Anzeichen von Erkrankungen sowie normales Freß- und Putzverhalten aufwiesen, wurden in den Versuch aufgenommen. C57BL/6-Mäuse hatten bei Versuchsdurchführung ein Körpergewicht von $23,77 \pm 0,43$ Gramm, die ApoE-Mäuse waren Diät-bedingt schwerer und wogen $30,08 \pm 1,14$ Gramm.

3.2 Versuchsmodell

In der vorliegenden Studie wurde durch temporäres Abklemmen der A. mesenterica cranialis eine Mesenterischämie induziert und die Mikrozirkulation des terminalen Ileums vor, während und nach 30 sowie 90 Minuten Reperfusion mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie untersucht [MASSBERG et al., 1998; SZABO et al., 2006 a]. Danach wurden die Tiere in derselben Vollnarkose getötet

und Blut- sowie Gewebeproben zur späteren histologischen Aufarbeitung entnommen.

3.2.1. Narkose

Alle Versuchstiere wurden während der chirurgischen Intervention und der nachfolgenden Untersuchungen durch eine intraperitoneale (i.p.) Injektion von 7,5 mg Ketamin-Hydrochlorid {Ketavet® 100mg/ml, Pfizer, Karlsruhe, Deutschland} und 2,5 mg Xylazin {Rompun® 2%, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland} pro 100 g Körpergewicht narkotisiert. Die Narkose wurde bei Bedarf durch eine Bolusinjektion (0,1 ml; i.p.) von einer 1:1 Verdünnung der Narkose-Stammlösung mit physiologischer Kochsalzlösung {NaCl 0,9%, B. Braun, Melsungen, Deutschland} aufrecht erhalten. Die Tiere wurden auf einer temperierbaren Heizplatte {thermo 12V/12W, 110 x 77 mm, Conrad Elektronik, Hirschau, Deutschland} in Rückenlage gelagert, um die Körperkerntemperatur bei 37 °C zu erhalten. Alternativ wurde eine Rotlichtlampe verwendet.

3.2.2. Zentralvenöser Zugang

Unter einem Operationsmikroskop {Leica M651, WILD, Heerbrugg, Schweiz} wurde dann ein zentraler Venenkatheter {Portex® Polythene Tubing, 0,28 mm ID, 0,61 mm OD, Smiths Medical International Ltd., Hythe, UK} unter Schonung aller umliegenden Strukturen in die linke Vena jugularis externa eingelegt. Hierzu wurde die Haut vom Kieferwinkel bis zum Sternum inzidiert, stumpf im Unterhautbindegewebe gelöst und zur Seite ausgelagert. Die Glandula mandibularis wurde ebenfalls stumpf gelöst und nach lateral gelegt. So wurde die Vena jugularis externa zugänglich. Diese wurde an der oberen Thoraxapertur durch einen Unterbindungsfaden angestaut und distal durch einen zweiten ligiert {beide Polypropylene blue, monofilament, nicht resorbierbar, USP 7/0 (0,7 metric), FSSB GmbH, Jestetten, Deutschland}. Dazwischen wurde die Vene dann längs inzidiert, der Katheter eingesetzt und vorsichtig bis in zentrale Position vorgeschoben. Die Fixierung erfolgte durch Einschlingen mit einem der Unterbindungsfäden (Abb. 3b). Um eine Luftembolie zu vermeiden, war der Katheter zuvor mit steriler physiologischer Kochsalzlösung befüllt worden. Dazu

wurde er vorab mit einer Seite luftdicht auf eine Injektionskanüle {BD Microlance™ 3, 27G, 0,4 x 19 mm, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien} gesteckt, um eine Verbindung mit einer 1 ml-Spritze {BD Plastipak™, Becton Dickinson S.A., Madrid, Spanien} zu erhalten.

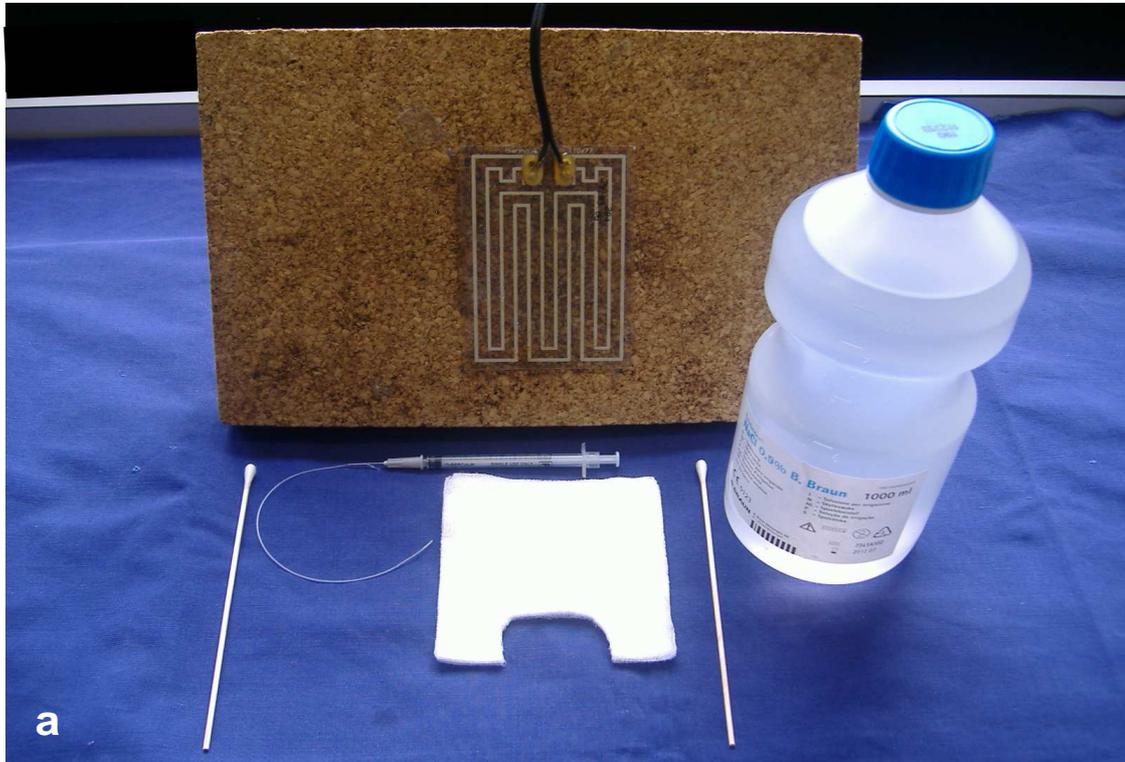


Abbildung 3: a) Heizplatte mit Korkboden, U-förmig ausgeschnittene Komresse, Venenkatheter auf 1 ml-Spritze, Stieltupfer, physiologische Kochsalzlösung; b)+c) Zentraler Venenkatheter in situ; b) 6-fache Vergrößerung, c) 40-fache Vergrößerung

3.2.3 Präparation des terminalen Ileums

Die narkotisierten Tiere wurden median laparotomiert. Für die intravitalmikroskopische Untersuchung des terminalen Ileums musste dieser Darmabschnitt so vorsichtig als möglich ausgelagert und auf speziell präparierten, mit physiologischer Kochsalzlösung getränkten Kompressen {Mullkompressen, 10 x 10 cm, 8-fach, Fink & Walter, Merchweiler, Deutschland} gebettet werden. Ein Darmabschnitt von ca. 2 cm wurde antimesenterial in Längsrichtung eröffnet und eventuell enthaltene Fäces vorsichtig mit warmer physiologischer Kochsalzlösung ausgespült. Es war gewährleistet, dass jeweils mindestens 2 cm geschlossenes und 2 cm eröffnetes Darmrohr für die mikroskopische Untersuchung der subserösen Darmwand und der Mukosa zur Verfügung standen (Abb. 4). Während der gesamten Präparation wurde mit größter Sorgfalt darauf geachtet, dass der später zu mikroskopierende Darmsektor weder mit den in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Stieltupfern {Wattestäbchen, 150 mm, Fink & Walter, Merchweiler, Deutschland} direkt angefasst, noch dass der Blutfluss in den Mesenterialgefäßen durch zu starke Manipulation gestört wurde.

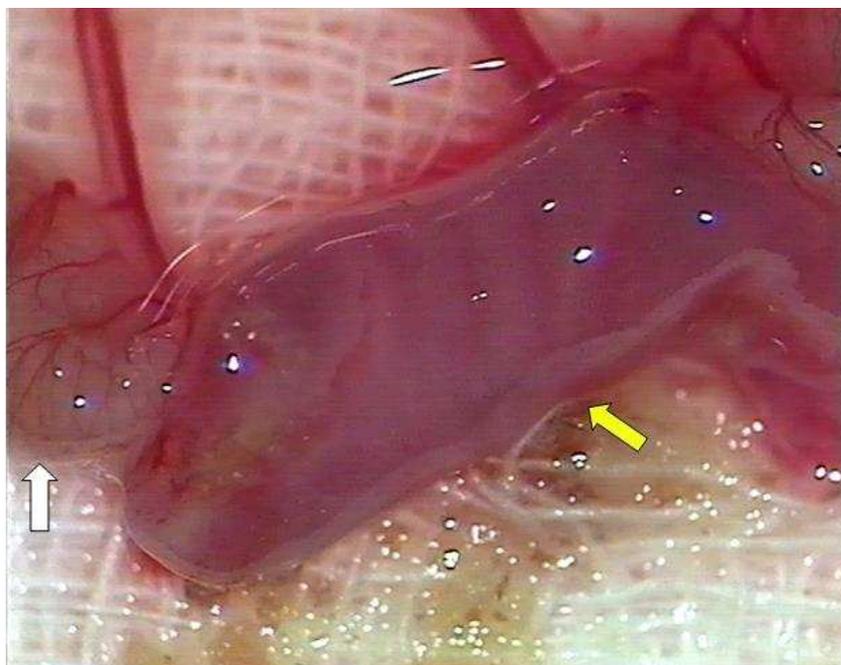


Abbildung 4: Weißer Pfeil: Darmsegment intakt, Mikroskopie von peritonealer Seite; gelber Pfeil: eröffnetes und gesäubertes Darmsegment, Mikroskopie von luminaler Seite. 25-fache Vergrößerung.

Direkt nach der Präparation wurde der vorgelagerte Darmabschnitt mit 5 ml warmer, physiologischer Kochsalzlösung gewässert und darüber ein Abdeckglas {Deckglas SUPERIOR, 24 x 50 mm, Merck, Deutschland} so positioniert, dass es keinen Druck auf das zu mikroskopierende Darmsegment ausübte. Dies gelang mit zwei übereinander liegenden, U-förmig ausgeschnittenen und ebenfalls in physiologischer Kochsalzlösung getränkten Mullkompressen (Abb. 3a). Durch dieses Aufschwimmenlassen des Deckgläschens und das wiederholte Auftropfen warmer physiologischer Kochsalzlösung wurde das Austrocknen des ausgelagerten Darms während der Untersuchungen verhindert.

3.3 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Die Mikrozirkulation des Dünndarms wurde mittels intravitale Fluoreszenzmikroskopie nach einem standardisierten Arbeitsplan (Anlage 3) untersucht. Dabei umfasste jeder Mikroskopie-Zyklus die systematische Untersuchung von drei bis fünf zufällig gewählten Gesichtsfeldern auf der Seite der subserösen Darmwand und der Mukosa. Bei der Mikroskopie des gleichen Tieres zu zwei unterschiedlichen Zeitpunkten wurden nach Möglichkeit die gleichen Areale, respektive die gleichen Gefäße gewählt.

Zuvor wurde jedem Versuchstier 0,1 ml FITC-Dextran 5% {MW=150.000 kD; SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA} und 0,2 ml Rhodamine-6G 0,1% {MW=479 kD; SIGMA,} in einer Mischspritze über den zentralen Venenkatheter verabreicht. In den Versuchsgruppen, bei denen Fragestellung bedingt eine zweite intravitale Fluoreszenzmikroskopie nötig war, wurde dieselbe Menge des Farbstoffgemisches erneut appliziert. FITC-Dextran verteilt sich dabei im Plasmakompartiment des Blutes und verbleibt aufgrund seines hohen Molekulargewichtes zum größten Teil intravasal. Der Fluoreszenzfarbstoff Rhodamine-6G färbt nach intravenöser Injektion korpuskuläre Anteile des Blutes (Leukozyten, Thrombozyten) an (Abb. 6).

Die Tiere wurden auf der Heizplatte liegend mit dem Korkboden auf der Mikroskopbühne positioniert (Abb. 5; Anlage 4A). Es wurde mit einem Orthoplan Mikroskop {Carl Zeiss, Göttingen, Deutschland} gearbeitet, welches mit einer 100 W HBO Quecksilber Lichtquelle gekoppelt an einen Ploemo-Pak Illuminator und einem blauen ($\lambda_{em} = 510 \text{ nm}$) sowie einem grünen ($\lambda_{em} = 560 \text{ nm}$) Filterblock {Leitz,

Wetzlar, Deutschland} ausgestattet war (Anlage 4B). Aufbau und Funktionsweise eines solchen Fluoreszenz-Auflichtmikroskopes ist in Anlage 4 dargestellt. Weiterhin wurden 10x, 20x und 50x Lang-Distanz-Objektive {Leitz, Wetzlar, Deutschland} im 0,5er und 1,0er Zoom verwendet. Um der Dreidimensionalität Rechnung zu tragen wurde durch alle Ebenen (Kapillare, Arteriolen, Venolen, z.T. Lymphgefäße) vaskulärer Netzwerke fokussiert. Die Beobachtungen wurden durch eine Videokamera {Pieper FK-6990-IQ-S, Pieper GmbH, Schwerte, Deutschland} aufgenommen (Anlage 4C) und mit einem Video Recorder System {Panasonic AG 7350; Matsushita Electric Ind. Co., Ltd., Japan}, an den ein Videotimer {FOR-A. Company, Modell VTG-33, Japan} gekoppelt war, zur späteren Auswertung aufgezeichnet {Fujifilm super VHS pro 240; Fuji Magnetics GmbH, Kleve, Deutschland} (Anlage 4D).

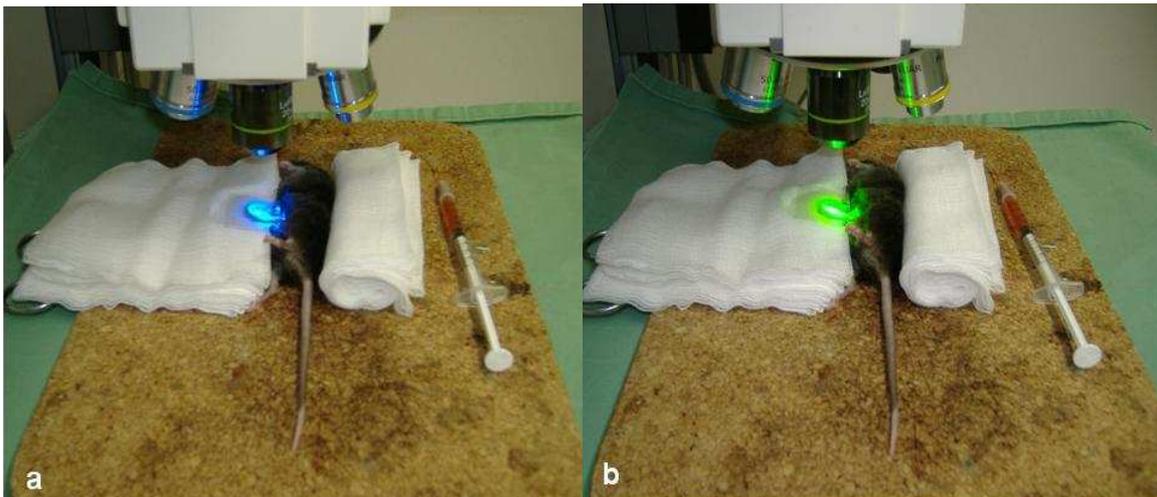


Abbildung 5: Positionierung des Versuchstieres unter dem Intravitalen Fluoreszenzmikroskop. **a)** FITC-Dextran Blaulicht-Epi-Illumination (510 nm); **b)** Rhodamine-6G Grünlicht-Epi-Illumination (560 nm).

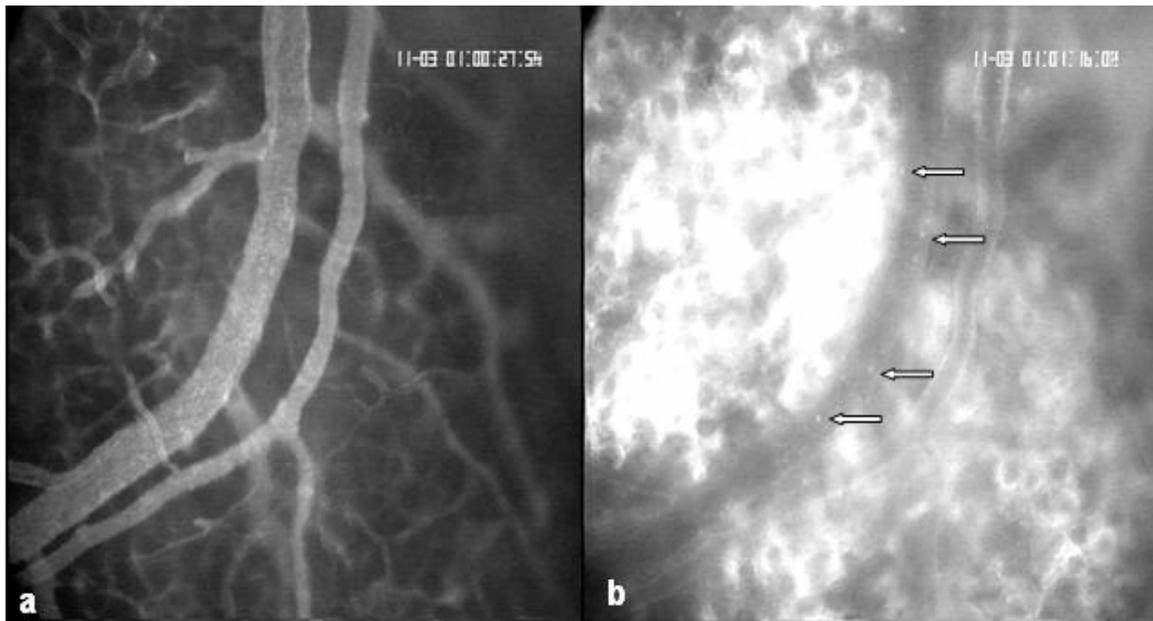


Abbildung 6: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahme eines Gefäßbaumes. **a)** FITC-Dextran Blaulicht-Epi-Illumination (510 nm), links Venole, rechts Arteriole **b)** Rhodamine-6G Grünlicht-Epi-Illumination (560 nm), Leukozyten (Pfeile) in Venole zu sehen. a) und b) jeweils ca. 200fache Vergrößerung.

3.4 Parameter der Mikrozirkulation

Parameter der Mikrozirkulation wurden offline mit einem Computer-unterstützten Bildverarbeitungssystem {CapImage; Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland} quantitativ analysiert.

Die Peristaltik [n/min] wurde immer zur gleichen Zeit, nämlich 10 Minuten nach Beginn der Mikroskopie, durch Zählen der Kontraktionswellen pro Minute bestimmt.

Leukozyten-Endothel-Interaktionen wurden in Arteriolen und postkapillären Venolen quantitativ erfasst. Das Rolling ist dabei definiert als die Anzahl der Leukozyten, die während 30 Sekunden einen Referenzpunkt in einem arteriolen bzw. venolären Gefäßsegment mit deutlich langsamerer Geschwindigkeit als die frei fließenden Leukozyten passieren. Rolling ist als n/min/mm Gefäßumfang gegeben.

Die feste Adhärenz bzw. das Sticking ist definiert als die Anzahl der Leukozyten, die während 30 Sekunden innerhalb eines Gefäßsegments fest an

der endothelialen Gefäßwand anhaften. Die feste Adhärenz ist als n/mm^2 Endotheloberfläche gegeben.

Blutflussgeschwindigkeiten wurden mit der Line-Shift-Methode in terminalen Arteriolen, nutritiven Kapillaren und postkapillären Venolen bestimmt. Ebenso wurde die Geschwindigkeit von rollenden Leukozyten gemessen. Blutfluss- und Rollgeschwindigkeiten sind in mm/s angegeben.

Die mikrovaskuläre Permeabilität beschreibt die Extravasation (Leakage) des Makromoleküls FITC-Dextran. Hierzu wurde unter Epi-Illumination mit blauem Licht die Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran in der plasmatischen Phase des Blutstroms und im angrenzenden Gewebe gemessen. Das Verhältnis dieser Werte gibt in Prozent die mikrovaskuläre Permeabilität an.

Die funktionelle Kapillardichte (FCD) beschreibt die Länge perfundierter Kapillaren pro Fläche [cm/cm^2]. Sie wurde wie die Kapillarblutflussgeschwindigkeit [mm/s] und der Kapillardurchmesser [μm] sowohl von mesenterialer als auch von mukosaler Seite, also den kapillären Gefäßen der Darmzotten (FCDZ), bestimmt. Bei der Mikroskopie der mesenterialen Seite wurden die Kapillaren des Stratum longitudinale der Tunica muscularis, also die Gefäßnetzwerke der Längsmuskelschicht, dargestellt. Bei der mukosalen Mikroskopie wurde als Fläche die Querschnittsfläche der betreffenden Darmzotte abzüglich der Fläche des Zottensaumes (= Darmepithelzellen) definiert. Die Zottendichte [n/mm^2] beschreibt die Anzahl perfundierter Darmzotten pro Fläche Darmmukosa.

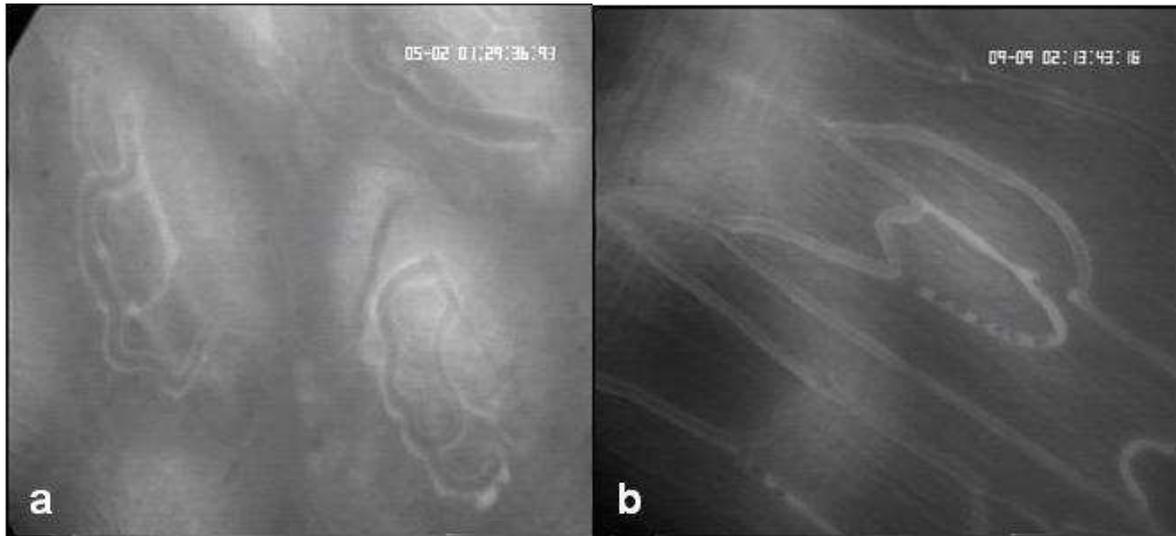


Abbildung 7: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen FITC-Dextran ca. 1000fache Vergrößerung **a)** Zottenkapillare **b)** Kapillare der Längsmuskelschicht

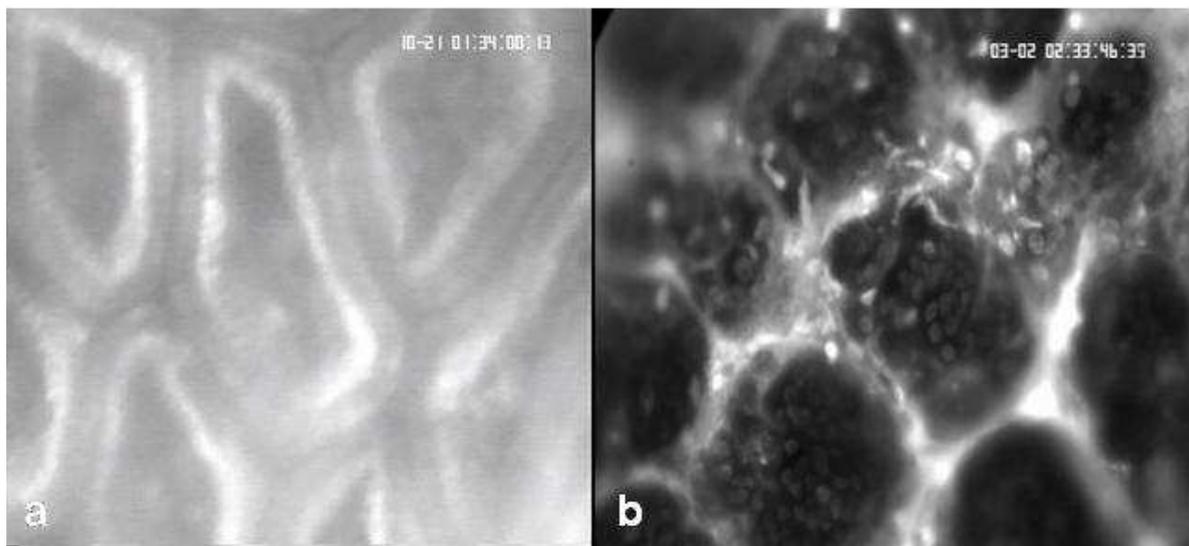


Abbildung 8: Intravitalfluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von mukosal; **a)** Rhodamine-6G-Aufnahme ca. 400fache Vergrößerung; Differenzierung in Saum und Zentrum bei 2-Dimensionalität. **b)** UV-Filter Aufnahme nach Bisbenzimidfärbung {Bisbenzimid H33342, SIGMA Chemical Co., St. Louis, USA } zur Verdeutlichung der 3-Dimensionalität der Darmzotten; ca. 1000fache Vergrößerung.

3.5 Blutanalyse

Nach Beendigung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurde jedem Tier eine Blutprobe aus der Aorta abdominalis und aus der Vena cava caudalis (seu inferior) entnommen. Mit der arteriell gewonnenen Blutprobe wurde unmittelbar im institutseigenen Labor eine Blutgasanalyse (BGA) {Bayer Rapidlab

855, Leverkusen, Deutschland} angefertigt, die venös gewonnene Blutprobe wurde auf zwei, mit Ethylendiamintetraacetat (EDTA) beschichtete Blutprobenröhrchen {Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland} verteilt. Eine der Proben diente der sich ebenfalls unmittelbar anschließenden Analyse im institutseigenen Labor {Coulter[®] ACT, Coulter Electronics, Luton, UK}. Es wurde hierbei ein Blutbild angefertigt und die absolute Leukozytenzahl (WBC) [$\times 10^3/\mu\text{l}$], die Zahl der Erythrozyten (RBC) [$\times 10^6/\mu\text{l}$], die Zahl der Thrombozyten (PLT) [$\times 10^3/\mu\text{l}$] und das Hämoglobin (Hgb) [g/dl] bestimmt. Aus der zweiten Probe wurden im Zentrallabor der Universitätskliniken des Saarlandes die Alaninaminotransferase (ALT) und die Aspartataminotransferase (AST) bestimmt {Modular P800, Hitachi, Japan}.

3.6 Histologie

Jedem Tier wurden noch in tiefer Narkose Gewebeproben aus Duodenum, noch geschlossenem, cranialem Ileum nahe des zuvor intravital mikroskopisch untersuchten Sektors, Colon ascendens, Leber, Lunge und Herz inclusive Aorta entnommen, und in 4 %iger Formaldehydlösung {Roti[®] - Histofix 4%, Carl Roth GmbH und Co. KG., Karlsruhe, Deutschland} fixiert. Bei drei C57Bl/6- und allen ApoE-Tieren wurden zusätzlich noch je eine Gewebeprobe von Leber, Lunge und Aorta ascendens in einer Formol-Calcium-Lösung nach Baker [Böck, 1989] fixiert. Nach 48 Stunden wurden alle Proben dann nach histologischem Standardprotokoll in Paraffin eingeblockt.

Des Weiteren wurden von jeweils einer Gewebeprobe aus Leber, Lunge und Jejunum das Feuchtgewicht unmittelbar nach Entnahme bestimmt {OHAUS AP110S, Florham Park, Schweiz}, die Proben dann für 72 Stunden in einen Trockenschrank {Heraeus T6, Kendro, Langenselbold} bei 60°C gestellt und danach erneut gewogen. Daraus wurde dann der Feucht/Trocken-Gewichtsquotient errechnet. Seine Einheit ist dimensionslos [aU].

Von jedem Tier wurden drei Schnitte der Jejunum-Probe mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt und mit einem Lichtmikroskop {BX60F; Olympus Optical Co., Tokyo, Japan} analysiert, welches über eine aufgesetzte Kamera {AxioCam HRc, Carl Zeiss, Jena, Deutschland} die Einstellungen an ein Computerprogramm {AxioVision[®] 3.1, Carl Zeiss, Jena, Deutschland} übermittelte. Von zwei unabhängigen Untersuchern wurde verblindet die Klassifizierung der HE-Proben

nach dem Grad der Schädigung der Darmschleimhaut, respektive dem Grad der funktionellen Schädigung des Darmrohres vorgenommen [PARK et. al., 1990]. Der Park-Score ist untenstehender Tabelle zu entnehmen. Jeder histologische Schnitt wurden also, je nach Schwere der Veränderung, in eine der neun Grade eingeteilt, wobei bei nicht eindeutiger Zuordenbarkeit auch eine Dezimalstelle hinter dem Komma, als Modifikation zu Park, veranschlagt wurde (3 – 4 = 3,5).

Mikroskopische Kriterien bei der Gradeinteilung nach Park

Grade	Beschreibung
0	Normale Mukosa
1	Grünhagen Space an der Villusspitze sichtbar
2	Grünhagen Space über die gesamte Breite des Villus
3	Epithelablösung auch an den Seiten der Villi erkennbar
4	Epithelzellen an den Villusspitzen zerstört
5	Verlust von Villusgewebe (Einkürzen der Villi)
6	Kryptenschicht bereits mit betroffen
7	Transmukosale Infarzierung
8	Transmurale Infarzierung (i.e. Mukosa und Lamina muscularis propria mucosae nekrotisch)

Bei dieser Graduierung wird ersichtlich, dass den Stufen 1 bis 4 eine wesentlich exaktere Beschreibung der Veränderungen zu Grunde liegt als den Stufen 5 bis 8. Somit kann mit diesem Schema eine beginnende Darmwandnekrose sehr detailliert quantifiziert werden.

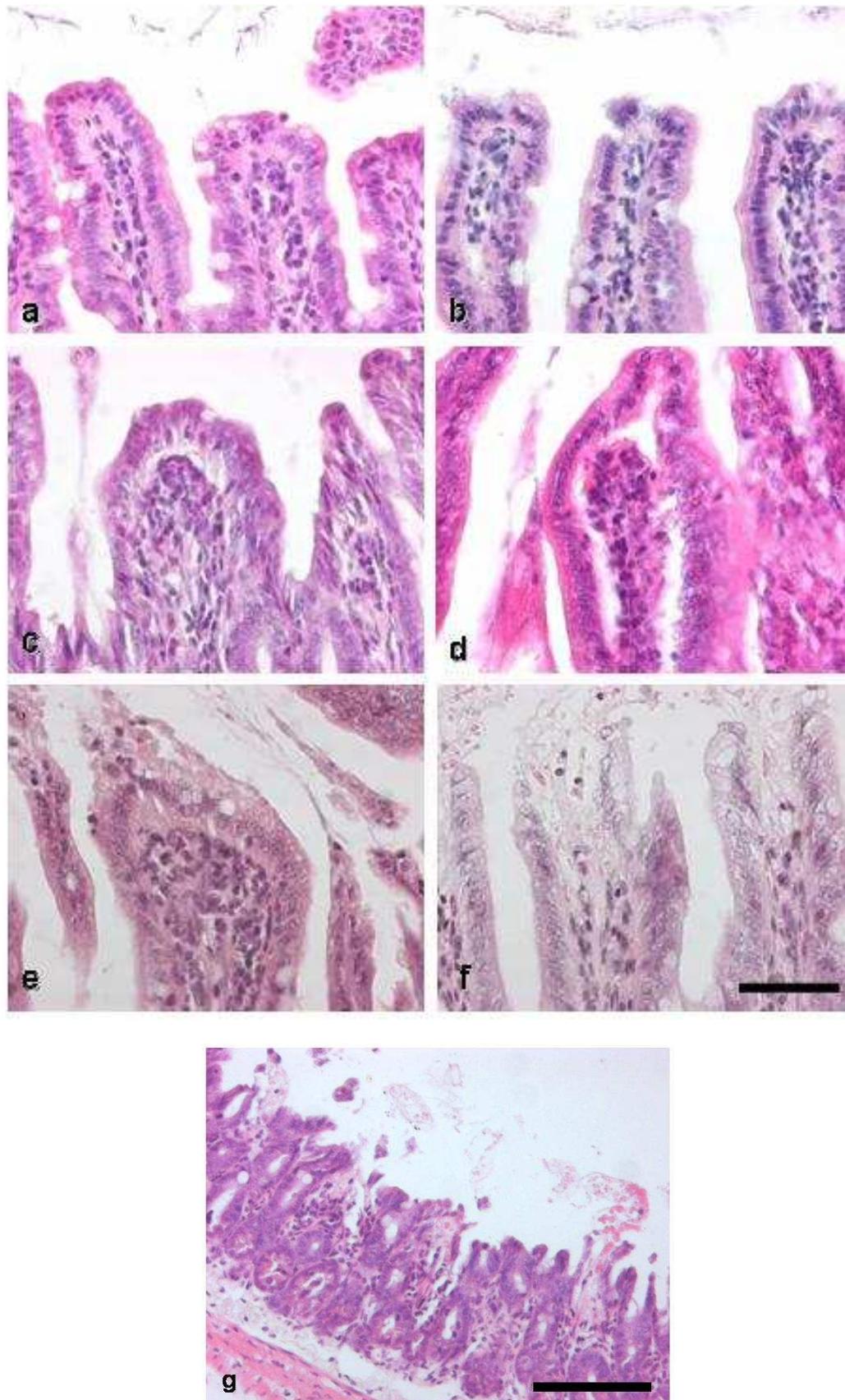


Abbildung 9: Beispielbilder für die Quantifizierung des Mukosaschadens (modifiziert nach Park et al., 1990; HE-Färbung) **a)** Grad 0, **b)** Grad 1, **c)** Grad 2, **d)** Grad 3, **e)** Grad 4, **f)** Grad 5, der Maßstab entspricht 50 μm für a) bis f); **g)** Grad 6, Übersichtsaufnahme, der Maßstab entspricht 100 μm .

An den HE-Schnitten wurde zusätzlich die mittlere Villuslänge (VL) [μm], die mittlere Kryptenlänge (KL) respektive Kryptentiefe [μm] und die mittlere Muskularisdicke (MU) [μm] vermessen. Aus Villus- und Kryptenlänge wurde die Mukosadicke (MD) [μm] errechnet. Die Villusepithelintegrität beschreibt das Verhältnis der Anzahl von Darmzotten mit intaktem Epithelgewebe pro 20 eindeutig beurteilbarer (also gerade angeschnittener) Zotten im HE-Schnitt. Hierbei wurde sorgfältig auf die Unterscheidung von „echtem Gewebeverlust“ und Schnittartefakt geachtet. Die Villusepithelintegrität ist in % gegeben. Bei der relativen Villuslänge wurden drei Quotienten gebildet: Die Villuslänge im Verhältnis zur Gesamtmukosadicke (VL/MD) ist ein „echter“ Quotient [%]; Villuslänge zu Kryptenlänge (VL/KL) ergibt einen dimensionslosen Faktor, ebenso das Verhältnis von Villuslänge zu Muskularisdicke (VL/MU).

Der relative Alveolarraum ist ein indirekter Parameter zur Bestimmung des Lungenschadens. Er beschreibt das Verhältnis in Prozent von im HE-Schnitt weiß erscheinendem Alveolarraum zum umliegenden, dunkleren Lungenparenchym anhand eines Grauwertes. Die Grauwertbestimmung erfolgte mit dem oben beschriebenen Computer-unterstützten Bildverarbeitungssystem {CapImage; Dr. Zeintl Ingenieurbüro, Heidelberg, Deutschland}.

3.7 Myeloperoxidase

Als zusätzlicher Parameter für die Detektion eines nachgeschalteten Organschadens nach Ischämie und Reperfusion wurde die Myeloperoxidase (MPO) im Lungengewebe bestimmt. Sie ist ein indirekter Parameter für die entzündliche Infiltration des Lungengewebes durch neutrophile Granulozyten [TURNAGE et al., 1994]. Die MPO ist in Units [U] gegeben. Dazu wurden 100 μg schwere Lungengewebestücke in 1 ml 0,05-molarem Kaliumphosphat-Puffer und Hexadecyltrimethylammoniumbromid (HTAB) homogenisiert, und das Homogenat anschließend bei 13.000 U/min und 4 °C zentrifugiert {Universal 30S, Hettich GmbH, Tuttlingen, Deutschland}. Von jeder Probe wurden 25 μl des Überstandes mit 25 μl Tetramethylbenzidinperoxidase-Substrat und 200 μl Phosphatpuffer bei Raumtemperatur für 3 Minuten inkubiert. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 5 μl Schwefelsäure gestoppt. Danach wurde die optische Dichte bei 450 nm durch

einen Enzyme-linked immunoabsorbent assay-Reader (ELISA-Reader) {Asys Hitech GmbH, Eugebdorf, Österreich} bestimmt.

3.8 Epo-Behandlung

Zur Beurteilung der Rolle von Epo {humanes rekombinantes Erythropoietin, NeoRecormon[®]; Roche; Basel, Schweiz} respektive eines möglichen protektiven Effektes dieser Substanz auf das inflammatorische Geschehen während Ischämie- und vor allem Reperfusionphase, wurden je 6 C57BL/6-Tiere 2 Stunden vor Narkose und Gefäßklippapplikation mit 500 IE Epo/kg Körpergewicht (entspricht 12,5 IE Epo/25 g Maus) oder 5000 IE Epo/kg Körpergewicht (entspricht 125 IE Epo/25 g Maus) intraperitoneal prämediziert.

3.9 Experimentelle Gruppen

Zur Untersuchung der Auswirkungen einer generalisierten Atherosklerose wurden folgende Gruppen gebildet:

1. **C57BL/6-Kontrollgruppe** (n=9): Es wurde eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie durchgeführt und anschließend Blut- und Gewebeproben entnommen („C57BL/6 –Baseline“).
2. **ApoE-Kontrollgruppe** (n=6): Versuchsdurchführung analog zu Gruppe 1 („ApoE-Baseline“)
3. **C57BL/6-Ischämiegruppe (C57BL/6-I-Gruppe)** (n=7): Nach der Applikation des Fluoreszenzfarbstoffgemisches wurde den Tieren dieser Versuchsgruppe ein Gefäßklipp auf die Arteria mesenterica cranialis (seu superior) gesetzt. Anschließend wurde der Versuch analog zur C57BL/6-Kontrollgruppe durchgeführt.
4. **ApoE-Ischämiegruppe (ApoE-I-Gruppe)** (n=6): Gleiche Versuchsdurchführung wie in der 3. Versuchsgruppe.

5. **C57BL/6-Ischämie-Reperfusionsgruppe (C57BL/6-IR)** (n=7): Es wurde für die Dauer von 30 Minuten ein ischämischer Zustand im Darmkonvolut in gleicher Weise wie bei den Ischämiegruppen herbeigeführt. Eine intravitale Fluoreszenzmikroskopie folgte jeweils nach 30 Minuten Reperfusion, die zweite nach 90 Minuten Reperfusion.
6. **ApoE-Ischämie-Reperfusionsgruppe (ApoE-IR)** (n=13): Gleiche Versuchsdurchführung wie in der 5. Versuchsgruppe.

Im Weiteren werden die erhobenen Daten der 4 experimentellen Gruppen zusammengefasst besprochen. Es wird die Mikrozirkulation des Dünndarms und der I/R-Schaden im Vergleich zwischen Kontrolltieren und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen analysiert, unabhängig von der Zugehörigkeit individueller Versuchstiere zu den aus logischen Gründen gebildeten experimentellen Versuchsgruppen.

Die Effekte einer Epo Behandlung auf die Mikrozirkulation des Dünndarms und den mesenterialen I/R-Schaden wurden in zwei weiteren experimentellen Gruppen analysiert:

7. **C57BL/6-Ischämie-Reperfusionsgruppe-Epo500 (C57BL/6-IREpo500)** (n=6) Prämedikation mit Epo (siehe Punkt 3.8). Die Versuchsdurchführung war danach identisch zu Gruppe fünf, lediglich auf die Entnahme der arteriellen Blutprobe wurde verzichtet.
8. **C57BL/6-Ischämie-Reperfusionsgruppe-Epo5000 (C57BL/6-IREpo5000)** (n=6): Gleiche Versuchsdurchführung wie in der 7. Gruppe, jedoch höhere Epo-Dosis (siehe Punkt 3.8).

3.10 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung erfolgte unterstützt mit dem Computerprogramm Sigma Stat® Version 3.02 {Jandel Scientific, USA}. Alle Parameter wurden in den einzelnen Experimenten erhoben und innerhalb einer Gruppe als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. „n“ ist dabei die Anzahl der in die definitive Auswertung eingegangenen Experimente pro Gruppe. Eine Differenzierung der normalen bzw. nicht normalen Verteilung der erhobenen Daten wurde für die einzelnen Gruppenvergleiche automatisiert durch das Computerprogramm SigmaStat® berechnet. Entsprechend der Datenverteilung wurden die Gruppenvergleiche mit dem t-Test oder mit dem Mann-Whitney Rank Sum Test analysiert. Unterschiede zwischen den Gruppen wurden bei einem Wahrscheinlichkeitswert $P < 0.05$ als signifikant gewertet.

4. Ergebnisse

4.1 Die Bedeutung generalisierter Atherosklerose beim mesenterialen I/R-Schaden

Die atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäuse hatten ein signifikant höheres Körpergewicht bei Versuchsdurchführung als die C57Bl/6-Kontrolltiere (30.1 ± 1.1 vs. 23.8 ± 0.4 g, P<0.001). Als Ausdruck einer generalisierten Atherosklerose wiesen die ApoE^{-/-}-Mäuse makroskopisch sichtbare Fettablagerungen im Bereich der pars abdominalis Aortae und ihrer Abgänge, so auch der Arteria mesenterica cranialis auf (Abb.10). Histologisch fanden sich typische Plaques in den großen arteriellen Gefäßen und massive Fetteinlagerungen in Koronararterien, Leber und Lunge (Abb. 11). Diese fehlten bei den C57Bl/6-Tieren.

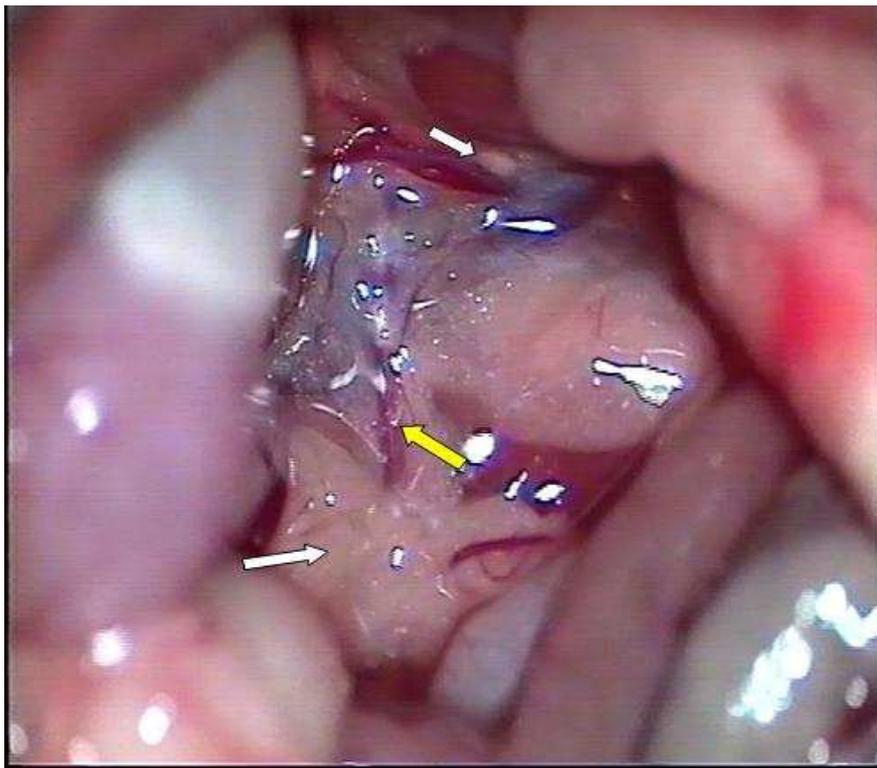


Abb. 10: Atherosklerotische Plaqueformationen bei einem ApoE^{-/-}-Tier um die Arteria mesenterica cranialis (gelber Pfeil) als diffuses Fettgewebe (langer weißer Pfeil) und als solitäre "Fettplaques" (kurzer weißer Pfeil). 25-fache Vergrößerung.

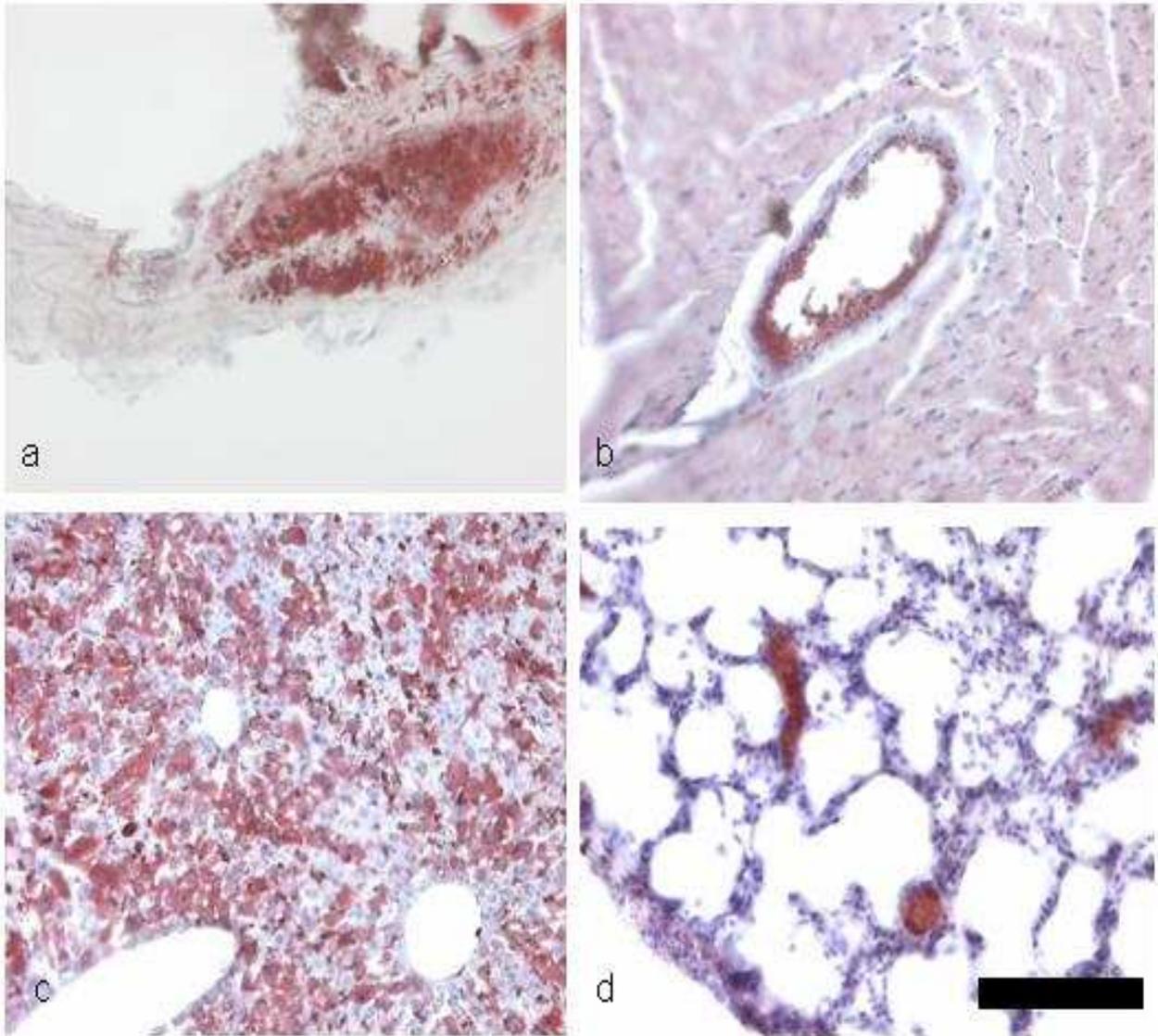


Abb. 11: Generalisierte Atherosklerose bei einer ApoE^{-/-}-Maus. **a)** Atherosklerotischer Plaque in der Aorta. **b)** Endotheliale Fettablagerungen in einer Koronararterie. **c)** Verfettung der Leber. **d)** Diskrete Fetteinlagerungen in der Lunge. Färbung der Schnitte mit Ölrot. Maßstab entspricht 100 μm in a) und c) und 50 μm in b) und d).

4.1.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des terminalen Ileums

4.1.1.1 Mikrovaskuläre Perfusion

Arteriolen:

Die mesenteriale Ischämie verursachte eine mikrovaskuläre Dysfunktion im terminalen Ileum sowohl in atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen als auch bei den Kontrolltieren. Die IVM zeigte, dass der Blutfluss in Arteriolen der

Längsmuskelschicht während der Phase der Ischämie fast komplett zum Stillstand kam. Die mikrovaskuläre Perfusion erholte sich bei den Kontrolltieren nach 90 Minuten Reperfusion wieder. Die arterioläre Blutflussgeschwindigkeit war zu diesem Zeitpunkt bei ca. 80 % des Baseline-Wertes. In atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen blieb die Blutflussgeschwindigkeit während der Reperfusion signifikant erniedrigt verglichen zur Baseline. Die Durchmesser der Arteriolen zeigten eine signifikante Dilatation nach 30 Minuten Reperfusion in der Kontrollgruppe. Nach 90 Minuten Reperfusion verringerte sich der mittlere Arteriolen-Durchmesser annähernd auf Baseline-Werte (Tabelle 1). Diese transiente Gefäßdilatation konnte bei den ApoE^{-/-}-Tieren nicht beobachtet werden.

Kapillare:

Die kapilläre Perfusion der Längsmuskelschicht des terminalen Ileums verschlechterte sich im Laufe der Reperfusion sowohl bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen, als auch bei den Kontrolltieren. Die kapillären Blutflussgeschwindigkeiten und die funktionellen Kapillardichten sanken im Vergleich zu den jeweiligen Baseline-Werten ab (Tabelle 1). Bei den Kontrolltieren war die kapilläre Blutflussgeschwindigkeit nach 30 Minuten Reperfusion zunächst wieder auf Baseline-Niveau, sank aber nach 90 Minuten Reperfusion signifikant ab. Bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen war diese temporäre Normalisierung der kapillären Blutflussgeschwindigkeit nicht zu beobachten. Hier war die mittlere kapilläre Blutflussgeschwindigkeit während der gesamten Reperusionsphase signifikant erniedrigt. Die kapillären Gefäßdurchmesser waren bei allen Tieren im gesamten Beobachtungszeitraum konstant, sowohl für die Kontrolle als auch bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen (Tabelle 1).

Venolen:

Die postkapillären Venolen zeigten stabile Diameter in beiden Gruppen und zu allen Zeitpunkten. Die postischämischen venolären Blutflussgeschwindigkeiten waren in beiden Gruppen, den Kontrolltieren und den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen, gegenüber den Baseline-Werten signifikant reduziert. Nach 30 Minuten Reperfusion zeigte sich bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen eine signifikant

niedrigere venoläre Blutflussgeschwindigkeit als bei den Kontrolltieren (Tabelle 1).

Tabelle 1: Mikrovaskuläre Perfusion im terminalen Ileum

		Baseline	Ischämie	30min	90min
Längsmuskelschicht					
<i>Arteriolen</i>					
Durchmesser [μm]	C57BL/6	27.4 \pm 1.6	30.8 \pm 2.4	38.9 \pm 3.5 *	31.7 \pm 1.2
	ApoE ^{-/-}	25.7 \pm 1.2	26.6 \pm 1.0	28.1 \pm 1.0 #	30.6 \pm 1.3
Geschw. [mm/s]	C57BL/6	2.87 \pm 0.17	0.28 \pm 0.05 *	1.96 \pm 0.24	2.26 \pm 0.25
	ApoE ^{-/-}	2.20 \pm 0.14 #	0.17 \pm 0.03 *#	1.47 \pm 0.1*#	1.48 \pm 0.1 *#
<i>Kapillaren</i>					
Durchmesser [μm]	C57BL/6	5.2 \pm 0.1	5.0 \pm 0.3	5.4 \pm 0.3	4.8 \pm 0.1
	ApoE ^{-/-}	4.9 \pm 0.2	5.6 \pm 0.2	4.8 \pm 0.1	4.8 \pm 0.2
Geschw. [mm/s]	C57BL/6	0.57 \pm 0.07	0.04 \pm 0.01 §	0.52 \pm 0.10	0.32 \pm 0.03 *
	ApoE ^{-/-}	0.42 \pm 0.03	0.04 \pm 0.01 §	0.34 \pm 0.03 *	0.24 \pm 0.03 §
FCD [cm/cm ²]	C57BL/6	232 \pm 11	76 \pm 19 §	200 \pm 11 *	194 \pm 12 *
	ApoE ^{-/-}	210 \pm 13	43 \pm 8 §	185 \pm 10	176 \pm 12
<i>Venolen</i>					
Durchmesser [μm]	C57BL/6	35.4 \pm 2.0	40.8 \pm 3.5	41.8 \pm 3.3	40.8 \pm 3.5
	ApoE ^{-/-}	31.9 \pm 1.7	36.2 \pm 1.7	37.0 \pm 1.8	36.2 \pm 1.7
Geschw. [mm/s]	C57BL/6	1.44 \pm 0.07	0.12 \pm 0.02 §	1.38 \pm 0.17 *	1.24 \pm 0.13 *
	ApoE ^{-/-}	1.33 \pm 0.04	0.10 \pm 0.02 §	0.93 \pm 0.05 *#	0.96 \pm 0.09 *
Zottenkapillare					
Durchmesser [μm]	C57BL/6	6.2 \pm 0.3	5.4 \pm 0.3	5.5 \pm 0.3	5.2 \pm 0.4
	ApoE ^{-/-}	5.4 \pm 0.2	5.5 \pm 0.2	5.8 \pm 0.2	5.8 \pm 0.2
Geschw. [mm/s]	C57BL/6	0.54 \pm 0.04	0.06 \pm 0.01 §	0.38 \pm 0.06	0.37 \pm 0.05
	ApoE ^{-/-}	0.50 \pm 0.07	0.07 \pm 0.01 §	0.32 \pm 0.03 *	0.32 \pm 0.02 *
FCDZ [cm/cm ²]	C57BL/6	515 \pm 10	123 \pm 26 §	440 \pm 50	432 \pm 46
	ApoE ^{-/-}	502 \pm 27	128 \pm 41 §	449 \pm 29	407 \pm 29

Mikrovaskuläre Durchmesser, Erythrozyten-Flussgeschwindigkeiten und Funktionelle Kapillardichten (FCD und FCDZ) wurden bestimmt in Arteriolen, Kapillaren und postkapillären Venolen in der Längsmuskelschicht und in den mukosalen Zottenkapillaren des terminalen Ileums bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen (n=13). Mikrozirkulatorische Parameterauswertung off-line von IVM-Sequenzen, aufgenommen bei Baseline, während der Ischämie, und nach 30 sowie 90 min Reperfusion. Werte sind Gruppenmittelwerte \pm Standardfehler (SEM); * p<0.05 vs. Baseline; § p<0.001 vs. Baseline; # p<0.05 vs. C57BL/6.

Zottenkapillare:

Die mukosale Zottenperfusion war während der Ischämie hoch signifikant verringert, sowohl in Kontrolltieren, als auch in atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen. Die Blutflussgeschwindigkeiten in den Zottenkapillaren und die funktionelle Zottenkapillardichte nahmen während der Reperfusion in beiden Gruppen wieder zu, erreichten aber nicht die Ausgangswerte. In den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen blieb die Blutflussgeschwindigkeit in den Zottenkapillaren signifikant erniedrigt im Vergleich zur Baseline. Zwischen den Kontrollen und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen gab es im Bezug auf mukosale kapilläre Blutflussgeschwindigkeiten und funktioneller Kapillardichte der Zotten keine signifikanten Unterschiede. Die Durchmesser der Zottenkapillare waren in allen Tieren relativ konstant und zu jeder Zeit vergleichbar (Tabelle 1).

Peristaltik:

Die mesenteriale Ischämie beeinflusste die Peristaltik im terminalen Ileum. In den Kontrolltieren war die Frequenz der Darmbewegungen während Ischämie und nach 30 Minuten Reperfusion auf ca. 50 % der Baseline-Werte erniedrigt. Nach 90 Minuten Reperfusion zeigte sich in den Kontrolltieren wieder eine normofrequente Peristaltik. Die atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäuse wiesen unter Baseline-Bedingungen eine signifikant niedrigere Kontraktionsfrequenz verglichen zu den Kontrollen auf. Diese war während der Ischämie ebenfalls massiv erniedrigt, erholte sich aber bereits nach 30 Minuten Reperfusion auf Werte, die mit der Baseline vergleichbar waren (Tabelle 2).

Tabelle 2: Peristaltik

		Baseline	Ischämie	30min	90min
Peristaltik [n/min]	C57BL/6	12.6 ± 1.6	6.9 ± 1.9	6.4 ± 1.8 *	12.7 ± 2.2
	ApoE ^{-/-}	7.3 ± 0.4#	2.3 ± 0.6§	8.2 ± 1.2	8.3 ± 1.4

Peristaltik wurde bestimmt bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen (n=13). Auswertung off-line. Werte sind Gruppenmittelwerte ± Standardfehler (SEM); * p<0.05 vs. Baseline; § p<0.001 vs. Baseline; # p<0.05 vs. C57BL/6.

4.1.1.2 Postischämische Entzündung

Die Analyse der intestinalen Mikrozirkulation zeigte keine Leukozyten-Endothelzellinteraktionen in Arteriolen und Kapillaren der Längsmuskelschicht unter Baseline-Bedingungen, weder in Kontrolltieren noch in atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen. In postkapillären Venolen fanden sich in beiden Gruppen vereinzelt rollende und fest adhärenente Leukozyten unter Baseline-Bedingungen. Bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen rollten im Vergleich zu den Kontrollen ca. doppelt so viele Leukozyten entlang des venolären Endothels (Abbildung 12). Das Rolling und die feste Adhäsion in Venolen waren aber unter Baseline-Bedingungen nicht signifikant unterschiedlich zwischen Kontrolltieren und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen.

In mukosalen Kapillaren fanden sich unter Baseline-Bedingungen keine Leukozyten-Endothelzellinteraktionen.

Während der Ischämie war die intestinale mikrovaskuläre Perfusion massiv eingeschränkt (s.o.). Aufgrund des stark verminderten Blutflusses war es nicht möglich frei fließende von rollenden Leukozyten zu unterscheiden. Entsprechend wurden das Rolling und die Rolling-Geschwindigkeit während Ischämie nicht quantifiziert. Im Vergleich zur Baseline war die feste Adhäsion in Kontrolltieren und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen während Ischämie nicht signifikant erniedrigt.

Als Ausdruck der postischämischen Entzündung zeigte sich eine deutliche Zunahme der Leukozyten-Endothelzellinteraktionen während der Reperfusion. Die postischämische Leukozytenrekrutierung ereignete sich vornehmlich in postkapillären Venolen. Arteriolen und Kapillaren der Längsmuskelschicht, wie auch mukosale Kapillaren waren praktisch frei von Leukozyten-Endothelzellinteraktionen während der Reperfusion.

Die Rolling-Geschwindigkeit in Venolen der Längsmuskelschicht war in den Kontrolltieren und den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen im gesamten Beobachtungszeitraum konstant und im Vergleich zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 3).

Die Anzahl fest adhärenenter Leukozyten in Venolen nahm während Reperfusion in Kontrolltieren und in atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen deutlich zu. Im Unterschied zu den Kontrollen war dieser Anstieg der festen Leukozytenadhäsion in atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen sowohl nach 30 wie

auch nach 90 Minuten Reperfusion signifikant im Vergleich zur Baseline. Während sich die Anzahl der fest adhärenen Leukozyten in den Kontrolltieren während 90 Minuten Reperfusion gerade verdoppelte, stieg die feste Adhäsion in atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen nach 90 Minuten auf ca. das 10fache des Baseline-Wertes an. Im Vergleich zwischen der Kontrolle und den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen war die feste Adhäsion nach 30 und 90 Minuten Reperfusion signifikant erhöht (Abbildung 13).

Tabelle 3: Postischämische Entzündung

		Baseline	Ischämie	30min	90min
<i>Arteriolen</i>					
Rolling	C57BL/6	0	-	0	0
[n/min/mm]	ApoE ^{-/-}	0	-	0	0
Rolling-Geschwindigk.	C57BL/6	-	-	-	-
[mm/sec]	ApoE ^{-/-}	-	-	-	-
feste Adhäsion	C57BL/6	2.5 ± 2.5	0	1.9 ± 1.9	1.5 ± 1.5
[n/mm ²]	ApoE ^{-/-}	0	0	5.9 ± 4.2	4.4 ± 2.6
<i>Venolen</i>					
Rolling	C57BL/6	57.9 ± 14.6	-	88,8 ± 24.1	121.3±28.2*
[n/min/mm]	ApoE ^{-/-}	115.6 ± 27.3	-	177.7 ± 26.6#	216.9 ± 28.8*#
Rolling-Geschwindigk.	C57BL/6	0.068 ± 0.009	-	0.061 ± 0.009	0.072 ± 0.01
[mm/sec]	ApoE ^{-/-}	0.047 ± 0.002	-	0.064 ± 0.007	0.060 ± 0.005
feste Adhäsion	C57BL/6	72.3 ± 20.9	24.6 ± 13.8	58.9 ± 23.8	124.8 ± 49.1
[n/mm ²]	ApoE ^{-/-}	42.9 ± 15.9	10.5 ± 10.5	203.4 ± 31.2*#	383.6±42.1*\$

Rolling, Rolling-Geschwindigkeit und festadhärente Leukozyten wurden ermittelt bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen (n=13) in Arteriolen und postkapillären Venolen. Parameterauswertung off-line von IVM-Sequenzen, aufgenommen bei Baseline, während der Ischämie, und nach 30 sowie 90 min Reperfusion. Werte sind Gruppenmittelwerte ± Standardfehler (SEM); * p<0.05 vs. Baseline; # p<0.05 vs. C57BL/6; \$ p<0.001 vs. C57BL/6.

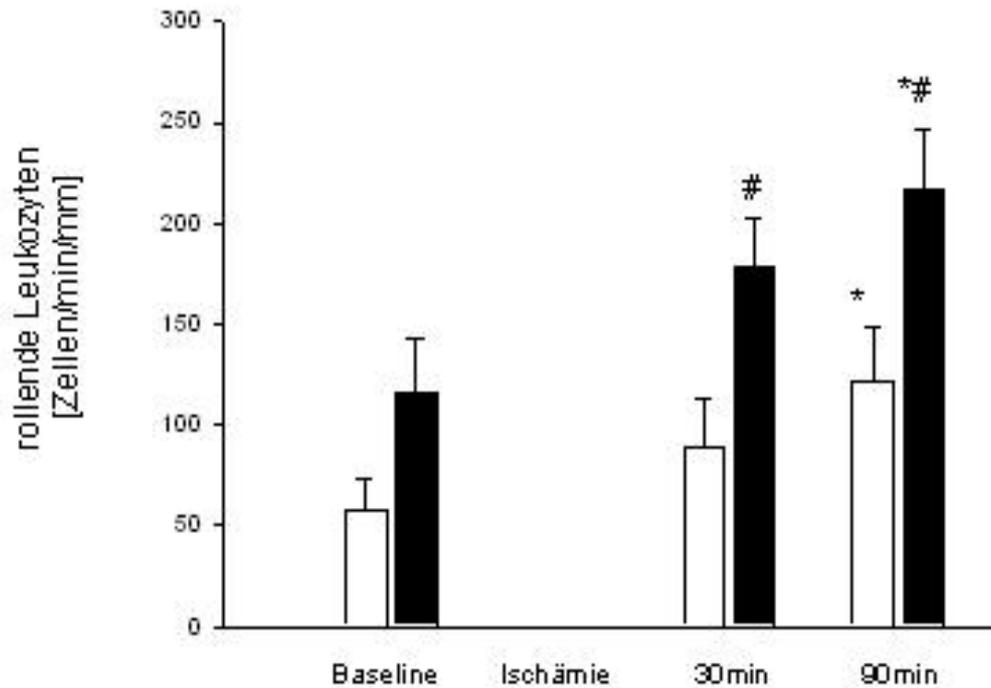


Abbildung 12: Quantitative Analyse der Leukozyten–Endothelzell–Interaktion („roller“); weiße Balken repräsentieren die Kontrolltiere (C57BL/6, n=7), schwarze Balken die atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäuse (n=12; Baseline n=6); * p<0.05 vs. Baseline; # p<0.05 vs. C57BL/6. Daten sind Mittelwerte ± SEM.

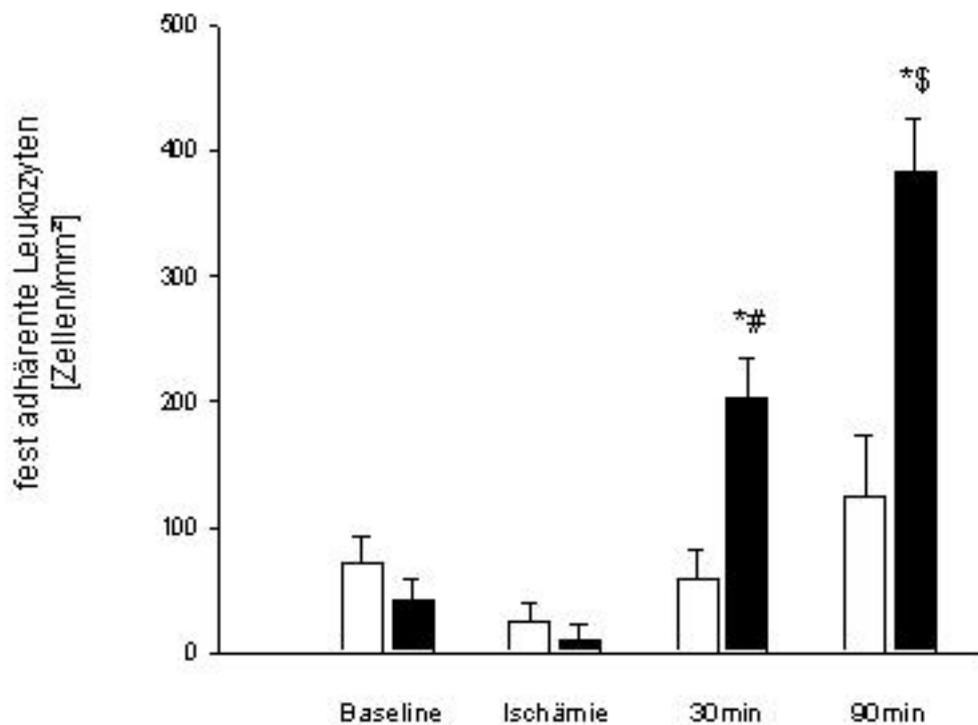


Abbildung 13: Quantitative Analyse der Leukozyten–Endothelzell–Interaktion („sticker“); weiße Balken repräsentieren die Kontrolltiere (C57BL/6, n=7), schwarze Balken die atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäuse (n=12; Baseline n=6); * p<0.05 vs. Baseline; # p<0.05 vs. C57BL/6; \$ p<0.001 vs. C57BL/6. Daten sind Mittelwerte ± SEM.

4.1.1.3 Histologie

Die histologische Analyse zeigte, dass die Mukosa des Dünndarms während der Reperfusion einen quantifizierbaren Schaden nimmt.

Park-Klassifikation:

Der semiquantitative Park-Score zeigte sowohl in den Kontrolltieren, als auch in den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen einen relevanten Mukosaschaden nach 90 Minuten Reperfusion (Tabelle 4). Dabei besteht im Vergleich zwischen Kontrolltieren und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen weder unter Baseline-Bedingungen noch nach 90 Minuten Reperfusion ein signifikanter Unterschied.

Villuslänge:

Die direkte quantitativ-morphometrische Analyse des anatomisch-histologischen Aufbaus der Darmwand des terminalen Ileums zeigte, dass die Zottenvilli im terminalen Ileum bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen gegenüber den Kontrolltieren nach 90 Minuten Reperfusion signifikant kürzer waren. Dabei verloren die Darmzotten bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren während der 90 Minuten Reperfusion bezogen auf die Baseline im Mittel mehr als die Hälfte ihrer Länge (Tabelle 4).

Kryptentiefe:

Die Tiefe der Krypten war bei den Kontrolltieren und den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen nach Ischämie und Reperfusion unverändert. Die Kryptentiefen waren nach 90 Minuten Reperfusion in beiden Gruppen vergleichbar zur Baseline. Bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen waren die Krypten des terminalen Ileums insgesamt etwas weniger tief als bei den Kontrollen, sowohl unter Baseline-Bedingungen als auch nach 90 Minuten Reperfusion. Dieser Unterschied war unter Baseline-Bedingungen statistisch signifikant (Tabelle 4).

Mukosadicke:

Die Dicke der Mukosa insgesamt spiegelt die Addition der Länge der Villi und der Krypten wider. Änderungen im Mukosa-Durchmesser sind hierbei aber allein im Verlust von Zottengewebe begründet, da die Kryptentiefe unverändert blieb. Nach Ischämie und 90 Minuten Reperfusion war die Schleimhaut des terminalen Ileums bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren signifikant dünner als bei den Kontrolltieren und betrug nur noch ca. 60 % des Baseline-Wertes (Tabelle 4).

Muskularisdicke:

Die Dicke der Tunica muscularis war in den Kontrollen und den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen nahezu konstant und im Vergleich zwischen den Gruppen nicht signifikant unterschiedlich (Tabelle 4).

Relative Villuslänge:

Da sich die Kryptenlänge des terminalen Ileums bei allen Versuchsgruppen über die Zeitdauer des Versuches gesehen als konstante Größe herauskristallisierte, bot sich an, die offensichtliche Verkürzung der Darmzotten zu dem Durchmesser der Kryptenschicht ins Verhältnis zu setzen. Dabei zeigte sich, dass zu Versuchsbeginn die Darmzotten der atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tiere 2,5 mal so lang waren wie die Darmkrypten, bei den Kontrolltieren nur knapp doppelt so lang. Nach Ischämie und Reperfusion betrug bei den Kontrolltieren die relative Villuslänge noch gut das anderthalbfache der Kryptenlänge, bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen waren Krypten und Zotten nur noch annähernd gleich lang ($p < 0,05$ vs. Baseline und $p < 0,05$ vs. Kontrolle). Relativ zur gesamten Mukosadicke hatten die Darmzotten bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen nur noch einen Anteil von 46 % gegenüber mehr als 70 % vor I/R ($p < 0,05$ vs. Baseline und $p < 0,05$ vs. Kontrolle; Tabelle 4). Bei den Kontrolltieren verringerte sich dieser Anteil nur von rund 65 % auf rund 61 % (Tabelle 4).

Tabelle 4: Histologische Daten

	Baseline	90 min
<i>Modif. Park Klassifikation</i>		
C57BL/6	0.28 ± 0.08	2.77 ± 0.48*
ApoE ^{-/-}	0.22 ± 0.13	3.65 ± 0.57*
<i>Villuslänge [µm]</i>		
C57BL/6	241 ± 14	205 ± 20
ApoE ^{-/-}	284 ± 21	130 ± 24 §#
<i>Kryptentiefe [µm]</i>		
C57BL/6	128 ± 2	126 ± 3
ApoE ^{-/-}	117 ± 5 #	116 ± 4
<i>Dicke der Tunica mucosa [µm]</i>		
C57BL/6	369 ± 14	331 ± 19
ApoE ^{-/-}	401 ± 17	245 ± 24 §#
<i>Dicke der Tunica muscularis [µm]</i>		
C57BL/6	69 ± 9	63 ± 6
ApoE ^{-/-}	63 ± 10	53 ± 5
<i>Relative Villuslänge</i>		
Im Bezug auf die Kryptenlänge [Faktor]		
C57BL/6	1.9 ± 0.1	1.6 ± 0.2
ApoE ^{-/-}	2.5 ± 0.3	1.2 ± 0.2 *#
Im Bezug auf die Mukosadicke [%]		
C57BL/6	64.9 ± 1.3	60.5 ± 3
ApoE ^{-/-}	70.4 ± 2.1	46.2 ± 6.1 *#
Im Bezug auf die Dicke der Muskularis [Faktor]		
C57BL/6	4.3 ± 0.6	3.6 ± 0.7
ApoE ^{-/-}	6.0 ± 1.9	2.7 ± 0.5 *
<i>Villusepithelintegrität [%]</i>		
C57BL/6	99.3 ± 0.3	79.2 ± 9.2 *
ApoE ^{-/-}	99.2 ± 0.4	48.7 ± 12.4 *

Gewebeproben wurden bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen (n=13) nach erfolgter intravitale Fluoreszenzmikroskopie nach 90 Minuten Reperfusion entnommen. Baseline Messungen wurden an Gewebeproben von separaten Kontroll- (C57BL/6; n=10) und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen (n=6), durchgeführt. Diese befanden sich zum Zeitpunkt der Gewebeprobenentnahme in naivem Zustand. Werte sind Gruppenmittelwerte ± Standardfehler (SEM); * p<0.05 vs. Baseline; # p<0.05 vs. C57BL/6; § p<0.001 vs. Baseline.

Villusepithelintegrität:

Der mesenteriale Ischämie/Reperfusionsschaden war auch am Epithel des terminalen Ileums detektierbar. Die Integrität des Villusepithels war nach 90 Minuten Reperfusion in Kontrollen und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen signifikant niedriger als unter Baseline-Bedingungen. Der Unterschied zwischen den Kontrollen und den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen war nach 90 Minuten Reperfusion statistisch nicht signifikant (Tabelle 4).

Zusammengefasst deuten die histologischen Untersuchungen ebenfalls auf einen ausgeprägteren Schweregrad des I/R-Schadens bei atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen hin.

4.1.2 Blutbild

Tabelle 5 : Blutbild

	Baseline	90 min
<i>Leukozyten (WBC) [x10³/μl]</i>		
C57BL/6	5.07 ± 0.68	4.87 ± 0.64
ApoE ^{-/-}	6.28 ± 1.04	3.44 ± 0.57 *
<i>Erythrozyten (RBC) [x10⁶/μl]</i>		
C57BL/6	7.46 ± 0.39	8.39 ± 0.34
ApoE ^{-/-}	7.03 ± 0.64	7.61 ± 0.45
<i>Thrombozyten (PLT) [x10³/μl]</i>		
C57BL/6	474.93 ± 133.09	687.19 ± 182.90
ApoE ^{-/-}	303.07 ± 104.94	342.48 ± 76.28
<i>Hämoglobin (Hgb) [g/dl]</i>		
C57BL/6	13.52 ± 1.09	14.62 ± 1.09
ApoE ^{-/-}	12.27 ± 1.01	12.89 ± 0.78

*Leukozytenkonzentration, Erythrozytenkonzentration, Thrombozytenkonzentration und Hämoglobin wurden bestimmt bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen (n=13). Vollblut wurde gezogen nach 90 Minuten Reperfusion und erfolgter IVM; bei den Baselinetieren (C57BL/6, n=9; ApoE^{-/-}, n=6) nach erfolgter IVM. Werte sind Gruppenmittelwerte ± Standardfehler (SEM); * p<0.05 vs. Baseline*

Die Anzahl der Leukozyten im freien Blutfluss sank bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren nach 90 Minuten Reperfusion auf knapp die Hälfte des Baseline-Wertes ab (p<0,05; Tabelle 5). Alle übrigen Blutbildparameter waren sowohl unter Baseline-Bedingungen als auch nach 90 Minuten Reperfusion

im Vergleich zwischen Kontrolltieren und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen nicht signifikant unterschiedlich.

4.2 „Remote Injury“ in Leber und Lunge

Die Auswirkung des mesenterialen IR-Schadens auf die Mikrozirkulation anderer, im Blutstrom direkt (Leber; Portalkreislauf) und indirekt (Lunge; kleiner Kreislauf) nachgeschalteter Organe, wurde nur im Atherosklerosemodell untersucht.

4.2.1 „Remote Injury“ in der Leber

Die Analyse der Aspartat- Amino-Transferase (AST)- und Alanin-Amino-Transferase (ALT)-Serumspiegel zeigte bei den Kontrolltieren Normwerte [*RESEARCH ANIMAL RESOURCES*, Reference Values] unter Baseline-Bedingungen. Die mesenteriale Ischämie bewirkte einen signifikanten Anstieg des AST- und des ALT-Serumspiegels in den Kontrolltieren nach 90 Minuten Reperfusion (Tabelle 6).

Bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren zeigte sich bereits unter Baseline-Bedingungen ein nahezu dreifach höherer Serum-AST-Spiegel als bei den Kontrolltieren. Diese Erhöhung war statistisch signifikant. Der Serum-ALT-Spiegel war unter Baseline-Bedingungen normwertig, stieg aber nach 90 Minuten Reperfusion signifikant an (Tabelle 6).

Die mesenteriale Ischämie und Reperfusion bewirkten einen signifikanten Anstieg des Wassergehaltes der Leber bei den Kontrolltieren, was durch einen Anstieg des Feucht/Trocken-Quotienten nach I/R angezeigt wird. Im Gegensatz dazu veränderte sich der hepatische Wassergehalt bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren nicht wesentlich. Die Feucht/Trocken-Quotienten waren bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren unter Baseline-Bedingungen und nach 90 Minuten Reperfusion signifikant niedriger als in den Kontrollen (Tabelle 6).

Tabelle 6: Leberschädigung nach mesenterialer I/R.

		Baseline	90 min
<i>AST [U/l]</i>			
	C57BL/6	54 ± 3	115 ± 24 *
	ApoE ^{-/-}	142 ± 41 #	102 ± 12
<i>ALT [U/l]</i>			
	C57BL/6	26 ± 2	68 ± 14 *
	ApoE ^{-/-}	32 ± 4	57 ± 10 *
<i>Feucht/Trocken-Gewichtsquotient [aU]</i>			
	C57BL/6	3.04 ± 0.02	3.42 ± 0.04 *
	ApoE ^{-/-}	2.57 ± 0.21 #	2.71 ± 0.06 #

*Blut- und Gewebeprobe*n wurden von Kontroll- (C57BL/6, n=8) und atherosklerotischen Apo E^{-/-}-Mäusen (n=13) nach 90 min Reperfusion und nach IVM entnommen. Baselinemessungen wurden an Proben von separaten, altersgemischten, naiven Kontroll- (C57BL/6, n=6) und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen (n=6) Mäusen durchgeführt, welchen sonst keinerlei Manipulation widerfuhr. Werte sind Gruppenmittelwerte ± Standardfehler (SEM); *p<0.05 vs. Baseline, # p<0.05 vs. C57BL/6.

4.2.2 „Remote Injury“ in der Lunge

Die Blutgasanalyse (BGA) zeigte nach 90 Minuten Reperfusion eine suffiziente Oxigenierung in Kontrolltieren und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen. In beiden Gruppen bestanden eine metabolische Azidose und eine diskrete Hyperkaliämie. Zwischen den Gruppen waren die Parameter der Blutgasanalyse vergleichbar (Tabelle 7).

Die Analyse des Feucht/Trocken–Gewichts Quotienten ergab nach 90 Minuten Reperfusion vergleichbare Werte in Kontrollen und in den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen (5.33 ± 0.14 aU vs. 5.71 ± 1.18 aU; p> 0,05).

Der Relative Alveolarraum (RAR) war unter Baseline-Bedingungen mit ca. 60 % zwischen den Kontrollen und atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen vergleichbar. Nach 90 Minuten Reperfusion sank in beiden Gruppen der RAR im Vergleich zur Baseline signifikant ab. Der RAR war zu diesem Zeitpunkt in den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen zusätzlich signifikant niedriger als in den Kontrolltieren (Abbildungen 14 und 15).

Die Konzentration der Myeloperoxidase (MPO) war nach Ischämie und Reperfusion im Lungengewebe der atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tiere signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe (1651 ± 166 U vs. 898 ± 284 U).

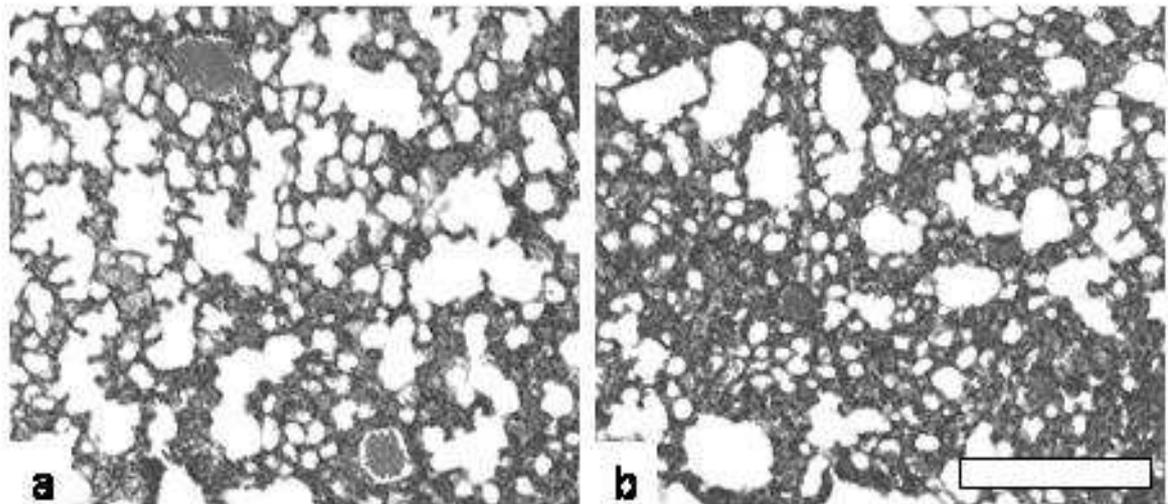


Abbildung 14: HE-gefärbte Gewebeschnitte der Lunge nach Ischämie und 90 Minuten Reperfusion. **a)** C57BL/6-Maus, **b)** ApoE^{-/-}-Maus. Maßstab entspricht in beiden Bildern 100 µm.

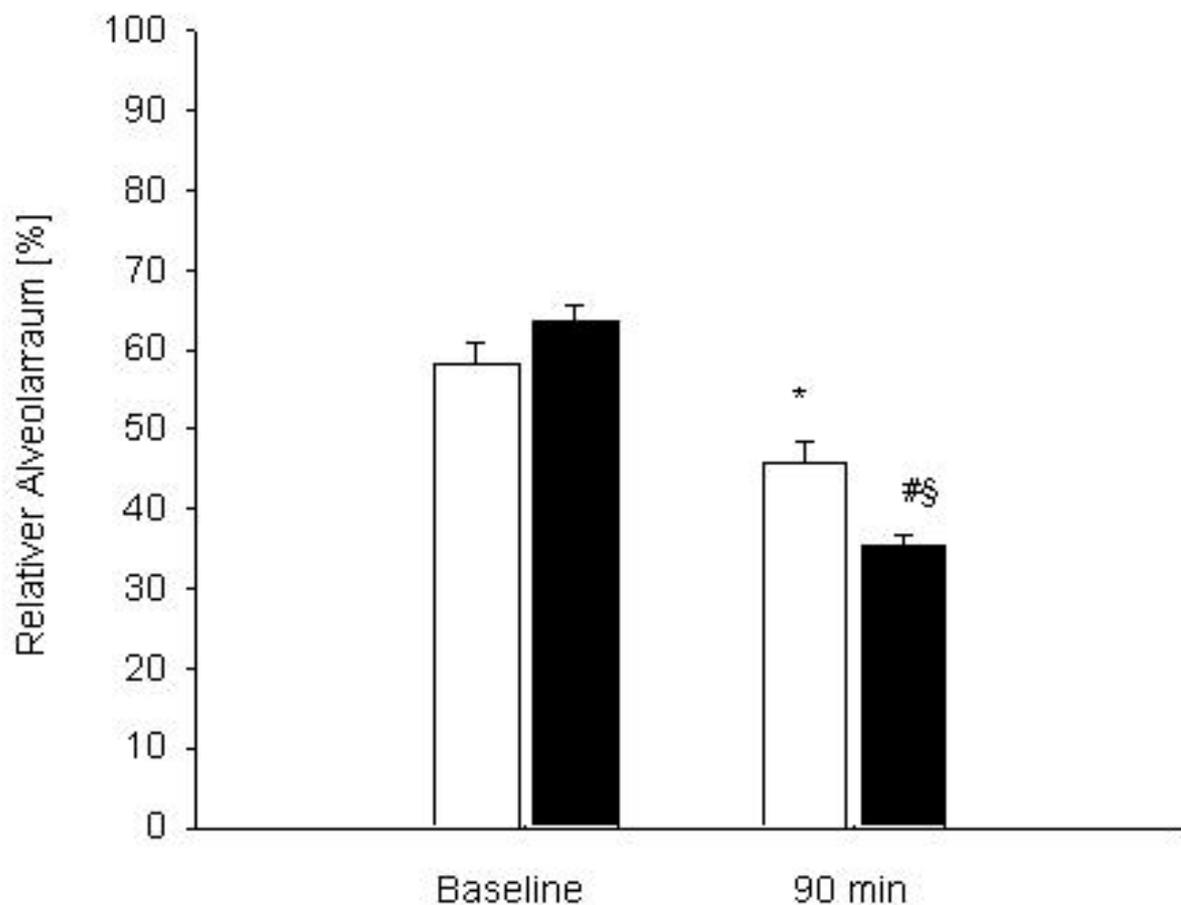


Abbildung 15: Relativer Alveolarraum; weiße Balken repräsentieren die Kontrolltiere (C57BL/6, n=7), schwarze Balken die atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäuse (Baseline n=6; 90 min n=12); Daten sind Mittelwerte ± SEM; * p<0.05 vs. Baseline; § p<0.001 vs. Baseline; # p<0.05 vs. C57BL/6.

Tabelle 7: Blutgasanalyse

	C57BL/6	ApoE ^{-/-}
pO ₂ [mmHg]	161.1 ± 8.9	143.1 ± 7.6
pCO ₂ [mmHg]	51.9 ± 3.1	47.0 ± 1.6
Laktat [mmol/l]	2.6 ± 0.3	2.5 ± 0.3
pH	7.138 ± 0.023	7.180 ± 0.017
K ⁺ [mmol/l]	5.5 ± 0.4	5.5 ± 0.3
base excess [mmol/l]	-11.9 ± 0.9	-10.9 ± 0.8
SO ₂ [%]	98.4 ± 0.2	98.2 ± 0.2

Blutproben wurden nach 90 Minuten Reperfusion und IVM aus der pars abdominalis aortae entnommen bei C57BL/6 (n=6) und atherosklerotischen ApoE^{-/-}- Mäusen (n=6). Daten sind Mittelwerte ± Standardabweichung (SEM).

4.3 Die Effekte von Erythropoietin beim mesenterialen I/R-Schaden

4.3.1 Intravitale Fluoreszenzmikroskopie des terminalen Ileums

4.3.1.1 Mikrovaskuläre Perfusion

Die Vorbehandlung mit Erythropoietin hatte einen Einfluss auf die mikrovaskulären Gefäßdurchmesser in Arteriolen und postkapillären Venolen. Im Vergleich zu den Kontrollen waren die arteriolären und venolären Gefäßdurchmesser insbesondere nach 30 Minuten, aber auch nach 90 Minuten Reperfusion deutlich kleiner (Tabelle 8). Die kapillären Gefäßdurchmesser waren durch Epo nicht beeinflusst, weder in der Längsmuskelschicht noch in den Zotten.

Die Blutflussgeschwindigkeit in Arteriolen und Venolen der Längsmuskelschicht des terminalen Ileums waren während Reperfusion in Epo-behandelten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen erhöht (Tabelle 8). Im Gegensatz dazu waren kapilläre Blutflussgeschwindigkeiten in der Längsmuskelschicht und in der Mukosa während Reperfusion nicht durch Erythropoietin beeinflusst.

In Epo-behandelten Tieren war die funktionelle Kapillardichte in der Längsmuskelschicht und in der Mukosa im Vergleich zu den Kontrollen erhöht.

Diese Erhöhung war nach 90 Minuten Reperfusion in der Epo500-Gruppe statistisch signifikant (Abbildungen 16 und 17; Tabelle 8).

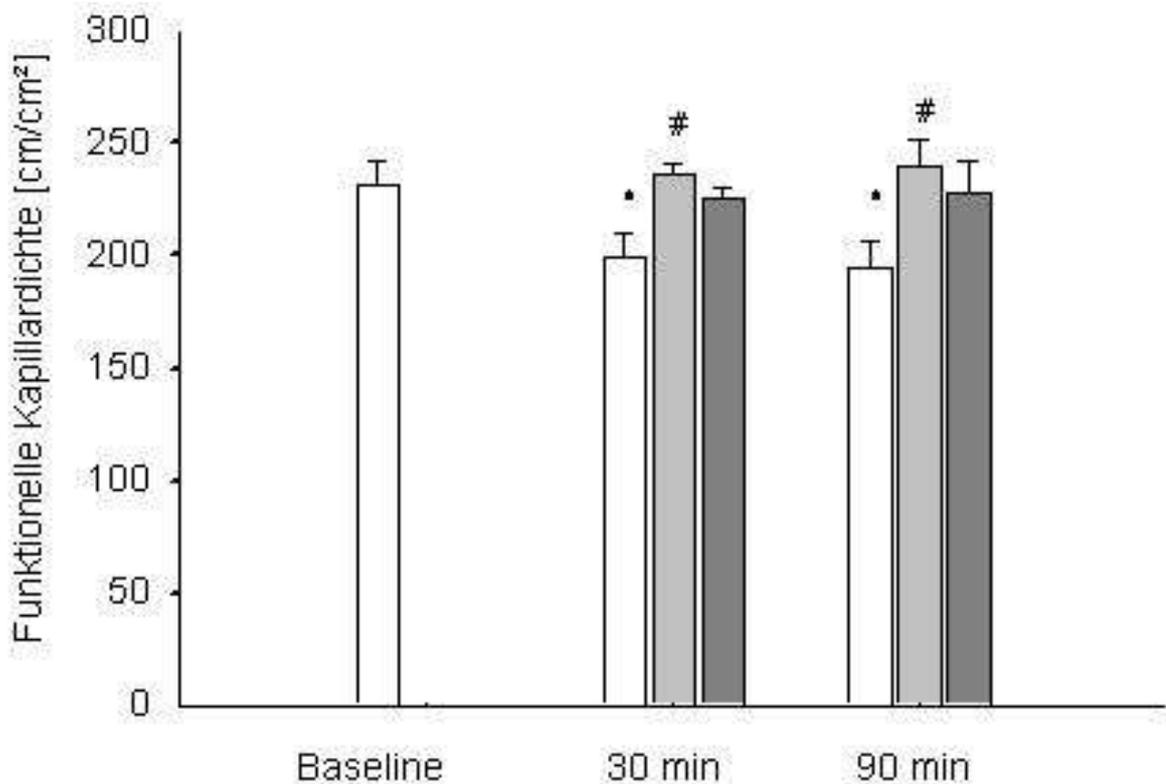


Abbildung 16: Perfundierte Kapillaren der Längsmuskelschicht in cm pro cm² Fläche. Weiße Balken repräsentieren die Kontrolltiere (C57Bl/6, n=7), hellgraue Balken die Versuchsgruppe Epo500 (n=6), dunkelgraue Balken die Versuchsgruppe Epo5000 (n=6). * $p < 0.05$ vs. Baseline; # $p < 0.05$ vs. C57Bl/6. Daten sind Mittelwerte \pm SEM.

Tabelle 8: Microvaskuläre Perfusion.

		Baseline	Ischämie	30min	90min
Längsmuskelschicht					
<i>Arteriolen</i>					
Durchmesser [μm]	C57BL/6	27.4 \pm 1.6	30.8 \pm 2.4	38.9 \pm 3.5 *	31.7 \pm 1.2
	Epo500	-	-	23.0 \pm 0.5 #	23.1 \pm 1.1 #
	Epo5000	-	-	24.7 \pm 0.6 #	27.6 \pm 2.4
Geschw. [mm/s]	C57BL/6	2.87 \pm 0.17	0.28 \pm 0.05 *	1.96 \pm 0.24	2.26 \pm 0.25
	Epo500	-	-	2.67 \pm 0.08 #	2.92 \pm 0.08 #
	Epo5000	-	-	2.58 \pm 0.13	2.75 \pm 0.12
<i>Kapillaren</i>					
Durchmesser [μm]	C57BL/6	5.2 \pm 0.1	5.0 \pm 0.3	5.4 \pm 0.3	4.8 \pm 0.1
	Epo500	-	-	5.6 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2
	Epo5000	-	-	5.1 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2
Geschw. [mm/s]	C57BL/6	0.57 \pm 0.07	0.04 \pm 0.01 §	0.52 \pm 0.10	0.32 \pm 0.03 *
	Epo500	-	-	0.47 \pm 0.04	0.44 \pm 0.05
	Epo5000	-	-	0.46 \pm 0.05	0.50 \pm 0.08
FCD [cm/cm^2]	C57BL/6	232 \pm 11	76 \pm 19 §	200 \pm 11 *	194 \pm 12 *
	Epo500	-	-	236 \pm 4 #	240 \pm 12 #
	Epo5000	-	-	225 \pm 5	228 \pm 14
<i>Venolen</i>					
Durchmesser [μm]	C57BL/6	35.4 \pm 2.0	40.8 \pm 3.5	41.8 \pm 3.3	40.8 \pm 3.5
	Epo500	-	-	26.5 \pm 1.1 #	24.7 \pm 1.6 #
	Epo5000	-	-	31.0 \pm 1.2 #	31.7 \pm 2.1
Geschw. [mm/s]	C57BL/6	1.44 \pm 0.07	0.12 \pm 0.02 §	1.38 \pm 0.17 *	1.24 \pm 0.13 *
	Epo500	-	-	1.52 \pm 0.07	1.61 \pm 0.12
	Epo5000	-	-	1.64 \pm 0.09	1.65 \pm 0.07 #
Zottenkapillare					
Durchmesser [μm]	C57BL/6	6.2 \pm 0.3	5.4 \pm 0.3	5.5 \pm 0.3	5.2 \pm 0.4
	Epo500	-	-	5.9 \pm 0.2	5.4 \pm 0.1
	Epo5000	-	-	5.4 \pm 0.2	5.5 \pm 0.1
Geschw. [mm/s]	C57BL/6	0.54 \pm 0.04	0.06 \pm 0.01 §	0.38 \pm 0.06	0.37 \pm 0.05
	Epo500	-	-	0.46 \pm 0.02	0.45 \pm 0.03
	Epo5000	-	-	0.41 \pm 0.03	0.48 \pm 0.02
FCDZ [cm/cm^2]	C57BL/6	515 \pm 10	123 \pm 26 §	440 \pm 50	432 \pm 46
	Epo500	-	-	552 \pm 28	572 \pm 18 #
	Epo5000	-	-	516 \pm 16	543 \pm 25

Microvaskuläre Durchmesser, Erythrozyten-Flussgeschwindigkeiten und Funktionelle Kapillardichten (FCD und FCDZ) wurden bestimmt in Arteriolen, Kapillaren und postkapillären Venolen in der Längsmuskelschicht und in den Zottenkapillaren des terminalen Ileum bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei den mit Epo-vorbehandelten C57BL/6-Tieren (Epo500, n=6; Epo5000, n=6). Mikrozirkulatorische Parameterauswertung off-line von IVM-Sequenzen, aufgenommen bei

Baseline, während der Ischämie, und nach 30 sowie 90 min Reperfusion. Werte sind Gruppenmittelwerte \pm Standardfehler (SEM); * $p < 0.05$ vs. Baseline; § $p < 0.001$ vs. Baseline; # $p < 0.05$ vs. C57BL/6.

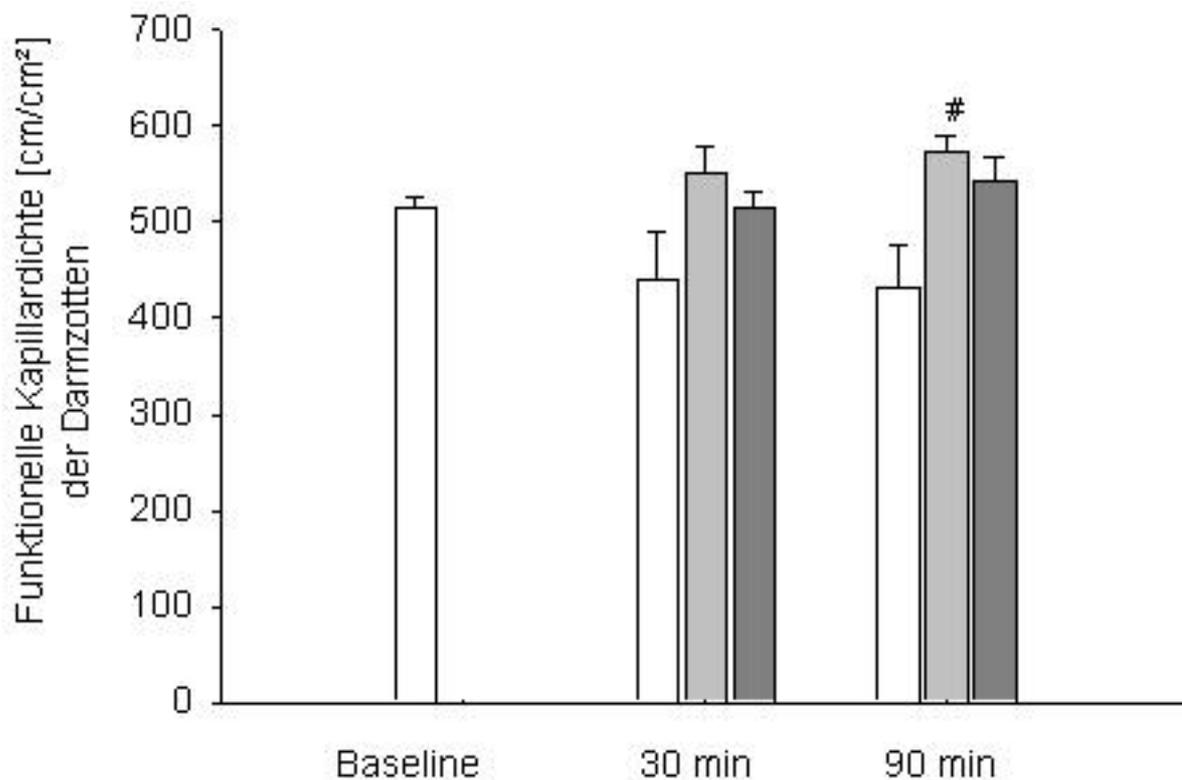


Abbildung 17: Perfundierte Kapillaren in cm pro cm² Zottenfläche. Weiße Balken repräsentieren die Kontrolltiere (C57BL/6, n=7), hellgraue Balken die Versuchsgruppe Epo500 (n=6), dunkelgraue Balken die Versuchsgruppe Epo5000 (n=6). # $p < 0.05$ vs. C57BL/6. Daten sind Mittelwerte \pm SEM.

Erythropoietin beeinflusste die postischämische Peristaltik im terminalen Ileum. Nach 30 Minuten Reperfusion war die Kontraktionsfrequenz in mit Epo behandelten Tieren vergleichbar mit der Kontrolle. Nach 90 Minuten Reperfusion waren die Kontraktionsfrequenzen in den mit Epo behandelten Tieren niedriger als in den Kontrollen. Im Vergleich zu den Kontrollen war die Kontraktionsfrequenz in der Epo500-Gruppe nach 90 Minuten Reperfusion statistisch signifikant niedriger.

Tabelle 9: Peristaltik

		Baseline	Ischämie	30min	90min
Peristaltik [n/min]	C57BL/6	12.6 \pm 1.6	6.9 \pm 1.9	6.4 \pm 1.8 *	12.7 \pm 2.2
	Epo500	-	-	3.3 \pm 1.1	6.0 \pm 0.9#
	Epo5000	-	-	5.8 \pm 0.5	8.3 \pm 1.3

Peristaltik wurde bestimmt bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei mit Erythropoietin vorbehandelten C57BL/6-Mäusen (Epo500, n=6; Epo5000, n=6). Auswertung off-line. Werte sind Gruppenmittelwerte \pm Standardfehler (SEM); * $p < 0.05$ vs. Baseline; # $p < 0.05$ vs. C57BL/6.

4.3.1.2 Postischämische Entzündung

Tabelle 10: Postischämische Entzündung

		Baseline	Ischämie	30min	90min
<i>Arteriolen</i>					
Rolling [n/min/mm]	C57BL/6	0	-	0	0
	Epo500	-	-	0	0
	Epo5000	-	-	0	0
Rolling- Geschwindigk. [mm/sec]	C57BL/6	-	-	-	-
	Epo500	-	-	-	-
	Epo5000	-	-	-	-
feste Adhäsion [n/mm ²]	C57BL/6	2.5 ± 2.5	0	1.9 ± 1.9	1.5 ± 1.5
	Epo500	-	-	6.1 ± 6.1	0
	Epo5000	-	-	0	5.3 ± 5.3
<i>Venolen</i>					
Rolling [n/min/mm]	C57BL/6	57.9 ± 14.6	-	88.8 ± 24.1	121.3 ± 28.2*
	Epo500	-	-	84.0 ± 12.0	69.8 ± 29.2
	Epo5000	-	-	78.2 ± 5.4	70.3 ± 21.0
Rolling- Geschwindigk. [mm/sec]	C57BL/6	0.068 ± 0.009	-	0.061 ± 0.009	0.072 ± 0.01
	Epo500	-	-	0.03 ± 0.003#	0.034 ± 0.004#
	Epo5000	-	-	0.042 ± 0.008#	0.044 ± 0.004#
feste Adhäsion [n/mm ²]	C57BL/6	72.3 ± 20.9	24.6 ± 13.8	58.9 ± 23.8	124.8 ± 49.1
	Epo500	-	-	58.5 ± 30.8	76.3 ± 29.1
	Epo5000	-	-	86.7 ± 31.4	84.0 ± 26.0

*Roler, Rolling-Geschwindigkeit und Sticker wurden ermittelt bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei den mit Epo vorbehandelten C57BL/6-Tieren (Epo500, n=6; Epo5000, n=6) in Arteriolen und postkapillären Venolen. Parameterauswertung off-line von IVM-Sequenzen, aufgenommen bei Baseline, während der Ischämie, und nach 30 sowie 90 min Reperfusion. Werte sind Gruppenmittelwerte ± Standardfehler (SEM); * p<0.05 vs. Baseline; # p<0.05 vs. C57BL/6*

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie zeigte, dass sich auch bei den mit Epo behandelten Tieren die postischämische Leukozyten-Endothel-Interaktion vornehmlich in den postkapillären Venolen der Längsmuskelschicht des terminalen Ileums ereignete. Arteriolen und Kapillaren waren nahezu frei von Leukozyten-Endothel-Interaktionen während der Reperfusion (Tabelle 10, Kapillaren nicht wiedergegeben).

In den Epo-behandelten Tieren waren die Anzahl rollender und fest adhärenter Leukozyten erniedrigt im Vergleich zur Kontrollgruppe. Der Unterschied zu den Kontrollen war aber statistisch nicht signifikant. Sowohl in der Epo500- als auch in der Epo5000-Gruppe waren die mittleren Rollgeschwindigkeiten der Leukozyten deutlich niedriger als in den Kontrollen. Die Unterschiede der

Rollgeschwindigkeiten waren im Vergleich zu den Kontrollen nach 30 und nach 90 Minuten Reperfusion statistisch signifikant.

4.3.1.3 Histologie

Die histologische Analyse zeigte, dass eine Epo-Prämedikation den Gewebeschaden im terminalen Ileum nach 90 Minuten Reperfusion positiv beeinflusst. Sowohl in der Epo500- als auch in der Epo5000-Gruppe war der semiquantitative Park-Score nach 90 Minuten niedriger als in den Kontrollen. Die Unterschiede waren aber statistisch nicht signifikant.

Die quantitative histomorphometrische Analyse ergab, dass eine Vorbehandlung mit Erythropoietin keinen relevanten Einfluss auf den postischämischen Gewebeschaden im terminalen Ileum ausübt. Die histomorphometrischen Parameter waren zwischen Epo-vorbehandelten Tieren und den Kontrollen im Wesentlichen vergleichbar. Auch die postischämische Epithel-Integrität konnte durch eine Epo-Prämedikation nicht verbessert werden (Tabelle 11).

Tabelle 11 : Histologische Daten

	Baseline	90 min
<i>Modif. Park Klassifikation</i>		
C57BL/6	0.28 ± 0.08	2.77 ± 0.48*
Epo 500	-	1.56 ± 0.65
Epo 5000	-	1.58 ± 0.78
<i>Villuslänge [µm]</i>		
C57BL/6	241 ± 14	205 ± 20
Epo 500	-	197 ± 17
Epo 5000	-	186 ± 30
<i>Kryptentiefe [µm]</i>		
C57BL/6	128 ± 2	126 ± 3
Epo 500	-	123 ± 3
Epo 5000	-	115 ± 3 #
<i>Dicke der Tunica mucosa [µm]</i>		
C57BL/6	369 ± 14	331 ± 19
Epo 500	-	320 ± 19
Epo 5000	-	300 ± 31

Fortsetzung nächste Seite

Tabelle 11 : Histologische Daten (*Fortsetzung*)

	Baseline	90 min
<i>Dicke der Tunica muscularis [μm]</i>		
C57BL/6	69 \pm 9	63 \pm 6
Epo 500	-	57 \pm 6
Epo 5000	-	44 \pm 8
<i>Relative Villuslänge</i>		
Im Bezug auf die Kryptenlänge [Faktor]		
C57BL/6	1.9 \pm 0.1	1.6 \pm 0.2
Epo 500	-	1.6 \pm 0.1
Epo 5000	-	1.6 \pm 0.3
Im Bezug auf die Mukosadiecke [%]		
C57BL/6	64.9 \pm 1.3	60.5 \pm 3
Epo 500	-	61.1 \pm 1.9
Epo 5000	-	58.4 \pm 6.5
Im Bezug auf die Dicke der Muskularis [Faktor]		
C57BL/6	4.3 \pm 0.6	3.6 \pm 0.7
Epo 500	-	3.8 \pm 0.6
Epo 5000	-	5.1 \pm 1.5
<i>Villusepithelintegrität [%]</i>		
C57BL/6	99.3 \pm 0.3	79.2 \pm 9.2 *
Epo 500	-	83.3 \pm 8.3
Epo 5000	-	72.1 \pm 15.2

*Formalin-fixierte Gewebeproben aus dem terminalen Ileum wurden mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt und der mukosale Gewebeschaden wurde mit einem modifizierten, an das Klassifizierungsschema nach Park [PARK et. al., 1990] angelehnten, semiquantitativen Score graduiert. Die direkte quantitative histomorphometrische Analyse wurde mittels eines Computer-unterstützten Software-Pakets {AxioVision[®] 3.1, Carl Zeiss, Jena, Deutschland} durchgeführt. Gewebeproben wurden bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei den mit Epo vorbehandelten C57BL/6-Tieren (Epo500, n=6; Epo5000, n=6) nach erfolgter intravitaler Fluoreszenzmikroskopie nach 90 Minuten Reperfusion entnommen. Baseline Messungen bei den Kontrolltieren entsprechen denen aus Tabelle 4. Werte sind Gruppenmittelwerte \pm Standardfehler (SEM); * $p < 0.05$ vs. Baseline; # $p < 0.05$ vs. C57BL/6*

4.3.2 Blutbild

Die Vorbehandlung mit Erythropoietin hatte keinen relevanten Einfluss auf das Blutbild (Tabelle 12). Nach 90 Minuten Reperfusion war insbesondere kein Anstieg des Hämoglobins oder der Zahl zirkulierender Erythrozyten zu verzeichnen. Die Zahl zirkulierender Leukozyten war nach Epo-Prämedikation vergleichbar mit der Kontrolle.

Tabelle 12 : Blutbild

	Baseline	90 min
<i>Leukozyten (WBC) [x10³/μl]</i>		
C57BL/6	5.07 ± 0.68	4.87 ± 0.64
Epo500	-	3.33 ± 0.63
Epo5000	-	5.83 ± 1.28
<i>Erythrozyten (RBC) [x10⁶/μl]</i>		
C57BL/6	7.46 ± 0.39	8.39 ± 0.34
Epo500	-	6.94 ± 0.56 #
Epo5000	-	7.40 ± 0.36
<i>Thrombozyten (PLT) [x10³/μl]</i>		
C57BL/6	474.93 ± 133.09	687.19 ± 182.90
Epo500	-	380.55 ± 140.40
Epo5000	-	729.73 ± 140.37
<i>Hämoglobin (Hgb) [g/dl]</i>		
C57BL/6	13.52 ± 1.09	14.62 ± 1.09
Epo500	-	11.87 ± 0.85
Epo5000	-	12.42 ± 0.70

Leukozytenkonzentration, Erythrozytenkonzentration, Thrombozytenkonzentration und Hämoglobin wurden bestimmt bei den Kontrolltieren (C57BL/6, n=8) und bei den mit Epo vorbehandelten C57BL/6-Tieren (Epo500, n=6; Epo5000, n=6). Die Blutentnahme erfolgte nach 90 Minuten Reperfusion und intravitaler Fluoreszenzmikroskopie; bei den Baselinetieren (C57BL/6, n=9) nach IVM. Werte sind Gruppenmittelwerte ± Standardfehler (SEM); # p<0.05 vs. C57BL/6.

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die vorliegende Studie untersucht den mesenterialen I/R-Schaden im terminalen Ileum im Mausmodell. Mittels IVM, histologischen und laborchemischen Techniken wurde die Mikrozirkulation des terminalen Ileums, sowie der Ischämie-assoziierte Gewebeschaden im terminalen Ileum und auch in der Leber und der Lunge analysiert.

Die Daten zeigen, dass eine präexistente generalisierte Atherosklerose und Hyperlipidämie den I/R-Schaden im terminalen Ileum verstärken, und zudem auch den assoziierten Schaden in der nachgeschalteten Leber und der Lunge aggravieren. Hierbei scheint insbesondere eine vermehrte Rekrutierung von Leukozyten, vor allem im terminalen Ileum und in der Lunge, eine wichtige Rolle zu spielen.

Zusätzliche Versuche wurden durchgeführt, um die gewebeprotectiven Effekte von Erythropoietin im Rahmen des mesenterialen I/R-Schadens zu untersuchen. Hierbei zeigte sich, dass Epo tendenziell eine Perfusionsverbesserung der postischämischen intestinalen Mikrozirkulation und eine Reduktion der postischämisch intestinalen Leukozyten-Rekrutierung bewirken kann. Allerdings zeigt sich keine deutliche Verbesserung des histologisch detektierbaren postischämischen Gewebeschadens.

5. Diskussion

5.1 Diskussion des experimentellen Modells

Für die Untersuchung des mesenterialen I/R-Schadens wurde in der vorliegenden Studie ein Mausmodell mit 30 Minuten Ischämie und anschließender 90-minütiger Reperfusion gewählt. Die zu Anfangs veranschlagte Ischämiezeit von 45 Minuten und anschließender Reperfusion von 90 Minuten wurde aufgrund hoher Letalität der Versuchstiere, und somit auch aus Gründen des Tierschutzes, nicht weiter verfolgt. Die Präparation der Versuchstiere wurde geringgradig modifiziert zu der bereits von Szabo und Mitarbeitern ebenfalls an einem 30/90-Modell beschriebenen Methode durchgeführt [SZABO et al., 2008]. Auch in anderen I/R-Modellen wurde mit diesen Ischämie- und Reperusionszeiten gearbeitet [HORIE et al., 1996; SZABO et al., 2006; SHI et al., 2009]. Speziell die in allen Versuchsgruppen histologisch gefundene Verkürzung der Darmzotten nach 90 Minuten Reperfusion und die damit verbundene Reduktion der Mukosadicke respektive der Villusepithelintegrität implizieren einen relevanten I/R-Schaden und sprechen somit für ein valides Versuchsmodell.

Ferner handelt es sich hierbei um ein so genanntes „Akut-Modell“. Das bedeutet, dass die intravitalmikroskopische Untersuchung der Mikrozirkulation nur über einen kurzen Zeitraum von Stunden und in Narkose durchgeführt wird. Akut-Modelle sind bekanntermaßen mit Nachteilen, bedingt vor allem durch die erforderliche Anästhesie und das induzierte Trauma infolge der mikrochirurgischen Präparation, behaftet [YAMAUCHI et al., 1999]. Die Untersuchung hämodynamischer Parameter an einem nicht transilluminierbaren Organ wie zum Beispiel dem Darmkonvolut stellt sich daher gegenüber z.B. dem Studium der Mikrozirkulation der Haut am Ohr haarloser Mäuse [BARKER et al., 1989; VOLLMAR et al., 2000] deutlich erschwert dar, da eine chirurgische Präparation hierbei unumgänglich ist. Nichts desto trotz ist die intravitalmikroskopische Erfassung mikrozirkulatorischer Parameter des Darmes von peritonealer, und speziell natürlich von luminaler Seite, nicht ohne vorsichtige mikrochirurgische Präparation zu realisieren.

Die ApoE-defiziente Maus entwickelt unter Cholesterindiät und aufgrund der durch den Gendefekt bedingten Fettstoffwechselstörung den Phänotyp einer

generalisierten Atherosklerose und begleitender Hyperlipidämie [WASSMANN et al., 2004]. In der vorliegenden Studie wurde dieser pathophysiologische Phänotyp der ApoE-defizienten Maus mit dem gesunden der C7BL/6 Kontrollmaus, der gleichzeitig den genetischen Hintergrund der Mutation darstellt, verglichen. Auf die Analyse von auf Cholesterindiät gesetzten C57BL/6 Mäusen wurde verzichtet, da nicht die isolierte Beurteilung des ApoE-Gendefektes Gegenstand der Studie war, sondern der Vergleich des phänotypisch gesunden Organismus und dem der generalisierten Atherosklerose und Hyperlipidämie. Eine interessante Erkenntnis der vorliegenden Studie ist, dass die Anzahl rollender Leukozyten („Roler“) in den postkapillären Venolen der Längsmuskelschicht in der Baselinegruppe der ApoE^{-/-}-Tiere bereits fast doppelt so hoch war wie in der Kontrollgruppe. Die Anzahl fest adhärenter Leukozyten („Sticker“) war dagegen zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen vergleichbar. Diese Daten belegen einen gewissen Grad einer generalisierten endothelialen Zellaktivierung und endothelialen Dysfunktion durch die präexistente Hypercholesterinämie in den ApoE-defizienten Mäusen. Deshalb repräsentieren mit einer hoch kalorischen Diät gefütterte ApoE^{-/-}-Mäuse ein probates experimentelles Versuchsmodell für Studien der generalisierten Atherosklerose mit konsekutiver endothelialer Dysfunktion.

5.2 Diskussion der Untersuchungstechniken

Als Untersuchungstechnik zur in vivo-Visualisierung der Mikrozirkulation des Darmrohres wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie gewählt. Sie stellt eine direkte Analysemethode dar und bietet die Möglichkeit, einzelne Segmente der Mikrozirkulation, wie Arteriolen, Kapillaren, postkapilläre Venolen und teilweise auch das Lymphgefäßnetzwerk des Darmes getrennt voneinander zu analysieren. In Kombination mit der Aufzeichnung der mikroskopierten Sequenzen auf Videobänder und anschließender quantitativer Analyse der Mikrohämodynamik quasi „offline“ konnte das detaillierte Studium der Mikrozirkulation per se entscheidend verbessert werden [INTAGLIETTA und TOMPKINS, 1972]. Darüber hinaus ermöglicht die intravenöse Gabe von Fluoreszenzfarbstoffen die Beurteilung der Mikrozirkulation nicht transilluminierbarer Organe. So wurde mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie bereits die Mikrohämodynamik von Hirn, Herz, Leber, Lunge, Milz, Pankreas, Muskel und Knochen quantifiziert [Wahl

et al., 1985; Winet, 1989; Schmidt et al., 1990; Menger et al., 1992; Vollmar et al., 1995; Menger et al., 1996; Kuebler et al., 1997; Vollmar et al., 1998]. Der Vorteil der intravitalen Mikroskopie gegenüber indirekten Untersuchungstechniken konnte in einer vergleichenden Studie am Beispiel der Laser-Doppler-Flowmetrie nachgewiesen werden. Dabei wurde gezeigt, dass die Laser-Doppler-Flowmetrie nicht die nutritive Mikrozirkulation selektiv erfassen kann, sondern lediglich über den gesamten Flux von Erythrozyten in einem definierten Gewebeareal Auskunft gibt [MENGER et al., 1992]. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie bietet weiter den Vorteil, dass sie nahezu in allen Geweben und Organen oder Organabschnitten der Maus, soweit sie für die Mikroskopie bei intaktem und ungestörtem Blutfluss vorlagerbar und präparierbar sind, angewendet werden kann. Hier offenbart sich aber auch eine mögliche Fehlerquelle bei der intravitalen Mikroskopie des Darmrohres in der dieser Arbeit zu Grunde liegenden Versuchsanordnung. Bei der Exenteration und dem „Aufschwimmenlassen“ des Deckgläschens auf einem dünnen Flüssigkeitsfilm warmer physiologischer Kochsalzlösung muss mit absoluter Vorsicht und viel Feingefühl vorgegangen werden, um nicht durch die Stieltupfer oder ähnliches Parameter wie z.B. die funktionelle Kapillardichte zu verfälschen. Es wurde vor allem tunlichst vermieden, die Darmschlinge bei der Auslagerung in einem Areal zu fassen, das später unter dem Deckgläschen zur Mikroskopie zu liegen kam, um Quetschartefakte vor allem bei der Leukozytenzahl und der Blutflussgeschwindigkeit zu vermeiden.

Auch bei der Entnahme und der mikroskopischen Analyse histologischer Gewebeproben muss bedacht werden, dass speziell das Darmsegment für die Histologie sich, auch auf Grund der beengten anatomischen Verhältnisse, unmittelbar dem Segment für die vorausgegangene intravitale Fluoreszenzmikroskopie anschließt. Es war also ebenfalls für die Zeit der IVM ausgelagert und wie im Kapitel Material und Methoden beschrieben präpariert. Prinzipiell wären hierbei manipulative Faktoren denkbar, die unter Umständen die Aussagefähigkeit histologischer Befunde relativierten. Durch die bereits mehrmals erwähnte extrem vorsichtige Präparation, das Feuchthalten des vorgelagerten Darmsegmentes mit physiologischer Kochsalzlösung und durch die Tatsache, dass bei allen Probanden gleichermaßen verfahren wurde, kann diese Fehlerquelle aber vernachlässigt werden. Einer möglichen subjektiven Einschätzung des histologisch-mukosalen Schadens, speziell bei der

Klassifizierung nach dem modifizierten Park-Score, wurde durch eine verblindete Untersuchungsreihenfolge und die mikroskopische Analyse durch zwei getrennt arbeitende Untersucher entgegengesteuert.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Die Bedeutung einer generalisierten Atherosklerose beim mesenterialen I/R-Schaden

Das Apolipoprotein-E (ApoE) spielt eine herausragende Rolle im Cholesterin-Metabolismus. Es vermittelt die Bindung und anschließende zelluläre Aufnahme einiger Lipoproteine über Rezeptoren der LDL-Rezeptorfamilie [KOLOVOU et al., 2003; HEEREN et al., 2006]. Die in dieser Studie verwendeten transgenen ApoE-defizienten (ApoE^{-/-}) Mäuse entwickeln eine schwere Hypercholesterinämie infolge verminderter Clearance von großen atherogenen Partikeln aus dem Blutstrom [NAKASHIMA et al., 1994]. Diese Tiere neigen dazu, atherosklerotische Läsionen im arteriellen Gefäßbaum zu entwickeln. Dabei kann die Atherogenese durch Verabreichung einer fettreichen, hochkalorischen Diät beschleunigt werden [NAKASHIMA et al., 1994; WASSMANN et al., 2004]. Verglichen mit Wildtyp-Mäusen zeigen diese ApoE^{-/-}-Tiere ein drastisch erhöhtes Körpergewicht bei gleichem Lebensalter und charakteristische Plaques in den großen Arterien [NAKASHIMA et al., 1994], was sich auch in dieser Studie bestätigte [Abbildung 11, Ergebnissteil].

Die Atherogenese ist ein entzündlicher Prozess (siehe auch Kapitel 2.4.3) [LIBBY, 2000; REINER und TEDESCHI-REINER, 2001; YUONG et al., 2002]. Im Gegensatz zu der vielfältig untersuchten zugrunde liegenden Pathophysiologie der Atherosklerose, ist wenig darüber bekannt, ob eine prävalente, klinisch aber noch nicht manifeste Atherosklerose und die mit ihr assoziierte endotheliale Dysfunktion, möglicherweise Auswirkungen auf die Gewebhomeostase bei Krankheiten anderer Genese hat. Unter Berücksichtigung des bereits erwähnten demographischen Wandels und der daraus resultierenden wachsenden Notwendigkeit der Behandlung immer älter werdender Patienten, ist solch eine Erkenntnis von immens hoher Bedeutung. Atherosklerose repräsentiert eine der

wichtigsten Co-Morbiditäten älterer Patienten und ist bei weitem kein exklusives Problem herznaher Gefäße [CIMMINIELLO, 2002].

Gegenstand dieser Studie war im Wesentlichen die Untersuchung der mesenterialen Mikrozirkulation. In den Mikrogefäßen formieren sich typischerweise keine manifesten Atherome. Diese kommen in der Regel nur in mittel-großen und großen Arterien vom muskulären und vom elastischen Typ vor [LEHR und MESSMER, 1996]. Atherosklerotische vaskuläre Erkrankungen breiten sich trotzdem auch in die Stromgebiete der Mikrozirkulation aus, erscheinen hier aber eher als funktionelle Beeinträchtigung denn als morphologisch fassbare Alteration [BUSSE und FLEMING, 1996; LEHR und MESSMER, 1996]. In diesem Zusammenhang präsentierten sich die Arteriolen der Längsmuskelschicht des Darms in den Baselinegruppen von atherosklerotischen Mäusen und Kontrolltieren morphologisch nahezu identisch. Die intravitalmikroskopisch erhobenen Daten lassen aber auf eine funktionelle Beeinträchtigung der arteriellen intestinalen Mikrozirkulation bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren schließen (Hyperlipidämie-induzierte endotheliale Dysfunktion). So zeigte sich bei den Kontrolltieren nach 30 Minuten Reperfusion eine vorübergehende (reaktive) arterioläre Vasorelaxation, welche bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen nicht gefunden wurde.

Unter Baseline-Bedingungen war in den postkapillären Venolen der Längsmuskelschicht der atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tiere die Anzahl rollender Leukozyten fast doppelt so hoch wie in der Kontrollgruppe. Die Anzahl fest adhärenter Leukozyten war im Gegenzug zu diesem Zeitpunkt in beiden Gruppen vergleichbar. Weiterführende Untersuchungen müssen zeigen, was der zugrunde liegende molekulare Prozess, der fehlenden reaktiven arteriolären Vasorelaxation in den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren ist. Möglicherweise liegt es an einem Zusammenbruch von Stickstoffmonoxyd (NO)-abhängigen Signaltransduktionswegen. NO wirkt auf Leukozyten antiadhäsiv [KANWAR und KUBES, 1995]. Des Weiteren konnte bereits gezeigt werden, dass eine Hypercholesterinämie eine NO-getriggerte, reaktive hyperämische Vasodilatation hemmt [BUSSE und FLEMING, 1996; VAN TEEFFELN et al., 2005]. So könnte auch erklärt werden, warum unter Baseline-Bedingungen bei einer fast doppelt so hohen Anzahl von „Rolern“ bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren doch nicht mehr Leukozyten eine feste Adhäsion mit dem Endothel postkapillärer Venolen eingehen als bei den

Kontrolltieren. Überdies korreliert im Mesenterium die postkapilläre venoläre Leukozytenadhäsion negativ mit der NO-Konzentration gepaarter Arteriolen [NELLORE und HARRIS, 2002]. All diese Ergebnisse sind Anzeichen für eine verstärkte endotheliale Dysfunktion und verminderte Vasoreaktionsfähigkeit im Gefäßsystem der atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäuse.

Die Leukozytenrekrutierung ist ein pathophysiologischer Aspekt beim Ischämie/Reperfusionsschaden [GRANGER, 1999; MENGER und VOLLMAR, 2000; LIBBY, 2002]. Es wird angenommen, dass der Umfang der postischämischen Leukozytenreaktion dabei mit dem Grad des Gewebeschadens korreliert [KURTEL et al., 1991; FRANGOIANNIS et al., 2002]. Ein aggressives Entzündungsgeschehen kann dabei zu einem Verlust der strukturellen und funktionellen Gewebeintegrität führen.

Die erhobenen Daten in dieser Studie zeigen, dass die postischämische leukozytäre Antwort und der resultierende Gewebeschaden bei den atherosklerotischen Tieren weitaus stärker ausgeprägt waren als bei den Kontrolltieren. Es interagierten wesentlich mehr Leukozyten mit dem postkapillären venolären Endothel, und der histologisch beobachtete Verlust von Mukosagewebe, hauptsächlich bedingt durch das Einkürzen der Villi, war bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren ebenfalls signifikant höher. Diese hatten nach 30 Minuten Ischämie und 90 Minuten Reperfusionzeit somit einen wesentlich deutlicher ausgeprägten Schaden der Darmschleimhaut als die Kontrolltiere. Die Tatsache, dass sich nicht nur die Zahl der Roter sondern auch die der Sticker merklich erhöhte, belegt, dass es sich bei dieser postischämischen, leukozytären Antwort um eine spezifische Entzündungsreaktion auf den Insult der mesenterialen Ischämie/Reperfusion handelt und nicht etwa nur durch einen gewissen Grad an endothelialer Zellaktivierung in den atherosklerotischen Tieren ausgelöst wurde. So bestätigt diese Studie frühere Ergebnisse, dass eine Hypercholesterinämie respektive eine präexistente Atherosklerose die Leukozytenantwort in postkapillären Venolen in der Reperusionsphase nach mesenterialer Ischämie verstärken kann [KUROSE et al., 1997; KUROSE et al., 1998]. Die Daten lassen aber des weitern den Schluss zu, dass vaskuläre atherosklerotische Veränderungen auch histomorphologische postischämische intestinale Gewebeschäden verschlimmern können.

Eine Vielzahl Studien dokumentieren, dass postkapilläre Venolen die primären Orte der postischämischen Leukozytenrekrutierung in der Reperfusionphase von vormals ischämischem Gewebe sind [CARLOS und HARLAN, 1994; GRANGER, 1999; MENGER und VOLLMAR, 2000; SCHRAMM et al.; 2007]. Das bestätigen auch die in dieser Arbeit erhobenen Daten. Die Tatsache, dass das Baseline-Rolling und die postischämische Leukozyten-Rekrutierung in Venolen bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen verstärkt auftrat, kann als Anlass genommen werden, die Atherosklerose nicht als eine alleinig arteriell-vaskuläre Erkrankung zu sehen. Unter bestimmten Umständen vermag es die Atherosklerose jenseits des arteriellen Gefäßnetzes zirkulatorische Dysfunktionen zu triggern [BUSSE und FLEMING, 1996; LEHR und MESSMER, 1996].

Die Mechanismen, die dieser exzessiven, venolären Leukozyten-Rekrutierung zugrunde liegen, sind möglicherweise das Resultat von, durch Atherosklerose und Hypercholesterinämie gestörten, NO-abhängigen Signaltransduktionswegen, denn Stickstoffmonoxid stellt primär eigentlich ein antiadhäsives Signal für Leukozyten dar [KANWAR und KUBES, 1995]. Diese verminderte NO-abhängige Signaltransduktion kann primär die beobachtete Leukozytenreaktion triggern, eine exzessive leukozytäre Rekrutierung könnte aber genauso der Grund sein für sekundär verminderte NO-abhängige Signale. Es konnte nämlich gezeigt werden, dass in reperfundierter Skelettmuskulatur eine Inhibition venolärer leukozytärer Adhäsion auch die Vasokonstriktion der die Venolen begleitenden Arteriolen verhindert [ZAMBONI et al., 1993]. Des Weiteren wurde in mesenterialen Studien bei Ratten gezeigt, dass während einer Hypercholesterinämie die venoläre Leukozytensequestration mit einer verminderten NO-abhängigen Vasodilatation benachbarter Arteriolen korreliert [KIM et al.; 2007 a und b]. Nellore und Harris fanden eine signifikant negative Korrelation zwischen venolärer Leukozytenadhäsion und der NO-Konzentration benachbarter mesenterialer Arteriolen bei hypercholesterinämischen Ratten [NELLORE und HARRIS, 2002]. Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten könnten somit den Schluss erlauben, dass eine generalisierte Atherosklerose und Hyperlipidämie die venoläre Leukozytensequestration in der postischämischen mesenterialen Mikrozirkulation verstärkt, was in der Folge zu sekundärem Neutrophilen-mediertem Verlust von NO und reaktiver Vasorelaxation in benachbarten Arteriolen führt.

In aktuellen Studien wird ferner angenommen, dass Thrombozyten und eine durch Thrombozyten regulierte Produktion reaktiver Sauerstoffspezies eine bedeutende Rolle bei der durch Hypercholesterinämie induzierten Leukozytenrekrutierung und arteriolären Dysfunktion spielen [STOKES et al., 2006; TAILOR et al., 2007]. Dies konnte in der vorliegenden Studie nicht bestätigt werden. Es waren in der intestinalen Mikrozirkulation weder bei Kontrolltieren noch bei den Mutanten, weder in den Baselinegruppen noch während der Reperfusion größere Mengen Thrombozyten oder gar Thrombozytenaggregate während der Observationszeit zu detektieren.

Durch einen mesenterialen I/R-Schaden werden Organe wie Leber und Lunge, deren Vaskularisierung in Reihe zur intestinalen Zirkulation geschaltet ist, nachfolgend negativ affektiert [HORIE und ISHII, 2001]. Es scheint eine logische Konsequenz zu sein, dass die Schwere der Schädigung nachgeschalteter Organe positiv mit dem Grad des mesenterialen I/R-Schadens korreliert. Aus dem reperfundierten Darm stammende Toxine, aktivierte Zellen und deren Mediatoren etc. sind verantwortlich für eine sich konsekutiv vergrößernde Schädigung so genannter „flussabwärts“ (downstream) lokalisierter Organe. Damit übereinstimmend deuten die in dieser Arbeit erhobenen Daten eine heftigere Affektion von Leber und Lunge bei den atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Tieren an, welche auch bereits einen größeren mesenterialen I/R-Schaden hatten. Darüber hinaus wurde bereits gezeigt, dass NO-Donatoren und diverse therapeutische Strategien zum Schutz des Darmkonvolutes vor einem I/R-Schaden, Folgeschäden in Leber und Lunge abschwächen können [HORIE und ISHII, 2001].

Ein Verschluss der Arteria mesenterica superior führt zu einem verminderten portalen Blutfluss. Dieser verminderte Blutfluss in der Pfortader wird zumindest teilweise durch eine Steigerung des Blutflusses in der Arteria hepatica ausgeglichen [HORIE et al., 1996 und 1997]. Dieses Phänomen wird als „hepatic arterial buffer response (HABR)“ bezeichnet. Es ist denkbar, dass eine generalisierte Atherosklerose durch die Affektion der Arteria hepatica per se die HABR hemmen und so die Leber schädigen kann [FERRE et al., 2009]. Bezogen auf die Experimente dieser Studie würde dies also bedeuten, dass die Leber infolge mesenterialer Ischämie nicht alleine aufgrund der In-Reihe-Schaltung des hepatischen Gefäßnetzes, sondern zusätzlich durch eine defiziente HABR geschädigt wurde. Ob und wie eine Hypercholesterinämie respektive eine

generalisierte Atherosklerose die Vasoregulationsmechanismen der Arteria hepatica negativ beeinflussen und somit direkt die Anfälligkeit der Leber für einen Konsekutivschaden nach mesenterialer Ischämie erhöht, bleibt Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Im Gegensatz zur Leber führt eine Okklusion der Mesenterialarterie nicht zu einem erniedrigten Blutdruck in der Arteria pulmonalis und einem verminderten Herzzeitvolumen [CRUZ et al., 2009]. Offensichtlich ist der nutritive Kreislauf der Lunge nicht sehr stark angewiesen auf ihre sog. Vasa privatae, was sich an der Tatsache zeigt, dass erfolgreiche Lungentransplantationen nicht nötigerweise einer Revaskularisierung der Bronchialarterien bedürfen. Die nutritive Versorgung des Lungengewebes geschieht hierbei über den Kollateralfluss der Pulmonalarterien mit sauerstoffarmem Blut. Es gibt aber dennoch Hinweise, dass eine Revaskularisierung der Bronchialarterien im Zuge einer Lungentransplantation das Peribronchialgewebe in der Frühphase der Reperfusion vor Hypoxie schützt [KAMLER et al., 2004]. Es ist nichts darüber bekannt, ob es einen verstärkten Blutfluss in den Bronchialarterien beim mesenterialen I/R-Schaden gibt. Möglicherweise gehören zu den Mechanismen, durch die eine generalisierte Atherosklerose direkt die Anfälligkeit nachgeschalteter Organe im Zuge eines mesenterialen I/R-Schadens erhöht, lokale Dysfunktionen von Endothelien genau so wie eine Erhöhung des oxidativen Stresses und die Zytokinexpression [DESAI et al., 2008; FERRÉ et al., 2009]. Für diese Annahme spricht die in der vorliegenden Arbeit nach 90 Minuten Reperfusion signifikant höhere Myeloperoxidase-Konzentration im Lungengewebe der atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäuse, welche auf eine verstärkte Infiltration neutrophiler Granulozyten in dieses Organ hinweist.

5.3.2 Die Bedeutung von Erythropoietin beim mesenterialen I/R-Schaden

Als Zeitpunkt der Epo-Injektion wurde das Zeitintervall von zwei Stunden vor Induktion der temporären Ischämie gewählt. Juul und Mitarbeiter fanden heraus, dass die Behandlung von Epithelzellen des Dünndarms von Ratten mit Epo das Auftreten von Cytokin-induzierter Apoptose abschwächte, und gleichzeitig sich die Zellmigrationsrate steigerte. Dabei war es egal, ob das Epo vor oder zeitgleich zur Noxe verabreicht wurde. Sie fanden weiter, dass Epo-Rezeptoren

bereits postnatal im Dünndarm von Ratten und Menschen exprimiert wurden. Daraus leiten sie die Vermutung ab, dass das in humaner Muttermilch vorhandene Epo (positive) Auswirkungen auf die intestinale Funktion von Säuglingen hat [JUUL et al., 1999]. In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass Epo bei der Entwicklung des Dünndarmes von neonatalen Ratten trophische Funktionen besitzt. Bei täglicher Verabreichung von Epo über mindestens eine Woche wiesen die Versuchstiere gegenüber einer Kontrollgruppe einen längeren Dünndarm (bezogen auf das Körpergewicht) auf und die absorptive Oberfläche des Mikrovillisaumes vergrößerte sich ebenfalls; Letzteres vornehmlich begründet durch eine Zunahme der Villuslänge. Dabei machte es keinen Unterschied, ob das Erythropoietin enteral oder parenteral verabreicht wurde [JUUL et al., 2001]. Bei enteraler Applikation wurde aber kein erythropoetischer Effekt festgestellt, was auf eine fehlende Absorption oder evtl. auf eine Absorption von einer funktionell inaktiven EPO-Form schließen lässt. In der vorliegenden Arbeit konnte weder eine Verlängerung der Villi noch eine Steigerung der Erythrozytenzahl in den vorbehandelten Versuchstieren gefunden werden, was aber nach einer Wirkdauer von nur 2 Stunden auch nicht zu erwarten war (Akutmodell!). Generell zeichnet sich in diversen experimentellen Modellen ab, dass das therapeutische Zeitfenster für eine Gewebeprotektion durch Erythropoietin sehr weit zu sein scheint. Es werden positive Effekte bei einer Verabreichung vor, während oder nach einem Insult gesehen, was die Hoffnung auf ein hohes klinisches Potential des antiinflammatorisch wirkenden Cytokins Erythropoietin schürt [BRINES und CERAMI, 2006].

Nach anfänglich fast ausschließlicher Betrachtung der Funktion des Hormons Erythropoietin als Wachstumsfaktor für die Erythropoese, rücken in letzter Zeit eher die biologischen Effekte des Cytokins Epo in nicht-hämatopoetischen Geweben in den Mittelpunkt des Interesses, vor allem bei der Erforschung pleiotroper Substanzen im Zuge der Gewebeprotektion nach einem Ischämie-/Reperfusionsschaden [BRINES und CERAMI, 2006; MENGER und VOLLMAR, 2007; ARCASOY 2008]. Dabei scheinen die antiinflammatorischen Effekte des Erythropoietins dosisabhängig zu sein. Sorg und Mitarbeiter konnten zeigen, dass eine singular verabreichte hohe Dosis Epo die Wundheilung der Haut im Kammermodell der Maus beschleunigt [SORG et al.; 2009], besser als wiederholte Gaben niedriger Dosen Epo, und erst recht besser als die wiederholte

Verabreichung hoher Epo-Dosen. Letzterer Befund wird auf die hierbei stärker auftretende hämatopoetische Wirkung des Erythropoietins und damit verbundener Malperfusion durch den ansteigenden Hämatokrit zurückgeführt. Patel et al. fanden bei Reperfusion eine bessere Effektivität im renalen I/R-Modell der Maus bei täglicher Vorbehandlung mit 1000 IE Epo/kg KGW s.c. über 3 Tage als mit einem einmalig verabreichten Bolus Epo s.c. gleicher Dosierung. Sie vermuten unterschiedliche zu Grunde liegende Wirkmechanismen bei singulärer oder repetitiver Gabe [PATEL et al., 2004]. Die Erhöhung des systemischen Hämokrits beobachteten auch Harder und Mitarbeiter in ihrem ebenfalls chronischen Versuchsmodell bei der Verabreichung repetitiver hoher Dosen (5000 IE Epo/kg KGW i.p.) über 4 Tage. Bei Gabe von nur 500 IE Epo/kg KGW i.p. über ebenfalls 4 Tage trat dieser Effekt nicht auf und überdies zeigte sich letztere Dosierung effektiver beim Schutz von kritisch perfundiertem, ischämischem Muskelgewebe [HARDER et al., 2009].

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl eine Versuchsgruppe mit hoher (Epo5000-Gruppe) als auch eine mit niedriger (Epo500-Gruppe) singulärer Epo-Dosierung gewählt. Das hierbei verwendete Präparat wirkt prinzipiell hämatopoetisch, die erhobenen Daten belegen aber, dass im vorliegenden Akutmodell keine Erhöhung des Hämoglobingehaltes oder der Erythrozytenzahl (RBC) stattgefunden hat. Des Weiteren werden bei der Verabreichung von humanem rekombinantem Erythropoietin zur Erhöhung des Hämokrits primär über längere Zeit konstant hohe Epo-Plasmakonzentrationen benötigt. Stark schwankende Epo-Plasmalevel mit dafür hohen Amplituden sind weniger geeignet. Hierbei wird synthetischen oder teilsynthetischen Epo-Analoga mit langen Halbwertszeiten der Vorzug gegeben [ELLIOTT et al., 2008].

Es konnte bereits gezeigt werden, dass eine einmalige, präischämische Verabreichung von 5000 IE Epo/kg im Mausmodell signifikant eine I/R-induzierte kapilläre Malperfusion und leukozytäre Inflammation in quergestreifter Muskulatur senkt. Letzteres wurde vornehmlich durch eine reduzierte Anzahl sowohl rollender als auch fest adhärenter Leukozyten in postkapillären Venolen dokumentiert [CONTALDO et al., 2007]. In der vorliegenden Studie zeigt sich ebenfalls eine signifikante Erhöhung der funktionellen Kapillardichte gegenüber den unbehandelten Tieren sowohl der Kapillare der Längsmuskelschicht als auch der Zottenkapillare, allerdings nur bei den mit 500 IE Epo/kg vorbehandelten Mäusen.

Sowohl die Anzahl rollender als auch die Anzahl fest adhärenter Leukozyten blieb in beiden Versuchsgruppen bis zum Observationsende annähernd auf dem Baselinenniveau der Kontrolltiere, was eine positive Tendenz erkennen lässt, statistisch aber nicht signifikant war.

Schon während der humanen Embryonal- und Fötalphase findet die Erythropoietin-Synthese auch in nicht hämatopoetischem Gewebe statt, und auch der Epo-Rezeptor (EpoR) wird von den verschiedensten Zelltypen und in den verschiedensten Geweben exprimiert. Dazu gehören Endothelzellen, Muskelzellen (glatte, quergestreifte und Herzmuskelzellen), Makrophagen, Zellen des zentralen Nervensystems (speziell Glia- und Retinazellen), Zellen der Nebennierenrinde und des Nebennierenmarks, Uteruszellen sowie die Gonaden, Pankreas, Milz, Leber, Niere, Lunge und Dünndarm [JUUL et al., 1998; ERBAYRAKTAR et al., 2003]. Epo wirkt hierbei als Promotor für die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung, es fungiert chemotaktisch, proangiogenetisch und antiapoptotisch [SCHÖFFEL et al., 2008]. Die EpoR-Expression in nicht hämatopoetischen Geweben wird dabei durch lokal produziertes oder auch systemisch verabreichtes Erythropoietin aktiviert [RUNDQVIST et al., 2009]. Contaldo und Mitarbeiter konnten weiter zeigen, dass eine singuläre Epo-Prämedikation in quergestreifter Muskulatur bei einer Ischämiezeit von 3 Stunden nach 6 Stunden Reperfusion eine signifikante Expression des Epo-Rezeptors bewirkt [CONTALDO et al., 2007]. Weitere Untersuchungen müssen aufzeigen, wie hoch die EpoR-Dichte im Dünndarm gegenüber der quergestreiften Muskulatur per se ist, und ob und ab welcher Dosis das Phänomen der gesteigerten EpoR-Expression auch im terminalen Ileum beobachtet werden kann. Eine Verbesserung der Mikrozirkulation im terminalen Ileum nach Ischämie und Reperfusion und eine gewisse antiinflammatorische Wirkungsweise des Zytokins Erythropoietin kann nach den Ergebnissen dieser Studie angenommen werden.

In der Literatur finden sich Berichte über positive und trophische Funktionen von exogen zugeführtem Erythropoietin auf die Entwicklung der Darmschleimhaut, hauptsächlich durch die Vergrößerung der absorptiven Oberfläche respektive der Verlängerung der Mikrovilli [JUUL et al., 1999; JUUL et al., 2001]. Auch reduzierte sich im Tierversuch der Zellschaden nach Ischämie und Reperfusion bei über zwei Wochen täglich mit Epo i.p. behandelten Ratten signifikant gegenüber der Kontrollgruppe [KUMRAL et al., 2003]. Histologisch konnten in der hier vorgelegten

Studie keine dahingehenden Unterschiede, speziell der absoluten und relativen Villuslänge, gegenüber den Kontrolltieren gefunden werden. Denkbar wäre bei der Verfolgung speziell dieser Fragestellung ein Versuchsmodell mit längerer Ischämie- und/oder längerer Observationszeit.

Es bleibt damit zu vermuten, dass die in dieser Arbeit durchgeführte einmalige Applikation von 500 IE Epo/kg zwar eine Verbesserung der Mikroperfusion im Kapillarnetz der Längsmuskelschicht sowie der Zotten des terminalen Ileums bewirkt, histomorphologisch sich aber keine Unterschiede gegenüber unbehandelten Probanden zeigen. Eine Erhöhung des Epo-Bolus auf die 10-fache Dosis hatte keinen relevanten Effekt.

5.4 Zusammenfassende Beurteilung und Perspektiven

Das durchschnittliche Lebensalter, in dem Patienten einen operativen Eingriff benötigen, steigt immer mehr an. Dementsprechend erhöht sich auch die Anzahl an Co-Morbiditäten, wozu auch periphere arterielle Erkrankungen zählen [CHU et al., 2008; LIMMER et al., 2009]. Bei vielen Patienten verlaufen atherosklerotische Gefäßerkrankungen klinisch unauffällig. Nichts desto trotz bedingen arteriell-okklusive Erkrankungen oft gastrointestinale Affektionen, wie zum Beispiel nach cardiochirurgischen Eingriffen [MANGI et al., 2005; FILSOUFI et al., 2007]. Hinzu kommt, dass eine sich entwickelnde mesenteriale Ischämie oft schwer zu diagnostizieren ist. Obwohl es eine Vielzahl indikativer Parameter gibt [GHOSH et al., 2002; TROMPETER et al., 2002], kann sich eine mesenteriale Ischämie auch beim Vorhandensein klinisch uneindeutiger oder gar ohne Symptomatik entwickeln.

Die vorliegende Arbeit zeigt, dass ein mesenterialer Ischämie-/Reperfusionsschaden in atherosklerotischen ApoE^{-/-}-Mäusen nicht nur eine verstärkte leukozytäre Inflammation sondern auch einen histomorphologisch detektier- und quantifizierbaren höheren Mukosachaden im präterminalen Ileum hervorruft. Überdies lassen die erhobenen Daten den Schluss auf einen höheren „Konsekutivschaden“ in Leber und Lunge bei den Mutanten zu. Diese Ergebnisse lassen befürchten, dass es bei Patienten, egal ob in der Human- oder Veterinärmedizin, die eine Hypercholesterinämie respektive generalisierte

Atherosklerose aufweisen und für eine gewisse Zeit, zum Beispiel für die Dauer einer Operation, kreislaufsupprimiert sind, als Folge einer damit einhergehenden Mesenterialischämie vermehrt Darmbakterien durch die geschädigte Mukosabarriere translozieren und zu einer generalisierten Sepsis führen können. Wenn dann noch bereits Organe wie Leber und Lunge vorgeschädigt sind, kann solch ein Zustand für manchen Patienten höchst lebensgefährlich werden. Im Umkehrschluss ist daraus zu folgern, dass Patienten mit bekannter generalisierter Atherosklerose einem intensiveren perioperativen Monitoring unterzogen werden müssen. Liegen postoperativ Symptome einer beginnenden mesenterialen Ischämie vor, wird ein entschiedenes Intervenieren gefordert.

In einer Wohlstandsgesellschaft wie der unseren, in der Menschen immer stärker zu Übergewicht neigen und, was noch schlimmer ist, sie ihre Haustiere durch Unkenntnis oder auch teilweise ignorant-fahrlässiges bzw. fälschlicherweise vermenschlichtes Bedürfnisempfinden völlig falsch (fett) füttern, ist dieses Thema aktueller und brisanter denn je.

Die präischämische Verabreichung von 500 IE Epo/kg verbesserte im vorliegenden Versuchsmodell die Mikrozirkulation im terminalen Ileum ohne begleitenden hämatopoetischen Effekt. Ob eventuell eine vorgeschaltete singuläre Epo-Prämedikation in einem größeren zeitlichen Abstand, die Prämedikation atherosklerotischer ApoE^{-/-}-Mäuse mit Epo, eine höhere oder auch geringere Dosierung oder gar eine tägliche Epo-Gabe über mehrere Tage vor Induktion einer Mesenterialischämie, bzw. unterschiedliche Applikationsformen (vor allem s.c. vs. i.p.) protektiv für einen zu erwartenden I/R-Schaden ist oder möglicherweise das Outcome bei längerer Ischämie-/Reperfusionzeit erhöht, müssen weitere Untersuchungen klären – sicherlich nicht unter Außerachtlassung des Tierschutzes und möglicher Risiken solcher Untersuchungsprotokolle.

6. Anlagen**Anlage 1:****Haltungsdiät Ratte / Maus****ALTROMIN 1320****BESCHREIBUNG**

„Altromin Standarddiät“ steht für die standardisierte Ernährung der Labortiere

ALTROMIN 1320

- besitzt eine gleich bleibende Ernährungsformel
- wurde vorzugsweise entwickelt für die Haltung von Ratten und Mäusen ab einem Alter von 8 Wochen
- ermöglicht eine optimale Ernährung der Tiere

Merkmale und Vorteile:

- gleichbleibende Rezepturen & Inhaltsstoffigkeit
- Inhaltsstoffe und mögliche Kontaminanten werden systematisch kontrolliert
- umfassende Qualitätskontrolle und langjährige Dokumentation
- basierend auf definierten Standards, welche der Wissenschaft frei zur Verfügung stehen.
- konform mit den Empfehlungen der GV-Solas
- garantiert Wiederholbarkeit & Vergleichbarkeit

CHEMISCHE ZUSAMMENSETZUNG**%-Anteil in der Diät**

Nährstoffe		Mineralien	
Rohprotein	19.0	Calcium	0.9
Rohfett	4.0	Phosphor	0.7
Rohfaser	6.0	Magnesium	0.2
Asche	7.0	Natrium	0.2
Wasser	13.5	Kalium	1.0
N-freie Extrakte	50.5		

Umsetzbare Energie	kcal/kg 2850 MJ/kg 11.9
--------------------	----------------------------

Aminosäuren (%-Anteil)		Spurenelemente (ppm)	
Lysin	0.90	Mangan	75
Methionin	0.30	Eisen	180
Cystin	0.30	Kupfer	13
Phenylalanin	0.80	Zink	70
Tyrosin	0.60	Iod	0.9
Arginin	1.10		
Histidin	0.40		
Tryptophan	0.20		
Threonin	0.60		
Isoleucin	0.80		
Leucin	1.30		
Valin	0.90		

Verabreichung:

Altromin 1320 enthält alle notwendigen Nährstoffe zur Haltung von Ratten und Mäusen. Die Diät sollte ad libitum mit ausreichend frischem Wasser gegeben werden.

Futteraufnahme in g/Tag

	Wachstum Adult	
Ratte	15-20	15-30
Maus	4-5	5-7

Je nach genetischem Ursprung der Tiere kann die Futterresorption bzw. -aufnahme schwanken.

Achtung: kühle und trockne Lagerung, frei von Schädlingen und Insekten

ALTROMIN 1320 ist lieferbar in:

Mehlform:		1321
Pellets	10mm	1324
Pellets	16mm	1326
Extrudat	10mm	1329

Vitamin-Zusatz in 1kg Diät

	standard	fortified
Vitamin A	15000 UI	25000 UI
Vitamin D ₃	600 UI	1000 UI
Vitamin E	75 mg	125 mg
Vitamin K ₃	3 mg	5 mg
Vitamin B ₁	18 mg	30 mg
Vitamin B ₂	12 mg	20 mg
Vitamin B ₆	9 mg	15 mg
Vitamin B ₁₂	24 µg	40 µg
Niacin	36 mg	60 mg
Pantothensäure	21 mg	35 mg
Folsäure	2 mg	3 mg
Biotin	60 µg	100 µg
Cholin	600 mg	1000 mg
Ascorbinsäure	36 mg	60 mg

Anlage 2:

ssniff® R/M-H

Alleinfuttermittel für die Haltung von Ratten und Mäusen

**Beschreibung**

Dieses Futtermittel ist für Ratten und Mäuse im Erhaltungsstoffwechsel vorgesehen. Aufgrund der ausgewogenen Nährstoffkonzentrationen bei mittlerer Energiedichte und niedrigem Nitrosamin-Gehalt ist es auch als Basisfutter für Langzeitstudien gut geeignet.

Rohnährstoffe	[%]
Trockensubstanz	87,7
Rohprotein (N x 6,25)	19,0
Rohfett	3,3
Rohfaser	4,9
Rohasche	6,4
N-freie Extraktstoffe	54,1
Stärke	36,5
Zucker	4,7

Energie	[MJ/kg]
Bruttoenergie (GE)	16,3
Umsetzbare Energie (ME) *	12,8



Mineralstoffe	[%]	Aminosäuren	[%]	Vitamine	per kg
Calcium	1,00	Lysin	1,00	Vitamin A	15.000 IE
Phosphor	0,70	Methionin	0,30	Vitamin D ₃	1.000 IE
Natrium	0,24	Met+Cys	0,65	Vitamin E	110 mg
Magnesium	0,22	Threonin	0,68	Vitamin K (als Menadion)	5 mg
Kalium	0,91	Tryptophan	0,25	Thiamin (B ₁)	18 mg
		Arginin	1,14	Riboflavin (B ₂)	23 mg
Fettsäuren	[%]	Histidin	0,44	Pyridoxin (B ₆)	21 mg
C 14:0	0,01	Valin	0,88	Cobalamin (B ₁₂)	100 µg
C 16:0	0,47	Isoleucin	0,76	Nicotinsäure	135 mg
C 16:1	0,01	Leucin	1,30	Pantothensäure	43 mg
C 18:0	0,08	Phenylalanin	0,85	Folsäure	7 mg
C 18:1	0,62	Phe+Tyr	1,43	Biotin	525 µg
C 18:2	1,80	Glycin	0,80	Cholin-Cl	2.990 mg
C 18:3	0,23	Glutaminsäure	3,90	Inositol	100 mg
C 20:0	0,01	Asparaginsäure	1,61		
C 20:1	0,02	Prolin	1,25	Spurenelemente	per kg
C 20:5	----	Alanin	0,79	Eisen	179 mg
C 22:6	----	Serin	0,89	Mangan	69 mg
				Zink	94 mg
				Kupfer	16 mg
				Iod	2,2 mg
				Selen	0,3 mg
				Cobalt	2,1 mg

Futterzusammensetzung

absteigende Reihenfolge der Gruppen (FMV)

Getreide und Getreidenebenprodukte, Ölsaatenprodukte, Mineralstoffe, pflanzliche Öle, Vitamine, Spurenelemente.

* ME berechnet nach der Schätzformel für Schweine, Anlage 4 der Futtermittelverordnung

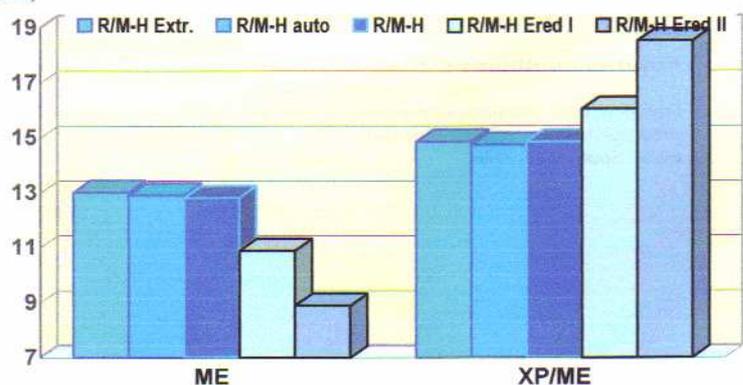
Hauptprodukte

V1530-0 Mehl, einfach vermahlen
V1534-0 10 mm Pellets
V1535-0 15 mm Pellets

Produktion und Vertrieb

ssniff Spezialdiäten GmbH
Phone: +49-(0)2921-9658-0
Fax: +49-(0)2921-9658-40
E-Mail mail@ssniff.de
www.ssniff.de

Energiedichte [MJ ME/kg] und Protein-/Energie-Verhältnis [g XP/MJ ME]



Anlage 3:**Intravitale Mikroskopie des Dünndarms**

Datum:

Behandlung/Tierstamm:

Nummer:

Mesenterial:1. Übersichtsaufnahmen des ausgelagerten Darms im **10x** Objektiv / **FITC-Filter****+ Rhodamin-Filter** (jeweils ca. 15 Sekunden)a) Arterio-Venuläres Bündel b) Kapillarebene 2. Aufnahmen im **20x** Objektiv / **FITC-Filter (ca. 15s) + Rhodamin-Filter (ca. 30s)**a) Kapillaren b) Venolen c) Arteriolen 3.) Aufnahmen **50x** Objektiv / **FITC-Filter (ca. 15s) + Rhodmain-Filter (ca. 30s)**d) Venolen e) Kapillaren f) Arteriolen 4.) Übersichtsaufnahmen des ausgelagerten Darms im **10x** Objektiv / **FITC-Filter**zur Darstellung des Lymphgefäß-Netzwerkes

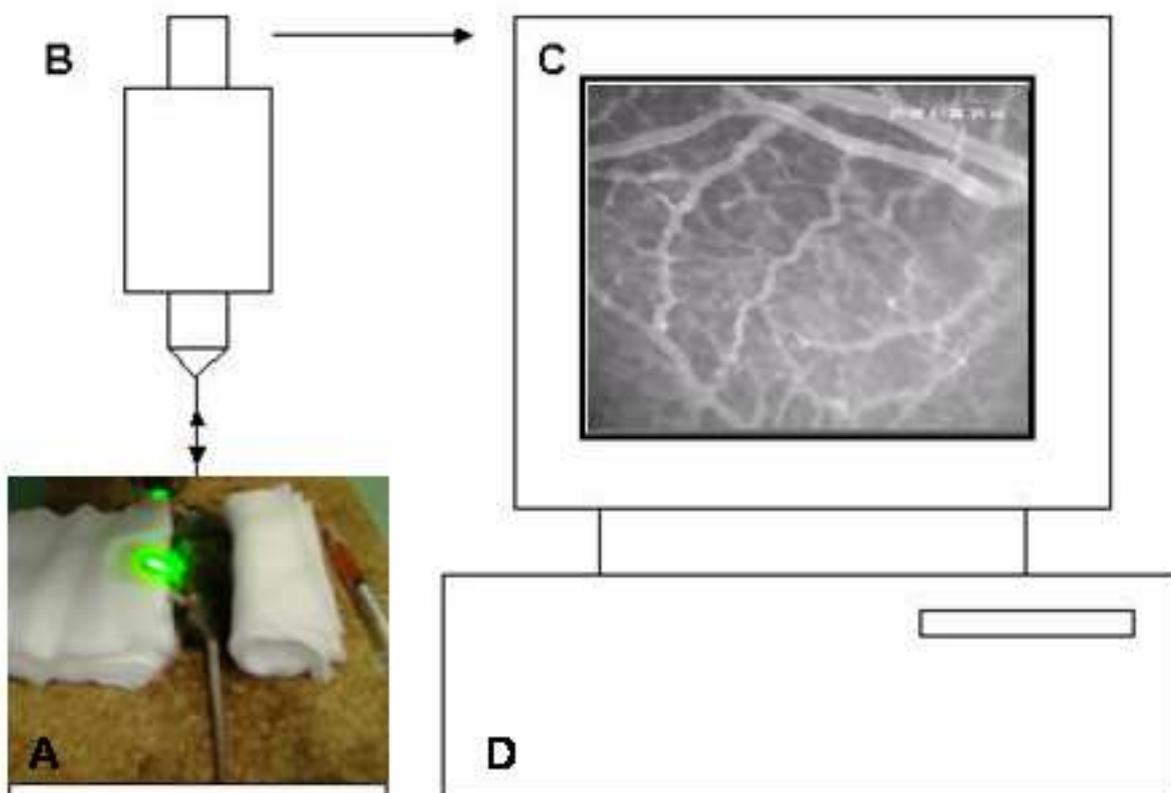
jeweils ca. 10 Sekunden

5.) Aufnahmen von Lymphgefäßen (**20x** o.) **50x** Objektiv / **FITC-Filter** o.**Rhodamin-** Filter zur Darstellung des zellulären Flusses

jeweils ca. 10 - 20 Sekunden

Anlage 4:

IVM-Schema:



7. Literaturverzeichnis

Allen KB, Salam AA, Lumsden AB. *Acute mesenteric ischemia after cardiopulmonary bypass.* J Vasc Surg. 1992; **16**, 391-5.

American Gastroenterological Association Medical Position Statement: *Guidelines on intestinal ischemia.* Gastroenterology. 2000; **118**, 951-3.

Anadol AZ, Bayram O, Dursun A, Ercan S. *Role of endogenous endothelin peptides in intestinal ischemia-reperfusion injury in rats.* Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids. 1998; **59**, 279-83.

Antes G. *Der akute und chronische progrediente Bauchschmerz: Welche Rolle spielen die radiologischen Verfahren in der Diagnostik?* Zentralbl Chir. 2005; **130**, 213-7.

Arcasoy MO. *The non-haematopoietic biological effects of erythropoietin.* Br J Haematol. 2008; **141**, 14-31.

Ayub K, Serracino-Inglott F, Williamson RC, Mathie RT. *Expression of inducible nitric oxide synthase contributes to the development of pancreatitis following pancreatic ischaemia and reperfusion.* Br J Surg. 2001; **88**, 1189-93.

Barger AC, Beeuwkes R 3rd, Lainey LL, Silverman KJ. *Hypothesis: vasa vasorum and neovascularization of human coronary arteries. A possible role in the pathophysiology of atherosclerosis.* N Engl J Med. 1984; **310**, 175-7.

Barker JH, Hammersen F, Bondàr I, Uhl E, Galla TJ, Menger MD, Messmer K. *The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation.* Plast Reconstr Surg. 1989; **83**, 948-59.

Berliner JA, Navab M, Fogelman AM, Frank JS, Demer LL, Edwards PA, Watson AD, Lusis AJ. *Atherosclerosis: basic mechanisms. Oxidation, inflammation, and genetics.* Circulation. 1995; **91**, 2488-96.

Betzler M. *Surgical technical guidelines in intestinal ischemia.* Chirurg. 1998; **69**, 1-7.

Bhakdi S. *Immunopathogenesis of atherosclerosis: the Mainz hypothesis.* Med Monatsschr Pharm. 2006; **29**, 356-9.

Boley SJ, Brandt LJ, Sammartano RJ *History of mesenteric ischemia. The evolution of a diagnosis and management.* Surg Clin North Am. 1997; **77**, 275-88.

Böck P. *Gebräuchlichste Fixierlösungen.* In: Romeis Mikroskopische Technik (Böck P, Hrsg.). 1989; Verlag Urban-Schwarzenberg, München, 17. Aufl., 86

Böttger T, Schäfer W, Weber W, Junginger T. *Value of preoperative diagnosis in mesenteric vascular occlusion. A prospective study.* Langenbecks Arch Chir. 1990; **375**, 278-82.

Brandt LJ, Boley SJ. *AGA technical review on intestinal ischemia.* American Gastrointestinal Association. Gastroenterology. 2000; **118**, 954-68.

Brandt LJ, Boley SJ. *Nonocclusive mesenteric ischemia.* Annu Rev Med. 1991; **42**, 107-17.

Braun L. *Acute mesenteric artery occlusion--clinical aspects, therapy, prognosis.* Zentralbl Chir. 1985; **110**, 1527-36.

Brines M, Cerami A. *Discovering erythropoietin's extra-hematopoietic functions: biology and clinical promise.* Kidney Int. 2006; **70**, 246-50.

Bürger K, Luther B. *Chronic occlusive process of intestinal arteries. Angina abdominalis, surgical indications.* Langenbecks Arch Chir Suppl II Verh Dtsch Ges Chir. 1990, 323-6.

Busse R, Fleming I. *Endothelial dysfunction in atherosclerosis.* J Vasc Res. 1996; **33**, 181-94.

Calvillo L, Latini R, Kajstura J, Leri A, Anversa P, Ghezzi P, Salio M, Cerami A, Brines M. *Recombinant human erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury and promotes beneficial remodeling.* Proc Natl Acad Sci USA. 2003; **100**, 4802-6.

Carden DL, Granger DN. *Pathophysiology of ischaemia-reperfusion injury.* J Pathol. 2000; **190**, 255-66.

Carlos TM, Harlan JM. *Leukocyte-endothelial adhesion molecules.* Blood. 1994; **84**, 2068-101.

Chu D, Bakaeen FG, Wang XL, Dao TK, LeMaire SA, Coselli JS, Huh J. *The impact of peripheral vascular disease on long-term survival after coronary artery bypass graft surgery.* Ann Thorac Surg. 2008; **86**, 1175-1180.

Cimminiello C. *PAD. Epidemiology and pathophysiology.* Thromb Res. 2002; **106**, V295-301.

Colantoni A, de Maria N, Caraceni P, Bernardi M, Floyd RA, Van Thiel DH. *Prevention of reoxygenation injury by sodium salicylate in isolated-perfused rat liver.* Free Radic Biol Med. 1998; **25**, 87-94.

Contaldo C, Meier C, Elsherbiny A, Harder Y, Trentz O, Menger MD, Wanner GA. *Human recombinant erythropoietin protects the striated muscle microcirculation of the dorsal skinfold from postischemic injury in mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; **293**, H274-83.

Cruz RJ Jr, Garrido AG, Ribeiro CM, Harada T, Rocha-e-Silva M. *Regional blood flow distribution and oxygen metabolism during mesenteric ischemia and congestion.* J Surg Res. 2010; **161**, 54-61.

Cursio R, Gugenheim J, Ricci JE, Crenesse D, Rostagno P, Maulon L, Saint-Paul MC, Ferrua B, Auberger AP. *A caspase inhibitor fully protects rats against lethal normothermic liver ischemia by inhibition of liver apoptosis.* FASEB J. 1999; **13**, 253-61.

Czerny M, Trubel W, Claeys L, Scheuba C, Huk I, Prager M, Polterauer P. *Acute mesenteric ischemia.* Zentralbl Chir. 1997; **122**, 538-44.

Dämmrich K, Loppnow H. *Stoffwechselstörungen mit vorwiegend extrazellulären Veränderungen.* In: *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin* (Stünzi H, Weiss E, Hrsg.). 1990; Verlag Paul Parey, Berlin, 8. Aufl., 126-30.

de Groot H, Littauer A. *Reoxygenation injury in isolated hepatocytes: cell death precedes conversion of xanthine dehydrogenase to xanthine oxidase.* Biochem Biophys Res Commun. 1988; **155**, 278-82.

de Groot H. *Injury to visceral organs by ischemia and reperfusion. Processes in pathogenetic networks.* Zentralbl Chir. 2005; **130**, 202-12.

Denecke H, Stiegler H. *Indications and results of second-look operation in acute mesenteric vascular occlusion.* Langenbecks Arch Chir Suppl II Verh Dtsch Ges Chir. 1990, 311-5.

Desai MS, Mariscalco MM, Tawil A, Vallejo JG, Smith CW. *Atherogenic diet-induced hepatitis is partially dependent on murine TLR4.* J Leukoc Biol. 2008; **83**, 1336-44.

DESTATIS, 2006; Gesundheitsberichterstattung des Bundes 2006; Webseiten: www.destatis.de/jetspeed/portal/cms und www.gbe-bund.de/oowa921-install vom 08.09.2008

DESTATIS, 2008; *Pressemitteilung Nr.304 vom 22.08.2008*; www.destatis.de

Dimakakos PB, Kotsis T, Kondi-Pafiti A, Katsenis K, Doufas A, Chondros K, Kouskouni E. *Oxygen free radicals in abdominal aortic surgery. An experimental study.* J Cardiovasc Surg (Torino). 2002; **43**, 77-82.

Dimković N. *Erythropoietin-beta in the treatment of anemia in patients with chronic renal insufficiency.* Med Pregl. 2001; **54**, 235-40.

Dirks K. *Sonographische Darmbefunde beim akuten Abdomen.* 55. Nürnberger Fortbildungskongress der Bayerischen Landesärztekammer vom 2. bis 5. Dezember 2004; Tagungsband

Dryja PM. *Die non-occlusive Mesenterialischämie nach herzchirurgischen Eingriffen. Eine retrospektive Studie.* Diss. HuMed, Münster, 2007

Ebnet K, Vestweber D. *Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines.* Histochem Cell Biol. 1999; **112**, 1-23.

Eckstein HH. *Acute mesenteric ischemia. Resection or reconstruction?* Chirurg. 2003; **74**, 419-31

Elliott S, Pham E, Macdougall IC. *Erythropoietins: a common mechanism of action.* Exp Hematol. 2008; **36**, 1573-84.

Eltzschig HK, Collard CD. *Vascular ischaemia and reperfusion injury.* Br Med Bull. 2004; **70**, 71-86.

Ende N. *Infarction of the bowel in cardiac failure.* N Engl J Med. 1958; **258**, 879-81.

Erbayraktar S, Yilmaz O, Gökmen N, Brines M. *Erythropoietin is a multifunctional tissue-protective cytokine.* Curr Hematol Rep. 2003; **2**, 465-70.

Ernst S, Luther B, Zimmermann N, Böhner H, Wilke R, Feindt P, Fürst G. *Current diagnosis and therapy of non-occlusive mesenteric ischemia.* Rofo. 2003; **175**, 515-23.

Feng D, Nagy JA, Pyne K, Dvorak HF, Dvorak AM. *Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP.* J Exp Med. 1998; **187**, 903-15.

Ferré N, Martínez-Clemente M, López-Parra M, González-Pérez A, Horrillo R, Planagumà A, Camps J, Joven J, Tres A, Guardiola F, Bataller R, Arroyo V, Clària J. *Increased susceptibility to exacerbated liver injury in hypercholesterolemic ApoE-deficient mice: potential involvement of oxysterols.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009; **296**, G553-62.

Filsoufi F, Rahmanian PB, Castillo JG, Scurlock C, Legnani PE, Adams DH. *Predictors and outcome of gastrointestinal complications in patients undergoing cardiac surgery.* Ann Surg. 2007; **246**, 323-29.

Fiordaliso F, Chimenti S, Staszewsky L, Bai A, Carlo E, Cuccovillo I, Doni M, Mengozzi M, Tonelli R, Ghezzi P, Coleman T, Brines M, Cerami A, Latini R. *A nonerythropoietic derivative of erythropoietin protects the myocardium from ischemia-reperfusion injury.* Proc Natl Acad Sci USA. 2005; **102**, 2046-51.

Fong YM, Marano MA, Moldawer LL, Wei H, Calvano SE, Kenney JS, Allison AC, Cerami A, Shires GT, Lowry SF. *The acute splanchnic and peripheral tissue metabolic response to endotoxin in humans.* J Clin Invest. 1990; **85**, 1896-904.

Frangogiannis NG, Smith CW, Entman ML. *The inflammatory response in myocardial infarction.* Cardiovasc Res. 2002; **53**, 31-47.

Frangogiannis NG. *The role of the chemokines in myocardial ischemia and reperfusion.* Curr Vasc Pharmacol. 2004; **2**, 163-74.

Fujimoto K, Hosotani R, Wada M, Lee J, Koshiba T, Miyamoto Y, Doi R, Imamura M. *Ischemia-reperfusion injury on the pancreas in rats: identification of acinar cell apoptosis.* J Surg Res. 1997; **71**, 127-36.

Gearhart SL, Delaney CP, Senagore AJ, Banbury MK, Remzi FH, Kiran RP, Fazio VW. *Prospective assessment of the predictive value of alpha-glutathione S-transferase for intestinal ischemia.* Am Surg. 2003; **69**, 324-9.

Gennari R, Alexander JW. *Effects of hyperoxia on bacterial translocation and mortality during gut-derived sepsis.* Arch Surg. 1996; **131**, 57-62.

Ghosh S, Roberts N, Firmin RK, Jameson J, Spyt TJ. *Risk factors for intestinal ischaemia in cardiac surgical patients.* Eur J Cardiothorac Surg. 2002; **21**, 411-6.

Gonzalez AP, Sepulveda S, Massberg S, Baumeister R, Menger MD. *In vivo fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats.* Transplantation. 1994; **58**, 403-8.

Granger DN. *Ischemia-reperfusion: mechanisms of microvascular dysfunction and the influence of risk factors for cardiovascular disease.* Microcirculation. 1999; **6**, 167-78.

Grisham MB, Hernandez LA, Granger DN. *Xanthine oxidase and neutrophil infiltration in intestinal ischemia.* Am J Physiol. 1986; **251**, G567-74.

Grotz MR, Deitch EA, Ding J, Xu D, Huang Q, Regel G. *Intestinal cytokine response after gut ischemia: role of gut barrier failure.* Ann Surg. 1999; **229**, 478-86.

Gujral JS, Bucci TJ, Farhood A, Jaeschke H. *Mechanism of cell death during warm hepatic ischemia-reperfusion in rats: apoptosis or necrosis?* Hepatology. 2001; **33**, 397-405.

Gumaste UR, Joshi MM, Mourya DT, Barde PV, Shrivastav GK, Ghole VS. *Alcohol dehydrogenase: a potential new marker for diagnosis of intestinal ischemia using rat as a model.* World J Gastroenterol. 2005; **11**, 912-6.

Günel E, Cağlayan F, Cağlayan O, Dilsiz A, Duman S, Aktan M. *Treatment of intestinal reperfusion injury using antioxidative agents.* J Pediatr Surg. 1998; **33**, 1536-9.

Haglund U, Bergqvist D. *Intestinal ischemia -- the basics.* Langenbecks Arch Surg. 1999; **384**, 233-8.

Halm MA. *Acute gastrointestinal complications after cardiac surgery.* Am J Crit Care. 1996; **5**, 109-18.

Harder Y, Amon M, Schramm R, Contaldo C, Metzkwow E, Matzen A, Rücker M, Vollmar B, Menger MD. *Erythropoietin reduces necrosis in critically ischemic myocutaneous tissue by protecting nutritive perfusion in a dose-dependent manner.* Surgery. 2009; **145**, 372-83.

Hasan S, Ratnatunga C, Lewis CT, et al. *Gut ischaemia following cardiac surgery.* Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2004; **3**, 475-78.

Heeren J, Beisiegel U, Grewal T. *Apolipoprotein E recycling: implications for dyslipidemia and atherosclerosis.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2006; **26**, 442-8.

Heino A, Hartikainen J, Merasto ME, Koski EM, Tenhunen J, Alhava E, Takala J. *Effects of dobutamine on splanchnic tissue perfusion during partial superior mesenteric artery occlusion.* Crit Care Med. 2000; **28**, 3484-90.

Horie Y, Ishii H. *Liver dysfunction elicited by gut ischemia-reperfusion.* Pathophysiology. 2001; **8**, 11-20.

Horie Y, Wolf R, Anderson DC, Granger DN. *Hepatic leukostasis and hypoxic stress in adhesion molecule-deficient mice after gut ischemia/reperfusion.* J Clin Invest. 1997; **99**, 781-8.

Horie Y, Wolf R, Miyasaka M, Anderson DC, Granger DN. *Leukocyte adhesion and hepatic microvascular responses to intestinal ischemia/reperfusion in rats.* Gastroenterology. 1996; **111**, 666-73.

Intaglietta M, Tompkins WR. *On-line measurement of microvascular dimensions by television microscopy.* J Appl Physiol. 1972; **32**, 546-51.

Jaeschke H, Mitchell JR. *Mitochondria and xanthine oxidase both generate reactive oxygen species in isolated perfused rat liver after hypoxic injury.* Biochem Biophys Res Commun. 1989; **160**, 140-7.

Jaeschke H, Smith CW. *Mechanisms of neutrophil-induced parenchymal cell injury.* J Leukoc Biol. 1997; **61**, 647-53.

Jelkmann W. *Erythropoietin: structure, control of production, and function.* Physiol Rev. 1992; **72**, 449-89.

Junqueira LC, Carneiro J. *Verdauungsorgane.* In: Histologie (Junquera LC, Carneiro J, Hrsg.), 1996; 4. Aufl., Springer-Verlag, Berlin, 505-6.

Juul SE, Yachnis AT, Christensen RD. *Tissue distribution of erythropoietin and erythropoietin receptor in the developing human fetus.* Early Hum Dev. 1998; **52**, 235-49.

Juul SE, Joyce AE, Zhao Y, Ledbetter DJ *Why is erythropoietin present in human milk? Studies of erythropoietin receptors on enterocytes of human and rat neonates.* Pediatr Res. 1999; **46**, 263-8.

Juul SE, Ledbetter DJ, Joyce AE, Dame C, Christensen RD, Zhao Y, DeMarco V *Erythropoietin acts as a trophic factor in neonatal rat intestine.* Gut. 2001; **49**, 182-9.

Kamler M, Nowak K, Bock M, Herold U, Motsch J, Hagl S, Gebhard MM, Jakob H. *Bronchial artery revascularization restores peribronchial tissue oxygenation after lung transplantation.* J Heart Lung Transplant. 2004; **23**, 763-6.

Kalia N, Pockley AG, Wood RF, Brown NJ. *Effects of FK409 on intestinal ischemia-reperfusion injury and ischemia-induced changes in the rat mucosal villus microcirculation.* Transplantation. 2001; **72**, 1875-80.

Kanwar S, Kubes P. *Nitric oxide is an antiadhesive molecule for leukocytes.* New Horiz. 1995; **3**, 93-104.

Katz MG, Schachner A, Ezri T, Kravtsov V, Freidman V, Hauptman E, Sasson L. *Nonocclusive mesenteric ischemia after off-pump coronary artery bypass surgery: a word of caution.* Am Surg. 2006; **72**, 228-31.

Kawata K, Takeyoshi I, Iwanami K, Sunose Y, Aiba M, Ohwada S, Matsumoto K, Morishita Y. *A spontaneous nitric oxide donor ameliorates small bowel ischemia-reperfusion injury in dogs.* Dig Dis Sci. 2001; **46**, 1748-56.

Kim MH, Carter PR, Harris NR. (a) *P-selectin-mediated adhesion impairs endothelium-dependent arteriolar dilation in hypercholesterolemic mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; **292**, H632-8.

Kim MH, Granger DN, Harris NR. (b) *Mediators of CD18/P-selectin-dependent constriction of venule-paired arterioles in hypercholesterolemia.* Microvasc Res. 2007; **73**, 150-5.

Klein HM, Lensing R, Klosterhalfen B, Töns C, Günther RW. *Diagnostic imaging of mesenteric infarction.* Radiology. 1995; **197**, 79-82.

Knichwitz G, Kruse C, van Aken H. *Intestinale Perfusionsstörungen beim Intensivpatienten.* Anaesthesist. 2005; **54**, 41-8.

Knichwitz G, Rötger J, Möllhoff T, Richter KD, Brüssel T. *Continuous intramucosal PCO₂ measurement allows the early detection of intestinal malperfusion.* Crit Care Med. 1998; **26**, 1550-7.

Köhler M, Kramann B, Hellstern P, Feß W, Walter P, Wörner H, Kiehl R, Wenzel E. *Successful treatment of superior mesenteric artery thrombosis with local high-dose urokinase therapy.* Klin Wochenschr. 1985; **63**, 722-7.

Kolovou G, Daskalova D, Mikhailidis DP. *Apolipoprotein E polymorphism and atherosclerosis.* Angiology. 2003; **54**, 59-71.

Koroglu TF, Yilmaz O, Ozer E, Baskin H, Gokmen N, Kumral A, Duman M, Ozkan H. *Erythropoietin attenuates lipopolysaccharide-induced splenic and thymic apoptosis in rats.* Physiol Res. 2006; **55**, 309-16.

Kortmann B, Klar E. *Recognizing acute mesenteric ischaemia too late: reasons and diagnostic approach from a surgical point of view.* Zentralbl Chir. 2005; **130**, 223-6

Krämer SC, Görich J, Oertel F, Beyer M, Siech M, Brambs HJ. *Nonokklusive mesenteriale Ischämie nach herzchirurgischen Eingriffen: Diagnostische und radiologische Evaluation.* Röntgenfortbildung 2000; Vorträge Gastrointestinaltrakt, Georg Thieme Verlag, Stuttgart

Krämer SC, Görich J, Oertel F, Scheld H, Heindel W. *Non-okklusive Darmischämie: Radiologische Diagnostik und Therapie.* Rofo. 2003; **175**, 1177-83.

Kuebler WM, Kuhnle GE, Groh J, Goetz AE. *Contribution of selectins to leucocyte sequestration in pulmonary microvessels by intravital microscopy in rabbits.* J Physiol. 1997; **501**, 375-86.

Kumral A, Baskin H, Duman N, Yilmaz O, Tatli M, Ozer E, Gökmen N, Genc S, Ozkan H. *Erythropoietin protects against necrotizing enterocolitis of newborn rats by the inhibiting nitric oxide formation.* Biol Neonate. 2003; **84**, 325-9.

Kurose I, Argenbright LW, Anderson DC, Tolley J, Miyasaka M, Harris N, Granger DN. *Reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage in normal and hypercholesterolemic rats.* Am J Physiol. 1997; **273**, 854-60.

Kurose I, Wolf RE, Grisham MB, Granger DN. *Hypercholesterolemia enhances oxidant production in mesenteric venules exposed to Ischemia/Reperfusion.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 1998; **18**, 1583-8.

Kurtel H, Fujimoto K, Zimmerman BJ, Granger DN, Tso P. *Ischemia-reperfusion-induced mucosal dysfunction: role of neutrophils.* Am J Physiol. 1991; **261**, G490-6.

Lange H. *Differential diagnostic significance of lactate in acute abdominal diseases.* Chirurg. 1989; **60**, 356-60.

Langheinrich AC, Kampschulte M, Buch T, Bohle RM. *Vasa vasorum and atherosclerosis - Quid novi?* Thromb Haemost. 2007; **97**, 873-9.

Lawrence MB, Springer TA. *Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins.* Cell. 1991; **65**, 859-73.

Lazarević T, Stojimirović B, Poskurica M, Lazarević M, Mitrović N, Stolić R. *Chronic inflammation, oxidative stress and effects of erythropoietin in end-stage renal disease patients.* Med Pregl. 2007; **60**, 109-13.

Lehr HA, Messmer K. *The microcirculation in atherogenesis.* Cardiovasc Res. 1996; **32**, 781-8.

Lentsch AB, Ward PA. *Regulation of inflammatory vascular damage.* J Pathol. 2000; **190**, 343-8.

Libby P, Geng YJ, Aikawa M, Schoenbeck U, Mach F, Clinton SK, Sukhova GK, Lee RT. *Macrophages and atherosclerotic plaque stability.* Curr Opin Lipidol. 1996; **7**, 330-5.

Libby P. *Molecular bases of the acute coronary syndromes.* Circulation. 1995; **91**, 2844-50.

Libby P. *Changing concepts of atherogenesis.* J Intern Med. 2000; **247**, 349-58.

Libby P. *Inflammation in atherosclerosis.* Nature. 2002; **420**, 868-74.

Libby P. *Molecular and cellular mechanisms of the thrombotic complications of atherosclerosis.* J Lipid Res. 2009; **50**, 352-7.

Liebich H-G. *Verdauungsapparat.* In: Funktionelle Histologie der Haussäugetiere (H-G. Liebich, Hrsg.). 1999; 3. Aufl., Schattauer Verlag, Stuttgart, 212.

Limmer S, Hauenschild L, Eckmann C, Czymek R, Schmidt H, Bruch HP, Kujath P. *Thoracic surgery in the elderly - co-morbidity is the limit.* Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2009; **8**, 412-6.

Littauer A, de Groot H. *Release of reactive oxygen by hepatocytes on reoxygenation: three phases and role of mitochondria.* Am J Physiol. 1992; **262**, G1015-20.

Little D, Brown SA, Campbell NB, Moeser AJ, Davis JL, Blikslager AT. *Effects of the cyclooxygenase inhibitor meloxicam on recovery of ischemia-injured equine jejunum.* Am J Vet Res. 2007; **68**, 614-24.

Little D, Tomlinson JE, Blikslager AT. *Post operative neutrophilic inflammation in equine small intestine after manipulation and ischaemia.* Equine Vet J. 2005; **37**, 329-35.

Liu X, Xie W, Liu P, Duan M, Jia Z, Li W, Xu J. *Mechanism of the cardioprotection of rhEPO pretreatment on suppressing the inflammatory response in ischemia-reperfusion.* Life Sci. 2006; **78**, 2255-64.

Lock G. (a) *Acute mesenteric ischemia--frequently overlooked and often fatal.* Med Klin (Munich). 2002; **97**, 402-9.

Lock G. (b) *Acute mesenteric ischemia: classification, evaluation and therapy.* Acta Gastroenterol Belg. 2002; **65**, 220-5.

Lundgren O, Haglund U. *The pathophysiology of the intestinal countercurrent exchanger.* Life Sci. 1978; **23**, 1411-22.

Luther B, Klein M, Özan K, Zimmermann N, Schulte H.D, Sandmann W. *Ist ein Mesenterialinfarkt nach kardiochirurgischen Eingriffen vermeidbar?* Zeitschrift für Herz-, Thorax- und Gefäßchirurgie, 2004; **18**, 148-157

Luther B, Lehmann C, Schwilden ED, Holzäpfel A. *Perioperative intra-arterial irrigation perfusion for adjuvant therapy of acute intestinal circulatory disorders.* Zentralbl Chir. 1996; **121**, 61-6.

Luther B, Moussazadeh K, Müller BT, Franke C, Harms JM, Ernst S, Sandmann W. *Die akute mesenteriale Ischämie - unverstanden oder unheilbar?* Zentralbl Chir. 2002; **127**, 674-84.

MacDonald PH. *Ischaemic colitis.* Best Pract Res Clin Gastroenterol. 2002; **16**, 51-61.

Mangi AA, Christison-Lagay ER, Torchiana DF, Warshaw AL, Berger DL. *Gastrointestinal complications in patients undergoing heart operation: an analysis of 8709 consecutive cardiac surgical patients.* Ann Surg. 2005; **241**, 895-904.

Månsson P, Zhang XW, Jeppsson B, Johnell O, Thorlacius H. *Critical role of P-selectin-dependent rolling in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte adhesion and extravascular recruitment in vivo.* Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2000; **362**, 190-6.

Massberg S, Eisenmenger S, Enders G, Krombach F, Messmer K. *Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse.* Res Exp Med (Berl). 1998; **198**, 23-35.

Menger MD, Barker JH, Messmer K. *Capillary blood perfusion during postischemic reperfusion in striated muscle.* Plast Reconstr Surg. 1992; **89**, 1104-14.

Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B. *Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats.* Dig Dis Sci. 1996; **41**, 823-30.

Menger MD, Rücker M, Vollmar B. *Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow".* Shock. 1997; **8**, 2-7.

Menger MD, Sack FU, Barker JH, Feifel G, Messmer K. *Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution.* Res Exp Med (Berl). 1988; **188**, 151-65.

Menger MD, Vollmar B. *Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies: is it time for the introduction of pleiotropic compounds?* Transplant Proc. 2007; **39**, 485-8.

Menger MD, Vollmar B. *Role of microcirculation in transplantation.* Microcirculation. 2000; **7**, 291-306.

Messmer K. *The importance of the intestinal system in shock.* Anaesthesist. 1968; **17**, 386-91.

Moneta GL, Misbach GA, Ivey TD. *Hypoperfusion as a possible factor in the development of gastrointestinal complications after cardiac surgery.* Am J Surg. 1985; **149**, 648-50.

Moore RM, Muir WW, Granger DN. *Mechanisms of gastrointestinal ischemia-reperfusion injury and potential therapeutic interventions: a review and its implications in the horse.* J Vet Intern Med. 1995; **9**, 115-32.

Moos MP, John N, Gräbner R, Nossmann S, Günther B, Vollandt R, Funk CD, Kaiser B, Habenicht AJ. *The lamina adventitia is the major site of immune cell accumulation in standard chow-fed apolipoprotein E-deficient mice.* Arterioscler Thromb Vasc Biol. 2005; **25**, 2386-91.

Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. *ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree.* Arterioscler Thromb. 1994; **14**, 133-40.

Natarajan R, Fisher BJ, Jones DG, Ghosh S, Fowler AA 3rd. *Reoxygenating microvascular endothelium exhibits temporal dissociation of NF-kappaB and AP-1 activation.* Free Radic Biol Med. 2002; **32**, 1033-45.

Nellore K, Harris NR. *L-arginine and antineutrophil serum enable venular control of capillary perfusion in hypercholesterolemic rats.* Microcirculation. 2002; **9**, 477-85.

Park PO, Haglund U, Bulkley GB, Falt K. *The sequence of development of intestinal tissue injury after strangulation ischemia and reperfusion.* Surgery. 1990; **107**, 574-80.

Patel NS, Sharples EJ, Cuzzocrea S, Chatterjee PK, Britti D, Yaqoob MM, Thiemermann C. *Pretreatment with EPO reduces the injury and dysfunction caused by ischemia/reperfusion in the mouse kidney in vivo.* *Kidney Int.* 2004; **66**, 983-9.

Petrat F, de Groot H, Sustmann R, Rauen U. *The chelatable iron pool in living cells: a methodically defined quantity.* *Biol Chem.* 2002; **383**, 489-502.

Petrides PE. *Blut.* In: *Biochemie und Pathobiochemie* (Löffler G, Petrides PE, Hrsg.) 1998; 6. Aufl., Springer Verlag, Berlin, 880-91

Pietura R, Szymańska A, Janicki K, Bojarska A, Szczerbo-Trojanowska M. *Superior mesenteric artery stenosis treated with percutaneous transluminal angioplasty and stent placement.* *Ann Univ Mariae Curie Sklodowska [Med].* 2003; **58**, 236-41.

Pljesa S. *Possible complications of erythropoietin therapy in patients with chronic renal failure.* *Med Pregl.* 2004; **57**, 254-7.

Pohlenz J, von Sandersleben J. *Kreislaufstörungen.* In: *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin* (Stünzi H, Weiss E, Hrsg.) 1990; Verlag Paul Parey, Berlin, 8. Aufl., 200-1

Probst P, Hirschmann DM, Haertel M, Fuchs WA. *The radiological diagnosis of acute intestinal ischaemia.* *Röfo.* 1980; **132**, 527-34.

Raebel S. *Magnetresonanztomographische, histologische und fluoreszenzmikroskopische Untersuchungen zur Lokalisation von atheroskleroseaffinen MRT-Kontrastmitteln in Plaques von WHHL-Kaninchen.* Diss. VetMed, Berlin, 2005

Reiner Z, Tedeschi-Reiner E. *New information on the pathophysiology of atherosclerosis* Lijec Vjesn. 2001; **123**, 26-31.

Research Animal Resources, University of Minnesota. *Reference Values for Laboratory Animals.* <http://www.ahc.umn.edu/rar/refvalues.html>

Rhee RY, Gloviczki P. *Mesenteric venous thrombosis.* Surg Clin North Am. 1997; **77**, 327-38.

Riaz AA *Mechanisms in colonic ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelial cell interactions.* Diss. HuMed, Malmö, 2002

Riaz AA, Wan MX, Schaefer T, Schramm R, Ekberg H, Menger MD, Jeppsson B, Thorlacius H. *Fundamental and distinct roles of P-selectin and LFA-1 in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the mouse colon.* Ann Surg. 2002; **236**, 777-84.

Ross R. *Atherosclerosis--an inflammatory disease.* N Engl J Med. 1999; **340**, 115-26.

Ross R. *The pathogenesis of atherosclerosis: a perspective for the 1990s.* Nature. 1993; **362**, 801-9.

Rundqvist H, Rullman E, Sundberg CJ, Fischer H, Eisleitner K, Ståhlberg M, Sundblad P, Jansson E, Gustafsson T. *Activation of the erythropoietin receptor in human skeletal muscle.* Eur J Endocrinol. 2009; **161**, 427-34.

Sandmann W, Böhner H, Kniemeyer HW, Schramm J. *Chronic mesenteric ischemia.* Dtsch Med Wochenschr. 1994; **119**, 979-84.

Schiebler TH, Schmidt W. *Baucheingeweide.* In: Lehrbuch Anatomie (Schiebler TH, Schmidt W, Hrsg.), 2002; Springer-Verlag, Berlin, 8. Aufl., 606-7

Schmidt EE, MacDonald IC, Groom AC. *Interactions of leukocytes with vessel walls and with other blood cells, studied by high-resolution intravital videomicroscopy of spleen.* Microvasc Res. 1990; **40**, 99-117.

Schöffel N, Börger JA, Quarcoo D, Scutaru C, Groneberg DA. *Erythropoietin - state of science.* Sportverletz Sportschaden. 2008; **22**, 201-6.

Schramm R, Menger MD, Kirsch S, Langer F, Harder Y, Hamacher J, Schäfers HJ. *The subepicardial microcirculation in heterotopically transplanted mouse hearts: an intravital multicolor fluorescence microscopy study.* J Thorac Cardiovasc Surg. 2007; **134**, 210-7.

Schwartzkopff B, Hennersdorf M. *Influence of cardiac circulation and medication on the perfusion of the intestine.* Zentralbl Chir. 2005; **130**, 218-22

Semba RD, Juul SE. *Erythropoietin in human milk: physiology and role in infant health.* J Hum Lact. 2002; **18**, 252-61.

Seubert N, Royer Y, Staerk J, et al. *Active and inactive orientations of the transmembrane and cytosolic domains of the erythropoietin receptor dimer.* Mol Cell. 2003; **12**, 1239-50.

Shepherd AP, Kiel JW. *A model of countercurrent shunting of oxygen in the intestinal villus.* Am J Physiol. 1992; **262**, H1136-42.

Shi T, Moulton VR, Lapchak PH, Deng GM, Dalle Lucca JJ, Tsokos GC. *Ischemia-mediated aggregation of the actin cytoskeleton is one of the major initial events resulting in ischemia-reperfusion injury.* Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol. 2009; **296**, G339-47.

Smith SC Jr. *Risk-reduction therapy: the challenge to change. Presented at the 68th scientific sessions of the American Heart Association November 13, 1995 Anaheim, California.* Circulation. 1996; **93**, 2205-11.

Sorg H, Krueger C, Schulz T, Menger MD, Schmitz F, Vollmar B. *Effects of erythropoietin in skin wound healing are dose related.* FASEB J. 2009; **23**, 3049-58.

Stokes KY, Calahan L, Russell JM, Gurwara S, Granger DN. *Role of platelets in hypercholesterolemia-induced leukocyte recruitment and arteriolar dysfunction.* Microcirculation. 2006; **13**, 377-88.

Szabo A, Menger MD, Boros M. (b) *Microvascular and epithelial permeability measurements in laboratory animals.* Microsurgery. 2006; **26**, 50-3.

Szabó A, Vollmar B, Boros M, Menger MD. (a) *Gender differences in ischemia-reperfusion-induced microcirculatory and epithelial dysfunctions in the small intestine.* Life Sci. 2006; **78**, 3058-65.

Szabó A, Vollmar B, Boros M, Menger MD. *In Vivo Fluorescence Microscopic Imaging for Dynamic Quantitative Assessment of Intestinal Mucosa Permeability in Mice.* J Surg Res.2008; **145**, 179-85.

Tailor A, Wood KC, Wallace JL, Specian RD, Granger DN. *Roles of platelet and endothelial cell COX-1 in hypercholesterolemia-induced microvascular dysfunction.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2007; **293**, H3636-42.

Takada K, Yamashita K, Sakurai-Yamashita Y, Shigematsu K, Hamada Y, Hioki K, Taniyama K. *Participation of nitric oxide in the mucosal injury of rat intestine induced by ischemia-reperfusion.* J Pharmacol Exp Ther. 1998; **287**, 403-7.

Taourel PG, Deneuille M, Pradel JA, Régent D, Bruel JM. *Acute mesenteric ischemia: diagnosis with contrast-enhanced CT.* Radiology. 1996; **199**, 632-6.

Tedder TF, Steeber DA, Chen A, Engel P. *The selectins: vascular adhesion molecules.* FASEB J. 1995; **9**, 866-73.

- Tessier PA, Naccache PH, Clark-Lewis I, Gladue RP, Neote KS, McColl SR.** *Chemokine networks in vivo: involvement of C-X-C and C-C chemokines in neutrophil extravasation in vivo in response to TNF-alpha.* J Immunol. 1997; **159**, 3595-602.
- Thorwarth C.** *Diagnostische und therapeutische chirurgische Konzepte bei intestinaler Ischämie.* Diss. HuMed, Würzburg, 2006
- Tola M, Portoghese A, Maniga AM.** *Laparoscopic second-look in acute intestinal ischemia.* Minerva Chir. 1997; **52**, 527-30.
- Trompeter M, Brazda T, Remy CT, Vestring T, Reimer P.** *Non-occlusive mesenteric ischemia: etiology, diagnosis, and interventional therapy.* Eur Radiol. 2002; **12**, 1179-87.
- Tseng YC, Tseng CK, Chou JW, Lai HC, Hsu CH, Cheng KS, Peng CY, Chen YF.** *A rare cause of mesenteric ischemia: celiac axis compression syndrome.* Intern Med. 2007; **46**, 1187-90.
- Tsiotos GG, Mullany CJ, Zietlow S, van Heerden JA.** *Abdominal complications following cardiac surgery.* Am J Surg. 1994; **167**, 553-7.
- Turnage RH, Guice KS, Oldham KT.** *Pulmonary microvascular injury following intestinal reperfusion.* New Horiz. 1994; **2**, 463-75.
- Van Geloven AA, Biesheuvel TH, Luitse JS, Hoitsma HF, Obertop H.** *Hospital admissions of patients aged over 80 with acute abdominal complaints.* Eur J Surg. 2000; **166**, 866-71.
- Van Hoogmoed LM, Nieto JE, Snyder JR, Harmon FA.** *In vitro evaluation of an intraluminal solution to attenuate effects of ischemia and reperfusion in the small intestine of horses.* Am J Vet Res. 2002; **63**, 1389-94.

Van Teeffelen JW, Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. *Hypercholesterolemia impairs reactive hyperemic vasodilation of 2A but not 3A arterioles in mouse cremaster muscle.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2005; **289**, H447-54.

Venkateswaran RV, Charman SC, Goddard M, et al. *Lethal mesenteric ischaemia after cardiopulmonary bypass: a common complication?* Eur J Cardiothorac Surg. 2002; **22**, 534-538.

Vidim T, Tosovský J. *Chronic visceral ischemia--diagnostic and therapeutic problem.* Cas Lek Cesk. 2006; **145**, 371-2.

Virmani R, Burke AP, Farb A, Kolodgie FD. Pathology of the vulnerable plaque. J Am Coll Cardiol. 2006; **47**, C13-8.

Vollmar B, Conzen P, Habazettl H, Adili F, Peter K. *Does nitrous oxide affect coronary microcirculation? An intravital microscopic study in the canine heart.* Anesth Analg. 1995; **80**, 249-55.

Vollmar B, Morgenthaler M, Amon M, Menger MD. *Skin microvascular adaptations during maturation and aging of hairless mice.* Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2000; **279**, H1591-9.

Vollmar B, Siegmund S, Menger MD. *An intravital fluorescence microscopic study of hepatic microvascular and cellular derangements in developing cirrhosis in rats.* Hepatology. 1998; **27**, 1544-53.

W. Druml. *Klinische Strategien zur Prävention der bakteriellen Translokation bei kritisch kranken Patienten.* Intensivmed 2001; **38**, 638-46.

Wahl M, Unterberg A, Baethmann A. *Intravital fluorescence microscopy for the study of blood-brain-barrier function.* Int J Microcirc Clin Exp. 1985; **4**, 3-18.

Wan MX, Riaz AA, Schramm R, Wang Y, Vestweber D, Menger MD, Thorlacius H. *Leukocyte rolling is exclusively mediated by P-selectin in colonic venules.* Br J Pharmacol. 2002; **135**, 1749-56.

Wassmann S, Czech T, van Eickels M, Fleming I, Bohm M, Nickenig G. *Inhibition of diet-induced atherosclerosis and endothelial dysfunction in apolipoprotein E/angiotensin II type 1A receptor double-knockout mice.* Circulation. 2004; **110**, 3062-7.

Weiss E. *Entzündung.* In: Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin (Stünzi H, Weiss E, Hrsg.) 1990; Verlag Paul Parey, Berlin, 8. Aufl., 232-9

Wilcox JN, Smith KM, Schwartz SM, Gordon D. *Localization of tissue factor in the normal vessel wall and in the atherosclerotic plaque.* Proc Natl Acad Sci USA. 1989; **86**, 2839-43.

Williams JK, Armstrong ML, Heistad DD. *Vasa vasorum in atherosclerotic coronary arteries: responses to vasoactive stimuli and regression of atherosclerosis.* Circ Res. 1988; **62**, 515-23.

Winet H. *A horizontal intravital microscope-plus-bone chamber system for observing bone microcirculation.* Microvasc Res. 1989; **37**, 105-14.

Wolf AM, Henne-Bruns D. *Mesenteriale Ischämie. Chirurgische Epidemiologie - wann muss man daran denken?* Chirurg 2003; **74**, 395-98.

Wolfram G. *Hyperlipoproteinämien.* In: Stoffwechselkrankheiten – Grundlagen Diagnostik Therapie (Mehnert H, Hrsg.), 1990; Thieme Verlag, Stuttgart, 4. Aufl.

Wolinsky H, Glagov S. *Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals.* Circ Res. 1967; **20**, 409-21.

Wong ND, Detrano RC, Abrahamson D, Tobis JM, Gardin JM. *Coronary artery screening by electron beam computed tomography. Facts, controversy, and future.* Circulation. 1995; **92**, 632-6.

World Health Organisation (WHO). 2007; www.who.int/classifications/apps/icd vom 08.09.2008

Wu B, Iwakiri R, Tsunada S, Utsumi H, Kojima M, Fujise T, Ootani A, Fujimoto K. *iNOS enhances rat intestinal apoptosis after ischemia-reperfusion.* Free Radic Biol Med. 2002; **33**, 649-58.

Wu TW, Hashimoto N, Au JX, Wu J, Mickle DA, Carey D. *Trolox protects rat hepatocytes against oxyradical damage and the ischemic rat liver from reperfusion injury.* Hepatology. 1991; **13**, 575-80.

Yamauchi J, Vollmar B, Wolf B, Menger MD. *Role of TNF-alpha in local surgical trauma-induced microvascular dysfunction.* Dig Surg. 1999; **16**, 400-6.

Young JL, Libby P, Schönbeck U. *Cytokines in the pathogenesis of atherosclerosis.* Thromb Haemost. 2002; **88**, 554-67.

Zamboni WA, Roth AC, Russell RC, Graham B, Suchy H, Kucan JO. *Morphologic analysis of the microcirculation during reperfusion of ischemic skeletal muscle and the effect of hyperbaric oxygen.* Plast Reconstr Surg. 1993; **91**, 1110-23.

8. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen, die zur Entstehung dieser Arbeit beigetragen haben, meinen herzlichen Dank aussprechen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Dr. Schramm für die Überlassung des Themas und für seine umfangreiche und kompetente Betreuung. Bei Herrn Prof. Dr. Menger bedanke ich mich für die Möglichkeit, in seinem Institut die Versuche durchführen und ihre Ergebnisse auswerten zu dürfen und für die Bereitstellung der entsprechenden Geräte.

Herrn Prof. Dr. Reinacher möchte ich für das Interesse an meiner Doktorarbeit und deren Betreuung und Begutachtung danken.

Weiterhin möchte ich allen Personen aus dem Institut für Klinisch-Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, die an der Entstehung meiner Doktorarbeit mitgewirkt haben, meinen Dank aussprechen. Allen voran Frau Janine Becker, Frau Elisabeth Gluding, Frau Ruth Nickels und Frau Dr. Claudia Scheuer.

Zuletzt möchte ich noch von ganzem Herzen der Person danken, ohne deren Verständnis, ohne deren Toleranz jedweder Entbehrung und ohne deren Kraft, das Erstellen dieser Arbeit wohl nicht möglich gewesen wäre – meiner geliebten Frau Sabine. Danke.

9. Erklärung

„Ich erkläre: Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

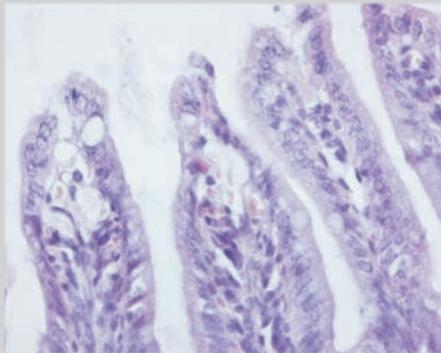
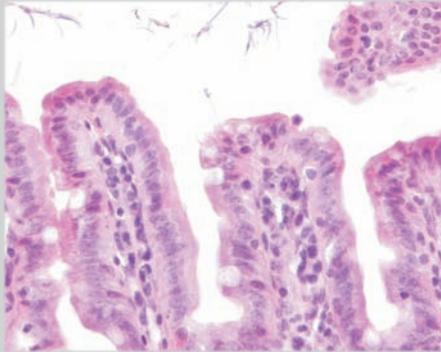
Bei der Planung der Experimente, Einarbeitung der Methoden und der Auswertung der Ergebnisse habe ich von folgenden Personen Unterstützung erhalten:

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Schramm, PhD

Herrn Prof. Dr. med. M. D. Menger

Herrn Priv.-Doz. Dr. med. M. W. Laschke

Frank Appel



édition scientifique
VVB LAUFERSWEILER VERLAG

VVB LAUFERSWEILER VERLAG
STAUFENBERGRING 15
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890
redaktion@doktorverlag.de
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-5737-4



9 783835 195737 4