

Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,  
der Universitätskliniken des Saarlandes  
Betreuer: PD Dr. med. Clemens Bauer

Eingereicht über das Institut für Pathologie  
der Justus- Liebig- Universität Gießen  
im Fachbereich vertreten durch Prof. Dr. med. vet. Dirk Seiffge

**Einfluß NO-generierender Systeme auf die langfristigen  
Veränderungen der Lebermikrozirkulation nach  
hämorrhagischem Schock**

Inaugural- Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus- Liebig- Universität Gießen

Eingereicht von  
**Claudia Biewald**  
Tierärztin aus St. Ingbert (Saarland)

Gießen 2004

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

**Dekan:** Prof. Dr. Dr. h.c. Bernd Hoffmann

---

**1. Berichterstatter:** PD Dr. Clemens Bauer

**2. Berichterstatter:** Prof. Dr. Dirk Seiffge

**Tage der mündlichen Prüfungen:** 27.5.2004

**„Wenn du bei Nacht den Himmel anschaust,  
wird es dir sein, als lachten alle Sterne,  
weil ich auf einem von ihnen wohne,  
weil ich auf einem von ihnen lache.  
Du allein wirst Sterne haben, die lachen können!“**

Antoine de Saint- Exupérie

**für Christian**

## **Danksagung**

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. Clemens Bauer für die Überlassung des Themas und die engagierte, freundliche und überaus geduldige Unterstützung bei der Erarbeitung.

Bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Dirk Seiffge möchte ich mich an dieser Stelle herzlich für die Übernahme des Koreferates und die gute Zusammenarbeit bedanken.

Herrn Dr. med. Wolfgang Kuntz danke ich sowohl für die praktische als auch für die seelische Unterstützung während der Zeit der Tierversuche.

Ein besonderes Dankeschön gilt meinem Lebensgefährten Stefan Wirtz, der mir bei der Überwindung computertechnischer Schwierigkeiten stets geduldig zur Seite stand.

Ebenso danke ich meinen Freunden Frau Dr. med. vet. Gertrud Brand und Herrn Dr. Ivo Bischoff für das unermüdliche Korrekturlesen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung</b>	<b>11</b>
1.1 Das Polytrauma und die posttraumatische Entzündungsreaktion	11
1.2 Der hypovolämisch hämorrhagische Schock	13
1.3 Das Ischämie- Reperfusionssyndrom	15
1.4 Der Arachidonsäurestoffwechsel	18
1.5 Die posttraumatische Immunmodulation	19
1.5.1 Eicosanoide	19
1.5.1.1 Prostaglandine	19
1.5.1.2 Thromboxane	19
1.5.1.3 Prostacycline	19
1.5.1.4 Leukotriene	20
1.5.2 Plättchen- aktivierender Faktor (PAF)	20
1.5.3 Zytokine	20
1.5.3.1 Tumornekrosefaktor - $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )	21
1.5.3.2 Interleukin 1 (IL-1)	21
1.5.3.3 Interleukin 6 (IL-6)	22
1.5.3.4 Interleukin 8 (IL-8)	22
1.5.3.5 Interleukin 10 (IL-10)	22
1.5.3.6 Interferon- $\gamma$ (IF- $\gamma$ )	22
1.5.3.7 Koloniestimulierende Faktoren (Granulocyte/ Monocyte- CSF)	23
1.5.3.8 Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )	23
1.6 Aktivierung polymorphkerniger Granulozyten und die Leukozyten- Endothel- Interaktion	23
1.7 Änderung der Gewebedurchblutung und der Mikrozirkulation im hypovolämischen Schock	25
1.8 Endogene Mediatoren mit vasoaktiver Wirkung	26
1.8.1 Stickstoffmonoxid (NO)	26
1.8.1.1. Die drei Formen der NO- Synthetase	27
1.8.2 Endothelin (ET)	29
1.8.3 Kohlenmonoxid (CO)	30

1.9 Die Bedeutung der Leber nach systemischer Ischämie und Reperfusion	31
1.9.1 Anatomische Grundlagen	31
1.9.2 Die hepatische Akut- Phasen- Reaktion	34
1.9.3 Das No- Reflow- Phänomen der Leber	34
1.9.4 Die hepatische Mikrozirkulation im hämorrhagischen Schock und in der Reperfusionsphase	36
1.10 Fragestellung	39
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>40</b>
2.1 Versuchstiere	40
2.2 Anästhesie	41
2.3 Präparation und Zeitverlauf	41
2.4 Monitoring	45
2.4.1 Mittlerer Arterieller Blutdruck (MABD)	45
2.4.2 Herzfrequenz (HF)	45
2.5 Blutprobenentnahme	46
2.5.1 Organparameter	46
2.5.2 Blutgasanalyse	47
2.6 Bestimmung des Nass- Trockengewichtes der Leber	47
2.7 Testsubstanzen	47
2.7.1 L- Arginin	47
2.7.2 N-Omega-L-Nitromonomethyllysin (L- NMMA)	47
2.7.3 NG-1-imminoethyl-lysin (L- NIL)	48
2.8 Versuchsgruppen	48
2.9 Intravitalmikroskopie	49
2.9.1 Präparation	49
2.9.2 Mikroskop	50
2.9.3 Video- Einheit	50
2.9.4 Fluoreszenzmarker	51
2.9.5 Untersuchungsablauf	52
2.9.6 Auswertung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen	53

2.10	Statistische Auswertung	55
<b>3.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>56</b>
3.1	Labordaten und makrohämodynamische Parameter	56
3.1.1	Sauerstoffpartialdruck (pO <sub>2</sub> ) in mmHg	56
3.1.2	Kohlendioxidpartialdruck (pCO <sub>2</sub> ) in mmHg	56
3.1.3	Glutamat- Oxalacetat- Transaminase (GOT)	57
3.1.4	Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD) im Versuchsverlauf	58
3.1.5	Herzfrequenz im Versuchsverlauf	61
3.1.6	Leber- Nass- Trockengewicht	63
3.2	Intravitalmikroskopische Befunde	64
3.2.1	Sinusoidperfusion (Erythrozytenflow)	65
3.2.2	Sinusoidweiten	66
<b>4.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>67</b>
4.1	Die intravitalmikroskopische Technik zur Untersuchung der Mikrozirkulation der Leber in vivo	69
4.2	Einfluss von L- NIL, L-NMMA und L- Arginin auf die Regulation des mittleren arteriellen Blutdrucks	71
4.3	Einfluss von L- NIL, L- NMMA und L- Arginin auf die Regulation der Sinusoidweiten und die Organperfusion der Leber 24 Stunden nach hämorrhagischem Schock	71
4.4	Einfluss von L- NIL, L- NMMA und L- Arginin auf die Regulation der Leberperfusion 24 Stunden nach hämorrhagischem Schock	72
<b>5.</b>	<b>Schlussfolgerungen</b>	<b>74</b>
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>75</b>
<b>7.</b>	<b>Summary</b>	<b>76</b>
<b>8.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>77</b>

## Verzeichnis der Abkürzungen

ADH	Antidiuretisches Hormon
ARDS	adult respiratory distress syndrom
ATP	Adenosintriphosphat
b- NOS	neuronale/ Gehirn Stickstoffmonoxidsynthetase
c- AMP	cyclisches Adenosinmonophosphat
c- GMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
CO	Kohlenmonoxid
COX	Cyclooxygenase
CPD	Citrat-Phosphat-Dextrose
DMF	Dimethylformalin
ec- NOS	endotheliale/ konstitutive Stickstoffmonoxidsynthetase
ET-1	Endothelin 1
ET-3	Endothelin 3
EDRF	Endothelium derived relaxing factor
ELAM-1	Endothelial Leucocyte Adhesion Molecule- 1
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
GMP-140	Granule Membrane Protein- 140
GOT	Glutamat- Oxalacetat- Transaminase
Hb	Hämoglobin
HF	Herzfrequenz
HO-1	Hämoxigenase- 1
HO-2	Hämoxigenase- 2
Hsp 32	Hitzeschockprotein 32
ICAM-1	Intercellular Adhesion Molecule- 1
IF- $\gamma$	Interferon- $\gamma$
IL-1	Interleukin 1
IL-2	Interleukin 2
IL-6	Interleukin 6
IL-8	Interleukin 8
IL -10	Interleukin 10

i- NOS	induzierbare Stickstoffmonoxidsynthetase
ISS	Injury Severity Score
LECAM-1	Leucocyte- Endothelial Cell Adhesion Molecule-1
L-NIL	NG-1-imminoethyl-lysin
L-NMMA	N-Omega-L-Nitromonomethyllysin
MABD	mittlerer arterieller Blutdruck
MODS	Multi Organ- Dysfunktions- Syndrom
NaCl	Natriumchlorid
NADP	Nicotinamid-adenin-dinucleotid-phosphat
NADPH	reduzierte Form des NADP
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	Stickstoffmonoxidsynthetase
PAF	Plättchen- aktivierender Faktor
pCO <sub>2</sub>	arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PDGF	Platelet derived growth factor
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandin E <sub>2</sub>
PGF <sub>2-α</sub>	Prostaglandin F <sub>2-α</sub>
PGI <sub>2</sub>	Prostacyclin I <sub>2</sub>
PLA <sub>2</sub>	Phospholipase A <sub>2</sub>
PLC	Phospholipase C
PMN	polymorphkernige neutrophile Granulozyten
pO <sub>2</sub>	arterieller Sauerstoffpartialdruck
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrome
SOD	Superoxiddismutase
TNF-α	Tumornekrosefaktor-α
TGF-β	Transforming Growth Factor-β

## Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

Abb. 1	Der Ischämie- Reperfusionsschaden
Abb. 2	Versuchstier
Abb. 3	Präparation der Leiste
Abb. 4	Präparation des Halses
Abb. 5	Monitoreinheit
Abb. 6	Zur Intravitalmikroskopie vorbereitete Ratte auf der Mikroskopierbühne
Abb. 7	Mikroskop- Videoeinheit zur Intravitalmikroskopie
Abb. 8	Auswerteeinheit
Abb. 9	Intravitalmikroskopisches Bild einer Rattenleber (ohne Schock)
Abb. 10	Glutamat- Oxalacetat- Transaminase (GOT)
Abb. 11a	mittlerer arterieller Blutdruck im Zeitverlauf des ersten Eingriffes
Abb. 11b	mittlerer arterieller Blutdruck im Zeitverlauf des zweiten Eingriffes
Abb. 12a	Herzfrequenz im Zeitverlauf des ersten Eingriffes
Abb. 12b	Herzfrequenz im Zeitverlauf des zweiten Eingriffes
Abb. 13	Leber- Nass- Trockengewicht
Abb. 14	Intravitalmikroskopisches Bild eines Schocktieres
Abb. 15	Sinusoidperfusion/ Erythrozytenflow
Abb. 16	Sinusoidweiten
Tab. 1	Versuchsgruppen
Tab. 2	Sauerstoffpartialdruck
Tab. 3	Kohlendioxidpartialdruck

# **1. Einleitung**

## **1.1 Das Polytrauma und die posttraumatische Entzündungsreaktion**

Das Polytrauma ist definiert als Verletzung mehrerer Organsysteme oder Körperregionen, die in Kombination zum Tode führen kann (Trentz 1995). Die Schwere der Verletzungen und die daraus resultierende Belastung für den Organismus wird z.B. mit Hilfe des Injury Severity Scores (ISS) bestimmt (Greenspan 1985). Im Idealfall ist eine „restitutio ad integrum“ möglich, jedoch kann sich im Anschluss an die primäre traumatische Schädigung, abhängig von Ausmaß und Muster der Verletzungen, ein massives Entzündungssyndrom (SIRS- Systemic Inflammatory Response Syndrome) entwickeln, das ein letales Multiorganversagen zur Folge haben kann.

Bei der Entwicklung des Organversagens im Anschluss an ein Polytrauma muss pathophysiologisch zwischen der durch direkte Traumaeinwirkung verursachten Organschädigung (z.B. Leber-, Milzverletzungen, Knochenfrakturen, Lungenkontusion,...) und dem Organversagen als Folge der generalisierten Entzündungsreaktion (SIRS) unterschieden werden.

Das SIRS ist die Folge einer Immunantwort des Gesamtorganismus auf ein Polytrauma. Infolge der Verletzung (physikalischer/ chemischer/ thermischer Art) eines oder mehrerer Organsysteme kommt es zu einer lokalen, primär nicht-bakteriellen Entzündungsreaktion. Durch spezielle Reparaturmechanismen kann der Körper den traumabedingten Schaden bis zu einem gewissen Schweregrad lokal begrenzen. Zu diesen Reparaturmechanismen gehören z.B. das Komplement- und Gerinnungssystem, die Phago- und Monozyten sowie matrixbildende Zellen und Lymphozyten. Unter optimalen Bedingungen gelingt es dem Organismus in diesem Stadium, eine lokale Heilung herbeizuführen. Je nach Schwere des Traumas kommt es jedoch häufig zu einer Abschwemmung der lokal freigesetzten Entzündungsmediatoren (spill over effect).

Auf diesem Weg werden verletzungsferne Organe und Strukturen in den Entzündungsprozess miteinbezogen und es kommt zu einer generalisierten Entzündungsreaktion. Die ursprünglich protektiven Abwehrmechanismen schaden dem Organismus, indem sie Endothel- und Parenchymzellen schädigen. Kommt es zu einer Überbeanspruchung der körpereigenen Schutzmechanismen bzw. erfolgt keine adäquate therapeutische Unterstützung, so werden primär nicht betroffene Organe geschädigt. Folgen sind u.a. generalisierte Permeabilitätsstörungen mit Bildung interstitieller Ödeme und Organdysfunktionen, die sich letztendlich bis zum kompletten Organversagen verschlimmern können. Sind gleichzeitig mehrere Organsysteme betroffen, spricht man von einem Multiorganversagen. Nahezu 30% aller Traumapatienten entwickeln ein Multiorganversagen, das trotz modernster therapeutischer Maßnahmen in bis zu 80% der Fälle letal endet (Goris 1985/ Hoch 1993). 1992 wurde die Bezeichnung „Multiorganversagen“ durch den Begriff des „Multiplen Organ- Dysfunktions-Syndroms“ (MODS) ersetzt (The ACCP/ SCCM Consensus Conference Committee 1992). Das MODS wird, abhängig vom Zeitintervall zwischen seiner Manifestation und der verursachenden Noxe, unterteilt in das:

- primäre MODS, das unmittelbar nach dem Organtrauma aufgrund der Hypoxie entsteht ,
- sekundäre MODS, das sich erst 3- 14 Tage nach dem schädigenden Ereignis manifestiert.

Das sekundäre MODS ist charakterisiert durch die Dysfunktion von Organsystemen, die bei der Polytraumatisierung primär keinen Schaden erlitten haben, sowie durch das Auftreten Tage bis Wochen nach dem initialen Trauma.

## **1.2 Der hypovolämische / hämorrhagische Schock**

Im Rahmen eines Polytraumas kommt es häufig neben der traumabedingten Gewebsschädigungen zu einem hohen Blutverlust des Patienten. Je nach Schwere des Blutverlustes kann sich daraus ein hämorrhagischer Schock (Volumenmangelschock) entwickeln. In solchen Fällen spricht man von einem hämorrhagisch-traumatischen Schock. Der hämorrhagische Schock kann sowohl durch einen äußeren als auch durch einen inneren Blutverlust verursacht werden. „Schock“ allgemein ist definiert als eine akute Minderdurchblutung lebenswichtiger Organe mit Hypoxie oder Anoxie (als Ausdruck eines Missverhältnisses zwischen Sauerstoffbedarf und Sauerstoffangebot) und nachfolgender Ansammlung von Stoffwechselprodukten (Silbernagel/ Despopoulos 1990). Infolge des Schocks kommt es zu Störungen des Zellstoffwechsels. Kennzeichen des hämorrhagischen Schocks ist eine akute kritische Abnahme des intravaskulären Volumens mit gleichzeitigem Verlust der Sauerstofftransportkapazität. Es kommt zu einer verminderten Kapillardurchblutung, einem herabgesetzten venösen Rückstrom zum Herzen, verminderter rechts- und linksventrikulärer Füllung und somit zu einer Reduktion des Herzzeitvolumens. Infolge des verminderten Herzzeitvolumens entwickeln sich Veränderungen auf der Ebene der Makro- und Mikro-zirkulation, im Gewebsstoffwechsel und im Immunsystem. Aufgrund der Reduktion der zirkulierenden Blutmenge, der daraus resultierenden Hypotension und der Abnahme der Sauerstoffträger kommt es zur Ischämie verschiedener Organsysteme. Als Ischämie bezeichnet man die Minderdurchblutung eines Gewebes/ Organs infolge unzureichender (= relative Ischämie) oder fehlender (= absolute Ischämie) Blutzufuhr. Im Zustand der relativen Ischämie genügt die noch vorhandene Blutmenge, um das Organ/ Gewebe im Ruhezustand zu versorgen; im Zustand besonderer Anforderung ist die Blutzufuhr jedoch unzureichend und es kommt zu Ausfallserscheinungen (Stünzi/ Weiss 1990).

Die Ischämie kann in eine „kalte“ und eine „warme“ Form unterteilt werden. Die „kalte“ Ischämie ist gekennzeichnet durch die vollständige Unterbindung der Blutversorgung eines Gewebes; sie kommt z. B. im Rahmen einer Organtransplantation vor. Nach der Entnahme des betreffenden Organs (z.B. der Leber) aus dem Spenderorganismus unterliegt dieses während des Transportes zum Empfängerorganismus einer längeren Phase kalter Ischämie.

Als "warme Ischämie" bezeichnet man die zeitweise Unterversorgung eines Gewebes/ Organs innerhalb des lebenden Organismus bei Normothermie, wie sie z.B. im Verlauf des hämorrhagischen Schocks gesehen wird. Als Reaktion auf den Blutverlust und den damit verbundenen Abfall des arteriellen Blutdrucks wird im Organismus reflektorisch eine sympathoadrenerge Reaktion ausgelöst. Dabei melden zunächst Dehnungs- und Chemorezeptoren, die im Aortenbogen und im Carotissinus liegen, den Blutverlust an das Vasomotorenzentrum in der Pons und Medulla oblongata. Als weitere Reaktion wird eine Steigerung des Sympathikotonus, die Zunahme der postganglionären Katecholaminfreisetzung und eine vermehrte Hormonproduktion der Nebenniere beobachtet. Das ausgeschüttete Adrenalin führt über die Erregung von  $\beta$ 1-Rezeptoren zu einer Steigerung der Herzfrequenz und der Kontraktilität des Herzens. Aufgrund der peripheren Vasokonstriktion, die  $\alpha$ -rezeptorvermittelt erfolgt, kommt es zu einer Steigerung des Gesamtgefäßwiderstandes. Ziel dieses kompensatorischen Mechanismus ist es, den Perfusionsdruck durch den erhöhten Gefäßwiderstand anzuheben und so den Abfall des Herzzeitvolumens auszugleichen. Auf diese Weise wird die Restblutmenge zugunsten primär wichtiger Organsysteme (v.a. Herz, Gehirn) umverteilt, um deren adäquate Perfusion sicherzustellen. Folge dieser Kreislaufzentralisation ist die Minderdurchblutung des Splanchnikusstromgebietes, der Nieren, der Muskulatur und der Haut. Durch Aktivierung des Renin-Angiotensin-Aldosteronsystems kommt es zur Verstärkung dieser Vasokonstriktion. Die Ausschüttung von antidiuretischem Hormon (ADH) bewirkt eine Erhöhung der Wasserrückresorption im Nierenmark.

Diese ersten Reaktionen des Körpers auf einen Abfall der zirkulierenden Blutmenge werden als kompensatorische Schockphase bezeichnet. Sie bewirken im günstigsten Fall (bei moderatem Blutverlust) einen klinischen Ausgleich der Schocksituation. Ist der Blutverlust jedoch größer und gelingt es dem Körper nicht, den Blutverlust auszugleichen, kommt es im Rahmen der Schockkompensation zu schwerwiegenden Störungen. Diese beruhen auf einer zeitlich verzögerten, progressiven Vasodilatation, einem kontinuierlichen Abfall des peripheren vaskulären Widerstandes (Bond 1967) trotz Zunahme der Aktivität sympathischer Nerven (Gonzales 1974) und einer reduzierten Antwort des Gefäßsystems auf Vasokonstriktoren (darunter Norepinephrin (Mellander 1963), Epinephrin (Manger 1957) und Tyramin (Harrison 1964)).

Der Beginn dieser vaskulären Veränderungen stimmt zeitlich mit dem Übergang der reversiblen in die irreversible Schockphase (Bond 1985) überein. In den meisten Fällen resultiert die vaskuläre Dekompensation im Tod.

### **1.3 Das Ischämie- Reperfusionssyndrom**

Als Reaktion auf den hypoxisch- ischämischen Zustand wird der Energiebedarf der Zelle zunehmend durch anaerobe Glycolyse gedeckt. Desweiteren kommt es zum Verbrauch von energiereichem Phosphat, bei dessen Abbau als Endprodukt Hypoxanthin entsteht. Als Folge dieser veränderten metabolischen Stoffwechsellage reichern sich Xanthin und Hypoxanthin an. Aufgrund des ischämiebedingten Versagens der Kalziumpumpe steigt der intrazelluläre  $Ca^{2+}$  Spiegel an, was wiederum für die Umwandlung der für den Hypoxanthinabbau verantwortlichen Xanthindehydrogenase in Xanthinoxidase mitverantwortlich ist.

Im Zustand der Hypovolämie ist es wichtig, durch adäquate Volumensubstitution die Kreislaufdepression und Zentralisierung möglichst schnell zu beenden. Als erwünschte Folge der Volumensubstitution kommt es zur Reperfusion und Reoxygenierung der zuvor minderdurchbluteten und mit Sauerstoff unterversorgten Gebiete. Jedoch hat die Reperfusion und Reoxygenierung dieser Gebiete nicht nur Vorteile. Die Schäden, die während der Reperfusion entstehen, werden in z.T. erheblichem Umfang durch den Einstrom von Sauerstoff in zuvor ischämisches Gewebe verursacht. In dieser so genannten postischämischen Phase kommt es zur Entwicklung des Ischämie- Reperfusionsschadens infolge spezifischer Entzündungsprozesse (Flaherty 1988).

In der initialen Phase der Reperfusion/ Reoxygenierung baut die Xanthinoxidase Hypoxanthin und Xanthin zu Harnsäure ab. Der in dieser Phase anflutende Sauerstoff dient der Xanthinoxidase dabei als Elektronenakzeptor. Als Produkt dieses Elektronentransfers entstehen Superoxidanionen (Mc Cord 1995), die im Folgenden in der so genannten Haber- Weiss- Reaktion durch das Enzym Superoxiddismutase (SOD) zu Wasserstoffperoxid reduziert werden. Bei der Bildung von hochreaktiven Hydroxylradikalen aus dem akkumulierten Wasserstoffperoxid dient freies Eisen als Katalysator (Fenton- Reaktion).

Die Hydroxylradikale können z.B. aus mehrfach ungesättigten Fettsäuren, die den Hauptbestandteil aller Phospholipidmembranen darstellen, Wasserstoffatome abspalten (Lipidperoxidation). Als Endprodukte entstehen organische Hydroperoxide und deren Radikale (Rose 1994 a). Durch diese Reaktionen kommt es zu einer Schädigung der Zellmembranen v.a. von Endothelzellen (Bartlett 1996), was als eine Ursache der Entwicklung generalisierter endothelialer Permeabilitätsstörungen (capillary leakage) angesehen wird. Infolge der veränderten Gefäßpermeabilität entwickeln sich interstitielle und intrazelluläre Ödeme, die den Austausch von Sauerstoff und Nährstoffen stören, indem sie die Diffusionsstrecke vergrößern; es kommt zu einer Zelldysfunktion bis hin zur Zellnekrose. Unter diesen Bedingungen steigt die Konzentration der Lipidperoxidationsprodukte im Serum signifikant an, was auf einen oxidativen Schaden der Zellmembran hinweist (Rose 1994 b).

Abb. 1 fasst den derzeitigen Kenntnisstand zur Entstehung des Reperfusionsschadens graphisch zusammen.



## 1.4 Der Arachidonsäurestoffwechsel

Eine Vielzahl hochpotenter, entzündungsfördernder und permeabilitätssteigernder Lipidmediatoren, Eicosanoide genannt, haben die Arachidonsäure als Ausgangssubstrat (Decker 1990). Eicosanoide sind Gewebshormone, die einer raschen Eliminierung unterliegen und ihre Wirkung nur über kurze Strecken entfalten. Arachidonsäure ist eine aus 20 C-Atomen aufgebaute Fettsäure, die vier Doppelbindungen besitzt. Sie ist Bestandteil der Phospholipide der Zellmembran. Die zytosolische calciumabhängige Phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) spaltet Arachidonsäure aus den Phospholipiden der Zellmembran ab. Ihr wird nach Trauma und Sepsis eine proinflammatorische Wirkung zugeschrieben. Die membranständige Phospholipase C (PLC) mobilisiert rezeptorvermittelt die Arachidonsäure.

Es existieren zwei Stoffwechselwege, an deren Anfang das Salz der Arachidonsäure (Arachidonat) steht. Zum einen der Cyclooxygenaseweg, dessen Endprodukte Prostaglandine des Typs PG<sub>2</sub>, Prostacyclin und Thromboxane sind; das katalysierende Enzym ist die Cyclooxygenase (COX). Zum anderen der Lipoxigenaseweg, dessen Endprodukte die Leukotriene sind. Sie haben vergleichbare Wirkungen wie die Produkte des Cyclooxygenaseweges: Rekrutierung inflammatorischer Zellen, Veränderung von Vasomotorik und Gefäßpermeabilität und Beeinflussung der Aggregation von Thrombozyten (Sigal 1991).

## **1.5 Die posttraumatische Immunmodulation**

Die posttraumatische Inflammation wird durch komplexe Interaktionen verschiedener Mediatoren gesteuert. Zu diesen Mediatoren zählt zum einen die Gruppe der:

### **1.5.1 Eicosanoide**

Sie entstehen über den Cyclo- bzw. Lipoxigenaseweg aus Arachidonsäure. Zu ihnen gehören:

#### **1.5.1.1 Prostaglandine**

Prostaglandine sind zyklische, oxygenierte C-20-Fettsäuren mit einem Zyklopentanring. Neben ihrer Funktion als Entzündungsmediatoren aktivieren sie polymorphkernige neutrophile Granulozyten und erhöhen die c-AMP- Spiegel in Thrombozyten, fetalem Knochen, Schilddrüse, Lunge, Corpus luteum und Hypophysenvorderlappen.

Vor allem PGE<sub>2</sub> kommt aufgrund seiner immunsupprimierenden Eigenschaft eine zentrale Bedeutung in der posttraumatischen Immunmodulation zu (O' Mahony 1984).

#### **1.5.1.2 Thromboxane**

Thromboxane bewirken Thrombozytenaggregation und Vasokonstriktion; ihr Syntheseort sind die Thrombozyten (Silbernagel/ Despopoulos 1990). Thromboxan A<sub>2</sub> spielt u.a. nach Ischämie/ Reperfusion und nach Trauma eine wesentliche Rolle bei der Rekrutierung inflammatorischer Zellen, bei der Veränderung der Vasomotorik und der Gefäßpermeabilität und bei der Beeinflussung der Aggregation von Thrombozyten (Sigal 1991).

#### **1.5.1.3 Prostacycline**

Sie sind potente Hemmstoffe der Thrombozytenaggregation und werden vornehmlich von Endothelzellen synthetisiert. Die Wirkung des Prostacyclins I<sub>2</sub> (PGI<sub>2</sub>) ist der Wirkung von Thromboxan A<sub>2</sub> entgegengesetzt.

#### **1.5.1.4 Leukotriene**

Sie werden über den Lipoxigenaseweg aus Arachidonsäure in neutrophilen und eosinophilen Granulozyten, in Gewebsmakrophagen und Mastzellen gebildet. Sie dienen als Mediatoren für Entzündungen und allergische Geschehen. Leukotrien B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) bewirkt z.B. einen Anstieg des Gefäßtonus sowie eine Zunahme der Gefäßpermeabilität.

Desweiteren steuert der Plättchen-aktivierende Faktor (PAF) die posttraumatische Immunmodulation.

#### **1.5.2 Plättchen-aktivierender Faktor (PAF)**

PAF wird von einer Reihe von Blutzellen (neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, Monozyten, Makrophagen) und von Endothelien gebildet. Mit Hilfe der Phospholipase A<sub>2</sub> wird PAF aus präformierten Ätherlipiden der Zellmembran freigesetzt und ist unter physiologischen Bedingungen ein sehr aktiver und lokal hochpotenter Mediator (Ostermann 1990).

Die Wirkung des PAF hat besondere Bedeutung durch die Aktivierung und das Priming von Makrophagen und Leukozyten mit Freisetzung von TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-2, Proteasen und Sauerstoffradikalen.

Eine weitere Gruppe von Entzündungsmediatoren wird unter dem Begriff der Zytokine zusammengefasst.

#### **1.5.3 Zytokine**

Zytokine sind Polypeptidhormone, die lokal ausgeschüttet werden und über para- und autokrine Mechanismen ihre Wirkung entfalten. Im Anschluss an ein Polytrauma kommt es zur Ausbildung einer sogenannten posttraumatischen Zytokinämie. Bereits 45 Minuten nach Induktion einer Hämorrhagie lässt sich ein Anstieg proinflammatorischer Zytokine nachweisen (Chaudry 1990).

Zu den Zytokinen zählen u.a.:

### **1.5.3.1 Tumornekrosefaktor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )**

TNF- $\alpha$ , auch Kachektin genannt, wird vornehmlich in Makrophagen synthetisiert und in der frühen Phase der Hypoxie gebildet. Kachektin ist eines der potentesten Zytokine. TNF- $\alpha$  bewirkt durch Interaktion mit spezifischen Rezeptoren eine Zunahme der Bildung von Sauerstoffradikalen durch Phagozyten. Unter der Wirkung von TNF- $\alpha$  bilden Makrophagen, Leukozyten, Granulozyten und Endothelzellen vermehrt IL-1, IL-6, IL-8, Interferon, Prostaglandin E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), Platelet activating factor (PAF) und Platelet derived growth factor (PDGF). Durch die vermehrte Freisetzung von Prostacyclin und endotheliale Relaxingfaktor (EDRF) als Reaktion auf TNF- $\alpha$  leitet dieser die frühe vasodilatatorische Phase der Entzündung ein. TNF- $\alpha$  ist auch maßgeblich an der Entstehung der post-traumatischen Permeabilitätsstörungen beteiligt, indem es die Interaktion von Leuko-, Lympho- und Monozyten mit Endothelzellen stimuliert. Außerdem bewirkt TNF- $\alpha$  die Degranulation und Aktivierung von Leukozyten. Bisher konnte TNF- $\alpha$  u.a. im Zusammenhang mit schwerer Hämorrhagie und im Endotoxinschock nachgewiesen werden. Im Zusammenwirken mit anderen Mediatoren bewirkt TNF- $\alpha$  Hypertriglyzeridämie, Hyperglykämie, Proteinkatabolismus und Hyperlaktatämie (Dargel 1995).

### **1.5.3.2 Interleukin 1 (IL- 1)**

IL-1 wird in erster Linie von Monozyten, Makrophagen und neutrophilen Granulozyten gebildet. Es liegt in 2 Formen (IL-1 $\alpha$  und IL-1 $\beta$ ) vor, die eine ähnliche biologische Aktivität besitzen. In den ersten Stunden nach traumabedingtem Schock ist IL-1 $\beta$  nicht nachweisbar. Durch IL-1 wird die Bildung von Interleukinen, TNF- $\alpha$ , unterschiedlichen protektiven Proteinase, sowie die Genexpression von PLA<sub>2</sub>, Cyclo- und Lipoxigenase induziert. Die Produktion von IL-1 und IL-2 ist während der ersten 5 Tage nach Trauma supprimiert (Rodrick 1986).

#### **1.5.3.3 Interleukin 6 (IL- 6)**

IL-6 wird hauptsächlich von Monozyten, Makrophagen, Fibroblasten und Endothelzellen nach Stimulation durch IL-1, TNF- $\alpha$ , Tumor Growth Factor  $\beta$  (TGF- $\beta$ ) und Endotoxin gebildet. Die Konzentration von IL-6 ist nach einem Polytrauma bereits frühzeitig im Plasma erhöht. Die Hauptfunktion von IL-6 ist die Induktion der hepatischen Akut- Phasen- Proteinsynthese (Miller-Graziano 1990).

#### **1.5.3.4 Interleukin 8 (IL- 8)**

IL-8 wird nach Stimulation durch TNF- $\alpha$ , IL-1 und verschiedene Bakterienprodukte von unterschiedlichen Zelllinien gebildet. Es gilt als Hauptmediator der Sauerstoffradikalproduktion, der Chemotaxis und der Diapedese von Granulozyten. Bei Patienten mit ARDS und letalem Ausgang sind die Plasmakonzentrationen von IL-8 früh erhöht; in der Spätphase zeigt sich ein signifikanter Anstieg (Meduri 1995).

#### **1.5.3.5 Interleukin 10 (IL- 10)**

IL-10 wird von Monozyten und Makrophagen gebildet. Aufgrund seiner suppressiven Wirkung auf die Freisetzung von IL-1 und TNF- $\alpha$  wird ihm eine antiinflammatorische Wirkung zugesprochen (Rose/ Marzi 1996).

#### **1.5.3.6 Interferon- $\gamma$ (IF- $\gamma$ )**

IF- $\gamma$  wird von T-Zellen synthetisiert. Es stimuliert die Aktivität natürlicher lymphozytärer Killerzellen, die Produktion von Radikalen durch Monozyten und Leukozyten, die Phagozytoseaktivität sowie die Freisetzung von IL-1 und TNF- $\alpha$  aus Makrophagen. Außerdem spielt IF- $\gamma$  eine wichtige Rolle bei der Präsentation von Antigenen durch Makrophagen und Monozyten. Die Expression von endothelialen Adhäsionsmolekülen (ICAM-1, ELAM-1) wird unter der Wirkung von IF- $\gamma$  zusammen mit TNF- $\alpha$  stimuliert (Faist 1988).

### **1.5.3.7 Koloniestimulierende Faktoren (Granulocyte/ Monocyte-CSF)**

Koloniestimulierende Faktoren werden von Leukozyten und Makrophagen synthetisiert. Sie stimulieren die Rekrutierung von Leukozyten im Knochenmark. In klinischen Studien zeigte sich im Tierversuch, dass die posttraumatische Gabe von GM-CSF eine Sepsisentwicklung verhindert (Gorgen 1992).

### **1.5.3.8 Transforming Growth Factor- $\beta$ (TGF- $\beta$ )**

TGF- $\beta$  wirkt als Stimulans für die Bildung von Adhäsionsmolekülen und Zytokinen. Er besitzt eine große Bedeutung bei der posttraumatischen Wundheilung, da er die Neubildung der Matrix fördert. Außerdem bewirkt er die Hemmung der Blutbildung, der Immunglobulinfreisetzung, sowie der T- und B- Zellproliferation. TGF- $\beta$  gilt als potentes Chemotaxin für neutrophile Granulozyten und Makrophagen.

## **1.6 Aktivierung polymorphkerniger Granulozyten und die Leukozyten- Endothel- Interaktion**

An der Entstehung des postischämischen Reperfusionsschadens sind sowohl o.g. Mechanismen als auch Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel beteiligt. In einem ersten Schritt kommt es in Endothelzellen, die von inflammatorischen Faktoren (z.B. freien Sauerstoffradikalen, Histamin, Thrombin und verschiedenen Zytokinen) stimuliert wurden, zur Verschmelzung der Weibel-Palade Granula mit der Zellmembran. Als Folge dieses Vorganges werden präformierte, in den Endothelzellen gespeicherte Adhäsionsmoleküle (Selektine, P-Selektin (=GMP-140)) an der Zelloberfläche exprimiert (Mc Ever 1989/ Patel 1991). Im weiteren Verlauf kommt es zur Adhäsion nicht- aktivierter Granulozyten über korrespondierende, leukozytäre Kohlenhydratrezeptoren (Sialyl-Lewis-X, LECAM-1) (Picker 1991).

Das „Slow- Rolling- Phänomen“ von Leukozyten in postkapillären Venolen wird ebenfalls über Selektine (L- Selektin (=LECAM-1)) vermittelt (Ley 1991/ von Andrian 1991). Als Folge der Annäherung von Leukozyten und Endothel kommt es zu einer Signalübertragung über PAF und PAF- Rezeptoren, was sich in einem Anstieg des intrazellulären Calciums der Leukozyten zeigt (Kuijpers 1992).

Nach/ bzw. durch die Signalübertragung kann es entweder zu einer Abstoßung (shedding) der beteiligten Rezeptoren kommen, die danach im Blut als frei zirkulierende Adhäsionsmoleküle nachzuweisen sind, oder aber es wird in einem weiteren Schritt das ELAM-1- Adhäsionsmolekül (=E-Selektin) auf der Endothelseite exprimiert, das mit den entsprechenden, bereits auf nicht- aktivierten Leukozyten exponierten Rezeptoren (Sialyl- Lewis-X oder L- Selektin) korrespondiert und eine festere Adhäsion zwischen Leukozyt und Endothel bewirkt (Jutila 1992/ Picker 1991). Außerdem kommt es zu einer Bindung zwischen den interzellulären, am Endothel normalerweise präsenten Adhäsionsmolekülen der Immunglobulin Superfamilie (v.a. ICAM-1) mit korrespondierenden Integrinen auf der Leukozytenseite (v.a. MAC-1 Komplex der Integrine CD 11b/ CD 18). Es konnte beobachtet werden, dass ICAM-1 v.a. 4-24 Stunden nach Aktivierung durch z.B. TNF oder IL-1 exprimiert wird (Pober 1990a/ 1990b). Folge ist eine feste Bindung zwischen Endothel und Leukozyt, was wiederum Voraussetzung für die Migration der Leukozyten sowohl durch die Endothelzellen als auch durch den interzellulären Spalt hindurch in das interstitielle Gewebe ist (Jutila 1992/ von Andrian 1991).

## **1.7 Änderung der Gewebedurchblutung und der Mikrozirkulation im hypovolämischen Schock**

Die Mikrozirkulation stellt das Bindeglied zwischen Kreislaufsystem und den zu versorgenden Strukturen (Organe, Gewebe, Zellen) dar. Unter dem Begriff der Mikrozirkulation werden alle Blutgefäße mit einem Durchmesser  $< 300\mu\text{m}$  (einschließlich der terminalen Arteriolen, der Kapillaren, der postkapillären Venolen, der initialen Lymphgefäße) und das in diesen Gefäßen fließende Blut zusammengefasst. Infolge der schockbedingten kompensatorischen Vasokonstriktion der prä- und postkapillären Widerstandsgefäße kommt es zu einer Veränderung sowohl der Quantität als auch der Qualität der kapillären Perfusion. Es entwickelt sich eine inhomogene Perfusion der Kapillargebiete. Infolge der Umstellung vom aeroben auf den anaeroben Stoffwechsel entstehen Laktat und saure Metabolite, welche im Gewebe akkumulieren, da sie aufgrund der mangelnden Durchblutung nicht abtransportiert werden können.

Doch nicht nur der schockbedingte Volumenmangel und der daraus resultierende verminderte Perfusionsdruck sind für die Minderdurchblutung der Gewebe verantwortlich. Durch die Anheftung von Leukozyten am Gefäßendothel und die Ansammlung von Erythrozyten und Thrombozyten kann es zum kompletten Verschluss von Gefäßen kommen, in dessen Folge eine lokale Gewebischämie entsteht, die zu schwersten Zellschäden führt. Neben der kompensatorischen sympathoadrenergen Reaktion und der Verlegung von Gefäßlumina durch sich ansammelnde und am Endothel anhaftende Zellen sind auch endogene Mediatoren an der Entstehung von Mikrozirkulationsstörungen beteiligt. Diese Mediatoren haben vasokonstriktorische bzw. vasodilatatorische Wirkung. Unter physiologischen Bedingungen liegt eine ausgewogene Balance zwischen vasokonstriktorischen und vasodilatatorischen Mediatoren vor, die den Gefäßtonus regulieren (Janssens 1994/ Marzi 1996).

## **1.8 Endogene Mediatoren mit vasoaktiver Wirkung**

### **1.8.1 Stickstoffmonoxid (NO)**

1980 wurde erstmals die Wirkung eines vasodilatatorischen endogenen Mediators beschrieben, der als „Endothelium derived relaxing factor (EDRF)“ bezeichnet wurde (Furchgott & Zawadski 1980). Im Folgenden wurde der EDRF- Faktor als Stickstoffmonoxid (NO) identifiziert (Palmer 1987). NO ist ein membranpermeables, lipophiles Molekül, das von einer Vielzahl von Zellen (Endothelzellen, Endocardzellen, neutrophilen Granulozyten, Thrombozyten, Neuronen, Retinazellen, Mesangialzellen, Mastzellen, Chondrozyten, Hepatozyten, Zellen der Nebenniere und Zellen nicht- adrenerger- nicht- cholinerges Nerven) synthetisiert wird (Moncada 1991).

Da die endothelabhängige Relaxation in Arterien größer ist als in Venen, ergibt sich der Schluss, dass die Endothelzellen der Arterien im Vergleich zu den Venen eine größere Menge NO produzieren (Moncada 1993).

NO entfaltet seine Wirkung über die Aktivierung der intrazellulären Guanylatcyclase. In einem ersten Schritt diffundiert NO in das Zytosol der Zelle, wo es am Eisen der Hämkomponente der Guanylatcyclase bindet. Nach der Anbindung von NO löst sich das Eisen aus der Ebene des Porphyrinringes heraus, wodurch die Guanylatcyclase in ihre aktivierte Form übergeht. Infolge der Aktivierung steigt der Spiegel des zyklischen Guanosinmonophosphates (c- GMP). Als Folge davon sinkt die  $Ca^{2+}$ - Konzentration durch verstärktes Extrudieren des  $Ca^{2+}$  und dessen Sequestrierung in den intrazellulären Raum. Das Absinken der intrazellulären  $Ca^{2+}$ - Konzentration ist für die NO- vermittelte Relaxation der glatten Muskelzellen, für die Hemmung der Aggregation und Adhärenz von Thrombozyten, für die Hemmung der neutrophilen Chemotaxis und für die Signal- Transduktion in das zentrale und periphere Nervensystem verantwortlich (Szabó 1999).

Außer der Vasodilatation besitzt NO noch eine Reihe c- GMP- unabhängiger Wirkungen: es wirkt in höheren Dosen als zytostatisches und zytotoxisches Molekül gegen Pilze, Bakterien, Protozoen, Würmer und Tumorzellen. Die zytotoxischen Effekte von hohen lokalen NO- Konzentrationen führen zu einer Blockade der mitochondrialen Fe- S- Schlüsselenzyme (Nathan 1992).

NO wird mit Hilfe der NO- Synthetase aus einem der beiden terminalen Guanidin-Stickstoffatome der Aminosäure L- Arginin synthetisiert; dabei katalysiert die NO-Synthetase die Oxidation von L- Arginin zu Zitrullin + NO (Marletta 1993).

1991 konnten drei unterschiedliche Formen der NO- Synthetase dargestellt werden, die sich in ihrer Aminosäuresequenz und in ihrer Lokalisation unterscheiden (Moncada 1991/ Förstermann 1991). Ihnen sind jedoch fünf prosthetische Gruppen gemeinsam (Szabó 1999):

- Flavin- Adenin- Dinucleotid
- Flavin- Mononucleotid
- Tetrahydrobiopterin
- Eisenprotoporphyrin IX
- Zink

Bei allen NOS- Isoformen ist die Bildung von NO an die Aufnahme von molekularem Sauerstoff in das Enzymmolekül gekoppelt (Szabó 1999).

### **1.8.1.1 Die drei Formen der NO- Synthetase**

- **Die endotheliale/ konstitutive NO-Synthetase (ec- NOS)**

Die ec- NOS, auch als Typ 3- NOS bezeichnet, ist ein permanent präsenten Enzym. Sie bildet kontinuierlich/ konstitutiv geringe NO- Mengen und ist dabei abhängig von Calcium, Calmodulin und NADPH (Marletta 1993 / Stuehr 1997/ Geller 1998). Sie ist in Endothelzellen lokalisiert und dort zum größten Teil membrangebunden (Michel 1993).

Die ec- NOS wird zur Aufrechterhaltung der kardiovaskulären Homöostase benötigt. Das von der ec- NOS in picomolaren Mengen synthetisierte NO übt einen massiven Einfluss auf den Blutdruck und den Gefäßtonus im Ruhestadium aus und hält das Gefäßsystem in einem Zustand aktiver Vasodilatation (Rees 1989). Es ist außerdem in die Regulation der Organdurchblutung (Moncada 1991) und der Hemmung der Adhäsion von Blutplättchen und polymorphkernigen neutrophilen Granulozyten (PMN) am Gefäßendothel (Vane 1994) involviert.

- **Die neuronale/ Gehirn NO-Synthetase (b- NOS)**

Die b- NOS wird auch als Typ 1- NOS bezeichnet. Sie ist ebenso wie die ec- NOS von Calcium, Calmodulin und NADPH abhängig und wird konstitutiv exprimiert (Marletta 1993/ Stuehr 1997/ Geller 1998). Die b- NOS trägt zu wichtigen Neuroeffektormechanismen im zentralen und peripheren Nervensystem bei.

- **Die induzierbare NO-Synthetase (i- NOS)**

Die auch als Typ 2- NOS bezeichnete i- NOS ist NADPH- und calmodulinabhängig, jedoch calciumunabhängig (Marletta 1993/ Stuehr 1997/ Geller 1998). Die i- NOS wird nicht kontinuierlich gebildet; ihre Expression in verschiedenen Zellen und Geweben (darunter Makrophagen, glatte Gefäßmuskelzellen, Fibroblasten und Hepatozyten) geschieht infolge Einwirkung verschiedener Stimuli (z.B. Endotoxineinfluss, Einfluss proinflammatorischer Zytokine (Moncada 1993), anhaltende Hämorrhagie (Nussler 1993)). Im hämorrhagischen Schock ist die Bildung von NO erhöht (Thiemermann 1993). Bei der Messung von NO- Hb-Komplexen in Blutproben von Ratten mit hämorrhagischem Schock mittels Elektronen- Spin- Resonanz- Spektroskopie sind bereits zwei Stunden nach Schockinduktion erhöhte Werte messbar (Westenberger 1990).

Die i- NOS produziert nanomolare NO-Mengen, die an der Entstehung von Zell- und Organdysfunktionen beteiligt sind und bei Hämorrhagie, Anaphylaxie und Trauma beobachtet werden (Szabó 1994). TNF- $\alpha$  und IL-1 können die Expression der i- NOS stimulieren, was zu einer NO- Überproduktion in verschiedenen Organen in vivo führt (Thiemermann 1993). Die i- NOS ist an der physiologischen Wirts- Abwehr- Reaktion beteiligt (so trägt sie z. B. zur Abtötung von Bakterien durch aktivierte Makrophagen bei).

Die Produktion großer NO Mengen kann für das Wirtsgewebe jedoch auch negative Auswirkungen haben (Gabor 1998). So führt die exzessive Bildung von NO zur Synthese von Peroxinitrit, indem NO mit den in der Hämorrhagie entstandenen Superoxidanionen reagiert. Peroxinitrit ist ein hochreaktives, zytotoxisches Molekül, das u. a. Lipidperoxidation bewirkt, die Membranionenpumpen und die mitochondriale Zellatmung hemmt und verschiedene Proteine modifiziert. Folge dieser Wirkungen sind zelluläre Energieverarmung, zelluläre Dysfunktion und letztendlich Zelltod (Beckmann 1991).

### **1.8.2 Endothelin (ET)**

Endotheline gehören zur Familie der Isopeptide; v.a. ET-1 ist ein hochpotenter und langwirkender Vasokonstriktor (Yanagisawa 1988). Seine Wirkung wird in erster Linie über den ET- A- Rezeptor vermittelt (Battistini 1996). Die vasokonstriktorisches Effekte können durch die vasodilatatorische Wirkung von NO moduliert werden (Lüscher 1990). Unter physiologischen Bedingungen besteht ein dynamisches Gleichgewicht zwischen diesen beiden Mediatorsystemen, wodurch eine adäquate Durchblutung des Gewebes sichergestellt wird. Vemulapalli et al. konnten 1994 eine Erhöhung des Plasma- ET- 1- Spiegels bei Ratten mit hämorrhagischem Schock nachweisen (Vemulapalli 1994). Zimmermann et al. konnten 1994 diese Ergebnisse bestätigen und fanden zudem heraus, dass die Blockade des isopeptidspezifischen ET- A- Rezeptors in der frühen Phase nach hämorrhagischem Schock in einem niedrigeren systemischen vaskulären Widerstand und in einem niedrigeren mittleren arteriellen Blutdruck verglichen mit der Schockinduktion ohne ETA- Rezeptorblockade resultiert (Zimmermann 1994).

Pannen et. al. zeigten in ihrer Studie 1997, dass die über ET-A- Rezeptoren vermittelte Vasokonstriktion durch eine NO- vermittelte Vasodilatation ausgeglichen wird. Dies bewirkt, dass sowohl der systemische Gesamtgefäßwiderstand als auch der mittlere arterielle Blutdruck und das Cardiac output auf gleichem Niveau bleiben wie vor der Schockinduktion (Pannen 1997).

### **1.8.3 Kohlenmonoxid (CO)**

Kohlenmonoxid, ein Intermediärstoffwechselprodukt des Hämabbaues, wirkt über Stimulation der Guanylatzyklase vasodilatatorisch (Brüne 1990). Das Enzym, das endogenes CO generiert, ist die mikrosomale Hämoxigenase (HO).

Ähnlich der NO- Synthetase gibt es 2 verschiedene Formen der Hämoxigenase:

- a) die konstitutive Hämoxigenase (HO-2),  
die permanent zu finden ist
- b) die induzierbare Form der Hämoxigenase (HO-1),  
auch Hitzeschockprotein 32 (hsp 32) genannt; sie wird durch besondere Stressereignisse (z.B. Hyperthermie) induziert (Erwing 1991).

Grundsätzlich sind alle Zellen zur Bildung von Hitzeschockproteinen fähig (De Maio 1995). Raju und Maines konnten 1996 zeigen, dass eine lokale Minderperfusion der Niere eine systemische Induktion der HO-1 bewirkt (Raju 1996). 1997 zeigten Bauer et al. an einem Modell, in dem Ratten einem hämorrhagischen Schock ausgesetzt wurden, dass unter diesen pathologischen Bedingungen die HO-1 exprimiert wird. Als hauptsächlichen Ort der Expression der HO-1 konnten Bauer et al. das Lebergewebe ausmachen. Sie folgerten aus ihren Ergebnissen, dass die stressinduzierte HO-1 nach Hämorrhagie und anschließender Volumensubstitution in der Pfortaderzirkulation vasodilatatorische Wirkung hat und somit zur Aufrechterhaltung der Leberperfusion nach hämorrhagischem Schock beiträgt (Bauer M. 1997).

## **1.9 Die Bedeutung der Leber nach systemischer Ischämie und Reperfusion**

### **1.9.1 Anatomische Grundlagen**

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Organismus und nimmt aufgrund dieses Stellenwertes im Rahmen des Multiorganversagens eine zentrale Rolle ein. 1991 wies Hawker nach, dass die Mortalität beim „adult respiratory distress syndrome“ (ARDS = akute respiratorische Insuffizienz), verursacht z.B. durch ein Thoraxtrauma mit Lungenkontusion und beim MODS mit gleichzeitiger Leberdysfunktion erhöht ist (Hawker 1991). Die Bedeutung der Leber im Multiorganversagen wird durch ihre zentrale Bedeutung bei Stoffwechsel- und Detoxifikationsvorgängen, bei der Synthese verschiedener Mediatoren und im Zusammenhang mit der hepatischen Akut- Phasen- Reaktion deutlich (Marzi 1996). Unter physiologischen Bedingungen wird die Leber zu gleichen Teilen von der A. hepatica und der V. portae mit Sauerstoff versorgt. Die A. hepatica hat jedoch nur 25 % Anteil an der Lebergesamtdurchblutung (Vollmar 1992). Die morphologisch kleinste Einheit der Leber ist das Leberläppchen (Lobulus) mit einer zentralen Vene und dem peripheren Portalfeld. Die funktionell kleinste Einheit ist der Leberazinus nach Rappaport (Rappaport 1958). Das Zentrum des Azinus ist das Portalfeld mit seinen Gefäßen (Pfortaderast, Leberarterie, Gallengang). Nach Rappaport wird der azinäre Verlauf der Sinusoide in 3 Zonen gleicher Länge, vom Portalfeld ausgehend eingeteilt.

Zone 1 wird Periportalzone genannt; sie besitzt den höchsten Sauerstoffpartialdruck und die höchste Gluconeogeneserate (Rappaport 1973). Die Sinusoide der Zone 1 haben den geringsten Durchmesser.

Zone 2 befindet sich als funktioneller, topographischer und morphologischer Übergangsbereich zwischen Zone 1 und Zone 3. Sie wird auch midzonale Zone genannt (Rappaport 1973/ Komatsu 1990).

Zone 3, auch als Perizentralfeld bezeichnet, hat den niedrigsten Sauerstoffpartialdruck und die höchste Aktivität mikrosomaler Enzyme (Rappaport 1973). Die Sinusoide der 3. Zone besitzen den größten Durchmesser.

Unter allen Organen hat die Leber, was die Mikrozirkulation betrifft, eine besondere Stellung, da sie über eine doppelte arterielle und portale Perfusion und einen deutlichen Sauerstoffgradienten vom portalen zum zentralen Azinus hin verfügt (Matsumura 1986).

Die **Parenchymalzellen** der Leber werden Hepatozyten genannt. Sie machen 94% des Gesamtvolumens der Leber aus und sind die Orte der verschiedenen Stoffwechsellleistungen (Gluconeogenese, Proteinbiosynthese, Konjugation von Gallensäuren (Van Bossuyt 1988)).

Zwischen den Parenchymzellen und den Lebersinusoiden liegt der sogenannte Dissé'sche Raum, der auch Perisinusoidalraum genannt wird. Er besitzt große Poren, über die eine Verbindung zwischen den Parenchymzellen und den Sinusoiden hergestellt wird (Rappaport 1958). Innerhalb eines Leberläppchens nimmt der Sauerstoffgradient von portal nach zentral ab. Die Hepatozyten sind in den verschiedenen Regionen eines Azinus mit unterschiedlichen Enzymen ausgestattet. So überwiegt im periportalen Azinus die Gluconeogenese sowie der oxidative Stoffwechsel von Aminosäuren und Fettsäuren. Im perizentralen Teil des Azinus finden dagegen vornehmlich Glycogensynthese, Liponeogenese und Detoxifikationsprozesse statt (Jungermann 1982).

Die nichtparenchymalen Zellen der Leber (4% des Leberzellvolumens) umfassen:

**a) Endothelzellen**

Sie kleiden die Sinusoide aus und grenzen diese gegen den Perisinusoidalraum (Dissé'scher Raum) ab; dabei sind sie für Flüssigkeiten und partikuläres Material (z.B. Chylomikronen) permeabel. Die nur in den Endothelzellen der Leber existierende Fenestrierung (Porengröße ca. 100 nm) gewährleistet den Stoffaustausch zwischen Hepatozyt und Sinusoidalzelle. Desweiteren sind die Endothelzellen zur Endozytose befähigt, was bedeutet, dass sie z.B. Mikroorganismen, Erythrozyten oder verschiedene Makromoleküle eliminieren können.

### **b) Ortsständige Makrophagen (Kupffer'sche Sternzellen)**

Die Kupffer'schen Sternzellen liegen intrasinusoidal und machen 80% des reticuloendothelialen Systems aus. Die bei Detoxifizierungsprozessen aktivierten Makrophagen sind in der Lage, neben hochpotenten Mediatoren (u.a. Prostaglandine, Leukotriene, TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6), die lokal verschiedene Funktionen der Hepatozyten beeinflussen, auch reaktiven Sauerstoff zu bilden. Im Rahmen des hämorrhagischen Schockgeschehens kommt ihnen eine große Bedeutung bei der Entstehung des Reperfusionsschadens zu. 1990 zeigten Jaeschke et al., dass die Freisetzung zytotoxischer Mediatoren durch Kupfferzellen und neutrophile Granulozyten maßgeblich an der Entstehung der Zellschädigung beteiligt sind (Jaeschke 1990). Hughes konnte 1992 dieses Ergebnis stützen, indem er nachwies, dass die Entstehung von Reperfusionsschäden verhindert werden kann, wenn man die Fähigkeit der genannten Phagozyten, reaktiven Sauerstoff zu bilden, gezielt reduziert (Hughes 1992).

### **c) Ito-Zellen**

Die Ito-Zellen werden wegen ihres hohen Gehaltes an Fetttröpfchen auch Fettspeicherzellen genannt. Sie weisen einen hohen Vitamin A-Gehalt auf und sind zur Bildung von Typ III-Kollagen befähigt. Ito-Zellen verfügen über netzartige, perisinusoidale Filamente, die unter Einfluss der Kupffer'schen Sternzellen an der Regulation des Tonus der Lebersinusoide beteiligt sind (Wake 1993/ Marzi 1994a). Lokale Mediatoren (z.B. PGF<sub>2</sub>- $\alpha$ , Thromboxan A<sub>2</sub>, NO und Endothelin) regulieren die Kontraktion dieser Filamente (Kawada 1993a /Takei 1993). Kawada et al. wiesen 1993 in einer weiteren Studie die direkte Wirkung von Endothelin und NO auf Ito-Zellen nach, indem sie isolierte Ito-Zellkulturen, welche zuvor auf spezielle Silikonmembranen aufgebracht wurden, mit Endothelin bzw. einem NO-Donor behandelten. In ihrem Ergebnis stellten sie fest, dass sich die Ito-Zellen in Antwort auf das Endothelin 1 kontrahierten. Im Gegensatz dazu reagierten die Ito-Zellen auf Zusatz des NO-Donors Nitroprussid-Natrium mit Relaxation (Kawada 1993b).

#### **d) Pit- Zellen**

Ihre Bedeutung ist bisher nur teilweise geklärt. Es wird davon ausgegangen, dass es sich bei diesen Zellen um leberassoziierte natürliche Killerzellen handelt, die für die Bekämpfung von Lebertumoren und Metastasen von Bedeutung sind (Marzi 1994 a).

#### **1.9.2 Die hepatische Akut- Phasen- Reaktion**

Der hämorrhagische Schock sowie die durch ihn verursachte systemische und lokale Ausschüttung von Mediatoren (v.a. IL- 6, IL- 1, TNF-  $\alpha$  und Corticoide) durch Makrophagen, Monozyten, Endothelzellen und Fibroblasten induzieren die sogenannte hepatische Akut- Phasen- Reaktion, die sich im besonderen auf die Proteinsynthese der Leber auswirkt. Sie gilt als zentraler Mechanismus der post-traumatischen Entzündungsreaktion. Zu den hepatischen Akut- Phasen- Proteinen zählt man: Albumin, Haptoglobin, Transferrin, C- reaktives Protein, saures  $\alpha_1$ - Glycoprotein, Komplement 5 a und Coeruloplasmin. Diese Proteine sind für die Opsonierung und Präsentation von Fremdkörpern, als Transport- und Speicherproteine, als Radikalfänger, und als Antiproteasen zur Kontrolle des Gerinnungs/ Fibrinolysesystems erforderlich (Rose/ Marzi 1996). Zur Synthese der genannten Proteine benötigt die Leber große Mengen an Aminosäuren und Energie, die durch den Abbau (Katabolismus) von Muskeleiweiß bereitgestellt werden. Der Verlust von Muskelmasse kann während der Rehabilitationsphase der Patienten zu erheblichen Problemen führen (Fischer 1991).

#### **1.9.3 Das No- Reflow- Phänomen der Leber**

Neutrophile Granulozyten und Kupfferzellen spielen eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des hepatischen Reperfusionsschadens. Jaeschke konnte mit zwei Arbeitsgruppen zeigen, dass die Freisetzung zytotoxischer Mediatoren maßgeblich für die Zellschädigung verantwortlich ist und dass der Organismus vor der Ausbildung eines Reperfusionsschadens geschützt werden kann, wenn die Fähigkeit der Phagozyten, reaktiven Sauerstoff zu produzieren, durch spezifische Eingriffe reduziert wird (Jaeschke 1990/ Jaeschke 1993).

Schmid- Schönbein zeigte 1986 in einem Myokard- Infarkt- Modell, dass durch Akkumulation neutrophiler Granulozyten in Kapillaren deren völlige Verlegung hervorgerufen wird, was im folgenden eine zweite Ischämiephase induziert, in deren Verlauf es zum Zelluntergang im stromabwärts liegenden Lebergewebe infolge eines ischämischen Infarktes kommt (Schmid- Schönbein 1986).

Dieses Modell kann auch auf andere Organsysteme angewandt werden. Koo et al. beobachteten 1991, dass die Reperfusion nach Leberischämie in einer vorübergehenden, initialen Blutflussumkehr resultiert, in deren Folge es zu einer stetigen Abnahme bis hin zum kompletten Ausfall des sinusoidalen Blutflusses kommt (Koo 1991). In den ersten 5- 10 Minuten der Reperusionsphase im Anschluss an kurze Ischämieperioden von 20- 30 Minuten werden fast alle Sinusoide wieder perfundiert. Im weiteren Verlauf der Reperfusion ist jedoch festzustellen, dass eine immer größer werdende Anzahl von Sinusoiden Stase zeigt (Koo 1991). Verschiedene Arbeitsgruppen zeigten, dass dieses No- Reflow- Phänomen mit der Akkumulation neutrophiler Granulozyten korreliert (Koo 1991/ Komatsu 1992/ Marzi 1992). Im Rahmen ihrer Versuche konnten diese Arbeitsgruppen auch zeigen, dass die Gabe von Superoxiddismutase (SOD) die Akkumulation neutrophiler Granulozyten in der Leber verringert. Koo et al. stellten in diesem Zusammenhang anfänglich auch eine Verminderung der Reperfusionsschäden fest (Koo 1991). Durch die Forschungsergebnisse dieser drei Arbeitsgruppen wird das Konzept gestützt, dass der von Kupffer' schen Sternzellen gebildete reaktive Sauerstoff (Jaeschke 1991) mitverantwortlich ist für die Rekrutierung der neutrophilen Granulozyten in die Leber. Jedoch kann durch die Ergebnisse von Koo et al. kein Beweis dafür geliefert werden, dass die akkumulierten neutrophilen Granulozyten durch das Verstopfen der Sinusoide zu der Entstehung der Reperfusionsschäden beitragen. Es ist auch möglich, dass der positive Effekt der Superoxiddismutase in der Anfangsphase der Reperfusion darin besteht, dass sie den von den Kupffer' schen Sternzellen gebildeten reaktiven Sauerstoff abfängt. Wird die Ischämiephase auf 60- 120 Minuten ausgedehnt, so zeigt sich, dass immer mehr Sinusoide in der Reperusionsphase überhaupt nicht mehr durchblutet werden (Koo 1991/ Ferguson 1993), was letztlich zu einer fokalen Nekrose und somit zum Funktionsausfall von Parenchymzellen führt.

Ferguson et al. konnten in ihrem Experiment zeigen, dass das No- Reflow- Phänomen zu ischämischen Infarkten führen kann, die völlig unabhängig von der Akkumulation neutrophiler Granulozyten sind (Ferguson 1993).

Es ist aufgrund verschiedener experimenteller Ergebnisse anzunehmen, dass nach kurzen Ischämiephasen (< 45 min.) der von Kupffer' schen Sternzellen gebildete reaktive Sauerstoff für die Rekrutierung neutrophiler Granulozyten in die Leber verantwortlich ist, die dort im folgenden die Parenchymzellen durch Freisetzung zytotoxischer Mediatoren schädigen. Nach länger andauernder Ischämie kommt es zum Niedergang von Parenchymzellen durch ischämische Infarkte infolge verstopfter Sinusoide. Je größer das Gebiet ist, das durch den ischämischen Infarkt beeinträchtigt wird, desto größer ist auch das Ausmaß der Leberdysfunktion.

#### **1.9.4 Die hepatische Mikrozirkulation im hämorrhagischen Schock und in der Reperusionsphase**

Im hämorrhagischen Schock kommt es aufgrund des Blutverlustes zu einem Abfall des Cardiac output und zu einem disproportional größeren Abfall der Leberdurchblutung (Flynn 1991). Die Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens führt zu einer Verringerung des Blutflusses sowohl in der A. hepatica als auch in der V. portae, was unter anderem zu einer Reduktion der Sauerstoffversorgung des Lebergewebes führt. Die Umverteilung der zirkulierenden Restblutmenge erfolgt zu ungunsten der Leber, was sich in einer deutlichen Leberischämie zeigt (Lovelace 1979). Bereits 1937 zeigte Blalock, dass Hämorrhagie in hepatozellulärer Dysfunktion und Leberzellschädigung resultiert (Blalock 1937). Die Minderperfusion der Leber scheint der Grund für die Entwicklung der schockbedingten hepatozellulären Dysfunktion zu sein (Peitzmann 1985).

Da die Leber eine zentrale Bedeutung bei der immunologischen und metabolischen Antwort des Organismus auf Schädigung besitzt (Pannen 1995), kann die sich infolge eines hämorrhagischen Schocks entwickelnde Leberdysfunktion eine wesentliche Rolle bei der Entstehung des MODS spielen (Matuschak 1993).

Aus diesem Grund ist es essentiell, nach hypovolämischem Schock die Durchblutung der Leber so früh wie möglich wieder herzustellen, um der hepatischen Dysfunktion entgegenzuwirken.

Jedoch selbst bei adäquater Volumenssubstitution konnte eine Reduktion der Leberdurchblutung beobachtet werden (Chaudry 1993). Lemasters et al. stellten 1995 sogar eine Verschlimmerung der Leberschädigung während Reperfusion infolge hepatischer Ischämie fest, die letztlich in einer Leberdysfunktion resultierte (Lemasters 1995). In verschiedenen Untersuchungen, in denen die Leberdurchblutung mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie dargestellt wurde, konnte gezeigt werden, dass es während und nach hämorrhagischem Schock zum Perfusionsausfall von Sinusoiden kommt. Dabei liegen nicht-perfundierte Sinusoide in direkter Nachbarschaft zu perfundierten Sinusoiden (= Heterogenität der Perfusion) (Vollmar 1995). Unter physiologischen Bedingungen sind nahezu 100 % der Lebersinusoide perfundiert. Nach einer 1-stündigen Schockphase mit einem mittleren arteriellen Blutdruck (MABD) von 40 mmHg werden bereits 28 % der Sinusoide nicht mehr perfundiert. Dabei zeigt sich, dass die größere Anzahl nicht-perfundierter Sinusoide (ca. 30 %) im periportalen und midzonalen Feld des Leberazinus liegt (Vollmar 1994). Mit zunehmender Schockdauer steigt die Anzahl nicht-perfundierter Sinusoide an; so kann nach einer 2-stündigen Schockphase bereits ein 40 %-iger Perfusionsausfall von Sinusoiden festgestellt werden (Vollmar 1993). Infolge des hämorrhagischen Schocks entwickelt sich das Bild, dass völlig ausgeschaltete oder minderperfundierte Regionen überinfundierten Gebieten ohne nutritive Bedeutung gegenüberstehen (Rose 1996). Bedingt durch die Unterversorgung mit Sauerstoff kommt es im hämorrhagischen Schock zu einer Schwellung der Endothel- und Kupffer'schen Sternzellen mit anschließender Verlegung des sinusoidalen Gefäßlumens (Mazzoni 1990/ Mc Cuskey 1993). Mc Cuskey et al. zeigten in ihren Versuchen 1993 auch, dass es infolge adrenerger, cholinergischer und aminergischer Einwirkung zu einer Störung der Gefäßregulation kommt, die eine Dilatation bzw. Konstriktion der Lebersinusoide vornehmlich im portalen Feld bewirkt (Mc Cuskey 1993).

Takei et al. konnten 1993 die Beteiligung von Stickstoffmonoxid (NO) an der Dilatation der Sinusoide nachweisen (Takei 1993). Bauer et al. bestätigten dies 1997, indem sie an einem Rattenmodell ohne Schock (d.h. unter normotensiven Bedingungen) nachwiesen, dass bereits nach der ersten Injektion von L- Arginin, dem Ausgangssubstrat der NO- Synthetase, ein deutlicher Anstieg der sinusoidalen Perfusion gemessen werden kann (Bauer C. 1997).

Neben NO haben auch Endotheline (v.a. ET- 1 und ET- 3) eine vasoaktive Wirkung auf die Lebergefäße; allerdings wirken sie gegensätzlich zu NO, nämlich vasokonstringierend. ET-1 wirkt in der hepatischen Mikrozirkulation sowohl auf der sinusoidalen, als auch auf der extrasinusoidalen Seite (Bauer M. 1994 b). Thiernemann wies 1994 nach, dass das Mediatorsystem aus NO und Endothelinen in die Kontrolle des systemischen vaskulären Tonus während Hypotension und anschließender Reperfusion involviert ist (Thiernemann 1994). Vemulapalli et. al. konnten 1994 in ihrer Studie einen Anstieg des ET- 1- Plasma- spiegels während hämorrhagischer Hypotension messen (Vemulapalli 1994). Eine erhöhte Konzentration von ET im Lebergewebe und im hepatisch- venösen Plasma konnte im Anschluss an die Reperfusionsphase nach hepatischer Ischämie gesehen werden (Kawamura 1995 / Nakamura 1995). Die durch Endotheline vermittelte Konstriktion der Lebersinusoide kann durch die NO- vermittelte Vasodilatation gehemmt werden (Zhang 1994).

Infolge des Blutverlustes nimmt der Perfusionsdruck der Leber ab und die Fließeigenschaften des Blutes verändern sich, wovon auch die Leukozyten betroffen sind. So nimmt z.B. unter dem Einfluss proinflammatorischer Mediatoren die Verformbarkeit der Leukozytenmembran ab, wodurch sich deren Fließeigenschaften derart verändern, dass eine Abnahme der Fließgeschwindigkeit in den Sinusoiden und den postsinusoidalen Venolen im hämorrhagischen Schock auf bis zu 60 % des Ausgangswertes gemessen werden kann (Vollmar 1995). Neben der Verlangsamung des Leukozytenflusses kommt es zu einem Anstieg der Interaktionen zwischen Endothel und aktivierten Leukozyten. Aufgrund der hypoxiebedingten geringeren Verformbarkeit der Leukozytenmembran steigt die Anzahl der Interaktionen zwischen Leukozyten und Endothel, wodurch die Passage der Leukozyten in den Sinusoiden eingeschränkt wird. Es kommt im weiteren Verlauf zur Leukostase.

Die zufällige Berührung von Endothel und Leukozyten ist Voraussetzung für die rezeptorvermittelte, feste Adhäsion der Leukozyten am Endothel (Vollmar 1993/ Vollmar 1994); s. auch Kapitel 1.6. Dabei ist das periportale und midzonale Feld stärker betroffen als die Perizentralzone des Azinus.

### **1.10 Fragestellung**

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen der Hemmung der NO- Bildung auf die Mikrozirkulation der Leber zu einem späten Zeitpunkt (24 Stunden) nach hämorrhagischem Schock zu untersuchen. Hierzu wurden zwei verschiedene Stoffe (L- NMMA, L- NIL) eingesetzt, welche die NO- generierenden Enzyme (NO- Synthetase) mit unterschiedlicher Selektivität blockieren.

## **2. Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Die Tierversuche wurden nach Überprüfung und Zustimmung der Ethikkommission, gemäss § 8 des Tierschutzgesetzes, genehmigt. Die tierexperimentelle Studie wurde verblindet und randomisiert an weiblichen Sprague- Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld) mit einem Körpergewicht von 200 - 250g durchgeführt. Die Durchführung der Tierversuche erfolgte im Institut für klinisch- experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes. Die Ratten wurden ca. 5 Tage vor Beginn des Eingriffes im Tierstall des Institutes eingestellt. Dort waren sie in Gruppen zu je 4 Tieren in durchsichtigen Plexiglas Käfigen, die mit Sägespänen eingestreut waren, untergebracht. Ihnen stand Wasser und pelletiertes Trockenfutter (Altromin®) ad libitum zur Verfügung. (Abb.2). Die Raumtemperatur im Tierstall betrug 24°C bei einer Luftfeuchtigkeit von ca. 70%.



Abb.2 Versuchstier

## **2.2 Anästhesie**

Durch intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (Narcoren®, Merial, Hallbergmoos, Deutschland) in einer Dosierung von 50mg/ kg wurden die Tiere für jeden der beiden im Abstand von 24h stattfindenden Eingriffe narkotisiert und blieben während des jeweiligen Eingriffes unter Narkose. Bei Bedarf konnte durch einen in der Schwanzvene liegenden periphervenösen Zugang Narkosemittel appliziert werden. Nach Beendigung des zweiten Eingriffes wurden die Tiere durch intravenöse Gabe einer Überdosis Pentobarbital euthanasiert.

## **2.3. Präparation und Zeitverlauf**

### **1. Eingriff:**

In der vorliegenden Versuchsreihe kam das von Bühren (Bühren 1989) modifizierte Wiggersche Schockmodell (Wiggers 1946) zur Anwendung.

Nach Narkoseeinleitung wurden die Tiere auf der gesamten ventralen Körperseite sowie im linken Inguinalbereich rasiert und anschließend auf einer Wärmeplatte (Conrad Electronic, Hirschau, Deutschland), die zur Aufrechterhaltung der Körpertemperatur diente, in Rückenlage fixiert. Nach Desinfektion der rasierten Hautpartien mittels einer alkoholischen Lösung (Kodan®, Schülke & Mayer GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurde durch Kanülierung der V. caudalis lateralis superficialis dexter bzw. sinister mittels einer kliniksüblichen, sterilen Venenverweilkanüle (0,8 mm Venflon®) ein periphervenöser Zugang gelegt. Nach einem Hautschnitt im Bereich des linken Leistenspaltes wurde die A. femoralis mikrochirurgisch dargestellt, angeschlossen, nach distal ligiert und nach Aufsetzen einer Mikrogefäßklemme mit einem PE-Katheter (0,4 x 0,8 mm Portex, Hythe, England) kanüliert. Die vorgelegte Schlinge diente dabei der Befestigung des Katheters.

Der Anschluss an einen Blutdruckmonitor (Servomed, Hellige, Heiligenwald, Deutschland) über einen Druckwandler (Statham P23 Db, Gould, Oxford, California, USA) erfolgte nach Entfernung der Mikrogefäßklemme und anschließender Spülung des Katheters mit physiologischer NaCl- Lösung (NaCl 0,9%, Braun, Melsungen, Deutschland). Dieser arterielle Zugang diente dem invasiven Blutdruckmonitoring und der späteren Induktion des hämorrhagischen Schocks (Abb.3)



Abb.3 Präparation der Leiste

### **Phase des hämorrhagischen Schocks**

Der Präparation folgte eine 10-minütige Erholungsphase. Vor Schockinduktion wurde eine arterielle Blutgasanalyse sowie die Entnahme von 0,5 ml arteriellem Blut zur Bestimmung des Leberenzym GOT durchgeführt. Die Einleitung des hämorrhagischen Schocks begann zum Zeitpunkt 0. Danach erfolgte eine fraktionierte Blutentnahme über den Femoraliskatheter, wobei innerhalb von 10 Minuten der mittlere arterielle Blutdruck auf 40 mmHg abgesenkt wurde. Der Druck wurde während der folgenden 50 Minuten auf 40 mmHg gehalten, indem den Kompensationsversuchen des Tieres erneute arterielle Blutentnahmen folgten. Nach Beendigung der 60-minütigen Schockphase begann die Reperfusionphase mit der Retransfusion von 60% des entnommenen Blutes.

### **Phase der Reperfusion**

Zu Beginn der Reperfusion wurden dem Tier 60% des entnommenen Blutes, welches bereits bei der Entnahme mit Hilfe von Natriumcitrat (0,1ml/ ml Blut) ungerinnbar gemacht wurde, über 10 Minuten langsam zurückgegeben. Im Anschluss daran wurde dem Tier während 180 Minuten über den venösen Zugang in der Schwanzvene mittels eines Perfusors Ringerlösung (Braun Melsungen, Deutschland) infundiert. Dabei wurde in der ersten Stunde die doppelte Menge des während der Schockphase entnommenen Blutes gegeben. Bevor in den beiden folgenden Stunden nur noch das einfache Entnahmevolumen an Ringerlösung infundiert wurde, wurde eine zweite arterielle Blutgasanalyse, sowie eine weitere arterielle Blutentnahme durchgeführt. Kurz vor Ende der Reperfusionphase erfolgten die dritte Blutgasanalyse und Blutentnahme. Im Anschluss an die Reperfusion wurde der Femoraliskatheter entfernt, die Arteria femoralis nach proximal ligiert und die Haut durch Einzelhefte mit nichtresorbierbarem Nahtmaterial (3,0 metric, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Danach wurde das Tier zum Aufwachen in einen Einzelkäfig verbracht. Bis das Tier wieder zur selbständigen Aufnahme von Wasser und Futter fähig war, wurde ihm Ringerlösung intravenös über den Zugang in der Schwanzvene in einer Dosierung von 2ml/ h appliziert (diese Menge entspricht dem Erhaltungsbedarf des Tieres).

## **2. Eingriff:**

23 Stunden nach dem ersten Eingriff wurden die Tiere erneut narkotisiert und auf eine Wärmeplatte gelagert und fixiert. Gegebenenfalls musste erneut ein peripher-venöser Zugang in die V. caudalis lateralis superficialis dexter/ sinister gelegt werden. Mittels eines median von der Mandibula bis zum cranialen Rand des Sternums geführten Hautschnittes mit anschließender Längsspaltung der darunterliegenden prätrachealen Muskelschichten (Mm. sternohyoidei, Mm. sternothyreoidei, Mm. Omohyoidei, Mm. thyreohyoidei) wurde die Trachea dargestellt und mittels eines Fadens (3,0 metric, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) angeschlungen. Anschließend erfolgte die Intubation des Tieres, wobei zunächst die Trachea zwischen zwei Knorpelspangen inzidiert wurde. Danach konnte ein 4 cm langer Polyethylenkatheter (1,8 x 2,4 mm, Portex, Hythe, England) in die Trachea eingeführt werden, der die sichere Belüftung beider Lungenhälften im Verlauf des folgenden Eingriffes gewährleistete und der außerdem das Absaugen des produzierten Bronchialschleimes ermöglichte. Mit einer weiteren Fadenschlinge wurde der Tubus in seiner Lage fixiert. Nach Präparation der linken A. carotis konnte diese vorsichtig vom mitverlaufenden N. vagus getrennt, ebenfalls angeschlungen und nach rostral ligiert werden. Das Anlegen einer Mikrogefäßklemme ermöglichte im folgenden die Inzision des Gefäßes und das anschließende Einführen eines mit physiologischer NaCl- Lösung gefüllten Polyethylenkatheters (0,4 x 0,8 mm, Portex, Hythe, England), welcher nun mit der vorgelegten Schlinge befestigt werden konnte. Nach Entfernung der Mikrogefäßklemme wurde der Katheter mit einer geringen Menge physiologischer Kochsalzlösung gespült und danach über einen Druckumwandler (Statham P23 Db, Gould, Oxford, California, USA) an einen Blutdruckmonitor (Servomed, Hellige, Heiligenwald, Deutschland) angeschlossen, um den Eingriff über ein invasives Blutdruckmonitoring überwachen zu können (Abb.4). Nach einer 10- minütigen Ruhephase wurde die Testsubstanz über den periphervenösen Zugang in der Schwanzvene appliziert. Nach weiteren 30 Minuten Wartezeit wurde das Tier zur Intravitalmikroskopie vorbereitet.



Abb.4 Präparation des Halses

## **2.4. Monitoring**

### **2.4.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD)**

Der mittlere arterielle Blutdruck wurde während des ersten und zweiten Eingriffes kontinuierlich aufgezeichnet. Mit Hilfe des Druckumwandlers konnten die Pulswellen des Tieres als Kurve auf einem Monitor sichtbar gemacht werden (Abb.5).

### **2.4.2 Herzfrequenz (HF)**

Durch Auszählen der Blutdruckwellen über eine definierte Strecke konnte am Monitor die Herzfrequenz des Tieres pro Minute ermittelt werden (Abb.5).

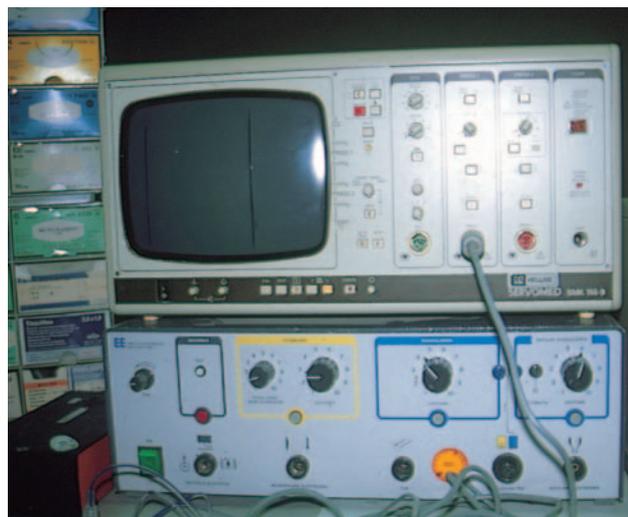


Abb.5 Monitoreinheit

## **2.5. Blutprobenentnahme**

Allen Tieren wurde während der beiden Eingriffe zu vier verschiedenen Zeitpunkten Blut über den Zugang in der A. femoralis/ bzw. A.carotis entnommen. Dabei wurden zum einen 0,5 ml Vollblut zur Bestimmung der Glutamat- Oxalacetat- Transaminase, zum anderen 200 µl Vollblut in einer Mikrokapillare zur Blutgasanalyse entnommen.

1. Entnahme: vor Beginn der Schockinduktion ( $t_0$ )
2. Entnahme: nach einer Stunde Reperfusion ( $t_{140}$ )
3. Entnahme: am Ende des ersten Eingriffes ( $t_{260}$ )
4. Entnahme: nach der Intravitalmikroskopie ( $t_{1440}$ )

Auf die Entnahme einer Blutprobe unmittelbar vor der Intravitalmikroskopie wurde zugunsten der Kreislaufstabilität des Tieres verzichtet.

### **2.5.1 Organparameter**

Das Blut, welches der Bestimmung des Leberenzym Glutamat- Oxalacetat- Transaminase (GOT) diene, wurde nach Abnahme bei 3500 Umdrehungen/ Min. zentrifugiert. Anschließend wurde das Serum abpipettiert und unverzüglich bis zur späteren Analyse in flüssigem Stickstoff (bei  $-198^{\circ}\text{C}$ ) tiefgefroren.

Nach Beendigung aller Versuche wurde der jeweilige GOT- Serumspiegel bestimmt.

### **2.5.2 Blutgasanalyse**

Unmittelbar nach Entnahme des Blutes für die Blutgasanalyse wurde die Untersuchung mit Hilfe eines Blutanalysegerätes (Astrupgerät ABL 30, Radiometer Copenhagen) durchgeführt. Folgende Parameter wurden dabei bestimmt:

1. arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub> in mmHg)
2. arterieller Kohlendioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub> in mmHg)

### **2.6. Bestimmung des Nass- Trockengewichtes der Leber**

Allen Tieren wurde nach der Euthanasie ein ca. 1g schweres Stück Lebergewebe entnommen und gewogen. Anschließend wurde es zur Trocknung für 24 h bei 60°C aufbewahrt. Nach abermaligem Auswiegen konnte über die Differenz der Gewichte der im Trockenschrank verdampfte Wasseranteil des Lebergewebes bestimmt werden. Mit Hilfe dieser Untersuchung konnte das Ausmaß des sich im Anschluss an den hämorrhagischen Schock gebildeten Gewebeödems bestimmt werden.

### **2.7 Testsubstanzen**

Alle Testsubstanzen wurden den jeweiligen Tieren 30 Minuten vor der Intravitalmikroskopie über die Schwanzvene appliziert.

#### **2.7.1 L-Arginin**

Die Aminosäure L- Arginin wurde den Tieren in einer Dosierung von 30 mg/ kg Körpergewicht, gelöst in 1 ml NaCl, verabreicht.

#### **2.7.2 N-Omega-L-Nitromonomethyllysin (L-NMMA)**

L-NMMA wurde den Tieren in einer Dosierung von 10 mg/ kg Körpergewicht, gelöst in 1 ml NaCl, appliziert.

### **2.7.3 NG-1-imminoethyl-lysin (L-NIL)**

L-NIL wurde in einer Dosierung von 5 mg/ kg Körpergewicht, in 1 ml NaCl gelöst, eingesetzt.

## **2.8 Versuchsgruppen**

Die Versuchstiere wurden randomisiert in 5 Gruppen zu je 8 bzw. 10 Tieren eingeteilt. Mit Ausnahme der Tiere der Kontrollgruppe, die keinem Schock unterzogen wurden, durchliefen alle anderen Tiere während des ersten Eingriffes eine 60-minütige Schockphase. Das Monitoring und die Laboranalysen wurden bei allen Tieren gleichermaßen durchgeführt. Zum Zeitpunkt t=0 am zweiten Tag wurde den Tieren die jeweilige Testsubstanz bzw. eine adäquate Menge physiologischer Kochsalzlösung (Schockgruppe) intravenös verabreicht. Die Tiere der Kontrollgruppe wurden nicht behandelt. 30 Minuten nach Gabe der Testsubstanz bzw. des Placebos (NaCl) wurde die Intravitalmikroskopie durchgeführt.

<b><u>Gruppe</u></b>	<b><u>Anzahl</u></b>	<b><u>Schock</u></b>	<b><u>Reperfusion</u></b>
Kontrolle	8	kein	Ringerlösung 2ml/ Stunde
Schock	8	60 min.	60% Blut +Ringerlösung
L-NMMA	8	60 min.	60% Blut +Ringerlösung
L-NIL	10	60min.	60% Blut +Ringerlösung
L-Arginin	8	60 min.	60% Blut +Ringerlösung

Tab. 1 Versuchsgruppen

## **2.9. Intravitalmikroskopie**

### **2.9.1 Präparation**

Nach alkoholischer Desinfektion der Haut wurden zunächst Bauchdecke und Bauchmuskulatur durch einen Längsschnitt vom Manubrium sterni bis zum Beckeneingang durchtrennt. Das Abdomen wurde im folgenden ebenfalls durch einen Längsschnitt in der Medianen entlang der Linea alba eröffnet. Anschließend wurde das Operationsfeld durch zwei seitliche, entlang des Rippenbogens geführte Entlastungsschnitte besser zugänglich gemacht. Die Mobilisierung der Leber konnte nach Durchtrennung des sichelförmigen Ligamentum falciforme hepatis und des Ligamentum coronarium hepatis, welche die Leber mit dem Zwerchfell verbinden, sowie der Ligamenta hepatogastrica und hepatoduodenale, die die Leber mit der kleinen Kurvatur des Magens bzw. dem Anfangsteil des Duodenum verbinden, erfolgen. Anschließend wurde das Tier auf einem speziell für die Intravitalmikroskopie angefertigten Mikroskopiertisch in linker Seitenlage positioniert und fixiert. Zur korrekten Auslagerung des Leberlappens war am Mikroskopiertisch eine kleine Bühne angebracht, welche in ihrer Position so verändert werden konnte, dass eine für die Intravitalmikroskopie optimale Lagerung des linken Leberlappens möglich war. Auf der Bühne wurde ein der Form der konvexen Seite des Leberlappens angepasstes Plastilinstück befestigt. Im Folgenden konnte der linke Leberlappen unter Zuhilfenahme zweier steriler, mit physiologischer 0,9%iger NaCl- Lösung getränkter Watteträger aus dem Körper der Ratte herausgeklappt und auf dem Plastilinbett fixiert werden (Abb.6). Die nun nach oben gerichtete plane Facies viszeralis der Leber wurde zunächst mit reichlich körperwarmer physiologischer Kochsalzlösung gespült, bevor auf ihrer gesamten Fläche ein zuvor zurechtgeschnittenes und entfettetes Stück einer Cellophanfolie positioniert wurde, welches den Zweck hatte, die Leber vor Austrocknung zu schützen. In der Kontrollgruppe wurde die gesamte Präparation in gleicher Weise durchgeführt.

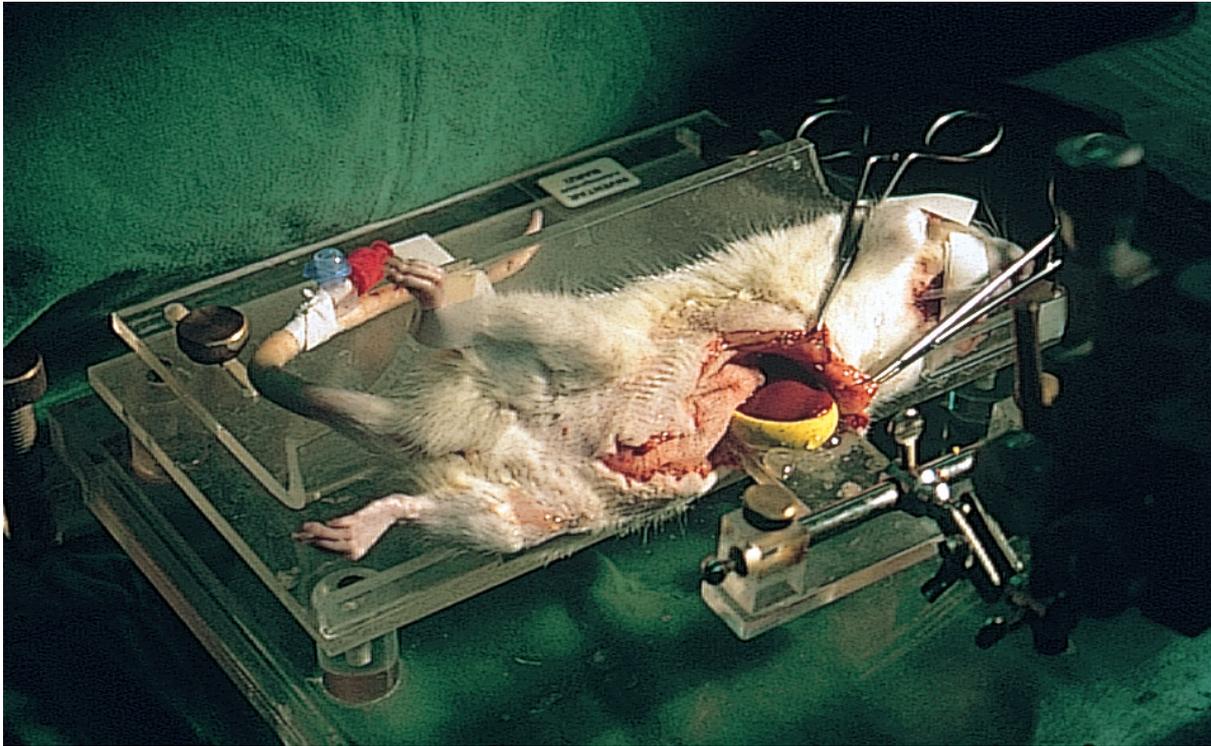


Abb.6 zur Intravitalmikroskopie vorbereitete Ratte auf der Mikroskopierbühne

### **2.9.2 Mikroskop**

Zur Intravitalmikroskopie wurde ein Epifluoreszenzmikroskop (MM-11, Nikon, Düsseldorf, Deutschland) mit einer 100- Watt Quecksilberhochdruckdampflampe, einem 10 x / 0,3 Wasserimmersionsobjektiv, einem 0,7 bis 2,25 Zoomobjektiv und einem 12 x Okular verwendet. In den Strahlengang wurde ein 545nm Filter eingebaut, welcher der Anregung des während der Mikroskopie verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs Acridin Orange diente. Letztlich konnte so eine 330- fache Vergrößerung erhalten werden (Abb.7).

### **2.9.3 Video-Einheit**

Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden mit einer über einen Adapter an das Mikroskop angeschlossenen CCD- Kamera (Fk 6990) aufgezeichnet. Die Kamera war über einen Time- Date- Generator (VTG 33, FOR-A Company, Tokyo, Japan), welcher der Zeiteinblendung diente, mit einem S-VHS Videorecorder (Panasonic FS1, Tokyo, Japan) verbunden (Abb.7).



Abb.7 Mikroskop- Videoeinheit zur Intravitalmikroskopie

#### **2.9.4 Fluoreszenzmarker**

- **Acridine Orange**

Acridine Orange (Sigma Chemical, Deisenhofen) ist ein basischer Farbstoff. Die Anwendung dieses Fluoreszenzfarbstoffes zur Untersuchung der Mikrozirkulation der Leber wurde erstmals in den Studien von Koo et al. beschrieben. In dieser Studie wurde 1mg des pulverförmigen Acridine Orange in 1 ml 0,9% NaCl aufgelöst und anschließend in einer Dosis von 0,1mg pro aufgezeichnetem Leberlobulus als Fluoreszenzmarker für Leukozyten während der Mikroskopie intravenös appliziert. Acridine Orange, ein Fluorochrom, besitzt die Eigenschaft, sich selektiv an Nucleinsäuren zu binden, was in diesem Fall bedeutet, dass nur kernhaltige Leukozyten angefärbt werden (Jahanmehr 1987). Die mit Acridine Orange angefärbten Leukozyten geben typischerweise den aufgenommenen Farbstoff rasch an die Hepatozyten ab. Dieses Phänomen hat den Vorteil, dass die Abgabe des Farbstoffes zu einer besseren Kontrastierung des zu untersuchenden Leberfeldes führt.

- **Fluoreszeinisothiocyanat**

Fluoreszeinisothiocyanat (FITC, Sigma Chemicals, Deisenhofen), dient als Fluoreszenzfarbstoff für Erythrozyten, mit deren Hilfe es möglich ist, die Mikrozirkulation der Leber zu beurteilen. Zur Herstellung der markierten Erythrozyten wurde in dieser Studie die Färbetechnik nach Zimmerhackl durchgeführt (Zimmerhackl 1983). Dabei wurden zunächst einer weiblichen Sprague- Dawley- Ratte, die in diesem Fall lediglich als Blutspender diente, 2 ml Blut entnommen.

Nach Zentrifugation des Blutes (4 Minuten bei 2000 Umdrehungen) konnten u.a. die Erythrozyten gewonnen werden. Diese mussten nun drei mal mit Alsever's Puffer und einmal mit Bicine- Saline Puffer gewaschen werden. Die Suspension wurde 1:2 mit Bicine- Saline verdünnt und dann während 3 Stunden bei 25 °C mit 4 mg/ ml Fluoreszeinisothiocyanat (aufgelöst in 50 µl DMF) inkubiert. Im Anschluss daran wurden die Erythrozyten 5 mal mit Bicine- Saline Pufferlösung 1:1 verdünnt mit 0,9%iger Kochsalzlösung gewaschen. Um die Adhäsion der Erythrozyten untereinander zu verhindern, wurden 0,14 ml CPD/ ml Suspension zugefügt.

### **2.9.5 Untersuchungsablauf**

- **Untersuchung mit Fluoreszeinisothiocyanat zur Markierung der Erythrozyten**

Nach intravenöser Applikation der markierten Erythrozyten konnte bei dem sich im Versuch befindlichen Tier die Erythrozytengeschwindigkeit innerhalb der Sinusoide gemessen werden. Während der Videoaufnahme stellten sich die Erythrozyten als leuchtend weiße Punkte dar (Abb.9). Um eine bessere Kontrastierung des Bildes zu erhalten, wurde dem Tier zu Anfang der Mikroskopie zunächst eine geringe Menge Acridine Orange appliziert, bevor die markierten Erythrozyten gegeben wurden. Die durch das Acridine Orange angefärbten Leukozyten konnten später bei der Auswertung anhand ihrer Größe von den wesentlich kleineren Erythrozyten unterschieden werden. Unter dem Fluoreszenzmikroskop wurde zunächst ein Leberläppchen so eingestellt, dass die Zentralvene des Lobulus an dem einen und das dazugehörige periportale Feld am gegenüberliegenden Bildrand lagen. Durch initiale Gabe von 0,05 ml Acridine Orange- Lösung wurde das im Mikroskop eingestellte Bild kontrastiert. Danach wurden dem Tier mit Fluoreszeinisothiocyanat markierte Erythrozyten intravenös fraktioniert appliziert. Wenige Sekunden später waren die markierten Zellen als leuchtend weiße Punkte zu erkennen. Insgesamt wurden 5 Leberläppchen je 30 Sekunden lang auf Video aufgezeichnet.

- **Untersuchung mit Acridine Orange zur Markierung der Leukozyten**

Nach Aufzeichnung der 5 Erythrozytensequenzen wurde dem Tier Acridine Orange in einer Konzentration von 0,1 mg/ kg Körpergewicht fraktioniert intravenös appliziert. Die angefärbten Leukozyten waren wenige Sekunden später als leuchtend weiße Punkte zu erkennen. Die Videodokumentation erfolgte genau wie bei den Erythrozyten in der Aufzeichnung von 5 Leberläppchen, je 30 Sekunden lang. Im Anschluss an die Leukozytenaufzeichnung wurden 5 quergetroffene Zentralvenen mit den in diese einmündenden Sinusoiden zur Messung der sinusoidalen Durchmesser jeweils 5 Sekunden lang aufgezeichnet.

### 2.9.6 Auswertung der intravitalmikroskopischen Untersuchungen

Die Auswertung der Flussgeschwindigkeiten von Erythrozyten und Leukozyten sowie die Auswertung der sinusoidalen Durchmesser erfolgten an einem S- VHS Videorecorder (Panasonic FS1, Tokyo, Japan) mit exakter Zeitlupenfunktion (1/ 50 Sekundenbereich) und off- line unter Zuhilfenahme des computergestützten Bildverarbeitungssystems LOBULUS (medvis, Saarlouis) (Abb.8). Durch Digitalisierung des analogen Videosignals wurde es möglich, das Bild für die Auswertung zu optimieren. Mit Hilfe des Computerprogramms konnten Strecken markiert werden und so die Flussgeschwindigkeiten nach Passage der markierten Strecke über die Registrierung des Zeitintervalls berechnet werden. Zur Auswertung wurden nur gerade verlaufende Sinusoidabschnitte und nur völlig ungehindert fließende Zellen herangezogen.



Abb. 8 Auswerteeinheit

- **Messung der Sinusoidweiten**

Die Sinusoide der Leber sind im portalen Bereich netzartig und in der zentralen Region sternförmig angeordnet. Mit Hilfe eines Graphiktablets (Summasketch 2, Summagraphics) wurde zunächst die Zentralvene in ihrer Ausdehnung markiert. Zur Bestimmung der sinusoidalen Durchmesser wurde ein Kreis mit der Zentralvene als Mittelpunkt und einem durch einen elektronischen Overlay markierten Durchmesser von 90 µm im digitalisierten Bild festgelegt und der Durchmesser lotrecht zur Wand an den Kreuzungsstellen gemessen. Es wurden ca. 15 Sinusoide pro Bild ausgemessen.

- **Sinusoidaler Blutfluss**

Zur Bestimmung des sinusoidalen Blutflusses musste neben der Geschwindigkeit des zur Messung herangezogenen Erythrozyten auch der Durchmesser des durchflossenen Gefäßabschnitts gemessen werden. Dazu wurde mit Hilfe des Graphiktablets und des Computerprogramms an 5- 8 Stellen der von dem Erythrozyten durchflossenen Sinusoidstrecke das Lot von einer Gefäßwand zur anderen gefällt. Anschließend konnte der sinusoidale Blutfluss mit folgender Formel berechnet werden:

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

$\Delta s$  = zurückgelegte Strecke des Erythrozyten

$\Delta t$  = benötigte Zeit

$d$  = Sinusoiddurchmesser

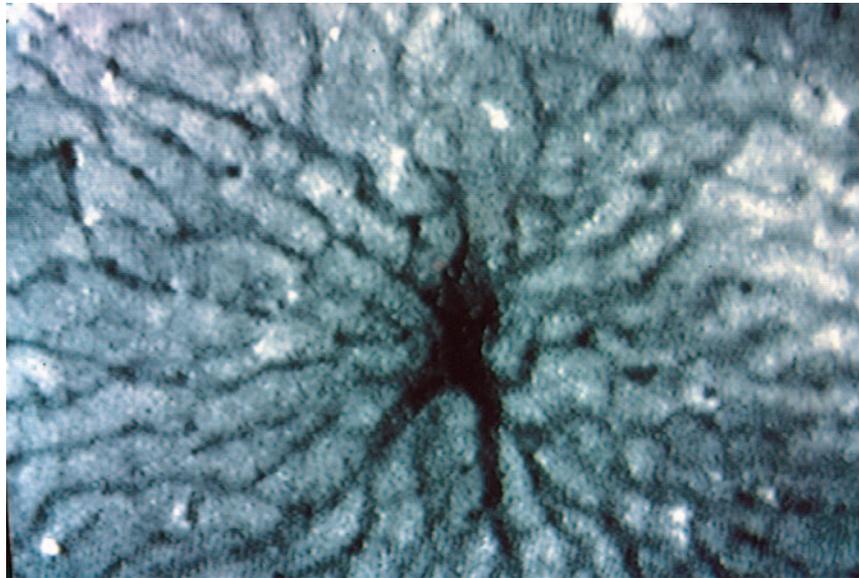


Abb.9 intravitalmikroskopisches Bild einer Rattenleber (ohne Schock)

## **2.10. Statistische Auswertung**

Die Überprüfung auf statistisch signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte mittels ANOVA (**A**nalysis **o**f **V**ariance = Varianzanalyse; kann zur statistischen Testung unverbundener Stichproben verwendet werden) und nachfolgendem Student- Newman- Keuls- Test. Unterschiede innerhalb der Gruppen wurden mittels Kruskal- Wallis- Test überprüft. Bei  $p < 0,05$  wurden die Daten als signifikant angesehen, sofern nicht anders angegeben.

## 3. Ergebnisse

### 3.1. Labordaten und makrohämodynamische Parameter

Bei den Ausgangswerten folgender Parameter:

- Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>)
- Kohlendioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub>)
- Serumspiegel des Leberenzym Glutamat- Oxalacetat- Transferase (GOT)
- Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD) und
- Herzfrequenz (HF)

waren in den untersuchten Gruppen keine signifikanten Unterschiede festzustellen.

#### 3.1.1 Sauerstoffpartialdruck (pO<sub>2</sub>) in mmHg:

Messung	Kontrolle		Schock		L-NIL		L-Arginin		L-NMMA	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
<b>1</b>	72,0	1,7	75,6	1,6	76,2	3,4	73,4	2,2	76,7	2,2
<b>2</b>	80,0	2,6	93,4	4,6	86,8	4,2	85,5	2,9	89,2	3,6
<b>3</b>	92,5	2,3	94,3	1,2	97,8	5,0	92,1	2,1	95,0	3,6
<b>4</b>	125,7	5,2	113,8	2,9	122,0	3,8	116,2	4,8	119,6	3,9

Tab. 2

#### 3.1.2 Kohlendioxidpartialdruck (pCO<sub>2</sub>) in mmHg:

Messung	Kontrolle		Schock		L-NIL		L-Arginin		L-NMMA	
	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM	MW	SEM
<b>1</b>	43,7	4,1	39,2	3,0	46,6	4,0	36,5	2,9	34,2	2,6
<b>2</b>	40,4	2,8	35,0	1,8	46,2	5,1	33,3	2,7	33,5	2,1
<b>3</b>	35,0	2,1	32,5	1,4	41,7	3,2	34,5	1,4	30,0	1,8
<b>4</b>	33,5	2,7	36,3	3,9	40,0	2,9	44,0	3,4	35,8	3,1

Tab.3

**MW** = Mittelwert; **SEM** = Standard error of the mean

Messung 1: vor der Schockinduktion ( $t_0$ )

Messung 2: nach einer Stunde Reperfusion ( $t_{140}$ )

Messung 3: am Ende des ersten Eingriffes ( $t_{260}$ )

Messung 4: nach der Intravitalmikroskopie ( $t_{1440}$ )

### **3.1.3 Glutamat- Oxalacetat- Transaminase (GOT):**

Die GOT ist ein Enzym, das v.a. in Leberzellen lokalisiert ist. Die Höhe der Serumaktivität ist ein wichtiger Parameter bei der Diagnostik von Lebererkrankungen.

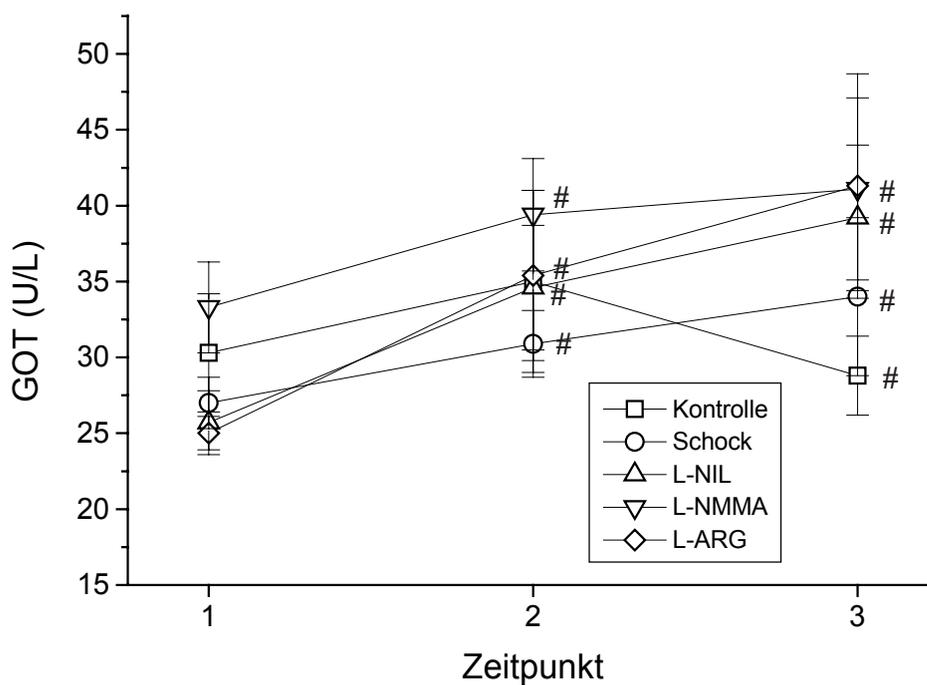


Abb. 10

**# → nicht signifikant versus Ausgangswert**

Zeitpunkt : 1 → Messung vor Schock

2 → Messung nach 1 Stunde Reperfusion

3 → Messung am Ende des ersten Eingriffes

Zu den Zeitpunkten 2 und 3 zeigen sich sowohl in der Kontrollgruppe als auch in allen Schockgruppen im Vergleich zum Ausgangswert keine signifikanten Veränderungen.

### 3.1.4 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD) im Versuchsverlauf:

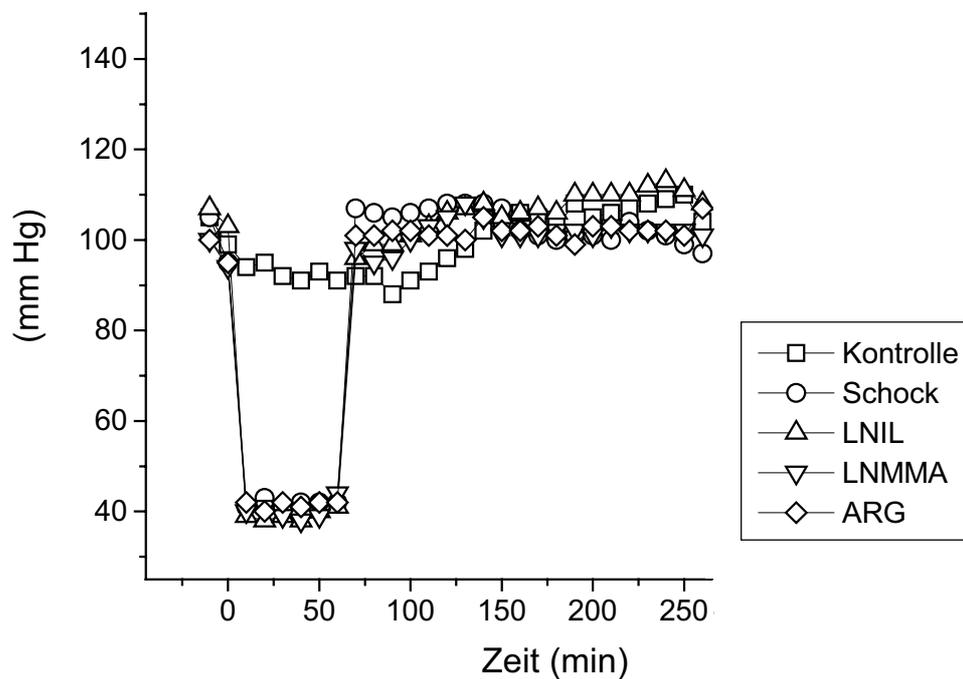


Abb. 11a Mittlerer arterieller Blutdruck im Zeitverlauf des ersten Eingriffes

SEM wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angegeben

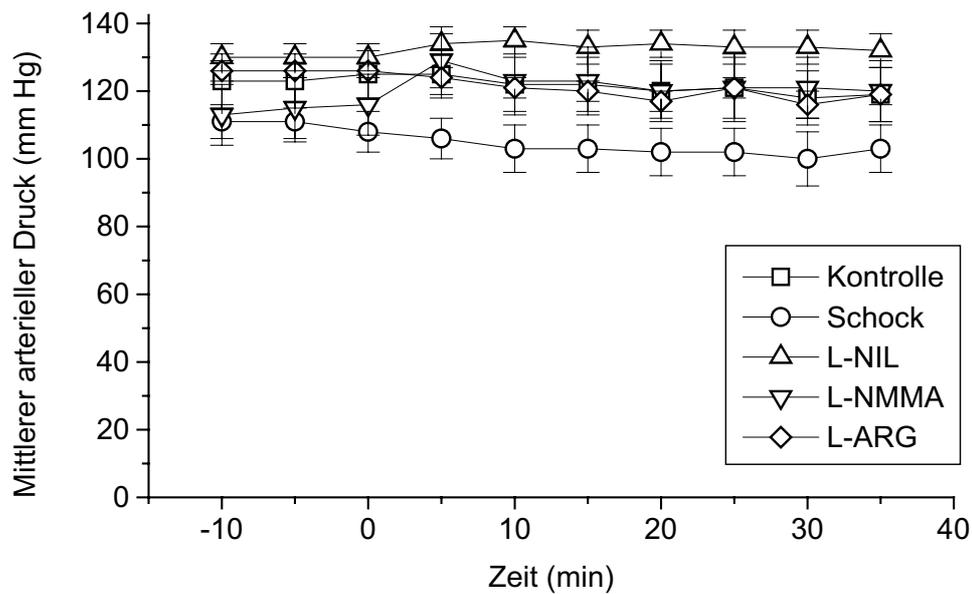


Abb. 11b Mittlerer arterieller Blutdruck im Zeitverlauf des zweiten Eingriffes

### Gruppen mit hämorrhagischem Schock:

L- NIL- Gruppe: zum Zeitpunkt  $t = -10$  wurde den Tieren NG-1-imminoethyl-lysin in einer Dosierung von 5 mg / kg Körpergewicht intravenös appliziert

L- NMMA- Gruppe: zum Zeitpunkt  $t = -10$  wurde den Tieren N- Omega- L- Nitromonomethyllysin in einer Dosierung von 10 mg/ kg Körpergewicht intravenös injiziert

L- Arginin- Gruppe: zum Zeitpunkt  $t = -10$  wurde den Tieren L- Arginin in einer Dosierung von 30 mg/ kg Körpergewicht in die Schwanzvene appliziert

Schockgruppe: zum Zeitpunkt  $t = -10$  wurde den Tieren 1 ml NaCl über die Schwanzvene verabreicht

## **Gruppe ohne hämorrhagischen Schock:**

Kontrollgruppe: keines der Tiere dieser Gruppe durchlief die Phase des hämorrhagischen Schocks

In allen Gruppen mit hämorrhagischem Schock wurde der MABD während des ersten Eingriffes auf 40 mmHg gesenkt. In der sich anschließenden Reperfusionphase stieg er in diesen Gruppen auf vergleichbare Werte über 90 mmHg an (Abb.11a). Zu Beginn des zweiten Eingriffes lag der Ausgangswert ( $t = -10$ ) des MABD aller Tiere zwischen 110 und 130 mmHg (Abb.11b). Beim Vergleich der Blutdruckwerte 30 Minuten nach Applikation der zu testenden Substanz (unmittelbar vor der Mikroskopie) konnte zwischen der Kontrollgruppe und der Schockgruppe sowie zwischen der Schockgruppe und der L- Arginin- Gruppe kein signifikanter Unterschied festgestellt werden ( $p = 0,24$ ). Jedoch erbrachte der Vergleich der Schockgruppe mit der L- NIL- und der L- NMMA- Gruppe zum Zeitpunkt  $t = 30$  einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ). Auch beim Vergleich der MABD- Werte der Tiere der L- Arginin- Gruppe mit denen der L- NIL- Gruppe zum Zeitpunkt  $t = 30$  konnte ein signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) festgestellt werden. Im Verlauf des zweiten Eingriffes zeigte sich innerhalb der L- NMMA- Gruppe ein signifikanter Anstieg des MABD zwischen den Werten der Zeitpunkte  $t = 5$  Minuten ( $p < 0,001$ ) und  $t = 10$  Minuten ( $p = 0,008$ ) im Vergleich zu  $t = 0$ . In der L- Nil- Gruppe konnte weder zum Zeitpunkt  $t = 5$  noch zum Zeitpunkt  $t = 10$  im Vergleich zu  $t = 0$  ein signifikanter Unterschied festgestellt werden (Abb. 11b).

### 3.1.5 Herzfrequenz im Versuchsverlauf:

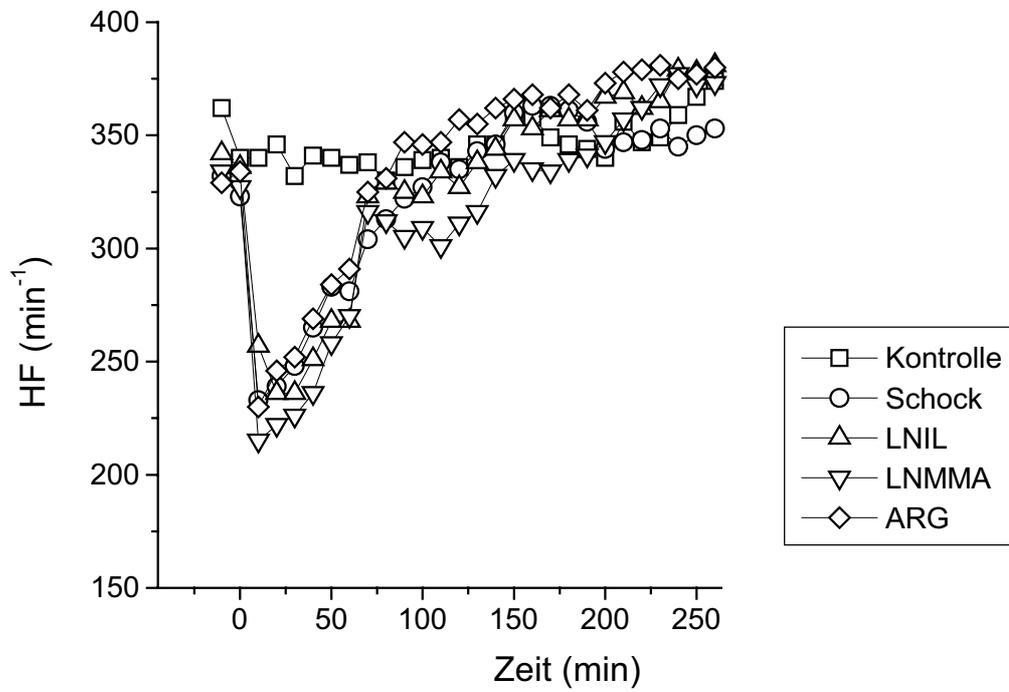


Abb. 12a Herzfrequenz im Zeitverlauf des ersten Eingriffes

SEM wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht angegeben

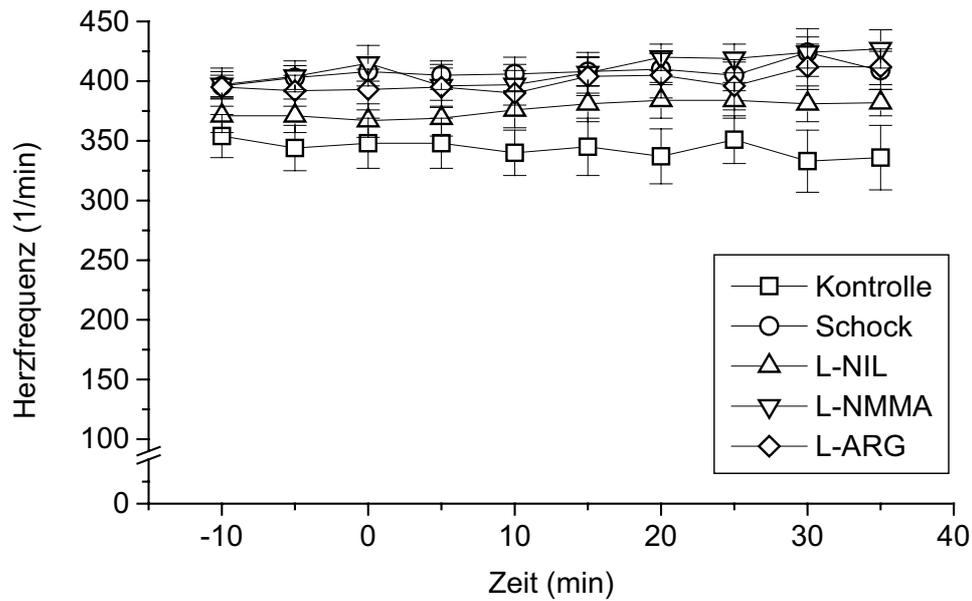


Abb. 12b Herzfrequenz im Zeitverlauf des zweiten Eingriffes

Während des ersten Eingriffes sank die Herzfrequenz in allen Gruppen mit hämorrhagischem Schock (ausgehend von Werten um 350 Schläge/ Minute) nach Schock-einleitung initial bis auf Werte um 225 Schläge pro Minute ab. Bereits während der Schockphase konnte jedoch wieder ein kontinuierlicher Anstieg der Herzfrequenz bis auf Werte um 275 Schläge/ Minute beobachtet werden.

Auch in der sich anschließenden Reperfusionphase stieg die Herzfrequenz in allen Schockgruppen weiter an, um am Ende des ersten Eingriffes annähernd wieder Ausgangswerte zu erreichen. Signifikante Unterschiede bezüglich der Herzfrequenz zwischen den Schockgruppen konnten zu keinem Zeitpunkt des ersten Eingriffes beobachtet werden.

Zu Beginn des zweiten Eingriffes betrug die Herzfrequenz in allen Gruppen zwischen 350 und 400 Schlägen pro Minute und zeigte somit vergleichbare Ausgangswerte wie zu Beginn des ersten Eingriffes. Nach Applikation der Testsubstanzen/ bzw. des NaCl zeigten sich zwischen den Gruppen nicht- signifikante Veränderungen bezüglich der Herzfrequenz.

### 3.1.6 Leber- Nass-Trockengewicht:

Diese Untersuchung diente dazu, das Ausmaß des durch den Schock entstandenen Gewebeödems zu ermitteln.

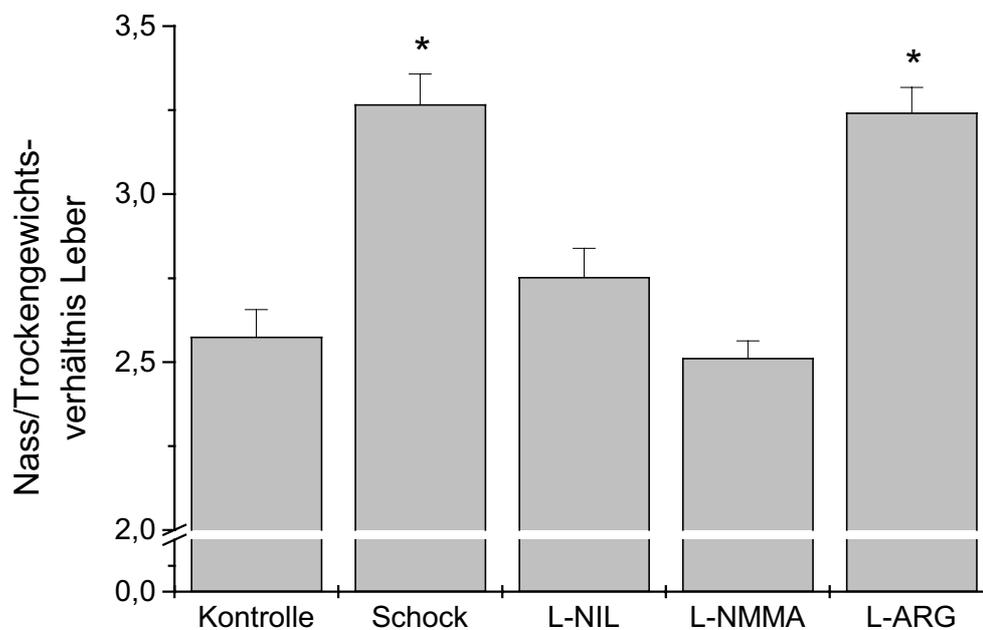


Abb. 13 Nass- Trockengewicht der Leber

**\*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe**

Abbildung 13 zeigt, dass ein signifikanter Unterschied im Leber- Nass- Trocken- Verhältnis beim Vergleich der Kontrollgruppe mit der Schockgruppe und der L- Arginin-Gruppe ermittelt werden konnte. Das Ausmaß des entstandenen Gewebeödems ist in diesen beiden Gruppen am größten. Nach Gabe von L- NIL/ bzw. L- NMMA zeigt sich annähernd das gleiche Nass- Trocken- Verhältnis wie in der Kontrollgruppe.

### **3.2 Intravitalmikroskopische Befunde**

Bereits vor Gabe des Fluoreszenzfarbstoffes ist es aufgrund der Eigenfluoreszenz der Leber möglich, Leberläppchen und Sinusoide durch das Mikroskop zu erkennen. Durch die Gabe des Kontrastmittels kann die Detailerkennbarkeit jedoch deutlich erhöht werden. Nach intravenöser Applikation der mittels FITC-angefärbten Erythrozyten stellen sich diese als kleine, runde, weiß-leuchtende Punkte dar. Mit Hilfe der intravitalmikroskopischen Untersuchung der Leber nach hämorrhagischem Schock können Veränderungen auf der Ebene der Mikrozirkulation sichtbar gemacht werden. In dieser Studie wurden die Veränderungen 24 Stunden nach Schock mit Hilfe dieses Verfahrens dargestellt.

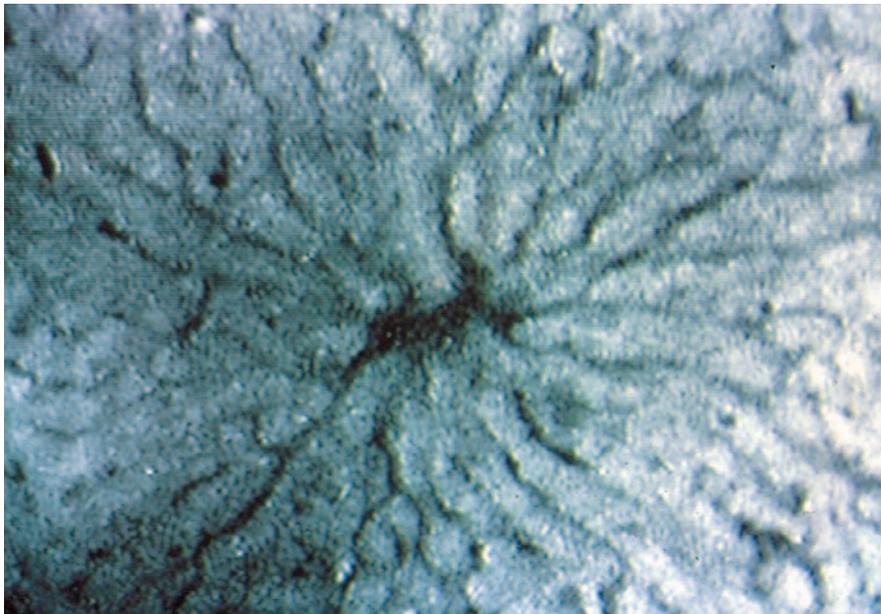


Abb. 14 intravitalmikroskopisches Bild einer Rattenleber 24 Stunden nach hämorrhagischem Schock

### 3.2.1 Sinusoidperfusion (Erythrozytenflow):

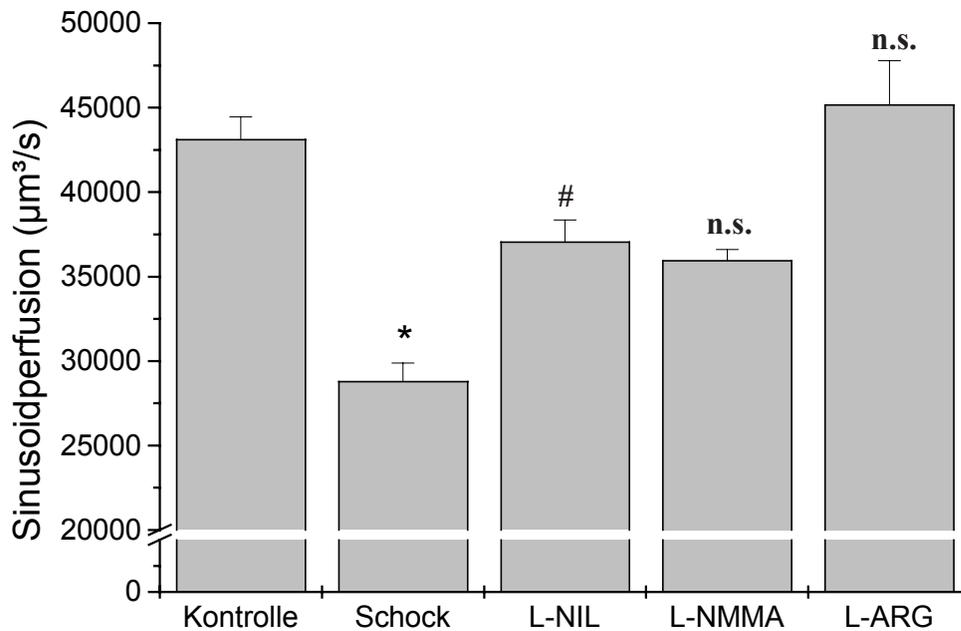


Abb.15 Perfusion der Lebersinusoide

\*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe

#  $p < 0,05$  versus Schockgruppe

n.s. → nicht signifikant versus Schockgruppe

Der Erythrozytenflow wurde als Maß für die sinusoidale Leberdurchblutung herangezogen. Die Ergebnisse zeigen, dass der Erythrozytenflow in den Sinusoiden der Tiere der Schockgruppe signifikant niedriger ist als in der Kontrollgruppe. Nach Gabe von L- Arginin konnte in dieser Gruppe eine annähernd gleiche, Sinusoidperfusion wie in der Kontrollgruppe gemessen werden. Beim Vergleich der Schockgruppe mit den drei behandelten Gruppen (L- Arginin, L- NMMA, L- NIL) konnte nur in der L- NIL- Gruppe ein signifikanter Unterschied in der Sinusoidperfusion festgestellt werden.

### 3.2.2 Sinusoidweiten:

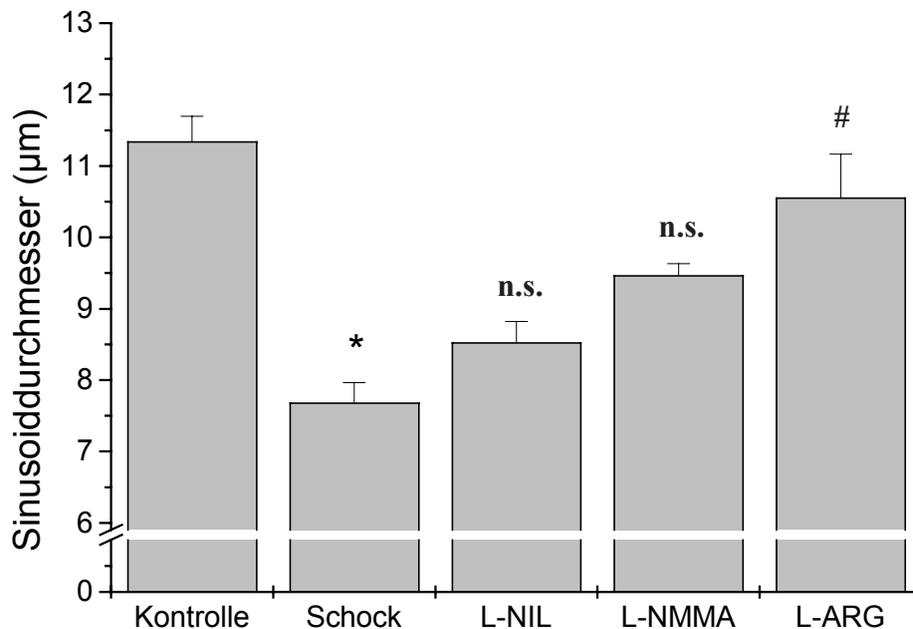


Abb.16

**\*  $p < 0,05$  versus Kontrollgruppe**

**#  $p < 0,05$  versus Schockgruppe**

**n.s. → nicht signifikant versus Schockgruppe**

Es zeigt sich, dass zum Zeitpunkt der intravitalmikroskopischen Untersuchung (= 24 Stunden nach Schock) ein signifikanter Unterschied der Sinusoidweiten zwischen der Kontrollgruppe und der Schockgruppe besteht, wobei die Sinusoide der Schockgruppe eine signifikant geringere Weite aufweisen als die der Kontrollgruppe. Beim Vergleich der L- Arginin- Gruppe mit der Schockgruppe ist ebenfalls ein signifikanter Unterschied bezüglich der Sinusoidweiten festzustellen, wohingegen keine Signifikanz beim Vergleich der Schockgruppe mit der L- NIL und der L- NMMA- Gruppe zu beobachten ist.

## **4. Diskussion**

Die Leber spielt eine zentrale Rolle bei der Entstehung des Multiorganversagens nach Trauma oder Schock. In vielen Studien konnte bereits gezeigt werden, dass es auf verschiedenen Ebenen und zu verschiedenen Zeitpunkten möglich ist, Einfluss auf die Veränderungen der Lebermikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock zu nehmen. Ziel der vorliegenden Studie war es, die Auswirkungen der Blockade der Synthese des Vasodilatators NO auf die Mikrozirkulation der Leber zu einem späten Zeitpunkt nach hämorrhagischem Schock zu untersuchen. In diesem Modell wurde die Lebermikrozirkulation der Versuchstiere 24 Stunden nach Schock mittels Intra-vitalmikroskopie untersucht; es wurden in den verschiedenen Gruppen spezifische Hemmstoffe der NO- generierenden Enzyme (NO- Synthetasen) eingesetzt.

Die Besonderheit des Lebergefäßbettes besteht darin, dass es nicht über Sphinkteren verfügt, welche die Durchblutung regulieren. Auf der Ebene der Makro- und Mikrozirkulation dieses Organs wirken endogene vasoaktive Mediatoren auf die Gefäße. Sie besitzen entweder vasokonstringierende oder vasodilatierende Eigenschaften. In Kap. 1.8 wurde bereits ausführlich auf diese Mediatoren und ihre Wirkung eingegangen. In verschiedenen Studien, in denen die Folgen einer Beeinflussung der NO- Produktion zu einem frühen Zeitpunkt nach Schock untersucht wurden, konnte gezeigt werden, dass die Blockade der NO- Produktion zu diesem Zeitpunkt negative Folgen mit sich bringt (z.B. Endothelzellschädigung, Austritt von Leberenzymen, histologische Schädigung des Lebergewebes, Reduktion der Leberdurchblutung, erhöhte Infiltration des Gewebes mit PMN s, Erhöhung der Anzahl nicht- perfundierter Acini, Erhöhung der Anzahl adhärenter Leukozyten in den Lebersinusoiden, Anstieg des oxidativen Stresses der Leber) (Kobayashi 1995/ Wang 1995/ Harbrecht 1995/ Harbrecht 1997/ Koepfel 1997/ Vega 1998). Vinten-Johansen et al. zeigten, dass negative Folgen der NO- Blockade durch die Gabe von exogenen NO- Donatoren aufgehoben werden können (Vinten- Johansen 1995). Angele et al. konnten nachweisen, dass die Gabe von L- Arginin, dem Ausgangs- substrat der NO- Synthese, im hämorrhagischen Schockmodell positive Effekte hat (Angele 1998).

Die positiven Eigenschaften von NO bestehen u.a. darin, dass es in der Lage ist, als extrazellulärer Radikalfänger zellschädigende Superoxidanionen abzufangen. Über direkte Reaktion mit der NADPH- Oxidase kann NO die Produktion von Superoxidanionen hemmen (Clancy 1992).

Ziel dieser Studie war es, an einem tierexperimentellen Modell zu untersuchen, ob durch Beeinflussung der NO- Synthese mittels spezifischer Stoffe die längerfristigen Veränderungen der Mikrozirkulation der Leber nach hämorrhagischem Schock beeinflusst werden können. Einer Gruppe von 10 Tieren wurde L- NIL (l- N6- (1- imminoethyl) lysine) als selektiver i- NOS- Inhibitor appliziert. Zum Vergleich der Wirkung kam der nicht- selektive NO- Synthetase- Hemmstoff L- NMMA in einer anderen Gruppe zum Einsatz. Außerdem wurde einer weiteren Versuchstiergruppe L- Arginin (Ausgangssubstrat der NO- Produktion) appliziert (= Positiv- Kontrolle). Die Ergebnisse wurden mit den Werten einer Plazebo- und einer Kontrollgruppe (ohne Schock) verglichen.

Aufgrund der Ergebnisse der Werte des MABD und der Herzfrequenz während der 60- minütigen Schockphase konnten in dieser Studie vergleichbare Ausgangssituationen bei den Tieren aller Versuchsgruppen angenommen werden. Somit handelt es sich bei dem in diesem Versuch verwendeten Schockmodell um ein reproduzierbares Modell.

Zum Messzeitpunkt 4 (nach der Intravitalmikroskopie) konnte in allen fünf Versuchsgruppen ein vergleichbarer Anstieg des Sauerstoffpartialdruckes beobachtet werden, was darauf zurückzuführen ist, dass bei Abklingen der Narkose die Schmerzempfindlichkeit der Tiere ansteigt, was wiederum zu einer verstärkten Atmung führt. Da sich der Anstieg des  $pO_2$  auch innerhalb der Kontrollgruppe (ohne Schock) zeigt, handelt es sich hierbei um ein methodisch bedingtes und nicht um ein schockbedingtes Geschehen.

#### **4.1 Die intravitalmikroskopische Technik zur Untersuchung der Mikrozirkulation der Leber in vivo**

Die Auflichtfluoreszenzmikroskopie hat sich als geeignete Methode zur Untersuchung der Lebermikrozirkulation erwiesen. Um eine genaue Untersuchung der Leberdurchblutung zu ermöglichen, ist außerdem der Einsatz von fluoreszierenden Markersubstanzen und entsprechenden korrespondierenden Filtern nötig (Marzi 1993).

In dieser Studie wurde u.a. der Fluoreszenzfarbstoff Acridine Orange, der die Eigenschaft besitzt, an Nukleinsäuren zu binden, zur Anfärbung der Leukozyten eingesetzt. Mittels der mit FITC angefärbten Erythrozyten war es möglich, im Anschluss an die Auswertung der videographischen Aufzeichnungen den Erythrozytenflow zu errechnen. Dieser Parameter gibt Rückschlüsse auf die mikrovaskuläre Durchblutung des Organs.

Das unter 2.9. beschriebene Modell der intravitalmikroskopischen Untersuchung wurde entwickelt, um eine zuverlässige, reproduzierbare und vergleichbare Untersuchung der Leberdurchblutung nach hämorrhagischem Schock zu ermöglichen. Intravitalmikroskopische Untersuchungen zur Mikrozirkulation der Leber nach Ischämie wurden bereits in mehreren Studien durchgeführt (Bauer C. 1997/ Marzi 1990/ Marzi 1992). Störungen auf der Ebene der hepatischen Mikrozirkulation müssen bei einer großen Anzahl verschiedener Krankheitsbilder für deren klinische Ausprägung mitverantwortlich gemacht werden. Aus diesem Grund ist die Untersuchung der Lebermikrozirkulation in vivo nach unterschiedlichen schädigenden Insulten immer mehr in den Mittelpunkt des Interesses gerückt.

Bereits 1979 zeigten Lovelace et al., dass eine negative Korrelation zwischen der Beeinträchtigung der Reoxygenierung der Leber und der Überlebensrate nach Reperfusion im Anschluss an einen hämorrhagischen Schock besteht (Lovelace 1979). 1993 wiesen Matuschak et al. nach, dass die Dysfunktion der Leber infolge eines hämorrhagischen Schocks signifikant zur Entwicklung des Multiorgan- Dysfunktions-Syndroms (MODS) beiträgt (Matuschak 1993). In den eigenen Untersuchungen konnte die Schädigung der Leber nach hämorrhagischem Schock durch das entstandene schockinduzierte Ödem des Lebergewebes nachgewiesen werden.

Zur Bestimmung des GOT- Serumspiegels wurden die Werte der Messungen 1, 2 und 3 der einzelnen Gruppen einander gegenübergestellt.

Im untersuchten Zeitrahmen (= früher Zeitpunkt nach Schock) konnte keine signifikante Erhöhung der GOT- Enzymaktivität beobachtet werden. Studien, die die GOT-Serumkonzentration zu einem späten Zeitpunkt post Schock untersuchten, zeigten einen signifikanten Anstieg dieses Enzyms zeigen. So beobachtete W. Kuntz 2002 bei seinen Untersuchungen zur Etablierung des Long- Term- Modells eine signifikante GOT- Erhöhung am 3. und 4. Tag nach Schock (Kuntz 2002). Bei der GOT handelt es sich um ein hepatozelluläres Enzym; ein hepatischer Parenchymschaden ist somit Voraussetzung für einen Anstieg der GOT im Serum. Die Messwerte der GOT- Konzentration im Serum in der vorliegenden Studie zeigen, dass zu einem frühen Zeitpunkt nach Schock noch kein hepatischer Parenchymschaden vorliegt.

Verschiedene Studien und Untersuchungen, die die Mikrozirkulation der Leber mittels Intravitalmikroskopie 5 Stunden nach hämorrhagischem Schock untersuchten, zeigten, dass bei den Tieren der Schockgruppen eine Verminderung der Sinusoiddurchmesser sowie eine Erniedrigung des sinusoidalen Blutflusses im Vergleich zur Kontrollgruppe erkennbar war (Riemer- Paxian 1998/ Roth 1999). In den eigenen Untersuchungen konnte 24 Stunden nach Schock ebenfalls sowohl eine Abnahme der sinusoidalen Durchmesser als auch eine Verringerung des Erythrozytenflow im Vergleich zur Kontrollgruppe beobachtet werden.

Im Mittelpunkt der vorliegenden Studie standen die Veränderungen der Mikrozirkulation der Leber und die Beeinflussung derselben mittels spezifischer vasoaktiver Substanzen 24 Stunden nach hämorrhagischem Schock.

Alle Tiere, mit Ausnahme derer der Kontrollgruppe, wurden dabei einem standardisierten hämorrhagischen Schock (MABD = 40 mmHg) von einer Stunde Dauer unterzogen. Diese Schockform ist gekennzeichnet durch eine akute kritische Abnahme des intravaskulären Volumens mit partiellem Verlust der Sauerstofftransportkapazität (Janssens 1994, Marzi 1996).

#### **4.2 Einfluss von L- NIL, L- NMMA und L- Arginin auf die Regulation des mittleren arteriellen Blutdruckes**

Lieberthal et al. zeigten 1991 in ihren Untersuchungen, dass der mittlere arterielle Blutdruck nach Hemmung der NOS bei Ratten mit hämorrhagischem Schock stärker ansteigt als bei Ratten ohne hämorrhagischen Schock (Lieberthal 1991). 1997 setzten Pannen et al. im Rahmen ihrer Studie L- NAME als NO- Synthetase- Inhibitor ein. L- NAME besitzt eine deutlich höhere Affinität zur ec- NOS als zur i- NOS. Als Ergebnis konnten sie eine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdruckes und des systemischen Gefäßwiderstandes während der Reperfusion beobachten (Pannen 1997). Wird Mercaptoethylguanidin als selektiver i- NOS Hemmstoff im hämorrhagischen Schockmodell bei Ratten kurz vor der Reperfusionsphase appliziert, kann beobachtet werden, dass bei diesen Tieren der systemische Blutdruck aufrecht erhalten und die vaskuläre Dekompensation verhindert wird (Zingarelli 1997).

In der eigenen Studie konnte 30 Minuten nach Gabe von L- NIL und L- NMMA (24 Stunden nach Schock) in der jeweiligen Gruppe ein signifikanter Anstieg des MABD im Vergleich zur Schockgruppe beobachtet werden. Aufgrund der Tatsache, dass es möglich war, auch noch 24 Stunden nach hämorrhagischem Schock durch Hemmung der NO- Bildung mittels Blockade der NO- produzierenden Enzyme Einfluss auf den Gefäßtonus (Hemmung der NO- bedingten Vasodilatation) und somit auf den MABD zu nehmen, konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass zu diesem späten Zeitpunkt post Schock eine hohe Aktivität der NO- generierenden Enzyme vorliegt.

#### **4.3 Einfluss von L- NIL, L- NMMA und L- Arginin auf die Regulation der Sinusoidweiten 24 Stunden nach hämorrhagischem Schock**

Pannen et al. untersuchten 1997 die funktionelle Bedeutung von NO und ET's für die Regulation der Leberdurchblutung während der Reperfusion nach hämorrhagischem Schock und konnten zeigen, dass die beiden Mediatorsysteme unter diesen Bedingungen in die Kontrolle des vaskulären Tonus involviert sind. Außerdem wiesen sie nach, dass ET's und NO miteinander wechselwirken und so die regionale Leberdurchblutung während Reperfusion nach hämorrhagischem Schock auf verschiedenen Niveaus regulieren (Pannen 1997).

In Studien von Thiernemann et al. und Kelly et al. wurde gezeigt, dass die Bildung der i- NOS in der späten Phase des hämorrhagischen Schocks (Phase der Dekompensation) induziert wird (Thiernemann 1993/ Kelly 1997).

In der eigenen Studie wurde 24 Stunden nach Schock zum einen mittels Blockade der NO- generierenden Enzyme (durch die Testsubstanzen L- NIL und L- NMMA) und zum anderen durch die Gabe des Ausgangssubstrates der NO- Synthese (L- Arginin) Einfluss auf die zu diesem Zeitpunkt zirkulierende Menge an Stickstoffmonoxid und somit auf den intra- und extrahepatischen Gefäßtonus genommen. Die Ergebnisse zeigen, dass bei den Tieren der Schockgruppe die Sinusoide signifikant enger sind als bei Tieren der Kontrollgruppe. Die Beeinflussung der NO- Produktion durch Gabe des NO- Ausgangssubstrates L- Arginin führt zu einer verstärkten Produktion von Stickstoffmonoxid, was im folgenden eine Vasodilatation bewirkt und dazu führt, dass die Sinusoide bei den Tieren dieser Gruppe signifikant weiter sind als bei den Tieren der Schockgruppe.

Sowohl unspezifische Hemmung des NO- generierenden Enzyms mittels L- NMMA als auch die spezifische i- NOS- Hemmung durch L- NIL zeigen keine signifikanten Veränderungen bezüglich der Sinusoidweiten im Vergleich zur Schockgruppe.

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass zum Zeitpunkt 24 Stunden nach Schock weder die ec- NOS, noch die i- NOS auf sinusoidaler Ebene eine starke Aktivität aufweisen, da eine Hemmung der NO-Synthese eine weitere Sinusoidkonstriktion zur Folge haben sollte.

#### **4.4 Einfluss von L- NIL, L- NMMA und L- Arginin auf die Regulation der Leberperfusion 24 Stunden nach hämorrhagischem Schock**

In den eigenen Untersuchungen wurde die Perfusion der Leber 24 Stunden nach Schock anhand des intrasinusoidalen Erythrozytenflows untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass die Sinusoide der mit L- NIL behandelten Tiere signifikant besser perfundiert werden, als bei den Tieren der Schockgruppe. Die unspezifische Blockade der NOS mittels L- NMMA führt jedoch zu keinem signifikant verbesserten Erythrozytenflow. Auch beim Vergleich der L- Arginin- Gruppe mit der Schockgruppe konnte kein signifikanter Unterschied bezüglich der Sinusoidperfusion beobachtet werden.

Da nur die Blockade der i- NOS eine signifikante Verbesserung des Erythrozytenflow im Vergleich zur Schockgruppe bewirkt, ist davon auszugehen, dass die i- NOS zum Untersuchungszeitpunkt eine höhere Aktivität besitzt als die ec- NOS. Die Tatsache dass bei der Messung der Sinusoidweiten beim Vergleich der L- NIL- Gruppe mit der Schockgruppe keine Signifikanz zu beobachten ist, jedoch bei der Messung des Erythrozytenflow ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht, könnte möglicherweise damit zusammenhängen, dass Stickstoffmonoxid nicht ausschließlich an der sinusoidalen Gefäßebene ansetzt, sondern seine Wirkung in der Leber z.B. auch im präkapillären Gefäßabschnitt hat. Das würde erklären, warum die Gabe von L- NIL zwar zu einer signifikant besseren Sinusoidperfusion führt, jedoch in der L- NIL- Gruppe keine signifikante Veränderung der Sinusoidweiten zu beobachten ist. Ein weiterer möglicher Ansatz zur Erklärung dieser Beobachtung wäre die Vorstellung, dass die Wirkung von L- NIL vornehmlich im extrahepatischen Bereich liegt (unter anderem z.B. in der Niere) und es infolge der i- NOS- Blockade und der damit verbundenen geringeren Bildung von NO zu einer Umverteilung des Blutvolumens zugunsten der Leber kommt.

Der günstige Effekt des Einsatzes von NO- Inhibitoren im hämorrhagischen Schock wurde bereits in verschiedenen Studien eindrucksvoll demonstriert: so konnte ein Anstieg des Herzzeitvolumens, eine Verbesserung des renalen Blutflusses und der glomerulären Filtrationsrate sowie der Schutz vor Organschädigung und eine Steigerung der Überlebensrate beobachtet werden (Klabunde 1993/ Yao 1996/ Lieberthal 1991). Studien von Thiernemann (1997) und Hua (1999) zeigten, dass der Einsatz des selektiven i-NOS Hemmstoffes Aminoguanidin in einem hämorrhagischen Schockmodell an Ratten zu einer Steigerung der Überlebensrate führt (Thiernemann 1997/ Hua 1999).

Im Gegensatz zu den o.g. günstigen Effekten einer Blockade der NO- Produktion stellten Koeppel et al. 1997 in ihrer intravitalmikroskopischen Studie fest, dass die nicht selektive Hemmung der NO- Produktion mittels L- NAME in einem Lebermodell mit Ischämie- Reperfusion- Schädigung in einem Untersuchungszeitraum von 20- 90 Minuten nach der Reperfusion zu einer Beeinträchtigung der hepatischen Mikrozirkulation und einem Anstieg nicht- perfundierter Sinusoide führt (Koeppel 1997). Vega et al. formulierten als ein Ergebnis ihrer Studie von 1998, dass der oxidative Stress der Leber nach Hemmung der NO- Synthese signifikant höher ist (Vega 1998).

Auch Wang et al. kamen 1995 zu dem Ergebnis, dass die Hemmung der endogenen NO- Bildung die postischämische Leberschädigung verschlimmert (Wang 1995).

Es ist festzustellen, dass die Bildung von NO im hämorrhagischen Schock eine wichtige regulatorische Funktion hat, eine Überproduktion von NO jedoch zu negativen Reaktionen führt. So zeigten Szabó und Thiernemann 1994, dass eine NO- Überproduktion durch die i- NOS eine Schlüsselrolle in der Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks spielt (Szabó/Thiernemann 1994). Neben der ausgeprägten Vasodilatation in Reaktion auf die großen NO- Mengen reagiert Stickstoffmonoxid mit dem im hämorrhagischen Schock produzierten Superoxid zu großen Mengen Peroxinitrit, einem zytotoxischen Molekül (Szabó 1996/ Beckmann 1996).

Die vaskuläre Dekompensation kann durch die gesteigerte Produktion von NO durch die i- NOS erklärt werden (Thiernemann 1993/ Kelly 1997). Unter Berücksichtigung der Ergebnisse anderer Studien (Koeppel 1997/ Vega 1998/ Wang 1995), die zeigten, dass die komplette Hemmung der NO- Synthese zu einem frühen Zeitpunkt nach hämorrhagischen Schock negative Folgen hat, führen die Beobachtungen in der eigenen Studie zu einem möglichen therapeutischen Ansatz auf der Ebene der Beeinflussung der NO- Produktion zu einem späten Zeitpunkt nach Schock.

## **5. Schlussfolgerungen**

Durch diese Studie konnte gezeigt werden, dass es möglich ist, auch 24 Stunden nach Schock über die Regulation der NO- Synthese Einfluss auf die Durchblutung der Leber zu nehmen. Die Ergebnisse zeigen außerdem, dass die Blockade der i- NOS zu diesem Zeitpunkt die größten Auswirkungen hat.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass mittels Blockade der NO- Produktion zu einem späten Zeitpunkt nach hämorrhagischem Schock (mittels spezifischer Blockade der i- NOS) sowohl die ungünstigen Effekte der frühen NO- Synthese-Hemmung als auch die negativen Folgen einer NO- Überproduktion vermieden werden können.

## **6. Zusammenfassung**

Ziel dieser Studie war es, die Auswirkungen der Hemmung der NO- Bildung auf die Mikrozirkulation der Leber zu einem späten Zeitpunkt (24 Stunden) nach hämorrhagischem Schock (MABD von 40 mmHg während 60 Minuten und anschließender Retransfusion) in einem tierexperimentellen Modell an Ratten zu untersuchen.

Im Mittelpunkt der intravitalmikroskopischen Untersuchungen standen die Durchmesser der Lebersinusoide und die Sinusoidperfusion unter dem Einfluss verschiedener Testsubstanzen (L- NIL, L- NMMA, L- Arginin), die den Versuchstieren 24 Stunden nach Schock und 30 Minuten vor Intravitalmikroskopie appliziert wurden. L- NIL wurde dabei als selektiver Inhibitor der induzierbaren NO- Synthetase eingesetzt, L- NMMA diente als nicht- selektiver Hemmstoff aller NOS- Formen. L- Arginin, das Ausgangssubstrat der NO- Synthese wurde in einer Gruppe eingesetzt, die als „Positivkontrolle“ diente.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl der Erythrozytenflow als Maß der Sinusoidperfusion, als auch die Sinusoidweiten bei den Tieren der Schockgruppe (= Placebogruppe) signifikant niedriger war/waren ( $p < 0,05$ ) als in der Kontrollgruppe (ohne Schock). Sowohl die Tiere der L-NIL- Gruppe, als auch die der L- NMMA- Gruppe zeigten im Vergleich zu den Tieren der Schockgruppe keine signifikante Veränderung der Sinusoidweiten, wohingegen die Tiere der L- Arginin- Gruppe signifikant weitere Sinusoide aufwiesen, als die Tiere der Schockgruppe ( $p < 0,05$ ). Lediglich die Tiere der L- NIL- Gruppe zeigten im Vergleich zu denen der Schockgruppe eine signifikant gesteigerte Sinusoidperfusion ( $p < 0,05$ ). Die Ergebnisse führen zu der Erkenntnis, dass über die Steuerung der gebildeten NO-Menge 24 Stunden post Schock mittels der Gabe von L- NIL als spezifischer i- NOS-Hemmstoff eine Einflussnahme auf die Perfusion der Lebersinusoide nicht jedoch auf deren Durchmesser möglich und auch therapeutisch sinnvoll ist.

## **7. Summary**

Hemorrhagic shock and resuscitation is known to induce a systemic inflammatory response which contributes to increased mortality. The inflammation is characterized by microcirculatory dysfunction. A broad variety of different mediators seems to be involved in the pathophysiology of microcirculatory failure, among these Nitric Oxide seems to play a pivotal role.

The aim of this study was to investigate the effects of an inhibition of Nitric Oxide (NO) - synthesis on the hepatic microcirculation in a rat liver at 24 hours after hemorrhagic shock (MABD at 40 mmHg for 60 min) and resuscitation. Intravital fluorescence microscopy investigation was applied to analyse the diameters of liver sinusoids and the sinusoidal perfusion under the influence of different substances (L-NIL, L- NMMA, L- Arginin) interfering with the NO-synthesis.

L- NIL was used as a selective inhibitor of the inducible isoform of NO synthase (i-NOS), L- NMMA was used as a non- selective inhibitor of all NOS- isoforms.

A positive control group was given L-Arginin, the basic substrate of the NO-synthesis. Our series of experiments show that the sinusoidal perfusion as well as the sinusoidal diameters were significantly lower in the shock- group ( $p < 0,05$ ) compared with the control- group without shock.

We observe that L- NIL has a significant effect on the sinusoidal perfusion ( $p < 0,05$ ) but not on the the sinusoidal diameters. This effect of L- NIL shows that 24 hours after shock the activity of inducible NOS is still high and distinctly higher than the activity of the other NOS- isoforms. The results indicate that the regulation of the amount of NO 24 hours after shock can exert a positive influence on the sinusoidal perfusion.

## **8. Literaturverzeichnis**

**Angele MK., Smail N., Wang P., Cioffi WG., Bland KI., Chaudry ICH.:** L- Arginine restores the depressed cardiac output and regional perfusion after trauma- hemorrhage. *Surgery* 124: 394- 401, (1998)

**Bartlett RL. :** Leucocyte mediated reperfusion injury: what role HBO? *Hyperbaric Medicine Update, Newsletter*, (1996)

**Battistini B., Forget M- A., Laight D.:** Potential role for endothelins in systemic inflammatory response syndrome with a particular relationship to cytokines. *Shock* 5, 167-183, (1996)

**Bauer C., Walcher F., Kalweit U., Larsen R., Marzi, I.:** Role of nitric oxide in the regulation of the hepatic microcirculation *J. of Hepatology* : 27: 1089- 1095, (1997)

**Bauer M., Marzi I.:** Leukozyten- Endothel- Interaktionen als Ausdruck einer hepatischen Entzündungsreaktion im experimentellen Schocksyndrom. *AINS* 29, 46-50, (1994a)

**Bauer M., Zhang JX., Bauer I., Clemens MG.:** Endothelin- 1 induced alterations of hepatic microcirculation: sinusoidal and extrasinusoidal sites of action. *Am. J. Physiol.;* 267: G143- G149 (1994b)

**Bauer M., Rensing H., Bauer C., Bauer I., Larsen R.:** Organ- spezifisches Expressionsmuster eines Kohlenmonoxid-generierenden Stressproteins (Hämoxigenase- 1 / Hitzeschockprotein 32) nach hämorrhagischem Schock. *Der Anästhesist* 4. 97 46:339- 342 , (1997)

**Beckmann JS., Beckmann TW., Chen J., Marshall PA., Freeman BA.:** Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 87:1620-1624, (1990)

**Beckmann JS., Koppel WH.:** Nitric oxide, superoxide, and peroxynitrite: the good, the bad, and ugly. *Am J Physiol* 271:C1424- 37, (1996)

**Blalock A.:** Shock: Further studies with particular reference to the effects of hemorrhage. *Arch. Surg.* 29: 837- 857, (1937)

**Bond RF., Manley ES., Jr., Green HD.:** Cutaneous and skeletal muscle vascular responses to hemorrhage and irreversible shock. *Am. J. Physiol.* 212, 488- 493, (1967)

**Bond RF., and Johnson III G.:** Vascular adrenergic interactions during hemorrhagic shock. *Fed. Proc.* 44: 281-289, (1985)

**Bühren V.:** Hohe Aortenblockade nach Trauma. *Habilitationsschrift*, (1989)

**Brüne B., Schmidt KU., Ullrich V.:** Activation of soluble guanylate cyclase by carbon monoxide and inhibition by superoxide anion. *Eur. J. Biochem.* 192: 683-688, (1990)

**Carlos TM., Harlan JM.:** Leukocyte- endothelial adhesion molecules. *Blood* 84, 2068-2101, (1994)

**Chaudry IH., Ayala H., Ertel W., Stephan RN.:** Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am. J. Physiol.*;259:R663-R678, (1990)

**Chaudry IH., Ayala A.:** Immune consequences of hypovolemic shock and resuscitation. *Current opinion in Anesthesiology* 6, 385-392, (1993)

**Chun K., Zhang JX., Biewer J., Ferguson D., Clemens MG.:** Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/ reperfused rat livers. *Shock* 1: 3-9, (1994)

**Clancy R.M., Leszczynska P.J., Abramson S.B.:** Nitric oxide, an endothelial cell relaxation factor, inhibits neutrophil superoxide anion production via a direct action on the NADPH oxidase. *J. Clin. Invest.* 90: 1116, (1992)

**Dargel R.:** Tumornekrosefaktor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). In: *Dargel R (Hrsg.): Entzündung: Grundlagen- Klinik- Therapie. Ullstein Mosby, Wiesbaden, S 78-84, (1995)*

**Decker K.:** Signal Path and regulation of superoxide, eicosanoid and cytokine formation in macrophages of rat liver. *Biological Reactive intermediates, New York, IV: 507- 520, (1990)*

**De Maio A .:** The heat- shock- response. *New Horizons 3: 198-207, (1995)*

**Erwing JF., Maines MD.:** Rapid induction of heme oxygenase- 1 m-RNA and protein by hyperthermia in rat brain: Heme oxigenase- 2 is not a heat shock protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:5364-5368, (1991)*

**Faist E., Mewes A., Strasser T., Walz A., Alkan S., Baker C., Ertel W., Herberer G.:** Alteration of monocyte function following major injury. *Arch Surg 123 (1988) 287292*

**Ferguson D., McDonagh PF., Biewer J., Paidas CN. and Clemens MG.:** Spatial relationship between leucocyte accumulation and microvascular injury during reperfusion following hepatic ischemia, *Int. J. Microcirc: Cli. Exp. 12, 45, (1993)*

**Fischer JE., Hasselgren PO.:** Cytocines and glucocorticoids in the regulation of the hepato- skeletal muscle axis in sepsis. *Am. J. Surg. 161, 266- 271, (1991)*

**Flaherty JT., Weisfeldt ML.:** Reperfusion injury. *Free Rad Biol Med 5 409419, (1988)*

**Flynn WJ., Cryer HG. Garrison.RN.:** Pentoxifylline but not saralazine restores hepatic blood flow after resuscitation from hemorrhagic shock. *J. Surg. Res. 50:616-621, (1991)*

**Förstermann U., Schmidt HW., Pollock J., Sheng H., Mitchell J A., Warner TD., Nakane M., Murad F.:** Isoforms of nitric oxide synthase: Charakterization and purification from different cell types. *Biochem. Pharmacol. 42, 1849-1857, (1991)*

**Furchgott RF., Zawadski JV.:** The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature (London) 288, 373-376., (1980)*

**Gabor MR.:** Nitric oxide and circulatory shock, *plenum Press, New York, (1998)*

**Geller DA., Billiar TR.:** Molecular biology of nitric oxide synthases. *Cancer Metastasis Rev 17:7-23, (1998)*

**Gonzalez RR., Bond RF.:** Sympathetic nerve and skeletal muscle vascular responses to hemorrhage and shock, with and without cholinergic and  $\beta$ -adrenergic blockage in the dog. *Circ. Shock 1, 39-50, (1974)*

**Gorgen I., Hartung T., Leist M., Niehorster M., Tiegs G., Uhlig S., Weitzel F., Wendel A. :** Granulocyte-colony stimulating factor treatment protects rodents against lipopolysaccharide-induced toxicity via suppression of systemic tumor necrosis factor. *J Immunol 149 (1992) 918- 924*

**Goris RJA., te Boekhorst TPA., Nuytinck JKS., Gimbrere JSF.:** Multiple-organ failure –generalized autodestructive inflammation? *Arch Surg 120, 1109-1115, (1985)*

**Greenspan L, Mc Lellan BA, Greig H:** Abbreviated injury scale and injury severity score: a scoring chart. *J Trauma 25, 60-62, (1985)*

**Harbrecht BG., Wu B., Watkins SC., Marshall HP. Jr., Peitzmann AB., Biliar BR.:** Inhibition of nitric oxide synthase during hemorrhagic shock increases hepatic injury. *Shock 4: 332- 7, (1995)*

**Harbrecht BG., Wu B., Watkins SC., Biliar TR., Peitzmann AB.:** Inhibition of nitric oxide during severe shock but not after resuscitation increases hepatic injury and neutrophil accumulation in hemorrhaged rats. *Shock 8: 415- 21, (1997)*

**Harrison DC., Chidsey, CA., Braunwald E.:** Effect of hemorrhagic shock on release of Norepinephrin by Tyramine. *Am. J. Physiol. 206, 1262-1266, (1964)*

**Hartmann H., Meyer H.:** Klinische Pathologie der Haustiere, *Gustav Fischer Verlag, (1994)*

**Hawker F.:** Liver dysfunction in critical illness. *Anaesth. Intensive Care* 19, 165-81, (1991)

**Hierholzer C., Harbrecht B., Menezes JM., Kane J., MacMicking J., Nathen CF., Peitzman AB., Billiar TR., Tweardy DJ.:** Essential role of induced nitric oxide in the initiation of the inflammatory response after hemorrhagic shock. *J Exp Med* 187, No. 6, 917- 928, (1998)

**Hoch RC., Rodriguez R., Manning T., Bishop M., Mead P., Shoemaker WC., Abraham E.:** Effects of accidental trauma on cytokine and endotoxin production. *Crit Care Med* 21, 839-845, (1993)

**Hua TC., Mochhala SM.:** Influence of L- Arginin, aminoguanidine and N<sup>G</sup>- nitro- L- arginine methyl ester on the survival rate in a rat model of hemorrhagic shock. *Shock*, 11: 51- 7, (1999)

**Hughes H., Farhood A., Jaeschke H.:** Role of leukotriene B4 in the pathogenesis of hepatic ischemia- reperfusion injury in the rat, *Prostagl. Leukotr. Ess. Fatty Acids* 45, 113, (1992)

**Ignarro LJ., Byrns RE., Buga GM., Wood KS.:** Endothelium derived relaxing factor from pulmonary artery and vein posses pharmacologic and chemical properties identical to those of nitric oxide radical. *Circ.Res.* 61:866- 879, (1987)

**Jaeschke H., Farhood A., Smith C. W.:** Neutrophils contribute to ischemia/ reperfusion injury in rat liver in vivo, *FASEB J.* 4, 3355, (1990)

**Jaeschke H., Farhood A.:** Neutrophil and Kupffer cell- induced oxidant stress and ischemia- reperfusion injury in rat liver in vivo, *Am. J. Physiol.* 260, G355, (1991)

**Jaeschke H., Farhood A., Bautista AP., Spolarics Z., Spitzer JJ., Smith C.W.:** Functional inactivation of neutrophils with a Mac- 1 (CD11B/ CD18) monoclonal antibody protects against ischemia- reperfusion injury in rat liver, *Hepatology* 17, 915, (1993)

**Jaeschke H.:** The inflammatory response after hepatic ischemia / reperfusion, in: *Cell Biology of Trauma*, S. 136, (1995)

**Jahanmehr SAH., Hyde K., Geary CG., Cincotai KJ., Maciver JE.:** Simple technique for fluorescence staining of blood cells with acridine orange, *J. Clin. Path.* 40: 926- 929, (1987)

**Janssens U., Hanrath P.:** Schock, *Internist* 35: 673- 689, (1994)

**Jungermann K., Katz N.:** Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 2, 385- 395, (1982)

**Jutila MA.:** Leukocyte traffic to sites of inflammation. *APMIS* 100: 191- 201, (1992)

**Kawada N., Klein H., Decker K.:** Concentration and relaxation of hepatic stellate cells in culture. In: *Cells of the hepatic sinusoid*, hrsg. von Knook, D. L., E. Wisse. Leiden, The Netherlands. Kupfer Cell Foundation pp. 161- 164, (1993a)

**Kawada N., Tran- Thi T-A., Klein H., Decker K.:** The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur. J. Biochem.* 213, 815- 823 (1993b)

**Kawamura E., Yamakana N., Okamoto E., Tomoda F., Furukawa K.:** Response of plasma and tissue endothelin- 1 to liver ischemia aits implication in ischemia- reperfusion injury. *Hepatology* 21(4):1138- 1143, (1995)

**Kelly E., Shah NS., Morgan NN., Watkins SC., Peitzmann AB., Billiar TR.:** Physiologic and molecular characterization of the role of nitric oxide in hemorrhagic shock. *Shock* 7: 157- 63, (1997)

**Klabunde RE., Slayton KJ., Ritger RC.:** N<sup>G</sup>- methyl- L- arginine restores arterial pressure in hemorrhaged rats. *Circ. Shock* 40: 47- 52, (1993)

**Koeppel TA., Thies JC., Schemmer P.:** Inhibition of nitric oxide synthesis in ischemia/ reperfusion of rat liver is followed by impairment of hepatic microvascular blood flow. *J Hepatol* 27: 163- 169, (1997)

**Komatsu H., Koo A., Guth PH.:** Leucocyte flow dynamics in the rat liver micro-circulation. *Microvasc. Res.* 40: 1-13, (1990)

**Komatsu H., Koo A., Ghadisha E., Zeng H., Kuhlenkamp JF., Inoue M., Guth, PH., Kaplowitz N.:** Neutrophil accumulation in ischemic perfused rat liver: evidence for a role of superoxide free radicals, *Am. J. Physiol.* 262, G669, (1992)

**Koo A., Komatsu H., Tao G., Inoue M., Guth PH., Kaplowitz N.:** Contribution of no-reflow phenomenon to hepatic injury after ischemia- reperfusion: evidence for a role for superoxide anion. *Hepatology* 15: 507-514, (1991)

**Kuijpers TW., Hakkert BC., Hart MHL., Roos D.:** Neutrophil migration across monolayers of cytokine-prestimulated endothelial cells: A role for platelet- activating factoer and IL-8. *J Cell Biol* 117: 565- 572, (1992)

**Kuntz W.:** Langzeitveränderungen der hepatischen Mikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock. *Dissertationsschrift* (2002)

**Lemasters JJ., Thurman RG.:** The many facets of reperfusion injury. *Gastroenterology* ; 108(4): 1317- 1320, (1995)

**Ley K., Gaehtgens P., Fennie C., Singer MS., Lasky LA., Rosen SD.:** Lectin-like cell adhesion molecule 1 mediates leukocyte rolling in mesenteric venules in vivo. *Blood* 77: 2553- 2555, (1991)

**Lieberthal W., McGarry AE., Sheils J., Valerie CR.:** Nitric oxide inhibition in rats improves blood pressure and renal function during hypovolemic shock. *Am J Physiol* 261: F868- 72, (1991)

**Lovelace DR., Short BL., Rink RD.:** Hepatic oxygen supply in reversible and irreversible hemorrhagic shock. *J. Surg. Res.* 26:120-128, (1979)

**Lüscher TF., Yang Z., Tschudi M., von Segesser L., Stulz P., Boulanger C., Siebenmann R., Turina M., Bühler FR.:** Interaction between endothelin- 1 and endothelin- derived relaxing factor in human arteries and veins. *Circ. Res.* 66: 1088-1094, (1990)

**Manger WM., Bollmann JL., Maher FT., Berkson J.:** Plasma Concentration of Epinephrine and Norepinephrine in hemorrhagic and anaphylactic shock. *Am. J. Physiol.* 190, 310-316, (1957)

**Marletta MA.:** Nitric oxide synthetase structure and mechanism. *J. Biol. Chem.* (1993), 268, 12231-12234.

**Marzi I., Takei Y., Knee J., Menger MD., Gores GJ., Bühren V., Trentz O., Lemasters JJ., Thurman RG.:** Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat. *Transplant. Proc.* 22: 2004- 2005, (1990)

**Marzi I.:** Ischämie/ Reperfusionssyndrome der Leber- Intravitalmikroskopische Charakterisierung zur Entwicklung therapeutischer Ansätze. *Habilitationsschrift* (1993)

**Marzi I.:** Bedeutung der Leber für den Verlauf des SIRS nach Schock, Trauma und bei Sepsis. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther.* 29, 41-46, (1994a)

**Marzi I., Bauer M., Reisdorf E., Walcher F.:** Beteiligung des Plättchen-aktivierungsfaktors (PAF) an pathologischen Leukozyten- Endothel- Interaktionen in der Leber nach hämorrhagischem Schock. *Zentralbl. Chir.* 119, 814- 821, (1994b)

**Marzi I.:** Der hämorrhagische Schock, *der Anästhesist* 45: 976- 992, (1996)

**Marzi I., Knee J., Bühren V., Menger M., Trentz O.:** Reduction by superoxide dismutase of leucocyte- endothelial adherence after liver transplantation, *Surgery* 111, 90, (1992)

**Matsumura T., Kauffmann FC., Meren H., Thurman RG.:** O<sub>2</sub> uptake in periportal and pericentral regions of liver lobule in perfused liver. *Am J Physiol* 250: 800- 805, (1986)

**Matuschak GM., Lechner AJ.:** Hepatic regulation of systemic host defense and its derangement in multiple systems organ dysfunction and failure. In: Multiple system organ Failure: *Hepatic Regulation of Systemic Host Defense*, edited by G. M. Matuschak. New York: Dekker, p 1-38, (1993)

**Mazzoni MC., Borström P., Intaglietta M., Arfors KE.:** Capillary narrowing in hemorrhagic shock is rectified by hyperosmotic saline- dextran reinfusion. *Circ. Shock* , 31:407-418, (1990)

**Mc Cord JM.:** Oxygen- derived free radicals in postischemic tissue injury *N. Engl. J. Med.* 312, 159-163, (1985)

**Mc Cuskey RS., Reilly FD.:** Hepatic microvasculature: Dynamic structure and its regulation. *Semin Liver Dis* 13, 1-12, (1993)

**Mc Ever RP., Beckstead JH., Moore KL., Marshall- Carlson L., Bainton DF.:** GMP- 140, a platelet  $\alpha$ -granule membrane protein, is also synthesized by vascular endothelial cells and is localized in Weibel- Palade bodies. *J Clin Invest* 84: 92- 99, (1989)

**Meduri GU., Headly S., Kohler G., Stentz F., Tolley E., Umberger R., Leeper K. :** Persistent elevation of inflammatory cytokines predicts a poor outcome in ARDS. Plasma IL-1 beta and IL-6 levels are consistent and efficient predictors of outcome over time. *Chest* 197 (1995) 1062-1073

**Mellander S., Lewis DH. :** Effect of hemorrhagic shock on the reactivity of resistance and capacitance vessels and on capillary filtration transfer in cat skeletal muscle. *Circ. Res.* 13, 105-118, (1963)

**Michel T., Li GK., Busconi L.:** Phosphorylation and subcellular translocation of endothelial nitric oxide synthase. *Proc.Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6252-6256, (1993)

**Miller- Graziano CL., Szabo G., Kodys K., Griffey K.:** Abberations in post-trauma monocyte-subpopulation: role in septic shock syndrome. *J Trauma* 30 (1990) S 86-97

**Moncada S., Palmer RM. J., Higgs EA.:** Nitric oxide: physiology, pathophysiology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* 43, 109-141, (1991)

**Moncada S., Higgs A.:** The L- arginine- nitric oxide pathway. *N. Engl. J. Med.* 329: 2002-2012, (1993)

**Moore WM., Webber RK., Jerome GM., Tjoeng FS., Misko TP., Currie MG.:** L- N6- (1-imminoethyl) lysine: a selective inhibitor of inducible nitric oxide synthase. *J Med Chem* 37: 3886- 3888, (1994)

**Nakamura S., Nishiyama R., Yokoi Y., Suzuki S., Konno H., Baba S., Muro H.:** Hepatic release of endothelin- 1 after warm ischemia- reperfusion injury and its hemodynamic effect. *Transplantation;* 59 (5):679- 684, (1995)

**Nathan C.:** Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells. *FASEB J* 6: 3051- 64, (1992)

**Nussler AK., Billiar TR.:** Inflammation, immunoregulation and inducible nitric oxide synthase. *J Leucocyte Biol* 54:171-178, (1993)

**O' Mahony JB., Palder SB., Wood JJ., Mc Irvine A., Rodrick ML., Demling RH., Mannik JA.:** Depression of cellular immunity after multiple trauma in the absence of sepsis. *J Trauma* 24 (1984) 869- 875

**Osada S., Ichiki H., Oku H.:** Participation of nitric oxide in mouse anaphylactic Hypotension. *Eur. J. Pharmacol.* 252:347-350, (1994)

**Ostermann G., Kertscher HP., Hofmann B.:** Der Plättchenaktivierende Faktor- ein biologisch hochwirksames Phospholipid. *Pharmazie* 45, 465-487, (1990)

**Palmer RMJ., Ferridge AG., Moncada S.:** Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium- derived relaxing factor. *Nature (London)* 327, 524-526, (1987)

**Pannen BHJ., Robotham JL.:** The acute phase response. *New Horizons* 3: 183- 197, (1995)

**Pannen BHJ., Bauer M., Nöldge- Schomburg GFE., Zhang JX., Robotham JL., Clemens MG., Geiger KK.:** Regulation of hepatic blood flow during resuscitation from hemorrhagic shock: role of NO and endothelins *Am. Physiological Society H* 2736- H2745, (1997)

**Patel KD., Zimmermann GA., Prescott SM., Mc Ever RP., Mc Intyre TM.:** Oxygen radicals induce human endothelial cells to express GMP- 140 and bind neutrophils. *J Cell Biol* 112: 749- 759, (1991)

**Peitzmann AB., Corbett WA., Shires GT.III., Illner H., Shires GT., Inamder R.:** Cellular function in liver and muscle during hemorrhagic shock in primates. *Surg. Gynecol. Obstet.* 161:419-424, (1985)

**Picker LJ., Warnock RA., Burns AR., Doerschuk CM., Berg EL., Butcher EC.:** The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP 140. *Cell* 66: 921- 933, (1991)

**Pober JS., Cotran RS.:** The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50: 537- 544, (1990a)

**Pober JS., Cotran RS.:** Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70: 427- 451, (1990b)

**Raju VS, Maines MD.:** Renal ischemia/ reperfusion injury upregulates heme oxygenase-1 (HSP- 32) expression and increases cGMP in rat heart. *J Pharmacol Exp Ther* 277:1814-1822, (1996)

**Rappaport AM.:** The structural and functional unit in the human liver (liver acinus). *Anat. Rec.* 130, 673-689, (1958)

**Rappaport AM.:** The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc. Res.*6: 212-228, (1973)

**Rees DD., Palmer RM., Moncada S.:** Role of endothelium- derived nitric oxide in the regulation of blood pressure *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3375-3378

**Riemer- Paxian I.:** Die Auswirkungen des rekombinanten Bactericidal/ permeability-increasing Protein<sub>21</sub> (rBPI<sub>21</sub>) auf die Alterationen der hepatischen Mikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock. *Dissertationsschrift* (1998)

**Rodrick ML., Wood JJ., O'Mahony JB., Davis CF., Grbic JT., Demling RH., Moss NM., Saporoschetz I., Jordan A., D'Eon P.:** Mechanisms of immunosuppression associated with severe nonthermal traumatic injuries in man: production of IL-1 and 2 . *Clin Immunol* 6, 310- 318, (1986)

**Rose S., Floyd RA., Eneff K., Buehren V., Massion W.:** Intestinal ischemia: reperfusion-mediated increase in hydroxyl free radical formation as reported by salicylate hydroxylation. *Shock* 1, 452-456, (1994a)

**Rose S., Bleymehl D., Chandler J., Blum U., Dike J., Wierkinski A., Mutschler W.:** Respiratory failure in polytrauma patients: Role of altered PMNL-signal transduction and free radical injury. *Int. Care Med* 20, S 89, (1994b)

**Rose S., Marzi I.:** Pathophysiologie des Polytraumas. *Zentralbl. Chir.* 121, 896-913, (1996)

**Roth W.:** Die Zeitabhängigkeit der Blockade von Tumor- Nekrose- Faktor- $\alpha$  zur Verbesserung hepatischer Leukozyten- Endothel- Interaktionen nach hämorrhagischem Schock. *Dissertationsschrift* (1999)

**Schmid- Schönbein GW.:** Capillary plugging by granulocytes and the no- reflow-phenomenon in the microcirculation, *Fed. Proc.* 46, 2397, (1986)

**Sigal E.:** The molecular biology of mammalian arachidonic acid metabolism. *Am J Physiol* 260 L 13-L 28, (1991)

**Silbernagel S., Despopoulos A. :** Taschenatlas der Physiologie, *Thieme Verlag* 4. überarbeitete Auflage, (1990)

**Southan GJ., Zingarelli B., O'Connor M., Salzmann AL., Szabó C.:** Spontaneous rearrangement of aminoalkylguanidines into mercaptoalkylguanidines- a novel class of nitric oxide synthase inhibitors with selectivity towards the inducible isoform. *Br J Pharmacol* 117: 619- 32, (1996)

**Stuehr DJ.:** Structure- function aspects in the nitric oxide synthases. *Ann Rev Pharmacol Toxicol* 37:339-59, (1997)

**Stünzi H., Weiss E.:** Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin *Verlag Paul Parey*, 8. Auflage, (1990)

**Szabó C., Thiemermann C.:** Role of nitric oxide in hemorrhagic, traumatic and anaphylactic shock and thermal injury. *Shock*, 2:145-155, (1994)

**Szabó C.:** The role of peroxynitrite in the pathophysiology of shock, inflammation and ischemia- reperfusion injury. *Shock* 6: 79- 88, (1996)

**Szabó C., Billiar TR.:** Novel roles of nitric oxide in hemorrhagic shock, *Shock*, Vol.12, No. 1, pp. 1-9, (1999)

**Takei Y., Oshita M., Tsuji S., Hijioka T., Kawano S., Goto M., Masuda E., Fukui H., Nishimura Y., Fusamoto H., Kamada T.:** Endothelin-1 and nitric oxide as mediators regulating sinusoidal tone in the presence of ethanol. In: Cells of the hepatic sinusoid. Vol. 4, hrsg. von Wisse E., D. L. Knook. Leiden, The Netherlands. Kupffer Cell Foundation, pp. 385- 387, (1993)

**The ACCP/ SCCM Consensus Conference Committee:** Definition for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 101, 1644-1655, (1992)

**Thiemermann C., Szabó C., Mitchell JA., Vane JR.:** Vascular hyporeactivity to vasoconstrictor agents and hemodynamic decompensation in hemorrhagic shock is mediated by nitric oxide. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 90 267-271, (1993)

**Thiemermann C.:** The role of the L- arginine: nitric oxide pathway in circulatory shock. *Adv. Pharmacol.* 28: 45-79, (1994)

**Trentz O., Ertel W.:** Pathophysiologie des Traumas. In: Rüter A, Trentz O, Wagner M (Hrsg.): *Unfallchirurgie*. 1. Auflage. S. 5-22. München: Urban & Schwarzenberg, (1995)

**Van Bossuyt H., Bouwens L., Wisse E.:** Isolation, purification and culture of sinusoidal liver cells. In: *Sinusoids in human liver: health and disease*, hrsg. von Bioulac- Sage P., C. Balabaud. Rijswijk, Netherlands. Kupffer Cell Foundation, pp. 1-16, (1988)

**Vane JR.:** The Croonian lecture: The endothelium: Maestro of the blood circulation. *Proc R Lond B* 343: 225-246, (1994 )

**Vega VL., Maldonado M., Mardones L., Manriquez V., Vivaldi E., Roa J., Ward PH.:** Inhibition of nitric oxide synthesis aggravates hepatic oxidative stress and enhances superoxid dismutase inactivation in rats subjected to tourniquet shock. *Shock* 9, No. 5, pp. 320- 328, (1998)

**Vemulapalli S., Chiu PJ., Griscti K., Brown A., Kurowski S., Sybertz EJ.:** Phosphoramidon does not inhibit endogenous endothelin-1 release stimulated by hemorrhage, cytokines and hypoxia in rats. *Eur. J. Pharmacol.* 257: 95-102, (1994)

**Vinten-Johansen J., Sato H., Zhao ZQ.:** The role of nitric oxide and NO- donor agents in myocardial protection from surgical ischemia- reperfusion injury. *Int. J. Cardiol.* 50: 273-281, (1995)

**Vollmar B., Conzen PF., Kerner T., Habazettl H., Vierl M., Waldner H., Peter K.:** Bloodflow and tissue oxygen pressure of liver and pancreas in rats: Effects of volatile anaesthetics and of hemorrhage. *Anesth. Analg.*,75: 421-430, (1992)

**Vollmar B., Lang G., Post S., Menger MD., Messmer K.:** Die Mikrozirkulation der Leber im hämorrhagischen Schock der Ratte und ihre Bedeutung für Energiestoffwechsel und Funktion. *Zentralbl. Chir.*,118:218-225, (1993)

**Vollmar B., Lang G., Menger MD., Messmer K.:** Hypertonic hydroxyethylstarch restores hepatic microvascular perfusion in hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol.*,266:H1927-H1934, (1994)

**Vollmar B.:** Mikrozirkulation und Sauerstoff- Versorgung der Leber bei hämorrhagischem Schock und Sepsis. *Anästhesiol. Intensivmed. Notfallmed. Schmerzther. Sonderheft 1*, 30: S52-S54, (1995)

**von Andrian UH., Chambers JD., Mc Evoy LM., Bargatze RF., Arfors K-E., Butcher E.C.:** Two- step model of leucocyte- endothelial cell interaction in inflammation. Distinct roles for LECAM- 1 and the leucocyte b 2 integrins in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* Vol. 88, 7538- 7542, (1991)

**Wang Y., Mathews W.R., Guido D.M., Farhood A., Jaeschke H.:** Inhibition of Nitric oxide synthesis aggravates reperfusion injury after hepatic ischemia and endotoxemia. *Shock*, Vol.4, No.4, pp. 282- 288 (1995)

**Ward PA., Johnson KJ., Till GO.:** Oxygen radicals and microvascular injury of lungs and kidney. *Acta Physiol. Scand. Suppl.* 548: 79- 85, (1986)

**Ward PA., Warren JS., Johnson KJ.:** Oxygen radicals, inflammation and tissue injury. *Free Radic. Biol. Med* 5: 403- 408, (1988)

**Westenberger U., Thanner S., Ruf HH., Gersonde K., Sutter G., Trentz O.:** Formation of free radicals and nitric oxide derivate of hemoglobin in rats during shock syndrome. *Free Radical Res Commun* 11: 167-178, (1990)

**Wiggers HC., Ingraham RC.:** Hemorrhagic shock : Definition and criteria for its diagnosis. *J. Clin. Invest.* 25: 30- 36, (1946)

**Yanagisawa M., Kurihara H., Kimura S., Tomobe Y., Kobayashi M., Mitusi Y., Yazaki Y., Goto K., Masaki T.:** A novel potent vasokonstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 332: 411-415, (1988)

**Yao YM., Bahrami S., Leichtfried G., Redl H., Schlag G.:** Significance of NO in hemorrhaged- induced hemodynamic alterations , organ injury, and mortality in rats. *Am J Physiol* 270: H1616- 23, (1996)

**Zhang JX., Pegoli W., Clemens MG.:** Endothelin- 1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am. J. Physiol.*, 266: G624- G632, (1994)

**Zimmerhackl B., Parekh N., Brinkhus H.:** The use of labeled erythrocytes for intravital investigation of flow and local hematocrit in glomerula capillaries in the rat. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 2: 119- 129, (1983)

**Zimmermann RS., Maymind M., Barbee RW.:** Endothelin blockade lowers total peripheral resistance in hemorrhagic shock recovery. *Hypertension* 23:205-210, (1994)

**Zingarelli B., Squadrito F., Altavilla D., Calapai G., Campo GM., Calo M., Saitta A., Caputi AP.:** Evidence for a role of nitric oxide in hypovolemic hemorrhagic shock. *J Cardiovasc Pharmacol* 19: 982- 6, (1992)

**Zingarelli B., Ischiropoulos H., Salzman AL., Szabó C.:** Improved vascular contractility and cellular energetics in the delayed phase of hemorrhagic shock by mercaptoethylguanidine, a novel inhibitor of the inducible isoform of nitric oxide synthase. *Eur J Pharmacol* 338: 55- 65, (1997)