

**Mikrozirkulationsstörungen der Mucosa hervorgerufen durch das Exotoxin
Escherichia coli Hämolysin am isolierten, volumenkonstant perfundierten
Ileum des Kaninchens**

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von
Friedland, Alexander M.
aus Simmern / Hunsrück

Gießen 2006

Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik V

Direktor:

Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Friedrich Grimminger

des Universitätsklinikums Gießen-Marburg

Gutachter: Prof. Dr. Dr. F. Grimminger

Gutachter: Prof. Dr. A. Szigoleit

Tag der Disputation: 10.07.2006

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung und Stand der Literatur	06
1.1	Sepsis – Inzidenz, Epidemiologie und Risikofaktoren	06
1.2	Definitionen	07
1.3	Sepsiserreger	09
1.4	Sepsis und Intestinaltrakt	09
1.5	Bakterielle Toxine und mucosale Mikrozirkulation	12
2	Zielsetzungen und Fragestellungen	14
3	Materialien, Messgeräte	15
3.1	Chemikalien und biologische Stoffe	15
3.1.1	Pharmaka	15
3.1.2	Erythrozytenstabilisatoren	15
3.1.3	Perfusatlösungen	16
3.2	Materialien und Geräte	18
3.2.1	Versuchsaufbau	18
3.2.2	Messgeräte	19
3.3	Datenaufzeichnung und Auswertung	19
4	Methoden	21
4.1	Gewinnung gewaschener Erythrozyten	21
4.2	Narkosevorbereitung des Versuchstiers	21
4.3	Präparationstechnik	22
4.4	Versuchsaufbau	23
4.5	Sterilität des Kreislaufsystems	25
4.6	Messgrößen	25
4.6.1	Druck in der A. mesenterica superior (P_{SMA} [mmHg]), Gewicht (ΔG [g]), und Peristaltik (kontinuierliche Messungen)	25
4.6.2	Intramucosal-arterielle pCO_2-Differenz (ΔpCO_{2i})	26
4.6.3	Mucosale Hämoglobinsättigung (HbO_{2i}, [%], kontinuierliche Messung) und relative Hämoglobinkonzentration ($rel Hb_{konz}$, kontinuierliche Messung)	28
4.6.4	Messungen aus arteriellen und venösen Blutproben	30

4.7	Bestimmung des <i>E. coli</i> Hämolysin (HlyA) -Toxintiters	31
4.8	Datenauswertung	31
4.9	Experimentelles Protokoll	33
4.9.1	Einschlusskriterien	33
4.9.2	Versuche zum Zusammenhang zwischen Perfusatfluss und mucosaler Hämoglobinoxygenierung (HbO_{2i})	33
4.9.3	Versuche zum Zusammenhang zwischen Perfusatfluss und Sauerstoff-Aufnahme (VO₂)	34
4.9.4	Versuche ohne Toxinapplikation	34
4.9.5	Versuche mit hämolysierten Erythrozyten	34
4.9.6	Versuche mit <i>E. coli</i> Hämolysin (HlyA)	35
5	Ergebnisse	36
5.1	Versuche zum Zusammenhang zwischen Perfusatfluss und mucosaler Hämoglobinoxygenierung (HbO_{2i})	36
5.2	Versuche zum Zusammenhang zwischen Perfusatfluss und Sauerstoff-Aufnahme (VO₂)	37
5.3	Versuche ohne Toxinapplikation	38
5.4	Versuche mit hämolysierten Erythrozyten	38
5.5	Versuche mit <i>E. coli</i> Hämolysin (HlyA)	38
5.5.1	Druck in der A. mesenterica superior (P_{SMA})	38
5.5.2	Mucosale Hämoglobinoxygenierung (HbO_{2i})	40
5.5.3	HbO_{2i}-Histogramme	41
5.5.4	Relative mucosale Hämoglobinkonzentration (rel Hb_{konz})	42
5.5.5	Mucosal-arterielle CO₂-Differenz (ΔpCO_{2i})	43
5.5.6	Darmgewicht (ΔG)	44
5.5.7	Sauerstoffaufnahme (VO₂)	45
5.5.8	Peristaltik	46
5.5.9	Blutgasanalyse, Blutbild, Serumwerte	46
6	Diskussion	48
6.1	Versuchsaufbau und Messmethoden	48
6.2	Effekte einer <i>E. coli</i> Hämolysin (HlyA)-Bolusapplikation	52

7	Zusammenfassung	54
8	Literatur	57
9	Abkürzungsverzeichnis	64
10	Danksagung	67
11	Publikationen	68
12	Erklärung	69
13	Lebenslauf	70

1 Einleitung und Stand der Literatur

1.1 Sepsis – Inzidenz, Epidemiologie und Risikofaktoren

Sepsis, schwere Sepsis und septischer Schock sind in der Intensivmedizin Krankheitsbilder mit ansteigender Inzidenz. Zwischen 1979 und 2000 stieg in den Vereinigten Staaten die jährliche Inzidenz von 164.000 Fällen (82.7 Fälle pro 100.000 Einwohner) auf 660.000 Fälle (240.4 Fälle pro 100.000 Einwohner an (1: Martin, G.S., NEJM 348, 16, 1546). Seit 1987 stellen Infektionen mit gram-positiven Erregern die Hauptursache einer Sepsis dar. Die epidemiologische Datenlage ist für Deutschland erheblich schlechter als für die USA, es kann aber davon ausgegangen werden, dass das Problem der Sepsis und der Sepsis-assoziierten Letalität in Deutschland eine vergleichbare Dimension aufweist. In Untersuchungen an 28 Intensivstationen in 8 europäischen Ländern wurde gefunden, dass Infektionen auf Intensivstationen zu 28% mit Sepsis, zu 24% mit schwerer Sepsis (Sepsis mit mindestens einem Organversagen) und zu 30% mit septischem Schock assoziiert waren (2: Alberti C, ICM 2002, 28:108-121). Die Gesamtmortalität von Sepsispatienten im Krankenhaus ist zwar von 27.8% (Zeitraum 1979 bis 1984) auf 17.9% (Zeitraum 1995 bis 2000) gefallen, die Gesamtzahl an Sepsistoden nimmt aber immer noch zu (1). Als Ursache hierfür werden verschiedene Gründe wie das durchschnittlich höhere Alter der Patienten mit zunehmender Multimorbidität, die steigende Zahl schwerstkranker Intensivpatienten und die Zunahme der diagnostischen und therapeutischen Invasivität angeschuldigt. Die Letalität liegt in Abhängigkeit vom Schweregrad bei <30% bis >60% (Sepsis mit geringer Letalität, schwere Sepsis 30-40%, septischer Schock 60-70%).

1.2 Definitionen

„Eine Sepsis liegt dann vor, wenn sich innerhalb des Körpers ein Herd gebildet hat, von dem konstant oder periodisch pathogene Bakterien in den Blutkreislauf gelangen und zwar derart, dass durch diese Invasion subjektive und objektive Krankheitserscheinungen ausgelöst werden.“

Diese Definition des Hamburger Internisten H. Schottmüller aus dem Jahre 1914 hat nichts von ihrer Prägnanz eingebüsst, wenn auch wesentliche Erweiterungen erforderlich sind. Tatsächlich kann in weniger als der Hälfte aller septischen Patienten ein Erreger oder eine Bakteriämie nachgewiesen werden. Das ist nicht nur auf die frühzeitige Gabe potenter Antibiotika zurückzuführen, sondern ist u.a. auch durch den alleinigen Übertritt bakterieller Toxine in die systemische Zirkulation zu erklären. Durch ein wachsendes Verständnis der Pathophysiologie ist klar geworden, dass der Sepsis ursächlich eine Dysregulation des Immunsystems zu Grunde liegt (83). Eine der Folgen manifestiert sich neben Veränderungen der globalen Hämodynamik in Störungen der Mikrozirkulation (4).

Nach den Kriterien der nordamerikanischen Konsensuskonferenz der Society of Critical Care Medicine /American College of Chest Physicians von 1992 wird die Sepsis definiert als systemische Entzündungsreaktion auf einen infektiösen Stimulus. Die Diagnose der Sepsis stützt sich dabei auf klinische und klinisch-chemische Parameter, die das Vorhandensein einer infektionsbedingten systemischen inflammatorischen Reaktion (SIRS) u.U. auch ohne unmittelbaren mikrobiologischen Erregernachweis nahe legt (5, 77, 78, 79).

Definition von Sepsis nach ACCP/SCCM Consensus Conference (1992)

Sepsis

- I.** Infektiöse Ätiologie der Inflammation – Infektion mikrobiologisch gesichert oder nach klinischen Kriterien diagnostiziert
- II.** Schwere inflammatorische Reaktion (**SIRS**) – (mind. 2 Kriterien)
- Fieber oder Hypothermie ($> 38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$)
 - Tachykardie ($> 90/\text{min}$)
 - Tachypnoe: (>20 Atemzüge/min) oder Hyperventilation ($p_a\text{CO}_2 > 32$ mmHg)
 - Leukozytose ($>12\,000/\mu\text{l}$) oder Leukopenie ($<4000/\mu\text{l}$) oder $>10\%$ stabkernige Neutrophile

Schwere Sepsis (zusätzlich zu I und II)

- III.** Zeichen der Organdysfunktion (mind. eines der folgenden Kriterien)
- Akute Enzephalopathie: reduzierte Vigilanz, Desorientierung, Unruhe, Delir bei fehlender Beeinflussung durch psychotrope Pharmaka, endokrine oder metabolische Ursachen
 - Arterielle Hypotension: $\text{RR}_{\text{sys}} < 90$ mmHg oder anhaltender Blutdruckabfall >40 mmHg gegenüber dem Ausgangsblutdruck
 - Thrombozytopenie ($<100.000/\mu\text{l}$) oder Thrombozytenabfall um mehr als 30%
 - Arterielle Hypoxämie: $p_a\text{O}_2 > 75$ mmHg) unter Raumluft oder Oxygenierungsindex ($p_a\text{O}_2/F_i\text{O}_2$) >250 mmHg unter O_2
 - Oligurie/Anurie: Urinausscheidung oder Abfall der Kreatininclearance
 - Metabolische Azidose: $\text{BE} > 5$ mmol/l oder Laktatanstieg

Septischer Schock (zusätzlich zu I und II)

Arterieller Blutdruck <90 mmHg ohne Ansprechen auf eine adäquate Volumenexpansion oder Einsatz von α -adrenerg wirksamen Katecholaminen um RR auf >60 mm Hg anzuheben

Tabelle 1: nach ACCP/SCCM Consensus Conference (1992)

1.3 Sepsiserreger

Das Erregerspektrum der in Blutkulturen nachgewiesenen Mikroorganismen bei septischen Patienten verteilt sich etwa je zur Hälfte auf grampositive, wie auf gramnegative Bakterien. Der Anteil von Blutkulturen die für *Candida spp.* positiv sind beträgt rund 2%. Die häufigsten Erreger sind: *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus pneumoniae*, koagulase-negative Staphylokokken, Enterokokken, *Klebsiella spp.* sowie *Pseudomonas spp.* Laut Statistik des National Nosocomial Infections Surveillance System von 1996 ist *Escherichia coli* mit 21% aller bakteriologisch nachgewiesenen Sepsisfälle neben *Staphylococcus aureus* (26%) führend in der Erregerliste.

1.4 Sepsis und Intestinaltrakt

Während Lunge und Niere als Zielorgane inflammatorischer Veränderungen mit konsekutiven Funktionsstörungen bei der Sepsis schon seit langem wissenschaftlich untersucht werden, hat der Intestinaltrakt als Zielorgan septischer Funktionsstörungen weniger Beachtung gefunden und ist erst in den letzten 10 Jahren zunehmend Gegenstand des wissenschaftlichen Interesses geworden. Wie bei der Lunge besteht am Darm die Grenzschrift zwischen „Außen“ (hier dem Darmlumen) und „Innen“ nur aus zwei Zellschichten (Darmepithel, Endothel) mit ihren dünnen Basalmembranen und einer dünnen Lage aus interstitiellem Bindegewebe. Dieser, die Resorption von Nährstoffen begünstigende Aufbau birgt im Falle des Integritätsverlustes aber ein erhebliches Risikopotential, da sich im Darmlumen gewaltige Mengen an Keimen und deren Toxinen befindet. Die Gesamtzahl aller Keime im Darmlumen wird auf 10^{12} pro Gramm Stuhl (davon 109 humanpathogene Erreger) geschätzt und umfasst ca. 500 verschiedene Bakterien- und Pilzspezies, was in einer erheblichen intraluminalen Anhäufung von Endotoxin, Exotoxinen, Lipoteichonsäuren und anderen mikrobiellen Produkten führt (81). Dazu kommt die Größe der Kontaktfläche, die beim Menschen bis zu 200 m^2 beträgt (*Aus Rauber/Kopsch: Anatomie des Menschen, Band II, 1987, S. 333*). Bei dieser Konstellation bedarf es einer Reihe von effektiven Schutzmechanismen, um den unkontrollierten Übertritt von Erregern und Toxinen aus dem Darmlumen in die Blutbahn zu verhindern (Tabelle 2).

Table 2: Schutzmechanismen des Gastrointestinaltraktes gegen mikrobielle Invasion

Intakte Darmflora	Überwiegend apathogene Keime, Hemmung von Über- und Fehlbesiedlung durch bakteriellen Synergismus und Antagonismus
Propulsive Peristaltik	Gerichteter Transport von Darminhalt wirkt Fehl- und Überbesiedlung entgegen
Mucussekretion	Der Mucus und das darin befindliche IgA unterstützt die mucosale Barrierefunktion
Mucosale Zellmauserung	Die rasche Erneuerung des Darmepithels (innerhalb von 3 Tagen wird das gesamte Epithel einmal erneuert) gewährleistet die mucosale Integrität und reduziert die bakterielle Oberflächenbesiedlung
Zell-Zell-Kontakte	Ein intaktes System interzellulärer Abschlussleisten verhindert die unkontrollierte parazelluläre Aufnahme von Pathogenen Keimen und Toxinen
Darmständiges Immunsystem	Das GALT (Gut Associated Lymphatic Tissue) ist wesentlicher Bestandteil der spezifischen Abwehr im Intestinaltrakt

Modifiziert nach: Venkataraman R., Fink M.P.: Mechanisms responsible for intestinal barrier dysfunction in critical illness. In: Mechanisms of organ dysfunction in critical illness. Vincent J.L., Evans T., Fink M.P. (Editors), Springer 2002

Die Aufrechterhaltung dieser Schutzmechanismen ist eine energieverbrauchende Leistung des Darms, die an eine ausreichende Zufuhr von Sauerstoff und Substrat gebunden ist. Im Vergleich zu anderen Organsystemen, wie dem Perfusionsgebiet der Herzkranzgefäße (5%), Gehirn (15%), den Nieren (20%), Muskelgewebe (15%) und Haut und Skelett (10%), ist das Splanchnikusgebiet mit einem Anteil von etwa 35% am Herzminutenvolumen deswegen ausgesprochen gut durchblutet (*Aus Taschenatlas der Anatomie, Band II, Helmut Leonhardt, 6. Auflage 1991, „Innere Organe“, S.33*). Die Perfusion kommt überwiegend der Mucosa zugute, deren Integrität von zentraler Bedeutung ist. Eine Verminderung in der Kapillarperfusion und Heterogenität der mikrovaskulären Blutverteilung (4) ist ein wesentlicher Mechanismus bei der Entstehung von Gewebehypoxie, Zellschäden und

Organversagen bei septischen Krankheitsbildern (6). Die mucosale Mikrozirkulation ist wegen des hohen intestinalen Sauerstoffbedarfs und der speziellen Architektur der villösen Blutversorgung mit einem Gegenstromprinzip des Sauerstoffaustausches und nahe kritischer Sauerstoffspannung an der Villusspitze (7, 8) in besonderem Maße von solchen Veränderungen betroffen. Hinzu kommt die bei allen Schockzuständen zu beobachtende Vasokonstriktion großer Gefäße im Splanchnikusstromgebiet (6). Eine kritische Verminderung des mucosalen Sauerstoffangebotes durch Störungen der Mikrozirkulation wie sie bei schweren Erkrankungen vorkommt, kann somit zu einer klinisch relevanten Störung der intestinalen Barriere- und Resorptionsfunktion führen (9).

Beim kritisch Kranken kommt es neben den klassischen Schockorganen (Leber, Lunge, Niere, kardiozirkulatorisches System) auch zur Ausbildung eines „Schockdarms“ (10). Dieser ist klinisch gekennzeichnet durch einen paralytischen Ileus und sonographisch durch weite, ödematös verdickte Darmschlingen, die keine geregelte propulsive Motorik zeigen. Bei den betroffenen Patienten ist zudem eine profunde mikrobielle Florastörung mit Besiedlung üblicherweise keimarmer Abschnitte des Intestinaltraktes (Magen, Dünndarm) zu unterstellen. Die These vom Darm als „undrainiertem Abszess“ und „Motor des Multiorganversagens“ wurde von *Marshall* und *Meakins* formuliert (13, 82). Dieses pathophysiologische Konzept geht von einer intestinalen Schrankenstörung infolge einer schweren infektiösen Sepsis oder nicht-infektiösen Erkrankung (z.B. Polytrauma, akute Pankreatitis, Verbrennungskrankheit) aus, wodurch es zur bakteriellen Translokation von Erregern oder deren Toxine aus dem Darmlumen in die systemische Zirkulation und zur Perpetuierung der bereits angelaufenen systemischen Inflammationskaskade kommt (5, 11, 12, 80). Tatsächlich konnte in verschiedenen Tiermodellen eine Translokation von Erregern in die regionalen Lymphknoten gezeigt werden (16). Die Beantwortung der Frage nach der tatsächlichen Relevanz dieser Beobachtungen ist aber bisher ungeklärt und das Auftreten einer bakteriellen Translokation beim Menschen konnte bisher nicht bewiesen werden (14).

1.5 Bakterielle Toxine und mucosale Mikrozirkulation

Über die pathophysiologischen Mechanismen, die zur Entwicklung eines „Schockdarms“ führen, liegt bisher nur fragmentarisches Wissen vor. Da Darmfunktionen klinisch schwer fassbar sind - das gilt im besonderen Maße für Schwerkranke auf der Intensivstation - kann von klinischen Untersuchungen eher kein signifikanter Wissenszuwachs zur Pathophysiologie erwartet werden. Zur Erforschung basaler Mechanismen sind tierexperimentelle Modelle erforderlich, anhand derer die Wechselwirkungen zwischen Erregern, deren Toxine, immunologischen sowie inflammatorischen Prozessen und intestinalen Funktionen detailliert beschreiben werden können.

Die bisherigen Publikationen zu diesem Thema befassen sich überwiegend mit den Wechselwirkungen zwischen Lipopolysacchariden gramnegativer Bakterien (Endotoxin) und Darmfunktionen (14, 15, 16, 17, 18, 19). Die Verursachung von Organfunktionsstörungen bis hin zum Organversagen durch Endotoxin ist vielfach vorbeschrieben. In einem Ganztiermodell (Hund) wiesen *Vallet et al.* nach systemischer Gabe von Endotoxin eine persistierende Minderperfusion der Mucosa trotz ausreichender Volumensubstitution und dadurch erzielter Normalisierung von Parametern der Makrozirkulation nach (17). Die Autoren fanden einen Anstieg der Sauerstoffspannung in der Muscularis und Serosa und folgerten daraus eine durch Endotoxin induzierte lokale Fehlverteilung der Mikrozirkulation weg von der Mucosa zugunsten anderer Wandschichten. Bei Ratten wurde mittels Intravitalmikroskopie nach Endotoxin-Gabe bei unveränderten Parametern der Makrohämodynamik ein deutlich geringerer Durchmesser der Zottenarteriolen sowie ein geringerer Blutdurchfluss im Vergleich zu unbehandelten Tieren einer Kontrollgruppe beschrieben (18, 73). Insgesamt sind die Befunde hinsichtlich der Wirkung von Endotoxin auf die Mucosaperfusion jedoch widersprüchlich und reichen von einer verminderten Perfusion und defekten O₂-Extraktion (17, 18, 19, 20, 21, 22, 23) bis zu unverändert normalen oder sogar gesteigerten Perfusionsverhältnissen (24, 25, 26).

Im Gegensatz zum Endotoxin existieren bisher keine Informationen zum Effekt bakterieller Exotoxine auf die intestinale Mikrozirkulation. Einer der Mechanismen der Exotoxinwirkung besteht in der Bildung transmembranöser Poren (30, 36, 37). *Escherichia coli* Hämolysin (HlyA) ist ein wichtiges Mitglied dieser Poren-bildenden Toxine (30, 31, 34). HlyA ist ein Protein mit einem Molekulargewicht von 107 kD, das Ähnlichkeiten mit anderen

porenformenden Toxinen wie *Staphylococcus-aureus*- α -Toxin und Streptolysin O aufweist, welche von grampositiven Keimen freigesetzt werden (29, 33, 34, 43). Die von HlyA gebildeten Poren sind durchlässig für Kalzium und Nucleotide wie ATP und GTP, jedoch zu klein, um einen Ausstrom von Proteinen aus der Zelle zu erlauben. Zusätzlich kommt es zu einer von der Porenbildung unabhängigen unspezifischen Toxinbindung an Zelloberflächen und zu G-Protein vermittelten Reaktionen, zu denen u.a. der Respiratory Burst, Freisetzung von Vesikelinhalt und PAF-Produktion bei Neutrophilen und Endothelzellen gehören (28, 35).

Die pathophysiologische Relevanz von bei *E. coli* Infektionen konnte in Tiermodellen gezeigt werden (27, 29). In der Mikrozirkulation der Lunge führt HlyA zu einer Schrankenstörung und zur Perfusions-/Ventilationsfehlverteilung (29, 41, 42). Auch bei humanen Infektionen ist HlyA als Virulenzfaktor anzusehen (28, 32, 35, 38, 39, 40).

2 Zielsetzungen und Fragestellungen

Ziel dieser Arbeit ist der Aufbau eines organphysiologischen Darmmodells (isoliertes Kaninchenileum), das Untersuchungen am intakten Organ mit physiologischen Zell-zu-Zell-Kontakten, nativer Matrix und Zellpolarität erlaubt. Bei erhaltenen lokalen physiologischen Regulationsmechanismen soll das Modell die Option zur Messung der mucosalen Mikrozirkulation, sowie zur Abschätzung der endo-/epithelialen Schrankenfunktion beinhalten. Das Modell soll genutzt werden, um die Auswirkung bakterieller Toxine auf die Mikrozirkulation der Darmmucosa unabhängig von Veränderungen der globalen Hämodynamik zu untersuchen. Solche Untersuchungen wurden bisher überwiegend mit Endotoxin durchgeführt. Erkenntnisse über die Auswirkung von Exotoxinen auf Organfunktionen wurden insbesondere an isolierten Lungen- und Herzmodellen von Kaninchen und Ratten gewonnen. Über die Auswirkung bakterieller Exotoxine auf die Mikrozirkulation und Integrität der Darmbarriere ist nur sehr wenig bekannt. Untersuchungen zur enteralen Wirkung von *Eschericia coli* Hämolysin (HlyA), ein aus infektiologischer und intensivmedizinischer Sicht wichtiges Toxin eines klinisch hochrelevanten Sepsiserregers, liegen bisher nicht vor. An diesem Modell sollen daher die pathophysiologischen Auswirkungen von *E.coli* Hämolysin auf die am Modell zu erhebenden Messparameter untersucht werden.

Im Einzelnen sollen folgende Fragestellungen bearbeitet werden:

1. Kann ein isoliertes Darmorganmodell etabliert werden, das Messungen der mucosalen Mikrozirkulation erlaubt?
2. Welche Messparameter können gewonnen werden, um Aussagen über die Mucosadurchblutung zu machen?
3. Welche Veränderungen der Messparameter werden nach Gabe von HlyA am isolierten Ileummodell gemessen?
4. Sind die zu messenden Veränderungen dosisabhängig?

3 Materialien, Messgeräte

3.1 Chemikalien und biologische Stoffe

3.1.1 Pharmaka

- *Escherichia coli* Hämolyysin (HlyA): Prof. Dr. S. Bhakdi (Mikrobiologisches Institut der Medizinischen Fakultät, Universitätsklinikum Mainz, Deutschland)
- Ketamin (Ketanest[®] 50 mg /ml): Firma Parke-Davis (Berlin, Deutschland)
- Lidocain-HCl (Xylocain[®] 2 %): Astra Chemicals GmbH (Wedel, Deutschland)
- Na-Heparin (Liquemin[®] 5000 I.E./ml): Hoffmann La Roche AG (Grenzach-Wyhlen, Deutschland)
- Xylazin (Rompun[®] 20 mg /ml): Bayer AG (Leverkusen/Deutschland)

3.1.2 Erythrozytenstabilisatoren

- PAGGS-M: Firma Biotrans (Dreieich, Deutschland)
- Zitronensäure: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland)
- (+) Glucose: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland)
- Natriumcitrat: Merck AG (Darmstadt, Deutschland)
- Natriumdihydrogenphosphat: Merck AG (Darmstadt, Deutschland)
- CPD-Puffer:

Natriumcitrat	26.3 g/l
Zitronensäure-Monohydrat	3.27 g/l
Glucose-Monohydrat	25.5 g/l
Natriumdihydrogenphosphat	2.51 g/l
Aqua ad inject	ad 1000 ml

3.1.3 Perfusatlösungen

- Calciumchlorid-Dihydrat: Merck AG (Darmstadt, Deutschland)
- D(-) Glucose: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland)
- HAES steril 10% (Hydroxyethylstärke 200/0.5): Fresenius AG (Bad Homburg v.d.H., Deutschland)
- Kaliumchlorid: Merck AG (Darmstadt, Deutschland)
- Kaliumdihydrogenphosphat: Merck AG (Darmstadt, Deutschland)
- L-Glutamin: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland)
- Magnesiumchlorid-Hexahydrat: Sigma-Aldrich-Chemie GmbH (Deisenhofen, Deutschland)
- Natriumchlorid: Carl Roth GmbH & Co (Karlsruhe, Deutschland)

Modifizierter Krebs-Henseleit Puffer der Firma Serag-Wiesner AG (Naila, Deutschland) mit folgender Zusammensetzung (**Perfusat 1**):

Calciumchlorid-Dihydrat	2.40 mmol/l
Glucose	13.32 mmol/l
HAES (Hydroxyethylstärke)	80g/l
Kaliumchlorid	4.30 mmol/l
Kaliumdihydrogenphosphat	1.10 mmol/l
L-Glutamin*	34.2 mmol/l
Magnesiumchlorid-Hexahydrat	1.30 mmol/l
Natriumchlorid	120 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat	24 mval/l
pH-Wert	7.40 ± 0.03
Osmolarität	286 mosmol
Onkotischer Druck	30 mosmol

*Vor Versuchsbeginn frisch zugesetzt

Perfusat 2: Beim Perfusat 2 wurden gegenüber dem Perfusat 1 folgende Veränderungen vorgenommen:

Erythrozyten	Hb 8.1 ± 0.13 g/dl
Natriumchlorid	100 mmol/l
Natriumhydrogencarbonat	42.5 mval/l
pH-Wert	7.38 ± 0.03

Die Perfusatzusammensetzung wurde vor jedem Versuch hinsichtlich Na-, K-, und Glucosegehalt sowie Hb-Wert kontrolliert.

3.2 Materialien und Geräte

3.2.1 Versuchsaufbau

- *Arterielle Kanülierung:* Metallkanüle als Sonderanfertigung der Firma Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten/Deutschland) mit 2.0 mm Außendurchmesser und ca. 1.8 mm Innendurchmesser sowie zwei zirkulären Einkerbungen am distalen Ende zur Fixation von Ligaturen.
- *Venöse Kanülierung:* Teflonkanüle als Eigenanfertigung mit 3.5 mm Außendurchmesser und einem Innendurchmesser von 3.4 mm sowie zwei zirkulären Einkerbungen am distalen Ende zur Fixation von Ligaturen.
- *Perfusionssystem:* Tygon-Schläuche (Innendurchmesser von 2.4 mm), Firma Norton Performance Plastics Corporation (Akron, Ohio, USA)
- *Arterielle und venöse Druckmessung:* Teflon-Schlauch (Außendurchmesser 0.56 mm), Novodirect (Kehl am Rhein, Deutschland)
- *Peristaltikmessung:* Latex-Ballon (Durchmesser 10 mm), Hugo Sachs Elektronik (March-Hugstetten, Deutschland)
- *Blutdruck-/Peristaltikmessung:* Statham-Druckaufnehmer vom Typ Combitrans[®]-Monitoring Set Modell II, Fa. B. Braun Medical (Melsungen/Deutschland)
- *Perfusatzirkulation:* Rollerpumpe Masterflex 7518-00, Cole-Parmer (Niles, Illinois, USA)
- *Perfusatoxygenierung:* Plattenoxygenator des Typs M2, Fa. Jostra Medizintechnik mit 10 ml Füllvolumen (Hirrlingen, Deutschland)
- *Perfusattemperierung:* Frigomix U und Thermomix UB, B. Braun AG (Melsungen, Deutschland)
- *Beatmungspumpe:* Eigenbau mit einem Hubvolumen von 29 ml und einer Beatmungsfrequenz von 30 Hüben / min .
- *Pharmakaapplikation:* Hamilton Präzisionsspritze 20 µl und 50 µl, Hamilton (Darmstadt, Deutschland)
- *Blutfilter:* Leukozytenfilter Bio R01 plus, Firma Biotrans (Dreieich, Deutschland)

3.2.2 Messgeräte

- *Druckmessung*: Überwachungsmonitor vom Typ Hellige Memoskop 4/6 - 28, Firma Hellige (Freiburg, Deutschland)
- *Blutgasanalyse*: ABL 330 (Acid Base Laboratory), Radiometer Deutschland GmbH (Willich, Deutschland)
- *Kalium- und Laktatbestimmung*: Kodak Ektachem 250 Analyzer, Johnson & Johnson Clinical Diagnostics (Neckargemünd, Deutschland)
- *Bestimmung des Darmgewichts*: Laborwaage PB 3002 Delta-Range (Messbereich: 10mg bis 3000g), Fa. Mettler/Toledo (Gießen, Deutschland)
- *Spektrophotometrie*: EMPHO II[®], Bodenseewerk (Gerätetechnik Überlingen, Germany)
- *Tonometrie*: Paratrend 7, Multiparameter Intravascular Sensor, Pfizer (Karlsruhe, Deutschland)

3.3 Datenaufzeichnung und Auswertung

- *PC - Labcard 818 H* von Advantech zur Wandlung von analogen Messwerten in digitale Signale
- Software Labtech Notebook[®]: Firma Spectra (Leinfeld-Echterdingen, Deutschland)
- *DX - 40 Personalcomputer* mit 8 MB Arbeitsspeicher
- *Windows 95, Windows XP, Microsoft[®] Corporation*
- *Office 97, Office XP, Microsoft[®] Corporation*
- *SPSS[®] for Windows, SPSS Inc. (Chicago, USA)*
- *PlotIT[®] 3.2, Scientific Programme Enterprises (Haslett, USA)*

4 Methoden

4.1 Gewinnung gewaschener Erythrozyten

Bei den für das erythrozytenhaltige Perfusat gewonnenen Erythrozyten handelte es sich um Erythrozyten von Spenderkaninchen. Das aus der Ohrarterie gewonnene Vollblut wurde mit CPD-Stabilisatorlösung versetzt (7ml auf 50 ml Vollblut). Anschließend folgte das zweimalige Waschen der Erythrozyten, die abzentrifugiert, jeweils wieder auf 50 ml mit 0.9%-iger NaCl-Lösung resuspendiert und nach einem weiteren Waschvorgang über einen Leukozytenfilter filtriert wurden. Nach der Filtration wurden die Erythrozyten nochmals zentrifugiert und nach Resuspension mit PAGGS-M Stabilisatorlösung bei +4°C im Kühlschrank gelagert. Vor jedem Versuchstag wurde die benötigte Menge an Erythrozyten dann nochmals gewaschen. Sämtliche Zentrifugationen wurden für 10 min bei 2500 G durchgeführt. Um einen Hb-Wert von 8.1 ± 0.13 g/dl und einen Hämatokrit von 23.0 ± 0.5 % zu gewährleisten, wurden etwa 60 ml des Erythrozytenkonzentrates mit 140 ml Perfusat 1 auf 200 ml aufgefüllt.

4.2 Narkosevorbereitung des Versuchstiers

Bei den verwendeten Versuchstieren handelte es sich um speziell zu Laborzwecken gezüchtete Kaninchen verschiedenen Geschlechts der Rasse „Weisse Neuseeländer“. Die Tiere wurden vor Versuchsbeginn für 12 Stunden bei freiem Zugang zu Wasser nüchtern gesetzt.

Nach Kanülierung einer lateralen Ohrvene des Kaninchens erfolgte die Sedierung durch Gabe von 15 mg Ketamin und 4 mg Xylazin. Anschließend folgte die Antikoagulation des Kaninchens mit 1000 I.E. Heparin pro kg Körpergewicht. Das analgosedierte Kaninchen wurde nun in Rückenlage fixiert und an Hals und Bauch geschoren. Zur Vorbereitung der Tracheotomie erfolgte eine subkutane Injektion von 10 ml Xylocain 2 % zur Lokalanästhesie etwa 3 cm unterhalb des Larynx. Danach wurde die Trachea schichtweise unter Schonung der großen Gefäße und des N. vagus freipräpariert und mit einem Ligaturfaden angeschlungen. Nach Eröffnen der Trachea wurde ein Beatmungstubus eingeführt und fixiert. Die Beatmung

des Kaninchens erfolgte mit einer Frequenz von 30 min^{-1} und einem Atemzugvolumen von 29 ml. Unter der Beatmung wurde nun die Narkose über einen Zeitraum von 15 Minuten durch Applikation von 30-35 mg/kg KG Ketamin und 7.7-9 mg/kg KG Xylazin vertieft. Zur Stabilisierung erhielten die Tiere eine Infusion von 100 ml einer 0.9%-igen NaCl-Lösung über einen Zeitraum von 30 Minuten. Die Narkosetiefe wurde nach Entfernen der Cutis im Abdominalbereich anhand des erlöschenden Bauchdeckenreflexes überprüft.

4.3 Präparationstechnik

Die nun erfolgende Eröffnung des Abdomens wurde mittels einer kompletten medianen Laparotomie unter Schonung der Aa. thoracicae internae bewerkstelligt. Der Magen wurde angeklemt und nach kranial aus der Bauchhöhle mobilisiert. Ebenso wurde der Dickdarm nach kranial aus der Bauchhöhle verlagert und mit einem angefeuchteten Tuch abgedeckt. Anschließend konnte das von der Arteria mesenterica superior versorgte Dünndarmsegment anhand des artspezifisch langen Appendix vermiformis, mit dem es zum Teil über eine Mesobrücke verbunden ist, identifiziert und so positioniert werden, dass der Mesenterialansatz ventral des Pankreas leicht erreichbar war. Dabei kam das Ileum bogenförmig ausgebreitet teilweise außerhalb der Bauchhöhle zu liegen, wobei es auf der linken Seite vom Appendix vermiformis flankiert wurde. Nach Abmessen von ca. 50 cm Dünndarm in oraler Richtung wurde dieses Darmsegment abgesetzt und in beide Enden ein Schlauch von 9 mm Durchmesser zur Drainage des Darminhaltes eingebunden. Anschließend musste der Darm skelettiert werden. Dazu wurden rechts und links des Gefäßstiels mit je vier bis fünf Ligaturen die von diesem abgehenden arteriellen und venösen Seitenäste unterbunden. Es resultierte ein ca. 22-28 g schweres Ileumsegment mit zu diesem Zeitpunkt noch bestehender Blutversorgung durch den Kreislauf des Kaninchens. Als nächster Schritt wurden am Mesenterialansatz Arteria und Vena mesenterica superior dargestellt. Die Arteria mesenterica superior wurde mit Ligaturen (5x0) umstochen und eine Metallkanüle mittels Seldinger Technik in das Gefäß eingebunden. Anschließend wurde unverzüglich die Perfusion mit einem Fluss von 10 ml/min gestartet. Als Perfusat diente zu diesem Zeitpunkt das auf 4 °C gekühlte erythrozytenfreie Perfusat 1. Zur Kontrolle der Perfusionsqualität wurde die Entfärbung der Darmwand beobachtet. Die Vena mesenterica superior wurde nun

ebenfalls mit Ligaturen (5x0) umstochen und es wurde mittels Seldinger Technik eine Teflonkanüle eingebunden. Nach Durchtrennung des Gefäßstiels proximal der beiden eingebundenen Kanülen folgte die vollständige Mobilisierung des präparierten Ileumsegments.

4.4 Versuchsaufbau

Das mobilisierte Ileumsegment wurde in das beheizbare, mit Pufferlösung (KHB-Puffer) gefüllte Organgefäß verlagert und die Kanülen in Halterungen befestigt. An der arteriellen und venösen Kanüle wurden nun die über ein T-Stück-Schlauchverbinder eingeführten Innenkatheter an Statham-Druckaufnehmer angeschlossen. Zur Gewichtsregistrierung diente eine kontinuierlich messende Digitalwaage. Zur manometrischen Peristaltikmessung wurde über den in das orale Darmende eingeführten Schlauch ein Ballonkatheter in das Darmlumen vorgeschoben und mit 0.5 ml Kochsalzlösung gefüllt. Nach Beginn der kontinuierlichen Messung von arteriellem Druck, Peristaltik und Gewichtsänderungen wurde das bis dahin benutzte erythrozytenfreie und auf 4 °C gekühlte Perfusat 1 gegen das erythrozytenhaltige Perfusat 2 ausgewechselt. Die Perfusatemperatur wurde über einen Zeitraum von 20 Minuten auf 37 °C angehoben und das Ileumsegment nun mittels einer Rollerpumpe rezirkulierend perfundiert. Die Perfusatbegasung erfolgte durch einen Plattenoxygenator. Mit einem Carbogengemisch (95 % O₂ und 5 % CO₂) und einem Gasfluss von 30-40 ml/min wurde ein pH zwischen 7.35 und 7.45 eingestellt. Dabei wurden ein arterieller pO₂ von im Mittel 55.4 ± 0.78 mmHg und ein ΔpCO₂ von durchschnittlich 48.9 ± 2.2 mmHg erreicht. Der venöse Druck wurde durch entsprechende Positionierung des venösen Schlauchsystems auf Werte zwischen 0 und -2 mmHg eingestellt. Die doppelwandigen Perfusativorratsgefäße, das Organgefäß sowie der Plattenoxygenator waren mit einem zusätzlichen kombinierten Wärme-/Kühlkreislauf versehen. Nach Stabilisierung des Perfusionsdrucks wurde die Sensoren für die kontinuierliche pCO₂- beziehungsweise HbO₂-Messung in das Lumen eingeführt und an der Schleimhaut platziert. (Abb.1).

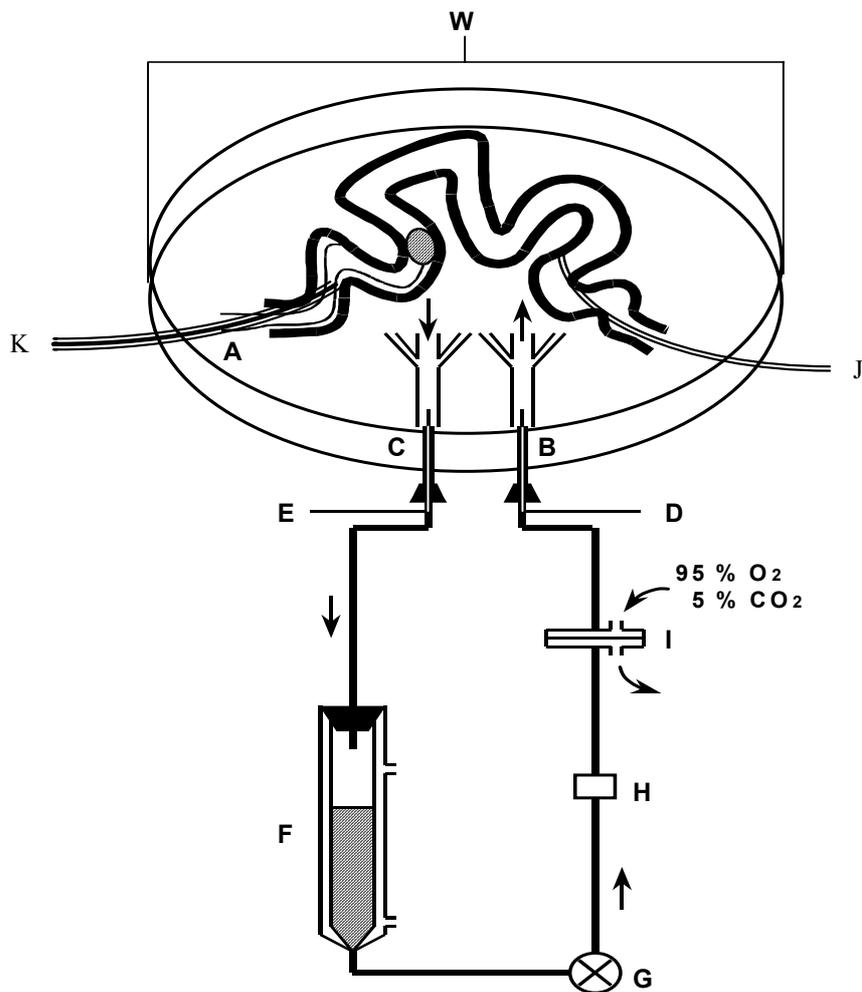


Abb. 1: Isoliertes, vaskulär perfundiertes Ileummodell.

Das Ileum-Segment befindet sich in einem mit Pufferlösung gefüllten, beheizten Organbad (37°C). Kontinuierliche Gewichtsregistrierung durch eine elektronische Präzisionswaage (W). A: Ballon-Katheter für das Monitoring der intestinalen Motilität (Frequenz, Grundtonus und Kontraktionsdruck der Peristaltik); B: arterielle Kanüle in der A. mesenterica superior; C: venöse Kanüle in der V. mesenterica superior; D, E: Katheter für das Monitoring von arteriellem und venösem Druck; F: beheizbarer Perfusatbehälter; G: Rollerpumpe (kontinuierlicher Fluss); H: Wärmeaustauscher; I: Plattenoxygenator; J: Sensor zur intraluminalen pCO₂-Messung; K: Sensor zur reflektionspektrophotometrischen Messung der Mucosaperfusion.

4.5 Sterilität des Kreislaufsystems

Alle mit dem Perfusat oder dem Organ in Kontakt tretende Geräte, Apparaturen, Perfusatbehälter, Schläuche usw. wurden mechanisch von Hand unter fließendem Wasser vorgereinigt und danach in einer industriellen Spülvorrichtung gesäubert. Nach dem Trocknen der Glasteile wurden deren Öffnungen verschlossen. Nun folgte die Sterilisation in einem Autoklaven. Alle anderen, hitzeunbeständigen Teile des Kreislaufsystems wurden nach dem Trocknen in Gassterilisationsfolien verpackt und in Gassterilisatoren nach den Vorschriften der aseptischen Chirurgie behandelt.

Der Endotoxingehalt des rezirkulierenden Perfusats wurde in regelmäßigen Intervallen gemessen, um eine Kontamination auszuschließen. Die ermittelten Werte lagen jeweils niedriger als 10 pg/ml (untere Nachweisgrenze des verwendeten Tests).

4.6 Messgrößen

4.6.1 Druck in der A. mesenterica superior (P_{SMA} [mmHg]), Gewicht (ΔG [g]) und Peristaltik (kontinuierliche Messungen)

Mit Hilfe eines Innenkatheters und eines Druckschlauchs wurden die Drücke im arteriellen Schenkel des Kreislaufs unmittelbar vor der arteriellen Kanüle aufgenommen und zum Druckaufnehmer geleitet. Die dort entstandene elektrische Spannung wurde durch einen Brückenverstärker amplifiziert und mittels Analog-Digital-Wandlerkarte dem Registrierrechner als Zahlenwert übergeben. Durch ein Druckkalibrationsgerät nach *Gauer* erfolgte regelmäßig die Einstellung des Rechnerprogramms. In analoger Weise wurde der Druck im Ballon, der der Peristaltikmessung diente erfasst und aufgezeichnet. Die Aufzeichnung erfolgte mit einer Frequenz von 1 Hz (P_{SMA}) bzw. 5 Hz (Peristaltik).

Das absolute Darmgewicht konnte nur vor Versuchsbeginn und nach Versuchsende gemessen werden. Während des laufenden Versuchs konnten nur relative Veränderungen des Gewichts registriert werden. Mit Versuchsbeginn wurde mittels der Tara-Funktion der Laborwaage die

Gewichtsanzeige auf „Null“ gesetzt und es wurden nachfolgend die Gewichtsänderungen mit einer Frequenz von 1 Hz registriert.

4.6.2 Intramucosal-arterielle pCO₂-Differenz ($\Delta p\text{CO}_2$)

Vom intramucosalen CO₂-Partialdruck (pCO_{2i}) ist bekannt, dass er sich rasch mit dem intraluminalen pCO₂ äquilibriert (45, 46). Die Differenz zwischen intramucosalem und arteriellem pCO₂ wird im Englischen auch als pCO₂-Gap bezeichnet. Der pCO₂-Gap gilt als Parameter für die Mucosaperfusion (65), wird aber auch durch andere Variablen beeinflusst. Der hier zur intraluminalen pCO₂-Messung verwendete Sensor (Paratrend[®] 7FL, MPS 7004S, Firma Diametrics Medical Inc.) enthielt eine amperometrische Sauerstoffelektrode (Clark Elektrode), fiberoptische pH- und CO₂-Sensoren und einen Temperaturfühler (Abb. 2). Alle Messeinheiten waren in der Sensorspitze auf einer Länge von 6 cm und einem Außendurchmesser von 0.5 mm untergebracht (76). Die Messung von pCO₂ erfolgte auf der Grundlage der Absorption von Licht einer definierten Wellenlänge in einem Gel, welches die Eigenschaft hat in Abhängigkeit von der CO₂-Konzentration seine Farbe und damit die Menge des absorbierten Lichtes zu verändern (Acrylamidgel mit Phenolzusatz). Für die Messung wurde über einen Lichtleiter Licht von der Basiseinheit zum Sensor geleitet und aus dem zurückgeleiteten Licht die CO₂-Konzentration errechnet. Vor dem Einsatz des Sensors wurde dieser mit der in die Basiseinheit integrierten Kalibrationseinheit unter Verwendung von Gasstandards kalibriert (62). Nach der Kalibration wurde der Sensor über die proximale (orale) Öffnung des Ileums eingeführt und vorsichtig der Mucosa angelegt.

Der so genannte pCO₂-Gap ($\Delta p\text{CO}_2$) wurde aus der Differenz zwischen dem Kohlendioxidpartialdruck des arteriellen Perfusats und dem intraluminal gemessenen Partialdruck des CO₂, welcher mit dem intramucosalen pCO₂ gleichzusetzen war, berechnet.

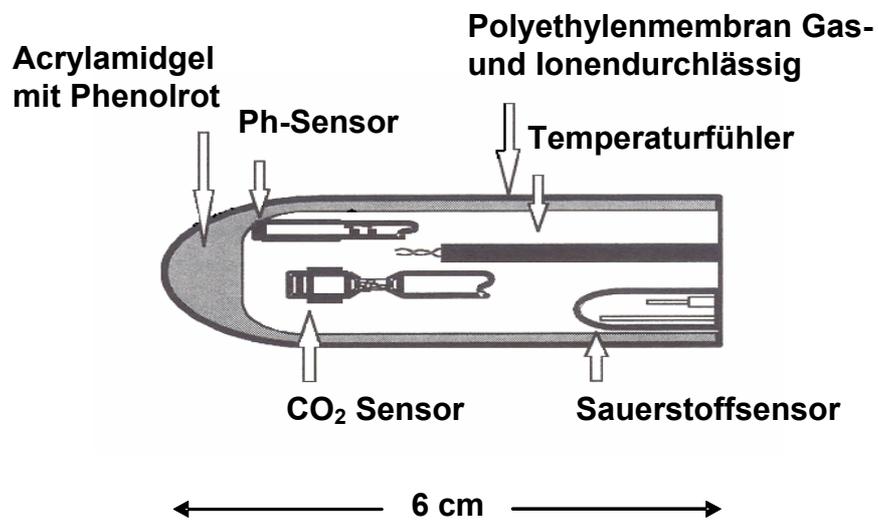


Abb.2: Schematischer Aufbau der Spitze des CO₂-Sensors (Paratrend®).

Der Temperaturfühler und die Sensoren zur Messung von pH, CO₂ und Sauerstoff sind in Acrylamidgel eingebettet. Nach außen wird die Anordnung durch eine für Gase durchlässige Polyethylenmembran begrenzt.

4.6.3 Mucosale Hämoglobinsättigung (HbO_{2i}, [%], kontinuierliche Messung) und relative Hämoglobinkonzentration (rel Hb_{konz}, kontinuierliche Messung)

Zur Messung der Mucosaperfusion diente ein Erlanger Mikrolichtleiter-Photometer (EMPHO[®]), das nach dem Prinzip der Remissionsspektrophotometrie arbeitet. Dieses Verfahren wurde erstmalig 1979 von *Sato* beschrieben (48). Das EMPHO[®] wurde von Frank et al. 1989 entwickelt und beschrieben (51). Bei diesem Verfahren wird monochromatisches Licht eines definierten Wellenlängenbereichs von einer Xenon-Lichtbogenlampe über einen 250 µm durchmessenden Mikrolichtleiter auf das zu untersuchende Gewebe gesendet. Das remittierte Licht wird über sechs weitere, symmetrisch um den ersten zentral angeordneten Lichtleiter (Durchmesser jeweils 250 µm) auf eine rotierende Interferenzfilterscheibe gestrahlt, wo es in Frequenzbereiche zwischen 502 bis 628 nm spektral aufgespalten wird. Über einen Photomultiplier werden die Lichtimpulse der einzelnen Frequenzbereiche portioniert in elektrische Impulse umgewandelt und danach über einen Analog-digitalen-Messwandler in einen PC übertragen und auf einem Bildschirm graphisch dargestellt (51). Kalibriert wurde vor jeder neuen Messreihe mit den optischen Spektren der „Farben“ Schwarz und Weiß. Die Remissionsspektren wurden mit den Spektren für oxygeniertes Hämoglobin (zweigipflige Kurve mit Maxima bei 542 und 577 nm) und desoxygeniertem Hämoglobin (eingipflige Kurve mit einem peak bei 556 nm) verglichen, um über einen Algorithmus die absoluten Hämoglobinanteile (HbO_{2i}) der beiden Fraktionen zu berechnen (Abb. 3). Weiterhin wurde die Konzentration des Gesamthämoglobins simultan zur Sättigung in Relation zu dem ersten in einer jeweiligen Messreihe detektierten Wert als Vielfaches von 1 dargestellt (rel Hb_{konz}). Das Gerät registrierte und berechnete 66 Spektren pro Sekunde. Zur Begrenzung der Datenmenge wurden 100 Spektren gemittelt. Demnach wurde etwa alle 1.5 Sekunden ein gemittelter Wert aufgezeichnet. Der Aperturwinkel der Lichtleiter betrug 60°, woraus sich eine numerische Apertur von 0.5 ergab. Die gemessene Fläche betrug 90 × 90 µm, bei einer Eindringtiefe von 250 µm. Durch die Peristaltik kam es während der Datenaufzeichnung zu feinsten tangentialen Bewegungen zwischen Sonde und Mucosa und somit zu einem ständigen Wechsel des gemessenen Schleimhautareals. Daraus resultierte eine Streuung der Messergebnisse, die bei der hohen Messfrequenz als Maß für die Inhomogenität der Schleimhautdurchblutung gewertet wurde. Die Eindringtiefe in das Gewebe von max. 250

µm begrenzte die Messungen auf die Mucosa. Der EMPHO[®]-Sensor wurde über das distale (aborale) Ende des Ileums eingeführt und ohne Druck der Mucosa angelagert (Abb. 3).

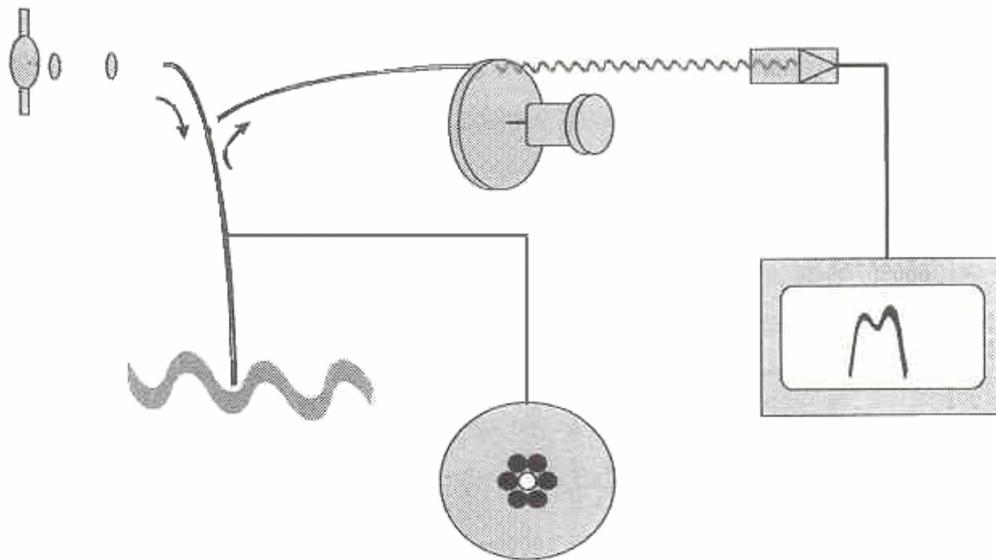


Abb 3.: Funktionsschema der Remissionsspektrophotometrie (EMPHO II[®]): Von der Lichtquelle gelangt Licht über den zentralen Lichtleiter (weiß) auf die Darmschleimhaut. Das reflektierte Licht wird über die äußeren Lichtleiter (schwarz) auf die Interferenzfilterscheibe geleitet und dort spektral aufgespalten. Über einen Photomultiplier werden die Lichtportionen an einen analog-digitalen-Meßwandler gesendet, der die Signale in elektrische Impulse umwandelt und einem Personalcomputer zuführt. Dieser interpretiert die erhaltenen Daten und stellt sie auf einem Monitor graphisch dar.

4.6.4 Messungen aus arteriellen und venösen Blutproben

Zu definierten Zeitpunkten während des Versuchsablaufs wurden arterielle und venöse Blutproben entnommen. Die Bestimmung von Blutgasanalyse (pO_2 , pCO_2 , Standardbicarbonat, pH), Blutbild (Hb, Hk) und Serumwerten (Na, K, Glucose, Laktat, Laktatdehydrogenase) erfolgte mit etablierten Standardmethoden des Routinelabors.

Die Werte für Sauerstoffaufnahme (VO_2) und Sauerstoffangebot (DO_2), jeweils bezogen auf 100 g Gewebe, wurden folgendermaßen ermittelt:

$$(1) VO_2 = V_T \times avDO_2$$

$$(2) DO_2 = V_T \times C_aO_2$$

$$(3) avDO_2 = C_aO_2 - C_vO_2$$

$$(4) C_aO_2 = Hb \times 1.34 \times S_aO_2 + p_aO_2 \times 0.003$$

$$(5) C_vO_2 = Hb \times 1.34 \times S_vO_2 + p_vO_2 \times 0.003$$

VO_2 = Sauerstoffaufnahme (ml O_2 /min)

V_T = Perfusatminutenvolumen (ml/100g/min)

$avDO_2$ = arteriovenöse O_2 -Differenz (ml O_2 /100ml)

DO_2 = Sauerstoffangebot (ml O_2 /min)

C_aO_2 = arterielle O_2 -Konzentration (ml O_2 /100ml)

C_vO_2 = venöse O_2 -Konzentration (ml O_2 /100ml)

Hb = Hämoglobingehalt (g/100ml)

1.34 = Hüfner-Zahl (ml O_2 /g Hb)

S_aO_2/S_vO_2 = arterielle/venöse Sauerstoffsättigung (%)

p_aO_2/p_vO_2 = arterieller/venöser Sauerstoffpartialdruck (mmHg)

0.003 = Löslichkeit von O_2 in Wasser (ml O_2 /100ml/atm)

4.7 Bestimmung des *E. coli* Hämolysin (HlyA) -Toxintiters

Eine hämolytische Einheit (HU) ist definiert als die Konzentration des Toxins, mit der eine 60%-ige Hämolyse in einer 10%-igen Erythrozytenlösung erreicht wird. Zur Bestimmung der Aktivität des in den Versuchen eingesetzten HlyA wurden 10 µl einer HlyA-Charge in einer Verdünnungsreihe von 1/10 bis 1/20480 in Probengefäßen vorbereitet. Je 50 µl einer HlyA-Verdünnungsstufe und 50 µl einer frischen, 10%-igen Kaninchenerthrozytenlösung wurden 60 Minuten in einem 37°C warmen Wasserbad unter vorsichtiger Bewegung inkubiert. Anschließend wurden die Proben zentrifugiert und jeweils 10 µl des Überstandes zur photometrischen Messung mit 90 µl einer 0.9%-igen NaCl-Lösung in eine Mikrotiterplatte pipettiert.

Die Messung der Extinktion erfolgte bei 405 nm. In halblogarithmischer Darstellung gegen die Verdünnungsstufe aufgetragen, kann der Punkt der 60%-igen Hämolyse optisch ermittelt werden und der entsprechenden Verdünnungsstufe (Titer) zugeordnet werden. Aus dem Quotienten von HlyA-Volumen und Perfusatvolumen im Verhältnis zum Titer, ließ sich die Größe der Dimension „Hämolytische Einheit“ (Hemolytical Unit; HU) pro Volumen berechnen: ($\mu\text{l HlyA}/\mu\text{l Perfusatvolumen} \times \text{Titer}^{-1}$).

4.8 Datenauswertung

Die Registrierung erfolgte unter Windows 3.1[®] durch einen 386-er PC, der zusätzlich mit einer Analog-Digital-Wandlerkarte (PC -Labcard 818 H, Advantech) und der dazu gehörigen Software Labtech Notebook[®] ausgerüstet war. Die Druckregistrierung erfolgte als analoges Signal über Statham-Druckaufnehmer und anschließender Verstärkung des Signals durch einen Brückenverstärker. Über eine zusätzliche serielle Schnittstelle wurde die Waagenanzeige digital auf den Registrierrechner transferiert. Die Daten der Paratrend[®]-Messeinheit wurden über die parallele Schnittstelle ebenfalls auf den Registrierrechner übertragen. Während des Versuchs wurden die diese Daten auf dem Monitor dargestellt und gleichzeitig als Datei im ASCII-Format auf der Festplatte abgelegt. Arterieller Druck und das Gewicht wurden einmal pro Sekunde gespeichert. Die Speicherung der Paratrend[®]-Daten und der Peristaltik erfolgte in Intervallen von 5 Sekunden.

Zur Auswertung des arteriellen Drucks diente ein in Excel[®] geschriebenes Makro, das aus den 60 Druckwerten je Minute den Mittelwert berechnete. Die Frequenz der Peristaltik wurde mit Hilfe einer Fast-Fourier-Transformation aus je 256 aufgezeichneten Werten ermittelt. Bei einer Aufzeichnungsfrequenz von 5 Hz ergab sich so ein Mittelwert alle 51.2 Sekunden. Die Ergebnisse jeder Transformation wurden optisch kontrolliert und der größte Frequenzpeak notiert. Zur Bestimmung der Amplitude diente ein Makro in Excel[®]. Dieses bestimmte fortlaufend die Maxima und Minima der über den intraluminalen Ballonkatheter registrierten Druckschwankungen und berechnete daraus die Amplitude des Kontraktionsdrucks, die anschließend noch über eine Minute gemittelt wurde.

Zu den jeweiligen Ablesezeitpunkten wurden die Werte der verschiedenen Messparameter in eine Excel[®]-Tabelle übertragen und Versuche der gleichen Reihe nebeneinander gestellt. Auf diese Weise konnten Mittelwert, Standardabweichung und Standardfehler des Mittelwertes berechnet werden. Die graphischen Darstellungen wurden mit PlotIT[®] 3.2 und PowerPoint[®] angefertigt. Bei der statistischen Auswertung kam das Programm SPSS[®] 6.1 für Windows zur Anwendung.

Bei Vergleichen innerhalb einer Versuchsreihe kam nach Testung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnov) der T-Test für verbundene Stichproben zur Anwendung. Bei Vergleichen zwischen zwei verschiedenen Versuchsreihen wurde das allgemeine lineare Modell für Messwiederholungen herangezogen. Bei Vergleichen zwischen mehr als zwei Versuchsreihen kam die einfaktorielle ANOVA zum Einsatz. In allen Fällen wurde zuvor auf Normalverteilung getestet. War diese nicht gegeben, so kam entweder ein Mann-Whitney-Rank-Sum-Test oder eine ANOVA on Ranks zur Anwendung. Ein Wert von $p < 0.05$ wurde als statistisch signifikant betrachtet. Alle Werte im Text der Arbeit wurden als Mittelwert +/- Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

4.9 Experimentelles Protokoll

4.9.1 Einschlusskriterien

Organpräparationen, die in die Datenauswertung einbezogen wurden, durften nur eine möglichst kurze Präparationszeit bis zur Kanülierung der Mesenterialgefäße, sowie eine kleinstmögliche warme und kalte Ischämie- bzw. Perfusionsphase durchlaufen. Objektivierbare Parameter, die als Einschlusskriterien einer Präparation während einer Steady-State Phase von 30 Minuten dienen waren die Folgenden:

- (1) Homogene Perfusion ohne Zeichen von Ödem, Blutung oder Blutstauung,
- (2) sichtbare und mit dem Ballonkatheter messbare Peristaltik,
- (3) konstanter Verlauf aller Messparameter.

Alle Organpräparationen, die diese Bedingungen nicht erfüllten, wurden von der weiteren Versuchsdurchführung und Datenauswertung ausgeschlossen.

4.9.2 Versuche zum Zusammenhang zwischen Perfusatfluss und mucosaler Hämoglobinoxygenierung (HbO₂i)

Bei dieser Versuchsreihe wurde nach Ende der initialen Steady-State Phase von 30 Minuten die Registrierung der HbO₂i-Werte gestartet und der Perfusatfluss auf 100ml/100g Organgewicht/min gesteigert. Der Perfusatfluss wurde dann alle 15 Minuten um 20 ml/100g/min reduziert. Nach Erreichen eines Perfusatflusses von Null wurde die Registrierung und damit der Versuch nach weiteren 5 Minuten beendet. Es wurden n=8 unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

4.9.3 Versuche zum Zusammenhang zwischen Perfusatfluss und Sauerstoff-

Aufnahme (VO_2)

Es wurden nach Ende der initialen Steady-State Phase von 30 Minuten der Perfusatfluß auf 100ml/100g Organgewicht/min gesteigert und Perfusatproben zur Bestimmung der VO_2 entnommen. Der Perfusatfluss wurde dann schrittweise alle 15 Minuten auf 75, 50, 45, 35, 25, 10 und 5 ml/100g/min reduziert. Nach Erreichen eines Perfusatflusses von Null wurde die Registrierung und damit der Versuch nach weiteren 5 Minuten beendet. Es wurden n=8 unabhängige Versuche durchgeführt und ausgewertet.

4.9.4 Versuche ohne Toxinapplikation

Bei n=4 Kontrollexperimenten wurde nach Ende der initialen Steady-State Phase von 30 Minuten die Registrierung der Messparameter gestartet und nach weiteren 15 Minuten (t=0) nicht Toxin sondern ohne weitere Manipulation nur Lösungsmittel (1 ml steriles Aqua dest.) in den arteriellen Schenkel des Perfusionssystems injiziert. Die Datenaufzeichnung wurde danach über 15 Minuten fortgesetzt und dann beendet.

4.9.5 Versuche mit hämolysierten Erythrozyten

Bei n=4 Versuchen wurde erythrozytenhaltiges Perfusat mittels einer Ultraschallsonde vollständig hämolysiert und nach der initialen Steady-State Phase (30 Minuten) sowie nach Beginn der Registrierung der Messparameter (weitere 15 Minuten) zum Zeitpunkt t=0 in den arteriellen Perfusatschenkel injiziert. Danach wurde die Datenregistrierung für weitere 15 Minuten fortgesetzt und dann der Versuch beendet.

4.9.6 Versuche mit *E. coli* Hämolysin (HlyA)

Nach einer initialen Phase der Stabilisierung (Steady-State Phase, mind. 30 Minuten) wurde die kontinuierliche Registrierung der Messparameter (P_{SMA} [mmHg], HbO_2i [%], $relHb_{Konz}$, pCO_2i [mmHg], Gewicht [ΔG , g], Peristaltik) gestartet. Nach einer Baseline von 15 Minuten wurde HlyA über die in die *A. mesenterica superior* eingebundene Kanüle ins Gefäßsystem injiziert. Nach Toxinapplikation wurde die kontinuierliche Datenregistrierung für weitere 15 Minuten fortgesetzt. Eine Minute vor Toxininjektion sowie 15 Minuten danach wurden arterielle und venöse Perfusatsproben entnommen und daraus Blutgasanalysen (arteriell und venös), Hb-Bestimmung (art.) und Bestimmung von Elektrolyten (Natrium und Kalium), Glucose, LDH und Laktat (art.) vorgenommen. In je 4 unabhängigen Experimenten wurden folgende Toxindosierungen verwendet: 0.005 HU/ml, 0.015 HU/ml, 0.05 HU/ml und 0.1 HU/ml. Abb. 4 gibt einen schematischen Überblick über das Versuchsprotokoll.

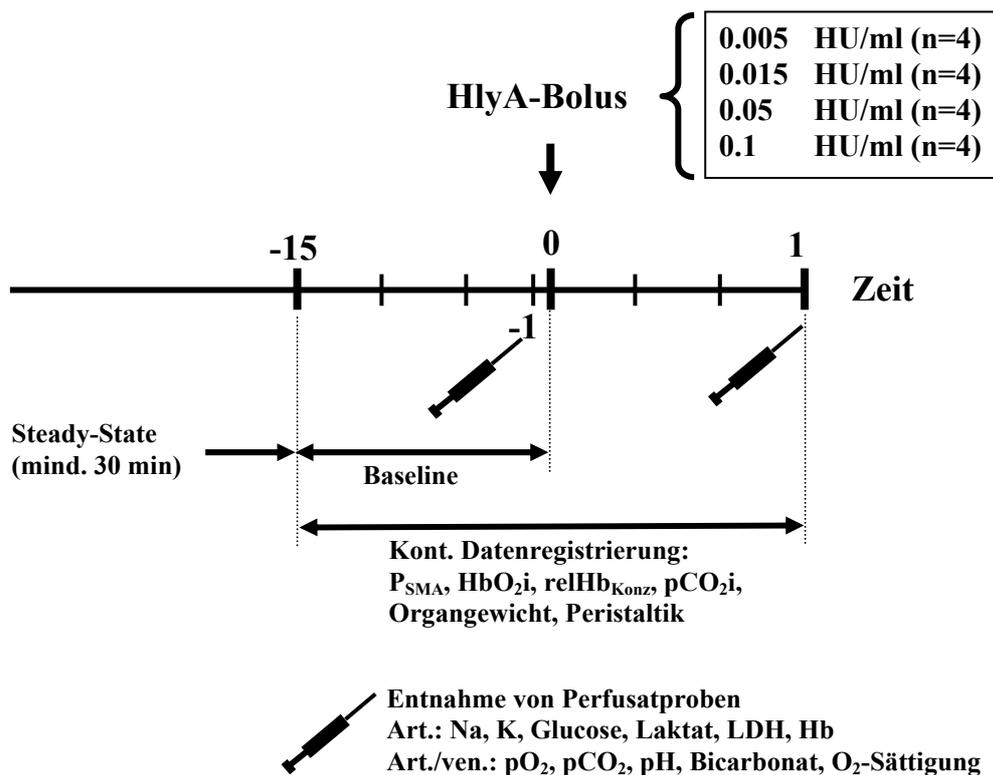


Abb. 4: Schematische Übersicht über den Versuchsablauf bei Bolusapplikation unterschiedlicher Dosierungen von *E. coli* Hämolysin (HlyA).

5 Ergebnisse

5.1 Versuche zum Zusammenhang zwischen Perfusatfluss und mucosaler Hämoglobinoxygenierung (HbO₂i)

Die Hämoglobinoxygenierung zeigte bei gleichbleibendem Perfusatfluss einen konstanten Verlauf. Sie fiel mit der stufenweisen Reduktion des Perfusatflusses in Schritten von 20 ml/100g Gewebe/min ab, wobei der prozentuale Abfall im Vergleich zur vorhergehenden Flussstufe mit zunehmender Flussreduktion zunahm. Daraus ergab sich nicht ein stufenförmiger, sondern ein exponentieller Abfall des HbO₂i in Abhängigkeit von der Organperfusion (Abb. 5).

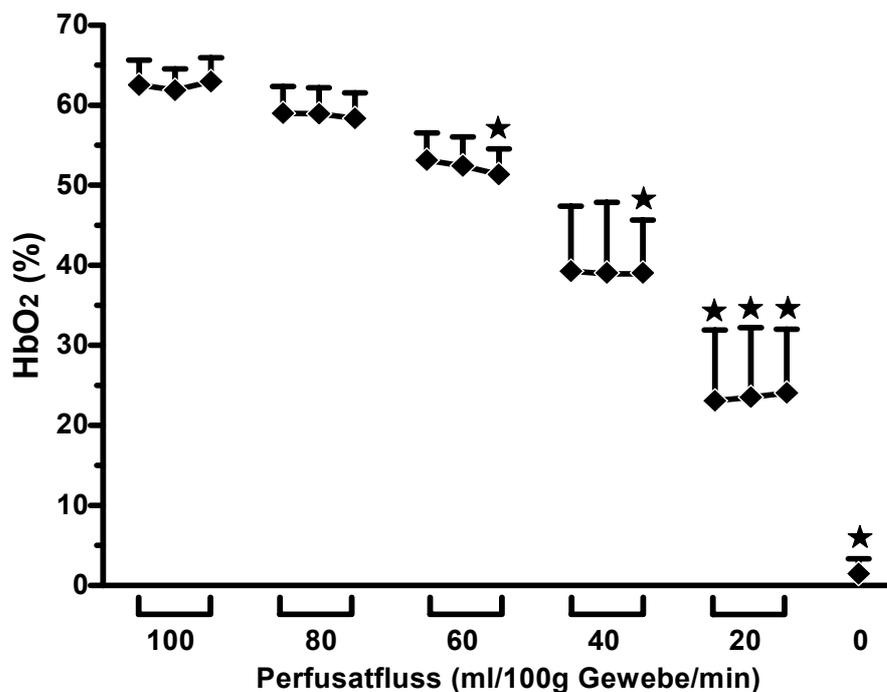


Abb. 5: Abhängigkeit der mucosalen Hämoglobinoxygenierung (HbO₂i) vom Perfusatfluss (n= 4).

In Schritten von 20 ml/100 g Gewebe/min wurden der Perfusatfluss ausgehend von 100 ml/100g Gewebe/min alle 15 Minuten reduziert und HbO₂i aufgezeichnet. Alle Werte wurden als Mittelwerte ± SEM angegeben. * p<0.05 getestet gegen den Ausgangswert (Wert nach 15 Minuten bei Perfusatfluss 100 ml/100g Gewebe/min).

5.2 Versuche zum Zusammenhang zwischen Perfusatfluss und Sauerstoff-Aufnahme (VO_2)

Die Sauerstoff-Aufnahme blieb bei stufenweiser Reduktion des Perfusatflusses bis zu einem Fluss von 45 ml/100 g Gewebe/min konstant und fiel dann flussabhängig exponentiell ab (Abb. 6).

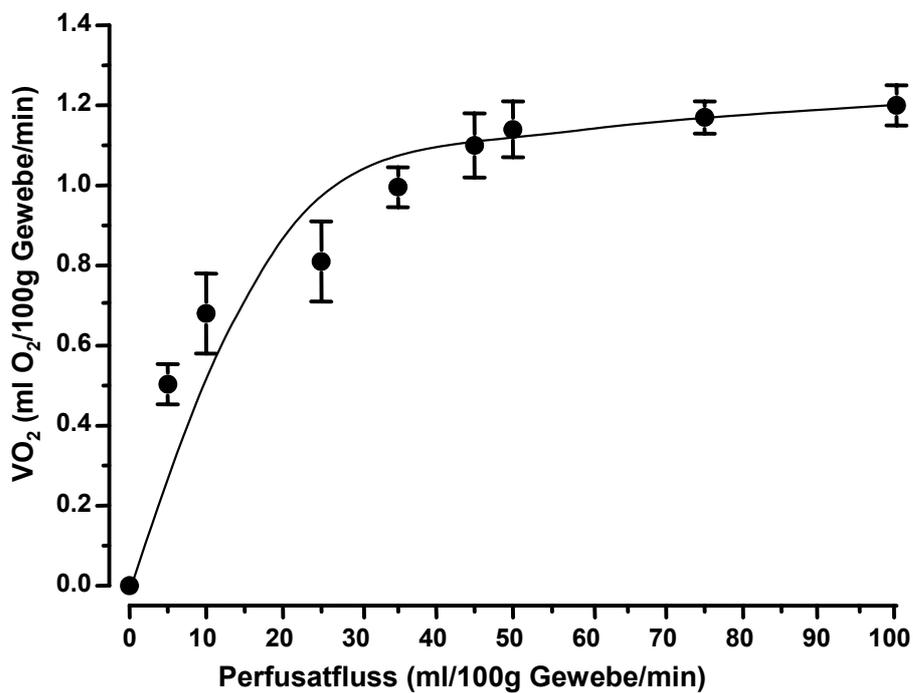


Abb. 6: Beziehung zwischen Perfusatfluss und Sauerstoffaufnahme (VO_2) ($n=8$).

Der Perfusatfluss wurde ausgehend von 100 ml/100g Gewebe/min alle 15 Minuten schrittweise reduziert (75, 50, 45, 35, 25, 10 und 5 ml/100g Gewebe/min) und es wurde jeweils VO_2 gemessen. Alle Werte wurden als Mittelwerte \pm SEM angegeben.

5.3 Versuche ohne Toxinapplikation

Die alleinige Applikation von Lösungsmittel ohne Toxinanteil (steriles Aqua dest.) führte zu keiner Veränderung der Messparameter.

5.4 Versuche mit hämolysierten Erythrozyten

Die Injektion von vollständig hämolysiertem Perfusat führt zu einem Anstieg des P_{SMA} von durchschnittlich 7 mmHg, der im weiteren Verlauf von 5 Minuten komplett reversibel war. Die übrigen Messparameter blieben unverändert.

5.5 Versuche mit *E. coli* Hämolysin (HlyA)

5.5.1 Druck in der A. mesenterica superior (P_{SMA})

Am Ende der Baselineperiode lag der P_{SMA} bei $53,0 \pm 0,53$ mmHg. Nach Injektion der niedrigsten Dosis HlyA (0.005 HU/ml) stieg der Druck innerhalb von 2 Minuten bis 77.1 ± 6.9 mmHg an und fiel dann im weiteren Versuchsverlauf wieder in den Ausgangsbereich vor Toxinapplikation ab. Die intraarterielle Injektion der beiden mittleren HlyA-Dosierungen (0.015 und 0.05 HU/ml) führte unmittelbar nach der Injektion zu einem dosisunabhängigen Druckanstieg (120-135 mmHg) mit anschließendem Druckabfall, der innerhalb von 15 Minuten zu einer Annäherung an die Ausgangswerte führte. Bei der höchsten HlyA-Dosierung (0.1 HU/ml) wurde das Ausmass des initialen Druckanstiegs nicht weiter gesteigert. Nachfolgend blieben die P_{SMA} -Werte bis zum Versuchsende im Vergleich zu den anderen HlyA-Dosierungen signifikant erhöht und fielen nicht mehr in den Ausgangsbereich ab (Abb.7).

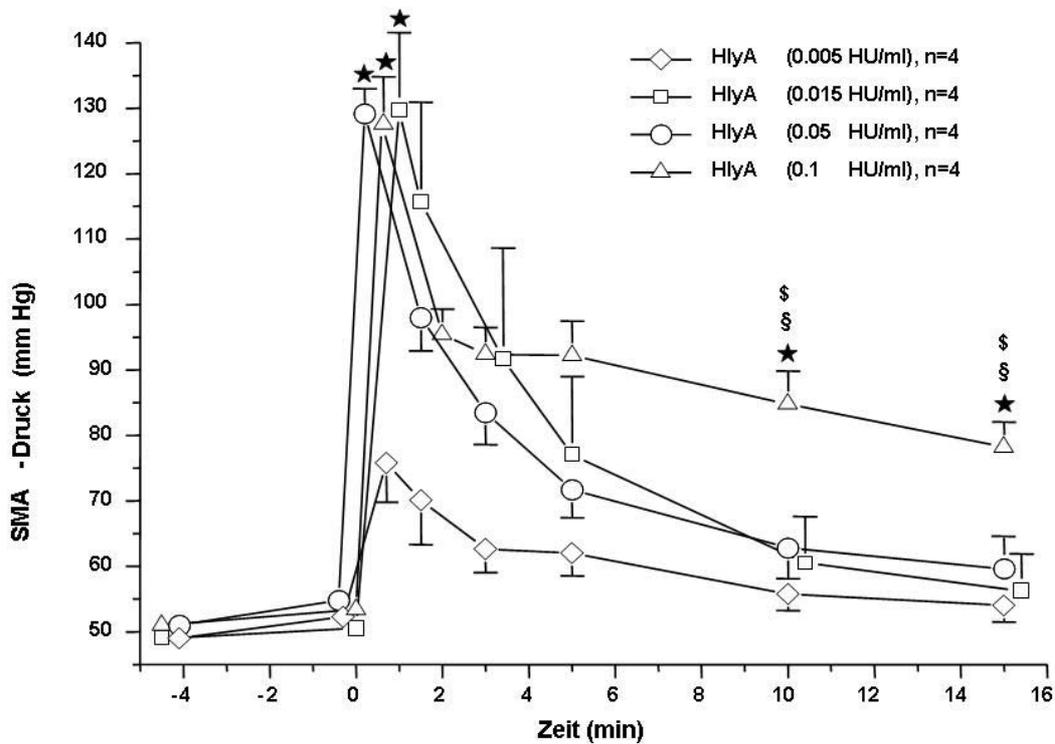


Abb. 7: Verlauf des arteriellen Drucks in der A. mesenterica superior (P_{SMA}) bei einem isolierten, vaskulär perfundierten Kaninchenileummodell nach intraarterieller Applikation von vier verschiedenen Dosierungen *E. coli* Hämolyysin (HlyA) zum Zeitpunkt $t=0$ (je $n=4$).

Rauten: 0.005 HU/ml , Quadrate: 0.015 HU/ml , Kreise: 0.05 HU/ml , Dreiecke: 0.1 HU/ml. Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Bei Werten ohne Darstellung der SEM liegt diese innerhalb des Symbols. * $p < 0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.005 HU/ml HlyA; § $p < 0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.015 HU/ml ; \$ $p < 0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.05 HU/ml .

5.5.2 Mucosale Hämoglobinoxygenierung (HbO₂i)

Unter Baselinebedingungen lagen die HbO₂i-Werte bei $55.4 \pm 0.78\%$. Bei allen verwendeten HlyA-Dosierungen kam es nach Applikation zu einem steilen Abfall, der nach 0.005 und 0.015 HU/ml HlyA innerhalb von zwei Minuten vollständig reversibel war. Nach Injektion von 0.05 und 0.1 HU/ml HlyA blieben die HbO₂i-Werte erniedrigt und zeigten einen langsamen Wiederanstieg bis zum Versuchsende (Abb.8).

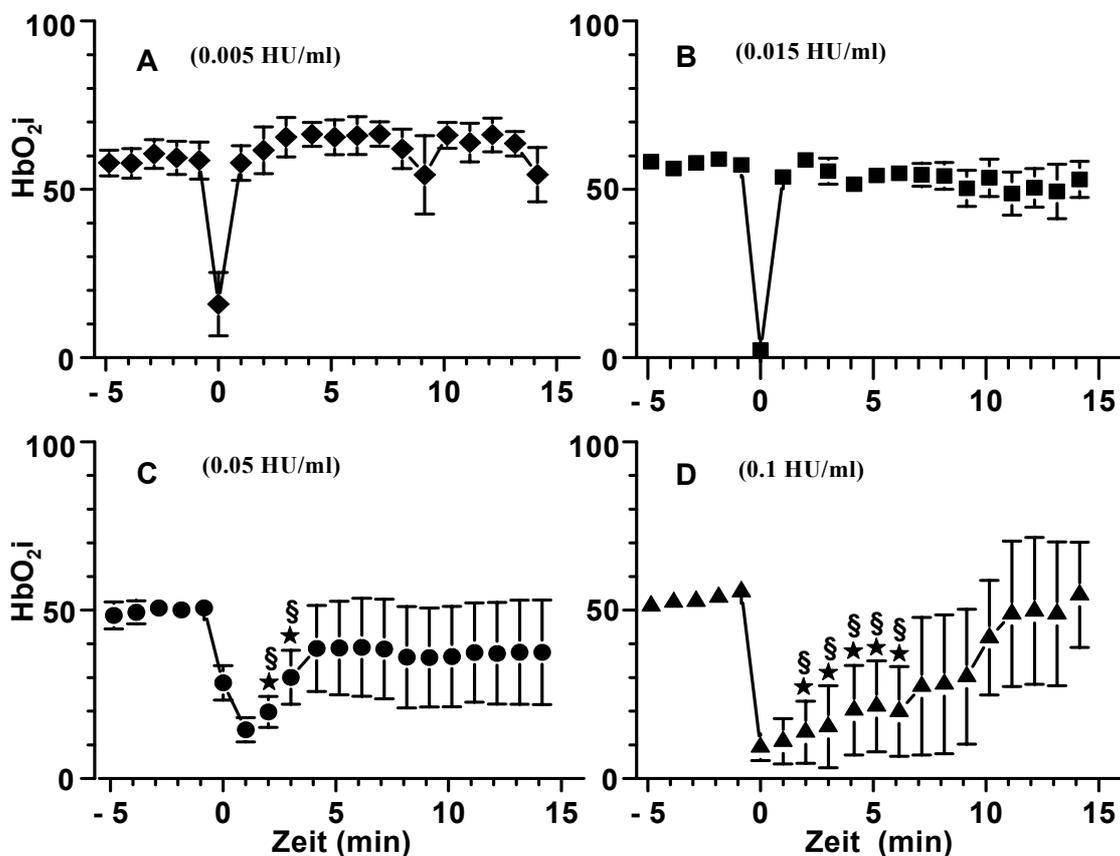


Abb. 8: Verlauf der spektrophotometrisch gemessenen mucosalen Hämoglobinoxygenierung (HbO₂i) bei einem isolierten, vaskulär perfundierten Kaninchenileummodell nach intraarterieller Applikation von vier verschiedenen Dosierungen *E. coli* Hämolyisin (HlyA) zum Zeitpunkt $t=0$ (je $n=4$).

Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Bei Werten ohne Darstellung der SEM liegt diese innerhalb des Symbols. * $p < 0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.005 HU/ml; § $p < 0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.015 HU/ml.

5.5.3 HbO₂i-Histogramme

Vor der Gabe von HlyA zeigten die HbO₂i-Werte eine nahezu Gaussche Normalverteilung. Nach HlyA-Applikation kam es bei allen Dosierungen zu einer Verbreiterung der histogrammischen Verteilung der HbO₂i-Werte. Diese war bei den Versuchen mit 0.005 und 0.015 HU/ml rasch reversibel und wurde sogar von einer reaktiven Verschiebung zu höheren HbO₂i-Werten gefolgt. Im Gegensatz dazu kam es nach den höheren HlyA-Dosierungen (0.05 und 0.1 HU/ml) zu deutlichen und anhaltenden Veränderungen der Verteilung der HbO₂i-Werte: neben hypoxischen und anoxischen Schleimhautarealen (0-30%) fanden sich Areale mit HbO₂i-Werten im hochnormalen oder hyperoxischen Bereich (60-90%) (Abb. 9).

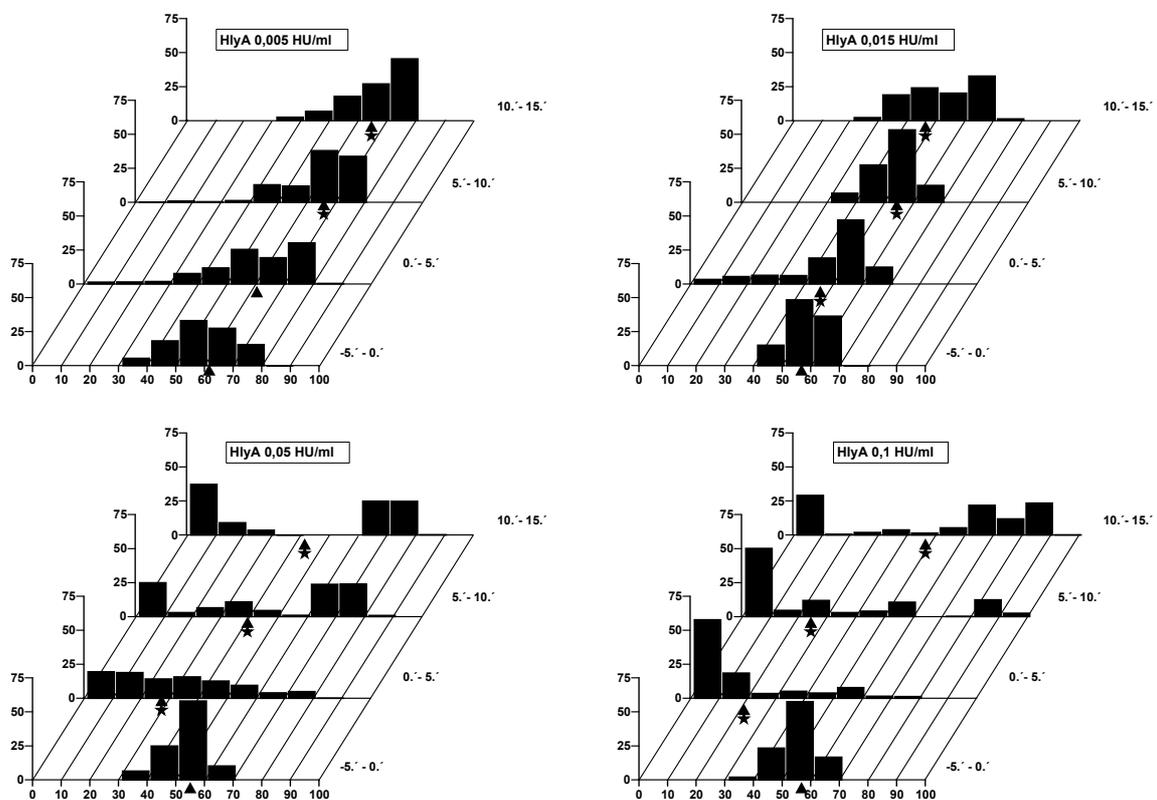


Abb. 9: Histogrammische Darstellung der spektrophotometrisch gemessenen mucosalen Hämoglobinoxygenierung (HbO₂i) bei einem isolierten, vaskulär perfundierten Kaninchenileummodell in verschiedenen Zeitintervallen (-5 bis 0, 0-5, 5-10, 10-15 min) bei intraarterieller Applikation von vier verschiedenen Dosierungen *E. coli* Hämolyysin (HlyA) zum Zeitpunkt $t=0$ (je $n=4$). X-Achse: Hämoglobinsättigung; Y-Achse: Häufigkeit der Sättigungen je 10%-Intervall; Z-Achse: Zeit

A: 0.005 HU/ml; B: 0.015 HU/ml ; C: 0.05 HU/ml ; D: 0.1 HU/ml . Das geschlossene Dreieck markiert den jeweiligen Mittelwert. * $p < 0.05$ im Vergleich zum Ausgangswert.

5.5.4 Relative mucosale Hämoglobinkonzentration (rel Hb_{konz})

Im Verlauf der Baseline-Periode kam es zu keinen signifikanten Veränderungen der relHb_{konz} und bei t=0 lag der Mittelwert bei 1.02 ± 0.01 . Nach Bolusapplikation von HlyA in der niedrigen bzw. in den mittleren Dosierungen (0.005, 0.015, 0.05 HU/ml) zeigte sich ein passagerer Abfall. Nach 0.005 und 0.015 HU/ml kam es innerhalb von 2 Minuten zu einem Wiederanstieg auf das Ausgangsniveau. Im Gegensatz dazu kam es nach 0.05 HU/ml HlyA zu einem protrahierten und nach 0.1 HU/ml HlyA zu einem sofortigen und deutlichen Anstieg über das Ausgangsniveau hinaus, wobei bei der letztgenannten Dosierung rund das Doppelte der Ausgangswerte erreicht wurde (Abb. 10).

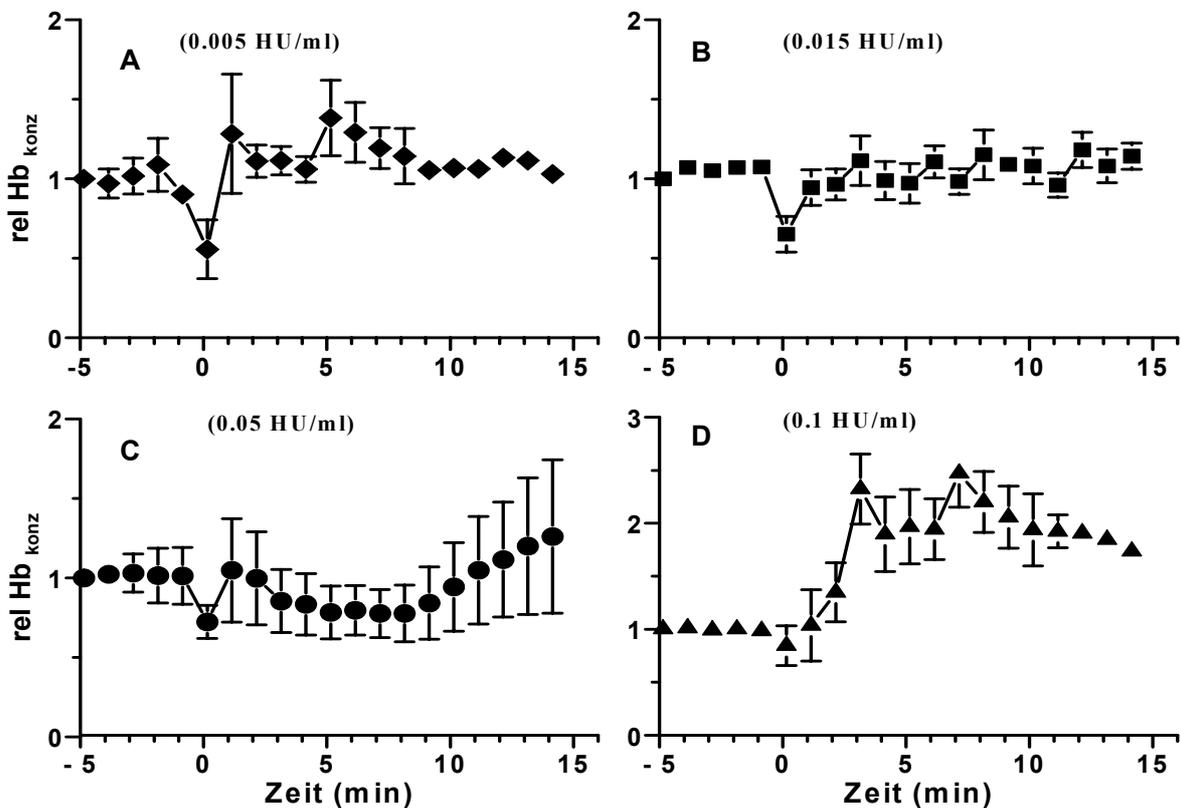


Abb. 10: Verlauf der spektrophotometrisch gemessenen relativen mucosalen Hämoglobinkonzentration (relHb_{konz}) bei einem isolierten, vaskulär perfundierten Kaninchenileummodell nach intraarterieller Applikation von vier verschiedenen Dosierungen *E. coli* Hämolyysin (HlyA) zum Zeitpunkt t=0 (je n=4).

Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Bei Werten ohne Darstellung der SEM liegt diese innerhalb des Symbols.

5.5.5 Mucosal-arterielle CO₂-Differenz ($\Delta p\text{CO}_2\text{i}$)

Unter Baselinebedingungen lag die $\Delta p\text{CO}_2\text{i}$ bei 48.9 ± 2.2 mmHg. Nach Applikation von HlyA wurde ein dosisabhängiger Anstieg beobachtet. Nach 0.005 und 0.015 HU/ml HlyA war der Anstieg vorübergehend und reversibel, während nach 0.05 HU/ml HlyA bis zum Versuchsende die Ausgangswerte nicht mehr erreicht wurden. Nach 0.1 HU/ml HlyA fand sich ein bis zum Versuchsende anhaltender stetiger Anstieg der $\Delta p\text{CO}_2\text{i}$ -Werte (Abb. 11).

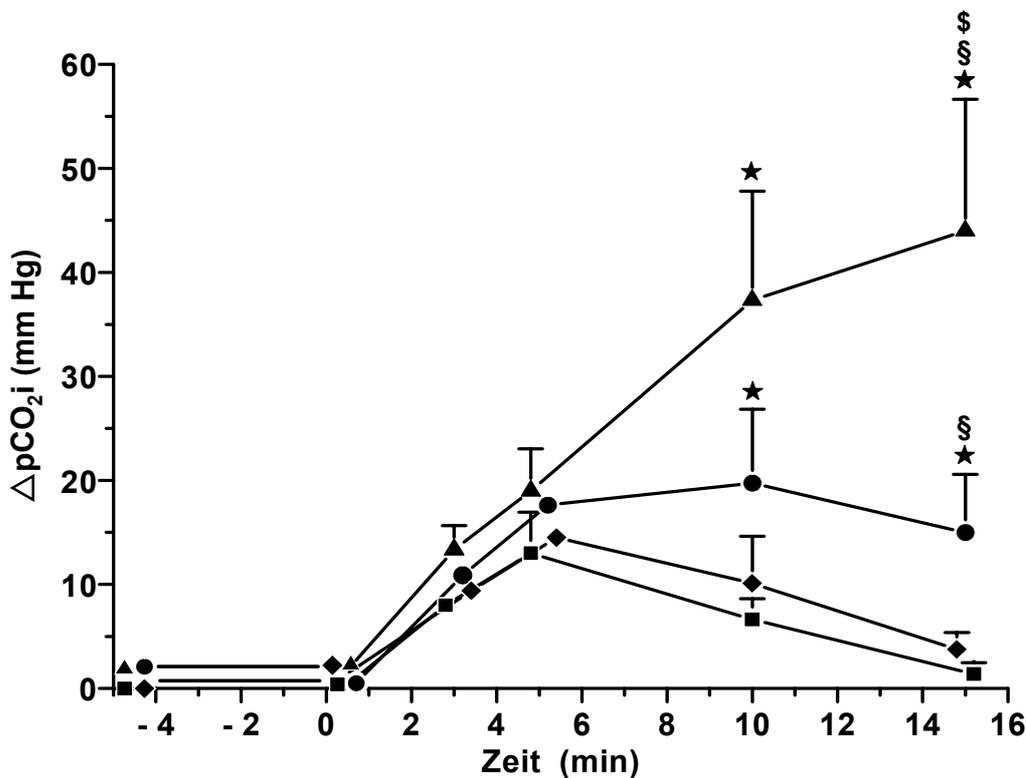


Abb. 11: Verlauf der mucosal-arteriellen $p\text{CO}_2$ -Differenz ($\Delta p\text{CO}_2\text{i}$) bei einem isolierten, vaskulär perfundierten Kaninchenileummodell nach intraarterieller Applikation von vier verschiedenen Dosierungen *E. coli* Hämolyysin (HlyA) zum Zeitpunkt $t=0$ (je $n=4$).

Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Bei Werten ohne Darstellung der SEM liegt diese innerhalb des Symbols. Rauten: 0.005 HU/ml, Quadrate: 0.015 HU/ml, Kreise: 0.05 HU/ml, Dreiecke: 0.1 HU/ml. * $p<0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.005 HU/ml; § $p<0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.015 HU/ml, \$ $p<0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.05 HU/ml.

5.5.6 Darmgewicht (ΔG)

In der Baselineperiode kam es zu keinem signifikanten Veränderung von ΔG . Die Gabe von HlyA bewirkte eine dosisabhängige Zunahme von ΔG , die nach 0.1 HU/ml HlyA am deutlichsten war (Abb. 12).

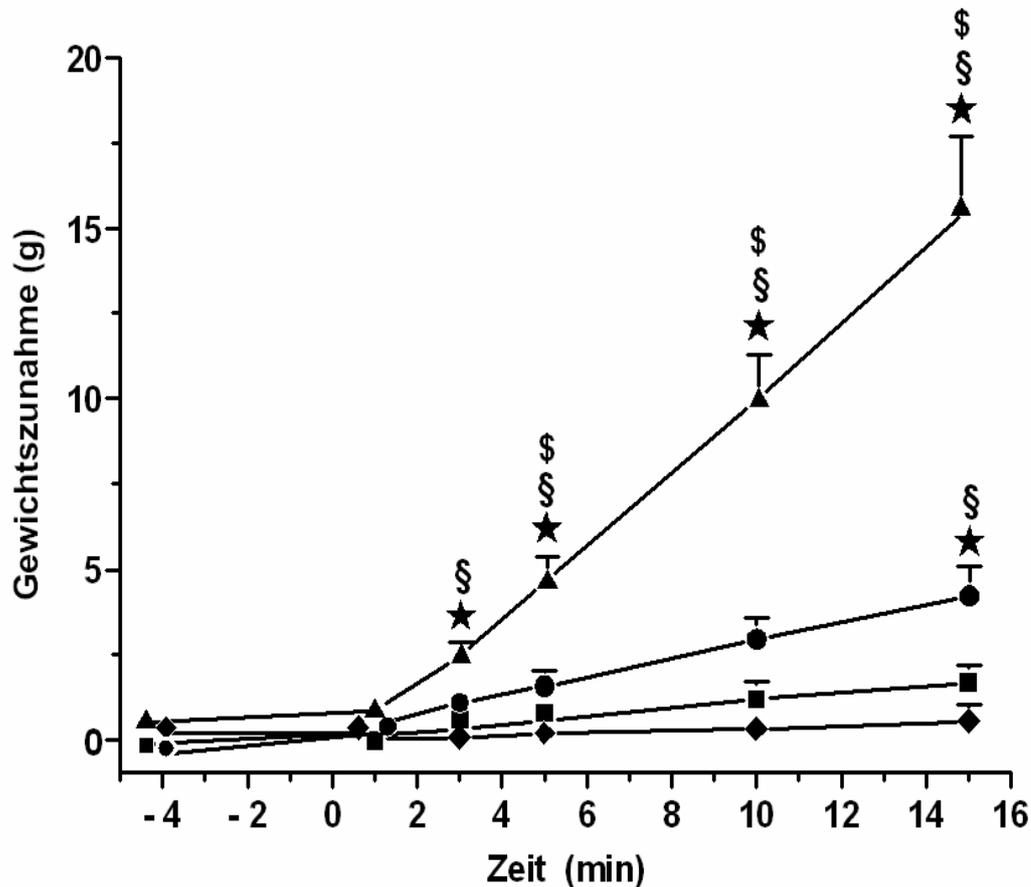


Abb. 12: Veränderung des Organgewichtes (ΔG) bei einem isolierten, vaskulär perfundierten Kaninchenileummodell nach intraarterieller Applikation von vier verschiedenen Dosierungen *E. coli* Hämolyysin (HlyA) zum Zeitpunkt $t=0$ (je $n=4$).

Rauten: 0.005 HU/ml , Quadrate: 0.015 HU/ml , Kreise: 0.05 HU/ml , Dreiecke: 0.1 HU/ml . Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. Bei Werten ohne Darstellung der SEM liegt diese innerhalb des Symbols. * $p < 0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.005 HU/ml ; § $p < 0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.015 HU/ml ; \$ $p < 0.05$ getestet gegen zeitlich korrespondierende Werte der Versuche mit 0.05 HU/ml .

5.5.7 Sauerstoffaufnahme (VO_2)

Die Sauerstoffaufnahme zeigte ausschließlich nach Applikation der höchsten Konzentration von HlyA (0.1 HU/ml) einen signifikanten Abfall gegenüber dem Ausgangswert. Bei den drei anderen Dosierungen zeigte sich keine Änderung gegenüber den Basiswerten vor Toxinapplikation (Abb. 13).

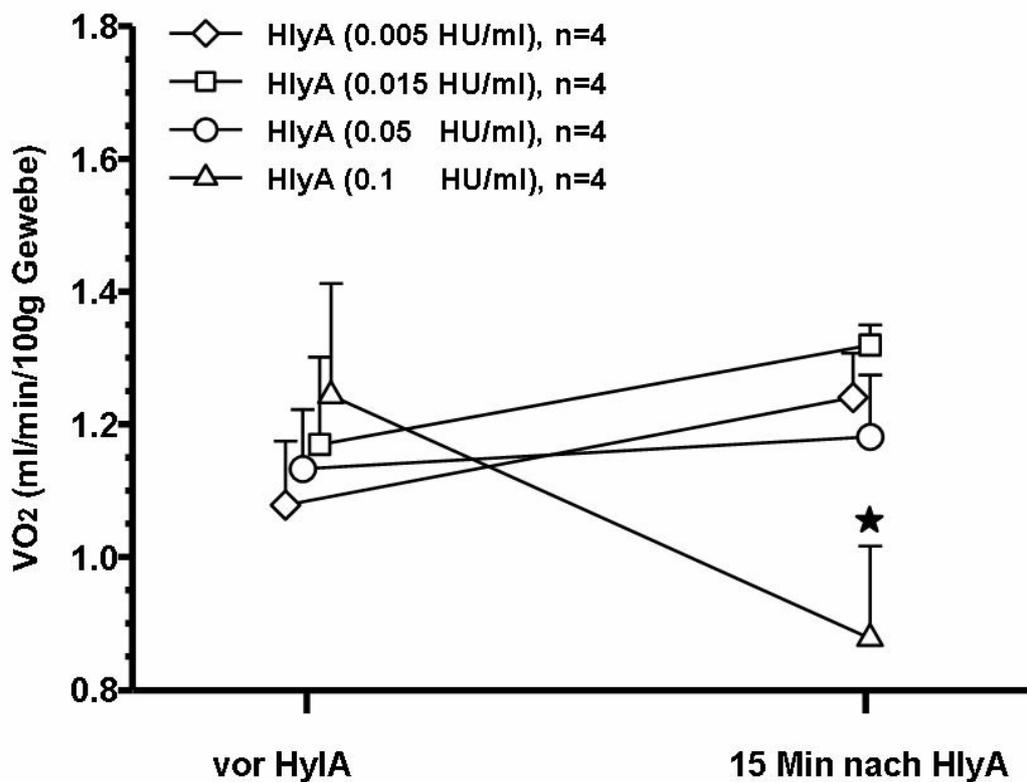


Abb. 13: Sauerstoffaufnahme (VO_2) bei einem isolierten, vaskulär perfundierten Kaninchenileummodell vor und nach intraarterieller Applikation von vier verschiedenen Dosierungen *E. coli* Hämolysin (HlyA).

Alle Werte wurden als Mittelwert \pm SEM angegeben. * $p < 0.05$ gegen den Ausgangswert bei 0.1 HU/ml.

5.5.8 Peristaltik

Es wurden Frequenz, Grundtonus und Kontraktionsdruck der Kontraktionen ausgewertet. Die Frequenz der Peristaltik änderte sich bei keiner der von uns verwendeten HlyA-Dosierungen. Ebenso konnte nach Applikationen von 0.005, 0.015 und 0.05 HU/ml HlyA keine Änderung des Grundtonus und des Kontraktionsdruckes festgestellt werden. Ausschließlich nach Injektion von 0.1 HU/ml HlyA konnte eine stetige Zunahme des Kontraktionsdrucks auf einen Mittelwert von 2.57 +/- 1.04 mmHg beobachtet werden.

5.5.9 Blutgasanalyse, Blutbild, Serumwerte

Bei den arteriellen Werten der Blutgasanalyse (pO₂, pCO₂, Standardbicarbonat und pH) ergaben sich unabhängig von der HlyA-Dosis im Versuchsverlauf keine signifikanten Veränderungen (Tabelle 3).

Tabelle 3: Arterielle Blutgasanalyse eines isoliert perfundierten Kaninchenileummodells vor und nach Gabe von E. coli Hämolyisin (HlyA).

	pH	Standardbicarbonat (mmol/l)	PCO ₂ (mmHg)	PO ₂ (mmHg)
T=0 (vor)	7.38 +/- 0.005	23.3 +/- 0.3	38.3 +/- 1.2	475.4 +/- 9.5
T=15 min (nach)	7.39 +/- 0.01	22.5 +/- 0.5	38.2 +/- 0.8	448.2 +/- 14.7

Die Angabe der Werte erfolgte als Mittelwert +/- SEM (n=17).

Bei den Serumwerten zeigte sich über alle Versuche am Versuchsende ein geringer Anstieg des Laktatkonzentration ohne Unterscheide zwischen des Dosisgruppen. Ebenso zeigte sich am Versuchsende ein durchschnittlich höherer LDH-Wert. Alle übrigen Parameter (Hb, K, Na, Glucose) zeigten keine Veränderungen im Versuchsverlauf (Tabelle 4).

Tabelle 4: Hämoglobinkonzentration und Serumwerte (art. Blutentnahme) eines isoliert perfundierten Kaninchenileummodells vor und nach Gabe von E. coli Hämolysin (HlyA).

	Hb (g/l)	Laktat (mmol/l)	K (mmol/l)	Na (mmol/l)	Glucose (mg/dl)	LDH (U/l)
T=0 (vor)	8.1 +/- 0.13	2.3 +/- 0.1	4.6 +/- 0.13	142.2 +/- 0.75	219.5 +/- 6.5	149.4 +/- 6.5
T=15 min (nach)	8.3 +/- 0.08	2.9 +/- 0.16	4.7 +/- 0.9	142.6 +/- 0.45	218.9 +/- 6.5	251.4 +/- 4.2

Die Angabe der Werte erfolgte als Mittelwert +/- SEM (n=17).

6 Diskussion

6.1 Versuchsaufbau und Messmethoden

Für die Untersuchungen wurden Kaninchen als Versuchstiere ausgewählt, die sich durch eine für die Präparation geeignete Größe auszeichneten. Es zeigte sich, dass es möglich war, ein komplett isoliertes, vaskulär perfundiertes Ileummodell zu präparieren und dieses ex-vivo in eine stabile Steady-State Phase zu bringen, so dass organphysiologische Untersuchungen durchgeführt werden konnten (57, 58, 59). Durch die komplette Isolierung und die flusskonstante Perfusion konnten die Einflüsse eines bakteriellen Exotoxins auf die Mucosaperfusion unabhängig von Veränderungen globaler kardio-pulmonaler Variablen durchgeführt werden.

Zunächst wurden die Basisbedingungen des Versuchsmodells in unabhängigen Versuchen geprüft. Es musste zunächst geklärt werden, ob und wie eine ausreichende Oxygenierung des isolierten Ileums erreicht werden konnte. Wegen der sehr hohen Sauerstoffaufnahme des Intestinums konnte, anders als bei isolierten Organmodellen der Lunge oder des Herzens, die Perfusion nicht mit einem erythrozytenfreien Perfusat durchgeführt werden, da auf diese Weise nur mit unphysiologisch hohen Perfusatflüssen ein ausreichendes Sauerstoffangebot zu erzielen gewesen wäre. Aus diesem Grund mussten dem Perfusat gewaschene Kaninchenerythrozyten als Sauerstoffträger beigemischt werden.

Als weiterer Punkt war zu klären welcher Perfusatfluss für ein ausreichendes Sauerstoffangebot notwendig war. In entsprechenden Experimenten zeigte sich eine Abhängigkeit der Sauerstoffaufnahme (VO_2) vom Perfusatfluss unterhalb einer Flussrate von 45 ml/100g Gewebe/min. Hierbei stellte bei gleichbleibender Hämoglobinkonzentration und Perfusatoxygenierung der Perfusatfluss die entscheidende Determinante für das Sauerstoffangebot (DO_2) dar. Bei einem Perfusatfluss von 55 ml/100g Gewebe/min konnte somit davon ausgegangen werden, dass das Sauerstoffangebot den Sauerstoffbedarf des Ileumpräparates komplett abdeckt und keine Hypoxie besteht. Eine weitere Steigerung des Perfusatflusses hätte zwar zu einer höheren DO_2 , nicht aber zur VO_2 -Steigerung geführt. Ein weiteres Zeichen für die ausreichende Oxygenierung fand sich in der intakten Schrankenfunktion des Ileumpräparates. Eine Ischämie führt am Intestinum sehr rasch zu einer Schrankenstörung mit Ödembildung. Diese konnte anhand des konstanten

Gewichtsverlaufs in der Steady-State- und Baseline-Phase ausgeschlossen werden, was auf eine intakte Permeabilität und ungestörte Perfusionsverhältnisse schließen ließ. Unter diesen Bedingungen lag die DO_2 bei 6.8 ± 0.17 ml $O_2/100g$ Gewebe/min, wobei in der Literatur kritische untere DO_2 -Grenzwerte für das isolierte Jejunum oder Ileum zwischen 4.8 ± 1.5 und 6.0 ± 0.2 ml $O_2/100g$ Gewebe/min angegeben werden (52). Auch die stabile Baseline der mucosalen Hämoglobinoxygenierung (näheres dazu siehe unten) von $55.4 \pm 0.78\%$ war in guter Übereinstimmung mit vergleichbaren Messungen des mucosalen HbO_2 bei Ganztiersversuchen mit Schweinen ($49.1 \pm 3.84\%$; [53]).

Der Druck in der A. mesenterica superior lag hingegen niedriger als in vivo, wobei es sich um eine Konsequenz der Denervierung handelt. Zudem wies das Perfusat eine niedrigere Viskosität als Vollblut auf. Ähnliche Beobachtungen wurden in einem isoliert perfundierten Intestinum der Ratte gemacht, wo der P_{SMA} mit 34.4 ± 3.6 mmHg gemessen wurde (18, 73). Ein spontaner Anstieg des P_{SMA} zeigte in dem hier beschriebenen Modell eine Entgleisung mit Störung weiterer physiologischer Parameter an, weswegen entsprechende Präparationen konsequent von der weiteren Versuchsdurchführung und Auswertung ausgeschlossen wurden.

Zur Beantwortung der Fragestellungen wurden eine Reihe pathophysiologisch relevanter Parameter im Versuchsverlauf erfasst. Zur Messung der Mucosaperfusion wurde ein EMPHO II[®] (Erlangen Mikrolightleiter Spektrophotometer) eingesetzt und damit die Parameter mucosale Hämoglobinoxygenierung (HbO_2i) und relative Hämoglobinkonzentration ($relHb_{Konz}$) gewonnen. Das Gerät arbeitet nach dem Prinzip der Remissionsspektrophotometrie und wurde bereits bei Untersuchungen an anderen Tiermodellen sowie bei Patienten erfolgreich eingesetzt. Die Zuverlässigkeit dieses Messverfahrens konnte experimentell über den Vergleich mit der Wasserstoff-Clearance als Referenzmethode nachgewiesen werden (23, 51, 52, 53, 60, 61). Da das Licht nur bis zu einer Tiefe von rund 250 μm in die Schleimhaut eindringt, kann davon ausgegangen werden, dass die Messergebnisse ausschließlich die Verhältnisse in der Mucosa widerspiegeln, während tiefere Wandabschnitte auf die Messergebnisse keinen Einfluss nehmen. Der in der Darmschleimhaut dominierende Farbstoff ist Hämoglobin, dessen Oxygenierungsgrad aufgrund unterschiedlicher Absorptionsspektren für oxygeniertes und desoxygeniertes Hämoglobin als absolute Größe genau bestimmt werden kann. Andere Pigmente wie Melanin, Myoglobin oder Bilirubin kommen in der Darmschleimhaut nur in so geringer Menge vor, dass sie die Messungen nicht beeinflussen. Durch die Peristaltik des Darmes kam es zu

feinsten tangentialen Verschiebungen zwischen Lichtleiter und Darmwand, so dass nicht ein Punkt gemessen wurde, sondern die Werte eines kleinen Mucosaareals in die Messungen einfließen. Unter Berücksichtigung der hohen Messfrequenz von 66 Spektren/s und der geringen Größe des Messvolumens ($\sim 90 \times 90 \times 250 \mu\text{m}$) für jedes Einzelspektrum war es daher möglich neben Veränderungen der Messwerte über die Zeit auch lokale Perfusionsinhomogenitäten zu erfassen. Die Messung der mucosalen Hämoglobinkonzentration war nur als relative Größe möglich. Für eine Messung in absoluten Einheiten wäre eine genaue Kenntnis des bei der Messung erfassten Gewebevolument erforderlich gewesen, ein Problem, das mit der vorhandenen Technik bisher nicht gelöst werden kann. Anhand von Experimenten, die der Evaluation der Messtechnik dienen sollten, ergab sich ein exponentieller Zusammenhang zwischen Perfusatfluss (bzw. DO_2) mit dem spektrophotometrisch gemessenen HbO_2i , so dass davon ausgegangen werden konnte, dass Veränderungen der Mucosaperfusion mit der bei den Versuchen mit Exotoxin zum Einsatz kommenden Messtechnik erfassbar waren (49, 50).

Als weiterer Parameter wurde die intramucosal-arterielle pCO_2 -Differenz (auch pCO_2 -Gap genannt) gemessen. Von Messungen an Hohlorganen ist bekannt, dass der intraluminale CO_2 -Partialdruck sich sehr schnell an der intramucosalen pCO_2 angleicht und es somit möglich ist, über intraluminale Messungen den intramucosalen pCO_2 zu bestimmen (62, 63). Davon ausgehend wurde von *Fiddian-Green* für den humanmedizinischen Gebrauch eine Methode entwickelt, bei der durch Messung des intraluminalen pCO_2 und der arteriellen Bicarbonatkonzentration mit Hilfe einer modifizierten Henderson-Hasselbalch-Gleichung der intrazelluläre pH von Mucosazellen berechnet wurde, um daraus Rückschlüsse auf die Mucosaperfusion zu ziehen (46). An der Validität der so erhobenen Messdaten wurde intensiv Kritik geübt (47). Als Parameter mit größerer Verlässlichkeit hat sich der pCO_2 -Gap etabliert (64, 65, 66). Eine der Ursachen für dessen Anstieg ist eine herabgesetzte Mucosaperfusion, deren Folge eine verminderte Auswaschung von CO_2 und ein vermehrter Anfall von Protonen durch anaeroben Stoffwechsel ist. Nach der Gleichung $\text{H}^+ + \text{HCO}_3^- \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ führen die Protonen zu einer vermehrten CO_2 -Bildung aus Bicarbonat und damit ebenfalls zu einer Erhöhung des intramucosalen pCO_2 . Andererseits kann es auch bei ungestörter Perfusion zur Beeinträchtigung des Zellmetabolismus mit nachfolgender Azidose und nach der genannten Gleichung auch zu einem Anstieg des CO_2 -Gap kommen. Im Ileum spielt im Gegensatz zu anderen Abschnitten des Gastrointestinaltraktes (Magen, Duodenum, Colon) Kohlendioxid

luminaer Herkunft keine Rolle und kann somit in diesem Darmabschnitt nicht zu Verfälschungen der Messergebnisse führen. Die in der Humanmedizin zur Messung benutzten kommerziell verfügbaren Tonometer, die an ihrer Spitze einen Ballon aufweisen, der mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt wird, haben eine Reihe methodischer Probleme, wie die lange Äquilibrationszeit (~ 90 Minuten) zwischen Ballonflüssigkeit und der Umgebung und die Messungenauigkeit, die u.a. bei der CO₂-Messung aus physiologischer Kochsalzlösung mittels konventioneller Blutgasanalytoren entstehen. Außerdem lassen sich nur Messungen zu vorherbestimmten Zeitpunkten durchführen, kurzfristige Schwankungen werden nicht erfasst und der Verlauf somit nur tendenziell dokumentiert. Aufgrund der Ballongröße üblicher Tonometersysteme wäre der Einsatz am Kaninchenileum ohnehin nicht möglich gewesen, so dass eine andere Methodik eingesetzt werden musste. Die vorgenannten Probleme wurden durch den Einsatz eines Systems zur kontinuierlichen pCO₂-Messung mittels Mikrolichtleitern gelöst (Paratrend®). Die zuverlässige Arbeitsweise dieses Messgerätes wurde durch die intravasale Verwendung nachgewiesen (62, 63) und konnte auch für die intraluminale Messung im Magen-Darm-Trakt validiert werden (47). Neben dem kontinuierlichen Messmodus ist in der geringen Größe des zur Messung verwendeten Sensors ein weiterer Vorteil zu sehen, so dass es nicht zu Messartefakten durch lokale Druckausübung auf die Mucosa kommen konnte. Durch die Platzierung der Sensoren für die Remissionsspektrophotometrie und die intramucosale pCO₂-Messung unter direkter visueller Kontrolle konnten diese unter Vermeidung von lokalem Druck, der die Schleimhautperfusion artifiziell hätte beeinflussen können, in das Darmlumen eingebracht und an die Mucosa angelegt werden, ohne dass sich die Messungen gegenseitig beeinflussen konnten. Bezüglich des pCO₂-Gap wurden Normalwerte <8 mmHg publiziert. Diese Daten stammen jedoch von tonometrischen Messungen am Magen. Messungen, die mit einer fiberoptischen Sonde am Ileum von gesunden Schweinen vorgenommen wurden ergaben Werte zwischen 7.2 und 15 mmHg, die sehr gut mit den in dieser Arbeit gemessenen Baselinewerten übereinstimmen (65).

Die Erfassung von Organgewicht (ΔG) und Druck in der A. mesenterica superior (P_{SMA}) erfolgte mit Routinemethoden eines organphysiologischen Messplatzes. Die Versuchsdurchführung erfolgte bei konstanter Perfusion (flusskonstantes Modell). Die Validität des gewählten Untersuchungsmodells wurde durch die Stabilität der Messparameter in der Steady-State und Baseline-Periode unterstützt.

6.2 Effekte einer *E. coli* Hämolyisin (HlyA) -Bolusapplikation

Die Applikation von HlyA führt zu einer Vasokonstriktion, die bei konstantem Perfusatfluss zum Anstieg des P_{SMA} führte. Parallel hierzu kam es zu einem vorübergehenden Abfall der Hämoglobinoxygenierung und Hämoglobinkonzentration in der Mucosa (HbO_{2i} und $relHb_{Konz}$). Ursächlich lag diesen Befunden eine Vasokonstriktion zugrunde, die im Bereich der Mucosaperfusion am ausgeprägtesten war. Auch wenn die transmurale Verteilung des Perfusatflusses nicht unmittelbar gemessen werden konnte, kann von einer Umverteilung von der Mucosa zu Gunsten der Muscularis und/oder Serosa ausgegangen werden. Vergleichbare Befunde einer Mucosa-Muscularis Umverteilung wurden in einem Ganztiermodell am Hund nach Endotoxin-Gabe erhoben (17). Ein Einfluss von LPS bei den in dieser Arbeit durchgeführten Versuchen konnte anhand von Kontrollexperimenten ausgeschlossen werden. Nach der initialen Vasokonstriktion kam es zu einem Wiederanstieg von HbO_{2i} und $relHb_{Konz}$. In dieser Phase kam es dosisabhängig zu Störungen der Mikrozirkulation in der Mucosa. Die Datenanalyse legt hierfür die Existenz zweier Mechanismen nahe: Perfusionsfehlverteilung und postkapilläre Vasokonstriktion.

Perfusionsfehlverteilung: vor Applikation von HlyA zeigte sich eine homogene, nahezu Gaussche Verteilung der HbO_{2i} -Werte mit einem Mittelwert von rund 55% und geringer Streubreite. Bei den höheren HlyA-Dosierungen zeigte sich die Verteilung völlig verändert. Es fand sich jetzt eine breite Streuung der Werte wobei sowohl hyperoxische ($HbO_{2i} > 70-80\%$) als auch hypoxische bis nahezu anoxische Mikroareale ($HbO_{2i} < 20\%$) gefunden wurden. Das ist mit einer lokalen Minderperfusion bis hin zum Perfusionsstillstand bei gleichzeitiger Existenz von hyperperfundierten Schleimhautarealen zu erklären. Eine solche Perfusionsinhomogenität erklärt auch den Anstieg der mucosal-arteriellen pCO_2 -Differenz (pCO_2 -Gap, ΔpCO_2). Durch die Malperfusion kommt es zu einem verminderten Abtransport des lokal gebildeten CO_2 , dessen Bildung durch anaeroben Stoffwechsel mit Azidose und Bicarbonatpufferung zudem noch gesteigert ist. Die intraluminale Messung des pCO_2 erlaubt keine Aussagen zur lokalen Inhomogenität der CO_2 -Bildung, die Vermutung, dass es wie beim HbO_{2i} auch beim pCO_2 zu einer Heterogenität der lokalen pCO_2 -Mucosaspiegel kommt ist aber naheliegend.

Postkapilläre Vasokonstriktion: nach der initialen Reduktion der $\text{relHb}_{\text{Konz}}$ -Werte parallel zum initialen Anstieg des P_{SMA} kam es bei den höheren HlyA-Dosierungen zu einem progredienten Anstieg der mucosalen Hämoglobin-Konzentration. Da dieser von einer Mucosahypoxie begleitet wurde, erscheint eine vermehrte kapilläre Mucosaperfusion als Erklärung hierfür nicht ausreichend. Statt dessen lassen sich die Daten am ehesten durch eine Blutstauung in Folge einer postkapillären Vasokonstriktion deuten, ein Phänomen, das auch unter klinischen Bedingungen bei Sepsis beschrieben wurde (67, 68, 69). Der daraus resultierende Anstieg des kapillären Filtrationsdrucks dürfte neben einer erhöhten kapillären Permeabilität zur dosisabhängigen Ödembildung der Organpräparate mit konsekutivem Gewichtsanstieg beigetragen haben. Eine erhöhte endotheliale Permeabilität für gelöste Substanzen und kleine Proteine nach HlyA-Gabe wurde bereits in der isolierten Kaninchenlunge (41, 42) und an Monolayers von Endothelzellkulturen nachgewiesen (70, 71).

Über HlyA-bedingte Veränderungen in der Muscularis lassen sich anhand der durchgeführten Untersuchungen allenfalls fragmentarische Aussagen machen. Das Ausmaß des initialen Anstiegs des P_{SMA} legt eine Vasokonstriktion nach HlyA-Applikation auch in diesem Kompartiment nahe. Veränderungen der Peristaltik bzw. des basalen Tonus als Zeichen einer signifikanten Störung von Muscularis-Funktionen entwickelten sich in moderater Form ausschließlich nach der höchsten HlyA-Dosierung, ein Befund, der die im Vergleich zur Mucosa geringere Empfindlichkeit der Muscularis gegenüber HlyA zeigt.

Insgesamt kann also davon ausgegangen werden, dass es durch geringe Dosierungen von HlyA zu einer schweren Mikrozirkulationsstörung der intestinalen Mucosa kommt, die mit einem Mismatch von lokalem Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf einhergeht. Dem liegt eine Inhomogenität des kapillären Perfusatflusses der Mucosa zu Grunde. Diese Störungen entwickeln sich bei unverändertem Gesamt-Perfusatfluss und unveränderten Variablen des Sauerstoff-Angebotes. Daraus zeigt sich, dass die systemische Hämodynamik und das mesenteriale Sauerstoffangebot keine Rückschlüsse auf die Mucosaperfusion erlauben. Zusätzlich zur kapillären Perfusionsinhomogenität entwickelt sich nach HlyA-Gabe eine venöse Kongestion und eine kapilläre Schrankenstörung. Insgesamt zeigen die gefundenen Veränderungen Parallelen zu den Mikrozirkulationsstörungen wie sie beim septischen Schock gefunden werden. Pathogenetisch könnten also neben Endotoxin auch bakterielle Exotoxine in diesem Zusammenhang von Bedeutung sein. Die sich entwickelnde Störung der mucosalen

Barrierefunktion könnte eine Grundlage zur Translokation von Mikroorganismen oder deren Toxinen aus dem Lumen in die Zirkulation bilden.

7 Zusammenfassung

Ein Ziel der Arbeit bestand im Aufbau eines organphysiologischen Darmmodells einschließlich der zugehörigen Messmethoden. Dieses Ziel konnte durch die Etablierung eines Modells des komplett isolierten, vaskulär perfundierten Ileums des Kaninchens realisiert werden. Es konnte gezeigt werden, dass sich das Modell in eine stabile Baseline-Phase bringen lässt und die zur Anwendung kommenden Messmethoden valide Daten liefern. Anhand unabhängiger Experimente zeigte sich, dass die mucosale Mikrozirkulation mit einer Methode auf Basis der Remissionsspektrophotometrie gemessen werden konnte.

Nach Gabe von *Escherichia coli* Hämolysin (HlyA) entwickelte sich bei unverändertem Perfusatfluss durch das Gesamtorgan eine Minderperfusion der Mucosa, die durch eine Umverteilung zugunsten tieferer Wandabschnitte bedingt war. Darüber hinaus zeigte sich eine Perfusionsinhomogenität mit breiter Streuung der mucosalen Hämoglobinoxygenierung. Trotz unverändertem und auf das Gesamtorgan bezogen ausreichendem Sauerstoffangebot fanden sich nach HlyA-Gabe hypoxische Mucosaareale. Das zeigt den fraglichen Wert von Variablen der systemischen oder regionalen Perfusion, die die Mucosaperfusion im Splanchnikusgebiet nicht widerspiegeln. Zusätzlich zu den Mikrozirkulationsstörungen der Mucosa entwickelte sich eine venöse Kongestion sowie eine Schrankenstörung mit kapillärem Leakage. Die Veränderungen nach HlyA-Gabe waren dosisabhängig und zeigten Parallelen zu den Mikrozirkulationsstörungen, die bei Sepsis und septischem Schock beobachtet werden. Das legt in diesem Zusammenhang eine mögliche Relevanz von Exotoxinen wie dem hier untersuchten porenbildenden *E. coli* Hämolysin nahe. Ferner kann spekuliert werden, dass durch die Beeinträchtigung der mucosalen Schrankenfunktion eine Translokation von Mikroorganismen oder deren Toxinen aus dem Darmlumen in die systemische Zirkulation ermöglicht wird.

Conclusion

In the present study, we employed an isolated, vascular perfused rabbit ileum to assess the effects of HlyA on the splanchnic circulation independent of changes in global hemodynamics.

Micro-lightguide spectrophotometry was engaged for direct assessment of microvascular haemoglobin oxygenation and its spatial distribution as well as capillary haemoglobin concentration in the ileal mucosal layer. Very low doses of HlyA were found to evoke profound microcirculatory disturbances in this compartment. Despite maintenance of global oxygen delivery, marked perfusion maldistribution with the appearance of severely hypoxic areas occurred within the mucosal microvasculature, accompanied by capillary leakage and venous congestion. Such a defective mechanism of local oxygen utilization despite maintained macro-hemodynamics is reminiscent of circulatory disturbances in septic shock. The data identify *E. coli* hemolysin as a putative contributor to splanchnic mucosal damage in states of sepsis and severe infection.

- 1 Martin, G.S., NEJM 348, 16, 1546
- 2 Alberti C, ICM 2002, 28:108-121
- 3 Parillo, J.E. 1993. Pathogenetic mechanisms of septic shock. New Engl. J. Med. 328: 1471-1477
- 4 Hinshaw, L.B. 1996. Sepsis / septic shock: participation of the microcirculation: an abbreviated review. Crit. Care Med. 24: 1072-107.
- 5 Marchant A., Alegre M.L., Hakim A., Pierad G., Marecaux G., Friedman G., De Groote D., Kahn R.J., Vincent J.L., Goldman M. 1995. Clinical and biological significance of interleukin-10 plasma levels in patients with septic shock. J. Clin. Immunol. 15: 266-273.
- 6 Messmer K. 1967. Intestinale Faktoren im Schock: Intestinaler Kreislauf. Langenbecks Arch. Chir. 319: 890-909.
- 7 Kamp, M., Lundgren O., and Nilsson N.J. 1968. Extravascular shunting of oxygen in the small intestine of cat. Acta Physiol. Scand. 72: 396-403.
- 8 Hallbäck, D.A., Hulten L., Jodal M., Lindhagen J., and Lundgren O.. 1978. Evidence for the existence of a countercurrent exchanger in the small intestine in man. Gastroenterol. 74: 683-690.
- 9 Wilmore, D.W., C.W. Goodwin, L.H. Aulink, M.C. Powanda, A.D. Mason, and B.A. Pruitt. 1980. Effects of injury and infection on visceral metabolism and circulation. Ann. Surg. 192: 491-504.
- 10 Porter, J.M., M.S. Sussman, and G.B. Bulkley. 1989. Splanchnic vasoconstriction in circulatory shock in splanchnic ischemia and multiple organ failure. A. Marston, G.B. Bulkley and R.G. Fiddian-Green, Herausgeber. Arnold, London. 73-88.
- 11 Fink, M.P. 1991. Gastrointestinal mucosal injury in experimental models of shock, trauma, and sepsis. Crit. Care Med. 19: 627-641.
- 12 Border J.R., Hasset J., Laduca J., Seibel R., Steinberg S., Mills B., Losi P., Border D. 1987. The gut origin septic states in blunt multiple trauma (ISS=40) in the ICU. Ann. Surg. 206:427-448.
- 13 Meakins, J.L., and Marshal, J.C. 1986. The gastrointestinal trakt: the „motor“ of MOF. Arch. Surg. 121: 197-201.
- 14 Rush, B.F., Sori, A.J., Murphy T.F., Smith S., Flanagan J.J., and Machiedo G.W. 1988. Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock. The link between trauma and sepsis? Ann. Surg. 207: 549-554.

- 15 Landow, L., and L.W. Andersen. 1994. Splanchnic ischaemia and its role in multiple organ failure. *Acta Aneesthesiol. Scand.* 38: 626-639.
- 16 Schlag G., Redl H., Dinges H.P., Radmore K. 1991. Bacterial translocation in a baboon model of hypovolemic-traumatic shock. In: Schlag G., Redl H., Siegel J.H. et al. (editors) shock, sepsis and organ failure. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 53-90 (Second Wiggers Bernard Conference).
- 17 Vallet, B., N. Lund, S.E. Curtis, D. Kelly, and S.M. Cain. 1994. Gut and muscle tissue pO₂ in endotoxemic dogs during shock and resuscitation. *J. Appl. Physiol.* 76: 793-800.
- 18 Schmidt, H.A. Secchi, R. Wellmann, A. Bach, H. Böhrer, M.M. Gebhard, and E. Martin 1996. Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats. *J. Surg. Res.* 61: 521-526.
- 19 Spain, D.A. M.A. Wilson, R.J. Krysztopik, P.J. Matheson, and R.N. Garrison. 1997. Differential intestinal microvascular dysfunction occurs during bacteremia. *J. Surg. Res.* 67: 67-71.
- 20 Farquahar, I., C.M. Martin, C. Lam, R. Potter, C.G. Ellis, and W.J. Sibbald. 1996. Decreased capillary density in vivo in bowel Mucosa of rats with normotensive sepsis. *J. Surg. Res.* 61: 190-196.
- 21 Nelson, D.P., R.W. Samsel, L.D.H. Wood, and P.T. Schumacker. 1988. Pathological supply dependence of systemic and intestinal O₂ uptake during endotoxemia. *J. Appl. Physiol.* 64: 2410-2419.
- 22 Drazenovic, R., W. Samsel, M.I. Wylam, C.M. Doerschug, and P. T. Schumacker. 1988. Regulation of perfused capillary density in canine intestinal Mucosa during endotoxemia. *Appl. Physiol.* 64: 2410-2419.
- 23 Hasibeder, W., R. German, H. J. Wolf, M. Haisjackl, H. Hausdorfer, B. Riedmann, J. Bonatii, E. Gruber, B. Schwarz, P. Waldenberger, B. Friesenecker and B. Furtner. 1996. Effects of short-term endotoxemia and dopamine on mucosal oxygenation in porcine jejunum. *Am. J. Physiol.* 270: G667-675.
- 24 Van der Meer, T.J., H. Wang and M.P. Fink 1995. Endotoxemia causes ileal Mucosal acidosis in the absence of Mucosal hypoxia in a normodynamic porcine model of septic shock. *Crit. Care Med.* 23: 1217-1226.
- 25 Lang, C.H., G.J. Bagby, J.L. Ferguson, and J.J. Spitzer. 1984. Cardiac output and redistribution of organ blood flow in hypermetabolic sepsis. *Am. J. Physiol.* 246: R331-R337.
- 26 Revelly, J.P., T. Ayuse, N. Brienza, H.E. Fessler, and J.L. Robotham. 1996. Endotoxic shock alters distribution of blood flow within the intestinal wall. *Crit. Care Med.* 24: 1345-1351.

- 27 Walmrath, D., H.A. Ghofrani, S. Rosseau, H. Schütte, A. Cramer, W. Kadus, F. Grimminger, S. Bhakdi, and W. Seeger. 1994. Endotoxin priming potentiates lung vascular abnormalities in response to *Escherichia coli* hemolysin: an example of synergism between endo- and exotoxin. *J Exp. Med.* 180: 1437-1443.
- 28 Grimminger, F., C. Scholz, S. Bhakdi, and W. Seeger. 1991. Subhemolytic doses of *E. Coli* hemolysin evoke large quantities of lipooxygenase products in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* 266: 14262-14269.
- 29 Walmrath D., Scharmann M., König R., Pilch J., Grimminger F., and Seeger W. 1993. Staphylococcal alpha-toxin induced ventilation-perfusion mismatch in isolated blood-free perfused rabbit lungs. *J. Appl. Physiol.* 74(4): 1972-1980.
- 30 Bhakdi, S. and J. Trandum-Jensen. 1987. Damage to mammalian cells by proteins that form transmembrane pores. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 107: 147-223.
- 31 Eberspercher, B., F. Hugo, M. Pohl, and S. Bhakdi. 1990. Functional similarity between hemolysis of *Escherichia coli* and *Morganella morganii*. *J. Med. Microbiol.* 33: 165-170.
- 32 Bhakdi S., Grimminger F., Suttrop N., Walmrath D., Seeger W. 1994. Proteinaceous bacterial toxins and pathogenesis of sepsis syndrome and septic shock: the unknown connection. *Med. Microbiol. Immunol.* 183: 119-144.
- 33 Bhakdi, S. and J. Trandum-Jensen. 1991. Alpha-Toxin of *Staphylococcus aureus*. *Microbiol. Rev.* 55: 733-751.
- 34 Bhakdi, S., U. Weller, I. Walev, E. Martin, D. Jonas, and M. Palmer. 1993. A guide to the use of pore-forming toxins for controlled permeabilisation of cell membranes. *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)* 182: 167-175.
- 35 Grimminger, F., U. Sibelius, S. Bhakdi, N. Suttrop, and W. Seeger. 1991. *E. coli* hemolysin is a potent inducer of phosphoinositide hydrolysis and related metabolic responses in human neutrophils. *Clin. Invest.* 88: 1531-1539.
- 36 Bhakdi S., Mackmann N., Nicaud J.M., Holland I.B. 1986. *Escherichia coli* hemolysin may damage target cell membrane by generating transmembrane pores. *Infect. Immun.* 52: 63-69.
- 37 Cavallieri, S. J., G.A. Boach, and I.S. Snyder. 1984. *Escherichia coli* alpha-hemolysin: characteristics and probable role in pathogenicity. *Microbiol. Rev.* 48: 326-343.
- 38 Welch, R.A., E.P. Dellinger, B. Minshew, and S. Falkow. 1981. Hemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. Coli* infections. *Nature* 294: 665-667.
- 39 Hacker, J., C. Huges, H. Hof, and W. Goebel. 1983. *Escherichia coli* that cause urinary tract infection determine different levels of toxicity in mice. *Infect. Immun.* 42: 57-63.

- 40 Welch, R.A., and S. Falkow. 1984. Characterization of Escherichia coli hemolysins conferring quantitative differences in virulence. *Infect. Immun.* 43: 156-160.
- 41 Seeger, W., H. Walter, N. Suttorp, M. Muhly, and S. Bhakdi. 1989. Thromboxane-mediated hypotension and vascular leakage evoked by low doses of Escherichia coli hemolysin in rabbit lungs. *J. Clin. Invest.* 84: 220-227.
- 42 Seeger, W., R. Obernitz, M. Thomas, D. Walmrath, I.B. Holland, F. Grimminger, B. Eberspächer, F. Hugo, N. Suttorp, and S. Bhakdi. 1991. Lung vascular injury after administration of viable hemolysin-forming Escherichia coli in isolated rabbit lungs. *Am.Rev. Respir. Dis.* 143: 797-805.
- 43 Eberspächer, B., F. Hugo, S. Bhakdi. 1989. Quantitative study of the binding and hemolytic efficiency of Escherichia coli hemolysin. *Infect. Immun.* 57: 983-988.
- 44 Bergosky, E.H. 1964. Determination of tissue O₂ tensions by hollow visceral tonometers: effect of breathing enriched O₂ mixtures. *J. Clin. Invest.* 43: 193-200.
- 45 Dawson, A.M., D. Trenchard, and A. Guz. 1965. Small bowel tonometry: assesment of small gut Mucosal oxygen tension in dog and man. *Nature* 206: 943-944.
- 46 Grum, A.M., R.G. Fiddian-Green, G.L. Pittenger, B.J.B. Grant, E.D. Rothmann, and D.R. Dantzker. 1984. Adequacy of tissue oxygenation in intact dog intestine. *J. Appl. Physiol.* 56: 1065.1069.
- 47 Knichwitz, G.J. Rötger, T. Brüssel, M.Kuhmann, N. Mertes, and T. Möllhoff. 1996. A new method for continuos intramucosal pCO₂ measurement in the gastrointestinal tract. *Anaesth. Analg.* 83: 6-11.
- 48 Sato, N.T. Kamada, M.Shichiri, S. Kawano, H. Abe, and B. Hagihara. 1979. Measurement of hemoperfusion and oxygen sufficiency in gastric Mucosa in vivo. *Gastroenterol.* 76(4): 814-819.
- 49 Leung, F.W., T.Morishita, E.H. Livingston, T. Reedy, and P.H. Guth. 1987. Reflectance spectrophotometry for the assessment of gastroduodenal Mucosal perfusion. *Am. J. Physiol.* 252: G797-804.
- 50 Casadevall, M.J. Panes, M.J. Pique, J. Bosch, J. Teres, J. Rodes. 1992. Limitations of laser -Doppler velocimetry and reflectance spectrophotometry in estimating gastric Mucosal blood flow. *Am. J. Physiol.* 263: g810-815.
- 51 Frank, K.H., Kessler, Appelbaum, and W. Dümmler. 1989. The Erlangen micro-lightguide spectrophotometer EMPHO I. *Phys. Med. Biol.* 34: 1883-1900.
- 52 Hasibeder, W., R. Germann, H. Sparr, M. Haisjackl, B. Friesenecker, G. Luz, H. Pernthaler, K.Pfaller, H. Maurer, and O.Ennemoser. 1994. Vasomotion induce regular major oscillations in jejunal Mucosal tissue oxygenation. *Am. J. Physiol.* 266: G978-986.

- 53 Germann, G., M. Hasjackl, W. Hasibeder, H. Sparr, G. Luz, R. Plattner, H. Pernthaler, B. Friesenecker, and M. Falk. 1994. Dopamine and mucosal oxygenation in porcine jejunum. *J. Appl. Physiol.* 77: 2845-2852.
- 54 Dümmler, W. 1988. Bestimmung von Hämoglobin-Oxygenierung und relativer Hämoglobinkonzentration in biologischen Systemen durch Anwendung der Kubelka-Munk-Theorie. Thesis, *Erlangen*.
- 55 Kubelka, P., and F. Munk. 1931. Ein Beitrag zur Optik der Farbanstriche. *Z. Tech. Physik.* 11a: 76-77.
- 56 Bloomfield, R. 1974. *The Fourier analysis of time series: an introduction*. Wiley, New York.
- 57 Yeo, C.J., N.F. Couse, and M.J. Zinner. 1989. Serotonin and Substance P stimulate intestinal secretion in the isolated perfused ileum. *Surg.* 105: 86-92.
- 58 Barry, M.K., J.D. Aloisi, and C.J. Yeo. 1995. Cholinergic agents modulate transport in the isolated, perfused ileum. *J. Surg. Res.* 59: 681-686.
- 59 Hirayama, H., X. Xu, and K.S. Pang. 1989. Viability of the vascular perfused, recirculating rat intestine and intestine-liver preparations. *Am J. Physiol.* 257: G249-G258.
- 60 Frank, K.H., R. Funk, M. Kessler, and J.W. Rohen. 1991. Spectrometric measurements in the anterior eye vasculature of the albino rabbit - A study with the rabbit EMPHO I. *Exp. Eye Res.* 52: 301-309.
- 61 Höper, J., and L. Plasswilm. 1994. Micro-Light guide spectrophotometric measurements of changes in local haemoglobin oxygenation and concentration in the rabbit lung induced by hypoxia and hyperoxia. *Int. J. Microcirc.* 14: 282-288.
- 62 Venkatesh, B., T.H. Clutton-Brock, and S.P. Hendry. 1994. A multiparameter sensor for continuous intra-arterial blood gas monitoring: a prospective evaluation. *Crit. Care Med.* 22: 588-594.
- 63 Abraham, E., T.J. Gallagher, and S. Fink. 1996. Clinical evaluation of a multiparameter intra-arterial blood gas sensor. *Int. Care Med.* 22: 507-513.
- 64 Bass, B.L., E.J. Schwetzer, J.W. Harmon, and Kraimer. 1985. Intraluminal pCO₂. A reliable indicator of intestinal ischemia. *J. Surg. Res.* 39: 351-360.
- 65 Antonsson, J.B., C.C. Boyle, K.L. Kruthoff, H. Wang, E. Sacristan, H.R. Rothschild, and M.P. Fink. 1990. Validation of tonometric measurement of gut intramural pH during endotoxemia and mesenteric occlusion in pigs. *Am. J. Physiol.* 259: G519-G523.
- 66 Hartmann, M., A. Montgomery, K. Jönsson, and U. Haglund. 1991. Tissue oxygenation in hemorrhagic shock measured as transcutaneous oxygen tension, subcutaneous oxygen tension, and gastrointestinal intramucosal pH in pigs. *Crit. Care Med.* 19: 205-210

- 67 Reynolds, D.G., and K.G. Swan. 1972. Intestinal microvascular architecture in endotoxin shock. *Gastroenterol.* 63: 601-610.
- 68 Meyer, M.W., and M.B. Visscher. 1962. Partial analysis of segmental resistance in intestinal vessels after endotoxin. *Am. J. Physiol.* 202: 913-918.
- 69 Lee, J.S. 1994. Microvascular volume changes induced by exercise, heat exposure, or endotoxin injection. *Am. J. Physiol.* 267: H1142-H1150.
- 70 Suttorp, N., B. Floer, H. Schnittler, W. Seeger, and S. Bhakdi. 1990. Effects of *Escherichia coli* hemolysin on endothelial cell function. *Infect. Immun.* 58: 3796-3801.
- 71 Suttorp, N., P. Ehreiser, S. Hippenstiel, M. Fuhrmann, M. Krull, H. Tenor, and C. Schudt. 1996. Hyperpermeability of pulmonary endothelial monolayer: protective role of phosphodiesterase isoenzymes 3 and 4. *Lung* 174: 181-194.
- 72 Grimminger, F., F. Rose, U. Sibelius, M. Meinhardt, B. Pötsch, R. Spiestersbach, S. Bhakdi, N. Suttorp, and W. Seeger. 1997. Human endothelial cell activation and mediator release in response to the bacterial exotoxins *Escherichia coli* hemolysin and *Staphylococcal alpha-toxin*. *J. Immunol.* 159: 1909-1916.
- 73 Secchi A, Wellmann R, Martin E, Schmidt H. 1997. Dobutamine maintains intestinal villus blood flow during normotensive endotoxemia: an intravital microscopic study in the rat. *J Crit Care* 12: 137-41.
- 74 Walley K.R. 1996. Heterogeneity of oxygen delivery impairs oxygen extraction by peripheral tissues: theory. *J Appl Physiol.* 81: 885-94.
- 75 Schütte, H., S. Rosseau, R. Czymek, L. Ermert, D. Walmrath, H.J. Kramer, W. Seeger, F. Grimminger. 1997. Synergism between endotoxin priming and Exotoxin challenge in provoking severe vascular leakage in rabbit lungs. 156: 819-24.
- 76 Clutton-Brock T.H., Fink S., Markle D., Luthra A.J., Hendry S.P. 1994. The Evaluation of a new intravascular blood gas monitoring system in the pig. *J Clin Monit.* 10: 387-91.
- 77 Bone, R.C., Fisher C.J., Clemmer T.P., Slotman G.J., Metz C.A., Balk R.A. 1989. Sepsis syndrome: a valid clinical entity. Methylprednisolone Severe Sepsis Study Group. *Crit Care Med* 17: 389-393.
- 78 Knaus, W.A., Wagner D.P., Draper E.A. et al. 1991. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest* 100: 1619-1636.
- 79 Marshall, J., Sweeney D. 1990. Microbial infection and septic response in critical surgical illness. Sepsis, not infection, determines outcome. *Arch Surg.* 125: 17-22.
- 80 Carrico, C.J., Meakins J.L., Marshall J.C., Fry D., Maier R.V. 1986. Multiple-organ-failure-syndrome. *Arch surg.* 121: 196-208.

- 81 Evaldson, G., Heimdahl A., Kager I., Nord C.E. 1982. The normal human anaerobic microflora. *Scand J Infect Dis Suppl.* 35: 9-15.
- 82 Marshall, J.C., Christou N.V., Meakins J.L. The gastrointestinal tract: The “undrained abscess” of multiple organ failure. 1993. *Ann Surg.* 218: 111-119.
- 83 Hotchkiss, R.S, *NEJM* 2003, Jan 9, 348;2, 138-150

9 Abkürzungsverzeichnis

Aa.	Arteriae
ACE	Angiotensin converting enzyme
AP	Arterieller Druck
ARDS	<u>A</u> du <u>l</u> t <u>R</u> espi <u>r</u> atory <u>D</u> istress <u>S</u> yndrome
avDO ₂	Arteriovenöse Sauerstoffdifferenz
CPD	<u>C</u> itrat- <u>P</u> hos <u>ph</u> at- <u>D</u> extrose-Puffer
CO ₂	Kohlendioxid
C _A O ₂	Arterielle Sauerstoffkonzentration
cNOS	konstitutive NO-Synthetase
C _V O ₂	Venöse Sauerstoffkonzentration
dl	Deziliter
DNA	Deoxyribonucleic Acid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DO ₂	Sauerstoffangebot
EDRF	Endothelial Derived Relaxing Factor
EMPHO II [®]	Erlangen Micro-lichtleitere Spectrophotometer
HAES	<u>H</u> ydroxy <u>a</u> ethyl <u>s</u> tärke
Hb	Hämoglobinkonzentration
HbO _{2j}	Prozentuale Sauerstoffsättigung des Hämoglobins intramukosal
HlyA	Hämolysin A (Enterotoxin des Bakteriums Escherichia Coli)
HU	Hemolytic Unit (Hämolytische Einheit)
I.E.	Internationale Einheit

IFN	<u>I</u> nter <u>f</u> er <u>o</u> n
IL-1	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin 1
IL-6	<u>I</u> nter <u>l</u> eukin 6
iNOS	induzierbare NO-Synthetase
K	Kalium
kg	Kilogramm
KG	<u>K</u> örper <u>g</u> ewicht
KHB	<u>K</u> rebs- <u>H</u> enseleit- <u>P</u> uffer
LDH	Laktatdehydrogease
mg	Milligramm
ml	Milliliter
min	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOV	<u>M</u> ulti <u>o</u> rgan <u>v</u> ersagen
MW	<u>M</u> ittel <u>w</u> ert
Na	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
PAGGS-M	<u>P</u> hosphat- <u>A</u> denin- <u>G</u> uanosin- <u>G</u> lucose- <u>S</u> orbitol- <u>M</u> annitol Stabilisatorlösung
PAMP	pathogen associated molecular pattern
p _a O ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
pCO ₂	CO ₂ -Partialdruck
pO ₂	O ₂ -Partialdruck
PGI ₂	Prostacyclin

PRR	Pattern Recognition Receptor
p_vO_2	Venöser Sauerstoffpartialdruck
rel Hb _{konz.}	Relative Hämoglobinkonzentration
6-Keto-PGF _{1α}	6-Keto-Prostacyclin F _{1α}
S _a O ₂	Arterielle Sauerstoffsättigung
SEM	Standardfehler des Mittelwertes
SIRS	<u>S</u> ystemic <u>I</u> nflammatory <u>R</u> esponse <u>S</u> yndrome
S _v O ₂	Venöse Sauerstoffsättigung
TNF- α	<u>T</u> umor <u>n</u> ekrose <u>f</u> aktor α
U	Unit
VO ₂	Sauerstoffaufnahme

10 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. rer. nat. Friedrich Grimminger für die Überlassung des Themas.

Frau Dr. med. Betina Temmesfeld-Wollbrück für die Anleitung zur Präparation, die Einarbeitung in die Messmethodik, die theoretische Einführung in das Themengebiet der Sepsis und die nahezu unerschöpfliche Bereitschaft zur Diskussion beim Auftreten von Problemen jeglicher Art.

„Meiner“ Medizinisch-technischen Assistentin Frau Gudrun Albohn für ihre zuverlässige Hilfe bei der Präparation, der Vorbereitung der Perfusatlösungen und vielen ungenannten „Kleinigkeiten“ des Laboralltags.

Herrn Michael Reich, durch dessen umfassende Vorarbeit beim Aufbau dieses Darmmodells meine Arbeit wesentlich erleichtert wurde.

Herrn Dr. med. Konstantin Mayer für seine stete Hilfsbereitschaft bei Problemen der Auswertung und seine Unterstützung in der Beseitigung von Soft- und Hardwarefehlern.

Herrn Dr. Münscher, Herrn Busch, Herrn Brittschock und Herrn Dörr von den Behringwerken in Marburg für ihre uneigennützigere Bereitschaft viel Zeit und Mühe für die Gewinnung von Spendererythrozyten zu opfern, ohne welche die Herstellung der Perfusatlösung nicht möglich gewesen wäre.

Meiner Familie, die mir während der gesamten Zeit der Laborarbeit und besonders in jener der Niederschrift eine starke Stütze war.

11 Publikationen

Teile dieser Arbeit wurden in folgenden Schriften veröffentlicht:

1. **Temmesfeld, B., K. Mayer, A. Friedland, M. Reich, W. Seeger, and F. Grimminger.** *Changes in mucosal microcirculation and metabolism after exotoxin administration in the isolated perfused ileum* (Abstract)
Intensive Care Medicine 22:S441 (Suppl.3), 1996.
2. **Temmesfeld, B., K. Mayer, A. Friedland, M. Reich, W. Seeger, and F. Grimminger.** *Einfluß von E.coli Hämolysin auf die Mikrozirkulation der Darmmucosa: ein Modell für sepsisbedingte Störungen der Mucosabarriere.* (Abstract)
Medizinische Klinik 92: 149 (Suppl.2), 1997.
3. **Temmesfeld, B., K. Mayer, A. Friedland, B. Brell, G. Albohn, F. Grimminger, and W. Seeger.** *Gut mucosal hypoperfusion after administration of bacterial exotoxins.* (Abstract)
American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine 157: A104. 1998
4. **Mayer, K., B. Temmesfeld-Wollbrück, A. Friedland, H. Olschewski, W. Seeger, and F. Grimminger.** *Severe microcirculatory abnormalities elicited by E, coli hemolysin in the rabbit ileum mucosa.* American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine

12 Erklärung

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

LEBENS LAUF

Alexander Martin Friedland

Am Güterbahnhof 1

56070 Koblenz

Mobil: 0173-72 47 559

Internet: a.friedland@gmx.de

Geburtsdatum: 15. April 1969
Geburtsort: Simmern - Hunsrück
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch
Eltern: Brunhilde Friedland, Hausfrau
Manfred Friedland, Elektro-Ingenieur

Schulbildung:	1990	Abitur am Hilda Gymnasium Koblenz
Grundwehrdienst:	1990 - 1991	Spezifikation: Sanitäter
Freiwilliges Soziales Jahr:	1991 - 1992	Krankenpflege, Medizinische Klinik I, Gastroenterologie (Kemperhof / Koblenz)
Medizinstudium:	April 1992	Justus-Liebig-Universität Gießen
Physikum:	März 1994	Justus-Liebig-Universität Gießen
Erstes Staatsexamen:	August 1995	Justus-Liebig-Universität Gießen
Zweites Staatsexamen:	April 1998	Justus-Liebig-Universität Gießen
Drittes Staatsexamen:	April 1999	Justus-Liebig-Universität Gießen

PJ: 1998 Wahlfach Anaesthesie im PJ

Promotion: 1995 - 1997
Promotionsarbeit in der Klinischen Forschungsgruppe „Respiratorische Insuffizienz“, SFB 311, an der Justus-Liebig-Universität Gießen, (Prof. Dr. Dr. Grimminger, Prof. Dr. Seeger, Dr. Temmesfeld-Wollbrück); Thema:
„Mikrozirkulationsstörungen der Mucosa hervorgerufen durch *Escherichia coli* Hämolyisin am isolierten, volumenkonstant perfundierten Ileum des Kanichens“

<i>AIP:</i>	8-10/1999	Beginn des AIP in der Medizinischen Klinik II der Med. Universität zu Lübeck bei Prof. Dr. Katus, Kardiologie (Herzkatheterlabor, Intensivüberwachungsstation)
	Januar 2000 - März 2001	Vollendung der AIP - Zeit in der Chirurgischen Klinik des Städt. Klinikums Ludwigshafen bei Prof. Dr. K. Schönleben (Ambulanz, Unfall-, Gefäß- und Allgemeinchirurgie)
	Dezember 2000	Seminarkongress Notfallmedizin Kurse A-D zur Erlangung der Qualifikation Fachkunde Rettungsdienst im Schulungszentrum der Akademie für Notfallmedizin in Arnberg
<i>Assistenzarzt:</i>	April 2001 - August 2002	Assistenzarzt in der Chirurgischen Abteilung des Evangelischen Krankenhauses in Lippstadt bei Prof. Dr. M. Mayer
	Oktober 2001	Erlangung der Fachkunde „Rettungsdienst“
	Oktober 2002 - Januar 2003	Tätigkeit als Notarzt in der Unfallchirurgischen Klinik der JLU Gießen, Prof. Dr. Dr. Schnettler
des	Februar 2003 - August 2003	Assistenzarzt der Chirurgischen Klinik Evangelischen. Krankenhauses Gießen; Prof. Dr. Muhrer
	Seit Dezember 2003	Assistenzarzt der Allgemeinchirurgischen Klinik des Klinikums Kemperhof in Koblenz; Prof. Dr. Markus

Interessen: Sportliche Aktivitäten (Schwimmen, Squash, Tauchen, Segelfliegen, Sportfischen), Reisen, Literatur, Kunst, Naturwissenschaften, Kochen