

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf
Direktor: Univ. Prof. Dr. med. B. H. Pannen

**Einfluss lokaler Losartan-Applikation auf die orale und gastrale
Mikrozirkulation unter physiologischen und hämorrhagischen
Kreislaufbedingungen**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

vorgelegt von
Fabian Voß
2018

Als Inauguraldissertation gedruckt mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

gez.:

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. N. Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. O. Picker, MBA

Zweitgutachter: PD Dr. med. J. Graßmann

Zusammenfassung

Einleitung: Der hämorrhagische Schock stellt auch in Folge seiner Komplikationen, wie der Sepsis oder des Multiorganversagens, eine häufige und schwerwiegende Erkrankung dar. Bei der Entstehung dieser Komplikationen kommt es über eine kompromittierte Mikrozirkulation zu einer gestörten Barrierefunktion der intestinalen Mukosa. Durch seine vasokonstriktive Wirkung scheint das im Schock vermehrt sezernierte Angiotensin (AT) II entscheidend daran beteiligt zu sein. Durch Applikation eines Antagonisten am AT₁-Rezeptor (Losartan) im hämorrhagischen Schock könnte demnach die intestinale Mikrozirkulation aufrechterhalten werden und auf diese Weise das Auftreten der o.g. Komplikationen verhindert werden. Zur Vermeidung systemischer Nebenwirkungen sollte die Applikation des Losartans topisch erfolgen.

Methoden: Nach Genehmigung durch die zuständige Behörde wurden die Experimente an sechs anästhesierten Foxhounds in wiederholter, randomisierter Reihenfolge verblindet durchgeführt. Dabei wurden jeweils 30mg Losartan bzw. NaCl-Lösung unter physiologischen oder hämorrhagischen (20% des Blutvolumens) Kreislaufbedingungen und anschließender Retransfusion appliziert. Die orale und gastrale Mikrozirkulation wurde mittels Reflektionsspektrofotometrie und Laser-Doppler-Technik kontinuierlich beurteilt. Parallel wurde intermittierend die orale Mukosa mittels *incident dark field illumination* untersucht. Systemische Kreislaufparameter wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Die statistische Auswertung erfolgte mittels einer 2-way ANOVA und eines Bonferroni post-hoc Test. Dargestellt sind MW ± SEM, p<0,05.

Ergebnisse: Lokal appliziertes Losartan verbesserte unter physiologischen Kreislaufbedingungen den gastralen μ flow im Vergleich zur Kontrollgruppe (147 ± 17 vs. 106 ± 9 aU), während dieser Effekt unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen nur tendenziell (p=0.09) nachweisbar war (125 ± 9 vs. 95 ± 16 aU). Die μ HbO₂ der gastralen Mukosa wurde durch die lokale Losartan-Applikation nicht beeinflusst. Die Messungen an der oralen Mukosa, sowie die systemischen Kreislaufparameter zeigten keine Beeinflussung durch Losartan.

Diskussion: Unterschiede in der Expression von AT-II-Rezeptoren in der oralen und gastralen Mukosa sowie histologische Unterschiede zwischen den beiden Messorten könnten den unterschiedlichen Messergebnissen zugrunde liegen. Verstärkte Ausschüttung von AT II im hämorrhagischen Schock könnte bei kompetitiver Antagonisierung durch Losartan zu einem verminderten Effekt im Schock geführt haben. Unter Hämorrhagie vermehrt ausgeschüttetes Vasopressin könnte über eine vorgeschaltete Vasokonstriktion ebenfalls einen verminderten Effekt durch Losartan im Schock erklären.

Diese Studie legt also folgende Schlüsse nahe:

1. Die lokale Applikation von Losartan erhöht den Blutfluss der gastralen Mikrozirkulation unter physiologischen Kreislaufbedingungen.
2. Die lokale Applikation von Losartan erhöht tendenziell den Blutfluss der gastralen Mukosa unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen.
3. Die lokale Applikation von Losartan an oraler und gastral Mukosa hat keinen Einfluss auf systemische Kreislaufparameter.

Abstract

Background: In clinical practice haemorrhage is often followed by severe complications such as sepsis or multi-organ-failure. Their development is mainly influenced by an impaired barrier-function of the intestinal mucosa, which is caused by the compromised intestinal microcirculation during haemorrhage. In this process, increased secretion of Angiotensin (AT) II – a strong vasoconstrictive agent – seems to play a key role.

While counteracting this mechanism at the AT₁-receptor, application of Losartan, may reduce or avoid intestinal vasoconstriction during haemorrhage and thereby help to maintain mucosal barrier-function, which reduces the number of life-threatening complications as named before. To prohibit systemic responses, e.g. lowered blood-pressure, Losartan should be applied locally.

Methods: To investigate the effects of locally admitted Losartan on oral and gastric microcirculation and intestinal barrier-function under physiological and haemorrhagic conditions, six anaesthetised dogs were tested repetitively.

Experiments were performed rater-blinded and randomized. In four groups dogs received 30mg Losartan or sodium chloride solution (via oral and gastric tube) under physiological and haemorrhagic conditions (-20% blood volume, followed by retransfusion). Oral and gastric microcirculation was measured via tissue reflectance spectrophotometry and laser Doppler flowmetry continuously. Additionally, investigations with incident dark field illumination (IDF) were performed to evaluate the oral microcirculation in detail. Systemic haemodynamic variables were computed during the experiments. Statistics were performed using a 2-way-ANOVA followed by a Bonferroni post-hoc test. Results are presented as mean \pm standard error, $p < 0,05$.

Results: Locally admitted Losartan improved gastric blood-flow (μ flow) under physiological conditions (147 ± 17 vs. 106 ± 9 aU in control group), whereas under haemorrhagic conditions gastric blood-flow was only improved by trend ($p=0.09$) (125 ± 9 vs. 95 ± 16 aU). Oxygen saturation at the gastric mucosa (μ HbO₂) was effected neither under physiological nor under haemorrhagic conditions by topically applied Losartan. No changes were measured after admitting Losartan to the oral mucosa (μ flow, μ HbO₂, IDF). Systemic haemodynamic variables did not alter due to Losartan application.

Discussion: Differences between the detected changes in oral and gastric mucosal microcirculation could either be caused by a diverging expression of AT II-receptors at the measuring sites or by their different mucosal histology.

Increased AT II secretion under haemorrhagic conditions may have led to a less improved microcirculation after Losartan application due to competitive effects at the AT II-receptor. Furthermore, an intensified release of vasopressin could have caused upstream vasoconstriction in haemorrhage.

Summarizing, this study leads to the following conclusions:

1. Local application of Losartan increases gastric blood-flow under physiological conditions.
2. Local application of Losartan increases gastric blood-flow under haemorrhagic condition only by trend.
3. Systemic haemodynamic parameters are not effected by locally applied Losartan.

Inhaltsverzeichnis:

1 EINLEITUNG	- 9 -
2 MATERIAL UND METHODEN	- 15 -
2.1 Versuchsgenehmigung	- 15 -
2.2 Versuchstiere	- 15 -
2.3 Operation	- 16 -
2.4 Messungen	- 16 -
2.4.1 Herzfrequenz	- 17 -
2.4.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	- 17 -
2.4.3 Herzzeitvolumen (HZV)	- 17 -
2.4.4 Körpertemperatur	- 19 -
2.4.5 Atem- und Narkosegaskonzentrationen	- 19 -
2.4.6 Neuromuskuläres Monitoring	- 19 -
2.4.7 Blutgasanalyse, Elektrolyt- und Hämatokritwertbestimmung	- 20 -
2.4.8 Monitoring der Mikrozirkulation	- 21 -
2.4.9 Messung der Barrierefunktion	- 24 -
2.4.10 Natriumchlorid- und Losartanapplikation	- 26 -
2.4.11 Hypovolämie	- 26 -
2.5 Versuchsprotokoll	- 27 -
2.6 Versuchsgruppen	- 30 -
2.6.1 Losartan-Applikation unter physiologischen Kreislaufbedingungen	- 30 -
2.6.2 NaCl-Applikation unter physiologischen Kreislaufbedingungen	- 30 -
2.6.3 Losartan-Applikation unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen	- 30 -
2.6.4 NaCl-Applikation unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen	- 30 -
2.7 Statistische Auswertung	- 31 -
3 ERGEBNISSE	- 31 -
3.1 Einfluss lokaler Losartan-Applikation auf die Mikrozirkulation an der oralen und gastralen Mukosa unter physiologischen Kreislaufbedingungen	- 31 -

3.2 Einfluss lokaler Losartan-Applikation auf die Mikrozirkulation an der oralen und gastralen Mukosa unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen	- 37 -
3.3 Einfluss der lokalen Losartan-Applikation auf die Barrierefunktion der gastralen Mukosa	- 41 -
4 DISKUSSION	- 42 -
4.1 Zentrale Aussagen	- 42 -
4.2 Methodenkritik	- 42 -
4.2.1 Experimentelle Rahmenbedingungen	- 42 -
4.2.2 Losartanapplikation und lokale Therapie	- 43 -
4.2.3 Messungen der oralen und gastralen Mikrozirkulation	- 43 -
4.2.4 Bewertung der MFI-Messungen	- 45 -
4.2.5 Bewertung der intestinalen Barrierefunktion	- 45 -
4.3 Ergebnisdiskussion	- 46 -
4.3.1 Steigerung des gastralen Blutflusses durch lokale Losartan Applikation	- 46 -
4.3.2 Wirkung von Losartan auf die orale Mukosa	- 48 -
4.3.3 Oxygenierung der gastralen Mukosa	- 49 -
4.4 Klinische Relevanz	- 50 -
5 ZUSAMMENFASSUNG	- 51 -
6 LITERATURVERZEICHNIS	- 54 -

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ACE	<i>angiotensin-converting-enzyme</i>
AT	Angiotensin
aU	<i>arbitrary units</i>
AZV	Atemzugvolumen
BE	Blutentnahme
BGA	Blutgasanalyse
bzw.	beziehungsweise
c	Kontrollzeitpunkt
c-	centi-
CaO ₂	arterieller Sauerstoffgehalt
DO ₂	systemisches Sauerstoffangebot
EKG	Elektrokardiogramm
FCD	<i>functional capillary density</i>
FHbO ₂	Oxyhämoglobinfraktion
h	Stunde
HV	Hypovolämie
HZV	Herzzeitvolumen
IDF	<i>incident dark field illumination</i>
IRR	Ischämie-Reperfusion-Reaktion
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
m	Meter
m-	milli-
μ-	mikro-
<i>μflow</i>	mikrovaskulärer Blutfluss
<i>μHbO₂</i>	mikrovaskuläre Hämoglobinsättigung
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck
MFI	<i>microcirculatory flow index</i>

MOV	Multiorganversagen
min	Minute
NV	Normovolämie
O2C	Reflektionsspektrofotometer
pCO ₂	Kohlenstoffdioxidpartialdruck
pO ₂	Sauerstoffpartialdruck
PPV	<i>proportional perfused vessels</i>
PVD	<i>perfused vessel density</i>
RAAS	Renin-Angiotensin-Aldosteron-System
rHb	relativer Hämoglobingehalt im Gewebe
RT	Retransfusion
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
S _{art} O ₂	arterielle Sauerstoffsättigung
SEM	standard error of the mean
SV	Schlagvolumen
SVR	systemischer vaskulärer Widerstand
TOF	<i>train of four</i>
TOFR	<i>train of four ratio</i>
TVD	<i>total vessel density</i>
u.a.	unter anderem
vgl.	vergleiche (mit)
vs.	versus
z.B.	zum Beispiel
°C	Grad Celsius

1 Einleitung

Schwere Traumata und ihre Folgen stellen die häufigsten Todesursachen im jungen und mittleren Erwachsenenalter (<44 Jahre) dar [1]. Unter den durch Unfälle verursachten Todesfällen sind der hämorrhagische Schock sowie die daraus resultierenden Komplikationen wie Sepsis oder Multiorganversagen (MOV) entscheidende Faktoren. Daraus lässt sich die immense Bedeutung, die der Behandlung und Vermeidung solcher Fälle zukommt, erkennen. Um auf ihre pathophysiologischen Vorgänge und eine mögliche Therapie derer näher eingehen zu können erscheint zunächst eine Definition des hämorrhagischen Schocks notwendig. [1-5]

Als Schock wird eine kreislaufbedingte Minderperfusion mit konsekutiver Gewebshypoxie verschiedener Organe bezeichnet [6]. Im hämorrhagischen Schock, als Unterform des hypovolämischen Schocks, führt ein starker Blutverlust zu einer arteriellen Hypotonie, welche zur Aufrechterhaltung der Organperfusion von einer kompensatorischen Tachykardie begleitet wird. Die bei unzureichender Kompensation entstehende Minderperfusion mündet in einer durch Tachypnoe und Hyperventilation (teil-) kompensierten azidotischen Stoffwechsellage.

Mit Blick auf die verschiedenen Organsysteme ergeben sich folglich verschiedene Auswirkungen.

Durch eine zerebrale Hypoxie kann es zu Bewusstseinsminderungen kommen, während auf Grund einer renalen Minderperfusion im Verlauf eine Oligourie, ggf. einhergehend mit einem akuten Nierenversagen, zu befürchten ist. [7]

Um lebensnotwendige Organe wie Herz und Gehirn vor dieser Hypoxie durch Hypoperfusion zu schützen, kommt es zu einer Umverteilung des Blutvolumens. Betroffen ist insbesondere das Splanchnikusgebiet. Die durch den Schock bereits bestehende Hypoxie des Splanchnikusgebiets nimmt also weiter zu [8].

Dazu trägt insbesondere auch das Renin-Angiotensin-Aldosteron-System (RAAS) bei, welches im Schock verstärkt aktiviert wird [9, 10], um über eine

gesteigerte Rückresorption von Flüssigkeit in der Niere dem (akuten) Volumenmangel entgegenzuwirken.

Allerdings wird auf diesem Weg auch die Kreislaufzentralisation und insbesondere die intestinale Vasokonstriktion verstärkt [11], so dass auch durch diesen Mechanismus die intestinale Hypoxie zunimmt.

Neben der Umverteilung des Blutvolumens spielt die besondere Gefäßarchitektur der Villi des Dünndarms eine wichtige Rolle bei der entstehenden mukosalen Hypoxie während des hämorrhagischen Schocks. Die Nähe zwischen aufsteigenden arteriellen und absteigenden venösen Gefäßen in den Villi sorgt basisnah für eine schnelle Diffusion der gelösten Gase zwischen den Gefäßabschnitten [12] und führt damit zu einem arteriovenösem Shunt. Folglich herrscht apikal eine relative Hypoxie in den Villi. Neben einer Abnahme der funktionellen kapillären Dichte (FCD) werden bei hämorrhagischen Ereignissen Ödeme der Endothelzellen beobachtet [4]. Durch die daher vergrößerte Diffusionsstrecke wird der Ausgleich einer entstehenden Hypoxie erschwert und durch die Schwellung der Endothelzellen der Fluss im Blutgefäß limitiert [13].

Die als Folge dessen lokal gestörte Perfusion und die anschließenden Reperfusionreaktionen in der intestinalen Mukosa bewirken eine Beeinträchtigung der mukosalen Funktion [14]. Zu diesen zählt neben der aktiven bzw. passiven Resorption von Nahrungsbestandteilen und der Sekretion verschiedener Substanzen auch die Barrierebildung zwischen luminal gelegenem Nahrungsbrei und dem Blut- bzw. Lymphsystem [14-16]. An der Bildung dieser Barriere sind sowohl die Zellmembranen der mukosalen Epithelzellen als auch die *tight-junctions* zwischen diesen Zellen, sowie sezernierte Substanzen beteiligt [17]. Insbesondere wird der Übertritt von Bakterien, die sich in einer Vielzahl im Gastrointestinaltrakt befinden, und ihrer Toxine ins Blut, sowie die Bildung endogener proinflammatorischer Substanzen [14] limitiert. Diese Mechanismen tragen effektiv zur Verhinderung der Sepsis und des MOV bei [14, 18-20].

Therapeutisch standen als zu beeinflussende Größen im Schock lange Zeit die Parameter der Makrozirkulation allein im Vordergrund. In den letzten Jahren

zeigte sich aber, dass insbesondere bei der Entstehung der Sepsis als Komplikation einer gestörten intestinalen Barrierefunktion im Rahmen hämorrhagischer Ereignisse die intestinale Mikrozirkulation eine entscheidende Rolle spielt [4, 21-23]

Dabei kann die Mikrozirkulation schon beeinträchtigt sein, während systemische hämodynamische Parameter noch unverändert sind. Systemische hämodynamische Parameter allein lassen daher nur eingeschränkt Rückschlüsse auf die Funktion der intestinalen Mikrozirkulation zu. Ihre Stabilisierung kann dementsprechend auch nicht als alleiniges Therapieziel dienen. [24]

Um eine Schädigung der intestinalen Barriere minimieren zu können, erscheint es demnach sinnvoll, die intestinale Mikrozirkulation zusätzlich direkt zu überwachen. Dazu werden verschiedene Parameter zur qualitativen und quantitativen Beurteilung der Mikrozirkulation in vivo herangezogen.

Insbesondere die Sauerstoffsättigung des Gewebes, der lokal vorhandene Blutfluss sowie die Dichte der (durchbluteten) Kapillaren müssen beurteilt werden. Ein hämorrhagisches Ereignis wirkt sich durch verschiedene Mechanismen auf diese Parameter aus. So werden der Blutfluss und der Anteil der durchbluteten Kapillaren durch die zunehmende intestinale Vasokonstriktion limitiert. Die Aufrechterhaltung bzw. Wiederherstellung der Mikrozirkulation hat dementsprechend – unabhängig von systemischen Kreislaufparametern – eine entscheidende Bedeutung.

Dabei schien die orale Mikrozirkulation ein unabhängiger Prognosefaktor im hämorrhagischen oder septischen Schock zu sein [24-27].

Allerdings gilt es zu beachten, dass die alleinige Bewertung der oralen Mikrozirkulation nicht ausreicht, um Rückschlüsse auf die intestinale Mikrozirkulation und demnach auch auf die Barrierefunktion der Mukosa ziehen zu können.

So konnten Vellinga et al. und Salgado et al. die Beobachtungen der o.g. Studien nach Messungen an der oralen Mukosa nicht bestätigen [28, 29].

Der Zusammenhang zwischen oraler und intestinaler Mikrozirkulation ist also nicht abschließend geklärt, da je nach Studie eine Korrelation [30] oder aber

Unabhängigkeit [31] der gemessenen Parameter der Mikrozirkulation an diesen beiden Kapillarbetten postuliert wird.

Zur Evaluation möglicher Therapieansätze zur Verbesserung der intestinalen Mikrozirkulation erscheint ein separates Monitoring dieser Kapillarbetten demnach – gerade mit Blick auf die unterschiedlichen Aussagen zur oralen Mikrozirkulation als Prognosefaktor – von besonderem Interesse zu sein.

Einen möglichen Ansatzpunkt zur Therapie intestinaler

Mikrozirkulationsstörungen stellt das RAAS dar, da ihm eine wesentliche Rolle bei der Regulation der Splanchnikusperfusion zukommt [11, 32]. Dabei ist

Angiotensin (AT) II in relevantem Maße an der durch Hypovolämie bedingten Vasokonstriktion während des hämorrhagischen Schocks im

Splanchnikusgebiet beteiligt [10, 33-36]. So ist in diesem Gebiet eine

besonders hohe Dichte an AT₁-Rezeptoren nachgewiesen worden [37, 38]. An

diesen bindet das im Schock vermehrt vorhandene AT II. Eine weitere

Zunahme des Blutflusses im Intestinum könnte durch eine verminderte

Ödembildung der Endothelzellen, wie sie unter hypovolämischen Bedingungen beobachtet wird, erreicht werden [39]. Im intestinalen Gewebe konnte gezeigt

werden, dass einer zellulären Ödembildung im hämorrhagischen Schock die

Aktivierung von Natrium-Protonen-Austauschern zu Grunde liegt [39]. Die

Aktivierung von Natrium-Protonen-Austauschern konnte in anderen Geweben

durch eine Blockade am AT₁-Rezeptor vermindert werden [40, 41]. Auf diese

Weise könnte auch am Endothel der intestinalen Mukosa eine Ödembildung

verringert und die Mikrozirkulation sowie Barrierefunktion des

Gastrointestinaltraktes verbessert werden.

Die Aktivierung des RAAS im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks

verstärkt außerdem die Ischämie-Reperfusion-Reaktionen (IRR), welche die

Barrierefunktion zusätzlich schädigen. Diese IRR werden u.a. durch vermehrte

Bildung von reaktiven Sauerstoffspezies (ROS) und eine vermehrte

Leukozytenadhäsion am intestinalen Endothel gesteigert [37]. Durch eine

verstärkte Ausschüttung proinflammatorischer (CXC-)Chemokine und die

Aktivierung verschiedener Adhäsionsfaktoren (wie P-Selektin, *lymphocyte*

function antigen-1) sowohl am Endothel als auch an den Leukozyten selbst wird dieser Effekt gesteigert [37, 42, 43].

Da AT II über die Bindung am AT₁-Rezeptor sowohl an der verstärkten ROS-Bildung [44, 45], als auch an der Expression und Ausschüttung der Chemokine bzw. Adhäsionsfaktoren, beteiligt ist, könnte eine Inhibition von AT II zu einer abgeschwächten IRR führen und somit die Barrierefunktion der intestinalen Mukosa geschützt werden [14, 37].

Die Blockade des RAAS könnte dementsprechend durch o.g. Effekte die intestinale Mikrozirkulation verbessern.

Eine solche Blockade kann auf systemischer oder auf topischer Ebene angestrebt werden.

Systemische Interventionen, wie z. B. die Blockade des RAAS, die Applikation von Vasodilatoren oder die Induktion einer Hypothermie, haben allerdings auch systemische Nebenwirkungen. So könnte im Speziellen durch eine systemische Antagonisierung des RAAS die Durchblutung des Splanchnikusgebiets zwar verbessert werden, allerdings bestünde die Gefahr einer starken Kreislaufdepression [46].

Zur Vermeidung dieser systemischen Nebenwirkungen ist demnach eine lokale Blockade der AT-Rezeptoren durch die topische Applikation von Medikamenten denkbar.

An einigen anderen Organen ist eine topische Therapie zur Vermeidung von Nebenwirkungen bereits etabliert. So wird inhalativ verabreichtes Iloprost erfolgreich zur Therapie der pulmonalen Hypertension eingesetzt [47].

Bezogen auf die intestinale Mikrozirkulation ist die topische Applikation von Medikamenten zur Verbesserung der Mikrozirkulation ohne systemische Nebenwirkungen ebenfalls denkbar. Allerdings ist dies – im Gegensatz zu vielen anderen Organen – bislang kaum untersucht. Im klinischen Setting könnte z.B. enterale Ernährung auf der Intensivstation mit vasodilatierenden Substanzen versetzt werden. So wäre es möglich, Nebenwirkungen, wie einen systemischen Blutdruckabfall, durch diese Substanzen, zu verhindern und gleichzeitig lokal die Mikrozirkulation zu verbessern. Kürzlich konnte erstmals

ein positiver Effekt durch lokale Nitroglycerin-Applikation auf die intestinale Oxygenierung gezeigt werden [48].

Eine topische Therapie im Gastrointestinaltrakt ist demzufolge grundsätzlich möglich, ohne systemische Nebenwirkungen auszulösen.

Es ist somit denkbar, dass eine lokale Blockade der AT-II-Rezeptoren die Mikrozirkulation der Mukosa moduliert, ohne systemische Nebenwirkungen auszulösen.

Lokal appliziertes Losartan könnte als kompetitiver Antagonist am AT₁-Rezeptor demnach auf verschiedenen Ebenen die Mechanismen unterbinden, die an der Entstehung von Sepsis und MOV nach hämorrhagischen Ereignissen beteiligt sind.

Mit dieser Studie sollen daher folgende Fragestellungen beantwortet werden:

1. Beeinflusst die lokale Losartan-Applikation die orale und/oder gastrale Mikrozirkulation unter physiologischen Kreislaufbedingungen?
2. Beeinflusst die lokale Losartan-Applikation die orale und/oder gastrale Mikrozirkulation unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen?
3. Beeinflusst die lokale Losartan-Applikation in der gewählten Dosierung auf systemischer Ebene Kreislaufparameter?
4. Hat die lokale gastrale Losartan-Applikation einen Effekt auf die intestinale Barrierefunktion?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsgenehmigung

Die Versuche (n = 24) wurden im Vorfeld durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen genehmigt (Aktenzeichen 84-02.04.2012.A152). Alle an den Experimenten beteiligten Personen sind im Besitz des Fachkundenachweises und soweit erforderlich der Ausnahmegenehmigung gemäß §9 des Tierschutzgesetzes.

2.2 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden sechs weibliche Foxhounds mit einem Körpergewicht (KG) zwischen 28 und 36 kg eingesetzt. Das Gewicht der jeweiligen Hunde wurde durch reglementierte Nahrungszufuhr konstant gehalten. Alle Hunde waren kastriert, somit war der Einfluss des Oestrus auf die Ergebnisse ausgeschlossen. Die wiederholt eingesetzten Hunde hatten zwischen den einzelnen Versuchen eine Mindestpause von drei Wochen, um die Erholung von der Narkose sowie ggf. der Hypovolämie und die vollständige Elimination des verwendeten Pharmakons [49] zu ermöglichen. Vor Versuchsbeginn wurde eine 12 stündige Nahrungskarenz eingehalten, um Artefakte während der gastralen Messung zu minimieren. Trinkwasser stand durchgehend in ausreichender Menge zur freien Verfügung. Gehalten wurden die Tiere in der Versuchstieranlage der Universität, wo die Fütterung mit Trockennahrung erfolgte (Hd-H extrudiert V3236, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest). Regelmäßiger Auslauf außerhalb des Gebäudes wurde sichergestellt. Die Experimente begannen alle zur selben Uhrzeit, um den Einfluss der circadianen Rhythmik des RAAS auf die Versuchsergebnisse auszuschließen [50]. Einflüsse pathologischer Prozesse wurden durch den Ausschluss kranker Tiere aus dem Versuch minimiert. Es zeigten sich keine Verhaltensauffälligkeiten unter den Versuchstieren. Um den Einfluss von situationsbedingtem Stress auf

das RAAS [51] und die Kreislaufparameter zu verhindern, wurden die Hunde im Vorfeld der Versuche an das Labor sowie an den Versuchstisch gewöhnt.

2.3 Operation

Einige Zeit vor den Versuchen wurden durch die Arbeitsgruppe die Halsschlagadern (Aa. Carotides) der Hunde operativ in Hautschlingen vorverlagert [52]. Die Operation fand unter Allgemeinanästhesie mit Piritramid und Isofluran statt.

In den folgenden Versuchen wurde auf diese Weise die Punktion der Aa. Carotides, sowie das Abbinden der Punktionsstelle nach Versuchsende ermöglicht.

2.4 Messungen

Die kontinuierlich gemessenen Daten (Elektrokardiogramm, arterieller Blutdruck, Atemwegsdruck, expiratorische Kohlenstoffdioxid- bzw. SevofluraneKonzentration und inspiratorische Sauerstoffkonzentration) wurden über einen Mehr-Kanal-Oszillographen (11-G4145-01, Gould Inc., Cleveland, OH, USA) aufgenommen, vom analogen in ein digitales Signal gewandelt (Powerlab®/800, ADInstruments, Castle Hill, AUS; 400 Hz) und schließlich auf einem handelsüblichen Computer (Betriebssystem: Microsoft Windows XP®, Microsoft Corporation, Redmond, USA) durch das Programm Chart 4.2 (Chart v. 4.2, ADInstruments, Pty Ltd., Castle Hill, AUS) dargestellt und anschließend gespeichert. Die Auswertung erfolgte auf einem separaten Computer (Betriebssystem: Microsoft Windows 7®, Microsoft Corporation, Redmond, USA) mittels Chart 5.5.6.

2.4.1 Herzfrequenz

Während der Versuche wurde mittels Nadelelektroden ein Oberflächen-1-Kanal-Elektrokardiogramm (EKG) abgeleitet. Die Herzfrequenz wurde durch die Software Chart 5.5.6 R-Zacken getriggert bestimmt.

2.4.2 Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)

Ein druckfester mit heparinisierter (Heparin-Na 5000 I.E./ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER), isotonischer Kochsalzlösung (1 I.E. Heparin/ml NaCl) gefüllter Katheter (PULSIOCATH arterieller Thermodilutionskatheter PV2015L20, Pulsion Medical Systems AG, München, GER), der über die A. carotis communis in die Aorta ascendens eingeführt wurde, diente zur arteriellen Blutdruckmessung. Eine Lagekontrolle erfolgte über die korrekte Darstellung der Blutdruckkurve sowie das EKG-Signal. Die kontinuierliche Druckmessung erfolgte durch einen auf Herzhöhe (als Orientierungspunkt diente der Processus spinosus des 7. Halswirbelkörper am liegenden Tier) angebrachten Drucksensor (Modell P23 ID, Gould Statham®, Elk Grove, IL, USA), welcher im Vorfeld des jeweiligen Experimentes mit einer Dreipunkteichung durch eine Eichwaage nach Gauer (HSE Druckeichgerät Typ 367, Hugo Sachs Elektronik, March, Gb) eingestellt wurde. Die Berechnung des MAP erfolgte anschließend durch eine Integralbestimmung als Funktion von Chart 5.5.6.

2.4.3 Herzzeitvolumen (HZV)

Das HZV wurde nach der Stewart-Hamilton-Methode wie folgt berechnet:

$$HZV = \frac{(T_B - T_I) * V_i * K}{\int \Delta T_B * dt}$$

T_B = Bluttemperatur vor Injektion

K = Injektatkonstante

T_I = Temperatur des Injektats

V_i = Volumen des Injektats

$\int \Delta T_B * dt$ = Fläche unter der Thermodilutionskurve

Gemessen wurden die Werte durch transpulmonale Thermodilution (PiCCO 4.2, PULSION Medical Systems AG, München, GER). Dabei wurde jeweils ein 10ml Bolus (V_i) eiskühlter isotonischer NaCl-Lösung über eine am Vorderlauf des Hundes platzierte Venenverweilkanüle der Größe 16 Gauge (Vasofix® Safety, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, GER) appliziert. Die Temperatur wurde dabei sowohl im Injektat (T_i) vor Injektion (PiCCO Monitoring Kit PV8215, Pulsion Medical Systems AG, München, GER) als auch im Blut in der Aorta ascendens (T_B) über einen geeigneten Katheter (PULSIOCATH arterieller Thermodilutionskatheter PV2015L20, Pulsion Medical Systems AG, München, GER) gemessen. Aus der über diesen Katheter registrierten Temperaturänderung über die Zeit ergab sich die Thermodilutionskurve. Zeitgleich erfolgte jeweils die Sicherung der Daten auf einem handelsüblichen Computer mit der Software PiCCO VoLEF Data Acquisition for Win32, Version 4.0 (PULSION Medical Systems AG, München, GER). Um eine möglichst hohe Reliabilität der Messungen zu erzielen, wurden vor Beginn der Versuche jeweils zwei aufeinanderfolgende Thermodilutionen durchgeführt und auf Abweichungen geprüft.

Über eine parallel laufende kontinuierliche Pulskonturanalyse konnten des weiteren Daten zum aktuellen Schlagvolumen (SV) und dem systemischen vaskulären Widerstand (SVR) erhoben werden. Weiterhin war es so möglich das HZV zu den Zeitpunkten NV40 bzw. NV45 (vgl. 2.5) ohne erneute Thermodilution zu bestimmen. Während des hämorrhagischen Schocks war dies nicht möglich.

Aufgrund der höheren Genauigkeit der Ergebnisse wurde zur Auswertung ansonsten primär das Ergebnis der halbstündlich durchgeführten Thermodilution herangezogen [53].

Der Vorteil dieser Messmethode, verglichen mit dem Einsatz eines Pulmonalkatheters, liegt zum einen in der - nach der einmaligen Operation - geringeren Invasivität der Untersuchung und zum anderen in der durch die Dauer der Messung von etwa zwei Minuten bedingten fast gänzlichen Unabhängigkeit vom Atemzyklus des Tieres [54-56].

2.4.4 Körpertemperatur

Um den Einfluss der Körpertemperatur auf das Messergebnis so gering wie möglich zu halten, wurde diese möglichst konstant gehalten. Dazu wurde das Versuchslabor klimatisiert und eine Raumtemperatur von 24°C eingestellt. Diese Temperatur liegt bei Hunden im Indifferenzbereich [57]. Zusätzlich wurde über den Picco-Katheter (vgl. 2.4.3) kontinuierlich die zentrale Bluttemperatur gemessen. Ggf. wurde die Körpertemperatur des Versuchstieres durch Zudecken oder Gebrauch eines medizinischen Warmluftgebläses (500E BAIR HUGGER, AUGUSTINE MEDICAL, INC., Minnesota, USA) konstant gehalten. Die gemessene Körpertemperatur der Hunde lag somit während der Versuche bei $38 \pm 1^\circ\text{C}$.

2.4.5 Atem- und Narkosegaskonzentrationen

Es erfolgte die kontinuierliche Messung der Sauerstoff-, Kohlendioxid- und Sevoflurankonzentration im in- sowie expiratorischen Gasgemisch im Nebenstromprinzip (Capnomac Ultima, Datex Division of Instrumentarium Corp., Helsinki, FIN). Die Aufzeichnung erfolgte durch die Software Chart 4.2.

2.4.6 Neuromuskuläres Monitoring

Um Störungen der kontrollierten Beatmung und Artefakte während der Messungen reduzieren zu können, wurde die Muskelrelaxierung des Tieres (vgl. 2.5) durch die *train of four* (TOF) Methode geprüft (TOF Guard® INMT, Organon Teknika BV, Boxtel, NLD). Dazu wurde mit zwei Elektroden im Bereich des linken Hinterlaufes der N. ischiadicus vierfach mit einer Stromstärke von 15 mA bei einer Frequenz von 2 Hz stimuliert. Ein distal an der Pfote angebrachtes Akzelerometer registrierte den Effekt dieser Stimulation. Als Quotient aus der vierten Stimulation und der ersten Stimulation ergibt sich die so genannte TOF-ratio (TOFR). Bei einer TOFR = 0.0 kann von einer vollständigen Relaxierung ausgegangen werden, während bei einem TOFR > 0.9 von einer ausreichenden neuromuskulären Erholung gesprochen werden kann [58]. Vor Beginn der

Relaxantiengabe wurde zur Kontrolle jeweils ein TOFR von 1.0 erreicht, danach jeweils ein TOFR von 0.0. Des Weiteren konnte durch diese Methode das Risiko eines Relaxantienüberhanges am Versuchsende verhindert werden [59, 60]. Von einer vollständigen Erholung wurde bei einem TOFR = 1.0 ausgegangen.

2.4.7 Blutgasanalyse, Elektrolyt- und Hämatokritwertbestimmung

Die 30-minütig mit einer heparinisierten Spritze (PICO 50, Radiometer, Kopenhagen) gewonnenen arteriellen Blutproben wurden nach Entnahme in Kapillaren (heparinisiert, Länge 75 mm, Durchmesser 1,15 mm, Brand GmbH, Wertheim, GER) 4 min zentrifugiert (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, GER; 4 min bei 13.000 Umdrehungen/min nach DIN 58933-1) und der Hämatokritwert bestimmt.

Die Elektrolytkonzentrationen (Kalium, Natrium, Calcium, Chlorid), die Hämoglobin-, Glucose- und Laktatkonzentrationen, die Oxyhämoglobinfraktion (FHbO₂), der Sauerstoff- (pO₂) und Kohlenstoffdioxidpartialdruck (pCO₂), der pH-Wert und der *base excess* wurden mittels eines Blutgasanalysegerätes (ABL 715, Radiometer Medial ApS, Bronshøj, DK) jeweils direkt nach Abnahme der jeweiligen Probe bestimmt.

Nach der an Hunde angepassten Hill-Formel wurde die arterielle Sauerstoffsättigung in Prozent bestimmt (S_{artO₂}) [61].

Durch Addition des am Hämoglobin gebundenen Sauerstoff mit dem physikalisch im Blut gelösten Sauerstoff lässt sich der arterielle Sauerstoffgehalt (CaO₂) berechnen [62]. Durch Einbeziehen des HZV in die Berechnung kann auf das systemische Sauerstoffangebot (DO₂) geschlossen werden ($DO_2 = \frac{CaO_2}{100} * HZV$).

2.4.8 Monitoring der Mikrozirkulation

2.4.8.1 Reflektionsspektrofotometrie (O2C) der gastralen und oralen Mukosa

Zur kontinuierlichen Messung der regionalen Mikrozirkulation wurden Messsonden an der gastralen und oralen Mukosa platziert und die Signale mit einem Reflektionsspektrofotometer (O2C Typ LW2222 Version 2, LEA Medizintechnik GmbH, Gießen, GER) registriert. Während der Messungen erfolgte eine durchgehende Darstellung der Signale auf dem integrierten Monitor des Gerätes zur Lagekontrolle der Sonden. Da Gefäße mit einem Durchmesser größer $100\mu\text{m}$, welche nicht mehr zur Mikrozirkulation gezählt werden [4], das emittierte Licht komplett absorbieren, werden diese nicht in der Messung erfasst [63]. Jede Sonde emittiert und registriert jeweils Weißlicht (450 – 1000nm aus einer 20-W-Xenon Glühbirne) sowie Licht eines Dioden-Lasers (CW-Modus, 820nm, 30mW) [64]. Die Messtiefe hängt dabei entscheidend vom Abstand zwischen emittierendem und detektierendem Teil der Sonde ab [65]. Durch die sich je nach O_2 -Sättigungsgrad verändernden speziellen Absorptionseigenschaften von Hämoglobin lässt sich mit Hilfe der bekannten Spektren [66] und des registrierten aus dem Gewebe reflektierten Weißlichtanteils auf die Sättigung des Hämoglobins (μHbO_2 , angegeben in Prozent) im untersuchten Gewebe schließen. Hierbei handelt es sich vorrangig um Blut im gemischt-venösen-System [64]. Durch die Bestimmung des Anteils des Weißlichts, welcher der Absorption durch roten Blutfarbstoff unterlag, lässt sich auf die im Messbereich vorhandene Hämoglobinmenge (rHb) schließen [64]. Die vom Gerät ausgegebene Einheit sind *arbitrary units* (aU), diese Größe ist dimensionslos.

Die Geschwindigkeit (*velocity*) der sich im Gewebe befindlichen Erythrozyten und damit des Blutes wird über die Frequenzverschiebung (Doppler-Shift) des ausgestrahlten und nach Reflektion detektierten Laserlichts ermittelt [67]. Aus dem Verhältnis des frequenzverschobenen Laserlichts zum Anteil des nicht verschobenen und detektierten Laserlichts lässt sich auf die Anzahl der bewegten Teilchen schließen. Daraus wiederum lässt sich der Blutfluss (*μflow*) als Summe aller auftretenden Geschwindigkeiten multipliziert mit der jeweiligen

Teilchenanzahl errechnen [64]. Die Einheit sind *arbitrary units* (aU). Alle Messungen fanden aufgrund der geringen Invasivität unter nahezu physiologischen Bedingungen statt.

2.4.8.2 Videomikroskopie der oralen Mukosa

Die orale Mikrozirkulation wurde zusätzlich intermittierend mittels Videomikroskopie untersucht. Die Kamera (CytoCam, Braedius Medical, Huizen, NLD) arbeitet nach dem Prinzip der „*incident dark field illumination*“ (IDF) [68]. Dabei wird aus zirkulär um das Objektiv angebrachten Dioden Licht der Wellenlänge 530nm emittiert, diese Wellenlänge entspricht einem isosbestischen Punkt von (Oxy-/Desoxy-) Hämoglobin und wird somit unabhängig vom Sättigungsgrad des Hämoglobins resorbiert [66, 69]. Daraus ergibt sich eine dunkle Darstellung der Erythrozyten auf hellem Grund (Abb. 1). Artefakten in den Aufzeichnungen durch die Bewegung des Blutes wird durch ein zur Einzelaufnahme synchrones Ein- und Ausschalten der Dioden vorgebeugt [69]. Es wurden zu jedem Zeitpunkt drei Videos mit je 101 Frames über 4 Sekunden aufgezeichnet. Beim Aufsetzen der Kamera auf die Schleimhaut wurden durch leichtes Zurückziehen und erneutes Aufsetzen auf die Schleimhaut Kompressionsartefakte minimiert [69]. Als Indikator für Kompressionsartefakte wurde ein diskontinuierlicher Fluss in größeren venösen Gefäßen ($> 30\mu\text{m}$) gewertet [70], so dass nur Aufnahmen ohne Kompressionsartefakte angefertigt bzw. ausgewertet wurden. Die Auswertung (Abb. 2) erfolgte mittels geeigneter Software (CytoCam Tools 1.7.8, Braedius Medical, Huizen, NLD) auf einem handelsüblichen PC (Betriebssystem: Microsoft Windows 7[®], Microsoft Corporation, Redmond, USA). Diese Software wurde in verschiedenen Studien evaluiert [71, 72]. Videos minderer Qualität (betreffend Fokussierung, Helligkeitseinstellung und Stabilisierung der Aufnahme) wurden nicht verwendet [70]. Die Auswertung der Videos erfolgte verblindet. Die Software bestimmt die absolute Gefäßdichte (*total vessel density* TVD [mm/mm^2]) als Maß für die kapilläre Dichte, den Anteil der durchbluteten Gefäße (*proportion of perfused vessels* (PPV [%]), die funktionelle kapilläre Dichte (FCD) (*perfused vessel density* (PVD [mm/mm^2]),

sowie die Flussqualität (*microcirculatory flow index* (MFI)) [24, 70, 73]. In die Auswertung wurden nur Gefäße mit einem Querschnitt kleiner als $20\mu\text{m}$ einbezogen.

Neben der automatisierten Auswertung durch die Software wurde der MFI auch manuell bestimmt. Dazu wurden die Aufnahmen zunächst wie in der Literatur [70, 73] beschrieben in 4 Quadranten eingeteilt (Abb. 1). Anschließend wurde für jeden Quadranten die Flussqualität bestimmt und mit Hilfe einer Ordinalskala von 0 bis 3 bewertet. Dabei galt: 0 = kein Fluss, 1 = intermittierender Fluss, 2 = träger Fluss sowie 3 = normaler Fluss.

Anschließend wurde für jede Aufnahme der Mittelwert aus den vier Quadranten gebildet. Diese Analyse folgt den Empfehlungen der internationalen Konsensuskonferenz zur Analyse der Mikrozirkulation mittels intravitale Videomikroskopie [70]. Trotz der primär subjektiven Einschätzung der Flussqualität konnte in Studien eine hohe Replizierbarkeit der Ergebnisse gezeigt werden [73]. Diese Replizierbarkeit stellte sich sowohl zwischen verschiedenen Untersuchern, als auch bei wiederholter Beurteilung durch den gleichen Untersucher dar.

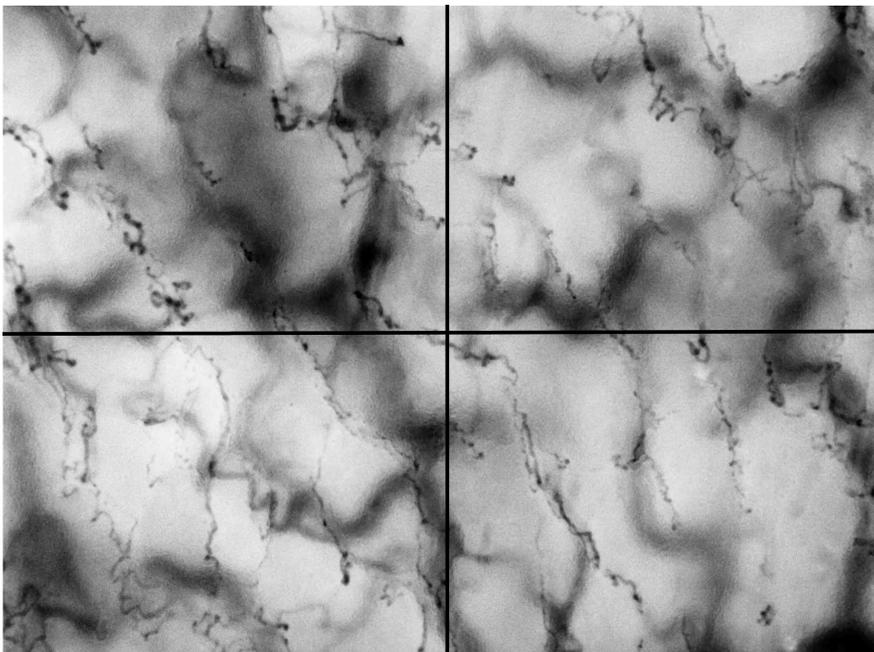


Abb. 1: CytoCam-Aufnahme der oralen Mukosa mit Einteilung in vier Quadranten, aufgenommen ist ein Sichtfeld von $1,55 \times 1,16 \text{ mm}$ mit einer 4-fachen optischen Vergrößerung

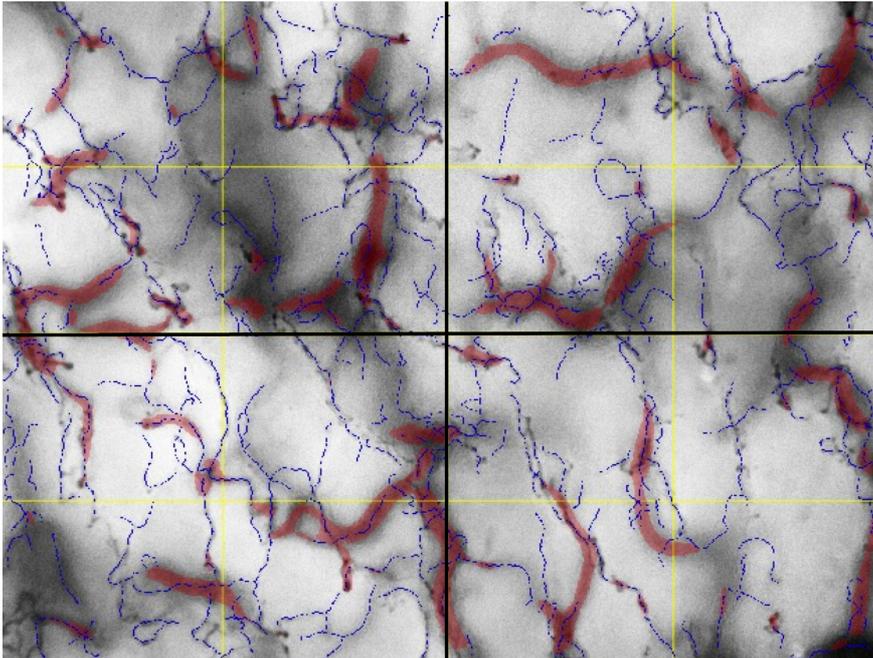


Abb. 2: CytoCam-Aufnahme der oralen Mukosa nach Analyse durch die Analyse-Software (CytoCam Tools 1.7.8, Braedius Medical) mit Einteilung in vier Quadranten, aufgenommen ist ein Sichtfeld von 1,55 x 1,16 mm mit einer 4-fachen optischen Vergrößerung

2.4.9 Messung der Barrierefunktion

Um die Transport- und Barrierefunktion der intestinalen Mukosa zu beurteilen, wurde den Tieren aller Versuchsgruppen über eine Magensonde eine Lösung (in 1ml/kg KG isotonischer Kochsalzlösung) verschiedener Mono- und Disaccharide verabreicht [74-76]. Das Gemisch enthielt Xylose (66,7 mg/kg KG; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER), Laktulose (16,7 mg/kg KG; Bifiteral®, Abbott Arzneimittel GmbH, Hannover, GER), Mannitol (6,7 mg/kg KG; 15% Lösung; SERAG-WIESSNER GmbH & Co. KG, Naila, GER) und Rhamnose (6,7 mg/kg KG; Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, GER). Da bei gestörter Barriere der Übertritt von Xylose mit dem Übertritt von Endotoxinen aus dem GI-Trakt ins Blut korreliert [74, 77], lässt sich durch eine Bestimmung des Xylosegehaltes im Blutplasma auf die Barrierefunktion der intestinalen Mukosa schließen.

Xylose lässt dabei weiterhin als kleines, passiv über die Membran resorbiertes Molekül Rückschlüsse auf die Absorptionsfläche des Dünndarms zu [76, 78-80]. Im hämorrhagischen Schock überwiegt der permeabilitätsbedingte

Übertritt, somit stellt unter diesen Bedingungen Xylose einen Indikator der gestörten Barrierefunktion dar [81].

Durch die Bestimmung dieser Mono- und Disaccharide im Blut sollten die Auswirkungen der Hypovolämie und der Losartangabe unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen auf die (Barriere-)Funktion der intestinalen Mukosa untersucht werden. Die Applikation bei den anderen Gruppen erfolgte zur Kontrolle. Zur späteren Analyse wurden deshalb zu definierten Zeitpunkten (vgl. 2.5) Blutproben in EDTA-Röhrchen (BD Vacutainer® Trace Element K2 EDTA (K2E) Plus Blood Collection Tubes 10.8mg, BD, Plymouth, UK) entnommen und dann umgehend zentrifugiert (15 min., 3000 rcf, 0° C.; Rotina 420R, Hettich Zentrifugen, Mühlheim a. d. Ruhr, GER). Die Proben wurden während der kompletten Verarbeitung auf Eis gelagert.

2.4.9.1 Extraktion

Um die Translokation der Zucker von endoluminal ins Blut zu bestimmen, wurde deren Konzentration im Blutplasma bestimmt. Hierfür wurden 30µl Blutplasma zunächst mit 400µl einer Extraktionslösung versetzt. Dabei bestand die Extraktionslösung aus Aceton, Isopropanol und einer 20 mM Ribitollösung im Verhältnis von 2000:1000:3. Anschließend wurde die Lösung homogenisiert (10s mit Vortex-Genie 1 Touch Mixer; Scientific Industries, INC; Bohemia, USA) und für 5 min bei 4° Celsius geschüttelt. Nach Zentrifugation (2 min, 20800 rcf, 0° Celsius, Centrifuge 5417R; Eppendorf; Hamburg, GER) wurde der flüssige Überstand in neue Reaktionsgefäße verbracht, welche jeweils eine Minute mit einem sanftem Strom Stickstoff begast und anschließend bei -80° Celsius in Dunkelheit gelagert wurden. [82]

2.4.9.2 Derivatisierung, Gaschromatographie und Massenspektrometrie

Die Derivatisierung sowie die Auswertung mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie erfolgte in einem externen Labor wie von Fiehn und Kind [82] beschrieben.

2.4.10 Natriumchlorid- und Losartanapplikation

Während der Versuche wurde verblindet und in randomisierter Reihenfolge jeweils oral und gastral entweder 30 mg Losartan (Losartan Potassium, Santa Cruz Biotechnology®, inc., Dallas, USA) gelöst in NaCl-Lösung (Isotonische Kochsalzlösung, FRESENIUS KABI Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., GER) oder reine NaCl-Lösung als Kontrolle appliziert. Um keinen differenten Einfluss mechanischer Reize auf die Mikrozirkulation zu erzeugen, wurde je Ort und Versuch eine Substanzmenge von einem Milliliter gewählt. Oral erfolgte die Darreichung durch einen Schlauch (Silastic®, Dow Corning Corporation Medical Products, Michigan, USA; 0,058 inch Innendurchmesser, 0,077 inch Außendurchmesser). Dieser wurde zirkulär um die oral platzierte Sonde (vgl. 2.4.8.1) befestigt. Gastral erfolgte die Darreichung hingegen durch einen an dem Magenschlauch, welcher die Mikrosonde führte (vgl. 2.4.8.1), befestigten Katheter (Durchmesser 1,3mm, Länge 80cm, Perifix®-Katheter, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, GER.). Hierdurch erfolgte die Applikation am Messort der O2C-Sonde.

2.4.11 Hypovolämie

Zur Induktion der Hypovolämie wurde durch einen Aderlass von 20 % des angenommenen Blutvolumens des Tieres eine Hypovolämie für 60 Minuten induziert. Bei diesem Volumen ist davon auszugehen, dass die Tiere keinen Folgeschaden erleiden [83]. Das Blutvolumen der Tiere wurde zwischen den Versuchen durch gleichbleibendes KG (vgl. 2.2) konstant gehalten. Nach Literaturangaben ist mit einem Blutvolumen von bis zu 80ml/kg KG zu kalkulieren [84], demnach wurden jeweils 16 ml/kg KG entzogen. Die Hypovolämie wurde über einen Zeitraum von maximal 10 min über die Venenverweilkanüle im linken Vorderlauf sowie über den arteriellen Katheter (vgl. 2.4.2) induziert. Das Blut wurde bis zur Retransfusion in mit Heparin (10 I.E. Heparin/ml Blut) vorgefüllten Spritzen (Original Perfusor® Syringe 50ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER) bei 37 °C gelagert. Nach 60 min erfolgte die Retransfusion des Blutes. Das verwendete Heparin wurde

anschließend mit Protamin (Protamin ME 1000 I.E./ml; MEDA Pharma GmbH & Co. KG, Bad Homburg, GER) in entsprechender Dosis antagonisiert.

2.5 Versuchsprotokoll

Wie in Kapitel 2.2 beschrieben, begannen die Versuche jeweils zur gleichen Tageszeit. Zur zusätzlichen Stressreduktion war das Labor lärmgedämmt und die Beleuchtung gedimmt. Nachdem der Hund auf dem Versuchstisch in Rechtsseitenlage gebracht worden war, folgte die Anlage einer Venenverweilkanüle (Vasofix® Safety, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, GER, 18 Gauge) in die linke Vena saphena lateralis. Anschließend wurde die Narkose mittels intravenöser Injektion von Propofol (4 mg/kg KG, Propofol 1% MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, GER) eingeleitet. Nach endotrachealer Intubation (Lo Contourt™ Murphy 9.0, Mallinckrodt Medical, Athlone, IRL) unter laryngoskopischer Kontrolle erfolgte die Aufrechterhaltung der Narkose mittels volatilem Anästhetikum (Sevorane, Abbott GmbH + Co. KG, Wiesbaden, GER). Der Augenschutz wurde durch Auftragen einer Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen, GER) und Schließen der Augen gewährleistet. Die kontrollierte maschinelle Beatmung (Aevista/5, Datex Ohmeda GmbH, Duisburg, GER) erfolgte mit einem für Hunde üblichem [85], jeweils festgelegtem Atemzugvolumen (AZV) (12,5 ml/kg KG). Der inspiratorische Sauerstoffgehalt (30 Volumenprozent) sowie die endexpiratorische Narkosegaskonzentration (3,0 Volumenprozent; 1,5 MAC bei Hunden [86]) wurde während des Versuches konstant gehalten. Der endtidale Kohlenstoffdioxidpartialdruck wurde atemfrequenzgesteuert bei 35 mmHg konstant gehalten. Zusätzlich wurden EKG-Elektroden (vgl. 2.4.1), Relaxometer (vgl. 2.4.6) sowie eine weitere Venenverweilkanüle für die späteren Thermodilutionen (vgl. 2.4.3) angelegt. Der in der Aorta ascendens zu platzierende Katheter (vgl. 2.4.2) wurde nach Punktion der A. carotis (vgl. 2.3) mittels Seldinger-Technik unter EKG-Kontrolle eingebracht und zum Blutdruckmonitoring an einen Druckaufnehmer (vgl. 2.4.2) angeschlossen (Polyethylen

Verlängerungskatheter, Laboratoires Pharmaceutiques VYGON, FR). Es erfolgte die vollständige Relaxierung durch intravenöse Injektion von 0,6 mg/kg KG Rocuroniumbromid (Esmeron®, N. V. Organon, NLD). Die Erhaltungsdosis von 1mg/kg KG/h wurde während des Versuchs durch eine automatische Spritzenpumpe (PILOT Anästhesie, Fresenius Vial S.A., Brezins, FR) appliziert. Unter laryngoskopischer Kontrolle wurden der Magenschlauch (Stomach tube, CH 18, Länge 80cm, P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, GER) für die Mikrosonde (vgl. 2.4.8.1) sowie eine weitere Magensonde (Stomach tube, CH 14, Länge 80cm, P.J. Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, GER) zur Injektion der gelösten Saccharide während der Versuche eingeführt. Anschließend wurde eine Flachsonde unter die linke Lefze des Hundes gelegt und dabei eine Gewebskompression weitgehend vermieden. Nach Stabilisierung aller aufgezeichneten Werte (insbesondere des Atemgasgemischs, des Blutdrucks, der Herzfrequenz und des O₂C-Signals) folgten die zwei initialen Thermodilutionen (Abb. 3: „TD“), eine arterielle Blutgasanalyse (BGA) sowie Messungen mittels Videomikroskopie (vgl. 2.4.8.2; Abb. 3: „V“). Diese Messungen und eine Entnahme von 4 ml-EDTA-Blut (Abb. 3: „BE“) wurden alle 30 Minuten, also vor jeder Intervention, wiederholt. Nach 30-minütiger „baseline“-Aufzeichnung (Abb. 3: C0 bis C30) ohne jegliche Manipulationen erfolgte die Applikation der Zuckerlösung (entsprechend „Saccharidgabe“ von C30 bis C60 in Abb. 3, vgl. 2.4.9) über die Magensonde, gefolgt von der Aufteilung in die vier randomisierten Gruppen, wobei jedes Tier jede Gruppe einmal durchlief und so später als eigene Kontrolle dienen konnte. Zusätzliche Messungen mittels Videomikroskopie wurden jeweils 10 min nach Substanzapplikation angefertigt (Abb. 3: V13-15).

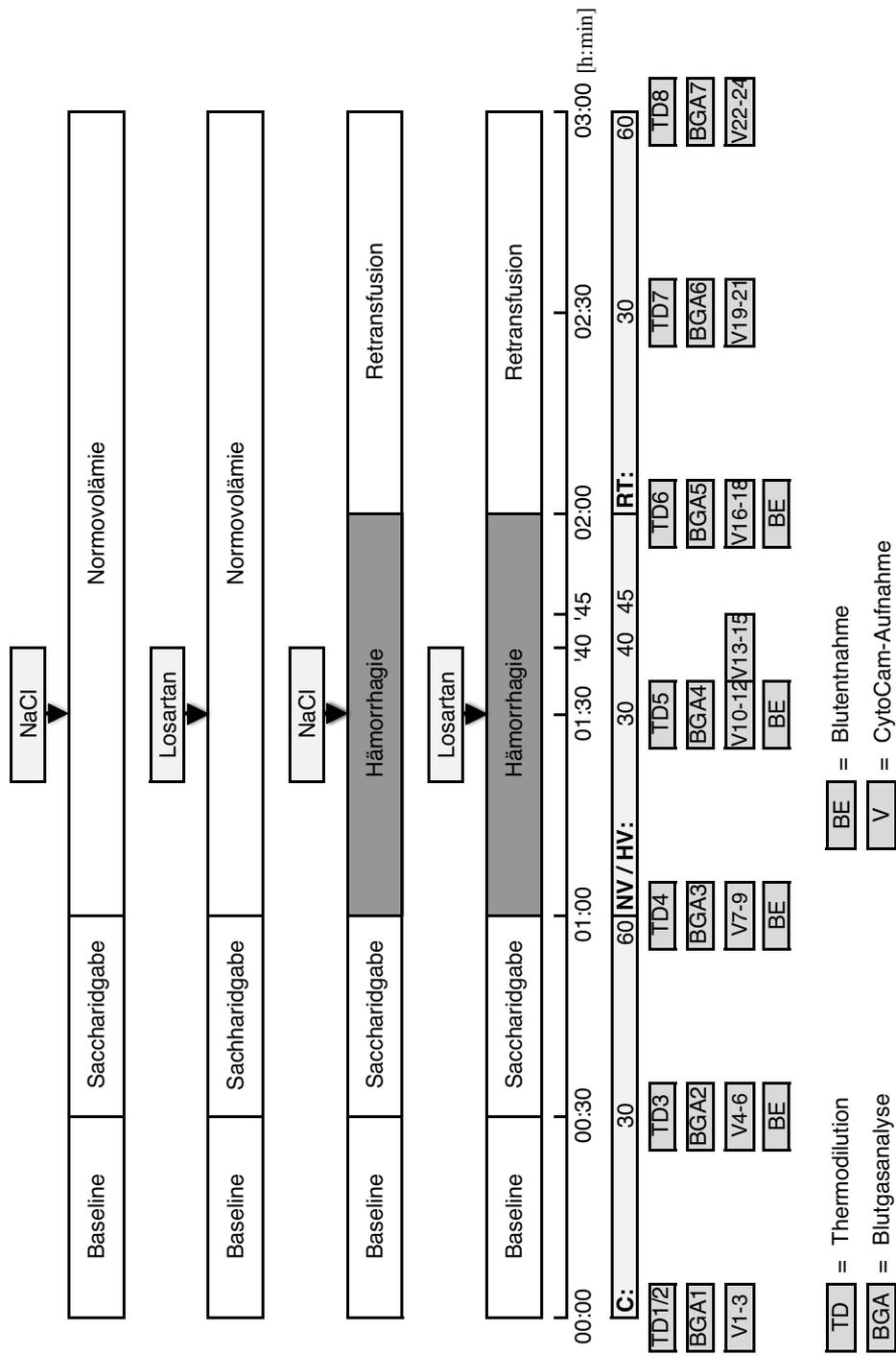


Abb. 3: Versuchsprotokoll im Zeitverlauf, Interventionen und Einteilung in die Versuchsgruppen; Messzeitpunkte: C= Kontrollzeitpunkte, NV= Normovolämie, HV= Hypovolämie, RT= Retransfusion

2.6 Versuchsgruppen

2.6.1 Losartan-Applikation unter physiologischen Kreislaufbedingungen

Um die Effekte von Losartan unter physiologischen Kreislaufbedingungen zu untersuchen, erhielten die Tiere zum Zeitpunkt NV30 oral und gastral jeweils 30 mg Losartan. Die Untersucher waren bezüglich der applizierten Substanz verblindet. Im Vordergrund stand in dieser Gruppe die Beobachtung der Wirkungen einer lokalen Losartan-Gabe auf die Mikrozirkulation und die intestinale Barrierefunktion unter physiologischen Kreislaufbedingungen.

2.6.2 NaCl-Applikation unter physiologischen Kreislaufbedingungen

Als Kontrollgruppe erhielten die Tiere analog zum Zeitpunkt der Losartanapplikation das reine Vehikel (isotonische NaCl-Lösung).

2.6.3 Losartan-Applikation unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen

Um den Effekt von Losartan unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen zu untersuchen, wurde zunächst ein hämorrhagischer Schock induziert (s.o.). Anschließend erhielten die Tiere zum Zeitpunkt HV30 oral und gastral jeweils 30 mg Losartan. Die Untersucher waren bezüglich der applizierten Substanz verblindet. Nach 60 min Hypovolämie erfolgte die Retransfusion des Blutes. Im Vordergrund stand in dieser Gruppe die Beobachtung der Wirkungen einer lokalen Losartan-Gabe auf die Mikrozirkulation und die intestinale Barrierefunktion unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen.

2.6.4 NaCl-Applikation unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen

Als Kontrollgruppe erhielten die Tiere analog zum Zeitpunkt der Losartanapplikation, nach Induktion der Hypovolämie, das reine Vehikel (isotonische NaCl-Lösung). Anschließend erfolgte die Retransfusion des Blutes.

2.7 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte \pm Standardfehler (SEM) angegeben. Sie wurden verglichen mittels Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA – *analysis of variance for repeated measurements*) gefolgt von einem Bonferroni *post-hoc* Test für multiple Vergleiche (GraphPad Prism 6.0f for Windows, GraphPad Software, La Jolla California, USA). Das Signifikanzniveau wurde auf 95% (entsprechend $p < 0,05$) festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Einfluss lokaler Losartan-Applikation auf die Mikrozirkulation an der oralen und gastralen Mukosa unter physiologischen Kreislaufbedingungen

Unter physiologischen Kreislaufbedingungen erhöht Losartan den Blutfluss (*μflow*) in der gastralen Mukosa vorübergehend von $108 \text{ aU} \pm 3$ auf 147 ± 17 aU nach 10 min und auf 134 ± 10 aU nach 15 min, während er nach NaCl-Applikation unverändert bleibt (97 ± 7 vs. 98 ± 9 aU nach 15 min) (Abb. 4). Nach 30 min ist dieser Effekt nicht mehr nachweisbar (128 ± 14 aU nach Losartangabe vs. 99 ± 10 aU in der Kontrollgruppe) und unterscheidet sich im weiteren Verlauf nicht zwischen den Gruppen. (Tabelle 1, Abb. 4)

Gleichzeitig ist die gastral gemessene Geschwindigkeit der Bluteilchen (*velocity*) nach Losartangabe im Vergleich zur NaCl-Gabe erhöht. Dies betrifft die Zeitpunkte 10 min (19 ± 1 vs. 15 ± 0 aU), 15 min (18 ± 1 vs. 15 ± 0 aU), sowie 60 min (18 ± 0 vs. 15 ± 1 aU) nach der Applikation. Anschließend sind keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu erkennen (Tabelle 1, Abb. 5).

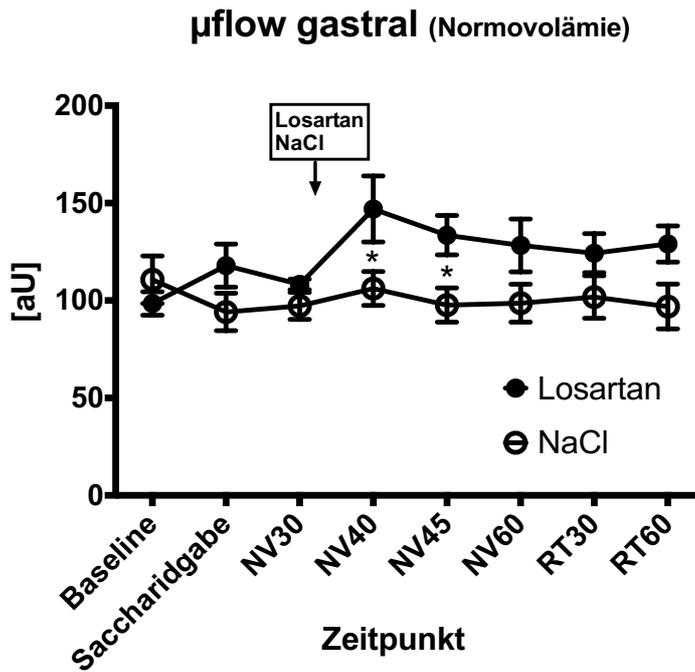


Abb. 4: Der gastrale Blutfluss unter physiologischen Kreislaufbedingungen (NV) mit anschließend zur Retransfusion (RT) äquivalentem Beobachtungszeitraum ist im Zeitverlauf aufgetragen. Die Messzeitpunkte sind vor (NV30) bzw. 10 (NV40), 15 (NV45) und 30 min (NV60) nach Losartan- oder NaCl-Applikation, jeweils als MW ± SEM für n = 6 Hunde dargestellt; * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe

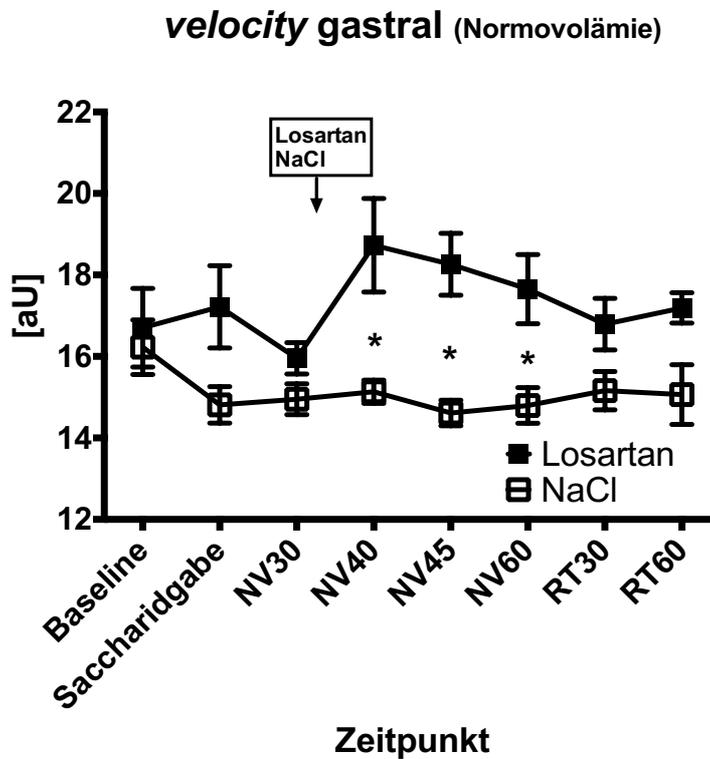


Abb. 5: Die *velocity* unter physiologischen Kreislaufbedingungen (NV) mit anschließend zur Retransfusion (RT) äquivalentem Beobachtungszeitraum ist im Zeitverlauf aufgetragen. Die Messzeitpunkte sind vor (NV30) bzw. 10 (NV40), 15 (NV45) und 30 min (NV60) nach Losartan- oder NaCl-Applikation, jeweils als MW ± SEM für n = 6 Hunde dargestellt; * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe

Die Steigerung des gastralen $\mu flow$ und der $velocity$ hatten keinen Einfluss auf die gastrale Sauerstoffsättigung (μHbO_2), die weder im Vergleich zum Ausgangswert (81 ± 2 vs. 83 ± 2 % 10 min nach Losartangabe), noch im Vergleich zur Kontrollgruppe (83 ± 2 vs. 81 ± 3 % nach 10 min in der Kontrollgruppe) wesentliche Differenzen aufwies. Auch im weiteren Verlauf der Experimente zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. (Tabelle 1)

An der oralen Mukosa zeigt sich nach Losartanapplikation kein Effekt auf den Blutfluss (von 162 ± 27 auf 164 ± 24 aU), die Geschwindigkeit (von 28 ± 5 auf 29 ± 5 aU) oder μHbO_2 (von 85 ± 1 auf 82 ± 1 %) der Blutteilchen (Tabelle 1). Auch im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigen die genannten Parameter keine Unterschiede.

Die Messung des rHb ergab (oral und gastral) keine relevanten Differenzen zwischen den Versuchsgruppen.

Tabelle 1: Ergebnisse der O2C-Messungen in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte

Parameter [hh:mm]	Gruppe	Baseline 00:30	Saccharid. 1:00	HV / NV 30 01:30	HV / NV 40 01:40	HV / NV 45 01:45	HV / NV 60 02:00	RT 30 02:30	RT 60 03:00
μ HbO2 oral [%]	NaCl	83 ± 2	84 ± 1	83 ± 1	82 ± 1	78 ± 1	82 ± 2	85 ± 1	84 ± 2
	Losartan	86 ± 2	85 ± 1	85 ± 1	82 ± 1	82 ± 1	84 ± 1	86 ± 1	87 ± 1
	NaCl - H	83 ± 2	83 ± 3	44# ± 3	46# ± 3	44# ± 4	51# ± 4	86 ± 3	93# ± 1
	Losartan - H	87 ± 1	85 ± 2	48# ± 6	46# ± 6	44# ± 4	53# ± 2	88 ± 3	95# ± 1
μ HbO2 gastral [%]	NaCl	81 ± 2	81 ± 2	81 ± 2	81 ± 3	81 ± 2	80 ± 3	81 ± 3	81 ± 3
	Losartan	81 ± 2	82 ± 1	81 ± 2	83 ± 2	81 ± 4	84 ± 1	82 ± 1	85 ± 2
	NaCl - H	83 ± 2	82 ± 2	52# ± 2	57# ± 6	55# ± 5	59# ± 4	81 ± 2	85 ± 2
	Losartan - H	80 ± 2	81 ± 3	48# ± 6	56# ± 7	54# ± 6	59# ± 7	79 ± 2	83 ± 1
μ flow oral [aU]	NaCl	190 ± 41	194 ± 41	198 ± 41	205 ± 39	182 ± 37	209 ± 42	215 ± 40	229# ± 34
	Losartan	159 ± 29	156 ± 27	162 ± 27	164 ± 24	136# ± 17	172 ± 24	175 ± 23	181 ± 23
	NaCl - H	167 ± 28	163 ± 31	89# ± 29	99# ± 33	92# ± 29	114# ± 34	215# ± 50	299# ± 47
	Losartan - H	179 ± 26	172 ± 26	70# ± 21	80# ± 21	70# ± 22	89# ± 20	226# ± 22	272# ± 20
μ flow gastral [aU]	NaCl	111 ± 12	94 ± 10	97 ± 7	106 ± 9	98 ± 9	99 ± 10	102 ± 11	97 ± 12
	Losartan	99 ± 6	118 ± 11	108 ± 3	147*# ± 17	134*# ± 10	128* ± 14	124 ± 10	129 ± 9
	NaCl - H	120 ± 14	123 ± 12	87 ± 17	95 ± 16	91 ± 15	98 ± 15	130 ± 16	141 ± 16
	Losartan - H	120 ± 10	137 ± 10	105 ± 12	125 ± 9	123 ± 9	131 ± 11	146 ± 16	150 ± 15
velocity oral [aU]	NaCl	28 ± 4	30 ± 5	30 ± 5	23 ± 2	28 ± 6	29 ± 5	30 ± 7	32 ± 6
	Losartan	31 ± 3	30 ± 6	28 ± 5	29 ± 5	22 ± 3	23 ± 3	25 ± 2	30 ± 6
	NaCl - H	29 ± 4	27 ± 4	20# ± 4	21 ± 4	18# ± 2	19 ± 3	28 ± 3	41# ± 4
	Losartan - H	29 ± 4	31 ± 3	19# ± 3	19# ± 3	15# ± 1	16# ± 1	33 ± 4	37 ± 3
velocity gastral [aU]	NaCl	16 ± 1	15 ± 0	15 ± 0	15 ± 0	15 ± 0	15 ± 0	15 ± 0	15 ± 1
	Losartan	17 ± 1	17 ± 1	16 ± 0	19* ± 1	18* ± 1	18* ± 1	17 ± 1	17 ± 0
	NaCl - H	17 ± 1	16 ± 1	14# ± 1	14# ± 1	14# ± 1	15 ± 1	17 ± 1	19 ± 2
	Losartan - H	16 ± 1	17 ± 1	15 ± 1	17 ± 1	16 ± 1	17 ± 1	18 ± 1	19 ± 1
rHb oral [aU]	NaCl	94 ± 2	91 ± 3	93 ± 1	90 ± 2	87 ± 2	88 ± 2	90 ± 3	91 ± 2
	Losartan	94 ± 2	95 ± 2	91 ± 3	89 ± 2	85# ± 2	86# ± 3	91 ± 3	93 ± 2
	NaCl - H	93 ± 2	90 ± 2	60# ± 1	63# ± 2	63# ± 1	64# ± 2	86# ± 3	95 ± 2
	Losartan - H	97 ± 3	95 ± 2	66# ± 4	61# ± 4	65# ± 4	68# ± 4	89# ± 3	99 ± 1
rHb gastral [aU]	NaCl	63 ± 1	60 ± 2	60 ± 3	60 ± 4	58 ± 2	58 ± 3	61 ± 3	62 ± 2
	Losartan	61 ± 3	59 ± 2	56 ± 2	61 ± 3	59 ± 3	59 ± 3	58 ± 2	58 ± 3
	NaCl - H	58 ± 2	58 ± 3	52 ± 1	52 ± 3	51 ± 3	52 ± 2	57 ± 3	58 ± 3
	Losartan - H	64 ± 3	65 ± 3	55# ± 1	56# ± 2	54# ± 2	55# ± 2	60 ± 5	61 ± 4

Legende: NaCl bzw. Losartan = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter physiologischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; NaCl-H bzw. Losartan-H = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; HV / NV = Hypo- bzw. Normovolämie je nach Gruppe mit Zeitangabe (30,40,60) in Minuten nach Aufteilung der Gruppen in Hypo- bzw. Normovolämie; MW ± SEM für n = 6 Hunde, * = signifikant zur jeweiligen Kontrollgruppe; # = signifikant zum jeweiligen Baseline-Wert

In den videomikroskopischen Messungen der oralen Mikrozirkulation konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen Losartan- und NaCl-Applikation festgestellt werden. Weder auf die Gefäßdicke (TVD) (13 ± 1 nach Losartanapplikation vs. 14 ± 1 mm/mm² in der Kontrollgruppe), noch auf die Dichte durchbluteter Gefäße (PVD) (10 ± 1 vs. 10 ± 1 mm/mm²) oder die Flussqualität (MFI(Software)) ($2,0 \pm 0,2$ vs. $1,8 \pm 0,2$) hatte die Losartan-Applikation einen Einfluss (jeweils nach 10 min). Auch die manuelle Auswertung des MFI (MFI (manuell)) ($2,8 \pm 0,1$ vs. $2,9 \pm 0$) zeigte keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 2).

Tabelle 2: Ergebnisse der CytoCam-Messungen in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte

Parameter [hh:mm]	Gruppe	Baseline 00:30	Saccharid. 1:00	HV/ NV 30 01:30	HV/ NV 40 01:40	HV/ NV 60 02:00	RT 30 02:30	RT 60 03:00
TVD [mm/mm ²]	NaCl	13 ± 1	13 ± 2	13 ± 1	14 ± 1	15 ± 1	14 ± 1	13 ± 1
	Losartan	15 ± 2	15 ± 1	14 ± 1	13 ± 1	13 ± 1	13 ± 0	13 ± 1
	NaCl - H	13 ± 1	13 ± 1	10# ± 1	10 ± 1	12 ± 1	14 ± 1	15 ± 1
	Losartan - H	15 ± 1	14 ± 0	11# ± 1	10# ± 1	10# ± 1	15 ± 1	14 ± 1
PVD [mm/mm ²]	NaCl	10 ± 2	11 ± 2	11 ± 1	10 ± 1	13 ± 1	11 ± 1	10 ± 1
	Losartan	12 ± 2	12 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	10 ± 1	9 ± 1	11 ± 1
	NaCl - H	10 ± 1	9 ± 1	6# ± 1	6 ± 1	8 ± 0	11 ± 1	12 ± 1
	Losartan - H	11 ± 1	11 ± 0	7# ± 2	7# ± 1	7# ± 1	12 ± 1	10 ± 1
PPV [%]	NaCl	70 ± 11	76 ± 9	85 ± 4	69 ± 8	84 ± 2	79 ± 5	72 ± 9
	Losartan	77 ± 7	79 ± 4	74 ± 6	76 ± 7	70 ± 7	72 ± 5	78 ± 7
	NaCl - H	73 ± 4	67 ± 7	57 ± 6	61 ± 9	69 ± 4	79 ± 4	85 ± 4
	Losartan - H	77 ± 5	78 ± 3	59 ± 13	65 ± 7	64 ± 7	80 ± 3	73 ± 7
MFI (Software)	NaCl	$1,9 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,3$	$2,4 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$2,3 \pm 0,1$	$2,1 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,3$
	Losartan	$2,1 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$	$2,0 \pm 0,2$	$2,0 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$1,9 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,2$
	NaCl - H	$1,9 \pm 0,1$	$1,8 \pm 0,2$	$1,4 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,2$	$1,8 \pm 0,2$	$2,2 \pm 0,1$	$2,4 \pm 0,2$
	Losartan - H	$2,1 \pm 0,2$	$2,1 \pm 0,1$	$1,5 \pm 0,4$	$1,7 \pm 0,2$	$1,6 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,1$	$1,9 \pm 0,2$
MFI (manuell)	NaCl	$2,9 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,0$	$2,9 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$
	Losartan	$2,9 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,1$	$2,8 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,0$
	NaCl - H	$2,9 \pm 0,0$	$2,9 \pm 0,1$	2# $\pm 0,2$	2# $\pm 0,2$	2# $\pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$
	Losartan - H	$2,9 \pm 0,0$	$2,8 \pm 0,0$	2# $\pm 0,0$	2# $\pm 0,0$	2# $\pm 0,1$	$2,9 \pm 0,1$	$2,9 \pm 0,0$

Legende: NaCl bzw. Losartan = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter physiologischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; NaCl-H bzw. Losartan-H = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; HV / NV = Hypo- bzw. Normovolämie je nach Gruppe mit Zeitangabe (30,40,60) in Minuten nach Aufteilung der Gruppen in Hypo- bzw. Normovolämie; MW \pm SEM für n = 6 Hunde, * = signifikant zur jeweiligen Kontrollgruppe; # = signifikant zum jeweiligen Baseline-Wert

Die lokale Losartanapplikation hatte keinen Einfluss auf systemische hämodynamische Parameter. So zeigten sich bezogen auf den MAP weder nach 10 min (62 ± 2 nach Losartanapplikation vs. 64 ± 3 mmHg in der Kontrollgruppe) noch im weiteren Verlauf Differenzen zwischen den Gruppen

der Losartan- bzw. NaCl-Applikation (Tabelle 3, Abb. 7). Auch mit Blick auf das HZV (77 ± 4 vs. 78 ± 4 ml/kg/min nach 30 min (HV60)) zeigten sich keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen (Tabelle 3, Abb. 8).

Tabelle 3: Kreislaufparameter in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte

Parameter [hh:mm]	Gruppe	Baseline 00:30	Saccharid. 1:00	HV/ NV 30 01:30	HV/ NV 60 02:00	RT 30 02:30	RT 60 03:00
DO2 [ml/kg/min]	NaCl	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1
	Losartan	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1	12 ± 1
	NaCl - H	13 ± 1	12 ± 1	7# ± 1	8# ± 1	12 ± 1	13 ± 1
	Losartan - H	12 ± 1	12 ± 1	6# ± 1	7# ± 1	12 ± 1	13 ± 2
SVR [mmHg·min/l]	NaCl	26 ± 2	27 ± 2	27 ± 2	27 ± 2	28 ± 2	28 ± 2
	Losartan	25 ± 3	27 ± 2	27 ± 2	27 ± 2	27 ± 3	27 ± 2
	NaCl - H	24 ± 2	26 ± 2	34# ± 4	37# ± 2	33# ± 3	25 ± 2
	Losartan - H	24 ± 2	26 ± 2	37# ± 2	37# ± 3	31# ± 2	26 ± 3
SV [ml]	NaCl	22 ± 2	21 ± 2	21 ± 2	21 ± 2	22 ± 2	22 ± 2
	Losartan	22 ± 2	21 ± 2	21 ± 2	21 ± 2	22 ± 2	22 ± 2
	NaCl - H	22 ± 2	22 ± 2	13# ± 1	13# ± 1	23 ± 3	26# ± 2
	Losartan - H	22 ± 2	21 ± 2	12# ± 1	13# ± 1	24 ± 2	25# ± 2

Parameter [hh:mm]	Gruppe	Baseline 00:30	Saccharid. 1:00	HV/ NV 30 01:30	HV/ NV 40 01:40	HV/ NV 45 01:45	HV/ NV 60 02:00	RT 30 02:30	RT 60 03:00
MAP [mmHg]	NaCl	62 ± 2	64 ± 2	64 ± 3	64 ± 3	65 ± 3	64 ± 2	65 ± 2	65# ± 3
	Losartan	60 ± 1	62 ± 2	62 ± 1	62 ± 2	63 ± 1	63 ± 2	63 ± 2	63 ± 3
	NaCl - H	59 ± 1	63# ± 2	48# ± 2	53# ± 2	53# ± 2	56# ± 2	74# ± 3	66# ± 2
	Losartan - H	57 ± 2	60 ± 2	48# ± 2	52# ± 2	54# ± 2	54 ± 2	73# ± 3	64# ± 1
Hf [1/min]	NaCl	117 ± 3	115 ± 3	114 ± 3	114 ± 3	114 ± 3	113 ± 3	112 ± 3	112 ± 4
	Losartan	113 ± 3	115 ± 3	113 ± 3	112 ± 3	113 ± 3	112 ± 3	112 ± 4	111 ± 4
	NaCl - H	114 ± 3	116 ± 3	114 ± 4	116 ± 4	117 ± 4	117 ± 4	103# ± 5	105# ± 5
	Losartan - H	113 ± 4	113 ± 3	113 ± 4	116 ± 4	117 ± 4	117 ± 4	103# ± 4	104# ± 4
HZV [ml/kg/min]	NaCl	80 ± 5	79 ± 5	78 ± 5	79 ± 5	78 ± 4	78 ± 4	78 ± 4	79 ± 5
	Losartan	79 ± 4	77 ± 4	76 ± 4	77 ± 4	77 ± 4	77 ± 4	77 ± 5	78 ± 4
	NaCl - H	81 ± 5	80 ± 4	49# ± 5			50# ± 2	76 ± 6	87 ± 4
	Losartan - H	79 ± 6	78 ± 5	43# ± 3			49# ± 3	79 ± 6	85 ± 7

Legende: NaCl bzw. Losartan = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter physiologischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; NaCl-H bzw. Losartan-H = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; HV / NV = Hypo- bzw. Normovolämie je nach Gruppe mit Zeitangabe (30,40,60) in Minuten nach Aufteilung der Gruppen in Hypo- bzw. Normovolämie; MW ± SEM für n = 6 Hunde, * = signifikant zur jeweiligen Kontrollgruppe; # = signifikant zum jeweiligen Baseline-Wert

Die lokale Applikation von Losartan hatte unter physiologischen Kreislaufbedingungen keinen Effekt auf die gemessenen Blutgase (pO₂, pCO₂, SAT in Tabelle 4), den pH-Wert, die Bikarbonat- und Laktatkonzentration, den Hämatokritwert oder die Hämoglobinkonzentration im Blut der Tiere (Tabelle 4).

3.2 Einfluss lokaler Losartan-Applikation auf die Mikrozirkulation an der oralen und gastral Mukosa unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen

Unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen zeigte sich eine leichte Reduktion des gastral μ flow ($p=0.12$), welche tendenziell durch Losartan aufgehoben wurde (125 ± 9 vs. 95 ± 16 aU in der Kontrollgruppe, $p=0.09$). Die gastrale *velocity* fiel unter Hypovolämie signifikant im Vergleich zur *baseline* ab (29 ± 4 vs. 20 ± 4 aU in der Kontrollgruppe), dieser Effekt wurde durch Losartanapplikation aufgehoben.

Die μ HbO₂ wurde an der gastral Mukosa (56 ± 7 nach Losartanapplikation vs. 57 ± 6 % in der Kontrollgruppe) ebenso wenig wie an der oralen Mukosa (46 ± 6 vs. 46 ± 3 %) durch die Losartanapplikation beeinflusst.

Es konnten an der oralen Mukosa außerdem keine Effekte der Losartanapplikation auf die *velocity* (19 ± 3 vs. 21 ± 4 aU) oder den *μ flow* (80 ± 21 vs. 99 ± 33 aU) beobachtet werden. (Tabelle 1)

Durch die Induktion der Hypovolämie fiel der *μ flow* nach Losartanapplikation an der oralen Mukosa von 179 ± 26 (Baseline) auf 80 ± 21 aU (HV 40) und in der Kontrollgruppe von 167 ± 28 auf 99 ± 33 aU ab (Tabelle 1).

In den Messungen des rHb (oral bzw. gastral) ergaben sich zwischen den Versuchsgruppen keine relevanten Unterschiede (Tabelle 1).

Die videomikroskopischen Untersuchungen an der oralen Mukosa konnten keinen Effekt der Losartan-Applikation zeigen (Tabelle 2). Die Hypovolämie (HV 30) resultierte (im Vergleich zur Baseline) in beiden Gruppen in einem gleichartigen Abfall von TVD, PVD und MFI (manuell) ohne Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. (Tabelle 2)

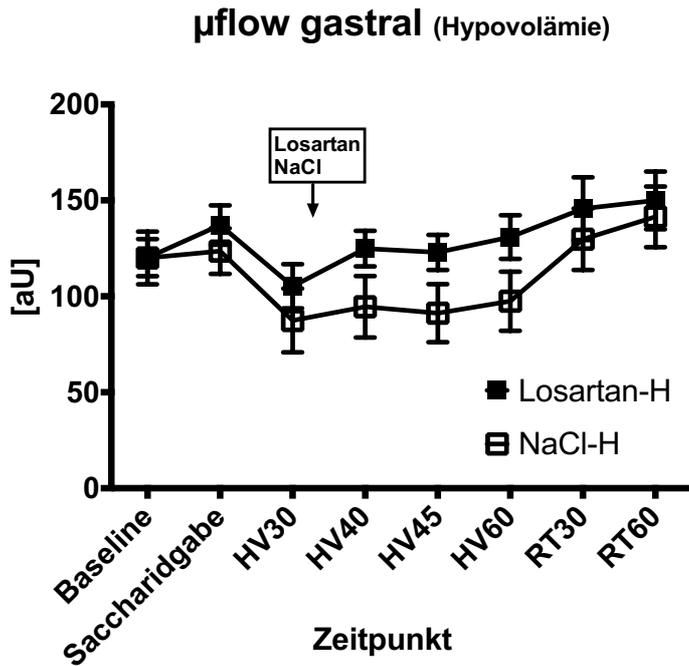


Abb. 6: Der gastrale Blutfluss unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) ist im Zeitverlauf aufgetragen. Die Messzeitpunkte sind vor (HV30) bzw. 10 (HV40), 15 (HV45) und 30 min (HV60) nach Losartan- oder NaCl-Applikation, jeweils als MW \pm SEM für n = 6 Hunde dargestellt * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe

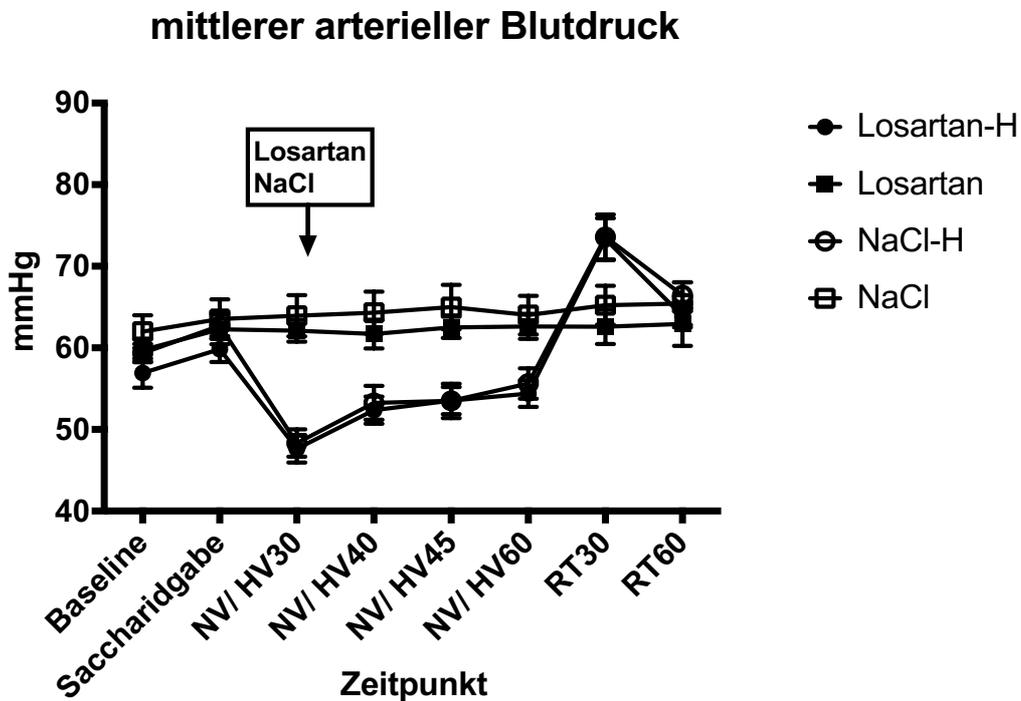


Abb. 7: Mittlerer arterieller Blutdruck im Zeitverlauf unter physiologischen Kreislaufbedingungen (NV) vor (NV30) bzw. 10 (NV40), 15 (NV45) und 30 min (NV60) nach Losartan- (Losartan) bzw. NaCl-Applikation (NaCl), sowie unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen (HV) ebenfalls vor (HV30) bzw. 10 (HV40), 15 (HV45) und 30 min (HV60) nach Losartan- (Losartan-H) bzw. NaCl-Applikation (NaCl-H), dargestellt mit MW \pm SEM für n = 6 Hunde; * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe

Die lokale Applikation von Losartan im Schock beeinflusste die aufgezeichneten systemischen Kreislaufparameter (Tabelle 3, Abb. 7 und Abb. 8) ebenfalls nicht. Durch die Induktion der Hypovolämie fiel in der Kontrollgruppe die DO₂ (von 13 ± 1 auf 7 ± 1 ml/kg/min), bedingt war dieser Abfall durch eine Reduktion des HZV (von 81 ± 5 auf 49 ± 5 ml/kg/min). Der Grund der Reduktion des HZV ist in einer Abnahme des SV (von 22 ± 2 auf 13 ± 1 ml) bei konstant bleibender Hf (114 ± 3 vs. 114 ± 4 1/min) zu sehen. Als Folge der HZV-Reduktion sank der MAP (von 59 ± 1 auf 48 ± 2 mmHg) (Abb. 7). Der SVR stieg kompensatorisch (von 24 ± 2 auf 34 ± 4 mmHg*min/l) an. (Tabelle 3) Im Vergleich zur Kontrollgruppe zeigten sich nach Losartanapplikation insbesondere keine Unterschiede beim MAP (52 ± 2 mmHg nach Losartanapplikation vs. 53 ± 2 mmHg in der Kontrollgruppe nach 10 min) und im HZV (49 ± 3 vs. 50 ± 2 ml/kg/min nach 30 min). Gleiches gilt für die späteren Messwerte (Tabelle 3, Abb. 8).

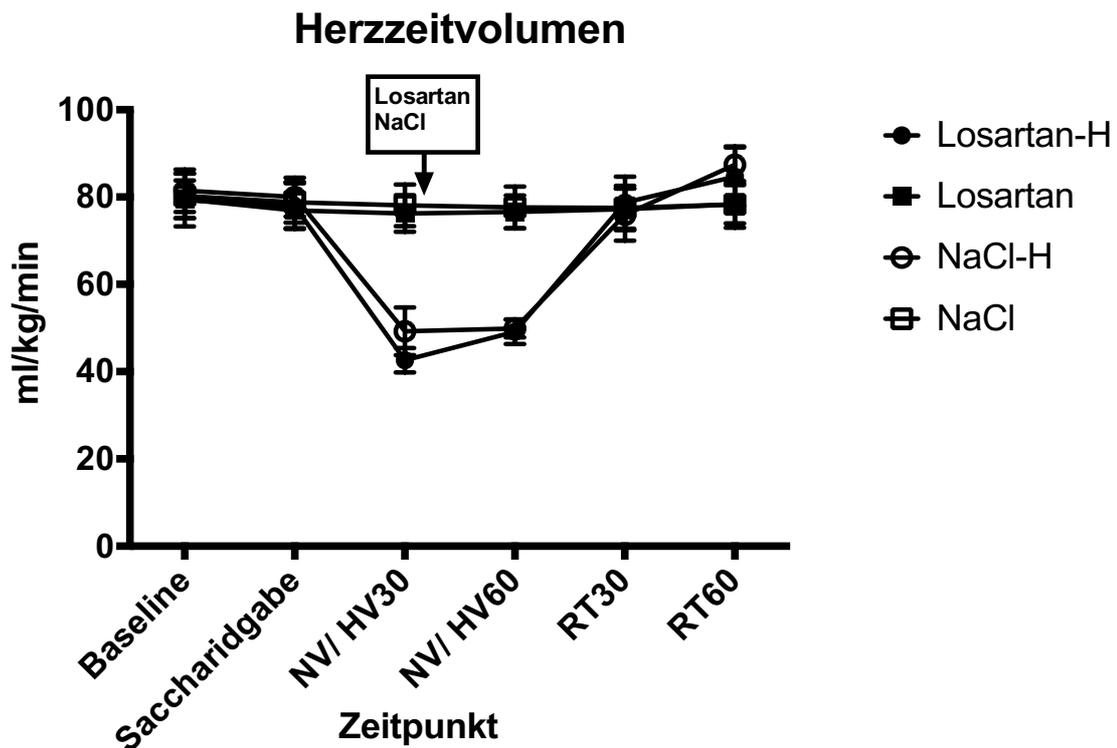


Abb. 8: Herzzeitvolumen im Zeitverlauf unter physiologischen Kreislaufbedingungen (NV) vor (NV30) bzw. 30 min (NV60) nach Losartan- (Losartan) bzw. NaCl-Applikation (NaCl), sowie unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen (HV) ebenfalls vor (HV 30) bzw. 30 min (HV60) nach Losartan- (Losartan-H) bzw. NaCl-Applikation (NaCl-H), dargestellt mit MW ± SEM für n = 6 Hunde; * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe

Tabelle 4: Ergebnisse der Blutgasanalyse in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte

Parameter [hh:mm]	Gruppe	Baseline 00:30	Saccharid. 1:00	HV / NV 30 01:30	HV / NV 60 02:00	RT 30 02:30	RT 60 03:00
pO₂ [mmHg]	NaCl	136 ± 4,74	138 ± 5,63	140 ± 4,37	142# ± 5,59	141# ± 4,43	141# ± 3,86
	Losartan	139 ± 4,94	141 ± 5,30	141 ± 5,43	141 ± 4,77	143 ± 4,26	143# ± 4,97
	NaCl - H	139 ± 4,86	144 ± 3,90	130# ± 3,85	136 ± 4,03	151# ± 5,80	149# ± 5,56
	Losartan - H	134 ± 4,77	139# ± 5,26	126# ± 4,69	132 ± 4,24	145# ± 3,90	144# ± 3,19
pCO₂ [mmHg]	NaCl	36 ± 0,80	37 ± 0,97	38 ± 0,75	38# ± 0,75	38 ± 0,74	38# ± 0,51
	Losartan	37 ± 1,17	37 ± 1,21	37 ± 0,88	38 ± 1,04	38 ± 0,93	38 ± 1,72
	NaCl - H	37 ± 1,22	37 ± 1,05	42# ± 1,48	42# ± 1,29	37 ± 0,81	37 ± 0,77
	Losartan - H	38 ± 1,13	37 ± 1,04	43# ± 1,46	42# ± 1,35	37 ± 0,78	38 ± 0,75
SAT [%]	NaCl	98 ± 0,26	98 ± 0,32	98 ± 0,23	98 ± 0,28	98 ± 0,22	98 ± 0,18
	Losartan	98 ± 0,25	98 ± 0,26	98 ± 0,25	98 ± 0,25	98 ± 0,20	98 ± 0,26
	NaCl - H	98 ± 0,26	98 ± 0,19	97# ± 0,31	98# ± 0,28	98# ± 0,21	98# ± 0,21
	Losartan - H	98 ± 0,27	98 ± 0,27	97# ± 0,40	97# ± 0,32	98# ± 0,18	98# ± 0,15
Hkt [%]	NaCl	35 ± 1,63	35 ± 1,67	35 ± 1,88	34 ± 1,78	34 ± 1,89	34 ± 1,89
	Losartan	34 ± 1,70	34 ± 1,69	34 ± 1,71	34 ± 1,88	34 ± 1,71	34 ± 1,73
	NaCl - H	35 ± 1,69	34 ± 1,66	34 ± 1,46	34# ± 1,58	33# ± 1,41	34# ± 1,45
	Losartan - H	34 ± 1,41	34 ± 1,58	34 ± 1,40	33# ± 1,28	33# ± 1,58	34 ± 1,59
Hb [g/dl]	NaCl	11,38 ± 0,59	11,33 ± 0,59	11,27 ± 0,61	11,32 ± 0,65	11,28 ± 0,65	11,33 ± 0,64
	Losartan	11,18 ± 0,57	11,22 ± 0,58	11,13 ± 0,60	11,13 ± 0,62	11,13 ± 0,60	11,01 ± 0,61
	NaCl - H	11,35 ± 0,61	11,30 ± 0,62	11,22 ± 0,51	11,08# ± 0,51	10,98# ± 0,52	10,89# ± 0,58
	Losartan - H	11,27 ± 0,49	11,17 ± 0,52	11,23 ± 0,46	10,97# ± 0,40	10,92# ± 0,47	10,95# ± 0,50
pH	NaCl	7,39* ± 0,01	7,38 ± 0,01	7,38# ± 0,01	7,37# ± 0,01	7,37# ± 0,01	7,37# ± 0,01
	Losartan	7,38 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,37 ± 0,02
	NaCl - H	7,38 ± 0,01	7,38 ± 0,01	7,31# ± 0,01	7,31# ± 0,01	7,36# ± 0,01	7,36# ± 0,01
	Losartan - H	7,37 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,30# ± 0,01	7,31# ± 0,02	7,36# ± 0,01	7,36# ± 0,01
HCO₃⁻ [mmol/l]	NaCl	21 ± 0,32	21 ± 0,41	21 ± 0,34	21 ± 0,29	21 ± 0,38	21 ± 0,28
	Losartan	21 ± 0,26	21 ± 0,22	21 ± 0,26	21 ± 0,30	21 ± 0,35	21 ± 0,35
	NaCl - H	21 ± 0,36	21 ± 0,36	20# ± 0,29	20# ± 0,32	20# ± 0,29	21# ± 0,25
	Losartan - H	21 ± 0,15	21 ± 0,23	20# ± 0,18	20# ± 0,20	20# ± 0,27	21 ± 0,18
Laktat [mmol/l]	NaCl	0,73 ± 0,09	0,87 ± 0,10	0,97# ± 0,11	0,98# ± 0,12	1# ± 0,14	1# ± 0,14
	Losartan	0,83 ± 0,10	0,97 ± 0,12	1,03# ± 0,12	1,05# ± 0,11	1,08# ± 0,13	1,05# ± 0,11
	NaCl - H	0,75 ± 0,11	0,97# ± 0,15	1,38# ± 0,16	1,33# ± 0,18	1,13# ± 0,14	1,1# ± 0,15
	Losartan - H	0,77 ± 0,10	0,92# ± 0,12	1,33# ± 0,15	1,30# ± 0,15	1,13# ± 0,13	1,1# ± 0,11

Legende: NaCl bzw. Losartan = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter physiologischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; NaCl-H bzw. Losartan-H = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; HV / NV = Hypo- bzw. Normovolämie je nach Gruppe mit Zeitangabe (30,40,60) in Minuten nach Aufteilung der Gruppen in Hypo- bzw. Normovolämie; MW ± SEM für n = 6 Hunde, * = signifikant zur jeweiligen Kontrollgruppe; # = signifikant zum jeweiligen Baseline-Wert

Die lokale Applikation von Losartan hatte unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen keinen Effekt auf die gemessenen Blutgase (pO₂, pCO₂, SAT in Tabelle 4), den pH-Wert, die Bikarbonat- und Laktatkonzentration, den Hämatokritwert oder die Hämoglobinkonzentration im Serum. Durch die hypovolämischen Kreislaufbedingungen stiegen der pCO₂ und die Laktatkonzentration im Blut an. Die Sauerstoffsättigung, der pH-Wert und die

Bikarbonatkonzentration im arteriellen Blut fielen als Folge der Hypovolämie im Vergleich zum Baseline-Wert der jeweiligen Gruppe (Tabelle 4). Nach 60 Minuten (HV 60) hatte die Hypovolämie auch einen Abfall des Hb und des Hkt zur Folge (Tabelle 4). Diese Effekte hielten zum Teil bis in die Retransfusion an (RT 30 / 60).

3.3 Einfluss der lokalen Losartan-Applikation auf die Barrierefunktion der gastralen Mukosa

Die Messungen während der Baseline zeigten in den vier Versuchsgruppen Ausgangswerte von 16 ± 7 Xylose/ μ l (Kontrollgruppe ohne Hypovolämie) bis zu 120 ± 26 Xylose/ μ l (Losartanapplikation unter Hypovolämie). Unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen war nach Losartan- bzw. NaCl-Applikation nach 30 min (625 ± 342 vs. 360 ± 131 Xylose/ μ l) kein Unterschied in der Aufnahme von Xylose ins Blutplasma nachzuweisen (Tabelle 5). Gleiches gilt für die Messwerte unter physiologischen Kreislaufbedingungen (Tabelle 5). Laktulose, Manntiol und Rhamnose wurden (als Zeichen einer geringen Störung der Barrierefunktion) nur in einem für die Quantifizierung im Blutplasma nicht ausreichendem Anteil resorbiert.

Tabelle 5: Ergebnisse der Xylose-Messungen im Blutplasma in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte

Parameter	Gruppe	Baseline 00:30	Saccharid. 1:00	HV / NV 30 01:30	HV / NV 60 02:00
Xylose [Menge/μl]	NaCl	16 ± 7	125 ± 26	228 ± 80	218 ± 90
	Losartan	48 ± 33	247 ± 77	467 ± 171	$476\# \pm 154$
	NaCl - H	32 ± 25	458 ± 328	382 ± 121	360 ± 131
	Losartan - H	120 ± 26	264 ± 71	370 ± 166	$625\# \pm 342$

Legende: NaCl bzw. Losartan = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter physiologischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; NaCl-H bzw. Losartan-H = Gruppe in der die jeweilige Substanz lokal unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen appliziert wurde; HV / NV = Hypo- bzw. Normovolämie je nach Gruppe mit Zeitangabe (30,40,60) in Minuten nach Aufteilung der Gruppen in Hypo- bzw. Normovolämie; MW \pm SEM für n = 6 Hunde, * = signifikant zur jeweiligen Kontrollgruppe; # = signifikant zum jeweiligen Baseline-Wert

4 Diskussion

4.1 Zentrale Aussagen

1. Die lokale Applikation von Losartan erhöht den Blutfluss der gastralen Mikrozirkulation unter physiologischen Kreislaufbedingungen.
2. In deutlich geringerem Maße verbessert Losartan auch den Blutfluss an der gastralen Mukosa während eines hämorrhagischen Schocks ($p=0.09$).
3. Die lokale Applikation von Losartan an oraler und gastraler Mukosa hat keinen Einfluss auf systemische Kreislaufparameter.

4.2 Methodenkritik

4.2.1 Experimentelle Rahmenbedingungen

Die Ergebnisse der Experimente und deren Auswertung ermöglichen die Beantwortung hinsichtlich der Fragestellungen (vgl. 1) nur, wenn die experimentellen Rahmenbedingungen den Schluss zulassen, dass die dargestellten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen nicht durch äußere oder vom Untersuchungsziel abweichende innere Faktoren ausgelöst wurden. Um dies zu gewährleisten, wurden Nahrungsmenge, Gewicht, Versuchszeitpunkt, Geschlecht und die Versuchsausführung standardisiert (vgl. 2). Durch die 12-stündige Nahrungskarenz im Vorfeld der Versuche wurde neben einer stabileren Messung ein jeweils ähnlicher pH-Wert im Magen des Versuchstieres erreicht [87]. Der Einfluss der pH-abhängigen Löslichkeit [88] von Losartan auf die Experimente wurde so minimiert.

Die Substanz-Applikation erfolgte jeweils langsam und in gleicher Menge, so dass Artefakte in der Messung bzw. Beeinflussungen der Mikrozirkulation durch Druck auf das Gewebe minimiert werden konnten.

Eine stabile, standardisierte Versuchsdurchführung wurde durch die zwischen den Gruppen nahezu identischen Messwerten zu Versuchsbeginn („baseline“) sichergestellt. Die im Verlauf auftretenden Unterschiede zwischen den

Versuchsgruppen können also auf die unterschiedlichen Interventionen zurückgeführt werden.

4.2.2 Losartanapplikation und lokale Therapie

Die Frage nach der Eignung von Applikationsart bzw. -weg sowie der Menge des verabreichten Losartans sind von entscheidender Bedeutung für die Interpretation der Ergebnisse dieser Studie. Gerade im Hinblick auf eine ausschließlich lokal wirkende Therapie (vgl. 1) stehen Faktoren wie Löslichkeit, Schleimhautpermeabilität, sowie die (orale) Bioverfügbarkeit des Pharmakons im Vordergrund.

Losartan ist als wasserlösliches Pharmakon stabil im sauren Milieu und oral bioverfügbar [49, 89], daher ist von einer Permeabilität durch die Mukosa auszugehen. Die Applikation erfolgte wie beschrieben (vgl. 2.4.10) direkt an der oralen bzw. gastralen Mukosa, so dass auf die lokale Wirkung der verwendeten Substanzmenge geschlossen werden kann. Gestützt wird die Annahme der rein lokalen Wirkung des Losartans durch die fehlenden Effekte auf die systemischen Kreislaufparameter (vgl. 3). Die Dosis wurde anhand der aktuellen Literatur gewählt. [49]

4.2.3 Messungen der oralen und gastralen Mikrozirkulation

Die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit betreffen die mukosale Mikrozirkulation. Um eine valide qualitative sowie quantitative Bestimmung dieser zu erreichen, wurden drei verschiedene Messmethoden eingesetzt. Neben der in der Arbeitsgruppe etablierten und in Studien evaluierten [90-92] Messung mittels Reflexionsspektrofotometrie und Laser-Doppler-Technik wurde als Ergänzung die orale Messung mittels Videomikroskopie (vgl. 2.4.8) etabliert. Die oral und gastral gewählten Messorte sind nach aktuellen Erkenntnissen [93, 94] geeignet, um Rückschlüsse auf die intestinale Mikrozirkulation zu ziehen. Die Ergebnisse von Vollmer et al. [81] konnten zeigen, dass die Messungen des gastralen μ flow, nicht jedoch des oralen μ flow, mit der Barrierefunktion des Dünndarms korrelieren.

Um Artefakte soweit wie möglich zu reduzieren, waren die Versuchstiere nüchtern sowie nach Relaxation kontrolliert beatmet (vgl. 2.5). Die Aufzeichnung der Daten mittels O2C erfolgt in hoher Frequenz und mit Darstellung nahezu in Echtzeit. So kann die Signalqualität durchgehend anhand des angezeigten Reflexionsspektrums beurteilt und konstant gehalten werden. Mit Blick auf die kurze (lokale) Wirkdauer des verwendeten Pharmakons [49] erlangt diese Art der Datenerfassung eine besondere Bedeutung. Durch die geringe Größe der verwendeten Sonden war auch gastral eine Messung ohne wesentliche Beeinflussung der lokalen Mukosa möglich. Es ist also anzunehmen, dass diese Messungen unter nahezu physiologischen Bedingungen stattfinden konnten. Durch die verwendete Instrumentierung wurde die Substanz in unmittelbarer Nähe des Messortes appliziert (vgl. 2.5). Ein Nachteil der punktuellen O2C-Messung ist, dass die Heterogenität des Blutflusses nicht erfasst werden kann [95]. Allerdings konnte bereits gezeigt werden, dass die punktuelle Messung ausreichend ist, um Unterschiede im Fluss zu detektieren, die mit einer verbesserten Barrierefunktion der intestinalen Mukosa einhergehen [81, 96].

Die Messung mittels Reflexionsspektrofotometrie ermöglicht dabei – im Gegensatz zu den gängigen anderen Techniken zur Messung der Mikrozirkulation – die Messung der regionalen Oxygenierung. Somit kann auf diese Weise auch eine Aussage über die Sauerstoffversorgung der Zellen getroffen werden.

Um auch die Qualität des Blutflusses und die Kapillardichte beurteilen zu können, wurden an der oralen Mukosa Aufnahmen mittels Videomikroskopie angefertigt (vgl. 2.4.8). Für die Platzierung der Kamera wurde der Ort gewählt, an dem auch die lokale Substanzapplikation und die O2C-Messungen erfolgten. Den Empfehlungen [70] folgend, wurden jeweils drei Aufnahmen pro Messzeitpunkt angefertigt. Messungen, welche die empfohlenen Qualitätskriterien, insbesondere bezüglich Druckartefakten, nicht erfüllten, wurde nicht ausgewertet. Neben der softwaregestützten Auswertung (vgl. 2.4.8), wurde der MFI auch manuell bestimmt, um die Aussagekraft der erhobenen Daten zu stärken [73, 95]. Diese Bestimmung erfolgte verblindet.

Durch die Kombination dieser Messmethoden war es möglich, ein umfassendes Bild der mukosalen Mikrozirkulation während der Versuche zu gewinnen.

4.2.4 Bewertung der MFI-Messungen

Nach Betrachtung der unterschiedlichen Messwerte von manueller und softwaregestützter Auswertung des MFI (Tabelle 2) stellt sich die Frage nach der Reliabilität und Validität dieser Messungen. Vergleicht man die Messwerte der softwaregestützten Auswertung vor Beginn jeglicher Intervention (Baseline: 1,94 – 2,12, Tabelle 2) mit in der Literatur [97, 98] angegebenen Werten für gesunde Patienten (2,7 – 2,9), so fällt eine deutliche Diskrepanz auf. Die manuell bestimmten Werte (2,85 – 2,92, Tabelle 2) liegen hingegen in einem ähnlichen Bereich. Mit Blick auf die ursprüngliche Beschreibung des MFI von Boerma et al. [73] soll in den 4 Quadranten jeweils der vorherrschende Fluss einmalig bewertet werden (Abb. 1). Die verwendete Software hingegen bewertet die detektierten Gefäße einzeln und bildet anschließend einen Mittelwert (Abb. 2). Dadurch können kleinste Abweichungen vom optimalen Fluss stärker ins Gewicht fallen. Dies scheint ein entscheidender Unterschied zur manuellen Auswertung zu sein. Auch der statistisch nicht signifikante Unterschied zwischen Messungen in Normo- (Baseline) und Hypovolämie (HV30 in NaCl-H) in der softwaregestützten Auswertung kann auf diese Weise erklärt werden. In der manuellen Auswertung ist dieser Unterschied analog zu den Messungen des O2C (Tabelle 2) vorhanden. Zusammenfassend scheint also die manuelle Auswertung der softwaregestützten in dieser Studie überlegen zu sein.

4.2.5 Bewertung der intestinalen Barrierefunktion

Eine direkte Bewertung der Barrierefunktion der intestinalen Mukosa sollte anhand der Resorption von gastral verabreichten Mono- und Disacchariden etabliert werden.

Die Konzentration der Saccharide Laktulose, Rhamnose und Mannitol lagen jeweils unterhalb der quantitativen Nachweisgrenze der Messmethode. Dies könnte einerseits Ausdruck einer nur gering gestörten intestinalen

Barrierefunktion im milden hämorrhagischen Schock gewesen sein, andererseits aber auch in einem ausgeprägten Reflux über die Magensonde während der Experimente mit konsekutiv erniedrigter gastraler Saccharidkonzentration begründet sein.

Die quantitative Bestimmung der Xylose im Blutplasma zeigte einen Anstieg, ohne Unterschiede zwischen den verschiedenen Versuchsgruppen aufzuweisen (vgl. Tabelle 5).

Eine vorherige Studie [81] zeigte einen erhöhten Xylose-Anstieg nach Induktion der Hypovolämie im Vergleich zur Normovolämie. Dieser stellte sich in Abhängigkeit zur Beeinträchtigung der gastralen Mikrozirkulation dar.

Allerdings wurde in betreffender Studie die Translokation der physiologisch vorhandenen Xylose untersucht [81]. In der aktuellen Studie wurde hingegen Xylose zusätzlich oral appliziert, um die physiologisch niedrigen Mengen zu ergänzen und größere Unterschiede zu detektieren. Höher osmolare Lösungen im Darmlumen können selbst die intestinale Permeabilität erhöhen [99]. Dieser Effekt mag zu den erhöhten Xylosekonzentrationen im Plasma nach exogener Zufuhr beitragen und kann Effekte des milden Schocks überlagern.

Außerdem kann die erhöhte Osmolarität der verwendeten Lösung (im Gegensatz zur physiologisch vorhandenen Xylose) zusätzlich zu einer Störung der intestinalen Barrierefunktion geführt [99] und auf diese Weise die Ergebnisse beeinflusst haben.

Eine abschließende Beurteilung der Barrierefunktion scheint daher nicht möglich.

4.3 Ergebnisdiskussion

4.3.1 Steigerung des gastralen Blutflusses durch lokale Losartan Applikation

Unter physiologischen Kreislaufbedingungen ist der Anstieg des Blutflusses (*μflow*) an der gastralen Mukosa (vgl. 3.1) als direkte Wirkung von Losartan auf die Mikrozirkulation zu verstehen.

Somit scheinen auch regionale AT₁-Rezeptoren, unabhängig von solchen in den vorgeschalteten Mesenterialarterien, an der regionalen Mikrozirkulation beteiligt zu sein. Ob diese Rezeptoren direkt über einen Effekt auf die Vasomotorik wirken oder auch indirekt zum Beispiel über Protonenaustauscher den Flüssigkeitshaushalt der Zellen modulieren (vgl. 1) bedarf einer weiteren Klärung.

Durch einen erhöhten Blutfluss wäre unter pathologischen Bedingungen eine verbesserte Versorgung der Mukosa mit Sauerstoff, sowie eine optimierte Entsorgung von Stoffwechselmetaboliten, möglich. Die Messungen mittels Videomikroskopie beurteilen primär den Blutfluss, sowie dessen Qualität, und nicht die Oxygenierung des Gewebes (vgl. 2.4.8). Studien, die ein verbessertes *outcome* bei Patienten mit optimierten Messwerten in der Videomikroskopie zeigen konnten [24], weisen demnach auf die besondere Bedeutung des Blutflusses für die Mikrozirkulation hin.

Unklar ist, warum die gastrale Perfusion unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen durch Losartan nur tendenziell verbessert wurde. Als eine mögliche Ursache kommt eine weiter zentral gelegene, vorgeschaltete Vasokonstriktion, verursacht durch die hypovolämischen Kreislaufbedingungen, in Frage. An einer solchen vorgeschalteten Vasokonstriktion könnte insbesondere auch Vasopressin beteiligt sein [100], welches im hämorrhagischen Schock insbesondere die mesenteriale Durchblutung und damit auch die Mikrozirkulation supprimiert [101]. Dadurch würde die Verbesserung der Mikrozirkulation durch eine lokal wirkende Substanz ggf. gemindert oder aufgehoben.

Ein zweiter Grund könnte die vermehrte Ausschüttung von AT II im hämorrhagischen Schock [34] gewesen sein. Auf diese Weise würde die Wirkung der kompetitiven Blockade [102, 103] des AT₁-Rezeptors durch Losartan vermindert. Demnach wäre Losartan unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen lokal unterdosiert und somit weniger wirksam gewesen. Folglich wäre der blutflusssteigernde Effekt auf die Mikrozirkulation geringer ausgefallen.

Diese Gründe könnten also die unterschiedlichen Messungen unter physiologischen bzw. hypovolämischen Kreislaufbedingungen erklären.

Die erhobenen Messwerte zu *velocity* und rHb helfen in erster Linie bei der Interpretation des Blutflusses.

Mit Blick auf den zwischen den Versuchsgruppen stabilen rHb (vgl. 3.1 bzw. 3.2) erscheint eine venöse Stauung unwahrscheinlich [64].

Zusammenfassend kann der μ flow an der gastralen Mukosa durch eine lokale Losartan-Applikation gesteigert werden, die nur tendenzielle Steigerung unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen könnte durch die o.g. Gründe bedingt sein.

4.3.2 Wirkung von Losartan auf die orale Mukosa

Die lokale Applikation von Losartan hat auf die Mikrozirkulation der oralen Mukosa keinen Effekt gezeigt (vgl. 3.1 bzw. 3.2). Dies steht im Gegensatz zu anderen Untersuchungen, welche Korrelationen der Mikrozirkulation an oraler und intestinaler Mukosa gezeigt haben [104]. Folgende Ansätze könnten diese divergent erscheinenden Beobachtungen erklären.

Denkbar wären zum einen Differenzen in der Verteilung von AT-Rezeptoren in oraler und intestinaler Mukosa. Dies hätte eine unterschiedliche Wirkung von Losartan an den verschiedenen Interventionsorten zur Folge. Während Effekte von AT-Antagonisten bzw. das Vorhandensein von AT-Rezeptoren in der intestinalen Mukosa häufig beschrieben wurden [9, 37, 38, 105], gibt es in der Literatur diesbezüglich kaum Aussagen zur oralen Mukosa. Auch die unterschiedliche Histologie der oralen und gastralen Mukosa [106] kann Anhaltspunkte in Bezug auf eine unterschiedliche Regulierung des Blutflusses geben. Die spezielle Gefäßarchitektur der Villi des Dünndarms (vgl. 1) liegt in dieser Form in der oralen Mukosa nicht vor. Zudem gibt es konkrete Hinweise, dass die Mikrozirkulation der oralen Mukosa unabhängig von der intestinalen Mukosa auf Therapien reagieren kann. Edul et al. [107] zeigten, dass die sublinguale Mikrozirkulation durch Interventionen beeinflusst werden kann, während gleichzeitig die intestinale Mukosa unbeeinflusst bleibt.

Auch Studien, in denen durch systemische Therapien des RAAS die orale Mikrozirkulation beeinflusst wurde [29, 108], stehen nicht im Gegensatz zu diesen Theorien, da sie durch Prozesse auf systemischer Ebene beeinflusst worden sein könnten. Zwar wurden in diesen Studien die hämodynamischen Messungen als stabil beschrieben, allerdings könnten die gezeigten Effekte trotzdem durch eine lokal gesteigerte Blutzufuhr über größere Arterien und Arteriolen zustande gekommen sein.

Es gibt folglich verschiedene Erklärungsansätze, warum in diesem Fall orale und gastrale Mukosa unterschiedlich auf die lokale Losartan-Applikation reagiert haben, diese gilt es näher zu untersuchen.

Zusammenfassend unterstreicht dieses Ergebnis aber, dass die orale Mikrozirkulation nicht immer mit der gastralen Mikrozirkulation korreliert. Die alleinige Messung der oralen Mikrozirkulation, wie in vielen Studien am Menschen üblich, scheint demnach nicht ausreichend zu sein um valide Rückschlüsse auf die Funktion der intestinalen Mikrozirkulation ziehen zu können. Dies erklärt möglicherweise auch die Ergebnisse der bisher größten klinischen Studie (microSOAP), in der die orale Mukosa allein kein unabhängiger Prognoseparameter ist [28].

4.3.3 Oxygenierung der gastralen Mukosa

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen keine Beeinflussung des μHbO_2 der gastralen Mukosa. Durch den lokal gesteigerten Blutfluss wäre eine gesteigerte Oxygenierung denkbar. Dem entgegen zu setzen sind Studien, die zeigen, dass der vermehrte Sauerstoffverbrauch im Gewebe den durch den erhöhten Blutfluss bereitgestellten Sauerstoff eliminiert [104, 109, 110]. Diese Studien stützen sich teils auf Beobachtungen des Partialdrucks von Kohlenstoffdioxid im Gewebe, welcher eine Aussage über die Blutversorgung des Gewebes zulässt [104, 111]. Dem folgend sinkt die Differenz des Kohlenstoffdioxidpartialdruckes zwischen Mukosa und arteriellem Blut, wenn der Blutfluss in der Mukosa zunimmt [104]. Bei gesteigertem μflow (und damit gesteigertem Abtransport von Stoffwechselprodukten) wäre trotz gesteigerter Stoffwechselprozesse demnach auch ein konstanter Kohlenstoffdioxidpartialdruck denkbar.

Einen anderen Erklärungsansatz liefert die besondere Anatomie und Gefäßarchitektur der intestinalen Mukosa. Wegen ihres komplexen Kapillarsystems, das sich durch eine Vielzahl an sowohl seriell als auch parallel verknüpften Gefäßen auszeichnet [12], kann die Mukosa nicht als einfaches geschlossenes System angesehen werden. Dies zeigt sich auch im Vorhandensein funktioneller arterio-venöser Shunts im intestinalen Kapillarbett. Durch eine enge räumliche Beziehung von Arteriolen zu Venolen ist hier ein direkter Übertritt von Sauerstoff möglich [12]. Demzufolge scheint die Annahme, ein gesteigerter Blutfluss führe zwingend zu einer besseren Oxygenierung der Mukosa, nicht vertretbar zu sein.

Ein unveränderter μHbO_2 -Wert kann also trotz verbessertem μflow auftreten. Mögliche Ursachen stellen ein erhöhter Sauerstoffverbrauch des Gewebes sowie die besondere Anatomie der Mukosa dar.

4.4 Klinische Relevanz

Unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen wie dem hämorrhagischen Schock treten im klinischen Setting u.a. durch die gestörte Integrität der Darmbarriere Komplikationen wie Sepsis und MOV auf. Anteil daran trägt eine gestörte Mikrozirkulation in der intestinalen Mukosa (vgl. 1). Diese Studie zeigt, dass lokal appliziertes Losartan die gastrale Mikrozirkulation beeinflussen kann (vgl. 3.1). Allerdings könnte eine Dosisanpassung für hypovolämische Kreislaufbedingungen notwendig sein. Die Übertragbarkeit der im Tierversuch gewonnenen Daten ist trotz beschriebener Ähnlichkeiten des Magens bzw. Intestinaltraktes [112] sowie ähnlicher pharmakologischer Eigenschaften [49, 113] von Losartan bei Hund und Mensch weiter zu verifizieren. Durch die in dieser Studie angestrebte lokale Therapie sind außerdem seltene Nebenwirkungen, wie sie bei systemischer Gabe auftreten (z.B. Hepatotoxizität [114, 115]), genauso limitiert wie unerwünschte Effekte auf hämodynamische Parameter (vgl. 3.2). Klinisch wäre der Einsatz z.B. als Bestandteil von enteraler Ernährung denkbar. Da bis zu 29% des oral verabreichten Losartans direkt in den Faeces ausgeschieden werden [49], erscheint auch eine lokale

Therapie im Intestinaltrakt möglich. Die Therapie des gesamten Gastrointestinaltraktes könnte jedoch durch die notwendige deutlich höhere Losartan-Dosierung mit potentiell systemischen Wirkungen limitiert sein. Ein alternativer Ansatz wäre die langsame, verzögerte aber niedrig dosierte Freisetzung.

Es konnte gezeigt werden, dass Losartan in der Lage ist, nach topischer Applikation die Mikrozirkulation zu beeinflussen. Demnach kann angenommen werden, dass AT-II-Rezeptoren auch an der lokalen Regulation des Blutflusses beteiligt sind.

Der klinische Einsatz von Losartan in der lokalen Therapie an der intestinalen Mukosa ist in Zukunft also prinzipiell denkbar.

Während hämorrhagischer Ereignisse müssen allerdings noch höhere lokale Konzentrationen untersucht werden. Für einen Therapieeinsatz wären demnach noch weitere Untersuchungen notwendig.

5 Zusammenfassung

Der hämorrhagische Schock stellt insbesondere auch infolge seiner Komplikationen, wie der Sepsis oder des MOV, eine häufige und schwerwiegende Erkrankung dar.

Bei der Entstehung dieser Komplikationen spielt die gestörte Barrierefunktion der intestinalen Mukosa eine zentrale Rolle.

Diese Störung wird kausal durch eine kompromittierte Mikrozirkulation der intestinalen Mukosa unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen verursacht. Durch seine vasokonstriktive Wirkung scheint das im Schock vermehrt sezernierte AT II entscheidend an dieser Kompromittierung der intestinalen Mikrozirkulation beteiligt zu sein.

Durch Applikation eines Antagonisten am AT₁-Rezeptor (Losartan) im hämorrhagischen Schock könnte demnach die intestinale Mikrozirkulation aufrechterhalten werden, die Barrierefunktion bestehen bleiben und auf diese Weise das Auftreten der o.g. Komplikationen verhindert werden.

Zur Vermeidung systemischer Nebenwirkungen sollte die Applikation des Losartans topisch erfolgen.

Um die Effekte von lokal appliziertem Losartan auf die orale und gastrale Mikrozirkulation sowie die intestinale Barrierefunktion unter physiologischen und hämorrhagischen Kreislaufbedingungen zu untersuchen, wurden sechs weibliche Foxhounds wiederholt anästhesiert und instrumentiert. Die Hunde durchliefen dabei jeweils in randomisierter Reihenfolge verblindet vier Versuchsgruppen. Dabei wurde jeweils 30mg Losartan bzw. NaCl-Lösung (als Kontrolle) unter physiologischen Kreislaufbedingungen oder nach Induktion eines hämorrhagischen Schocks (Entzug von 20% des individuellen Blutvolumens) und anschließender Retransfusion appliziert.

Während der Versuche wurde die orale und gastrale Mikrozirkulation mittels Reflektionsspektrofotometrie und Laser-Doppler-Technik kontinuierlich beurteilt. Parallel wurde intermittierend die orale Mukosa mittels *incident dark field illumination* (IDF) untersucht. Während der Versuche wurden systemische Kreislaufparameter (u.a. DO₂, HZV und MAP) kontinuierlich aufgezeichnet. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte mittels einer 2-way ANOVA und einem anschließendem Bonferroni post-hoc Test. Dargestellt sind MW ± SEM, $p < 0,05$.

Lokal appliziertes Losartan verbesserte unter physiologischen Kreislaufbedingungen nach 10 min den gastralen $\mu flow$ im Vergleich zur Kontrollgruppe (147 ± 17 vs. 106 ± 9 aU), während dieser Effekt unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen nur tendenziell ($p=0.09$) nachweisbar war (125 ± 9 vs. 95 ± 16 aU). Die μHbO_2 der gastralen Mukosa wurde durch die lokale Losartan-Applikation weder unter physiologischen (83 ± 2 vs. 81 ± 3 % nach 10 min) noch unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (56 ± 7 vs. 57 ± 6 % nach 10 min) beeinflusst. Die Messungen an der oralen Mukosa ($\mu flow$, μHbO_2 , IDF) zeigten keine Beeinflussung durch Losartan. Es zeigte sich auch keine Beeinflussung der systemischen Kreislaufparameter. Unterschiede in der Expression von AT-II-Rezeptoren in der oralen und gastralen Mukosa, sowie histologische Unterschiede zwischen den beiden Messorten könnten den unterschiedlichen Messergebnissen zugrunde liegen.

Verstärkte Ausschüttung von AT II im hämorrhagischen Schock könnte bei kompetitiver Antagonisierung durch Losartan zu einem verminderten Effekt unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen geführt haben. Auch vermehrt ausgeschüttetes Vasopressin, welches im hämorrhagischen Schock zu einer vorgeschalteten Vasokonstriktion führen kann, könnte die verminderte Wirkung des Losartans unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen erklären.

Diese Studie legt also folgende Schlüsse nahe:

1. Die lokale Applikation von Losartan erhöht den Blutfluss der gastralen Mikrozirkulation unter physiologischen Kreislaufbedingungen.
2. Die lokale Applikation von Losartan erhöht tendenziell den Blutfluss der gastralen Mukosa unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen.
3. Die lokale Applikation von Losartan an oraler und gastraler Mukosa hat keinen Einfluss auf systemische Kreislaufparameter.

6 Literaturverzeichnis

1. Kleber, C., et al., *Overall distribution of trauma-related deaths in Berlin 2010: advancement or stagnation of German trauma management?* World J Surg, 2012. 36(9): p. 2125-30.
2. Henao, F.J., J.E. Daes, and R.J. Dennis, *Risk factors for multiorgan failure: a case-control study.* J Trauma, 1991. 31(1): p. 74-80.
3. Deitch, E.A., *Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy.* Ann Surg, 1992. 216(2): p. 117-34.
4. Szopinski, J., K. Kusza, and M. Semionow, *Microcirculatory responses to hypovolemic shock.* J Trauma, 2011. 71(6): p. 1779-88.
5. Bonanno, F.G., *Shock - A reappraisal: The holistic approach.* J Emerg Trauma Shock, 2012. 5(2): p. 167-77.
6. Herold, G., *INNERE MEDIZIN.* 2013: p. 321-326.
7. Adams, H.A., et al., *[Definition of shock types].* Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther, 2001. 36 Suppl 2: p. S140-3.
8. Isbister, J.P., *Physiology and pathophysiology of blood volume regulation.* Transfus Sci, 1997. 18(3): p. 409-23.
9. Yilmaz, E.N., et al., *The renin-angiotensin system in swine during hypovolaemic shock combined with low-flow ischaemia of the sigmoid colon.* Cardiovasc Surg, 1999. 7(5): p. 539-44.
10. Bulkley, G.B., et al., *Control of gastric vascular resistance in cardiogenic shock.* Surgery, 1985. 98(2): p. 213-23.
11. Ray-Chaudhuri, K., et al., *The effect of captopril on the superior mesenteric artery and portal venous blood flow in normal man.* Br J Clin Pharmacol, 1993. 35(5): p. 517-24.
12. Folkow, B., *Regional adjustments of intestinal blood flow.* Gastroenterology, 1967. 52(2): p. 423-32.
13. Mazzoni, M.C., et al., *Amiloride-sensitive Na⁺ pathways in capillary endothelial cell swelling during hemorrhagic shock.* J Appl Physiol (1985), 1992. 73(4): p. 1467-73.
14. Deitch, E.A., *Bacterial translocation or lymphatic drainage of toxic products from the gut: what is important in human beings?* Surgery, 2002. 131(3): p. 241-4.
15. Deitch, E.A., *The role of intestinal barrier failure and bacterial translocation in the development of systemic infection and multiple organ failure.* Arch Surg, 1990. 125(3): p. 403-4.
16. Ruchti, C., et al., *[Epithelial barriers of the intestine. Significance and function in defense against infection].* Fortschr Med, 1976. 94(10): p. 531-4.
17. Balzan, S., et al., *Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact.* J Gastroenterol Hepatol, 2007. 22(4): p. 464-71.
18. Deitch, E.A., *Multiple organ failure.* Adv Surg, 1993. 26: p. 333-56.
19. Magnotti, L.J. and E.A. Deitch, *Burns, bacterial translocation, gut barrier function, and failure.* J Burn Care Rehabil, 2005. 26(5): p. 383-91.

20. Magnotti, L.J., et al., *Gut-derived mesenteric lymph but not portal blood increases endothelial cell permeability and promotes lung injury after hemorrhagic shock*. *Ann Surg*, 1998. 228(4): p. 518-27.
21. Scalia, S., et al., *Persistent arteriolar constriction in microcirculation of the terminal ileum following moderate hemorrhagic hypovolemia and volume restoration*. *J Trauma*, 1990. 30(6): p. 713-8.
22. Lam, C., et al., *Microvascular perfusion is impaired in a rat model of normotensive sepsis*. *J Clin Invest*, 1994. 94(5): p. 2077-83.
23. De Backer, D., et al., *Microcirculatory alterations: potential mechanisms and implications for therapy*. *Ann Intensive Care*, 2011. 1(1): p. 27.
24. De Backer, D., et al., *Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis*. *Am J Respir Crit Care Med*, 2002. 166(1): p. 98-104.
25. Sakr, Y., et al., *Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock*. *Crit Care Med*, 2004. 32(9): p. 1825-31.
26. Trzeciak, S., et al., *Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis*. *Intensive Care Med*, 2008. 34(12): p. 2210-7.
27. Kerger, H., et al., *Systemic and microcirculatory effects of autologous whole blood resuscitation in severe hemorrhagic shock*. *Am J Physiol*, 1999. 276(6 Pt 2): p. H2035-43.
28. Vellinga, N.A., et al., *International study on microcirculatory shock occurrence in acutely ill patients*. *Crit Care Med*, 2015. 43(1): p. 48-56.
29. Salgado, D.R., et al., *Sublingual microcirculatory effects of enalaprilat in an ovine model of septic shock*. *Shock*, 2011. 35(6): p. 542-9.
30. Verdant, C.L., et al., *Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis*. *Crit Care Med*, 2009. 37(11): p. 2875-81.
31. Boerma, E.C., et al., *Relationship between sublingual and intestinal microcirculatory perfusion in patients with abdominal sepsis*. *Crit Care Med*, 2007. 35(4): p. 1055-60.
32. Ceppa, E.P., K.C. Fuh, and G.B. Bulkley, *Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock*. *Curr Opin Crit Care*, 2003. 9(2): p. 127-32.
33. Mulrow, P.J. and W.F. Ganong, *Role of the kidney and the renin-angiotensin system in the response of aldosterone secretion to hemorrhage*. *Circulation*, 1962. 25: p. 213-20.
34. Scornik, O.A. and A.C. Paladini, *Angiotensin Blood Levels in Hemorrhagic Hypotension and Other Related Conditions*. *Am J Physiol*, 1964. 206: p. 553-6.
35. Toung, T., et al., *Mesenteric vasoconstriction in response to hemorrhagic shock*. *Shock*, 2000. 13(4): p. 267-73.
36. Reilly, P.M., et al., *Mesenteric vasoconstriction in cardiogenic shock in pigs*. *Gastroenterology*, 1992. 102(6): p. 1968-79.
37. Riaz, A.A., et al., *Role of angiotensin II in ischemia/reperfusion-induced leukocyte-endothelium interactions in the colon*. *FASEB J*, 2004. 18(7): p. 881-3.
38. Duggan, K.A., F.A. Mendelsohn, and N.R. Levens, *Angiotensin receptors and angiotensin I-converting enzyme in rat intestine*. *Am J Physiol*, 1989. 257(4 Pt 1): p. G504-10.

39. Zakaria el, R., et al., *Cellular edema regulates tissue capillary perfusion after hemorrhage resuscitation*. Surgery, 2007. 142(4): p. 487-96; discussion 496.e1-2.
40. Gunasegaram, S., et al., *Regulation of sarcolemmal Na(+)/H(+) exchanger activity by angiotensin II in adult rat ventricular myocytes: opposing actions via AT(1) versus AT(2) receptors*. Circ Res, 1999. 85(10): p. 919-30.
41. Musch, M.W., Y.C. Li, and E.B. Chang, *Angiotensin II directly regulates intestinal epithelial NHE3 in Caco2BBE cells*. BMC Physiol, 2009. 9: p. 5.
42. Riaz, A.A., et al., *Oxygen radical-dependent expression of CXC chemokines regulate ischemia/reperfusion-induced leukocyte adhesion in the mouse colon*. Free Radic Biol Med, 2003. 35(7): p. 782-9.
43. Farber, H.W., et al., *Components of the angiotensin system cause release of a neutrophil chemoattractant from cultured bovine and human endothelial cells*. Eur Heart J, 1990. 11 Suppl B: p. 100-7.
44. Alvarez, A. and M.J. Sanz, *Reactive oxygen species mediate angiotensin II-induced leukocyte-endothelial cell interactions in vivo*. J Leukoc Biol, 2001. 70(2): p. 199-206.
45. Wolf, G., *Free radical production and angiotensin*. Curr Hypertens Rep, 2000. 2(2): p. 167-73.
46. Francis, R.C., et al., *Effect of angiotensin II and endothelin-1 receptor blockade on the haemodynamic and hormonal changes after acute blood loss and after retransfusion in conscious dogs*. Acta Physiol Scand, 2004. 180(4): p. 319-28.
47. Ghofrani, H.A., et al., *Combination therapy with oral sildenafil and inhaled iloprost for severe pulmonary hypertension*. Ann Intern Med, 2002. 136(7): p. 515-22.
48. Truse, R., et al., *Effect of Topical Iloprost and Nitroglycerin on Gastric Microcirculation and Barrier Function during Hemorrhagic Shock in Dogs*. J Vasc Res, 2017. 54(2): p. 109-121.
49. Christ, D.D., et al., *The pharmacokinetics and pharmacodynamics of the angiotensin II receptor antagonist losartan potassium (DuP 753/MK 954) in the dog*. J Pharmacol Exp Ther, 1994. 268(3): p. 1199-205.
50. Mochel, J.P., et al., *Chronobiology of the renin-angiotensin-aldosterone system in dogs: relation to blood pressure and renal physiology*. Chronobiol Int, 2013. 30(9): p. 1144-59.
51. Koepke, J.P. and P.A. Obrist, *Angiotensin II in the renal excretory response to behavioral stress in conscious dogs*. Am J Physiol, 1983. 245(2): p. R259-64.
52. van Leersum, E.C., *Eine Methode zur Erleichterung der Blutdruckmessung bei Tieren*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 1911. 142(7-8): p. 377-395.
53. Johansson, A. and M. Chew, *Reliability of continuous pulse contour cardiac output measurement during hemodynamic instability*. J Clin Monit Comput, 2007. 21(4): p. 237-42.
54. Zollner, C., et al., *[Retrospective analysis of transpulmonary and pulmonary arterial measurement of cardiac output in ARDS patients]*. Anaesthesist, 1998. 47(11): p. 912-7.
55. Sakka, S.G., K. Reinhart, and A. Meier-Hellmann, *Comparison of pulmonary artery and arterial thermodilution cardiac output in critically ill patients*. Intensive Care Med, 1999. 25(8): p. 843-6.

56. Segal, E., et al., *Transpulmonary thermodilution cardiac output measurement using the axillary artery in critically ill patients*. J Clin Anesth, 2002. 14(3): p. 210-3.
57. Hammel, H.T., C.H. Wyndham, and J.D. Hardy, *Heat production and heat loss in the dog at 8-36 degrees C environmental temperature*. Am J Physiol, 1958. 194(1): p. 99-108.
58. Hemmerling, T.M. and N. Le, *Brief review: Neuromuscular monitoring: an update for the clinician*. Can J Anaesth, 2007. 54(1): p. 58-72.
59. Murphy, G.S., et al., *Intraoperative acceleromyography monitoring reduces symptoms of muscle weakness and improves quality of recovery in the early postoperative period*. Anesthesiology, 2011. 115(5): p. 946-54.
60. Martin-Flores, M., et al., *Recovery from neuromuscular block in dogs: restoration of spontaneous ventilation does not exclude residual blockade*. Vet Anaesth Analg, 2014. 41(3): p. 269-77.
61. Rossing, R.G. and S.M. Cain, *A nomogram relating pO₂, pH, temperature, and hemoglobin saturation in the dog*. J Appl Physiol, 1966. 21(1): p. 195-201.
62. Kretz, F.-J.e.a., *Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*. 2007. 5. Auflage: p. 76.
63. Gandjbakhche, A.H., et al., *Visible-light photon migration through myocardium in vivo*. Am J Physiol, 1999. 277(2 Pt 2): p. H698-704.
64. Krug, A., *Mikrozirkulation und Sauerstoffversorgung des Gewebes - Methode des so genannten O₂C (oxygen to see)*. Phlebologie, 2006: p. 300-312.
65. Jakobsson, A. and G.E. Nilsson, *Prediction of sampling depth and photon pathlength in laser Doppler flowmetry*. Med Biol Eng Comput, 1993. 31(3): p. 301-7.
66. Zijlstra, W.G., A. Buursma, and W.P. Meeuwse-van der Roest, *Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin*. Clin Chem, 1991. 37(9): p. 1633-8.
67. M. Ghazanfari, L.V., W. Banzer, U. Rhodius, *Reproducibility of Non-Invasive Blood Flow Measurements Using Laser Doppler Spectroscopy*. Phys Rehab Kur Med, 2002. 12(06): p. 330-336.
68. Sherman, H., S. Klausner, and W.A. Cook, *Incident dark-field illumination: a new method for microcirculatory study*. Angiology, 1971. 22(5): p. 295-303.
69. Goedhart, P.T., et al., *Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation*. Opt Express, 2007. 15(23): p. 15101-14.
70. De Backer, D., et al., *How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference*. Crit Care, 2007. 11.
71. Sharawi, N. *FIRST EXPERIENCES WITH AUTOMATED MICROCIRCULATION ANALYSIS SOFTWARE*. in *JOURNAL OF VASCULAR RESEARCH*. 2015. KARGER ALLSCHWILERSTRASSE 10, CH-4009 BASEL, SWITZERLAND.
72. Carsetti, A., et al., *Accuracy of an automatic analysis software to detect microvascular density parameters*. Intensive Care Medicine Experimental, 2015. 3(1): p. 1-2.
73. Boerma, E.C., et al., *Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study*. Crit Care, 2005. 9(6): p. R601-6.
74. Wang, Y.B., J. Liu, and Z.X. Yang, *Effects of intestinal mucosal blood flow and motility on intestinal mucosa*. World J Gastroenterol, 2011. 17(5): p. 657-61.

75. Kuitunen, M. and E. Savilahti, *Gut permeability to human alpha-lactalbumin, beta-lactoglobulin, mannitol, and lactulose in celiac disease*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1996. 22(2): p. 197-204.
76. Sorensen, S.H., et al., *A blood test for intestinal permeability and function: a new tool for the diagnosis of chronic intestinal disease in dogs*. Clin Chim Acta, 1997. 264(1): p. 103-15.
77. Li, S., et al., *Change of intestinal mucosa barrier function in the progress of non-alcoholic steatohepatitis in rats*. World J Gastroenterol, 2008. 14(20): p. 3254-8.
78. Roberts, J.G., et al., *D-Xylose blood-level time-curve as an index of intestinal absorption, with a description of a simplified method for estimation of blood xylose levels*. Can Med Assoc J, 1960. 83: p. 112-7.
79. Ohkohchi, N., et al., *Mechanism of D-xylose transport in human small intestine*. J Pediatr Gastroenterol Nutr, 1986. 5(3): p. 372-8.
80. Ambromovage, A.M., U. Shah, and J.M. Howard, *Xylose and inulin absorption. From the small intestine of dogs following endotoxin shock*. Arch Surg, 1971. 102(5): p. 496-500.
81. Vollmer, C., et al., *Melatonin pretreatment improves gastric mucosal blood flow and maintains intestinal barrier function during hemorrhagic shock in dogs*. Microcirculation, 2017. 24(4).
82. Fiehn, O. and T. Kind, *Metabolite profiling in blood plasma*. Methods Mol Biol, 2007. 358: p. 3-17.
83. Wiggers, H.C. and R.C. Ingraham, *Hemorrhagic Shock: Definition and Criteria for Its Diagnosis*. J Clin Invest, 1946. 25(1): p. 30-6.
84. Engelhardt von, W., *Physiologie der Haustiere*. 2010: p. 194-195.
85. Oura, T., et al., *Low tidal volume ventilation in healthy dogs*. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2012. 22(3): p. 368-71.
86. Kazama, T. and K. Ikeda, *Comparison of MAC and the rate of rise of alveolar concentration of sevoflurane with halothane and isoflurane in the dog*. Anesthesiology, 1988. 68(3): p. 435-7.
87. Akimoto, M., et al., *Gastric pH profiles of beagle dogs and their use as an alternative to human testing*. Eur J Pharm Biopharm, 2000. 49(2): p. 99-102.
88. Tran, H.T., et al., *Preparation and characterization of pH-independent sustained release tablet containing solid dispersion granules of a poorly water-soluble drug*. Int J Pharm, 2011. 415(1-2): p. 83-8.
89. Chiu, A.T., et al., *Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VII. Cellular and biochemical pharmacology of DuP 753, an orally active antihypertensive agent*. J Pharmacol Exp Ther, 1990. 252(2): p. 711-8.
90. Vollmer, C., et al., *Hypothermia improves oral and gastric mucosal oxygenation during hypoxic challenges*. Br J Anaesth, 2014. 113(3): p. 433-42.
91. Bludau, M., et al., *Quantitative measurement of gastric mucosal microcirculation using a combined laser Doppler flowmeter and spectrophotometer*. Dis Esophagus, 2008. 21(7): p. 668-72.
92. Maier, S., et al., *Microcirculatory parameters after isotonic and hypertonic colloidal fluid resuscitation in acute hemorrhagic shock*. J Trauma, 2009. 66(2): p. 337-45.
93. Creteur, J., et al., *Sublingual capnometry tracks microcirculatory changes in septic patients*. Intensive Care Med, 2006. 32(4): p. 516-23.

94. Fisher, E.M., et al., *A comparison of gastric and rectal CO₂ in cardiac surgery patients*. Biol Res Nurs, 2005. 6(4): p. 268-80.
95. De Backer, D., K. Donadello, and D.O. Cortes, *Monitoring the microcirculation*. J Clin Monit Comput, 2012. 26(5): p. 361-6.
96. Vollmer, C.W., M. ; Weber, A. ; Bauer, I. ; Mathes, A. ; Picker, O. , *Melatonin improves gastric mucosal microcirculatory perfusion and maintains intestinal barrier function during haemorrhagic shock in dogs*. European Journal of Anaesthesiology, 2014. 31(Volume 31 Supplement 52, June 2014, p 66–67): p. 66-67.
97. Orbegozo Cortes, D., et al., *Normobaric hyperoxia alters the microcirculation in healthy volunteers*. Microvasc Res, 2015. 98: p. 23-8.
98. Li, H., et al., *Papaverine improves sublingual blood flow in patients with septic shock*. J Surg Res, 2015. 195(1): p. 271-6.
99. Pappenheimer, J.R. and K.Z. Reiss, *Contribution of solvent drag through intercellular junctions to absorption of nutrients by the small intestine of the rat*. J Membr Biol, 1987. 100(2): p. 123-36.
100. Hildebrand, L.B., et al., *Effects of vasopressin on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract in anesthetized pigs in septic shock*. Anesthesiology, 2007. 106(6): p. 1156-67.
101. Errington, M.L. and M. Rocha e Silva, Jr., *Vasopressin clearance and secretion during haemorrhage in normal dogs and in dogs with experimental diabetes insipidus*. J Physiol, 1972. 227(2): p. 395-418.
102. Wong, P.C., et al., *Nonpeptide angiotensin II receptor antagonists. VIII. Characterization of functional antagonism displayed by DuP 753, an orally active antihypertensive agent*. J Pharmacol Exp Ther, 1990. 252(2): p. 719-25.
103. Rhaleb, N.E., et al., *DuP 753 is a specific antagonist for the angiotensin receptor*. Hypertension, 1991. 17(4): p. 480-4.
104. Creteur, J., *Gastric and sublingual capnometry*. Curr Opin Crit Care, 2006. 12(3): p. 272-7.
105. Brzozowski, T., *Role of renin-angiotensin system and metabolites of angiotensin in the mechanism of gastric mucosal protection*. Curr Opin Pharmacol, 2014. 19: p. 90-8.
106. Welsch, U., T. Deller, and S. Elsberger, *Sobotta Lehrbuch Histologie: Unter Mitarbeit von Thomas Deller*. 2011: Elsevier Health Sciences Germany.
107. Edul, V.S., et al., *Dissociation between sublingual and gut microcirculation in the response to a fluid challenge in postoperative patients with abdominal sepsis*. Ann Intensive Care, 2014. 4: p. 39.
108. Salgado, D.R., et al., *Microcirculatory effects of angiotensin II inhibitors in patients with severe heart failure*. Clin Hemorheol Microcirc, 2013. 54(1): p. 87-98.
109. De Backer, D., et al., *Pathophysiology of microcirculatory dysfunction and the pathogenesis of septic shock*. Virulence, 2014. 5(1): p. 73-9.
110. Ellis, C.G., et al., *Effect of a maldistribution of microvascular blood flow on capillary O₂ extraction in sepsis*. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2002. 282(1): p. H156-64.
111. Mythen, M.G. and A.R. Webb, *The role of gut mucosal hypoperfusion in the pathogenesis of post-operative organ dysfunction*. Intensive Care Med, 1994. 20(3): p. 203-9.

112. Kararli, T.T., *Comparison of the gastrointestinal anatomy, physiology, and biochemistry of humans and commonly used laboratory animals*. Biopharm Drug Dispos, 1995. 16(5): p. 351-80.
113. Lo, M.W., et al., *Pharmacokinetics of losartan, an angiotensin II receptor antagonist, and its active metabolite EXP3174 in humans*. Clin Pharmacol Ther, 1995. 58(6): p. 641-9.
114. Al-Halawani, M.Z., et al., *Losartan-induced Ischemic Hepatocellular Hepatotoxicity: A Case Report and Literature Review*. J Family Med Prim Care, 2014. 3(3): p. 272-4.
115. Nygaard, B. and S. Strandgaard, *Marked hepatotoxicity associated with losartan treatment*. Blood Press, 1996. 5(3): p. 190-1.

Ein besonderer Dank gilt meinen Eltern Annette und Klaus Voß sowie meinem Bruder Paul Voß für die großartige Unterstützung während der Erarbeitung meiner Dissertation und dem gesamten Studium.