

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

**Einfluss von topischem Carbachol mit
Nitroglycerin auf die gastrale und orale
Mikrozirkulation im hämorrhagischen Schock**

Dissertation

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

vorgelegt von
Lara Susanne Lings

2020

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. O. Picker

Zweitgutachter: PD Dr. A. Assmann

I Zusammenfassung

Eine unzureichende Oxygenierung und Perfusion der gastrointestinalen Schleimhaut führt zu einer gestörten Barrierefunktion und kann zum Übertritt von Darmbakterien ins Blut führen¹. Systemisch wirkendes Carbachol als Struktur analogon des Neurotransmitters Acetylcholin und lokal wirkendes Nitroglycerin als NO-Donator zeigten jeweils bereits positive Auswirkungen auf die mukosale Mikrozirkulation im Schock^{2, 3}. Systemische Ansätze sind durch systemische Nebenwirkungen limitiert. Ziel dieser Studie war es zu untersuchen, ob der protektive Effekt von lokaler Nitroglycerinapplikation auf die Mikrozirkulation durch zusätzliche lokale Carbacholapplikation moduliert wird. Die Experimente wurden an fünf anästhesierten, beatmeten, weiblichen Foxhounds in wiederholter, randomisierter Reihenfolge verblindet durchgeführt. Die Hunde erhielten unter hämorrhagischen Bedingungen (Entzug von 20 % des Blutvolumens) in vier Gruppen lokal appliziert (1) Nitroglycerin+Carbachol(NC), (2) Carbachol+NaCl(CK), (3) Nitroglycerin+NaCl(NK) oder (4) NaCl+NaCl(KK). Systemische hämodynamische Parameter, mikrozirkulatorischer Fluss ($\mu flow$) und Hämoglobinsättigung (μHbO_2) wurden kontinuierlich aufgezeichnet. Die orale Mukosa wurde intermittierend mittels *incident dark field illumination* (CytoCam) untersucht. Statistik: Daten sind angegeben als MW \pm SEM, ANOVA für wiederholte Messungen und Bonferroni post-hoc-Test, $p < 0,05$. Die lokale gastrale Nitroglycerinapplikation führte zu einer signifikant erhöhten mikrozirkulatorischen Oxygenierung verglichen mit der Kontrollgruppe im Schock (KK = 38 ± 8 % vs NK = 55 ± 6 %). Die Zugabe von Carbachol konnte diesen Wert nicht weiter modulieren. Die alleinige lokale Carbacholapplikation veränderte die gastrale mukosale Oxygenierung im Schock nicht signifikant (CK = 53 ± 7 %, $p = 0,0577$). Die lokale Carbacholapplikation erhöhte an der oralen Mukosa die totale kapilläre Gefäßdichte (KK = $13,1 \pm 1,2$ vs CK = $16,6 \pm 1,1$ mm/mm²), die funktionelle kapilläre Gefäßdichte (KK = $5,0 \pm 1,4$ vs CK = $8,9 \pm 1,0$ mm/mm²), und die kapilläre Flussqualität (KK = $1,8 \pm 0,2$ vs CK = $2,3 \pm 0,2$) ohne jedoch die mikrozirkulatorische Perfusion ($\mu flow$, $\mu velocity$) zu verbessern. Nach gemeinsamer Applikation von Carbachol und Nitroglycerin konnte keine Veränderung der kapillären funktionellen oder totalen Gefäßdichte, der kapillären Flussqualität, oder der Perfusion ($\mu flow$, $\mu velocity$) beobachtet werden. Systemische Kreislaufparameter blieben durch die lokale Wirkstoffapplikation unbeeinflusst. Die Zugabe von Carbachol in der gewählten Dosierung zur lokalen Nitroglycerintherapie kann die Wirkung dieser auf die Mikrozirkulation also nicht maßgeblich beeinflussen.

II Summary

An insufficient oxygenation and perfusion of the gastrointestinal mucosa leads to a compromised barrier function and can permit enteral bacteria and toxins to trespass into the blood system. Systemically acting Carbachol, as a structural analogon to Acetylcholin and locally acting Nitroglycerin, as a NO-donor have shown a positive impact on mucosal microcirculation during shock. Systemic approaches are limited by their systemic side effects. The goal of this study was to investigate whether the protective effect of locally applied Nitroglycerin on mucosal microcirculation can be modulated through the additional topical application of Carbachol. The experiments were performed blinded, on five anaesthetised, ventilated, female foxhounds in randomized order. After induction of a mild hemorrhagic shock (removal of 20% of the total blood volume), the dogs received in four groups: (1) *Nitroglycerin+Carbachol (NC)* (2) *Carbachol+NaCl (CK)* (3) *Nitroglycerin+NaCl (NK)* (4) *NaCl+NaCl (KK)*, each locally applied. Systemic parameters, microvascular hemoglobinsaturation (μHbO_2) and flow (μflow) were recorded continuously. The oral mucosa was intermittently examined using incident dark field illumination (CytoCam). Statistics: Data presented as Means + SEM, Bonferroni for multiple comparisons, $p < 0,05$. The local gastric application of Nitroglycerin led to a significantly higher microcirculatory oxygenation compared to the control group during shock ($\text{KK} = 38 \pm 8$ vs $\text{NK} = 55 \pm 6$ %). Adding Carbachol to the locally administered Nitroglycerin did not alter these parameters. The single, local administration of Carbachol improved the microcirculatory oxygenation only slightly compared to the control group during shock ($\text{CK} = 53 \pm 7$ %, $p = 0,0577$). The local application of Carbachol led to a significant elevation of total vessel density during shock ($\text{KK} = 13,2 \pm 1,2$ vs $\text{CK} = 16,2 \pm 1,0$; HV60: $\text{KK} = 13,1 \pm 1,2$ vs $\text{CK} = 16,6 \pm 1,1$ mm/mm^2), as well as perfused vessel density during shock ($\text{KK} = 5,0 \pm 1,4$ vs $\text{CK} = 8,9 \pm 1,0$ mm/mm^2) and micro flow index during shock ($\text{KK} = 1,8 \pm 0,2$ vs $\text{CK} = 2,3 \pm 0,2$), without effecting the overall perfusion (μflow , $\mu\text{velocity}$). The simultaneous application of Carbachol and Nitroglycerin did not alter the total and functional vessel density, microvascular flow index or perfusion (μflow , $\mu\text{velocity}$). Systemic hemodynamic parameters were unaffected by the local application of agents. The addition of Carbachol in the chosen dosage to locally applied Nitroglycerin does thus not change its impact on microcirculation.

III Inhaltsverzeichnis

I	Zusammenfassung	iii
II	Summary	iv
III	Inhaltsverzeichnis	v
IV	Abkürzungsverzeichnis	vii
V	Abbildungsverzeichnis	xii
VI	Tabellenverzeichnis	xiv
1	Einleitung	1
2	Material und Methoden	6
2.1	Versuchstiere	6
2.2	Vorbereitende Operationen.....	6
2.3	Messungen	7
2.3.1	Kreislaufparameter	7
2.3.2	Blutgase	9
2.3.3	Körpertemperatur.....	10
2.3.4	Narkoseparameter	10
2.3.5	Mikrozirkulation	11
2.3.6	Gastrale Barrierefunktion	15
2.4	Interventionen	16
2.4.1	Wirkstoff-/ Placeboapplikation	16
2.4.2	Hypovolämie	17
2.5	Versuchsprotokoll	17
2.5.1	Allgemeines	17
2.5.2	Versuchsgruppen.....	20
2.6	Statistische Auswertung.....	21
3	Ergebnisse	22
3.1	Gastrale Mikrozirkulation	22
3.2	Orale Mikrozirkulation	23
3.3	Videomikroskopische Untersuchung der oralen Schleimhaut.....	26
3.4	Systemische Hämodynamik.....	29
3.5	Gastrale Barrierefunktion	33

4	Diskussion	35
4.1	Zentrale Aussagen.....	35
4.2	Methodenkritik.....	35
4.2.1	Experimentelle Rahmenbedingungen.....	35
4.2.2	Nitroglycerin- und Carbacholapplikation zur lokalen Therapie	36
4.2.3	Messung der oralen und gastralen Mikrozirkulation	37
4.2.4	Messung der gastralen Barrierefunktion.....	38
4.3	Ergebnisdiskussion	39
4.3.1	Ergebnisdiskussion der mukosalen Mikrozirkulation	39
4.3.2	Ergebnisdiskussion der gastralen Barrierefunktion	44
4.3.3	Ergebnisdiskussion der systemischen Kreislaufparameter	45
4.4	Klinische Relevanz.....	47
5	Literaturverzeichnis	49

IV Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
A	Ampere
A.	Arteria
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
aU	Arbitrary Units
AZ.	Aktenzeichen
BA	Blutabnahme
BGA	Blutgasanalyse
BH₂	Dihydrobiopterin
BH₄	Tetrahydrobiopterin
BL	Baseline
bzw.	Beziehungsweise
Ca²⁺	Calcium
CaO₂	Arterieller Sauerstoffgehalt
CGRP	Calcitonin-Gen-Related-Peptid
CK	Carbacholgruppe (Carbachol + NaCl)
Cl⁻	Chlorid
CO₂	Kohlendioxid
d-	Dezi-
DO₂	Systemisches Sauerstoffangebot
dPmax	Maximale Steilheit des arteriellen Druckanstiegs
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid

EKG	Elektro-Kardio-Gramm
eNOS	Epitheliale NO-Synthase
et al.	Et alii/aliae/alia
FiO₂	Inspiratorische Sauerstofffraktion
g	Gramm
Ggf.	Gegebenenfalls
GIT	Gastrointestinaltrakt
h	Stunde
Hb	Hämoglobin
HCO₃⁻	Hydrogencarbonat
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
H₂O	Wasser
HV	Hypovolämie
HWK	Hals-Wirbel-Körper
Hz	Hertz
HZV	Herz-Zeit-Volumen
i.a.	Intra arteriell
IDF	Incident-dark-field-Illumination
I.E.	Internationale Einheiten
k-	Kilo-
K⁺	Kalium
KG	Körpergewicht
KK	Kontrollgruppe (NaCl + NaCl)
l	Liter

M	Molar
m	Meter
m-	Mili
mAChR	Muskarinerger Acetylcholin-Rezeptor
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MFI	Mikrovaskulärer Flussindex
Min	Minute
mmHg	Milimeter-Quecksilbersäule
MOV	Multi-Organ-Versagen
MW	Mittelwert
μ-	Micro-
μflow	Mikrozirkulatorischer Fluss
μHbO₂	Mikrozirkulatorische Hämoglobinsättigung
μvelocity	Mikrozirkulatorische Flussgeschwindigkeit
n-	Nano-
N.	Nervus
Na⁺	Natrium
nAChR	Nikotinerger Acetylcholin-Rezeptor
NaCl	Natriumchlorid
NC	Nitroglycerin + Carbachol
NK	Nitroglycerin + Carbachol (Nitroglycerin + NaCl)
NO	Stickstoffmonoxid
NRW	Nordrhein-Westfalen
o.	oder

O₂	Sauerstoff
O₂C	Oxygen to see
PaCO₂	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PaO₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PC	Personal Computer
pH	Potentia hydrogenii
PPV	Anteil funktioneller Gefäße
PVD	Funktionelle Gefäßdichte
RES	Retikulo-Endotheliales-System
rHb	Lokale Hämoglobinmenge
rpm	revolutions per minute
RT	Retransfusion
SaO₂	Arterielle Sauerstoffsättigung
SAT	Sättigung
Sek	Sekunden
SEM	Standardfehler bezogen auf den Mittelwert
SIRS	Systemic Inflammatory Response Syndrom
SV	Schlagvolumen
SVR	Totaler peripherer Widerstand
SVV	Schlagvolumen-Variation
Tbl	Tabelle
TD	Thermodilution
TOF	Train-of-four
TVD	Totale Gefäßdichte

u.	und
u.a.	unter anderem
v.a.	vor allem
Vgl.	Vergleich
Vol%	Volumenprozent
vs.	gegen(übergestellt)
W	Watt
z.B.	zum Beispiel
ZVD	Zentralvenöser Druck
°C	Grad Celsius

V Abbildungsverzeichnis

- Abb. 1:** Beispielhafte Darstellung der Erfassung des *microcirculatory flow index* (MFI). Aus den, den einzelnen Quadranten zugeordneten Flussqualitäten (hier beispielhaft: 3;2;2;1) wird der Mittelwert bestimmt..... 14
- Abb. 2: Versuchsprotokoll im Zeitverlauf..... 19
- Abb. 3: Die gastrale Oxygenierung unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (15,20,30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit $MW \pm SEM$ für $n=5$ Hunde; * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe (KK).....23
- Abb. 4: Der orale Fluss unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Re-transfusion (RT) mit Zeitangabe (15,20,30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit $MW \pm SEM$ für $n=5$ Hunde; * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe (KK)24
- Abb. 5: Die perfundierte Gefäßdichte gemessen an der Lefze unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit $MW \pm SEM$ für $n=5$ Hunde; * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe (KK)26
- Abb. 6: Der MFI gemessen an der Lefze unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit $MW \pm SEM$ für $n=5$ Hunde; * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe (KK).....28
- Abb. 7: Der MAP unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (15,20,30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit $MW \pm SEM$ für $n=5$ Hunde; * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe (KK) ; ° = $p < 0,05$ zu CK..... 30

Abb. 8: Die Plasmasucrose-Konzentration unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit Median für n=5 Hunde; * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe (KK) ; # = $p < 0,05$ zum Ausgangswert (BL) innerhalb der Gruppe. 34

VI Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Ergebnisse der O2C-Messungen in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte	25
Tabelle 2: Ergebnisse der CytoCam-Messungen in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte	28
Tabelle 3: Ergebnisse der Blutgasanalyse in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte	31
Tabelle 4: Kreislaufparameter in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte	32
Tabelle 5: Plasmasucrosewerte in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte	33

1 Einleitung

Die intestinale Schleimhaut hat neben vielen Absorptions- und Sekretionsfunktionen noch eine weitere wichtige Funktion. Sie fungiert als Barriere zwischen den im Darmlumen enthaltenen Bakterien und Toxinen und dem aseptischen Blut und Lymphsystem. Für die Aufrechterhaltung dieser Barriere scheint eine ausreichende Perfusion und Oxygenierung, vor allem der Mukosa, zentral zu sein.^{4, 5} Der Anteil, der von den Mesenterialarterien versorgten Strukturen beträgt unter physiologischen Kreislaufbedingungen in Ruhe etwa 20-30% des Herzzeitvolumens. Von diesem Anteil veranschlagen Mukosa und Submukosa etwa 70%, wobei circa die Hälfte auf die oberflächlichsten Villusspitzen entfällt.⁶ Insgesamt zeigt die Mukosa des Gastrointestinaltrakts (GIT) mit ihrem hohen O₂-Bedarf durch verschiedene anatomische und physiologische Gegebenheiten eine ausgeprägte Vulnerabilität für hypoxische Zustände⁶.

Die unter physiologischem Stress im Allgemeinen, sowie unter hypovolämischen Bedingungen im Besonderen stattfindende Sympathikusaktivierung sorgt, entsprechend des von Cannon beschriebenen „*fight-or-flight*“-Mechanismus, für eine Umverteilung des Blutes zugunsten der überlebenswichtigen Organe (Herz, Gehirn, Niere, Lunge) und zuungunsten anderer Organe wie dem Magen-Darm-Trakt und der Haut⁷. Hierzu findet eine systemische α_1 -adrenerg-vermittelte Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße statt, die jedoch die Gefäße der überlebenswichtigen Organe nicht einschließt. Stattdessen findet in diesen Gefäßen durch das ausgeschüttete Adrenalin β_2 -adrenerg-vermittelt eine Vasodilatation statt. Hinzu kommt unter hypovolämischen Bedingungen eine, durch Angiotensin II vermittelte, disproportional erhöhte Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße im Mesenterialgebiet, verglichen mit der Vasokonstriktion im restlichen Körper. Diese ausgeprägte Vasokonstriktion im Mesenterialgebiet ist für mehr als 40% der Steigerung des totalen peripheren Widerstandes des gesamten Körpers verantwortlich.^{8, 9}

Kommt es durch die oben genannten Umstände in einer hypovolämischen Kreislaufsituation (hervorgerufen zum Beispiel durch Hämorrhagie oder einen septischen Schock mit relativer Hypovolämie) zu einer Ischämie im Mesenterialgebiet, so kann dies weitreichende lokale, sowie systemische Folgen haben.

Insbesondere der Perfusion der Mukosa scheint eine zentrale Rolle für den Erhalt der zellulären Integrität zuzukommen. Eine Minderperfusion des Splanchnikusgebietes, wie sie regelhaft durch genannte Umverteilungsphänomene im Schock auftritt, gilt als eine der Hauptursachen für die Entstehung von lokalen Schleimhautschäden des Magens^{10, 11}. Bei kritisch Kranken Patienten finden sich regelhaft erosive Veränderungen der Magenmukosa. Bereits 24 Stunden nach Aufnahme auf eine Intensivstation finden sich bei 75 – 100% der Patienten Erosionen der Magenschleimhaut¹⁰.

Durch eine ischämiebedingte Hyperpermeabilität der epithelialen Mukosa kann es zu einer Translokation von Bakterien und Endotoxinen aus dem Darmlumen in die mesenterialen Lymphknoten und weitere extraintestinale Gewebe kommen^{1, 4, 5, 12}.

Auch unter physiologischen Kreislaufbedingungen sind geringe Mengen an Endotoxinen im Pfortaderblut zu finden¹³. Normalerweise werden diese geringen Anteile vom Retikulo-Endothelialen-System (RES) während der Leberpassage herausgefiltert und gelangen so nicht in den systemischen Kreislauf¹⁴⁻¹⁶. Bei einem verschobenen Verhältnis zwischen Endotoxinlast und Retikulo-Endothelialer-Filterkapazität zugunsten der Endotoxämie (zum Beispiel durch Translokation) kann dies nicht mehr vollständig gewährleistet werden^{17, 18}. In Studien fand sich u.a. nach Trauma und Hämorrhagie eine Minderung der Retikulo-Endothelialen-Filterkapazität^{16, 19, 20}.

Darüber hinaus konnte bereits belegt werden, dass die Mukosa selbst Produktionsort sowohl verschiedener Akute-Phase-Proteine^{21, 22} als auch proinflammatorischer Cytokine ist^{23, 24}. Dabei ist insbesondere die Cytokinproduktion unter septischen²⁴⁻²⁶, sowie unter hämorrhagischen Bedingungen erhöht²⁷. So ist der Darm nicht nur ein entscheidender Wirkungsort hinsichtlich der immunologischen und metabolischen Antwort auf einen kritischen Krankheitszustand, sondern selbst zu einem Teil als ursächlich zu sehen.

Zusammengenommen kann eine Ischämie im Splanchnikusgebiet mit den aufgeführten möglichen pathophysiologischen Folgen (bakterielle Translokation, gesteigerte proinflammatorische Aktivierung) eine systemische Inflammation verursachen und das Entstehen eines Multi-Organ-Versagens (MOV) begünsti-

gen.²⁸ Daher ist die Erhaltung der adäquaten Oxygenierung und Perfusion im Mesenterialgebiet und die damit verbundene Aufrechterhaltung der mukosalen Barrierefunktion schon seit längerer Zeit Gegenstand intensiver Forschung.

Systemische Therapieansätze waren hierbei oft durch systemische Nebenwirkungen limitiert. So erhöht beispielsweise eine systemische Therapie mit Vasokonstriktoren wie Noradrenalin den mittleren arteriellen Druck (MAP), senkt gleichzeitig aber die Splanchnikusperfusion und ist hierdurch in der klinischen Anwendung limitiert²⁹. Bei anderen Krankheitsbildern sind lokale Therapieansätze bereits erprobt, wie beispielsweise die inhalative Applikation von Prostanoiden zur Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie³⁰. Somit scheint die topische Therapie ein potentieller vielversprechender Versuchsansatz zur Verbesserung der regionalen Mikrozirkulation und Barrierefunktion. Allerdings gibt es bislang wenig Daten zum Einfluss der topischen Therapie im Gastrointestinaltrakt.

In einer Versuchsreihe, bei der der Effekt einer lokalen Applikation des NO-Donors Nitroglycerin an der Mund- und Magenschleimhaut von Hunden unter hämorrhagischen Bedingungen untersucht wurde, konnte eine Verbesserung der Oxygenierung der Magenschleimhaut im Vergleich zur Kontrollgruppe gezeigt werden, ohne eine Veränderung systemischer Kreislaufparameter hervorzurufen³.

In derselben Versuchsreihe wurde die Barrierefunktion der gastralen Mukosa durch Messung der Sucrosepermeabilität evaluiert. Hier zeigte sich, dass die lokale Nitroglycerinapplikation, die in der Kontrollgruppe beobachtete Erhöhung der Plasmasucrosewerte abmildern konnte³. Dies ist ein Hinweis, dass Nitroglycerin protektive Auswirkungen auf die mukosale Barrierefunktion während eines milden hämorrhagischen Schocks beim Hund hat. Überraschenderweise führte Nitroglycerin als potenter Vasodilatator unter hämorrhagischen Bedingungen zu keiner Verbesserung der mikrozirkulatorischen Perfusion der Magenschleimhaut. Denkbar wäre, dass im hämorrhagischen Schock durch die Sympathikusbedingte Vasokonstriktion keine Vasodilatation durch Nitroglycerin möglich ist. In dieser Situation könnte eine Stimulation des Parasympathikus eine zusätzliche Vasodilatation ermöglichen. Da eine systemische Sympathikusblockade im

hämorrhagischen Schock häufig die Kreislaufinsuffizienz verstärkt, wäre die lokale Stimulation von muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren ein potentieller Therapieansatz.

Carbachol ist ein Acetylcholin-Analogon und wirkt agonistisch am muskarinergen Acetylcholin-Rezeptor (mAChR). Vor allem über die Bindung am muskarinergen M1 und M3 Rezeptor wird die vasodilatatorische Wirkung von Carbachol vermittelt.³¹⁻³⁵

Hu et al. konnten in einer tierexperimentellen Studie an Hunden zeigen, dass Carbachol als Parasympathomimetikum als Zusatz zur oralen Volumensubstitution im Schock nach Verbrennungstrauma die intestinale mukosale Perfusion erhöht².

Lesko et al. konnten in einer Versuchsreihe zeigen, dass die cholinerge Stimulation am mAChR auf einer Monolayer aus Ferkelkolonzellen durch Carbachol sich positiv auf den transepithelialen Widerstand der Monolayer auswirkt³⁶. Carbachol scheint also *in-vitro* neben seiner vasodilatativen Wirkung auch eine positive Wirkung auf die Integrität von Epithelien zu haben. Der Einfluss auf die Integrität von Epithelien *in-vivo* ist bislang nicht bekannt.

Im Gegensatz zu Acetylcholin ist im Carbacholmolekül die Acetylgruppe durch die Carbamylgruppe ersetzt, weshalb es verlangsamt durch die Acetylcholinesterase abgebaut wird und in Folge dessen eine längere Halbwertszeit von 1h aufweist³⁷.

Carbachol könnte also ergänzend zu Nitroglycerin die Sympathikus-bedingte Vasokonstriktion aufheben und somit die Perfusion steigern. Zusätzlich könnte es ergänzend durch seinen direkten Effekt auf die Integrität von Epithelien die Barrierefunktion *in-vivo* – neben der Verbesserung durch die gesteigerte Oxygenierung unter Nitroglycerin – steigern.

Vor diesem Hintergrund sollte in dieser Arbeit untersucht werden, inwiefern eine zusätzliche Carbacholapplikation zu Nitroglycerin die regionale Mikrozirkulation und Barrierefunktion modulieren kann.

Die zentralen Fragestellungen dieser Arbeit lauten somit:

1. Wird der protektive Effekt von Nitroglycerin auf die mikrozirkulatorische Oxygenierung unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen durch zusätzliche lokale Carbacholapplikation moduliert?
2. Welchen Effekt hat die additive Gabe von Carbachol auf die Barrierefunktion *in-vivo*?
3. Hat die Kombination beider Vasodilatoren Carbachol und Nitroglycerin systemische Nebenwirkungen?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchstiere

Die Versuche (n = 20) wurden nach Genehmigung des Landesamts für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW (AZ 84-02.04.2012.A152) durchgeführt und alle beteiligten Experimentatoren erhielten vor Versuchsbeginn eine versuchstierkundliche Einführung für wissenschaftliche Mitarbeiter, Doktoranden und Studenten zum Erwerb des Fachkundenachweises bzw. ggf. eine Ausnahmegenehmigung gemäß §9 des geltenden Tierschutzgesetzes.

Als Versuchstiere dienten fünf gesunde, weibliche Foxhounds außerhalb des Oestrus mit einem Gewicht von 28-36 kg, welches durch standardisierte Fütterung konstant gehalten wurde.

Die Hunde wurden in der *Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben* der Universität Düsseldorf gehalten und mit Standardnahrung (Hd-H extrudiert V3236, ssniff Spezialdiät GmbH, Soest) gefüttert. Vor den Versuchen unterlag der jeweilige Hund einer 12 h Nahrungskarenz mit Wasser *ad libitum*.

Zwischen den Versuchen lag für die Hunde jeweils eine dreiwöchige Pause zur adäquaten Erholung in Hinblick auf verwendete Pharmaka, Narkotika und die Störung des Tag-Nacht-Rhythmus durch die lange Narkosedauer.

Die Hunde wurden im Vorfeld der Versuche schrittweise an die Experimentatoren, sowie die, für die Experimente zur Verfügung stehenden Räumlichkeiten gewöhnt.

2.2 Vorbereitende Operationen

Alle Hunde wurden im Vorfeld der Versuche operiert um die wiederholten arteriellen Katheterisierungen und arteriellen Blutentnahme zu erleichtern und um eine komplikationslose Heilung der entsprechenden Punktionsstellen nach den einzelnen Versuchen zu gewährleisten.

Dazu wurden beide Arteriae carotides unter aseptischen Bedingungen in Allgemeinanästhesie (Propofol, Isofluran, Lachgas, Piritramid) frei präpariert und in oberflächliche Hautschlingen eingebettet³⁸.

2.3 Messungen

2.3.1 Kreislaufparameter

Herzfrequenz und EKG

Während der Versuche wurde ein Drei-Kanal-EKG mittels Nadelelektroden kontinuierlich abgeleitet, woraus R-Zacken getriggert die Herzfrequenz bestimmt wurde (Chart 5.5.6.)

Blutdruck

Der arterielle Blutdruck wurde kontinuierlich in der Aorta ascendens über einen, über die A. carotis eingeführten, flüssigkeitsgefüllten druckfesten Katheter (Durchmesser: 5F; PULSIOCATH arterieller Thermodilutionskatheter PV2015L20, Pulsion Medical Systems AG, München, GER) gemessen. Die präzise Lage des Katheters wurde über die korrekte Darstellung der arteriellen Druckkurve gesichert.

Der verwendete Druckwandler (Druckwandler Modell P23 ID, Gould StathamR, Elk Grove, USA) wurde auf Herzhöhe, orientierend am Processus spinosus des 7. HWK beim liegenden Hund ausgerichtet und unmittelbar vor jedem Versuch mittels Gauerwaage (HSE Druckeichgerät Typ 367, Hugo Sachs Elektronik, March,UK) kalibriert.

Der mittlere arterielle Druck (MAP) wurde durch Integration der Originalsignale berechnet (Chart 5.5.6).

Die Spülung des Katheters wurde mit heparinierter Kochsalzlösung durchgeführt (1000 I.E. Heparin in 500ml NaCl 0,9%).

Die kontinuierlich gemessenen Daten von Elektrokardiogramm (EKG) und arterieller Blutdruckkurve wurden mittels eines Universalverstärkers (11-G4145-01,

Gould Inc., Cleveland, OH, USA) verstärkt und nach analog/digital Umwandlung (Powerlab/800®, 400 Hz, ADInstruments, Pty Ltd., Castle Hill, AUS) auf einem PC mit geeigneter Software (Chart v. 4.2., ADInstruments, Pty Ltd., Castle Hill, AUS) gespeichert.

Zur weiteren Auswertung der Daten diente das Programm Chart 5.5.6 (ADInstruments, Castle Hill, AUS) im Analysis Modus.

Thermodilution und Pulskonturanalyse

Die Messung des Herzzeitvolumens und Berechnung der peripheren Widerstände erfolgte mittels transpulmonaler Thermodilution. Die transpulmonale Thermodilution (PiCCO 4.2, PULSION Medical System AG, Feldkirchen,GER) wurde zu Beginn und im Verlauf des Experiments nach jeder Interventions- oder Kontrollphase durchgeführt.

Hierfür wurden dem Hund 10 ml einer eisgekühlten Kochsalzlösung als Indikator im Bolus über eine Venenverweilkanüle im Vorderlauf (16G, Vasofix® Safety, B.Braun Melsungen AG, Melsungen,GER) verabreicht. Nachdem die Injektattemperatur am Injektionsort gemessen wurde (PiCCO Monitoring Kit PV8215-2, Pulsion Medical System AG, Feldkirchen, GER), wurde die Temperaturentwicklung in der Aorta ascendens über eine Thermistorsonde im Thermodilutionskatheter (ULSIOCATH arterieller Thermodilutionskatheter PV2015L20, Pulsion Medical System AG, Feldkirchen, GER) registriert und hierzu in Relation gesetzt.

Da der Abfall der Bluttemperatur und dessen zeitlicher Verlauf von der Menge des durchflossenen Blutvolumens und der Blutflussgeschwindigkeit abhängig ist, lässt sich nach der Stewart-Hamilton-Gleichung das Herzzeitvolumen (HZV) berechnen:

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

T_B : Bluttemperatur vor Injektion

T_I : Injektattemperatur

V_I : Injektatvolumen

K : Korrekturkonstante (setzt sich aus spez. Gewicht und Wärme von Blut und Injektat zusammen)

$\int \Delta T_B \cdot dt$: Fläche unter der Thermodilutionskurve

Die initiale Thermodilution diente zusätzlich als Kalibrierung für die Pulskonturanalyse, welche eine kontinuierliche Aufzeichnung weiterer Kreislaufparameter ermöglicht. Dazu gehören neben dem HZV und dem Schlagvolumen (SV) auch die Schlagvolumen-Variation (SVV) als Parameter der Volumenreagibilität des Herzen. Außerdem liefert die Pulskonturanalyse den Wert der maximalen Steilheit des arteriellen Druckanstiegs (dPmax) als Index der linksventrikulären Kontraktilität.

Für die Darstellung der Ergebnisse wurden die intermittierend, mittels transpulmonaler Thermodilutionstechnik gemessenen Daten verwendet, da diese genauer sind.

Des Weiteren ist die Berechnung des systemischen Gefäßwiderstandes (SVR) aus der arteriovenösen Druckdifferenz pro Flussmenge möglich. Da der zentralvenöse Druck (ZVD) nicht direkt gemessen wurde, wurde der SVR hier approximativ wie folgt bestimmt:

$$SVR \approx \frac{MAD}{HZV}$$

2.3.2 Blutgase

Am Ende jeder Interventions- oder Kontrollphase wurde eine arterielle Blutprobe mit heparinisierten Spritzen (PICO 50, Radiometer Medical ApS, Brønshøj, DEN) entnommen. Daraus wurden mittels eines Blutgasanalysegerätes (ABL 700, Radiometer GmbH, Willich, GER) die Blutgase P_aO_2 und P_aCO_2 , die Säure-Base-Haushaltsparameter pH, HCO_3^- , sowie die Elektrolyte Ca^{2+} , K^+ , Na^+ und Cl^- bestimmt. Außerdem ermittelte das Gerät Hämoglobin, Oxyhämoglobin, Carboxyhämoglobin, Laktat und Glukose.

Der vom Gerät bestimmte Hämatokrit wurde durch Zentrifugation des arteriellen Blutes (Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, GER) für 4 Min bei 13000 rpm in heparinisierten Mikro-Hämatokrit-Kapillaren (Länge 75 mm, Durchmesser 1,15 mm, Brand GmbH, Wertheim, GER) verifiziert.

Aus den gemessenen Werten wurde die arterielle Sauerstoffsättigung (S_aO_2) mittels einer für Hunde modifizierten Form der Hill-Formel berechnet³⁹:

$$SaO_2[\%] = 100 \cdot \frac{10^{(2,5198 \cdot \log pO_2 + 1,1804 \cdot (pH-7) - 0,047234 \cdot T - 2,3621)}}{1 + 10^{(2,5198 \cdot \log pO_2 + 1,1804 \cdot (pH-7) - 0,047234 \cdot T - 2,3621)}}$$

Außerdem wurde aus den gemessenen Werten der arterielle O₂-Gehalt (CaO₂) berechnet⁴⁰:

$$CaO_2 = \frac{Hb \cdot 1,34 \cdot S_{art}O_2}{100} + (pO_2 \cdot 0,0031)$$

Das systemische Sauerstoffangebot DO₂ wurde wie folgt berechnet:

$$DO_2 = HZV * \frac{CaO_2}{100}$$

2.3.3 Körpertemperatur

Entsprechend der thermoneutralen Indifferenztemperatur für Hunde wurde die Raumtemperatur im Labor auf 24±1 °C gehalten⁴¹. Während der Versuche wurde die Bluttemperatur der Hunde in der Aorta ascendens über den Thermosensor des Thermodilutionskatheters (vgl. 2.3.1) gemessen und wenn nötig durch Zudecken der Hunde konstant bei 38°C gehalten.

2.3.4 Narkoseparameter

Atem- und Narkosegase

Die in- und expiratorische Konzentration von O₂, CO₂ und Sevofluran wurde kontinuierlich mittels eines konventionellen Atemgasmonitors (Capnomac Ultima, Datex Division of Instrumentarium Corp., Helsinki, FIN) im Nebenstrom gemessen. Alle drei Parameter, sowie der Atemwegsdruck, wurden mittels eines Universalverstärkers (11-G4145-01, Gould Inc., Cleveland, OH, USA) verstärkt und nach analog/digital Umwandlung (Powerlab/800®, 400 Hz, ADInstruments, Pty Ltd., Castle Hill, Australia) auf einem PC mit geeigneter Software (Chart v. 4.2., ADInstruments, Pty Ltd., Castle Hill, AUS) gespeichert.

Die fortführende Auswertung erfolgte mit dem Programm Chart v5.5.6 (ADInstruments, Castle Hill, AUS) im Analysis Modus (vgl. Kapitel 2.3.1.).

Relaxometrie

Das Monitoring der Relaxierung wurde mittels *train-of-four* (TOF-WATCH®, Organon Technika B.V., NED) durchgeführt. Dabei wurde beim narkotisierten Hund der N. ischiadicus mit 15 mA stimuliert. Der an der entsprechenden Pfote möglichst weit distal befestigte Beschleunigungssensor maß den, auf die Stimulation durch Muskelkontraktur folgenden Ausschlag der Pfote. Die Elektroden waren korrekt platziert, wenn sich vor Beginn der Relaxierung eine TOF-Ratio von 1,0 erzielen ließ. Während der Versuche wurde eine TOF-Ratio von 0 erreicht und aufrechterhalten. Die Narkose wurde nach Beendigung des Messzeitraums solange fortgesetzt bis klinisch und relaxometrisch ein Relaxantienüberhang ausgeschlossen werden konnte.

2.3.5 Mikrozirkulation

Laser-Doppler und Weißlichtspektrometrie

Zur Evaluation der Mikrozirkulation der Mund- und Magenschleimhaut wurde in den Versuchen ein Gewebefotospektrometrie-System verwendet, welches die postkapilläre O₂-Sättigung (μHbO_2) und die lokale Hämoglobinmenge ($r\text{Hb}$) über Weißlichtspektrometrie sowie die mikrovaskuläre Flussgeschwindigkeit ($\mu\text{velocity}$) und den mikrovaskulären Fluss (μflow) über Laser-Doppler kontinuierlich erfasst (O2C Typ LW2222 Version 2, LEA Medizintechnik GmbH Gießen, GER).

Bei dem Verfahren der Weißlichtspektrometrie wird weißes Licht mit einem Wellenlängenspektrum von 500-800 nm von der Illuminationssonde ins Gewebe eingestrahlt. Hier wird das Licht von ubiquitär vorhandenen Mitochondrien gestreut. Nach Durchlaufen des Gewebes kann ein kleiner Teil des Lichtes an der Oberfläche von der Detektionssonde wieder erfasst werden. Das Licht wird dabei auf seinem Pfad im Gewebe durch das Auftreffen auf dort zirkulierende Erythrozyten in bestimmten Wellenlängenbereichen - abhängig vom Blutfarbstoff (v.a. Hämoglobin) und dessen O₂-Sättigung - absorbiert und somit in seiner Farbe verändert. Es werden die von der Detektionssonde gemessenen Spek-

tren erfasst und diese mit Referenzspektren des Hämoglobins verglichen. Darüber kann die genaue Sauerstoffsättigung [%] angegeben werden. Zudem kann durch die Messung der Lichtabschwächung (Absorption), die durch das Hämoglobin hervorgerufen wird, auf die lokale Hämoglobinmenge (rHb) geschlossen werden. Die Angabe des rHb erfolgt in *arbitrary units* [aU].⁴²

Beim Laserdoppler generiert ein Diodenlaser im CW-Modus Licht bei 820 nm mit einer Leistung von 3 mW. Das Licht dringt wie oben beschrieben ins Gewebe ein, wird hier von den Mitochondrien gestreut und an der Oberfläche detektiert. Da das Licht durch die Mitochondrien in alle Raumrichtungen gestreut wird, entstehen, selbst bei einem komplexen, dreidimensionalen Kapillarnetz, immer auch Vektoren, die parallel zur Blutflussrichtung der Erythrozyten laufen. Trifft das Laserlicht auf einen bewegten Erythrozyten, so werden die Lichtwellen in ihrer Frequenz, entsprechend des Doppler-Shifts, abhängig v.a. von der Geschwindigkeit der Erythrozyten verschoben. Anhand der frequenzverschobenen Anteile des Laserlichts im Verhältnis zu dem weitaus größeren Anteil an nicht frequenzverschobenem Laserlicht kann die Anzahl der bewegten Erythrozyten errechnet werden. Aus dem Produkt der Geschwindigkeit v_i und der Anzahl der Erythrozyten mit dieser Geschwindigkeit N_i lässt sich summiert über alle auftretenden Geschwindigkeiten \sum_i der mikrovaskuläre Blutfluss berechnen. Die hierbei verwendete Einheit [aU] = *arbitrary units* ist eine dimensionslose Einheit, die in diesem Fall dem gemessenen Partikelvolumenstrom (Anzahl der Teilchen x Hz-Dopplershift) entspricht:

$$\text{Blutfluss} = \sum_i v_i \cdot N_i$$

Da das emittierte Licht in Gefäßen >100 µm komplett absorbiert wird, erfasst das O2C nur nutritive Gefäße.⁴²

Das O2C misst überwiegend postkapillär, da aufgrund der Volumenverteilung des Blutes im mikrovaskulären Gefäßsystem (venös 75%, kapillär 14%, arteriell 11%) von einer Dominanz der Messsignale kapillär-venösen Ursprungs ausgegangen werden kann⁴².

Die Detektion erfolgt über Glasfasersonden, wobei sich die Detektionstiefe des Sensors durch den Abstand von Sensor und Lichtquelle ergibt. So kann der erfasste Bereich auf die Mukosa beschränkt werden.

Zur Durchführung wurde eine Mikrosonde (LM-10, LEA Medizintechnik GmbH, Gießen, GER) über eine zuvor gelegte Magensonde atraumatisch in den Magen vorgeschoben und hier locker an die Schleimhaut angelegt. Außerdem wurde eine Flachsonde (LF-2, LEA Medizintechnik GmbH, Gießen, GER) an der Wangenschleimhaut des Hundes platziert. Die korrekte Lage beider Sonden wurde durch die kontinuierliche Darstellung und Beurteilung der Signalspektren auf dem angeschlossenen O2C-Monitor sichergestellt.

Als Grundlage für die statistische Auswertung wurden die Mittelwerte der letzten fünf Minuten (150 Spektren von jeweils 2 Sekunden Dauer) vor der nächsten Intervention verwendet.

Videomikroskopie der oralen Mukosa

Die orale Mikrozirkulation wurde zusätzlich zum Ende jeder Kontroll- bzw. Interventionsphase mittels Videomikroskopie beurteilt. Die verwendete Kamera (CytoCam, Braedius Medical, Huizen, NLD) arbeitet nach dem Prinzip der „*incident dark field illumination*“ (IDF)⁴³. Die Auflichtbeleuchtung wird hier aus konzentrisch um das Objektiv angebrachten Dioden emittiert. Das emittierte Licht korrespondiert dabei in seiner Wellenlänge von 530 nm mit dem isobestischen Punkt der Absorptionsspektren von Oxy-/Desoxyhämoglobin. So wird eine optimale optische Absorption, unabhängig vom Oxygenierungsgrad des Hämoglobins, gesichert. Es entsteht ein Bild von dunkel dargestellten Erythrozyten vor einem weiß-gräulichen Hintergrund. Die Belichtung der Dioden erfolgt gepulst synchron zu den Einzelbildaufnahmen. Diese Form des stroboskopischen Abbildens beugt Artefakten, hervorgerufen durch Bewegungen des Blutes, vor.⁴⁴

Es wurden zu jedem Messzeitpunkt fünf Videos mit je 101 *Frames* aufgezeichnet.

Die Auswertung erfolgte mittels geeigneter und in verschiedenen Studien evaluierter Software (CytoCam Tools 1.7.8, Braedius Medical, Huizen, NLD) auf einem handelsüblichen PC.⁴⁵⁻⁴⁸

Die hierbei ermittelten Werte waren die kapilläre Dichte „*total vessel density*“ (TVD) [mm/mm^2], die funktionelle kapilläre Dichte „*perfused vessel density*“ PVD [mm/mm^2] und der sich aus den beiden Werten ergebende relative Anteil an durchbluteten Kapillaren „*proportion of perfused vessels*“ (PPV) [%]. In die Auswertung wurden nur Gefäße mit einem Durchmesser $<20 \mu\text{m}$ einbezogen.⁴⁹

Des Weiteren wurde durch eine manuelle, verblindete Auswertung der „*microcirculatory flow index*“ (MFI) als Maß für die Flussqualität, wie von de Backer et al. beschrieben, bestimmt⁴⁹. Zusammengefasst wurden die Aufnahmen zunächst in vier Quadranten geteilt. Im Anschluss wurde für jeden Quadranten einzeln die Flussqualität mit Hilfe einer Ordinalskala von 0 bis 3 bewertet. Hierbei galt: 0= kein Fluss; 1= intermittierender Fluss; 2= träger Fluss und 3= normaler Fluss. Zuletzt wurde für jede Aufnahme der Mittelwert aus den vier Quadranten gebildet.

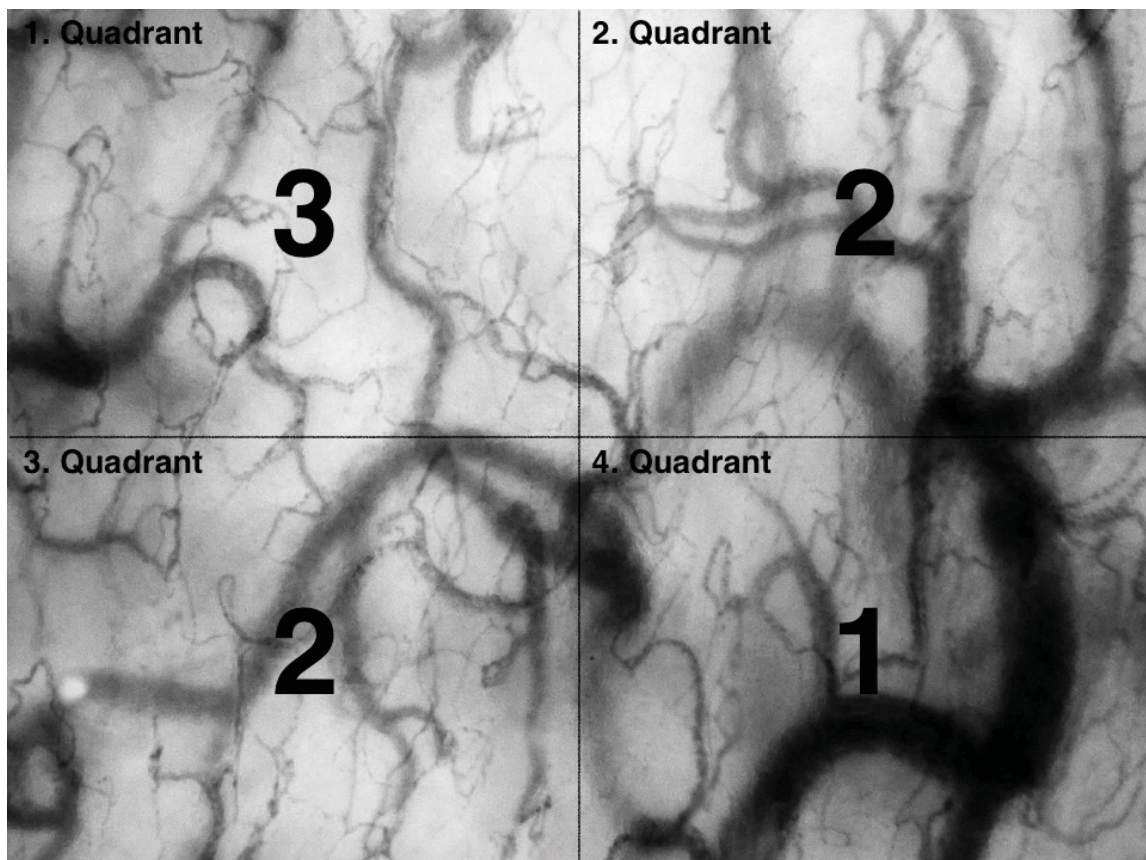


Abb. 1: Beispielhafte Darstellung der Erfassung des *microcirculatory flow index* (MFI). Aus den, den einzelnen Quadranten zugeordneten Flussqualitäten (hier beispielhaft: 3;2;2;1) wird der Mittelwert bestimmt.

2.3.6 Gastrale Barrierefunktion

Zur Bestimmung der gastrointestinalen Transport- und Barrierefunktion wurde allen Versuchsgruppen vor der Schockinduktion über eine Magensonde das Disaccharid Sucrose (D-Sucrose, Carl Roth GmbH und CoKG, Karlsruhe, GER) gelöst in Wasser (1,7 mg/kg KG) im Bolus verabreicht (2,45ml/kgKG).

Unter physiologischen Bedingungen kann Sucrose weder die gastrale Mukosa überwinden, noch im Magen enzymatisch abgebaut werden. Direkt nach dem Verlassen der gastralen Region wird das Disaccharid rapide durch das im Dünndarm vorhandene Enzym Sucrose-Isomaltase gespalten. Daher findet man unter physiologischen Bedingungen nur eine minimale Menge Sucrose im Blutplasma. Unter kompromittierten Bedingungen wie z.B. im hämorrhagischen Schock, kann die Barrierefunktion beeinträchtigt sein und Sucrose die gastrale Mukosa überwinden. Im Blutplasma wird die Sucrose nicht weiter gespalten. Daher kann über das Sucrose-Plasma-Level gezielt die Barrierefunktion der gastralen Mukosa beurteilt werden.⁵⁰

Im Versuch wurden hierzu halbstündlich Blutproben entnommen (vgl 2.5.1.). Die Proben wurden wie von Fiehn und Kind beschrieben aufbereitet⁵¹: Dazu wurde das in 6 ml EDTA Röhrchen (Vacutainer K2EDTA 10,8 mg, Plymouth, UK) entnommene Blut umgehend bei 0 °C und 3000 g für 15 Min zentrifugiert (Rotina 420®, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, GER). 30 µl Plasma wurden mit 400 µl Extraktionslösung versetzt. Die Extraktionslösung bestand aus Aceton, Isopropanol und einer Stocklösung (20 mM Lösung aus Ribitol und H₂O) im Verhältnis 2000:1000:3. Das Ribitol diente als interner Standard. Anschließend wurde das Gemisch homogenisiert (Vortex-Genie 1 Touch Mixer, Scientific Industries, INC, Bohemia, USA) und für fünf Minuten im 4 °C kalten Raum geschüttelt. Nach weiterer Zentrifugation bei 0 °C und 20800 rpm für 2 Min (Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, GER) wurde der flüssige Überstand in neue Reaktionsgefäße gefüllt. Diese wurden jeweils mit einem sanften Stickstoff Strom begast und anschließend bei -80 °C in Dunkelheit bis zur weiteren Verarbeitung gelagert. Während der gesamten Prozedur wurden die Proben auf Eis gelagert.

Die Derivatisierung, sowie die Auswertung mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie, erfolgte in einem externen Labor wie von Fiehn und Kind beschrieben⁵¹. Die Spitzenwerte der Plasmakonzentration wurden auf die korrespondierenden Ribitolwerte normiert und als relative Werte pro ml Probenvolumen angegeben.

2.4 Interventionen

2.4.1 Wirkstoff-/ Placeboapplikation

Während der Versuche wurde den Hunden nach 30 Min verblindet und in randomisierter Reihenfolge in vier Gruppen jeweils

(1) NC: Nitroglycerin + Carbachol

(2) CK: Carbachol + NaCl

(3) NK: Nitroglycerin + NaCl

(4) KK: NaCl+ NaCl

verabreicht. Die orale Applikation erfolgte kontinuierlich während des weiteren Versuchs über Spritzenpumpen. Auch die gastrale Applikation erfolgte analog zur oralen Applikation kontinuierlich, jedoch wurde hier vor Beginn der kontinuierlichen Gabe ein Bolus zur Aufsättigung des Wirkstoffspiegels im Magenumen verabreicht. Genauere Informationen zu Dosierung und Applikationsgeschwindigkeit sind in Kapitel 2.5.2. aufgeführt. Die orale Applikation erfolgte dabei über einen speziell angefertigten Applikationsschlauch (0,058 inch Innendurchmesser, 0,077 inch Außendurchmesser), welcher die Flachsonde umfassend (Vgl. 2.3.5.) befestigt wurde. Die gastrale Applikation erfolgte über eine Magensonde, welche auch gleichzeitig die Mikrosonde (Vgl. 2.3.5.) führte, sodass die Applikation direkt am Messort der Sonde erfolgte. Die Wirkstoffe wurden jeweils im Verhältnis 1:1 in NaCl 0,9 % gelöst.

2.4.2 Hypovolämie

Nach 30-minütiger Wirkstoff-/Placeboapplikation wurde ein milder hämorrhagischer Schock durch Entnahme von 20 % des angenommenen Blutvolumens (angenommenes Gesamtblutvolumen: 80 ml/kg KG) induziert. Das Blut wurde über eine Venenverweilkanüle am linken Vorderlauf sowie über den arteriellen Katheter (vgl. 2.3.1.) entnommen, heparinisiert (10 I.E. Heparin/ml Blut) und gewärmt gelagert. Die Hypovolämie wurde für 60 Min aufrechterhalten. Bei dieser milden Hämorrhagie ist von keinerlei Folgeschäden für die Tiere auszugehen⁵². Das verwendete Heparin wurde nach der Retransfusion mittels Protamin (MEDA Pharma GmbH & Co. KG, Bad Homburg, GER) in entsprechender Menge (1 I.E. Protamin pro 2 I.E. Heparin) antagonisiert.

2.5 Versuchsprotokoll

2.5.1 Allgemeines

Um die Einflüsse von Temperatur und zirkadianer Rhythmik auf die Stoffwechselvariablen zu minimieren begannen alle Versuche um 8 Uhr morgens bei einer Raumtemperatur von 24 (± 1) °C (vgl. 2.3.3.) in einem leicht abgedunkelten Raum. Die Platzierung des Hundes auf dem gepolsterten Versuchstisch erfolgte stressfrei in Rechtsseitenlage. Dem Hund wurde eine Venenverweilkanüle (18G Vasofix® Safety, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, GER) in den Hinterlauf gelegt, über die eine Propofolinjektion von 4 mg/kg KG (Propofol 1% MCT-Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., GER) verabreicht wurde. Nach Wirkeintritt wurde der Hund unter direkter laryngoskopischer Sicht orotracheal intubiert (McIntosh-Spatel Gr.5: Medicon eG, Tuttlingen, GER; Tubus:Lo Contour TM Murphy 9.0, Mallinckrodt Medical, Athlone, IRE) und die automatische, volumenkontrollierte Beatmung wurde mit einem Tidalvolumen von 12,5 ml/kg KG⁵³ und einer FiO₂ von 0,3 gestartet. Es wurde ein halbgeschlossenes Narkosesystem (Aestiva 5, Verdampfer Tec 7, Datex Ohmeda, heute GE Healthcare, Chalfont St.Giles, UK) verwendet. Die Narkose wurde mit Sevofluran (Sevorane, Abbvie Deutschland GmbH & Co.KG,

Ludwigshafen, GER) in einer endtidalen Konzentration von 3 Vol %, entsprechend einem MAC von 1,5 bei Hunden⁵⁴ aufrechterhalten. Da Abweichungen im Kohlendioxidpartialdruck sich auf die Mikrozirkulation in der Magenschleimhaut auswirken können⁵⁵ wurde der expiratorische Kohlendioxidpartialdruck stetig, über eine Anpassung der Atemfrequenz, bei 35 mmHg gehalten. Die Augen der Hunde wurden mittels Augensalbe (Bepanthen® Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, GER) während der Versuchszeit vor Austrocknung geschützt. Für die Thermodilution und den Aderlass wurde am Vorderlauf eine zweite Venenverweilkanüle (16G, Vasofix® Safety, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, GER) gelegt. Außerdem wurden EKG-Elektroden (Vgl. 2.3.1.) sowie das Relaxometer (vgl. 2.3.4.) angelegt. Nach Punktion der linken A. carotis communis in Seldinger-Technik wurde der Thermodilutionskatheter in der Aorta platziert und über einen druckfesten Verlängerungskatheter (PE Verlängerungskatheter, Laboratoires Pharmaceutiques VYGON, Ecoen, FR) mit dem Druckwandler zur Blutdruckmessung (vgl. 2.3.1.) und mit dem PICCO-System (vgl. 2.3.1.) verbunden. Danach wurde eine Magensonde gelegt durch die die Mikrosonde zur Messung der gastralen Mikrozirkulation vorgeschoben wurde, sowie die Flachsonde unter der linken Lefze platziert (vgl. 2.3.5.). Schließlich erfolgte die Muskelrelaxation mittels eines initialen Rocuroniumbolus (Rocuronium Inresa, Inresa Arzneimittel GmbH, Freiburg, GER) von 0,6 mg/kg KG gefolgt von einer kontinuierlichen Erhaltungsinfusion von 1 mg/kg/h über eine elektrische, druckgesteuerte Infusionspumpe in die Venenverweilkanüle am Hinterlauf. Nach Stabilisierung aller Messwerte wurden initial zwei Thermodilutionen (Abb.1:TD) zur Testung der Ergebnisse auf Replizierbarkeit, sowie fünf videomikroskopische Aufnahmen der Lefze durchgeführt (Vgl.2.3.5., Abb.1:V) und eine arterielle BGA (Abb.1: BGA) entnommen. Diese Messungen wurden wie in Abb.1 aufgezeigt alle 30 Min - vor jeder Interventionsphase – zusätzlich zu einer Entnahme von 4 ml-EDTA Blut (Abb.1: BA) wiederholt. Die Hunde durchliefen dabei in randomisierter Reihenfolge die vier Versuchsgruppen und dienten somit als ihre eigene Kontrolle. Alle Untersucher waren hinsichtlich der Pharmakagabe verblindet.

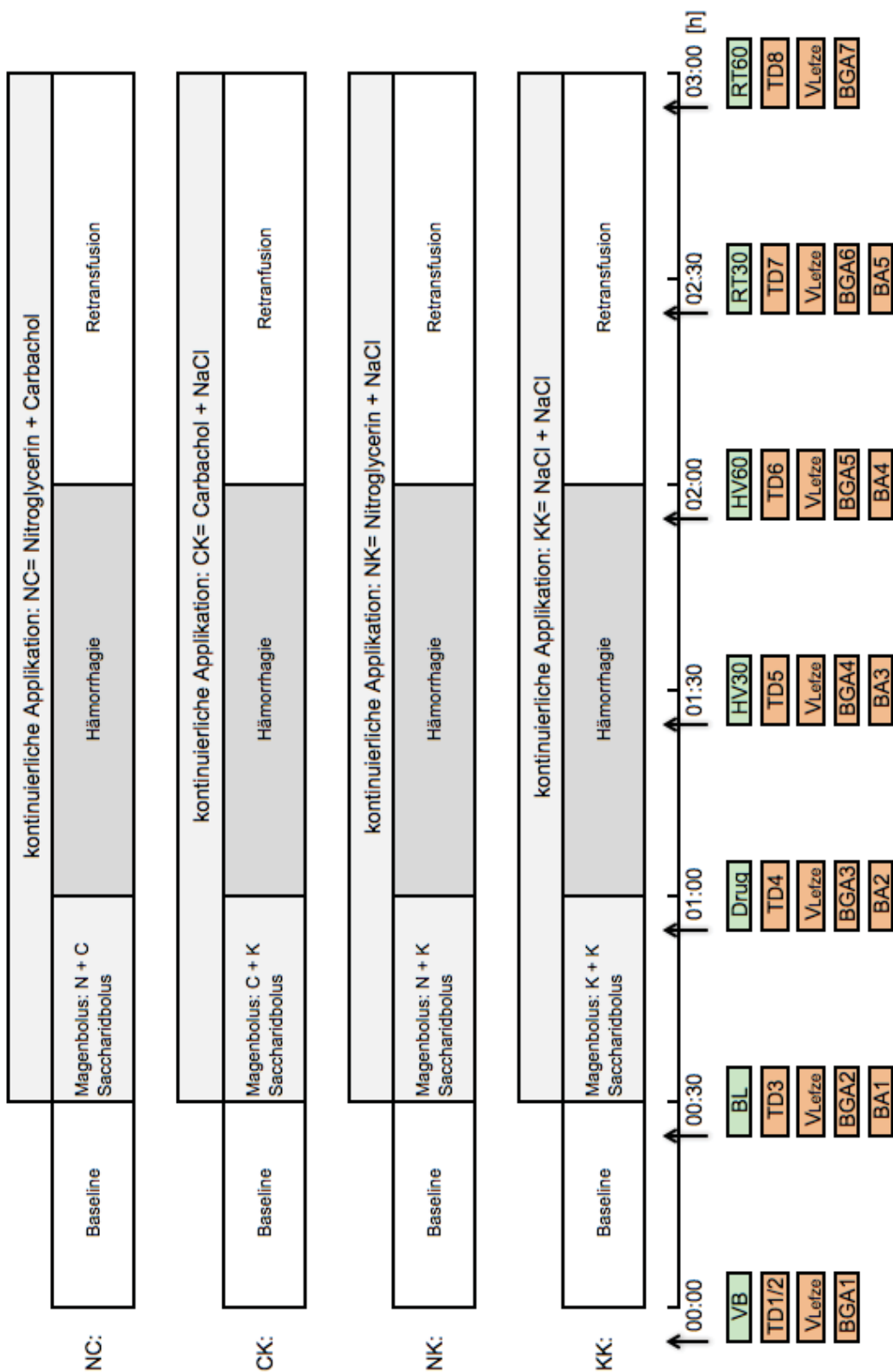


Abb. 2: Versuchsprotokoll im Zeitverlauf ; Messzeitpunkte: VB= Versuchsbeginn, BL= Baseline, Drug=Wirkstoff-/Placeboapplikation, HV= Hypovolämie, RT= Retransfusion; Wirkstoffe: C= Carbachol, N= Nitroglycerin, K= NaCl, TD = Thermodilution, V=Videomikroskopie, BGA= Blutgasanalyse, BA= Blutabnahme

2.5.2 Versuchsgruppen

(1) NC: Nitroglycerin + Carbachol

Um die Effekte von Carbachol in der Kombination mit Nitroglycerin auf die orale und gastrale Mikrozirkulation zu untersuchen, erhielten die Tiere zum Zeitpunkt "Baseline" einen gastralen Bolus Sucroslösung (vgl. 2.3.6) versetzt mit 20 µg/kg KG Carbachol (Carbamylcholine chloride von Sigma, C4382) und 25 µg/kg KG Nitroglycerin (Nitrolingual infus., G. Pohl-Boskamp & Co KG), mit einem Gesamtvolumen von 2ml /kg KG. Es folgte die kontinuierliche Applikation einer NaCl-Lösung (NaCl 0,9% Fresenius Infusionslösung, Fresenius Kabi DL-GmbH, Bad Homburg, GER) versetzt mit Carbachol (5 µg/ml) und Nitroglycerin (250 µg/ml) mit einer Rate von 0,66 ml/kg KG/h an der Mund- und 2 ml/kg KG/h an der Magenschleimhaut.

(2) CK: Carbachol + NaCl

Um zu evaluieren welche der Effekte in der Kombinationsgruppe (1) NC auf Carbachol als Verum zurück zu führen sind, erhielten die Tiere zum Zeitpunkt "Baseline" - analog zur Gruppe (1) - einen gastralen Bolus Sucroslösung versetzt mit 20 µg/kg KG Carbachol, in einem Gesamtvolumen von 2ml /kg KG. Es folgte die kontinuierliche Applikation einer NaCl-Lösung mit Carbachol (5 µg/ml) mit einer Rate von 0,66 ml/kg KG/h an der Mund- und 2 ml/kg KG/h an der Magenschleimhaut.

(3) NK: Nitroglycerin + NaCl

Um zu evaluieren welche der Effekte in der Kombinationsgruppe (1) NC auf Nitroglycerin als Verum zurück zu führen sind, erhielten die Tiere zum Zeitpunkt "Baseline" - analog zur Gruppe (1) - einen gastralen Bolus Sucroslösung versetzt mit 25 µg/kg KG Nitroglycerin, in einem Gesamtvolumen von 2ml /kg KG. Es folgte die kontinuierliche Applikation einer NaCl-Lösung mit Nitroglycerin (250 µg/ml) mit einer Rate von 0,66 ml/kg Kg/h an der Mund- und 2 ml/kg KG/h an der Magenschleimhaut.

(4) KK: NaCl+ NaCl

Als Kontrollgruppe zur Evaluation welche der möglichen Zeit-Effekte in Gruppe (1)-(3) auf Störfaktoren wie Narkose oder Placebowirkung zurück zu führen sind, erhielten die Tiere in dieser Gruppe analog zu Gruppe (1)-(3) zum Zeitpunkt "Baseline" einen gastralen Bolus Sucroslösung. Äquivalent zu den o.g. Gruppen wurde NaCl-Lösung hinzugefügt, um die Bolusmenge von 2ml/kg KG zu erreichen. Es folgte die kontinuierliche Applikation einer NaCl-Lösung mit einer Rate von 0,66 ml/kg KG/h an der Mund- und 2 ml/kg KG/h an der Magenschleimhaut.

2.6 Statistische Auswertung

Die Ergebnisse sind als Mittelwerte +/- Standardfehler (SEM) angegeben. Es wurde eine Varianzanalyse für multiple Messungen (2-Wege ANOVA) durchgeführt gefolgt von einem Bonferroni *posthoc* Test (GraphPad Prism 6.0f for Windows, Graph Pad Software, La Jolla California, USA). Bei nicht-normalverteilten Datensätzen wurden die Ergebnisse als Median +/- Standardfehler des Medians angegeben. Es wurde der H-test nach Kruskal-Wallis für unabhängige Stichproben durchgeführt und der Friedmann-Test für verbundene Stichproben (GraphPad Prism 6.0f for Windows, Graph Pad Software, La Jolla California, USA). Das Signifikanzniveau wurde auf 95 % (entspricht $p < 0,05$) festgelegt.

3 Ergebnisse

3.1 Gastrale Mikrozirkulation

Bezüglich der gastralen Oxygenierung (μHbO_2) wurde durch die lokale Applikation der Substanzen in keiner der Gruppen unter physiologischen Kreislaufbedingungen eine Veränderung hervorgerufen (Tbl. 1). Die gastrale Oxygenierung sank in der Kontrollgruppe (KK) unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen von $77 \pm 3 \%$ auf $38 \pm 8 \%$ (HV30) ab. Dieser Effekt wurde durch die lokale Applikation von Nitroglycerin allein (NK) (BL: 81 ± 3 zu HV30: $55 \pm 6 \%$) abgeschwächt. Die zusätzliche Gabe von Carbachol hatte keinen additiven Effekt (NC) (BL: 83 ± 3 zu HV30: $57 \pm 4 \%$). Carbachol allein (CK) milderte den Abfall in der gastralen μHbO_2 zwar ab, jedoch nicht signifikant (BL: 75 ± 4 zu HV30: $53 \pm 7 \%$, $p=0,0577$). In der Retransfusionsphase war kein Unterschied zwischen den Gruppen mehr zu verzeichnen (Tbl. 1). (Abb. 3)

Auch die gastrale mikrozirkulatorische Flussrate ($\mu flow$) wurde durch die lokale Substanz-Applikation bei physiologischer Kreislaufbedingung nicht verändert (Tbl. 1). Nach Induktion der milden Hämorrhagie zeigte sich in allen Versuchsgruppen ein leichter nicht signifikanter Abfall des $\mu flow$ ohne Unterschied zur Kontrollgruppe (KK) (HV30: KK = 128 ± 10 vs. NK = 145 ± 21 vs. CK = 121 ± 19 vs. NC = 101 ± 13 aU) (Tbl. 1).

Auch in der gastralen mikrozirkulatorischen Flussgeschwindigkeit ($\mu velocity$) (HV30: KK= $15,7 \pm 0,8$ vs. NK= $17 \pm 1,3$ vs. CK= $16,2 \pm 1,7$ vs. NC= $14,4 \pm 0,8$ aU) und in der lokalen Hämoglobinemenge (rHb) zeigte sich entsprechend der Ergebnisse der Flussrate ein leichter, nicht signifikanter Abfall der Werte unter Hämorrhagie. Weder nach Substanzapplikation noch nach Induktion der Hämorrhagie zeigten sich Unterschiede zur Kontrollgruppe (KK). (Tbl. 1)

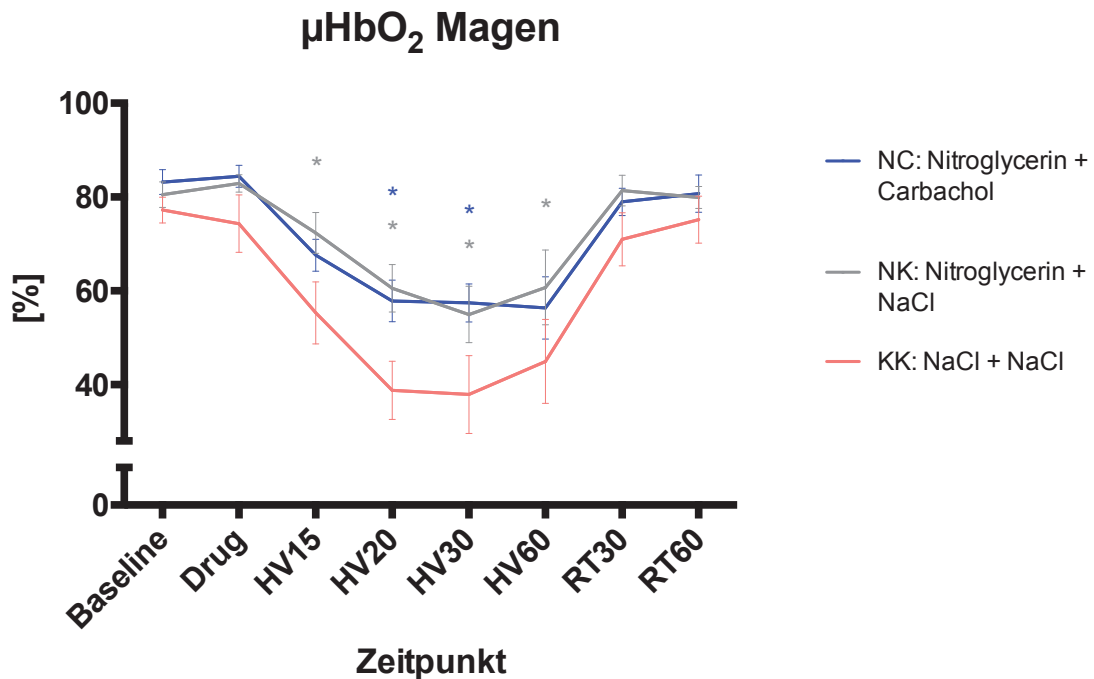


Abb. 3: Die gastrale Oxygenierung unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (15,20,30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit MW±SEM für n=5 Hunde; * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe (KK)

3.2 Orale Mikrozirkulation

Bezüglich des oralen μHbO_2 gab es unter physiologischen Kreislaufbedingungen keine Veränderungen durch die Substanzapplikation. Unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen gab es in keiner der Gruppen signifikante Unterschiede verglichen mit der Kontrollgruppe (KK). (Tbl. 1)

Unmittelbar nach der lokalen Substanzapplikation war in allen drei Versuchgruppen unter physiologischer Kreislaufbedingung der $\mu flow$ höher als in der Kontrollgruppe (KK) (Drug: KK= 71,8 ± 4,7 vs NK= 179,1 ± 36,2 vs CK= 144,7 ± 25,6 vs NC= 175,5 ± 43,3 aU). Während des Schocks gab es jedoch keine Unterschiede zwischen den Versuchgruppen. In der frühen Retransfusion war der $\mu flow$ in der Carbacholgruppe (CK) höher als in der Kontrollgruppe (KK) (RT30: KK= 82,9 ± 6,8 vs CK= 159,8 ± 34,9 aU) (Tbl. 1). (Abb. 4)

Die μ velocity verhielt sich während der milden Hämorrhagie analog zum μ flow und zeigte keinen Unterschied zwischen den Versuchsgruppen (Tbl. 1).

In den Messungen des oralen rHb ergab sich nach Applikation der Substanz unter physiologischen Kreislaufbedingungen keine Veränderung. Auch nach Induktion der Hypovolämie (HV15, HV20) zeigte sich vorerst keine Veränderung zwischen den Gruppen. Im Verlauf des Schocks zeigte sich zum Zeitpunkt HV30 eine signifikante Erhöhung des rHb in der Nitroglycerin Gruppe (NK) (HV30: KK= $59,8 \pm 4,8$ vs NK= $69,5 \pm 3,4$ aU) und zum Zeitpunkt HV60 ein signifikanter Unterschied zwischen der Nitroglycerin-/ Carbachol- (NK/CK) und der Kontrollgruppe (KK) (HV60: KK= $61,9 \pm 3$ vs NK= $76,1 \pm 3,5$ aU vs CK= $72,8 \pm 5,9$ aU). (Tbl. 1)

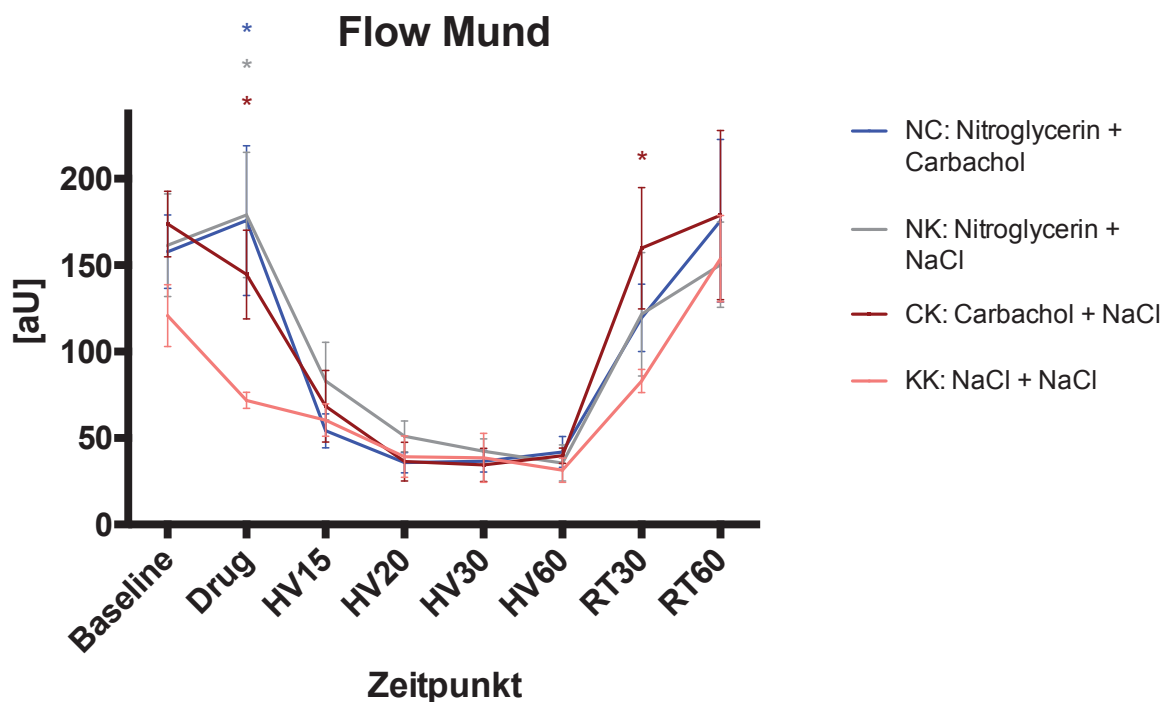


Abb. 4: Der orale Fluss unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Re-transfusion (RT) mit Zeitangabe (15,20,30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit $MW \pm SEM$ für $n=5$ Hunde; * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe (KK)

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

Variable	GR	BASELINE	DRUG	HV15	HV20	HV30	HV60	RT 30	RT 60
μHbO_2 gastral [%]	KK	77 ± 3	74 ± 6	55 ± 7 #	39 ± 6 #	38 ± 8 #	45 ± 9 #	71 ± 6	75 ± 5
	CK	75 ± 4	76 ± 2	59 ± 5 #	49 ± 9 #	55 ± 7 #	58 ± 5 #	70 ± 3	78 ± 2
	NK	81 ± 3	83 ± 2	72 ± 4 *KK	61 ± 5 #	55 ± 6 #	61 ± 8 #	81 ± 3	80 ± 2
	NC	83 ± 3	84 ± 2	68 ± 3 #	58 ± 4 #	57 ± 4 #	56 ± 7 #	79 ± 3	81 ± 4
Flow gastral [aU]	KK	154 ± 29	170 ± 9	126 ± 15	102 ± 7	128 ± 10	175 ± 21	191 ± 18	214 ± 26 *NC,CK
	CK	177 ± 11	195 ± 42	90 ± 21 #	89 ± 23 #	121 ± 19	117 ± 17 #	156 ± 31	141 ± 32 *KK
	NK	187 ± 26 *NC	201 ± 26	164 ± 34	134 ± 21	145 ± 21	190 ± 32	213 ± 31	186 ± 23
	NC	110 ± 14 *NK	170 ± 24	98 ± 19	88 ± 16	101 ± 13	115 ± 11	165 ± 22	134 ± 31 *KK
Velocity gastral [aU]	KK	18,7 ± 1,4	18,0 ± 0,8	16,0 ± 1,0	14,0 ± 1,0	15,7 ± 0,8	18,8 ± 1,4	19,9 ± 1,1	21,8 ± 1,9 *NC
	CK	19,4 ± 0,9	22,3 ± 3,1	16,0 ± 1,0	15,0 ± 1,0	16,2 ± 1,7	15,5 ± 1,3	19,0 ± 2,3	19,7 ± 1,9
	NK	20,7 ± 1,7 *NC	21,0 ± 2,1	19,0 ± 3,0	17,0 ± 1,0	17,0 ± 1,3	19,7 ± 2,3 *NC	21,9 ± 2,7	20,7 ± 2,9
	NC	14,8 ± 1,0 *NK	18,9 ± 1,8	14,0 ± 1,0	13,0 ± 1,0	14,4 ± 0,8	14,4 ± 0,5 *NK	17,6 ± 0,9	17,1 ± 2,0 *KK
rHb gastral [aU]	KK	55,9 ± 5,6	53,8 ± 5,7	51,0 ± 6,0	48,0 ± 18,0	47,1 ± 8,0	44,9 ± 6,0	53,5 ± 4,7	55,2 ± 6,4
	CK	49,3 ± 5,1	54,0 ± 6,7	45,0 ± 9,0	46,0 ± 9,0	52,4 ± 4,5	49,8 ± 3,5	42,6 ± 4,6	44,2 ± 6,5 *NK
	NK	60,4 ± 4,6	63,6 ± 3,6	58,0 ± 4,0	58,0 ± 4,0	55,4 ± 3,9	54,3 ± 2,7	64,4 ± 6,2 *CK	59,4 ± 5,9 *CK
	NC	55,2 ± 6,7	61,4 ± 5,6	53,0 ± 7,0	48,0 ± 17,0	46,9 ± 6,5	51,7 ± 6,0	53,1 ± 9,0	51,1 ± 8,2
μHbO_2 oral [%]	KK	85 ± 2	77 ± 2	62 ± 3 #	43 ± 5 #	40 ± 4 #	44 ± 4 #	77 ± 1	88 ± 2
	CK	89 ± 2	86 ± 2	62 ± 7 #	47 ± 5 #	44 ± 3 #	50 ± 3 #	81 ± 3	90 ± 3
	NK	83 ± 2	82 ± 4	65 ± 7 #	50 ± 6 #	43 ± 4 #	51 ± 3 #	78 ± 2	88 ± 2
	NC	88 ± 2	78 ± 2	59 ± 4 #	39 ± 3 #	40 ± 4 #	45 ± 2 #	79 ± 4	87 ± 2
Flow oral [aU]	KK	121 ± 18	72 ± 5 *CK,NK,NC	60 ± 9	39 ± 12 #	39 ± 14 #	31 ± 7 #	83 ± 7 *CK	154 ± 25
	CK	174 ± 19	145 ± 26 *KK	68 ± 21 #	36 ± 11 #	34 ± 10 #	40 ± 4 #	160 ± 35 *KK	179 ± 49
	NK	161 ± 30	179 ± 36 *KK	83 ± 22 #	51 ± 9 #	42 ± 7 #	36 ± 11 #	122 ± 36	150 ± 25
	NC	158 ± 21	176 ± 43 *KK	51 ± 10 #	36 ± 6 #	37 ± 6 #	42 ± 9 #	119 ± 19	176 ± 47
Velocity oral [aU]	KK	24,2 ± 2,9	18,7 ± 1,2 *NK,NC	16,0 ± 2,0	14,0 ± 2,0 #	14,9 ± 2,5	13,3 ± 1,0 #	20,2 ± 1,3 *CK	28,6 ± 2,5
	CK	27,0 ± 2,4	25,0 ± 2,6	17,0 ± 2,0 #	14,0 ± 2,0 #	14,0 ± 1,8 #	15,7 ± 1,9 #	29,3 ± 3,2 *KK	28,6 ± 4,5
	NK	26,7 ± 2,7	30,6 ± 2,8 *KK	20,0 ± 2,0	18,0 ± 2,0	17,6 ± 3,0 #	13,4 ± 1,6 #	24,4 ± 4,4	26,0 ± 2,2
	NC	25,4 ± 1,7	28,5 ± 5,4 *KK	16,0 ± 2,0 #	14,0 ± 1,0 #	14,4 ± 1,3	15,7 ± 2,1	24,1 ± 3,1	29,1 ± 4,8
rHb oral [aU]	KK	95,9 ± 2,8	90,0 ± 1,9 *NC	81,0 ± 4,0 #	70,0 ± 5,0 #	59,8 ± 4,8 #	61,9 ± 3,0 #	84,0 ± 4,3 #	89,4 ± 1,8
	CK	100,8 ± 1,9	97,8 ± 2,1	83,0 ± 3,0 #	72,0 ± 3,0 #	67,9 ± 2,3 #	72,8 ± 5,9 #	84,7 ± 4,0 #	92,5 ± 4,0
	NK	97,6 ± 2,9	96,3 ± 1,8	86,0 ± 2,0 #	77,0 ± 2,0 #	69,5 ± 3,4 #	76,1 ± 3,5 #	86,1 ± 3,4 #	92,8 ± 1,5
	NC	98,7 ± 3,1	100,2 ± 2,3 *KK	84,0 ± 2,0 #	71,0 ± 3,0 #	68,9 ± 3,7 #	70,4 ± 6,2 #	86,5 ± 6,3 #	92,7 ± 3,9

Legende 1: HV = Hypovolämie; RT = Retransfusion mit Zeitangabe (15,20,30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie; MW ± SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur jeweils angegebenen Gruppe (KK=NaCl-NaCl; CK=Carbachol-NaCl; NK=Nitroglycerin-NaCl; NC=Nitroglycerin-Carbachol) ; # = p < 0.05 zum jeweiligen Baseline-Wert

3.3 Videomikroskopische Untersuchung der oralen Schleimhaut

In der videomikroskopischen Untersuchung an der oralen Mukosa sah man in allen vier Versuchsgruppen einen Abfall der funktionellen Gefäßdicke (PVD) nach Induktion der Hypovolämie. Im späteren Schock (HV60) zeigte sich allein in der Carbacholgruppe (CK) ein deutlicher Anstieg der funktionellen Gefäßdicke auf den Ausgangswert. Allerdings hatte die Kombination mit Nitroglycerin keinen Einfluss (HV60: KK= $5,0 \pm 1,4$ vs CK= $8,9 \pm 1,0$ vs NC= $4,9 \pm 1,1$ mm/mm²). Die schnellere Erholung der Carbachol-Gruppe (CK) bezüglich der PVD zeigte sich auch in der frühen Retransfusionsphase noch, verglichen mit der Kontrollgruppe (KK). (RT30: KK= $8,5 \pm 2,0$ vs. CK= $13,5 \pm 1,3$ mm/mm²) (Abb. 6) (Tbl. 2)

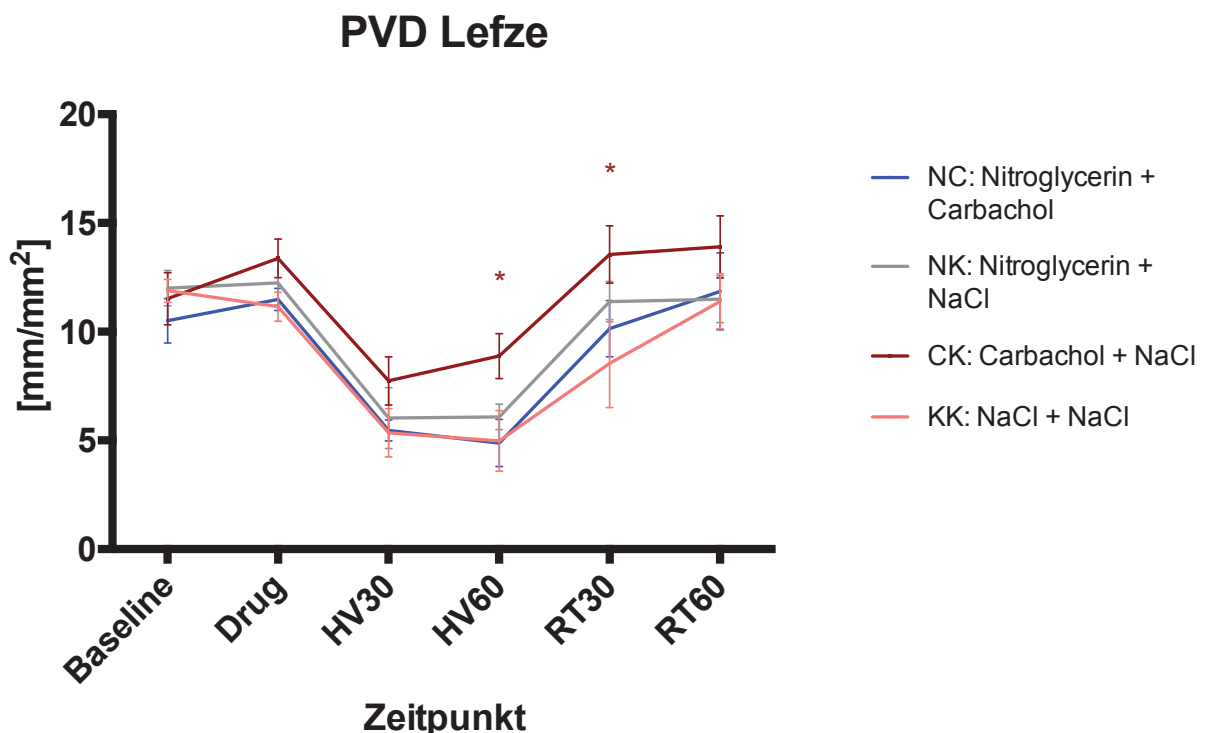


Abb. 5: Die perfundierte Gefäßdicke gemessen an der Lefze unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit MW±SEM für n=5 Hunde; * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe (KK)

Bezüglich der totalen Gefäßdichte (TVD) an der oralen Mukosa sah man in allen vier Versuchsgruppen unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen einen signifikanten Abfall verglichen mit dem jeweiligen Baseline-Wert. (KK: BL= $18,8 \pm 0,4$ zu HV30= $13,2 \pm 1,2$; CK: BL= $18,9 \pm 0,7$ zu HV30= $16,2 \pm 1,0$; NK: BL= $18,6 \pm 0,7$ zu HV30= $13,8 \pm 1,5$; NC: BL= $18,8 \pm 0,7$ zu HV30= $15,3 \pm 0,9$ mm/mm²). In der Carbacholgruppe (CK) war die totale Gefäßdichte über den kompletten Zeitraum der Hypovolämie, trotz des beschriebenen Abfalls signifikant höher als in der Kontrollgruppe (KK) (HV30: KK= $13,2 \pm 1,2$; CK= $16,2 \pm 1,0$ mm/mm²). Die gemeinsame Applikation von Carbachol und Nitroglycerin konnte zu keiner Erhöhung der totalen Gefäßdichte führen. (Abb. 5) (Tbl. 2)

Der Anteil der perfundierten Gefäße (PPV) zeigte unter Hämorrhagie keine Unterschiede zwischen den Gruppen. Entsprechend den Werten von TVD und PVD zeigte jedoch die Carbachol-Gruppe (CK) als einzige keinen Abfall im Schock (BL: $59,8 \pm 4,6$ zu HV30: $46,2 \pm 5,5$ zu HV60: $48,4 \pm 3,8$ %). In der frühen Retransfusionsphase zeigte die Carbacholgruppe (CK) einen signifikant höheren Anteil perfundierter Gefäße im Vergleich zur Kontrollgruppe (KK) (RT30: KK= $46,9 \pm 10,2$ vs CK= $66,0 \pm 4,4$ %). Auch hier konnte dies nicht durch die gemeinsame Applikation von Carbachol und Nitroglycerin reproduziert werden. (Tbl. 2)

Ähnlich der PVD sank der manuell bestimmte Flussindex (MFI) nach Induktion der Hypovolämie in allen vier Versuchsgruppen ohne Unterschiede zwischen den Gruppen signifikant zum Ausgangswert ab. Auch hier zeigte die Carbachol-Gruppe (CK) im späten Schock eine Erholung, während die zusätzliche Gabe von Nitroglycerin (CN) keinen Effekt hatte. (KK: HV30= $1,7 \pm 0,1$ zu HV60= $1,8 \pm 0,2$ vs NK: HV30= $1,5 \pm 0,3$ zu HV60= $1,7 \pm 0,2$ vs CK: HV30= $1,7 \pm 0,3$ zu HV60= $2,3 \pm 0,2$ vs NC: HV30= $1,6 \pm 0,3$ zu HV60= $1,8 \pm 0,2$). (Abb. 7) (Tbl. 2)

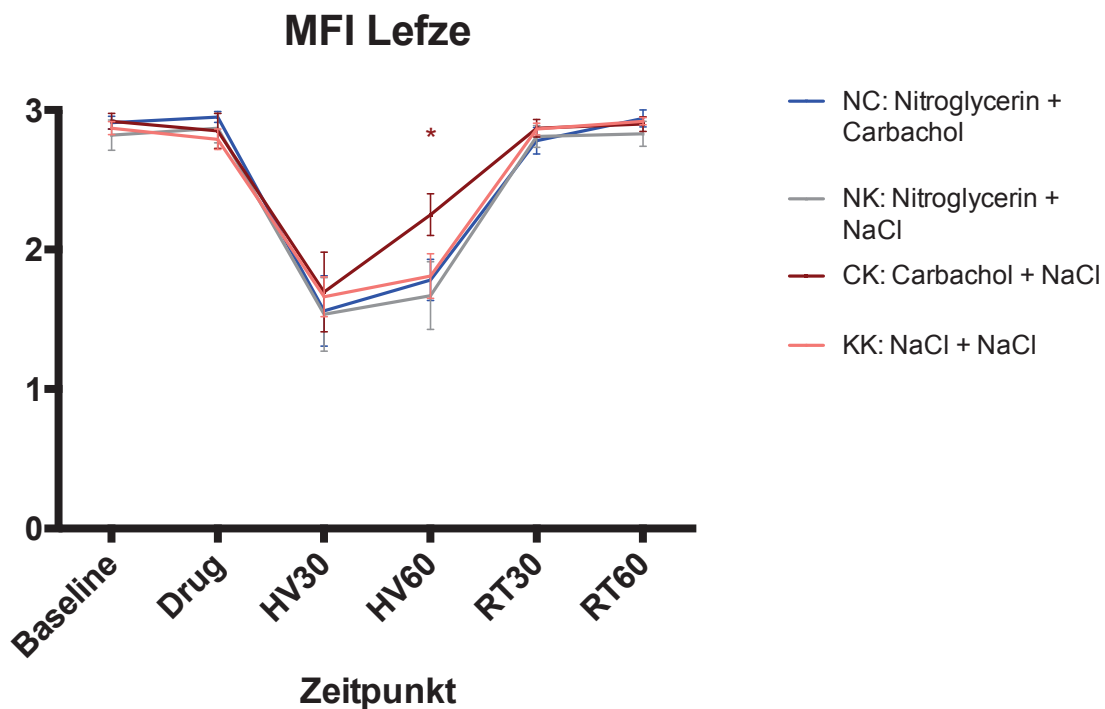


Abb. 6: Der MFI gemessen an der Lefze unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit MW±SEM für n=5 Hunde; * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe (KK)

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

Variable	GRUPPE	BASELINE	DRUG	HV30	HV60	RT 30	RT 60
TVD Lefze [mm/mm ²]	KK	18,8 ± 0,4	18,6 ± 0,6	13,2 ± 1,2	13,1 ± 1,2	17,9 ± 0,6	19,4 ± 0,8
	CK	18,9 ± 0,7	18,9 ± 0,8	16,2 ± 1,0	16,6 ± 1,1	20,1 ± 0,8	20,5 ± 1,2
	NK	18,6 ± 0,7	18,8 ± 0,8	13,8 ± 1,5	13,6 ± 0,6	19,2 ± 0,4	19,4 ± 0,6
	NC	18,8 ± 0,7	19,3 ± 0,5	15,3 ± 0,9	13,6 ± 1,4	18,8 ± 1,0	19,6 ± 1,2
PVD Lefze [mm/mm ²]	KK	11,9 ± 0,5	11,1 ± 0,7	5,3 ± 1,1	5,0 ± 1,4	8,5 ± 2,0	11,4 ± 1,3
	CK	11,5 ± 1,2	13,4 ± 0,9	7,7 ± 1,1	8,9 ± 1,0	13,5 ± 1,3	13,9 ± 1,4
	NK	12,0 ± 0,8	12,2 ± 1,0	6,0 ± 1,4	6,1 ± 0,6	11,4 ± 0,9	11,5 ± 1,1
	NC	10,5 ± 1,0	11,5 ± 0,5	5,5 ± 0,5	4,9 ± 1,1	10,1 ± 1,3	11,9 ± 1,8
PPV Lefze [%]	KK	61,8 ± 2,3	59,2 ± 3,0	40,3 ± 6,6	37,7 ± 7,1	46,9 ± 10,2	58,1 ± 4,5
	CK	59,8 ± 4,6	66,8 ± 3,5	46,2 ± 5,5	48,4 ± 3,8	66,0 ± 4,4	66,7 ± 3,2
	NK	64,0 ± 2,2	64,7 ± 3,4	42,4 ± 5,5	44,9 ± 4,3	59,4 ± 5,3	58,9 ± 5,0
	NC	53,8 ± 4,3	56,7 ± 2,2	40,4 ± 5,2	35,7 ± 4,7	51,5 ± 6,9	55,0 ± 10,6
MFI Lefze	KK	2,9 ± 0,1	2,8 ± 0,1	1,7 ± 0,1	1,8 ± 0,2	2,9 ± 0,0	2,9 ± 0,0
	CK	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1	1,7 ± 0,3	2,3 ± 0,2	2,9 ± 0,1	2,9 ± 0,1
	NK	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1	1,5 ± 0,3	1,7 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,8 ± 0,1
	NC	2,9 ± 0,1	3,0 ± 0,0	1,6 ± 0,3	1,8 ± 0,2	2,8 ± 0,1	2,9 ± 0,1

Legende 2: HV= Hypovolämie; RT=Retransfusion mit Zeitangabe (30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie; MW ± SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur jeweils angegebenen Gruppe (KK=NaCl-NaCl; CK=Carbachol-NaCl; NK=Nitroglycerin-NaCl; NC=Nitroglycerin-Carbachol) ; # = p < 0.05 zum jeweiligen Baseline-Wert

Folgende Qualitätskriterien wurden für die Beurteilbarkeit der videomikroskopischen Untersuchung benannt: Messungen wurden an mindestens drei verschiedene Stellen an der Lefze pro Zeitpunkt erhoben, Druckartefakte wurden ausgeschlossen, es lag keine Störung der Beurteilbarkeit durch Sekrete vor, Focus und Kontrast waren optimal eingestellt, es lagen keine Bewegungsartefakte vor.

3.4 Systemische Hämodynamik

Nach Induktion der Hypovolämie fiel in der Kontrollgruppe die DO_2 ab (BL= 14 ± 1 auf HV30= 8 ± 0 ml/kg/min), bedingt durch eine Reduktion des HZV (BL= 81 ± 4 auf HV30= 48 ± 1 ml/kg/min). Grund für diese Reduktion ist eine Abnahme des SV (BL= 24 ± 1 auf HV30= 15 ± 1 ml) bei gleichzeitig abfallender HF (BL= 114 ± 2 auf HV30= 109 ± 3 1/min). Als Folge der Reduktion des HZV sank der MAP (BL= 60 ± 2 auf HV30= 48 ± 3 mmHg). Kompensatorisch stieg der SVR an (BL= 22 ± 1 auf HV30= 31 ± 2 mmHg*min/l). Die über den Zeitverlauf stattfindende Dynamik der Kreislaufparameter fand sich entsprechend der Kontrollgruppe (KK) in den drei anderen Versuchsgruppen wieder. (Tbl. 4)

Weder im HZV noch im MAP zeigte sich nach lokaler Applikation der Pharmaka eine signifikante Veränderung verglichen mit den Baselinebedingungen. Ein milder Blutdruckabfall in der Nitroglycerin-Gruppe (NK), sowie in der Nitroglycerin+Carbachol-Gruppe (NC) führte bei einem milden Blutdruckanstieg in der Carbachol- und der Kontrollgruppe (CK und KK) nach Verum-/Placeboapplikation zu einem Unterschied von 8-9 mmHg zwischen den Gruppen. Dieser Unterschied zog sich durch den restlichen Versuch. Nach Induktion der Hypovolämie fiel in allen vier Versuchsgruppen der MAP signifikant zum jeweiligen Ausgangswert ab. Der MAP erholte sich in allen Versuchsgruppen im Verlaufe der Hypovolämie leicht und stieg in allen vier Versuchsgruppen nach Induktion der Reperfusion gleichermaßen über den Ausgangswert hinaus an. (Tbl. 4) (Abb. 8)

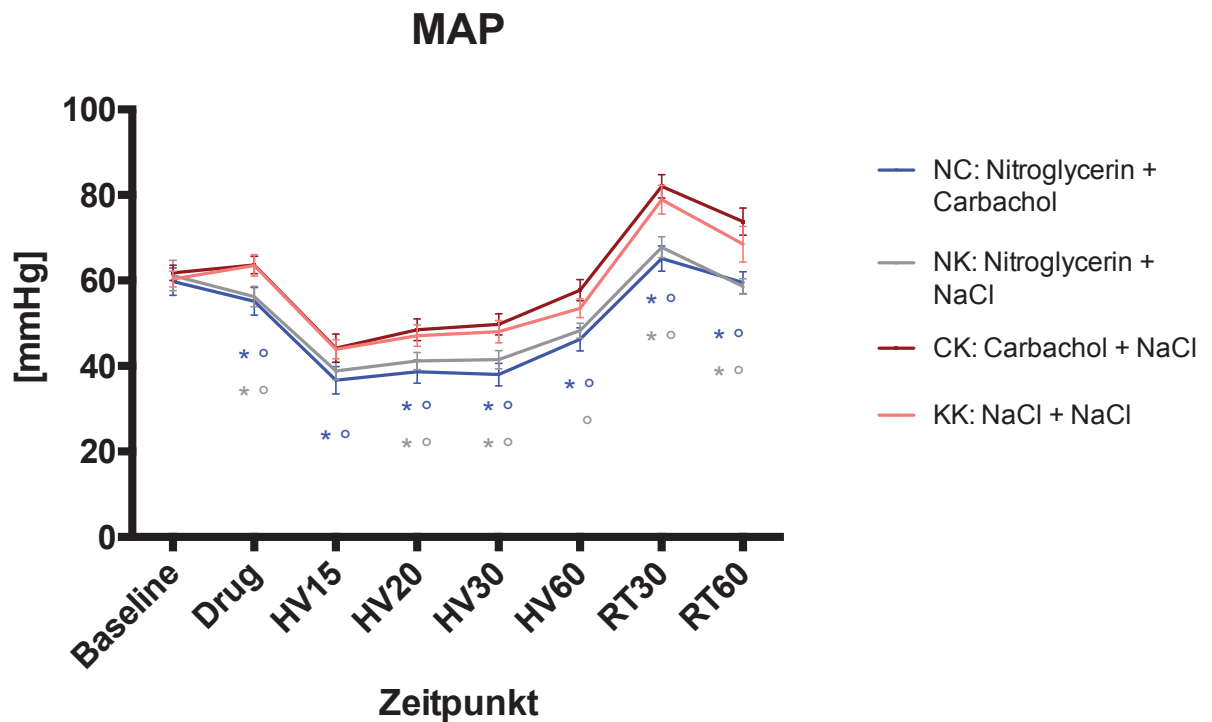


Abb. 7: Der MAP unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (15,20,30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit $MW \pm SEM$ für $n=5$ Hunde; * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe (KK) ; ° = $p < 0,05$ zu CK

Bezüglich des *SV*, der *HF* und des daraus resultierenden *HZV*, sowie dem *DO₂* zeigte sich in den 30 Minuten nach der lokalen Applikation der Pharmaka, sowie in der darauffolgenden hypovolämischen Kreislaufsituation in keiner der Gruppen ein Unterschied zur Kontrollgruppe. (Tbl. 4)

Weitere Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich *SAT*, *pCO₂*, *pO₂*, *pH*, *Laktat*, *HCO₃₋*, *Hb* und *Hkt* können Tabelle 3 entnommen werden.

Tabelle 3: Ergebnisse der Blutgasanalyse in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte

Variable	GRUPPE	BASELINE	DRUG	HV30	HV60	RT 30	RT 60
SaO ₂ [%]	KK	99 ± 0	99 ± 0	98 ± 0	98 ± 0	99 ± 0	99 ± 0
	CK	99 ± 0	99 ± 0	98 ± 0	98 ± 0	99 ± 0	99 ± 0
	NK	99 ± 0	99 ± 0	98 ± 0	98 ± 0	99 ± 0	99 ± 0
	NC	98 ± 0	98 ± 0	97 ± 0	98 ± 0	99 ± 0	99 ± 0
pCO ₂ [mmHg]	KK	35 ± 0	36 ± 0	40 ± 1	39 ± 1	36 ± 1	37 ± 0
	CK	35 ± 1	35 ± 1	41 ± 1	39 ± 1	36 ± 1	36 ± 1
	NK	36 ± 1	36 ± 1	42 ± 1	41 ± 1	37 ± 0	37 ± 1
	NC	36 ± 0	37 ± 0	43 ± 1	41 ± 1	37 ± 0	37 ± 1
pO ₂ [mmHg]	KK	151 ± 3	150 ± 3	146 ± 4	146 ± 4	156 ± 4	154 ± 4
	CK	147 ± 2	149 ± 4	144 ± 4	145 ± 3	158 ± 2	158 ± 3
	NK	150 ± 3	150 ± 3	140 ± 5	142 ± 4	159 ± 3	157 ± 3
	NC	147 ± 5	146 ± 4	134 ± 4	144 ± 5	162 ± 4	161 ± 5
pH	KK	7,40 ± 0,01	7,39 ± 0,01	7,32 ± 0,02	7,33 ± 0,02	7,37 ± 0,01	7,37 ± 0,01
	CK	7,40 ± 0,01	7,39 ± 0,01	7,31 ± 0,02	7,31 ± 0,02	7,36 ± 0,02	7,36 ± 0,02
	NK	7,39 ± 0,01	7,38 ± 0,01	7,30 ± 0,01	7,31 ± 0,01	7,35 ± 0,01	7,36 ± 0,01
	NC	7,39 ± 0,01	7,37 ± 0,01	7,29 ± 0,01	7,29 ± 0,01	7,34 ± 0,01	7,35 ± 0,01
HCO ₃ ⁻ [mmol/l]	KK	21 ± 0	21 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 0
	CK	21 ± 0	21 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 1	20 ± 0
	NK	21 ± 0	21 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	20 ± 0
	NC	21 ± 0	21 ± 0	20 ± 0	20 ± 0	19 ± 0	20 ± 0
Hb [g/100ml]	KK	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0
	CK	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0
	NK	12 ± 0	12 ± 0	13 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0
	NC	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0
Laktat [mmol/l]	KK	1,1 ± 0,1	1,3 ± 0,1	1,6 ± 0,2	1,6 ± 0,2	1,7 ± 0,2	1,6 ± 0,2
	CK	0,6 ± 0,1	0,8 ± 0,1	2,2 ± 0,6	2,6 ± 0,8	2,4 ± 0,7	2,4 ± 0,7
	NK	0,9 ± 0,2	1,1 ± 0,2	1,5 ± 0,1	1,6 ± 0,1	1,4 ± 0,1	1,3 ± 0,1
	NC	0,7 ± 0,0	1,0 ± 0,1	1,6 ± 0,2	2,0 ± 0,3	2,0 ± 0,4	1,9 ± 0,4
Hkt [%]	KK	37,4 ± 0,8	37,3 ± 0,8	37,7 ± 0,9	37,0 ± 0,7	36,6 ± 0,7	36,4 ± 0,8
	CK	37,1 ± 0,7	37,0 ± 0,7	37,9 ± 1,3	37,1 ± 1,3	36,2 ± 0,8	36,0 ± 0,7
	NK	37,7 ± 0,8	37,5 ± 0,7	38,3 ± 0,9	38,3 ± 1,0	37,3 ± 0,7	36,8 ± 0,5
	NC	37,0 ± 0,7	36,4 ± 0,9	37,5 ± 1,1	37,1 ± 1,1	36,2 ± 0,8	35,7 ± 0,7

Legende 3: HV= Hypovolämie; RT=Retransfusion mit Zeitangabe (30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie; MW ± SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur jeweils angegebenen Gruppe (KK=NaCl-NaCl; CK=Carbachol-NaCl; NK=Nitroglycerin-NaCl; NC=Nitroglycerin-Carbachol) ; # = p < 0.05 zum jeweiligen Baseline-Wert

Tabelle 4: Kreislaufparameter in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte

Variable	GRUPPE	BASELINE	DRUG	HV15	HV20	HV30	HV60	RT 30	RT 60
DO ₂	KK	14 ± 1 *CK	13 ± 1			8 ± 0 #	8 ± 0 #	14 ± 1	14 ± 1
[ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹]	CK	15 ± 1 *KK	14 ± 1 *NK,NC			8 ± 1 #	9 ± 1 #*NC	14 ± 1	15 ± 1 *NK
	NK	14 ± 1	13 ± 1 *CK			7 ± 1 #	9 ± 0 #	14 ± 1	13 ± 1 *CK
	NC	14 ± 0	13 ± 1 #*CK			8 ± 0 #	8 ± 0 #	14 ± 1	14 ± 1
SVR	KK	22 ± 1	24 ± 1			31 ± 2 #*NC	31 ± 2 #	29 ± 2 #*NC	24 ± 2
[mmHg ⁻¹ ·min]	CK	21 ± 1	22 ± 1			33 ± 4 #*NC	32 ± 3 #	28 ± 1 #*NC	23 ± 1
	NK	23 ± 2	22 ± 2			30 ± 2 #*NC	28 ± 1 #	24 ± 1	22 ± 1
	NC	21 ± 2	21 ± 2			25 ± 3 #*KK,CK,NK	29 ± 3 #	22 ± 1 *KK,CK	20 ± 1
HZV	KK	81 ± 4 *CK	81 ± 2			48 ± 1 #	52 ± 2 #	84 ± 4	88 ± 5
[ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹]	CK	90 ± 6 *KK	87 ± 5 *NK			47 ± 4 #	56 ± 3 #*NC	89 ± 5	95 ± 6 *NK
	NK	83 ± 5	78 ± 5 *CK			42 ± 2 #	51 ± 2 #	84 ± 4	81 ± 4 *CK,NC
	NC	88 ± 2	81 ± 2			47 ± 2 #	48 ± 2 #*CK	89 ± 3	89 ± 3 *NK
SV	KK	24 ± 1 *CK	24 ± 1			15 ± 1 #	16 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #*CK,NK
[ml]	CK	26 ± 1 *KK	25 ± 1 *NK,NC			14 ± 1 #	16 ± 1 #*NC	28 ± 1	30 ± 1 #*NK,CK,NC
	NK	25 ± 1	23 ± 1 *CK			13 ± 0 #	15 ± 1 #	26 ± 1	25 ± 1 *CK,CK
	NC	25 ± 2	23 ± 1 #*CK			14 ± 1 #	14 ± 1 #*CK	27 ± 1	27 ± 1 *CK
dPmax	KK	432 ± 24 *CK	400 ± 22 *CK			332 ± 22 #	324 ± 12 #	392 ± 11	428 ± 24
[mmHg ⁻¹ ·s]	CK	486 ± 17 *KK	452 ± 19 *KK			334 ± 21 #	362 ± 25 #	418 ± 30 #	454 ± 34
	NK	474 ± 21	416 ± 39 #			322 ± 25 #	330 ± 27 #	404 ± 41 #	434 ± 49
	NC	476 ± 14	428 ± 20			300 ± 10 #	342 ± 17 #	414 ± 20 #	436 ± 25
MAP	KK	60 ± 2	64 ± 3 *NK,NC	44 ± 2 #*NC	47 ± 3 #*NK,NC	48 ± 3 #*NK,NC	54 ± 2 #*NC	79 ± 3 #*NK,NC	69 ± 4 #*NK,NC
[mmHg]	CK	62 ± 2	64 ± 2 *NK,NC	44 ± 3 #*NC	48 ± 3 #*NK,NC	50 ± 2 #*NK,NC	58 ± 2 *NK,NC	82 ± 3 #*NK,NC	74 ± 3 #*NK,NC
	NK	61 ± 4	56 ± 2 *KK,CK	39 ± 2 #	42 ± 2 #*KK,CK	42 ± 2 #*KK,CK	48 ± 2 #*CK	68 ± 2 #*KK,CK	59 ± 2 *KK,CK
	NC	60 ± 3	55 ± 3 #*KK,CK	37 ± 3 #*KK,CK	39 ± 3 #*KK,CK	38 ± 3 #*KK,CK	46 ± 3 #*KK,CK	65 ± 3 #*KK,CK	60 ± 3 *KK,CK
HR	KK	114 ± 2	115 ± 2	111 ± 3	106 ± 2 #	109 ± 3 #	112 ± 2	103 ± 3 #*NC	108 ± 3 #
[min ⁻¹]	CK	116 ± 4	116 ± 3	111 ± 3	111 ± 2 #	111 ± 2 #	114 ± 3	105 ± 4 #	107 ± 3 #
	NK	112 ± 4 *NC	114 ± 3	111 ± 2	110 ± 2	110 ± 2	114 ± 2	107 ± 3	109 ± 4
	NC	116 ± 4 *NK	118 ± 3	111 ± 2 #	110 ± 2 #	110 ± 2 #	114 ± 2	110 ± 3 #*KK	111 ± 3 #

Legende 4: HV= Hypovolämie; RT=Retransfusion mit Zeitangabe (15,20,30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie; MW ± SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur jeweils angegebenen Gruppe (KK=NaCl-NaCl; CK=Carbachol-NaCl; NK=Nitroglycerin-NaCl; NC=Nitroglycerin-Carbachol) ; # = p < 0.05 zum jeweiligen Baseline-Wert

3.5 Gastrale Barrierefunktion

Da sich die ermittelten Werte der Sucrosekonzentrationen im Plasma nicht normalverteilt darstellten wurde hier für die Auswertung der Median \pm Standardfehler des Medians verwendet. Für die statistische Auswertung wurde zum Vergleich zwischen den Gruppen der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben, sowie zum Vergleich der Werte im Zeitverlauf innerhalb der Gruppen der Friedmann-Test für abhängige Stichproben verwendet.

In den gemessenen Plasmaproben zeigte sich lediglich in der Kontrollgruppe (KK) ein signifikanter Anstieg der Plasma-Saccharidkonzentration im Schock verglichen mit dem Ausgangswert (KK: BL = 25,3 \pm 54,0 vs HV60 = 204,4 \pm 88,5). Weder nach Nitroglyceringabe, noch nach Carbacholgabe und gemeinsamer Nitroglycerin und Carbacholapplikation kam es zu einem Anstieg der Plasma-Saccharidkonzentration im Schock verglichen mit dem Ausgangswert (CK: BL = 22,0 \pm 189,0 zu HV60 = 38,2 \pm 54,5; NK: BL = 106,5 \pm 43,8 zu HV60 = 82,4 \pm 38,7; NC: BL = 130,2 \pm 148,2 zu HV60 = 22,6 \pm 76,0). Zwischen den Gruppen zeigten sich während des gesamten Versuches keine signifikanten Unterschiede. (Tbl. 5)

Tabelle 5: Plasmasucrosewerte in der Übersicht über die Gruppen und Messzeitpunkte

Variable	GRUPPE	BASELINE		DRUG		HV30		HV60		RT 30	
Sucrose Median	KK	25,3	\pm 54,0	57,0	\pm 245,4	201,3	\pm 147,8	204,3	\pm 88,5	#	185,7 \pm 156,2
	CK	22,0	\pm 189,0	56,8	\pm 47,8	29,8	\pm 33,8	38,2	\pm 54,4		39,5 \pm 54,5
	NK	106,5	\pm 43,8	100,3	\pm 32,7	44,8	\pm 23,2	82,4	\pm 38,7		119,9 \pm 396,0
	NC	130,2	\pm 148,2	75,9	\pm 16,8	86,1	\pm 822,9	22,6	\pm 76,0		114,8 \pm 75,0

Legende 5: HV= Hypovolämie; RT=Retransfusion mit Zeitangabe (30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie; Median \pm SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur jeweils angegebenen Gruppe (KK=NaCl-NaCl; CK=Carbachol-NaCl; NK=Nitroglycerin-NaCl; NC=Nitroglycerin-Carbachol) ; # = p < 0.05 zum jeweiligen Baseline-Wert

Sucrose

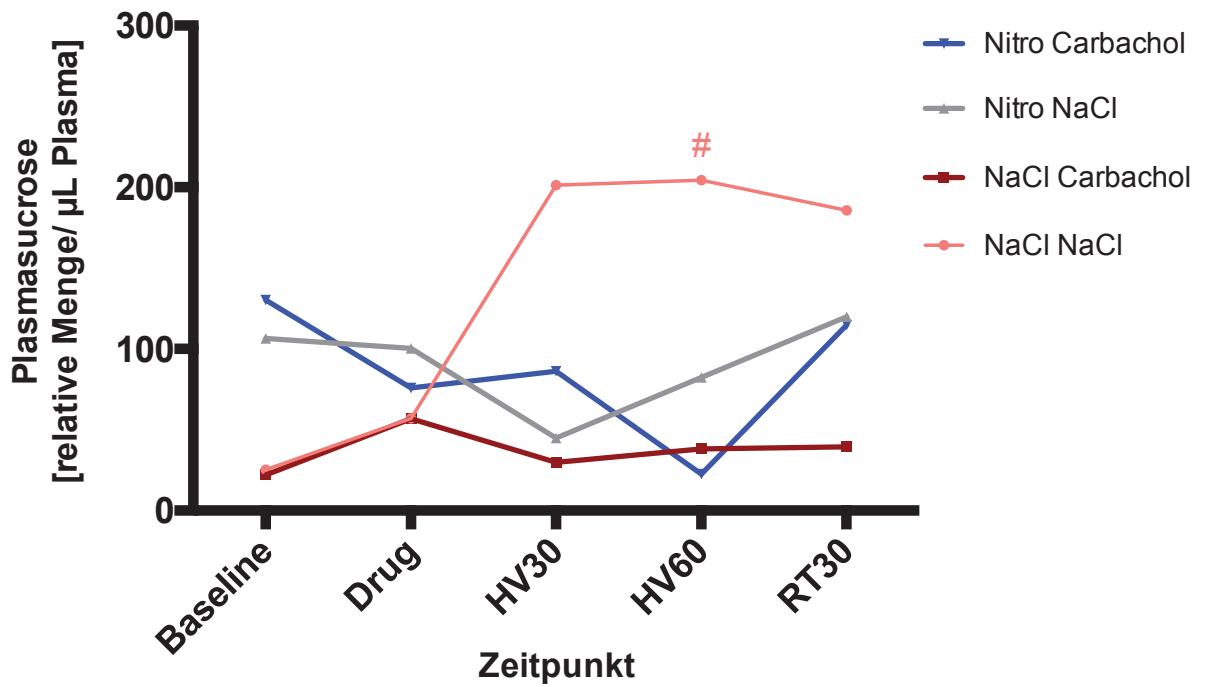


Abb. 8: Die Plasmasucrose-Konzentration unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV) mit anschließender Retransfusion (RT) mit Zeitangabe (30,60) in Minuten, nach Induktion der Hypovolämie ist im Zeitverlauf aufgetragen. Dargestellt mit Median für n=5 Hunde; * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe (KK) ; # = $p < 0,05$ zum Ausgangswert (BL) innerhalb der Gruppe.

4 Diskussion

4.1 Zentrale Aussagen

1. Der Protektive Effekt von Nitroglycerin auf die mikrozirkulatorische Oxygenierung unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen wird durch zusätzliche Carbacholapplikation in der gewählten Dosierung nicht maßgeblich moduliert.
2. Die additive Gabe von Carbachol hatte keinen Effekt auf die Barrierefunktion *in-vivo*.
3. Die Kombination der beiden Vasodilatoren Carbachol und Nitroglycerin lassen systemische Parameter weitestgehend unbeeinflusst.

4.2 Methodenkritik

4.2.1 Experimentelle Rahmenbedingungen

Die experimentellen Rahmenbedingungen müssen gewährleisten sekundäre Einflüsse zu minimieren, sodass weitestgehend sichergestellt werden kann, dass Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen interventionsbedingt aufgetreten sind.

Um genau solche äußeren und inneren, aber vom Untersuchungsziel abweichenden Störfaktoren zu minimieren wurden die Versuchsbedingungen möglichst konstant und einheitlich gehalten.

Das Gewicht der Hunde wurde durch standardisierte Fütterung stabil gehalten. Außerdem dienten nur weibliche Hunde außerhalb des Oestrus als Versuchstiere. (vgl. 2.1.) Um zirkadiane Schwankungen auszuschließen, fanden die Versuche immer zur selben Tageszeit statt. Um den Einfluss interindividueller Unterschiede zwischen den Hunden zu minimieren, durchlief jeder Hund alle Versuchsreihen in randomisierter Reihenfolge und diente somit als seine eigene

Kontrolle. Die Versuche wurden unter stabilen Laborbedingungen durchgeführt. (vgl. 2.5.1.) Interaktionen zwischen den Versuchen wurden durch eine mindestens dreiwöchige Pause zwischen Versuchen am selben Hund gewährleistet (vgl. 2.1.).

Der Hund wurde aus verschiedenen Gründen als Versuchstier ausgewählt. Zum einen ermöglicht das Großtiermodell eine Messsonde atraumatisch in den Magen vorzuschieben, um die gastrale Mikrozirkulation zu untersuchen. Zum anderen sind die erforderlichen Blutabnahmen für die serielle Blutgasanalyse und Plasmauntersuchungen nur im Großtiermodell möglich, ohne die Hämodynamik relevant zu beeinflussen. Des Weiteren kommt die Hämodynamik des Großtieres der des Menschen näher als die des Kleintieres. Zusätzlich weisen die gastrointestinale Durchblutung, die Histologie und die Physiologie beider Spezies deutliche Ähnlichkeiten auf.^{56, 57}

Die Standardisierung der experimentellen Rahmenbedingungen zeigte sich in den nahezu identischen Baseline-Werten zwischen den Gruppen.

4.2.2 Nitroglycerin- und Carbacholapplikation zur lokalen Therapie

Die intragastrale Applikation über eine Magensonde stellt eine atraumatische Form der Applikation dar und erlaubt Messungen unter annähernd physiologischen Bedingungen. Sowohl Nitroglycerin als auch Carbachol riefen gastral verabreicht in vorigen Versuchsreihen bereits Effekte auf die mukosale Mikrozirkulation hervor und scheinen daher für diese Art der Applikation geeignet zu sein.^{2, 3}

Die Menge, Konzentration und Applikationsart des Nitroglycerins wurde entsprechend vorausgehender Versuche gewählt, in denen unter entsprechenden Bedingungen keine systemische Kreislaufbeeinflussung vorlag, aber dennoch die gastralen Mikrozirkulation beeinflusst wurde³. Menge und Konzentration des verabreichten Carbachols wurden orientierend an der hierzu vorhandenen Literatur gewählt.⁵⁸

4.2.3 Messung der oralen und gastraln Mikrozirkulation

Die Messungen der mukosalen Mikrozirkulation sind die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit. Daher wurden drei verschiedene Methoden zur Erfassung der Mikrozirkulation verwendet, um aus den Ergebnissen ein umfassendes, wirklichkeitsgetreues Bild zu erstellen.

Bei der verwendeten Reflexionsspektrofotometrie und dem Laser-Doppler mittels O2C handelt es sich um bereits etablierte Verfahren⁵⁹⁻⁶¹.

Im Gegensatz zum herkömmlichen Pulsoxymeter misst das O2C hauptsächlich die kapillär-venöse Sauerstoffsättigung, da aufgrund der Volumenverteilung des Blutes im mikrovaskulären Gefäßsystem (venös 75%, kapillär 14%, arteriell 11%) von einer Dominanz der Messsignale kapillär-venösen Ursprungs ausgegangen werden kann⁴². Da es aber im kapillär-venösen Bereich nach dem Prinzip der „letzten Wiese“ am ehesten zu Hypoxien kommt, besteht dort die größte Hypoxie-Sensitivität⁶². Daher ist es von hohem Interesse die Sauerstoffsättigung des Hämoglobins genau dort zu messen.

Das O2C hat den, aufgrund der kurzen Halbwertszeit des Nitroglycerins für diese Versuchsreihe besonderen Vorteil, dass es durch eine hohe Aufzeichnungsfrequenz eine Darstellung nahezu in Echtzeit ermöglicht. Die Signalqualität kann durchgehen beurteilt und konstant gehalten werden. (vgl. 2.3.5)

Die geringe Größe der Messsonden ermöglicht auch gastrale Messungen unter physiologischen Bedingungen. Die realistische Wiedergabe der Mikrozirkulation, ohne wesentliche Beeinflussung durch die Sonde, spiegelt sich im Vergleich der erhobenen Baseline-Werte dieser Arbeit mit Baseline-Werten aus vorigen Arbeiten, die diese Art der Messung verwendeten, wider.^{3, 59, 63}

Die zu untersuchenden Substanzen wurden durch die verwendete Instrumentierung in unmittelbarer Nähe zur Messsonde appliziert. (vgl. 2.3.5) Der Nachteil dieser punktuellen Messung liegt darin, dass die Heterogenität des Blutflusses nicht dargestellt werden kann^{64, 65}. Trotzdem konnte bereits gezeigt werden, dass Unterschiede im Fluss durch die punktuelle Messung hinreichend dargestellt werden können und, dass dargestellte Veränderungen im Fluss mit der Barrierefunktion der Mukosa korrelieren⁶⁶.

Zur weiteren Beurteilung der Qualität des Flusses und der Kapillardichte wurde die Videomikroskopie an der oralen Schleimhaut eingesetzt.

Der Messort an der oralen Schleimhaut entsprach dabei dem Ort der O₂C Messung und damit dem Ort der Substanzapplikation. Messungen, die der Qualitätsempfehlung⁶⁷ (Vgl. 3.3) nicht entsprachen wurden verworfen. Um die softwaregestützte Auswertung von *TVD*, *PVD* und *PPV* zu ergänzen wurde zusätzlich verblindet manuell der *MFI* bestimmt. Die manuell bestimmten *MFI*-Werte lagen zum Baselinezeitpunkt sowohl in vorherigen Versuchsreihen unserer Arbeitsgruppe, als auch in dieser Versuchsreihe innerhalb des in der Literatur für gesunde angegeben Bereichs⁶³. Zusätzlich zeigte der manuell ausgewertete *MFI* signifikante Veränderungen während der Hämorrhagie im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen. Aufgrund der definierten Kriterien zur Einstufung der Flussqualität konnte trotz der subjektiven Evaluation in Studien eine hohe Inter- sowie Intraraterreliabilität für den manuell erhobenen *MFI* gezeigt werden⁶⁸.

4.2.4 Messung der gastralen Barrierefunktion

Die gastrale Barrierefunktion unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen sollte über die Quantifizierung des Übertritts von Sucrose über die Magenmukosa evaluiert werden. Bedingt durch die kontinuierliche Flüssigkeitsgabe während des Versuchs kam es bei einzelnen Versuchen zu einem Reflux der Zuckerlösung entlang der gelegten Magensonde. Dies führte zu einzelnen sehr variablen Saccharidwerten im Plasma, sodass sich teilweise eine erhebliche Streuung der resorbierten Sucrosemenge zwischen den Gruppen und auch den einzelnen Versuchstieren zeigt. Die durch den Reflux bedingten Ausreißer in den erhobenen Plasmasucrosewerten führten dazu, dass sich die Gesamtheit der Plasmasucrosewerte als nicht-normalverteilt darstellten. Um einzelnen Ausreißern in den Plasmasucrosewerten die Gewichtung zu nehmen wurden die jeweiligen Mediane \pm des Standardfehlers des Medians verglichen. Es ergaben sich durch die variablen Werte, teils sehr große Standardabweichungen, die das Erreichen einer Signifikanz nur eingeschränkt möglich machten.

Dennoch zeigen sich deutliche Trends die auch ohne vorliegende Signifikanz eine aussagekräftige Auswertung der Daten möglich machen.

4.3 Ergebnisdiskussion

4.3.1 Ergebnisdiskussion der mukosalen Mikrozirkulation

Bezüglich des mikrozirkulatorischen Flusses konnte weder aus den videomikroskopisch erhobenen Daten noch aus den mittels Gewebefotospektrometrie erhobenen Daten ein additiver Effekt durch die zusätzliche Applikation von Carbachol zur lokalen Nitroglycerinapplikation gezeigt werden. Carbachol entwickelt einen Großteil seiner vasodilatatorischen Wirkung Endothel-abhängig über seine agonistische Wirkung an den, auf dem Endothel vorhandenen muskarinergen M1 und M3 Acetylcholinrezeptoren. Dies führt Gq-gekoppelt über eine Ca_{2+} -Freisetzung zu einer Aktivierung der NO-Synthase und somit über eine erhöhte NO-Produktion zur Relaxation der glatten Muskulatur der Gefäße.^{31, 33, 34, 69} Es stellt sich die Frage, warum weder Carbachol noch Nitroglycerin, die auf verschiedenen Wegen zu einem Anstieg des NO-Spiegels führen nicht zu einer flussrelevanten Vasodilatation führen. Hier argumentieren Truse et al, dass die beiden Substanzen, trotz ihrer Eigenschaft als Vasodilatoren den Fluss nicht verbessern konnten, da der Hauptteil der gastralen mikrozirkulatorischen Perfusion aus dem mesenterialen Gefäßsystem stammt, und somit die Flussregulation auf Höhe der mesenterialen Arteriolen den bestimmenden Faktor darstellt. Eine ausgeprägte, sympathisch vermittelte Vasokonstriktion auf Höhe der, der Mikrozirkulation vorgeschalteten mesenterialen Arteriolen, könnte also eine nachgeschaltete Nitroglycerin-/Carbachol-vermittelte Vasodilatation der mikrozirkulatorischen Gefäße und eine Erhöhung des μ flows verhindern. Der zweite Pfad über den Carbachol seine vasodilatatorische Wirkung entfaltet verläuft Endothel- und eNOS-unabhängig über die Aktivierung präsynaptischer muskarinerg M1 und M3 Rezeptoren auf vaskulären Nervenzellen. Die cholinerge Aktivierung der Rezeptoren führt hier zu einer Freisetzung des Calcitonin-Gen-related-Peptid (CGRP), welches am CGRP-Rezeptor

der vaskulären glatten Muskulatur eine Relaxation bewirkt.^{34, 35, 70} In Versuchen mit Acetylcholin konnte jedoch gezeigt werden, dass geringere Mengen von Acetylcholin (1 nmol) nicht ausreichen, um diesen Pfad zu aktivieren, sondern erst höhere Mengen von Acetylcholin (10 nmol, 100 nmol) zu einem Effekt führten^{34, 71}. Es ist also nicht auszuschließen, dass auch die in dieser Versuchsreihe verwendeten Konzentrationen von Carbachol zu gering waren, um eine Aktivierung des Endothel-unabhängigen vasodilatatorischen Pfades zu bewirken.

Dennoch konnten Hu et al. in ihren Versuchen eine Verbesserung der intestinalen mukosalen Perfusion durch lokale Carbacholapplikation als Zusatz zu einer oralen Flüssigkeitssubstitution im Rahmen eines Verbrennungstraumas nachweisen². Diese divergierenden Ergebnisse lassen sich insofern erklären, als dass Hu et al in der gleichen Versuchsreihe zusätzlich zeigen konnten, dass die lokale Carbacholapplikation die mukosale Absorption von Wasser und Elektrolyten unter Schockbedingungen verbessert. Da der Effekt der lokalen Carbacholapplikation hier durch Zusatz von Carbachol zur oralen Volumensubstitution getestet wurde, könnte die verbesserte Gewebepfusion hier auch dem verbesserten Volumenstatus zugerechnet werden. Dafür spricht insbesondere auch eine mit einem gesteigerten HZV einhergehende Plasmavolumenerhöhung der Versuchstiere nach Carbacholgabe.

Zu der nicht erhöhten Flussrate passen auch die äquivalent unveränderten Werte in der lokalen Hämoglobinmenge (*rHb*) und der mikrovaskulären Flussgeschwindigkeit (*μvelocity*) aus denen sich der mikrovaskuläre Fluss ergibt.

Obwohl die zusätzliche Applikation von Carbachol zur Nitroglycerinapplikation keinen additiven Effekt auf die mukosale Perfusion hatte konnte in den durch die Videomikroskopie erhobenen Daten im oralen Bereich eine verbesserte kapilläre Dichte, ein verbesserter funktionelle kapilläre Dichte und ein verbesserter Flussindex in den abgebildeten Gefäßen nach alleiniger Carbacholapplikation gezeigt werden. Es bleibt zu diskutieren, wieso sich dieser Effekt nicht nach gemeinsamer Carbachol und Nitroglycerinapplikation zeigt. Ein möglicher Erklärungsansatz wäre, dass für NO neben vielen vorteilhaften Effekten in der Vergangenheit auch negative Effekte gezeigt werden konnten^{72, 73}. NO wirkt

sich in hohen Konzentrationen zytotoxisch auf körpereigene Zellen aus und senkt durch kompetitive Bindung des Cytochrom C-Moleküls die ATP-Konzentration in der Zelle⁷³. Desweiteren konnten Salzmann et al. in einer *in-vitro* Studie an einer CaCo-Monolayer zeigen, dass NO die Durchlässigkeit der vorhandenen *tight-junctions* erhöhte⁷². Es wäre denkbar, dass durch die gemeinsame Applikation von Carbachol und Nitroglycerin, lokal sehr hohe NO-Spiegel entstehen. Diese hohen NO-Spiegel könnten durch cytotoxische Effekte, sowie zellulären Energiemangel und die damit einhergehende Nekrose, als auch durch eine erhöhte Durchlässigkeit von *tight-junctions* und die damit einhergehende vermehrte Diffusion zu lokaler Ödembildung führen und die Mikrozirkulation kompromittieren.

Bezüglich der Perfusion der gastralen Mukosa bleiben weitere Fragen zu diskutieren. Zum einen sind dies die bereits zum Zeitpunkt Baseline signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen im μ flow, und zum anderen der auch in der Kontrollgruppe fehlende signifikante Abfall des μ flow unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen. Bei genauer Betrachtung der einzelnen Werte, lässt sich ein Abfall im μ flow unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen in allen Gruppen beobachten, der allerdings keine statistische Signifikanz erreicht. Dennoch zeigt sich im Bereich der gastralen Mukosa der Abfall im μ flow deutlich geringer als an der oralen Mukosa. Während der μ flow im oralen Bereich in der Kontrollgruppe durch den Wechsel in eine hämorrhagische Kreislauflage um etwa 2/3 des Ausgangswertes abfällt, fällt der μ flow im gastralen Bereich in der Kontrollgruppe lediglich um etwa 1/3 des Ausgangswertes ab. Eine mögliche Erklärung hier ist die Ausschüttung des parasymphatischen Transmitters Acetylcholin durch einen Dehnungsreiz an der Magenschleimhaut. Die Sekretionsphasen der Magensaftproduktion sind in eine Kephale, Gastrale und Intestinale Phase unterteilt, wobei in der Gastralen Phase durch lokale Wanddehnung die Ausschüttung von Acetylcholin zur Produktion von Magensäure führt. Die lokale Ausschüttung von Acetylcholin wirkt hier neben der Produktion von Magensäure zusätzlich den vasokonstriktischen Reizen des Sympathikus (ausgelöst durch die Hämorrhagie) entgegen, sodass es auch in der Kontrollgruppe, allein durch das Volumen des Placebos zu einem geringeren Abfall im μ flow kommen könnte.⁷⁴

Die Unterschiede der absolut gemessenen Werte des gastralen $\mu flow$ in aU zwischen den Gruppen zum Zeitpunkt Baseline scheinen nur von untergeordneter Relevanz, da in aU angegebene Messungen primär als relative Werte zu verstehen sind und der Fokus der Interpretation dieser insbesondere im Verlauf innerhalb der Gruppen liegen sollte.

Bezüglich der mukosalen Oxygenierung konnte in dieser Versuchsreihe ebenfalls gezeigt werden, dass durch die zusätzliche Applikation von Carbachol zur Nitroglycerinapplikation weder an der oralen noch an der gastralen Mukosa ein additiver Effekt erzielt werden konnte.

Die lokale Gabe von Nitroglycerin vor Induktion der Hypovolämie konnte den, unter Kontrollbedingungen beobachteten μHbO_2 -Abfall an der gastralen Schleimhaut abschwächen. Diese Ergebnisse entsprechen vorherigen Ergebnissen unserer Arbeitsgruppe, die bereits einen positiven Effekt von Nitroglycerin auf den gastralen μHbO_2 unter hypovolämischen Kreislaufbedingungen zeigten.³

Die unter Nitroglycerinapplikation beobachtete Verbesserung der gastralen Oxygenierung, ohne einen erhöhten gastralen $\mu flow$ wird von Truse et al. der Eigenschaft von NO, die mitochondriale zelluläre Atmung zu modifizieren zugeschrieben³.

An dieser Stelle kommt die Frage auf, warum Carbachol mit seiner eNOS-aktivierenden Wirkung und der damit verbundenen erhöhten NO-Produktion keine, bzw. nur eine geringe Auswirkung auf die gastrale Oxygenierung zeigt.

Während Nitroglycerin selbst, unabhängig von der NO-Synthase zu NO konvertiert, wirkt Carbachol sich über Aktivierung der NO-Synthase auf die NO-Bildung aus. Die NO-Synthase bildet aus L-Arginin und O_2 , Citrullin, NO und H_2O . Hierbei benötigt die NO-Synthase Tetrahydrobiopterin (BH_4) als Kofaktor. BH_4 ist jedoch instabil und wird unter oxidativem Stress, wie z. B. während einer Hämmorrhagie, vermehrt zu dem biologisch inaktiven Dihydrobiopterin (BH_2) oxidiert. Als Folge dessen behindert BH_2 die Wirkung des noch vorhandenen BH_4 durch kompetitive Hemmung der NO-Synthase.⁷⁵ Zusätzlich kommt es bei niedrigem BH_4 -Angebot zur sogenannten eNOS-Entkopplung, bei dem die eNOS, aufgrund des fehlenden BH_4 , Superoxid, statt NO produziert. Das entstandene

Superoxid reagiert mit NO sehr leicht zu Peroxynitrit, welches wiederum BH₄ abbaut. So entsteht ein *circulus vitiosus*.

Da in unserer Versuchsreihe weder BH₄ noch der BH₄/BH₂-Ratio bestimmt wurde, ist es im Nachhinein nicht möglich eine Aussage über das BH₄-Angebot zu treffen. Auch in der Literatur befinden sich bezüglich des BH₄-Vorkommens in verschiedenen Spezies und verschiedenen Geweben große Unterschiede⁷⁶. Unabhängig von der absoluten BH₄ Konzentration stützen einige Versuchsreihen an verschiedenen Spezies, in verschiedenen Modellen kompromittierter hämodynamischer Bedingungen, die Vermutung, dass BH₄ als begrenzende Größe nicht vernachlässigt werden darf:

In experimentellen Ischämie-Reperfusionen-Modellen konnte die exogene Zugabe von BH₄ die mikrozirkulatorische Perfusion verbessern^{77, 78}. In Patienten mit koronarer Herzkrankheit konnte eine intracoronare BH₄-Infusion die Wirkung von ACh auf den mikrozirkulatorischen Fluss verbessern⁷⁹. Im Sepsismodell konnte BH₄ zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation und des Überlebens führen⁸⁰⁻⁸³. An gesunden Probanden konnte eine i.a. BH₄-Gabe eine durch Lipopolysaccharid geminderte ACh Wirkung auf den Unterarmfluss wiederherstellen⁸⁴. Da in allen genannten Versuchsreihen, durch die Zugabe von BH₄ eine Verbesserung der Mikrozirkulation hervorgerufen werden konnte, liegt der Gedanke nahe, dass das BH₄ Angebot unter Hämorrhagie nicht ausreicht und somit auch in unserer Versuchsreihe BH₄ einen begrenzenden Faktor für die optimale Carbacholwirkung dargestellt haben könnte.

Festzuhalten ist also, dass die von Truse et al gezeigten, positiven Effekte von lokal appliziertem Nitroglycerin auf die gastrale Mikrozirkulation reproduziert werden konnten. Diese konnten jedoch durch Zufügen von Carbachol nicht moduliert werden. Zukünftige Studien müssen nun zeigen, inwiefern die Zugabe von BH₄ die erhobenen Studienergebnisse modulieren könnte.

Die unterschiedliche Auswirkung von Nitroglycerin auf die mukosale Oxygenierung der Magen- und der Mundschleimhaut ist weiterer Ausdruck, dass die Regulationsmechanismen der Mikrozirkulation nicht nur von systemisch-hämodynamischen Faktoren abhängen, sondern innerhalb des Gefäßabschnitts organspezifisch auf lokale Reize (lokale Aktivierung der Koagulation, lokale

Inflammationsaktivierung) hin reagieren und primär von diesen lokalen Faktoren gesteuert werden. Zudem zeigt die orale Schleimhaut verglichen mit der gastralen Schleimhaut sowohl einen anderen histologischen Aufbau, als auch eine andere Gefäßversorgung, was auch eine verschiedene Rezeptorendichte nahelegt (Dominanz der Angiotensinrezeptoren im Splanchnikusgebiet vgl.1). Hier zeigt sich, dass es nicht möglich ist von oral gemessenen Mikrozirkulationsparametern auf die Mikrozirkulation in anderen Organsystemen zu schließen. Diese Erkenntnis steht auch im Einklang mit Studien von Boerma et al sowie von Edul et al, die ähnliche Erkenntnisse am Menschen bestätigen konnten⁸⁵.

⁸⁶

4.3.2 Ergebnisdiskussion der gastralen Barrierefunktion

Unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen zeigte sich ein signifikanter Anstieg des Plasmasucrospiegels in der Kontrollgruppe. Dies kann als Hinweis auf eine verminderte Barrierefunktion gewertet werden. In den Gruppen in denen Nitroglycerin alleine, Carbachol alleine oder Nitroglycerin und Carbachol simultan verabreicht wurden, konnte ein solcher Anstieg der Plasmasucroselevel nicht verzeichnet werden, sodass von einer verbesserten Barrierefunktion der gastralen Mukosa durch die lokale Verumapplikation ausgegangen werden kann. Für Nitroglycerin konnte eine solche Verbesserung der gastralen Barrierefunktion nach lokaler Applikation bereits in vorherigen Versuchen unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden.³ Auch die alleinige Carbacholapplikation konnte den signifikanten Anstieg der Plasmasucrose-Werte unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen verhindert. Nachdem Lesko et al. bereits *in vitro* einen positiven Effekt durch cholinerge Stimulation auf die mukosale Integrität zeigen konnten, konnten auf diesem Wege auch Hinweise auf eine positive Auswirkung durch lokale cholinerge Stimulation mittels Carbachol *in-vivo* gesammelt werden³⁶. Die Plasmasucrose-Werte unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen unterscheiden sich in den drei Verumgruppen in dieser Versuchsreihe nicht, sodass keine additiver Effekt der zusätzlichen lokalen Carbacholapplikation zur lokalen Nitroglycerinapplikation gezeigt werden konnte. Die

positiven Auswirkungen auf die Barrierefunktion durch die lokale Nitroglycerinapplikation lässt sich am ehesten durch die gleichzeitig verbesserte lokale Oxygenierung nach Nitroglycerinapplikation erklären (Vgl. 4.3.1.). Die Verbesserung in der Barrierefunktion nach lokaler Carbacholapplikation führen Lesko et al. am ehesten auf eine, durch Stimulation muskarinischer ACh-Rezeptoren hervorgerufene, Verstärkung der Zell-Zell-Kontakte zurück³⁶. Es bleibt die Frage offen, warum sich diese beiden positiven Effekte bei simultaner Carbachol und Nitroglycerinapplikation nicht additiv auf die Barrierefunktion auswirken. Hier ist ein Erklärungsansatz die Dosisabhängigkeit des vorteilhaften Effekts von NO auf die Barrierefunktion. Salzmann et al. beschreiben in einer *in-vitro* Versuchsreihe an einer CaCo2BBE-Monolayer einen dosisabhängigen negativen Einfluss von NO auf die Integrität der *tight junctions*⁷². Es wäre also denkbar, dass bei den durch Nitroglycerinapplikation hervorgerufenen niedrigen NO-Konzentrationen der positive Effekt der Verbesserung der mukosalen Oxygenierung den negativen Effekt auf den Zell-Zell-Zusammenhalt überwiegt, während bei gleichzeitiger Carbacholapplikation die NO-Freisetzung auf NO-Konzentrationen steigt, bei denen die negativen Effekte auf die Integrität der *tight junctions* überwiegen.

4.3.3 Ergebnisdiskussion der systemischen Kreislaufparameter

Im Hinblick auf den lokalen Aspekt des in dieser Arbeit getesteten Therapieansatzes ist neben der Eignung von Applikation und Menge der verabreichten Substanzen die Bewertung der systemischen Kreislaufparameter bedeutend.

In dieser Versuchsreihe unterschieden sich *HZV*, *SV*, *HF* und *DO₂* nach lokaler Applikation von Nitroglycerin u./o. Carbachol in den entsprechenden Versuchsgruppen nicht von der Kontrollgruppe und gaben somit keinen Anhalt für eine systemische Auswirkung der lokalen Applikation.

Die im HZV gemessenen Unterschiede zwischen der Carbachol- und Kontrollgruppe zum Baseline-Zeitpunkt sind mit einem absoluten Unterschied von 9 ml/kgKG/min auf die geringen Standardabweichungen zurückzuführen und nicht als biologisch relevante Unterschiede zu werten.

Der bei Hypovolämie zu erwartende kompensatorische Anstieg der Herzfrequenz war in dieser Versuchsreihe nicht zu beobachten. Stattdessen kam es während der Hämorrhagie zu einem Abfall der HF. Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Abfall ist der Bezold-Jarisch-Reflex, ein kardioinhibitorischer Reflex, bei dem es durch mechano- und chemosensitive Rezeptoren in den kardialen Ventrikeln, vagal vermittelt, durch Stimuli wie Hypovolämie und myokardialer Ischämie zu Bradykardie, Hypotension und peripherer Vasodilatation kommen kann⁸⁷. Ein weiterer Erklärungsansatz für die abfallende HF unter Hämorrhagie ist der umgekehrte Bainbridge-Reflex, bei dem ein geminderter venöser Rückstrom als Stimulus für eine abfallende HF diskutiert wird.⁸⁸

Nach Applikation der Substanzen zeigte sich im *MAP* in keiner der vier Versuchsgruppen unter physiologischen Bedingungen eine Veränderung verglichen mit den jeweiligen Ausgangswerten. Jedoch zeigten sich ein leichter, nicht signifikanter Anstieg des *MAP* nach Substanzapplikation in der Carbachol- und Kontrollgruppe mit einem entgegengesetzten leichten, nicht signifikanten Abfall des *MAP* in den nitroglycerinhaltigen Gruppen. Dieser Trend im *MAP* in entgegengesetzte Richtung führt in der Summation zwischen den Gruppen zu einer Signifikanz. Eventuell wurde dieser Effekt im *MAP* durch die Verabreichung der entsprechenden Substanzmenge in Bolusform hervorgerufen. Im weiteren Verlauf des Versuchs blieb dieser konstante Unterschied des *MAP* von etwa 9mmHg zwischen der Nitroglycerin-/Nitroglycerin+Carbacholgruppe (NK/NC) und der Kontroll- und Carbacholgruppe (KK/CK) erhalten, wobei diesem Unterschied im klinischen Alltag keine Relevanz beizumessen ist. Allerdings könnte es bei größerer Dosierung, z. B. bei Therapie des gesamten GI-Traktes, zu größeren systemischen Effekten kommen. Insgesamt scheint jedoch die lokale Kombination von Nitroglycerin und Carbachol sicher und ohne systemische Nebenwirkungen anwendbar.

Hier stellt sich allerdings noch die Frage, warum Carbachol als Parasympathomimetikum nach alleiniger Applikation einen Anstieg im *MAD* hervorruft. Dies scheint am ehesten erklärbar zu sein durch die einhergehende Volumenapplikation, die den *MAP*-senkenden parasympathomimetischen Effekt des Carbachols zu übersteigen scheint. Dies ist zum Einen insofern wahrscheinlich, als dass sich auch in der Kontrollgruppe ein quantitativ gleichwertiger Anstieg des *MAD*

zeigt. Zum Anderen korrelieren diese Ergebnisse, mit der Tatsache, dass Carbachol in der gewählten Dosierung auch im Hinblick auf die ermittelten mikrozirkulatorischen Parameter des Versuchs keine messbare parasymphomimetische Wirkung entfalten konnte.

Bezüglich der gemessenen Blutgase (pO_2 , pCO_2 , SAT), des pH, des Bikarbonats, sowie des Hämatokritwerts und der Hämoglobinkonzentration im Serum zeigten sich zwar, durch eine sehr geringe Standardabweichung, einzelne signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen, die aber zu keinem Zeitpunkt biologische Relevanz erreichten. Der erhöhte Laktatwert im späten (HV60) Schock, sowie in der Retransfusionsphase in der Carbacholgruppe (CK) kann Hinweis auf einen anaeroben Stoffwechsel geben, und damit auf eine Hypoxie im Gewebe hinweisen. Dennoch stellt sich auch hier die Frage nach der biologischen Relevanz eines maximalen Laktatunterschieds von 1 mmol/l zur Kontrollgruppe. Der Laktatwert überschreitet in der Carbacholgruppe (CK) zu keinem Zeitpunkt im Versuch relevant den oberen Normwert für Hunde von 2,5 mmol/l⁸⁹.(Tbl. 3)

Ein Anhalt für die Auswirkung der lokalen Substanzapplikation auf systemische Kreislaufparameter ist in dieser Versuchsreihe anhand der aufgezeichneten Kreislaufparameter, sowie der Werte aus der Blutgasanalyse nicht anzunehmen.

4.4 Klinische Relevanz

Der hämorrhagische Schock gehört nicht nur zu den häufigen Ursachen der perioperativen Mortalität und Morbidität, sondern stellt auch bei polytraumatisierten Patienten eine der größten Herausforderungen dar. Neben der akuten lebensbedrohlichen Kreislaufstörung kann ein hämorrhagischer Schock durch die Störung der Mikrozirkulation und die damit verbundene eingeschränkte Oxygenierung verschiedener Gewebe noch weitere oft fulminante Krankheitsbilder nach sich ziehen. So kann eine Hämorrhagie im Splanchnikusgebiet zu einer eingeschränkten Barrierefunktion der Darmmukosa führen und so die Entstehung von Sepsis und Multiorganversagen begünstigen (Vgl. 1). In dieser

Studie konnten gezeigt werden, dass das Prinzip der lokalen Applikation vasoaktiver Substanzen ein vielversprechender Therapieansatz sein kann. Zum wiederholten Male konnte gezeigt werden, dass eine lokale Applikation von Wirkstoffen an die Mukosa von Mund und Magen eine lokale Verbesserung der Mikrozirkulation hervorrufen kann, ohne dabei systemische Parameter zu beeinflussen. Dies hat den Vorteil, dass erwünschte Effekte, lokal auf den Zielbereich begrenzt sind, ohne durch systemischen Nebenwirkungen beschränkt zu werden. In anderen Bereichen sind solche lokalen Therapieansätze bereits erprobt, wie beispielsweise die inhalative Applikation von Prostanoiden wie Iloprost zur Therapie der pulmonalarteriellen Hypertonie³⁰. In der Schock-Therapie sind lokale Therapien jedoch gegenwärtig lediglich Gegenstand der Forschung. Eine Übertragung des in dieser Studie getesteten lokalen Versuchsaufbaus in die Klinik wäre beispielsweise über den Zusatz von Wirkstoffen zu enteraler Ernährung denkbar. Zum zweiten konnte in dieser Studie gezeigt werden, dass die von Truse et al beobachteten positiven Effekte von lokal appliziertem Nitroglycerin auf die mukosale Oxygenierung in dieser Form reproduzierbar sind. Damit rückt Nitroglycerin als interessanter Wirkstoff für eine klinische Studie weiter in den Fokus. Carbachol hingegen, konnte keinen weiteren additiven Effekt auf die gastrale mukosale Oxygenierung oder die gastrale mukosale mikrozirkulatorische Perfusion hervorrufen. Ein Effekt auf die kleinen Gefäße der oralen Mukosa ohne die Gesamtpfusion zu beeinflussen konnte in dieser Studie für Carbachol gezeigt werden und macht Carbachol für weitere Forschung interessant. Insbesondere höhere Dosierungen des lokale applizierten Carbachols wären dahingehend von Interesse (Vgl 4.3.2.).

5 Literaturverzeichnis

1. Deitch, E. A.; Morrison, J.; Berg, R.; et al. Effect of hemorrhagic shock on bacterial translocation, intestinal morphology, and intestinal permeability in conventional and antibiotic-decontaminated rats. *Crit Care Med* **1990**, *18*, 529-36.
2. Hu, S.; Che, J. W.; Tian, Y. J.; et al. Carbachol promotes gastrointestinal function during oral resuscitation of burn shock. *World J Gastroenterol* **2011**, *17*, 1746-52.
3. Truse, R.; Hinterberg, J.; Schulz, J.; et al. Effect of Topical Iloprost and Nitroglycerin on Gastric Microcirculation and Barrier Function during Hemorrhagic Shock in Dogs. *J Vasc Res* **2017**, *54*, 109-121.
4. Sori, A. J.; Rush, B. F., Jr.; Lysz, T. W.; et al. The gut as source of sepsis after hemorrhagic shock. *Am J Surg* **1988**, *155*, 187-92.
5. Rush, B. F., Jr.; Sori, A. J.; Murphy, T. F.; et al. Endotoxemia and bacteremia during hemorrhagic shock. The link between trauma and sepsis? *Ann Surg* **1988**, *207*, 549-54.
6. Ceppa, E. P.; Fuh, K. C.; Bulkley, G. B. Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock. *Curr Opin Crit Care* **2003**, *9*, 127-32.
7. Cannon, W. Bodily Changes in Pain, Hunger, Fear and Rage: An Account of Recent Researches Into the Function of Emotional Excitment. *New York: D. Appleton & Co* **1920**, 1-311.
8. Toung, T.; Reilly, P. M.; Fuh, K. C.; et al. Mesenteric vasoconstriction in response to hemorrhagic shock. *Shock* **2000**, *13*, 267-73.
9. Reilly, P. M.; MacGowan, S.; Miyachi, M.; et al. Mesenteric vasoconstriction in cardiogenic shock in pigs. *Gastroenterology* **1992**, *102*, 1968-79.
10. Fennerty, M. B. Pathophysiology of the upper gastrointestinal tract in the critically ill patient: rationale for the therapeutic benefits of acid suppression. *Crit Care Med* **2002**, *30*, S351-5.
11. Steinberg, K. P. Stress-related mucosal disease in the critically ill patient: risk factors and strategies to prevent stress-related bleeding in the intensive care unit. *Crit Care Med* **2002**, *30*, S362-4.
12. Jiang, J.; Bahrami, S.; Leichtfried, G.; et al. Kinetics of endotoxin and tumor necrosis factor appearance in portal and systemic circulation after hemorrhagic shock in rats. *Ann Surg* **1995**, *221*, 100-6.
13. Jacob, A. I.; Goldberg, P. K.; Bloom, N.; et al. Endotoxin and bacteria in portal blood. *Gastroenterology* **1977**, *72*, 1268-70.
14. Nolan, J. P. Endotoxin, reticuloendothelial function, and liver injury. *Hepatology* **1981**, *1*, 458-65.
15. Yamaguchi, Y.; Yamaguchi, K.; Babb, J. L.; et al. In vivo quantitation of the rat liver's ability to eliminate endotoxin from portal vein blood. *J Reticuloendothel Soc* **1982**, *32*, 409-22.
16. Deitch, E. A. Review of the effect of stress and trauma on plasma fibronectin and the reticuloendothelial system. *JBCR* **4**: 344-351 **1983**.
17. Bjorneboe, M.; Prytz, H.; Orskov, F. Antibodies to intestinal microbes in serum of patients with cirrhosis of the liver. *Lancet* **1972**, *1*, 58-60.
18. Triger, D. R.; Alp, M. H.; Wright, R. Bacterial and dietary antibodies in liver disease. *Lancet* **1972**, *1*, 60-3.
19. Kaplan, J. E.; Saba, T. M. Humoral deficiency and reticuloendothelial depression after traumatic shock. *Am J Physiol* **1976**, *230*, 7-14.
20. Saba, T. M. Prevention of liver reticuloendothelial systemic host defense failure after surgery by intravenous opsonic glycoprotein therapy. *Ann Surg* **1978**, *188*, 142-52.
21. Molmenti, E. P.; Ziambaras, T.; Perlmutter, D. H. Evidence for an acute phase response in human intestinal epithelial cells. *J Biol Chem* **1993**, *268*, 14116-24.

22. Wang, Q.; Meyer, T. A.; Boyce, S. T.; et al. Endotoxemia in mice stimulates production of complement C3 and serum amyloid A in mucosa of small intestine. *Am J Physiol* **1998**, *275*, R1584-92.
23. Mester, M.; Tompkins, R. G.; Gelfand, J. A.; et al. Intestinal production of interleukin-1 alpha during endotoxemia in the mouse. *J Surg Res* **1993**, *54*, 584-91.
24. Meyer, T. A.; Wang, J.; Tiao, G. M.; et al. Sepsis and endotoxemia stimulate intestinal interleukin-6 production. *Surgery* **1995**, *118*, 336-42.
25. Ogle, C. K.; Mao, J. X.; Wu, J. Z.; et al. The 1994 Lindberg Award. The production of tumor necrosis factor, interleukin-1, interleukin-6, and prostaglandin E2 by isolated enterocytes and gut macrophages: effect of lipopolysaccharide and thermal injury. *J Burn Care Rehabil* **1994**, *15*, 470-7.
26. Wang, Q.; Wang, J. J.; Boyce, S.; et al. Endotoxemia and IL-1 beta stimulate mucosal IL-6 production in different parts of the gastrointestinal tract. *J Surg Res* **1998**, *76*, 27-31.
27. Deitch, E. A.; Xu, D.; Franko, L.; et al. Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* **1994**, *1*, 141-5.
28. Deitch, E. Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy. *Ann Surg* **1992**, *216*, 117-34.
29. Krejci, V.; Hildebrand, L. B.; Sigurdsson, G. H. Effects of epinephrine, norepinephrine, and phenylephrine on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract in sepsis. *Crit Care Med* **2006**, *34*, 1456-63.
30. Ewert, R.; Glaser, S.; Bollmann, T.; et al. Inhaled iloprost for therapy in pulmonary arterial hypertension. *Expert Rev Respir Med* **2011**, *5*, 145-52.
31. Gericke, A.; Sniatecki, J. J.; Goloborodko, E.; et al. Identification of the muscarinic acetylcholine receptor subtype mediating cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **2011**, *52*, 7479-84.
32. Gericke, A.; Sniatecki, J. J.; Mayer, V. G.; et al. Role of M1, M3, and M5 muscarinic acetylcholine receptors in cholinergic dilation of small arteries studied with gene-targeted mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2011**, *300*, H1602-8.
33. Khurana, S.; Chacon, I.; Xie, G.; et al. Vasodilatory effects of cholinergic agonists are greatly diminished in aorta from M3R^{-/-} mice. *Eur J Pharmacol* **2004**, *493*, 127-32.
34. Tangsucharit, P.; Takatori, S.; Zamami, Y.; et al. Muscarinic acetylcholine receptor M1 and M3 subtypes mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric arteries. *Journal of Pharmacological Sciences* **2016**, *130*, 24-32.
35. Takenaga, M.; Kawasaki, H.; Wada, A.; et al. Calcitonin gene-related peptide mediates acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in mesenteric resistance blood vessels of the rat. *Circ Res* **1995**, *76*, 935-41.
36. Lesko, S.; Wessler, I.; Gabel, G.; et al. Cholinergic modulation of epithelial integrity in the proximal colon of pigs. *Cells Tissues Organs* **2013**, *197*, 411-20.
37. Lüllman, M., Welting. *Pharmakologie und Toxikologie, Arzneimittelwirkung verstehen - Medikamente gezielt einsetzen*, 2003, Georg Thieme Verlag Stuttgart, New York.
38. van Leersum, E. C. Eine Methode zur Erleichterung der Blutdruckmessung bei Tieren. *Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere* **1911**, *142*, 377-395.
39. Rossing, R. G.; Cain, S. M. A nomogram relating pO₂, pH, temperature, and hemoglobin saturation in the dog. *Journal of Applied Physiology* **1966**, *21*, 195-201.
40. Kretz, S. *Anästhesie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie*. 2007; p 76.
41. Hammel, H. T.; Wyndham, C. H.; Hardy, J. D. Heat production and heat loss in the dog at 8-36 degrees C environmental temperature. *The American journal of physiology* **1958**, *194*, 99-108.

42. Krug, A. CME: Mikrozirkulation und Sauerstoffversorgung des Gewebes - Methode des so genannten O₂C (oxygen to see). *Phlebologie* **2006**, *35*, 300-312.
43. Sherman, H.; Klausner, S.; Cook, W. A. Incident Dark-Field Illumination: a New Method for Microcirculatory Study. *Angiology* **1971**, *22*, 295-303.
44. Goedhart, P. T.; Khalilzada, M.; Bezemer, R.; 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*, 15101-15114.
45. Carsetti, A.; Pierantozzi, S.; Aya, H. D.; et al. Accuracy of an Automatic Analysis Software to Detect Microvascular Density Parameters. *Intensive Care Medicine Experimental* **2015**, *3*, A415.
46. Carsetti, A.; Aya, H. D.; Pierantozzi, S.; et al. Ability and efficiency of an automatic analysis software to measure microvascular parameters. *J Clin Monit Comput* **2017**, *31*, 669-676.
47. Sharawy, N.; Mukhtar, A.; Islam, S.; et al. Preliminary clinical evaluation of automated analysis of the sublingual microcirculation in the assessment of patients with septic shock: Comparison of automated versus semi-automated software. *Clin Hemorheol Microcirc* **2017**, *67*, 489-498.
48. Sharawy, N. First experiences with automated microcirculation analysis software. *Journal of vascular research, Karger Allschwilerstr. 10, CH-4009 Basel, Switzerland* **2015**.
49. De Backer, D.; Hollenberg, S.; Boerma, C.; et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Critical Care* **2007**, *11*, R101.
50. Meddings, J. B.; Sutherland, L. R.; Byles, N. I.; et al. Sucrose: a novel permeability marker for gastroduodenal disease. *Gastroenterology* **1993**, *104*, 1619-26.
51. Fiehn, O.; Kind, T. Metabolite profiling in blood plasma. *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* **2007**, *358*, 3-17.
52. Walcott, W. W. Standardization of experimental hemorrhagic shock. *American Heart Journal* **1945**, *29*, 765.
53. Dyson, D. H. Positive pressure ventilation during anesthesia in dogs: Assessment of surface area derived tidal volume. *Can Vet J* **2012**, *53*, 63-6.
54. Kazama, T.; Ikeda, K. Comparison of MAC and the rate of rise of alveolar concentration of sevoflurane with halothane and isoflurane in the dog. *Anesthesiology* **1988**, *68*, 435-7.
55. Vollmer, C.; Schwartges, I.; Naber, S.; et al. Vasopressin V(1A) receptors mediate the increase in gastric mucosal oxygenation during hypercapnia. *J Endocrinol* **2013**, *217*, 59-67.
56. Dressman, J. B. Comparison of canine and human gastrointestinal physiology. *Pharm Res* **1986**, *3*, 123-31.
57. Haglund, U.; Hulten, L.; Ahren, C.; et al. Mucosal lesions in the human small intestine in shock. *Gut* **1975**, *16*, 979-84.
58. Kraft. *Dosierungsvorschläge für Arzneimittel bei Hund und Katze*. Schattauer: 2005; Vol. 4. Auflage.
59. Vollmer, C.; Weiss, S.; Beck, C.; et al. Hypothermia improves oral and gastric mucosal oxygenation during hypoxic challenges. *Br J Anaesth* **2014**, *113*, 433-42.
60. Bludau, M.; Vallbohmer, D.; Gutschow, C.; et al. Quantitative measurement of gastric mucosal microcirculation using a combined laser Doppler flowmeter and spectrophotometer. *Dis Esophagus* **2008**, *21*, 668-72.
61. Maier, S.; Holz-Holz, C.; Pajk, W.; et al. Microcirculatory parameters after isotonic and hypertonic colloidal fluid resuscitation in acute hemorrhagic shock. *J Trauma* **2009**, *66*, 337-45.
62. Schmidt, L., Heckmann. *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 2017; Vol. 37. Auflage.

63. Truse, R.; Voss, F.; Herminghaus, A.; et al. Local gastric RAAS inhibition improves gastric microvascular perfusion in dogs. *J Endocrinol* **2019**, *241*, 235-247.
64. De Backer, D.; Donadello, K.; Cortes, D. O. Monitoring the microcirculation. *J Clin Monit Comput* **2012**, *26*, 361-6.
65. De Backer, D.; Durand, A. Monitoring the microcirculation in critically ill patients. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol* **2014**, *28*, 441-51.
66. Vollmer, C.; Weber, A. P. M.; Wallenfang, M.; et al. Melatonin pretreatment improves gastric mucosal blood flow and maintains intestinal barrier function during hemorrhagic shock in dogs. *Microcirculation* **2017**, *24*.
67. De Backer, D.; Hollenberg, S.; Boerma, C.; et al. How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference. *Crit Care* **2007**, *11*, R101.
68. Boerma, E. C.; Mathura, K. R.; van der Voort, P. H. J.; et al. Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study. *Critical Care* **2005**, *9*, R601-6.
69. Chiba, S.; Tsukada, M. Possible involvement of muscarinic M1 and M3 receptor subtypes mediating vasodilation in isolated, perfused canine lingual arteries. *Clin Exp Pharmacol Physiol* **1996**, *23*, 839-43.
70. Horvath, B.; Orsy, P.; Benyo, Z. Endothelial NOS-mediated relaxations of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse: a methodological study. *J Cardiovasc Pharmacol* **2005**, *45*, 225-31.
71. Takenaga, M.; Kawasaki, H.; Wada, A.; et al. Calcitonin Gene-Related Peptide Mediates Acetylcholine-Induced Endothelium-Independent Vasodilation in Mesenteric Resistance Blood Vessels of the Rat. *Circulation Research* **1995**, *76*, 935-941.
72. Salzman, A. L.; Menconi, M. J.; Unno, N.; et al. Nitric oxide dilates tight junctions and depletes ATP in cultured Caco-2BBE intestinal epithelial monolayers. *Am J Physiol* **1995**, *268*, G361-73.
73. Lupp, C.; Baasner, S.; Ince, C.; et al. Differentiated control of deranged nitric oxide metabolism: a therapeutic option in sepsis? *Crit Care* **2013**, *17*, 311.
74. J. Kirsch, F. S., E. Schulte. *Duale Reihe Anatomie - Teil I Ch. 1 Rumpfdarm - Ösophagus und Gastrointestinaltrakt*. Thieme: 2010; Vol. 2. Auflage.
75. Vasquez-Vivar, J.; Martasek, P.; Whitsett, J.; et al. The ratio between tetrahydrobiopterin and oxidized tetrahydrobiopterin analogues controls superoxide release from endothelial nitric oxide synthase: an EPR spin trapping study. *Biochem J* **2002**, *362*, 733-9.
76. Duch, D. S.; Bowers, S. W.; Woolf, J. H.; et al. Biopterin cofactor biosynthesis: GTP cyclohydrolase, neopterin and biopterin in tissues and body fluids of mammalian species. *Life Sci* **1984**, *35*, 1895-901.
77. Maglione, M.; Hermann, M.; Hengster, P.; et al. Tetrahydrobiopterin attenuates microvascular reperfusion injury following murine pancreas transplantation. *Am J Transplant* **2006**, *6*, 1551-9.
78. Wang, W. Z.; Fang, X. H.; Stephenson, L. L.; et al. Effects of supplementation of BH4 after prolonged ischemia in skeletal muscle. *Microsurgery* **2007**, *27*, 200-5.
79. Setoguchi, S.; Mohri, M.; Shimokawa, H.; et al. Tetrahydrobiopterin improves endothelial dysfunction in coronary microcirculation in patients without epicardial coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol* **2001**, *38*, 493-8.
80. Tymi, K.; Li, F.; Wilson, J. X. Septic impairment of capillary blood flow requires nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase but not nitric oxide synthase and is rapidly reversed by ascorbate through an endothelial nitric oxide synthase-dependent mechanism. *Crit Care Med* **2008**, *36*, 2355-62.
81. Secor, D.; Li, F.; Ellis, C. G.; et al. Impaired microvascular perfusion in sepsis requires activated coagulation and P-selectin-mediated platelet adhesion in capillaries. *Intensive Care Med* **2010**, *36*, 1928-34.
82. Fitzal, F.; Redl, H.; Strohmaier, W.; et al. A 4-amino analogue of tetrahydrobiopterin attenuates endotoxin-induced hemodynamic alterations and organ injury in rats. *Shock* **2002**, *18*, 158-62.

83. Bahrami, S.; Fitzal, F.; Peichl, G.; et al. Protection against endotoxemia in rats by a novel tetrahydrobiopterin analogue. *Shock* **2000**, *13*, 386-91.
84. Mittermayer, F.; Pleiner, J.; Schaller, G.; et al. Tetrahydrobiopterin corrects Escherichia coli endotoxin-induced endothelial dysfunction. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **2005**, *289*, H1752-7.
85. Boerma, E. C.; van der Voort, P. H.; Spronk, P. E.; et al. Relationship between sublingual and intestinal microcirculatory perfusion in patients with abdominal sepsis. *Crit Care Med* **2007**, *35*, 1055-60.
86. Edul, V. S.; Ince, C.; Navarro, N.; 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*, 39.
87. Campagna, J. A.; Carter, C. Clinical relevance of the Bezold-Jarisch reflex. *Anesthesiology* **2003**, *98*, 1250-60.
88. Crystal, G. J.; Salem, M. R. The Bainbridge and the "reverse" Bainbridge reflexes: history, physiology, and clinical relevance. *Anesth Analg* **2012**, *114*, 520-32.
89. Hughes, D.; Rozanski, E. R.; Shofer, F. S.; et al. Effect of sampling site, repeated sampling, pH, and PCO₂ on plasma lactate concentration in healthy dogs. *Am J Vet Res* **1999**, *60*, 521-4.