

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

**Die topische Applikation von Iloprost und Carbachol
verbessert die Mikrozirkulation des Gastrointestinaltraktes
während milder Hämorrhagie bei Hunden**

Dissertation

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

vorgelegt von
Marius Michels

2022

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

gez.:

Dekan: Prof. Dr. med. Nikolaj Klöcker

Erstgutachter: Prof. Dr. med. Olaf Picker

Zweitgutachter: PD Dr. Georg Flügen

Für meine Eltern

I Zusammenfassung

Ein hämorrhagischer Schock beeinträchtigt u.a. die Mikrozirkulation des Gastrointestinaltraktes und kann so zu einer Schädigung der mukosalen Integrität führen. Dies ermöglicht den Übertritt von Darmbakterien ins Blut und kann schließlich das Entstehen einer Sepsis begünstigen. Systemische Therapien mit Vasodilatoren zeigten bereits positive Effekte auf die Mikrozirkulation, können aber durch Nebenwirkungen limitiert sein [1]. In einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass topisch verabreichtes Iloprost einen schützenden Einfluss auf die gastrale Mikrozirkulation im Schock hatte, jedoch ohne Einfluss auf die Barrierefunktion [2]. Carbachol konnte *in vitro* die Barrierefunktion von Schweinekolonzellen verbessern [3]. In der vorliegenden Studie sollte daher untersucht werden, ob die Kombination von Iloprost und Carbachol protektive Effekte auf die gastrointestinale Mikrozirkulation und Barrierefunktion hat. Die Experimente wurden an fünf anästhesierten, beatmeten Foxhounds durchgeführt. Alle Hunde durchliefen in milder Hämorrhagie (-20 % des Blutvolumens) vier Versuchsgruppen in randomisierter Reihenfolge: (1) NaCl+NaCl, (2) Iloprost+NaCl, (3) Carbachol+NaCl oder (4) Iloprost+Carbachol. Oral und gastral wurde die mukosale Oxygenierung (μHbO_2) und Perfusion (μflow , $\mu\text{velocity}$) gemessen. Zusätzlich wurde die orale Gefäßarchitektur mittels *incident dark field illumination* untersucht. Die Kombination von Iloprost und Carbachol erhöhte die gastrale Oxygenierung, nicht jedoch die Perfusion, im Schock im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die alleinige Gabe von Carbachol führte zu einer gesteigerten funktionellen Gefäßdichte und verbesserter kapillärer Flussqualität ohne jedoch die Perfusion (μflow , $\mu\text{velocity}$) der oralen Mukosa im Schock zu verbessern. In Kombination mit Iloprost war die orale Flussgeschwindigkeit ($\mu\text{velocity}$) erhöht. Die systemische Hämodynamik wurde durch die topische Therapie nicht beeinflusst. Eine Verbesserung der Barrierefunktion konnte nicht nachgewiesen werden. Demnach verbessert die kombinierte lokale Applikation von Iloprost und Carbachol perfusionsunabhängig die gastrale mikrozirkulatorische Oxygenierung im hämorrhagischen Schock. Oral verbessern Iloprost und Carbachol die kapilläre Gefäßarchitektur und Flussqualität. Die Effekte auf die orale Mukosa lassen dabei keine Rückschlüsse auf Veränderungen der gastraln Mikrozirkulation zu.

II Summary

A hemorrhagic shock compromises the microcirculation of the gastrointestinal tract and can lead to impaired mucosal integrity. This loss of barrier function permits bacterial translocation into the blood stream and enables initiation of a sepsis. Studies have shown that systemic vasodilators can be useful in opening the microcirculation in shock but could be limited by their systemic side effects [1]. Topical Iloprost had protective effects on gastric microcirculation during hemorrhagic shock without systemic side effects but did not impact shock-induced mucosal barrier damage [2]. *In vitro* Carbachol improved epithelial tightness in the proximal colon of pigs by regulating the muscarinic pathways [3]. The aim of this study was to analyze whether the combination of Iloprost and Carbachol might have positive effects on the microcirculation and barrier function of the gastrointestinal mucosa. The experiments were conducted in five anesthetized, ventilated foxhounds. All dogs underwent each experimental protocol in randomized order with mild hemorrhage (-20 % of estimated blood volume): (1) NaCl+NaCl, (2) Iloprost+NaCl, (3) Carbachol+NaCl or (4) Iloprost+Carbachol. Variables of the oral and gastral microcirculatory oxygenation (μHbO_2), perfusion (μflow , $\mu\text{velocity}$) were measured continuously. The oral mucosa was intermittently examined using incident dark field illumination. The combination of Iloprost and Carbachol showed positive effects on the gastric oxygenation in shock compared to the control group. There was no alteration in gastric perfusion. The single local application of Carbachol led to an elevation of total vessel density, perfused vessel density, and microcirculatory flow index, without improving the gastric overall perfusion (μflow , $\mu\text{velocity}$) during hemorrhagic shock. The combination of Iloprost and Carbachol showed positive effects on oral microcirculatory velocity. Systemic hemodynamic variables were not altered by topical therapy. There was no positive effect observed on mucosal barrier function. In conclusion, topical treatment with Iloprost and Carbachol improves the gastric microcirculatory oxygenation in hemorrhagic shock, without effecting gastric perfusion. The topical administration of Iloprost and Carbachol to the oral mucosa improves microcirculatory perfusion. This study underlines, that effects of treatments at the oral mucosa does not allow to draw conclusions regarding effects at the gastric microcirculation.

III Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Beschreibung
A	Ampere
A.	Arterie
Aa.	Arteriae
Abb.	Abbildung
ACh	Acetylcholin
AG	Arbeitsgemeinschaft
APSI	Average Perfused Speed Indicator
ATP	Adenosintriphosphat
aU	Arbitrary Unit
AZ	Aktenzeichen
BE	Blutentnahme
BGA	Blutgasanalyse
BL	Baseline
Ca²⁺	Calcium
CGRP	Calcitonin-Gene-Related-Peptid
CK	Carbachol-Gruppe (Carbachol + NaCl)
Cl⁻	Chlorid
CO₂	Kohlenstoffdioxid
d-	Dezi-
DO₂	Systemisches Sauerstoffangebot
dPmax	Maximale Steilheit des arteriellen Druckanstiegs
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EKG	Elektrokardiogramm
et al.	Et alii/aliae/alia
et	Expiratorisch
Fi	Inspiratorische Fraktion
g	Gramm
G	Gauge
h	Stunde
H₂O	Wasser

Hb	Hämoglobin
HCO₃⁻	Hydrogencarbonat
Hkt	Hämatokrit
HR	Herzfrequenz
HV	Hypovolämie
Hz	Hertz
HZV	Herz-Zeit-Volumen
i.a.	Intra-arteriell
I:E	Inspiration zu Expiration
I.E.	Internationale Einheit
IC	Iloprost-Carbachol-Gruppe (Iloprost + Carbachol)
IDF	Incident dark field Illumination
IK	Iloprost-Gruppe (Iloprost + NaCl)
in	Inch
k-	Kilo-
K⁺	Kalium
KG	Körpergewicht
KK	Kontrollgruppe (NaCl + NaCl)
l	Liter
LED	Lichtemittierende Diode
m	Meter
M	Molar
m-	Milli
MAC	Minimale alveoläre Konzentration
MAP	Mittlerer arterieller Druck
MFI	Mikrovaskulärer Flussindex
min.	Minute
mmHg	Millimeter Quecksilbersäule
MOV	Multiorganversagen
MW	Mittelwert
n	Nummer
n-	Nano-
N	Nervus
Na⁺	Natrium

NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
NRW	Nordrhein-Westfalen
O₂C	Oxygen to see
p-	Pico-
p	Partialdruck
Pa	Arterieller Partialdruck
PC	Personal Computer
PGI₂	Prostacyclin
pH	Potentia hydrogenii
PPV	Anteil funktioneller Gefäße
PVD	Funktionelle Gefäßdichte
rcf	Relativen Zentrifugalbeschleunigung
RT	Retransfusion
s	Sekunde
Sa	Arterielle Sättigung
SAT	Sättigung
sek.	Sekunde
SEM	Standardfehler bezogen auf den Mittelwert
SV	Schlagvolumen
SVR	Totaler peripherer Widerstand
SVV	Schlagvolumen-Variation
Tab.	Tabelle
TD	Thermodilution
TOF	Train of four
TOFR	Train of four ratio
TVD	Totale Gefäßdichte
VL	Videomikroskopie der Lefze
Vol%	Volumenprozent
vs.	Gegen(übergestellt)
W	Watt
ZVD	Zentralvenöser Druck
μ-	Mikro-
°C	Grad Celsius

IV Inhaltsverzeichnis

I Zusammenfassung	I
II Summary	II
III Abkürzungsverzeichnis	III
IV Inhaltsverzeichnis	VI
1 Einleitung	1
2 Material und Methoden	6
2.1 Versuchsgenehmigung.....	6
2.2 Versuchstiere	6
2.3 Operationen.....	6
2.4 Messungen.....	7
2.4.1 Registrierung der Daten.....	7
2.4.2 Herzfrequenz (HR).....	7
2.4.3 Mittlerer Arterieller Druck (MAP).....	7
2.4.4 Herzzeitvolumen (HZV)	8
2.4.5 Körpertemperatur.....	9
2.4.6 Atem- und Narkosegaskonzentration	9
2.4.7 Neuromuskuläres Monitoring.....	9
2.4.8 Blutgasanalyse, Elektrolyt- und Hämatokritbestimmung	10
2.4.9 Gewebespektrofotometrie der gastralen und oralen Mukosa	11
2.4.10 Videomikroskopie der oralen Mukosa.....	12
2.4.11 Messung der Barrierefunktion.....	14
2.5 Interventionen.....	15
2.5.1 Applikation von Sucroslösung.....	15
2.5.2 Applikation von Iloprost, Carbachol und Natriumchlorid	16
2.5.3 Hypovolämie	17
2.6 Versuchsablauf.....	18
2.7 Statistische Auswertung	19
2.8 Versuchsprotokoll.....	20

3 Ergebnisse.....	21
3.1 Gewebespektrofotometrie der gastralen Mukosa.....	21
3.2 Gewebespektrofotometrie der oralen Mukosa	22
3.3 Videomikroskopie der oralen Mukosa	26
3.4 Systemische Hämodynamik	29
3.5 Metabolische Parameter	32
3.6 Barrierefunktion	33
4 Diskussion	35
4.1 Zentrale Aussagen	35
4.2 Methodenkritik	35
4.2.1 Experimentelle Rahmenbedingungen.....	35
4.2.2 Iloprost- und Carbacholapplikation zur lokalen Therapie.....	36
4.2.3 Messungen der gastralen und oralen Mikrozirkulation	36
4.2.4 Messung der Barrierefunktion.....	37
4.3 Ergebnisdiskussion	38
4.3.1 Ergebnisdiskussion der gastralen Mikrozirkulation.....	38
4.3.2 Ergebnisdiskussion der oralen Mikrozirkulation.....	39
4.3.3 Ergebnisdiskussion der Barrierefunktion	42
4.3.4 Ergebnisdiskussion der systemischen Kreislaufparameter	43
4.3.5 Ergebnisdiskussion der Blutgasanalyse	44
4.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse.....	44
5 Literaturverzeichnis	46

1 Einleitung

Als „Schock“ bezeichnet man die Minderperfusion von Organen und Geweben und das konsekutive Missverhältnis von Sauerstoffverbrauch und Sauerstoffversorgung der Zellen [4, 5]. Er ist die klinische Manifestation eines Kreislaufversagens und ist mit einer hohen Morbidität und Mortalität verbunden [6]. Als behandlungsbedürftiges Symptom der Grunderkrankung betrifft er ein Drittel aller Patienten, die auf Intensivstationen behandelt werden [7]. Mehr als jeder zweite Patient, der in Deutschland ein schweres Trauma erleidet, erfüllt die Kriterien eines hypovolämischen Schocks [8].

Die Diagnose basiert auf klinischen, hämodynamischen und biochemischen Faktoren [9]. Die Ursachen sind im Wesentlichen vier mögliche Faktoren [10]. Diesen Faktoren entsprechend, kann man die folgenden Formen klassifizieren: Der hypovolämische Schock (z.B. der hämorrhagische Schock), der distributive Schock (z.B. der septische, anaphylaktische oder neurogene Schock), der kardiogene Schock (z.B. im Rahmen eines Myokardinfarkts) und der obstruktive Schock (z.B. bei einer Herzbeutelamponade) [11]. Ein traumatisch-hämorrhagischer Schock als Sonderform des hypovolämischen Schocks entsteht durch Blutverlust, beispielsweise in Folge eines Traumas. Dieser stellt in Deutschland die häufigste Todesursache bei Kindern, Jugendlichen und jungen Erwachsenen dar [12], dabei ist er (zum Beispiel im Rahmen eines großen Blutverlustes aufgetreten) eine häufig vermeidbare Ursache für diese Todesfälle [13].

Beim hypovolämischen Schock führt die verminderte Menge des zirkulierenden Blutvolumens zunächst zu einer Hypotonie [4]. Um das Herzzeitvolumen und die Perfusion überlebenswichtiger Organe wie Herz und Gehirn aufrecht zu halten, kommt es unter anderem zu einer ausgeprägten Aktivierung des Sympathikus und damit zu einer Tachykardie und einer Erhöhung des peripheren Gesamtwiderstandes [4, 14]. Die damit einhergehende Zentralisation des Blutvolumens hat eine Minderdurchblutung anderer Organe, vor allem der Haut, der Nieren und des Splanchnikusgebietes zur Folge [4, 14, 15]. Unter dem Splanchnikusgebiet versteht man den anatomischen und physiologischen Zusammenschluss der Organe, die über den Truncus coeliacus, sowie die Aa. mesenteria superior und inferior durchblutet werden, darunter die Organe

des Gastrointestinaltraktes (Magen, Dün- und Dickdarm), Pankreas, Leber und Milz [16]. Eine kritische Minderdurchblutung kann von einer Funktionseinschränkung bis hin zum vollständigen Funktionsverlust der jeweiligen Organe führen [4, 14, 15].

Der Gastrointestinaltrakt hat diverse Funktionen: Neben Verdauung und Absorption von Nahrungsbestandteilen hat er vor allem endokrinologische, metabolische und immunologische Aufgaben. Eine weitere Aufgabe ist die Bildung einer Barriere als Schutz gegen Bakterien, die ubiquitär im Darmlumen vorkommen [17]. Diese Barriere besteht hauptsächlich aus engen Zell-Zell-Kontakten, wie *tight-junctions* oder Desmosomen [18-20]. Bei dem Erhalt der Barrierefunktion handelt es sich um einen Sauerstoff-verbrauchenden Prozess, wofür eine adäquate Blutversorgung essenziell ist [21]. Der Gastrointestinaltrakt weist daher insbesondere bei seiner Blutversorgung einige Besonderheiten auf. Er macht gerade einmal 5 % des Körpergewichts aus, dennoch erhält das Splanchnikusgebiet unter physiologischen Kreislaufbedingungen 20 – 30 % des Herzzeitvolumens, wobei die Hälfte alleine auf die apikalen Anteile der Villi intestinales entfällt [16, 21]. Durch Autoregulation des Gefäßbettes kann eine konstante Durchblutung von Organen und Geweben aufrechterhalten werden [22]. Zudem können die Organe des Splanchnikusgebietes auch bei niedrigem Perfusionsdruck ihren Sauerstoffbedarf durch optimierte Sauerstoffausschöpfung decken [23]. Der Blutfluss des Gastrointestinaltraktes teilt sich in zwei parallele Kreisläufe auf: Ein Kreislauf versorgt die Tunica muscularis, ein zweiter versorgt die Mukosa sowie die Submukosa [24]. Innerhalb eines Villus verlaufen aufsteigende Arteriole und absteigende Venole relativ nahe beieinander. Dies führt, vor allem nahe der Basis, zu einer Diffusion der gelösten Gase, insbesondere von Sauerstoff aus dem arteriellen ins venöse System, wodurch in Richtung Spitze ein hypoxischer Gradient entsteht [24]. Während eines hämorrhagischen Schocks mit ohnehin eingeschränkter Gesamtpfusion ist daher insbesondere die Mukosa der Villusspitze verstärkt einer Hypoxie ausgesetzt [21]. Die Autoregulation des Gewebettes kann dies nur zum Teil kompensieren: Bei einem Abfall der Gewebedurchblutung kommt es zu einem nicht proportional verlaufenden Abfall des Perfusionsdrucks [22]. Für die Integrität der Barrierefunktion ist eine adäquate Perfusion und Oxygenierung jedoch unabdingbar [21]. Durch eine Ischämie der Mukosa kann es zu einer

Schädigung der intestinalen Barriere und zu einer Translokation von Bakterien aus dem Darmlumen ins Blut kommen [25, 26]. Darüber hinaus kommt es zu einer Ausschüttung proinflammatorischer Mediatoren über das portale Blut und das lymphatische System. Dies kann zu einer systemischen Inflammation führen und die Entstehung eines Multiorganversagens begünstigen [27, 28]. Es ist daher von erheblichem Interesse, die gastrointestinale Mikrozirkulation und Barrierefunktion unter kompromittierten Kreislaufbedingungen zu verbessern.

Die Therapie des hämorrhagischen Schocks zielt bisher vor allem auf die Aufrechterhaltung bzw. Normalisierung systemischer Kreislaufparameter ab [29]. Diese Therapieansätze können jedoch durch systemische Nebenwirkungen limitiert sein [30]. Außerdem zeigte sich in der Sepsis, dass die Mikrozirkulation des Gastrointestinaltraktes trotz normaler systemischer hämodynamischer Parameter schon beeinträchtigt sein kann [31]. Um Schäden der gastrointestinalen Mukosa zu verhindern, könnte die Mikrozirkulation und Perfusion zusätzlich direkt überwacht werden: Verschiedene Studien konnten zeigen, dass die orale Mikrozirkulation ein unabhängiger Prädiktor für das Entstehen eines Organversagens oder Tod im Rahmen eines hämorrhagischen oder septischen Schocks ist [31-34]. Ob jedoch ein Zusammenhang zwischen der Mikrozirkulation der gastrointestinalen Mukosa und der klinisch wesentlich einfacher zugänglichen oralen Mukosa besteht, ist fraglich: Die aktuelle Studienlage zeichnet ein uneinheitliches Bild, ob eine Korrelation zwischen oraler und gastrointestinaler Mikrozirkulation besteht [35] oder ob sie unabhängig voneinander zu betrachten sind [36].

Es scheint jedoch wichtig, Therapien zu entwickeln, die die Mikrozirkulation des Gastrointestinaltraktes verbessern. Buwalda et al. konnten zeigen, dass der Einsatz von Vasodilatoren die überproportionale Vasokonstriktion des Splanchnikusgebietes verhindern konnte und einen positiven Effekt auf die Perfusion und Oxygenierung hatte [1]. Jedoch wurden diese Therapien teilweise limitiert durch systemische Nebenwirkungen wie die weitere Reduktion des Perfusionsdrucks. Möglicherweise könnte die Therapie mittels lokal bzw. topisch applizierter Medikamente diese systemischen Nebenwirkungen minimieren.

Eine topische Therapie des Gastrointestinaltraktes findet im klinischen Alltag bisher nicht statt, für andere Organsysteme sind solche Therapien jedoch bereits

etabliert, so wird beispielsweise Iloprost zur inhalativen Therapie der pulmonalen Hypertonie eingesetzt [37-39].

Iloprost ist ein synthetisches Prostacyclin-Analogon und wirkt, wie auch andere Prostaglandine über verschiedene Rezeptoren im gesamten Körper unter anderem als potenter Vasodilatator [40]. Auch die Endothelzellen des Gastrointestinaltraktes bilden Prostaglandine. Diese regulieren über die Prostacyclinrezeptoren vor allem die Sekretion von Säuren und Bikarbonat sowie die Muzinproduktion, sind jedoch auch für die Regulation der Mukosadurchblutung und die epitheliale Integrität verantwortlich [41]. Somit ist der Einsatz von lokal verabreichtem Iloprost ein potenziell vielversprechender Versuchsansatz zur Aufrechterhaltung von Mikrozirkulation und Barrierefunktion des Gastrointestinaltraktes [39, 41]: Die intravenöse Applikation von Prostacyclin erhöhte den gastralen Blutfluss bei Ratten und schützte die epitheliale Integrität [41-43]. Im hämorrhagischen Schock zeigte das Gefäßbett von Ratten *in vitro* einen erhöhten Prostacyclinspiegel [44]. Allerdings war dieser Effekt begrenzt: Bei längeren Schockzuständen reduzierte sich die Freisetzung von Prostacyclin im Splanchnikusgebiet [45].

Truse et al. konnten zeigen, dass die topische Therapie mit Iloprost einen schützenden Einfluss auf die gastrale Mikrozirkulation der Mukosa im hämorrhagischen Schock hatte, ohne Einfluss auf systemische Kreislaufparameter zu haben. Ein Einfluss auf die intestinale Barrierefunktion und die Perfusion der gastralen Mukosa konnte jedoch nicht gezeigt werden [2]. Möglicherweise konnte durch die Sympathikus-bedingte Vasokonstriktion des Splanchnikusgebietes im hämorrhagischen Schock keine ausreichende Vasodilatation durch Iloprost erreicht werden [2]. In diesem Fall könnte eine zusätzliche Aktivierung des enterischen Nervensystems einen additiven Effekt haben. Die zusätzliche lokale Aktivierung muskarinerges Acetylcholinrezeptoren könnte zu einer stärkeren Vasodilatation und einer verbesserten Perfusion führen. Beides könnte einen positiven Effekt auf die intestinale Barrierefunktion haben.

Carbachol ist ein Analogon des Neurotransmitters Acetylcholin und wirkt durch seine direkte Bindung an die Muskarinrezeptoren vasodilatatorisch. Hu et al. konnten in einer tierexperimentellen Studie an Hunden zeigen, dass oral verabreichtes Carbachol im Schock nach Verbrennungstrauma die Perfusion der

intestinalen Mukosa verbesserte [46]. Auch auf die Zell-Zell-Kontakte hat Acetylcholin Einfluss: *In vitro* konnte die Barrierefunktion von Kolonzellen verbessert werden, indem die muskarinergen Acetylcholin-Rezeptoren direkt durch Carbachol stimuliert wurden [3].

Carbachol könnte also ergänzend zu Iloprost eingesetzt werden, um die Perfusion der gastralen Mukosa zu steigern. Zusätzlich könnte es durch seinen Effekt auf die epitheliale Integrität in Kombination mit der gesteigerten Oxygenierung durch Iloprost die Barrierefunktion verbessern.

Vor diesem Hintergrund ergeben sich somit die zentralen Fragestellungen, die in dieser Arbeit untersucht werden sollen:

1. Hat die lokale Applikation von Carbachol in Kombination mit Iloprost einen additiven Effekt auf die Mikrozirkulation des Gastrointestinaltraktes im hämorrhagischen Schock?
2. Hat die lokale Applikation von Carbachol in Kombination mit Iloprost einen Effekt auf die Barrierefunktion des Gastrointestinaltraktes im hämorrhagischen Schock?
3. Kommt es durch die Kombination der beiden Vasodilatoren Carbachol und Iloprost zu systemischen Nebenwirkungen?

2 Material und Methoden

2.1 Versuchsgenehmigung

Die Versuche (n = 20) wurden mit Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz NRW durchgeführt (AZ 84-02.04.2012.A152).

2.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um fünf weibliche Hunde der Rasse Foxhound mit einem Körpergewicht von 28 – 36 kg. Die Hunde lebten in der universitätseigenen Tierversuchsanlage (ZETT, Zentrale Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben) und wurden mit Standardnahrung für Versuchstiere gefüttert (V3286-000 Hd Ereich, extrudiert, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland). Während der Versuchsreihe waren die Hunde gesund und normalgewichtig.

Vor jedem Versuch unterlagen die Hunde einer zwölfstündigen Nahrungskarenz, um mögliche Fehlmessungen im Magen zu vermeiden. Der Zugang zu Wasser war in diesem Zeitraum unbegrenzt möglich.

Jeder Hund durchlief alle Versuche in randomisierter Reihenfolge und diente somit als seine eigene Kontrolle. Zwischen zwei Experimenten wurde für jeden Hund eine Pause von mindestens drei Wochen eingehalten. Dadurch wurde die vollständige Erholung der Tiere und die Elimination der verabreichten Pharmaka gewährleistet.

Die Experimente begannen stets zur selben Uhrzeit. Dadurch konnte ein Einfluss der circadianen Rhythmik auf die Versuchsergebnisse ausgeschlossen werden. Um situativen Stress zu vermeiden, wurden die Hunde vor Beginn der Versuchsreihe an die Laborumgebung, den Labortisch und das Versuchspersonal gewöhnt.

2.3 Operationen

Alle Hunde waren kastriert, um einen Einfluss des Oestrus auf die Versuchsergebnisse zu vermeiden.

Vor Beginn der Versuchsreihe wurden die Hunde unter aseptischen Bedingungen in Allgemeinanästhesie (Piritramid, Isofluran) operiert. Hierbei wurden beide Aa. carotides freipräpariert, nach außen verlagert und in

Hautschlingen eingebettet [47]. Dies dient einer erleichterten Punktion zu Versuchsbeginn und ermöglicht eine kontinuierliche arterielle Blutdruckmessung und die Abnahme arterieller Blutproben während der Experimente. Darüber hinaus kann die Punktionsstelle nach dem Versuch unkompliziert verschlossen werden und komplikationsfrei abheilen.

2.4 Messungen

2.4.1 Registrierung der Daten

Die erfassten Daten (EKG, Blutdruck, expiratorische CO₂-Konzentration, inspiratorische Sauerstoffkonzentration, Sevoflurankonzentration, Atemwegsdruck) wurden mittels eines Universalverstärkers (11-G4145-01, Gould Inc., Cleveland, USA) verstärkt und analog/digital umgewandelt (Powerlab/800®, 400 Hz, ADInstruments, Pty Ltd., Castle Hill, Australien). Diese Daten wurden auf einem konventionellen PC (Betriebssystem: Windows XP, Microsoft Corporation, Redmond, USA) mit dem Programm Chart (Chart Version 4.2, ADInstruments, Pty Ltd., Castle Hill, Australien) visualisiert und gespeichert. Zur weiteren Auswertung der Daten wurde Chart Version 5.5.6 im Analysemodus verwendet.

2.4.2 Herzfrequenz (HR)

Die Herzfrequenz wurde mittels Nadelelektroden über ein Standard-Oberflächen-EKG bestimmt und R-Zacken getriggert ermittelt (Chart 5.5.6).

2.4.3 Mittlerer Arterieller Druck (MAP)

Zur arteriellen Blutdruckmessung wurde ein druckfester und flüssigkeitsgefüllter Katheter (PULSIOCATH arterieller Thermodilutionskatheter PV2015L20, Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland) über die A. carotis bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Dort fand eine kontinuierliche Messung statt. Eine Lagekontrolle erfolgte mittels korrekter Darstellung der arteriellen Druckkurve. Der Druckwandler (Modell P23 ID, Gould Statham, Elk Grove, USA) wurde vor jedem Versuch mit einer Eichwaage nach Gauer (HSE Druckeichgerät Typ 367, Hugo Sachs Elektronik, March, Deutschland) kalibriert und auf Herzhöhe ausgerichtet. Als Orientierung diente der Processus spinosus des 7. Halswirbels des liegenden Hundes. Die Spülung des Katheters erfolgte mittels heparinierter

Kochsalzlösung (1000 I.E. Heparin in 500 ml NaCl 0,9 %). Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde berechnet, indem die Integrale aus den Originalsignalen gebildet wurden (Chart 5.5.6).

2.4.4 Herzzeitvolumen (HZV)

Das Herzzeitvolumen wurde diskontinuierlich mittels transpulmonaler Thermodilutionstechnik (PiCCO, Version 4.2, Pulsion Medical Systems AG, München, Deutschland) ermittelt. Hierfür erfolgte eine intravenöse Injektion eines kalten Bolus von 10 ml isotonischer Kochsalzlösung über eine großlumige Venenverweilkanüle (Vasofix Safety, Größe 16 G, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) am Vorderlauf des Hundes. Die Injektion erfolgte in konstanter Geschwindigkeit. Registriert wurde die Ausgangstemperatur am Injektionsort, sowie die Temperaturänderung der Lösung in der Aorta über den einliegenden Katheter (vgl. 2.4.3). Ausgehend davon wurde die Thermodilutionskurve aufgezeichnet. Der Vorteil gegenüber einem Pulmonalkatheter liegt in der geringeren Invasivität und der fast vollständigen Unabhängigkeit vom Atemzyklus des Tieres aufgrund der etwa zweiminütigen Messdauer [48-50]. Im Anschluss wurde das HZV mit der Stewart-Hamilton-Gleichung berechnet:

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

TB: Bluttemperatur vor Injektion

TNaCl Temperatur der injizierten NaCl-Lösung

VNaCl Injektatvolumen (standardisiert 10ml)

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

K Korrekturkonstante, welche sich aus spezifischen Gewichten und spezifischen Wärmen von Blut und Injektat zusammensetzt

Darüber hinaus wurden Schlagvolumen (SV), der systemische vaskuläre Widerstand (SVR) und der Index der linksventrikulären Kontraktilität (dPmax) berechnet. Um die Reproduzierbarkeit der Messung zu belegen, wurden vor Beginn jedes Versuches zwei aufeinanderfolgende Messungen mittels

Thermodilution durchgeführt. Danach wurde alle 30 Minuten eine Messung durchgeführt. Die Thermodilution weist im Vergleich zur kontinuierlichen Pulskonturanalyse eine erhöhte Genauigkeit auf und wurde daher für die Auswertung verwendet [51].

2.4.5 Körpertemperatur

Die Körpertemperatur der Hunde wurde während der Versuche möglichst konstant gehalten. Dazu wurde das Labor klimatisiert, sodass die Umgebungstemperatur durchgängig 24 °C betrug. Dies ist die Indifferenztemperatur bei Hunden [52]. Zusätzlich konnte die Körpertemperatur der Hunde durch Decken und medizinische Warmluftgebläse (500E Bair Hugger, Augustine Medical, INC., Minnesota, USA) bei 38 ± 1 °C gehalten werden. Zur kontinuierlichen Messung der zentralen Bluttemperatur wurde der PiCCO-Katheter (vgl. 2.4.4) genutzt.

2.4.6 Atem- und Narkosegaskonzentration

Die in- und expiratorische Sauerstoff-, Kohlendioxid- und Sevoflurankonzentration wurde kontinuierlich im Nebenstromprinzip (Capnomac Ultima, Datex Division of Instrumentarium Corp., Helsinki, Finnland) gemessen und durch die Software Chart 4.2. aufgezeichnet.

2.4.7 Neuromuskuläres Monitoring

Die suffiziente neuromuskuläre Relaxation der Hunde wurde mittels *train of four* (TOF) Methode geprüft (TOF Guard INMT, Organon Teknika BV, Boxtel, Niederlande). Hierfür wurden zwei Elektroden über dem Verlauf des N. ischiadicus am linken Hinterlauf platziert. Über die Elektroden wurden vier supramaximale elektrische Reize von 15 mA in einer Frequenz von 2 Hz abgegeben. Ein möglichst distal an der Pfote angebrachter Akzelerometer registrierte die muskuläre Antwort. Der Quotient aus der vierten Stimulation und der ersten Stimulation ergibt die TOF-Ratio (TOFR) [53].

Vor Gabe des Muskelrelaxans wurde die TOFR kontrolliert. Ein Wert von 1,0 entspricht dabei einer vollständig funktionsfähigen neuromuskulären Übertragung, eine TOFR von 0,0 nach Gabe des Muskelrelaxans entspricht einer

vollständigen Relaxierung [54]. Die Relaxierung ist nötig, um Störungen der kontrollierten Beatmung und Artefakte während des Versuches zu reduzieren. Um einen Relaxantienüberhang zu verhindern, wurde die Muskelrelaxierung am Versuchsende erneut mittels TOF geprüft. Von einer für die Extubation ausreichenden neuromuskulären Erholung ist ab einer TOFR > 0,9 auszugehen [53, 55, 56]. Die Narkose wurde erst beendet, wenn die TOFR erneut bei 1,0 lag.

2.4.8 Blutgasanalyse, Elektrolyt- und Hämatokritbestimmung

Nach einer initialen venösen Blutgasanalyse (BGA) wurde in halbstündlichen Intervallen eine arterielle Blutprobe entnommen. Hierfür wurde Blut aus dem Thermodilutionskatheter in eine heparinisierte 2 ml-Spritze (PICO 50 Arterial Blood Sampler, Radiometer edical APS, Dänemark) entnommen und mittels Blutgasanalysegeräts (ABL 715, Radiometer Medial ApS, Bronshoj, Dänemark) analysiert.

Bestimmt wurden die Elektrolytkonzentrationen (Natrium, Kalium), die Blutgaspartialdrücke (Sauerstoff, Kohlenstoffdioxid), der Basenüberschuss, die Hämoglobin- und Laktatkonzentration, sowie der pH-Wert.

Die Sauerstoffsättigung (S_a in Prozent) konnte mit einer an Hunde angepassten Hill-Formel berechnet werden [57]. Anschließend konnte der arterielle Sauerstoffgehalt (C_aO_2) aus der Summe des an Hämoglobin gebundenen Sauerstoffs und des im arteriellen Blut physikalisch gelösten Sauerstoffs berechnet werden:

$$C_aO_2 = Hb * 1,34 * S_a + pO_2 * 0,0031$$

C_aO_2 :	arterieller Sauerstoffgehalt
Hb:	Hämoglobinkonzentration
S_a :	arterielle Sauerstoffsättigung
pO_2 :	Sauerstoffpartialdruck

Aus dem arteriellen Sauerstoffgehalt ließ sich durch Multiplikation mit dem Herzzeitvolumen das systemische Sauerstoffangebot (DO_2) bestimmen:

$$DO_2 = C_aO_2 * HZV$$

DO_2 : systemisches Sauerstoffangebot
 C_aO_2 : arterieller Sauerstoffgehalt
HZV: Herzzeitvolumen

Die Bestimmung des Hämatokrits erfolgte einerseits durch das Blutgasanalysegerät, als Kontrolle mittels Kapillarröhrchen (heparinisiert, Länge 75 mm, Durchmesser 1,15 mm, Brand GmbH, Wertheim, Deutschland). Hier konnte nach Zentrifugation (4 min., 130000 rcf [58]; Rotina 420R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland) der Hämatokrit abgelesen werden.

2.4.9 Gewebespektrofotometrie der gastralen und oralen Mukosa

Die regionale orale und gastrale Mikrozirkulation wurde mittels Weißlichtspektrofotometrie und Laser-Doppler (O2C Typ LW2222 Version 2, LEA Medizintechnik GmbH, Gießen, Deutschland) bestimmt. Hierfür wurde eine Flachsonde (LF-2, LEA Medizintechnik GmbH, Gießen, Deutschland) auf die Innenseite der Lefze, sowie eine Mikrosonde (LM-10, LEA Medizintechnik GmbH, Gießen, Deutschland) über eine Magensonde an der gastralen Schleimhaut des Versuchstieres platziert. Die Platzierung erfolgte jeweils atraumatisch und ohne Anpressdruck, um Kompressionsartefakte zu vermeiden. Die korrekte Lage der Sonden wurde durch kontinuierliche graphische Darstellung des Signals auf einem integrierten Monitor kontrolliert.

Die jeweiligen Sonden strahlen einerseits mit einer 20-W-Xenon-Glühbirne Licht eines kontinuierlichen Spektrums im Wellenlängenbereich von etwa 450 bis 1000 nm (Weißlichtspektrometrie), andererseits mit Hilfe eines Diodenlasers im *Continuous-Wave-Modus* Licht einer spezifischen Wellenlänge von 820 nm (Laser-Doppler) in das Gewebe [59]. Blutgefäße, die größer als 100 µm groß sind, absorbieren dabei das gesamte ausgestrahlte Licht und werden durch die Messung nicht miterfasst [60]. Durch die O2C-Messung werden also nur die

nutritiven Gefäße der Mikrozirkulation erfasst [59]. Der Abstand zwischen Emitter und Detektor des Lichtes ist bei den Sonden konstant. Da die Messtiefe von diesem Abstand abhängt [61], konnte die Messung auf die Mukosa beschränkt werden.

Durch Einstrahlung von Weißlicht in das Gewebe und die unterschiedliche Absorption von Hämoglobin je nach O₂-Sättigungsgrad wurde die mikrovaskuläre Sauerstoffsättigung (μHbO_2) in Prozent (%) und die lokale Hämoglobinmenge ($r\text{Hb}$) in *arbitrary Units* (aU) bestimmt [62]. Mit Hilfe des Laser-Dopplers konnte die Geschwindigkeit ($\mu\text{velocity}$) der im Gewebe befindlichen Erythrozyten und damit Flussgeschwindigkeit des Blutes bestimmt werden. Der Blutfluss in aU ist das Produkt aus der Integration der Flussgeschwindigkeiten und der Anzahl der Erythrozyten, die mittels Doppler-Formel berechnet werden konnte [59, 63].

2.4.10 Videomikroskopie der oralen Mukosa

Zusätzlich zur kontinuierlichen Aufzeichnung der oralen und gastralen Mikrozirkulation wurde die orale Mikrozirkulation in halbstündlichen Intervallen mittels Videomikroskopie (CytoCam, Braedius Medical, Huizen, Niederlande) untersucht. Die Kamera arbeitet nach dem Prinzip der „*incident dark field illumination*“ (IDF) [64].

Die Kamera verfügt über eine stiftförmige Sonde, in der sich der Sensor umgeben von zwölf LEDs befindet [65]. Die Aufnahmen erfolgten nach Vorgaben einer Konsensuskonferenz um das Auftreten von Kompressionsartefakten zu minimieren [66]. Die LEDs beleuchten die Mukosa mit einem 2 ms langen Lichtimpuls mit der Wellenlänge von 530 nm. Diese entspricht dem isobestischen Punkt von Desoxy- und Oxyhämoglobin und erlaubt es, die Erythrozyten unabhängig des Oxygenierungszustandes optimal darzustellen [62, 66]. Zu jedem Messzeitpunkt wurden fünf Aufnahmen mit 101 Einzelbildern und einer Länge von 4 Sekunden generiert. Die Größe des Einzelbildes (Abb. 1) entsprach dabei 1,55 mm x 1,16 mm [64, 65]. Kam es bei venösen Gefäßen > 30 μm zu einem stagnierenden oder diskontinuierlichen Fluss, wurde dies als Druckartefakt gewertet [67] und die Aufnahme für die Auswertung verworfen und wiederholt. Für die Beurteilung der Untersuchung wurden folgende Qualitätskriterien benannt: Die Messungen wurden an mindestens drei

verschiedenen Stellen an der Lefze pro Zeitpunkt erhoben, es lagen weder Bewegungs- noch Druckartefakte vor, Fokus und Kontrast waren optimal eingestellt und die Beurteilung war nicht durch Sekrete gestört. Die anschließende Auswertung der Aufnahmen (Abb. 2) erfolgte mittels einer Software der Firma Braedius Medical (CytoCam Tools 1.7.12, Braedius Medical, Huizen, Niederlande) [68, 69].

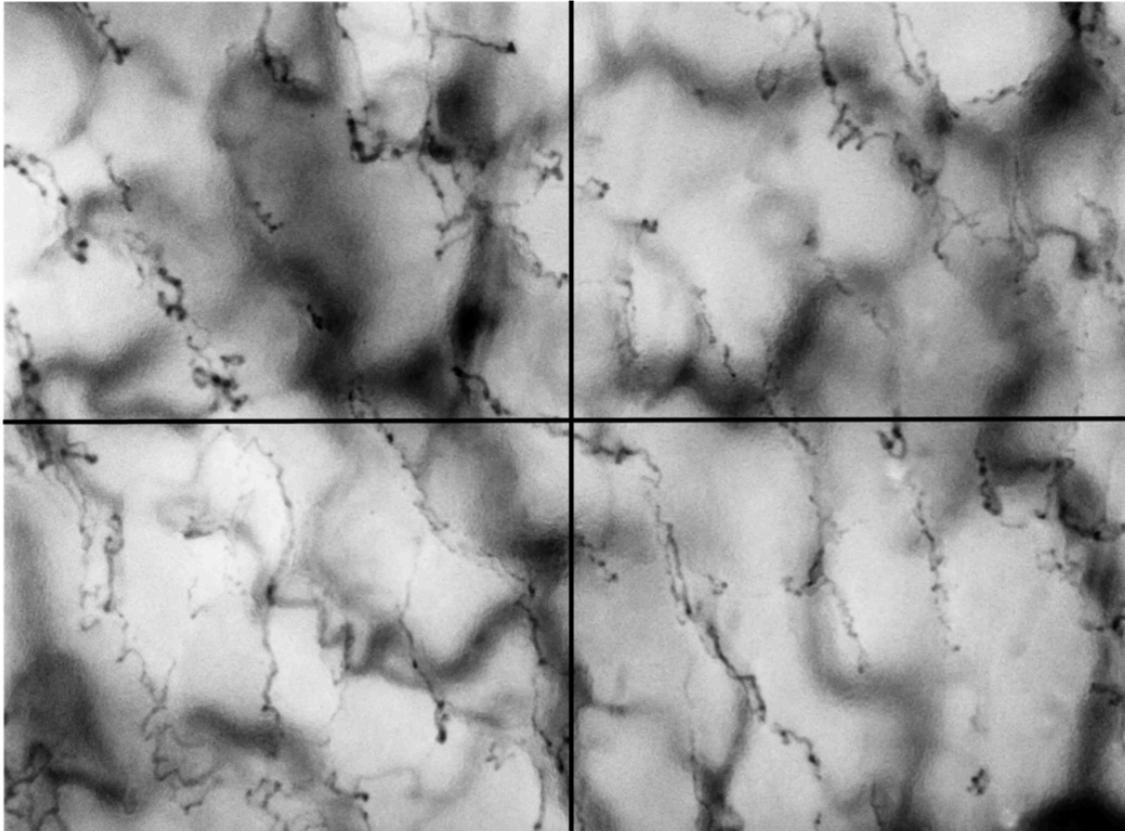


Abb. 1: Aufnahme der CytoCam von der oralen Mukosa, aufgenommen ist ein Sichtfeld von 1,55 x 1,16 mm mit einer 4-fachen optischen Vergrößerung und anschließender Einteilung in vier Quadranten.

Folgende Werte wurden durch die Software automatisiert berechnet: Die gesamte Gefäßdichte (*Total Vessel Density*, TVD [mm/mm^2]), die Dichte der durchbluteten Gefäße (*Perfused Vessel Density*, PVD [mm/mm^2]), der Anteil der durchbluteten Gefäße an der Gesamt-Gefäßdichte (*Proportion of Perfused Vessels*, PPV), sowie der durchschnittliche Geschwindigkeitsindex der durchbluteten Gefäße (*Average Perfused Speed Indicator*, APSI) [69]. Anschließend wurde manuell der Flussindex (*Microcirculatory Flow Index*, MFI) bestimmt. Hierfür wurden die Aufnahmen in vier Quadranten unterteilt (Abb. 1)

und die Flussqualität verblindet durch zwei Untersucher unabhängig voneinander beurteilt. Hierbei zeigte sich eine hohe Interrater- sowie Re-Test-Reliabilität. Eingeteilt wurde die Flussqualität für jeden Quadranten ordinalskaliert von 0 bis 3 (0 = kein Fluss (*absent*), 1 = unterbrochener Fluss (*intermittend*), 2 = zäher Fluss (*sluggish*), 3 = normaler Fluss (*normal*)). Die Werte für die vier Quadranten wurden gemittelt und auf eine natürliche Zahl gerundet. Anschließend wurden die Flussqualitäten aller gewerteten Aufnahmen zum jeweiligen Messzeitpunkt ebenfalls gemittelt und auf eine natürliche Zahl gerundet [67].

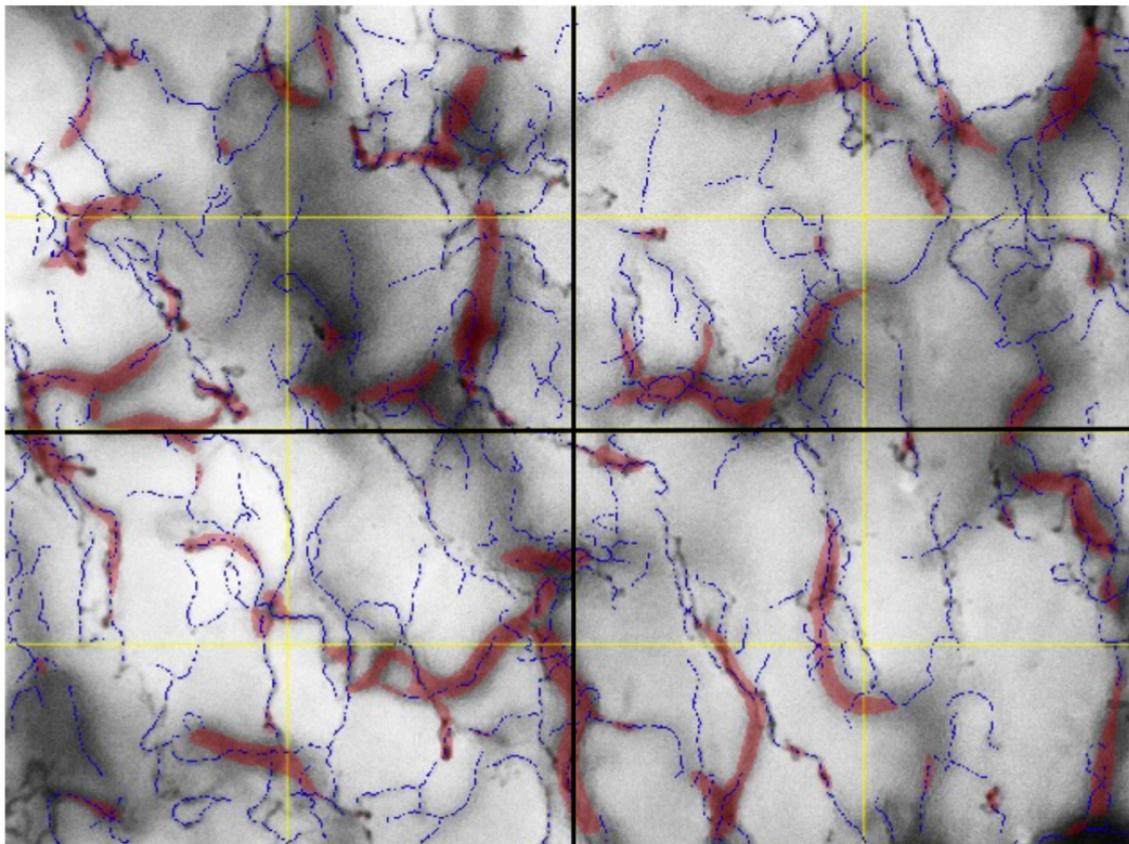


Abb. 2: Aufnahme der CytoCam von der oralen Mukosa nach Analyse durch Software (CytoCam Tools 1.7.12, Braedius Medical, Huizen, Niederlande), aufgenommen ist ein Sichtfeld von 1,55 x 1,16mm mit einer 4-fachen optischen Vergrößerung und anschließender Einteilung in vier Quadranten, blau dargestellt sind Kapillaren, rot dargestellt sind Gefäße > 30 µm

2.4.11 Messung der Barrierefunktion

Disaccharide wie Sucrose werden unter physiologischen Bedingungen rein parazellulär aufgenommen [70], sie können die gastrale Mukosa weder überwinden, noch werden sie im Magen enzymatisch abgebaut [71]. Im Dünndarm wird die Sucrose durch die Sucrase-Isomaltase in ihre Bestandteile

Glukose und Fruktose gespalten [72]. Diese Monosaccharide können die Mukosa überwinden und ins Blutplasma gelangen [70, 71]. Der Nachweis von Sucrose im Blutplasma dient daher als Indikator einer gestörten gastralen Barriere [71].

Zur Messung der Sucrospiegel wurden während des Versuches in halbstündlichen Intervallen Blutproben entnommen und nach einem Standardprotokoll weiterbehandelt [73]: Das Blut wurde in 6 ml EDTA Röhrchen (Vacutainer K2EDTA 18,0 mg, Plymouth, UK) gefüllt und umgehend zentrifugiert (15 min., 3000 rcf, 0 °C; Rotina 420R, Hettich Zentrifugen, Mülheim a.d. Ruhr, Deutschland). 30 µl der Plasmaüberstandes wurden mit 400 µl Extraktionslösung versetzt. Die Extraktionslösung bestand aus Aceton (Aceton, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland), Isopropanol (2-Propanolol, Carl Roth GmbH + Co. KG, Karlsruhe, Deutschland) und einer Stocklösung (20 mM Lösung aus Ribitol und H₂O) im Verhältnis 2000 : 1000 : 3. Die Lösung wurde 20 Sekunden homogenisiert (Vortex-Genie 1 Touch Mixer, Scientific Industries INC, Bohemia, USA), für fünf Minuten im 4 °C kalten Raum geschüttelt und anschließend erneut zentrifugiert (2 min., 20800 rcf, 0 °C, Centrifuge 5417R, Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Der Überstand wurde in neue Gefäße übertragen und eine Minute mit einem sanften Stickstoffstrom begast (Stickstoff verdichtet, Linde AG, Pullach, Deutschland). Die Zwischenlagerung bis zur Weiterverarbeitung fand bei -80 °C in Dunkelheit statt.

Die abschließende Derivatisierung der Blutproben, sowie Auswertung mittels Gaschromatographie und Massenspektrometrie, erfolgte in einem externen Labor [73].

2.5 Interventionen

2.5.1 Applikation von Sucroslösung

Allen Versuchsgruppen wurde 30 Minuten nach Etablierung der Baseline ein Bolus von 1,66 g/kgKG Sucrose (D-Sucrose, Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland) gelöst in 0,78 ml/kgKG isotonischer Kochsalzlösung über eine Magensonde verabreicht.

2.5.2 Applikation von Iloprost, Carbachol und Natriumchlorid

Parallel zur Applikation der Sucroselösung wurde den Versuchstieren zunächst ein gastraler Bolus von Iloprost (5-*cis* Iloprost, Cayman Chemicals, Ann Arbor, MI, USA), Carbachol (Carcamylcholine chloride von Sigma, C4382) oder die Kombination aus Iloprost und Carbachol jeweils gelöst in Natriumchlorid (Isotonische Kochsalzlösung, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg v.d.H., Deutschland) verabreicht. Als Kontrolle wurde 0,9 %ige Kochsalzlösung appliziert. Anschließend wurden die jeweiligen Medikamente kontinuierlich mittels Perfusor sowohl oral (0,66 ml/kgKG/h), als auch gastral (2 ml/kgKG/h) appliziert. Die orale Applikation erfolgte über einen Schlauch mit Löchern (0,058 in Innendurchmesser, 0,077 in Außendurchmesser, Silastic R, Dow Corning Corporation Medical Products, Michigan, USA), der die Flachsonde (vgl. 2.4.9) umfassend befestigt wurde. Die gastrale Applikation erfolgte über die Magensonde, über die ebenfalls die Mikrosonde platziert wurde. So konnte gewährleistet werden, dass die Applikation der Medikamente direkt am Messort stattfand. Das Volumen, sowohl beim gastralen Bolus, als auch bei der anschließenden kontinuierlichen oralen und gastralen Applikation, war in allen Versuchsgruppen identisch.

Die Zuteilung zu den Versuchsgruppen, sowie die Bereitstellung der Medikamente fand verblindet statt. Jedes der Versuchstiere durchlief alle vier Versuchsgruppen in randomisierter Reihenfolge. Das Versuchsprotokoll war für alle Gruppen bis auf die Applikation der Medikamente identisch. Folgende Versuchsgruppen wurden gebildet:

(1) NaCl + NaCl (KK)

In der Kontrollgruppe erhielten die Versuchstiere zunächst einen gastralen Bolus mit 0,25 ml/kgKG 0,9 %ige Kochsalzlösung, gefolgt von der kontinuierlichen Gabe 0,9 %ige Kochsalzlösung oral (0,66 ml/kgKG/h) und gastral (2 ml/kgKG/h).

(2) Iloprost + NaCl (IK)

In der zweiten Gruppe erhielten die Versuchstiere zunächst einen gastralen Bolus von 100 ng/kgKG Iloprost (in einem Volumen von 0,25 ml/kgKG), gefolgt

von der kontinuierlichen Gabe oral (660 ng/kgKG/h, in einem Volumen von 0,66 ml/kgKG/h) und gastral (2 µg/kgKG/h, in einem Volumen von 2 ml/kgKG/h).

(3) Carbachol + NaCl (CK)

Um die Effekte einer Behandlung von Carbachol auf die Mikrozirkulation zu untersuchen erhielten die Versuchstiere zunächst einen gastral Bolus von 20 µg/kgKG Carbachol (in einem Volumen von 0,25 ml/kgKG), gefolgt von der kontinuierlichen Gabe oral (3,33 µg/kgKG/h, in einem Volumen von 0,66 ml/kgKG/h) und gastral (10 µg/kgKG/h, in einem Volumen von 2 ml/kgKG/h).

(4) Iloprost + Carbachol (IC)

Um die Effekte einer kombinierten Behandlung mit Carbachol und Iloprost auf die Mikrozirkulation zu untersuchen, erhielten die Versuchstiere zunächst einen gastral Bolus von 100 ng/kgKG Iloprost und 20µg/kgKG Carbachol (in einem Volumen von 0,25 ml/kgKG), gefolgt von der kontinuierlichen Gabe oral (660 ng/kgKG/h Iloprost und 3,33 µg/kgKG/h Carbachol, in einem Volumen von 0,66 ml/kgKG/h) und gastral (2 µg/kgKG/h Iloprost und 10 µg/kgKG/h Carbachol, in einem Volumen von 2 ml/kgKG/h).

2.5.3 Hypovolämie

Zur Induktion eines milden hämorrhagischen Schocks wurde den Versuchstieren 20 % des angenommenen Blutvolumens entzogen Hierbei handelt es sich um einen hämorrhagischen Schock Grad 2 [74]. Bei einem geschätzten Blutvolumen von bis zu 80 ml/kgKG [75] wurden also jeweils 16 ml/kgKG über einen Zeitraum von maximal 10 Minuten entzogen. Das Blut wurde mittels heparinisierter (10 I.E. Heparin/ml Blut) Spritzen (Original Perfusor Syringe 50 ml, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) parallel über den einliegenden arteriellen Katheter (vgl. 2.4.3) und die Venenverweilkanüle im linken Vorderlauf entnommen und in einem 37 °C warmen Wasserbad (Thermomix 1420 Typ 850022, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) zwischengelagert. Nach 60 Minuten wurde das Blut über ein Infusionsset mit einem 200 µm Filter rasch

retransfundierte. Gleichzeitig wurde das Heparin mittels Protamin (Protamin ME 1000 I.E./ml, MEDA Pharma GmbH & Co. KG, Bad Homburg, Deutschland) im Verhältnis 2 : 1 antagonisiert. Bei diesem reversiblen, milden hämorrhagischen Schock ist von keinen Folgeschäden für das Versuchstier auszugehen [76].

2.6 Versuchsablauf

Die Versuche begannen stets zur selben Tageszeit (vgl. 2.2). Die Hunde wurden auf den Versuchstisch gehoben und in Rechtsseitenlage gebracht. Nach Anlage einer Venenverweilkanüle (18 G Vasofix Safety, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) am linken Hinterlauf wurde die Narkose mittels intravenöser Injektion (4 mg/kgKG, Propofol 1 % MCT Fresenius, Fresenius Kabi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) eingeleitet. Die Intubation (Lo Contourt Murphy 9.0, Mallinckrodt Medical, Athlone, Irland) erfolgte unter direkter Laryngoskopie (McIntosh-Spatel Gr.5, Medicon eG, Tuttlingen; Deutschland). Die Narkose wurde mittels kontrollierter maschineller Beatmung (Aestiva 5, Verdampfer Tec 7, Datex Ohmeda, Chalfont St.Giles, UK) und volatilem Narkotikum (Sevorane, Abbott GmbH + Co. KG, Wiesbaden, Deutschland) mit einem Tidalvolumen von 12,5 ml/kgKG aufrechterhalten. Dies entspricht einem physiologischen Tidalvolumen bei Hunden [77]. Die Hunde wurden konstant mit einer inspiratorischen Sauerstoffkonzentration (FiO_2) von 30 %, einem Inspirations-zu-Expirationsverhältnis (I : E) von 1 : 1,5 und einer expiratorischen Narkosegaskonzentration von 3,0 Volumenprozent (Vol%) (entsprechend einer Minimalen Alveolären Konzentration (MAC) von 1,5 bei Hunden [78]) beatmet. Der endtidale Kohlenstoffdioxidpartialdruck ($etCO_2$) wurde frequenzkontrolliert bei 35 mmHg gehalten. Um die Augen vor Austrocknung zu schützen, wurde eine Augensalbe (Bepanthen Augen- und Nasensalbe, Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) aufgetragen.

Im Anschluss wurden EKG-Elektroden (vgl. 2.4.2), Relaxometer (vgl. 2.4.7), sowie eine weitere Venenverweilkanüle (vgl. 2.4.4) angelegt. Der Thermodilutionskatheter (vgl. 2.4.4) wurde mittels Punktion der A. carotis (vgl. 2.3) in Seldinger-Technik und unter EKG-Kontrolle in der Aorta ascendens platziert. Im Anschluss wurde dieser zur kontinuierlichen Blutdruckmessung an einen Druckaufnehmer platziert (PE Verlängerungskatheter, Laboratoires

Pharmaceutiques VYGON, Ecouen, Frankreich) und mit dem PiCCO-System verbunden (vgl. 2.4.4). Es folgte die Relaxierung des Hundes mittels initialer Injektion von 0,6 mg/kgKG Rocuronium (Rocuroniumbromid-Ratiopharm, Ratiopharm GmbH, Ulm, Deutschland) über die Venenverweilkanüle am Hinterlauf, gefolgt von einer kontinuierlichen Gabe einer Erhaltungsdosis von 1 mg/kg/h über eine elektrische, druckgesteuerte Infusionspumpe (PILOT Anästhesie, Fresenius Vial S.A., Brezins, Frankreich). Anschließend wurde eine Magensonde gelegt, über die die Mikrosonde (vgl. 2.4.9) platziert werden konnte. Die Flachsonde (vgl. 2.4.9) wurde auf die Innenseite der linken Lefze gelegt und ihre Position mit einem außen aufgebrauchten Klebestreifen markiert.

Nach Stabilisierung aller aufgezeichneten Werte erfolgten die ersten zwei Thermodilutionen (vgl. Abb. 3: „TD 1 / 2“), sowie eine BGA (vgl. Abb. 3: „BGA 1“) und die ersten Aufnahmen der *CytoCam* von Zunge und Lefze (vgl. Abb. 3: „VL“). Dies wurde in halbstündlichen Intervallen zu den jeweiligen Messzeitpunkten (vgl. Abb. 3: „BL“, „Drug“, „HV30“, „HV60“, „RT30“, „RT60“) und vor Beginn der jeweiligen Intervention (Sucroseapplikation (vgl. 2.5.1), Medikamentenapplikation (vgl. 2.5.2), Hypovolämie und Retransfusion (vgl. 2.5.3) wiederholt. Zu allen Messzeitpunkten außer „RT60“ erfolgte eine Blutentnahme zur Sucrosebestimmung (vgl. Abb. 3: „BE“).

2.7 Statistische Auswertung

Zur Überprüfung der Normalverteilung der Messwerte für eine multifaktorielle Varianzanalyse wurde eine Testung mittels Q-Q-Plots graphisch dargestellt (IBM SPSS Statistics, Version 23.0). Die Auswertung der Gruppen erfolgte mittels 2-way ANOVA für wiederholte Messungen. Danach wurde ein Bonferroni posthoc Test für mehrfache Vergleiche durchgeführt (GraphPad Prism 7.0c for Mac, GraphPad Software, La Jolla, USA). Die Ergebnisse sind als Mittelwert \pm Standardfehler angegeben. Die Daten, die keiner Normalverteilung entsprachen, wurden als Median \pm Standardfehler des Medians angegeben. Die Auswertung wurde mittels H-Test nach Kruskal-Wallis für unabhängige Stichproben und mittels Friedmann-Test für verbundene Stichproben durchgeführt (GraphPad Prism 7.0c for Mac, GraphPad Software, La Jolla, USA). Von einer statistischen Signifikanz wurde bei einem p-Wert $< 0,05$ ausgegangen.

2.8 Versuchsprotokoll

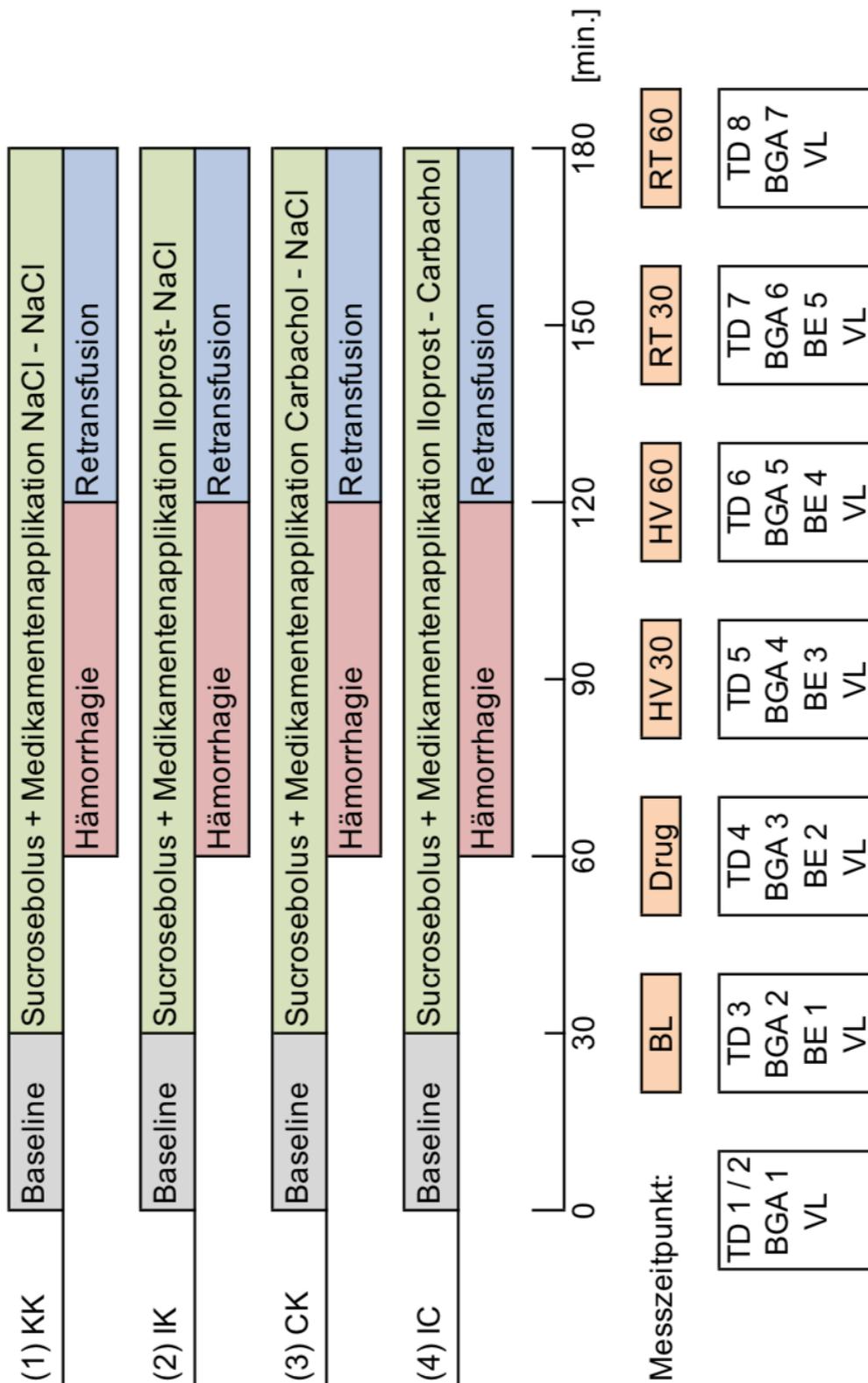


Abb. 3: Versuchsprotokoll im Zeitverlauf, Aufteilung in die Versuchsgruppen, Darstellung der Messzeitpunkte und Interventionen: KK = NaCl + NaCl; IK = Iloprost + NaCl; CK = Carbachol + NaCl; IC = Iloprost + Carbachol; BL = Baseline; HV = Hypovolämie; RT = Retransfusion; TD = Thermodilution; BGA = Blutgasanalyse; BE = Blutentnahme; VL = Videomikroskopie der Lefze

3 Ergebnisse

3.1 Gewebespektrofotometrie der gastralen Mukosa

Die lokale Applikation der Substanzen führte unter physiologischen Kreislaufbedingungen in keiner der Versuchsgruppen zu einer Veränderung der gastralen Oxygenierung (μHbO_2). Die gastrale μHbO_2 sank in der Kontrollgruppe (KK) unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen von $77 \pm 3 \%$ auf $38 \pm 8 \%$ (HV30) ab. Die alleinige Applikation von Iloprost (IK) zeigte hier keinen signifikanten Effekt (Baseline: $76 \pm 4 \%$ zu HV30: $47 \pm 7 \%$, $p = 0,7513$). Auch Carbachol alleine (CK) hatte hier keinen signifikanten Effekt auf die gastrale μHbO_2 im Schock (BL: $75 \pm 4 \%$ zu HV30: $53 \pm 7 \%$, $p = 0,1095$). Die gleichzeitige Gabe von Iloprost und Carbachol (IC) zeigte jedoch eine signifikant gesteigerte gastrale μHbO_2 im Vergleich zur Kontrollgruppe (BL: $81 \pm 4 \%$ zu HV30: $56 \pm 5 \%$, $p = 0,0135$). Nach der Retransfusion zeigte sich kein Unterschied mehr zwischen den Gruppen (Tabelle 1) (Abb. 4).

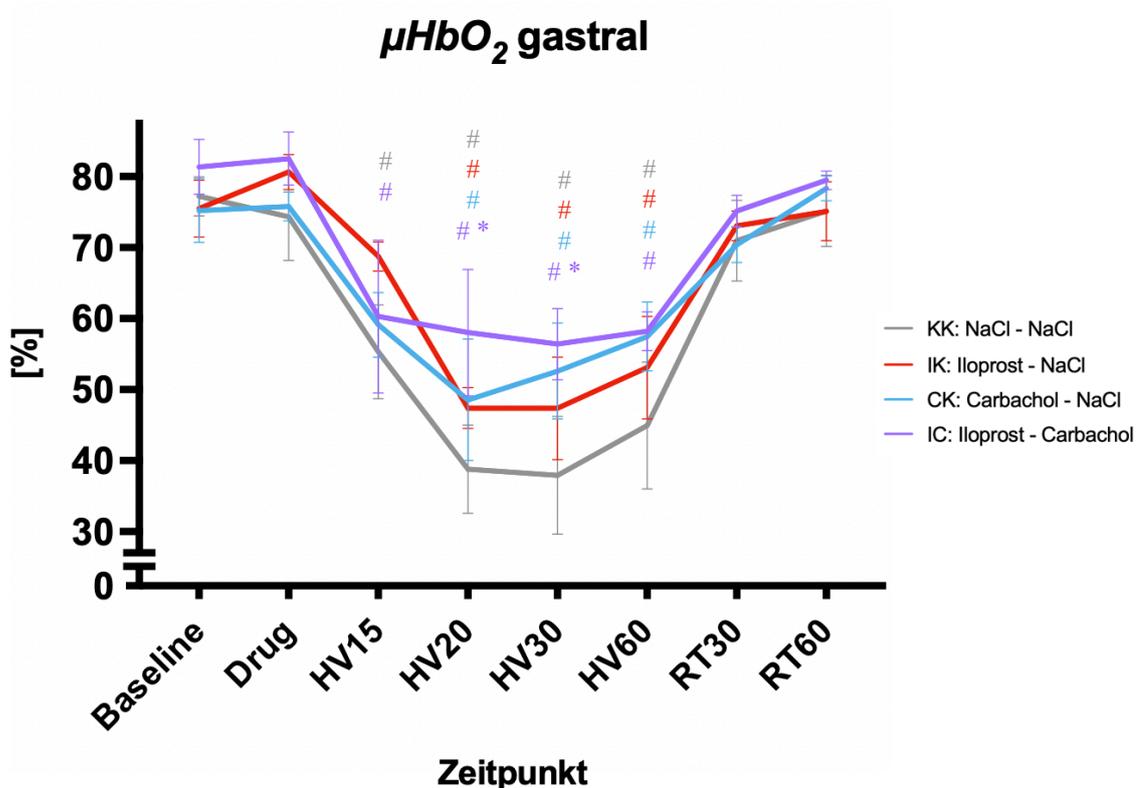


Abb. 4: Gastrale Oxygenierung (μHbO_2) in %. Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (15, 20, 30, 60) in Minuten. Dargestellt als MW \pm SEM für $n = 5$ Hunde, * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe, # = $p < 0,05$ zur jeweiligen Baseline.

Auch auf die gastrale mikrozirkulatorische Flussrate ($\mu flow$) hatte die lokale Applikation der Substanzen unter physiologischen Kreislaufbedingungen keinen Einfluss. Unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV30) zeigte sich in allen Versuchsgruppen ein nicht signifikanter Abfall des $\mu flow$, ohne signifikanten Unterschied zur Kontrollgruppe (KK) (HV30: KK = 128 ± 10 aU vs. IK = 169 ± 31 aU vs. CK = 121 ± 19 aU vs. IC = 133 ± 14 aU) (Tabelle 1).

Sowohl bei der gastralen mikrozirkulatorischen Flussgeschwindigkeit ($\mu velocity$) (HV30: KK = $15,7 \pm 0,8$ aU vs. IK = $16,4 \pm 1,0$ aU vs. CK = $16,2 \pm 1,7$ aU vs. IC = $17,5 \pm 1,1$ aU), als auch bei der gastralen lokalen Hämoglobinmenge (rHb) (HV30: KK = $47,1 \pm 7,9$ aU vs. IK = $42,0 \pm 1,7$ aU vs. CK = $52,4 \pm 4,5$ aU vs. IC = $50,0 \pm 4,8$ aU) zeigten sich entsprechend dem gastralen $\mu flow$ ein nicht signifikanter Abfall der Werte unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen. Sowohl nach Applikation der Substanzen (Drug), als auch nach Induktion der milden Hämorrhagie (HV30) und nach Retransfusion (RT30) zeigten sich in den Versuchsgruppen keine Unterschiede zur Kontrollgruppe (KK) (Tabelle 1).

3.2 Gewebespektrofotometrie der oralen Mukosa

Bei der oralen μHbO_2 kam es in keiner der Versuchsgruppen nach Applikation der Substanzen, während der milden Hämorrhagie oder nach der Retransfusion zu signifikanten Unterschieden zur Kontrollgruppe (KK) (Tabelle 1).

Der orale $\mu flow$ war nach Applikation der Substanzen in allen Versuchsgruppen im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht (Drug: KK = 72 ± 5 aU vs. IK = 148 ± 20 aU vs. CK = 145 ± 26 aU vs. IC = 129 ± 27 aU). Während der milden Hämorrhagie zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied zwischen den Versuchsgruppen. In der frühen Phase der Retransfusion (RT30) zeigte sich noch ein signifikant höherer $\mu flow$ in der Carbachol-Gruppe (CK) ($p = 0,003$) und in der Iloprost-Carachol-Gruppe (IC) ($p = 0,0191$) im Vergleich zur Kontrollgruppe (KK) (RT30: KK = 83 ± 7 aU vs. CK = 160 ± 35 aU vs. IC = 147 ± 24 aU). In der späten Retransfusion (RT60) war dieser signifikante Effekt nicht mehr nachweisbar (Tabelle 1) (Abb. 5).

μflow oral

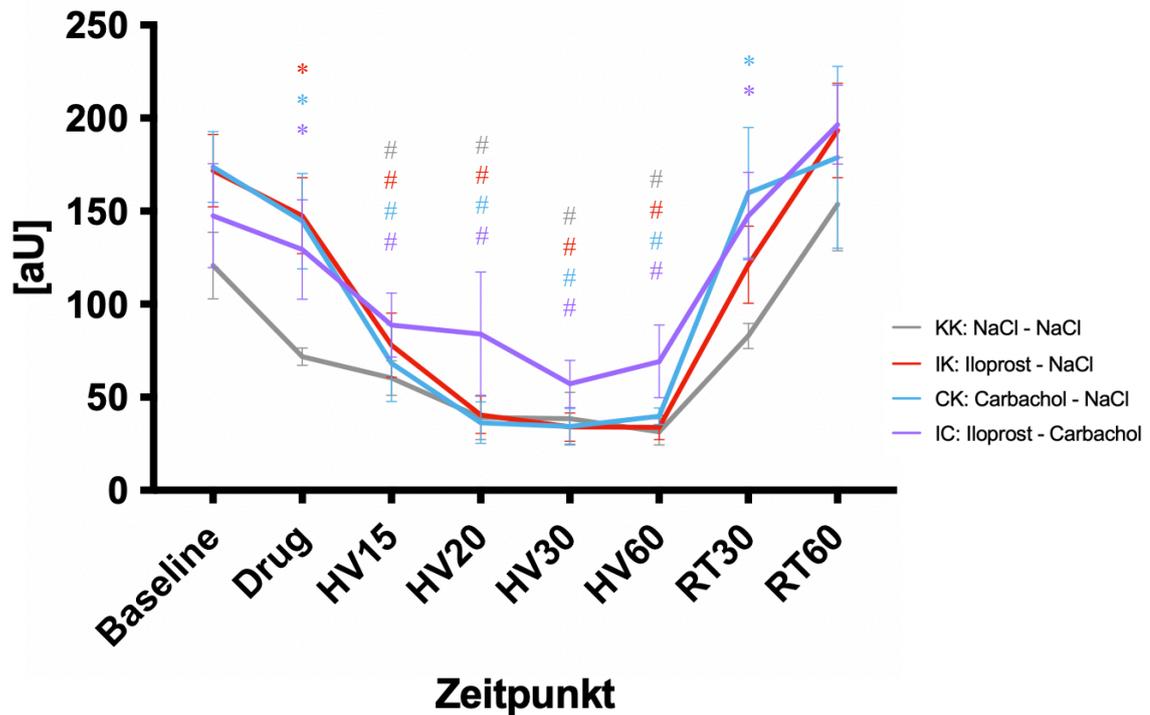


Abb. 5: Orale mikrozirkuläre Blutfluss (μ flow) in arbitrary Unit (aU). Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (15, 20, 30, 60) in Minuten. Dargestellt als MW \pm SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe, # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

Parallel zur oralen μ flow war die orale μ velocity nach Applikation von Iloprost (IK) im Vergleich zur Kontrollgruppe (KK) erhöht (Drug: KK = 18,7 \pm 1,2 aU vs. IK = 26,5 \pm 2,4 aU, p = 0,0430). Auch hier war dieser Unterschied während der milden Hämorrhagie (HV30) nicht mehr nachweisbar. Im hämorrhagischen Schock kam es zu einem Abfall der oralen μ velocity (KK: BL = 24,2 \pm 2,9 aU zu HV30 = 14,9 \pm 2,5 aU, p = 0,0125). Dieser Abfall war nach der kombinierten Applikation von Iloprost und Carbachol (IC) nicht zu beobachten (BL: 25,5 \pm 3,5 aU vs. HV30: 19,9 \pm 3,5 aU, p = 0,3599). Auch war die orale μ velocity in der Iloprost-Carbachol-Gruppe zum Zeitpunkt HV60 und in der frühen Phase der Retransfusion (RT 30) signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe (KK) (HV60: KK = 13,3 \pm 1,0 aU vs. IC = 24,5 \pm 5,1 aU, p = 0,0009; RT30: KK = 20,2 \pm 1,3 aU vs. IC = 30,2 \pm 3,5 aU, p = 0,0039). Die anderen Gruppen zeigten alle einen signifikanten Abfall der oralen μ velocity in der Hämorrhagie im Vergleich zur Baseline (Tabelle 1) (Abb. 6).

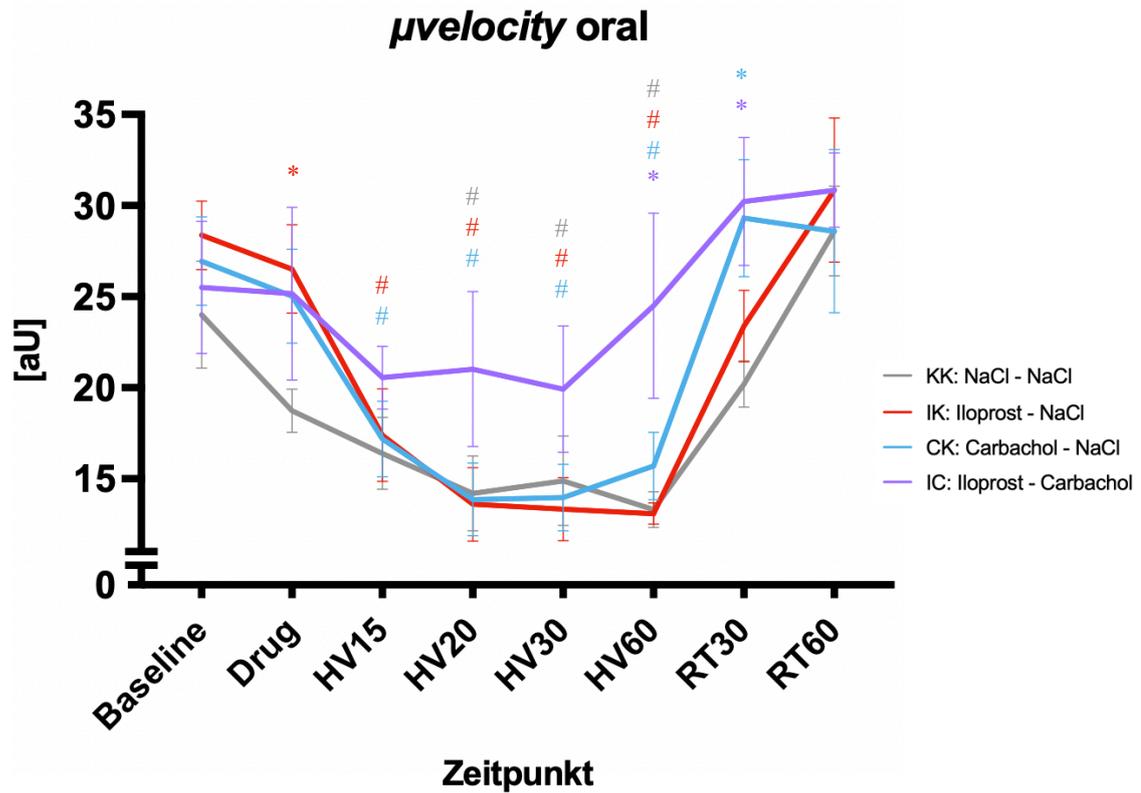


Abb. 6: Orale mikrozirkuläre Flussgeschwindigkeit (μ velocity) in arbitrary Unit (aU). Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (15, 20, 30, 60) in Minuten. Dargestellt als MW \pm SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe, # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

Bei der Messung der oralen lokalen Hämoglobinmenge (*rHb*) gab es zu keinem Messzeitpunkt einen signifikanten Unterschied zwischen den Versuchsgruppen und der Kontrollgruppe (KK) (Tabelle 1).

3.3 Videomikroskopie der oralen Mukosa

In der videomikroskopischen Untersuchung der oralen Mukosa zeigte sich in allen vier Versuchsgruppen unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV30) ein signifikanter Abfall der totalen Gefäßdichte (TVD) im Vergleich zu den jeweiligen Baseline-Werten (KK) (KK: BL = $18,8 \pm 0,4 \text{ mm/mm}^2$ zu HV30 = $13,2 \pm 1,2 \text{ mm/mm}^2$; IK: BL = $20,0 \pm 1,2 \text{ mm/mm}^2$ zu HV30 = $13,4 \pm 1,5 \text{ mm/mm}^2$; CK: BL = $18,9 \pm 0,7 \text{ mm/mm}^2$ zu HV30 = $16,2 \pm 1,0 \text{ mm/mm}^2$; IC: BL = $17,7 \pm 1,2 \text{ mm/mm}^2$ zu HV30 = $13,1 \pm 1,2 \text{ mm/mm}^2$). In der Carbachol-Gruppe (CK) zeigte sich während der gesamten Hämorrhagie ein signifikant geringerer Abfall der TVD verglichen mit der Kontrollgruppe (KK) (HV60: KK = $13,1 \pm 1,2 \text{ mm/mm}^2$ vs. CK = $16,6 \pm 1,1 \text{ mm/mm}^2$). Dieser Unterschied war zum Versuchsende nicht mehr zu beobachten. Die kombinierte Gabe von Iloprost und Carbachol (IC) führte zu keinem Zeitpunkt zu einer höheren Gefäßdichte als in der Kontrollgruppe (KK) (Tabelle 2) (Abb. 7).

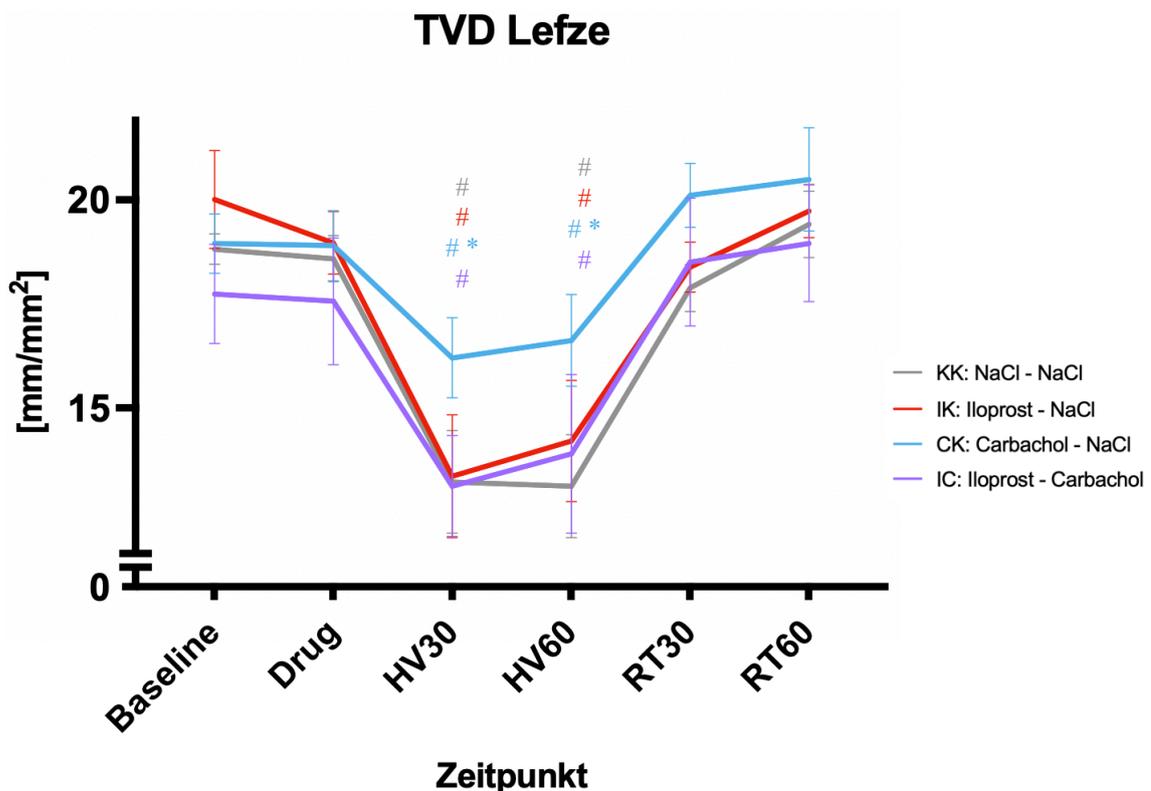


Abb. 7: Totale Gefäßdichte der Lefze (TVD) in mm/mm^2 . Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (30, 60) in Minuten. Dargestellt als MW \pm SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe, # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

Analog zur TVD kam es in allen vier Versuchsgruppen unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen (HV30) zu einem signifikanten Abfall der funktionellen Gefäßdichte (PVD) im Vergleich zu den jeweiligen Baseline-Werten (KK). In der Carbachol-Gruppe war die PVD während der späten Hämorrhagie (HV60) dabei signifikant höher verglichen mit der Kontrollgruppe (KK) (HV60: KK = $5,0 \pm 1,4$ mm/mm² vs. CK = $8,9 \pm 1,0$ mm/mm², $p = 0,0168$). Dieser Unterschied war auch nach der Retransfusion (RT30) zunächst noch signifikant (RT30: KK = $8,5 \pm 2,0$ mm/mm² vs. CK = $13,5 \pm 1,3$ mm/mm², $p = 0,0011$), zum Versuchsende (RT60) jedoch nicht mehr zu beobachten. Auch hier konnte dies nicht durch eine kombinierte Applikation von Iloprost und Carbachol reproduziert werden (Tabelle 2).

Bezüglich des Anteiles der perfundierten Gefäße (PPV) zeigte sich unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen kein Unterschied zwischen den Gruppen. Allerdings zeigten sich in der Carbachol-Gruppe (CK) und in der Iloprost-Carachol-Gruppe (IC) kein Abfall der PPV während der Hämorrhagie im Vergleich zum jeweiligen Baseline-Wert (CK: BL = $59,8 \pm 4,6$ % zu HV30 = $46,2 \pm 5,5$ %, IC: BL = $53,9 \pm 13,1$ % zu HV30 = $41,2 \pm 9,9$ %). Auch hier zeigten sich für die Carbachol-Gruppe (CK) in der frühen Retransfusion (RT30) signifikant höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe (KK) (RT30: KK = $46,9 \pm 10,2$ % vs. CK = $66,0 \pm 4,4$ %) (Tabelle 2).

Ähnlich der TVD sank der manuell bestimmte Flussindex (MFI) in Hämorrhagie in allen Versuchsgruppen signifikant im Vergleich zur jeweiligen Baseline und ohne Unterschied zwischen den Gruppen ab (KK: BL = $2,9 \pm 0$ zu HV30 = $1,7 \pm 0,1$; IK: BL = $2,8 \pm 0,1$ zu HV30 = $1,6 \pm 0,2$; CK: BL = $2,9 \pm 0,1$ zu HV30 = $1,7 \pm 0,3$; IC: BL = $2,8 \pm 0,1$ zu HV30 = $1,5 \pm 0,2$). Auch hier zeigte die Carbachol-Gruppe in der späten Hämorrhagie (HV60) signifikant höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe (KK = $1,8 \pm 0,2$ vs. CK = $2,3 \pm 0,1$, $p = 0,0009$), wohingegen die kombinierte Applikation von Iloprost und Carbachol (IC) keinen zusätzlichen Effekt zeigte (KK = $1,8 \pm 0,2$ vs. IC = $2,0 \pm 0,2$, $p = 0,3931$) (Tabelle 2) (Abb. 8).

MFI Lefze

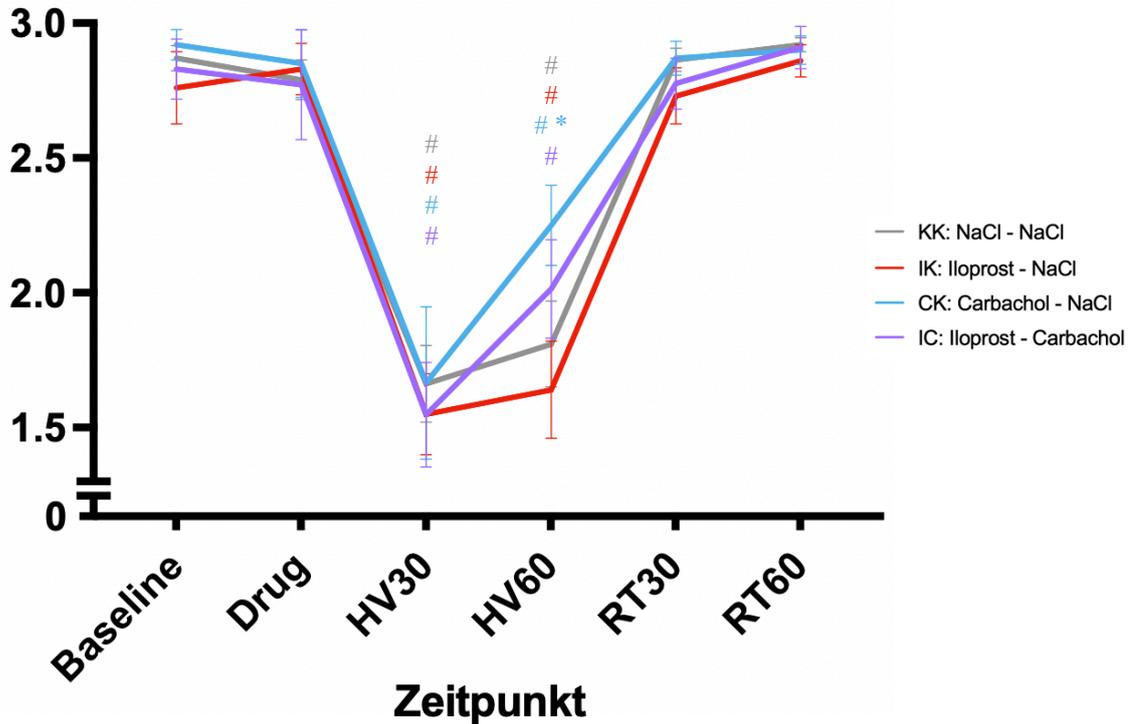


Abb. 8: Microcirculatory Flow Index (MFI). Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (30, 60) in Minuten. Dargestellt als MW \pm SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe, # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

Variabel	Gruppe	Baseline	Drug	HV 30		HV 60		RT 30	RT 60
		[min]	30	60	90	120	150	180	
TVD Lefze [mm/mm ²]	KK	18,8 \pm 0,4	18,6 \pm 0,6	13,2 \pm 1,2	# *CK	13,1 \pm 1,2	# *CK	17,9 \pm 0,6	19,4 \pm 0,8
	IK	20 \pm 1,2	19 \pm 0,8	13,4 \pm 1,5	# *CK	14,2 \pm 1,5	# *CK	18,4 \pm 0,6	19,7 \pm 0,6
	CK	18,9 \pm 0,7	18,9 \pm 0,8	16,2 \pm 1	# *KK, IK, IC	16,6 \pm 1,1	# *KK, IK, IC	20,1 \pm 0,8	20,5 \pm 1,2
	IC	17,7 \pm 1,2	17,6 \pm 1,5	13,1 \pm 1,2	# *CK	13,9 \pm 1,9	# *CK	18,5 \pm 1,5	19 \pm 1,4
PVD Lefze [mm/mm ²]	KK	11,9 \pm 0,5	11,1 \pm 0,7	5,3 \pm 1,1	#	5 \pm 1,4	# *CK	8,5 \pm 2	# *CK
	IK	13,1 \pm 1,8	10,6 \pm 1,2	5,9 \pm 1,1	#	6,5 \pm 1	#	10,8 \pm 0,9	12,2 \pm 0,8
	CK	11,5 \pm 1,2	13,4 \pm 0,9	7,7 \pm 1,1	#	8,9 \pm 1	*KK	13,5 \pm 1,3	*KK
	IC	10 \pm 2,7	10,5 \pm 2,9	6 \pm 1,6	#	7,1 \pm 2,5	#	10,3 \pm 2,5	11,8 \pm 2,4
PPV Lefze [%]	KK	61,8 \pm 2,3	59,2 \pm 3	40,3 \pm 6,6	#	37,7 \pm 7,1	#	46,9 \pm 10,2	*CK
	IK	64,4 \pm 5,8	54,6 \pm 4,9	43,3 \pm 4,9	#	44,6 \pm 3,7	#	58,3 \pm 4,1	#
	CK	59,8 \pm 4,6	66,8 \pm 3,5	46,2 \pm 5,5	#	48,4 \pm 4,7	#	66 \pm 4,4	*KK
	IC	53,9 \pm 13,1	55,8 \pm 13,3	41,2 \pm 9,9	#	46,8 \pm 11,3	#	51,8 \pm 9,9	#
APSI Lefze	KK	3,6 \pm 0,3	3,5 \pm 0,3	2,7 \pm 0,3	#	3 \pm 0,3	#	3 \pm 0,4	*CK
	IK	4,1 \pm 0,4	3,5 \pm 0,2	3 \pm 0,2	#	3,1 \pm 0,1	#	3,4 \pm 0,1	#
	CK	3,9 \pm 0,2	4 \pm 0,3	3,2 \pm 0,2	#	3,3 \pm 0,2	#	4 \pm 0,2	*KK
	IC	3,6 \pm 0,5	4 \pm 0,4	3 \pm 0,3	#	3,1 \pm 0,4	#	3,5 \pm 0,3	#
MFI Lefze	KK	2,9 \pm 0	2,8 \pm 0,1	1,7 \pm 0,1	#	1,8 \pm 0,2	# *CK	2,9 \pm 0	2,9 \pm 0
	IK	2,8 \pm 0,1	2,8 \pm 0,1	1,6 \pm 0,2	#	1,6 \pm 0,2	# *CK, IC	2,7 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1
	CK	2,9 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1	1,7 \pm 0,3	#	2,3 \pm 0,1	# *KK, IK	2,9 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1
	IC	2,8 \pm 0,1	2,8 \pm 0,2	1,5 \pm 0,2	#	2 \pm 0,2	# *IK	2,8 \pm 0,1	2,9 \pm 0,1

Tabelle 2: Ergebnisse der CytoCam-Messungen der oralen Mukosa. Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (30, 60) in Minuten und Zeitangabe im Gesamtversuchsverlauf in Minuten, dargestellt als MW \pm SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur jeweils angegebenen Gruppe (KK = NaCl–NaCl, IK = Iloprost–NaCl, CK = Carbachol–NaCl, IC = Iloprost–Carbachol), # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

3.4 Systemische Hämodynamik

Unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen kam es in der Kontrollgruppe (KK) zu einer Reduktion des Herzzeitvolumens (HZV) (BL = 81 ± 4 ml/kg/min auf HV30 = 47 ± 1 ml/kg/min) als Folge einer Abnahme des Schlagvolumens (SV) (BL = 24 ± 1 ml auf HV30 = 15 ± 1 ml) bei gleichzeitig leicht abfallender Herzfrequenz (HR) (BL = 114 ± 2 1/min auf HV30 = 109 ± 3 1/min). Daraus resultierend sank das systemische Sauerstoffangebot (DO_2) (BL = 13 ± 1 ml/kg/min auf HV30 = 8 ± 0 ml/kg/min) (Abb. 9). Trotz eines kompensatorisch gestiegenen systemischen Gefäßwiderstands (SVR) (BL = 22 ± 1 mmHg*min/l auf HV30 = 31 ± 2 mmHg*min/l) fiel der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) ab (BL = 60 ± 2 mmHg auf HV30 = 48 ± 3 mmHg) (Abb. 10). Die stattfindende Dynamik im Zeitverlauf zeigte sich in allen Versuchsgruppen entsprechend der Kontrollgruppe (KK) (Tabelle 3).

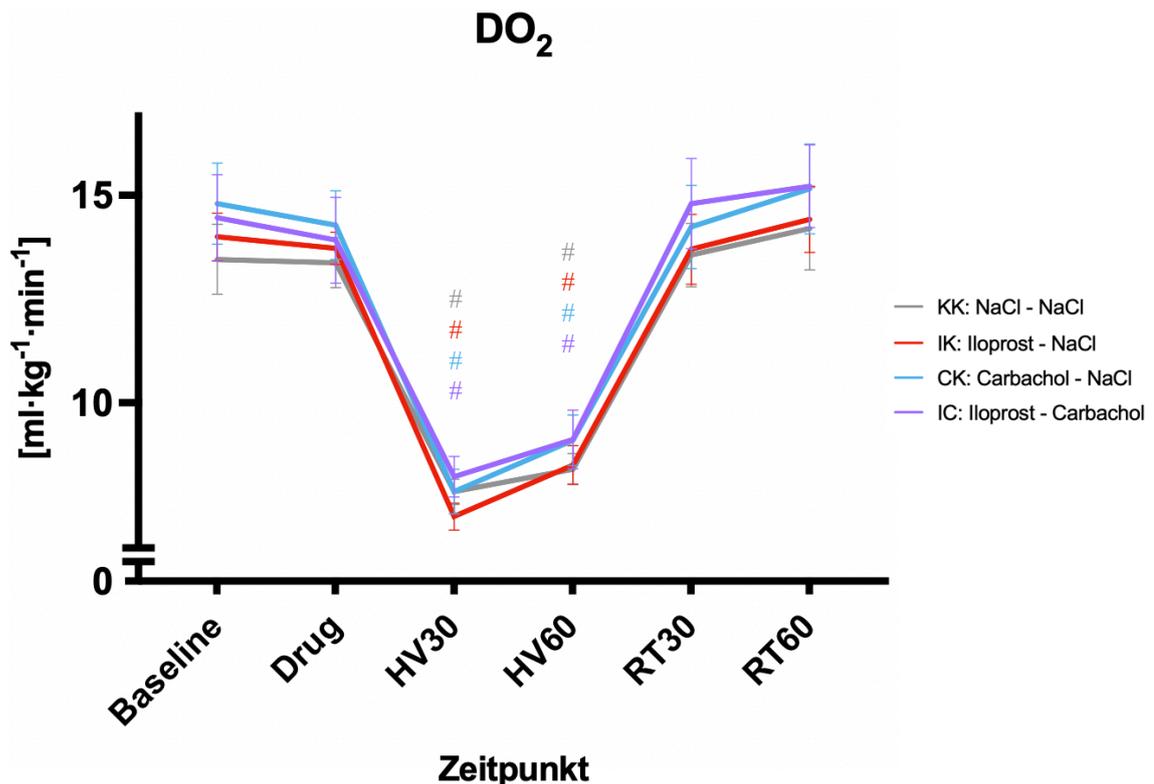


Abb. 9: Systemisches Sauerstoffangebot (DO_2) in ml/kg/min. Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (30, 60) in Minuten. Dargestellt als MW \pm SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe, # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

Bei den Versuchsgruppen zeigten weder DO₂ noch HZV nach lokaler Applikation der Pharmaka während der milden Hämorrhagie und nach der Retransfusion Unterschiede zur Kontrollgruppe. In allen Versuchsgruppen entsprachen die Werte der DO₂ am Ende des Versuchs (RT60) wieder den jeweiligen Baseline-Werten (KK: BL = 13 ± 1 ml/kg/min vs. RT60 = 14 ± 1 ml/kg/min, IK: BL = 14 ± 1 ml/kg/min vs. RT60 = 14 ± 1 ml/kg/min, CK: BL = 15 ± 1 ml/kg/min vs. RT60 = 15 ± 1 ml/kg/min, IC: BL = 14 ± 1 ml/kg/min vs. RT60 = 15 ± 1 ml/kg/min) (Tabelle 3) (Abb. 9).

Auch bezüglich SV, HR und SVR gab es nach lokaler Applikation der Pharmaka (Drug) sowie in der milden Hämorrhagie (HV30) keine Unterschiede zwischen den Gruppen (Tabelle 3).

Beim MAP zeigte sich sowohl in der Carbachol-Gruppe als auch in der Iloprost-Carbachol-Gruppe eine schnelle Erholung der Werte in der späten Hämorrhagie (HV60), ohne jedoch signifikant höher zu sein im Vergleich zur Kontrollgruppe. Nach der Retransfusion stieg der MAP in der Carbachol-Gruppe stark an und war zum Versuchende (RT60) signifikant höher als in der Kontrollgruppe (KK = 69 ± 4 mmHg vs. CK = 74 ± 3 mmHg) (Tabelle 3) (Abb. 10).

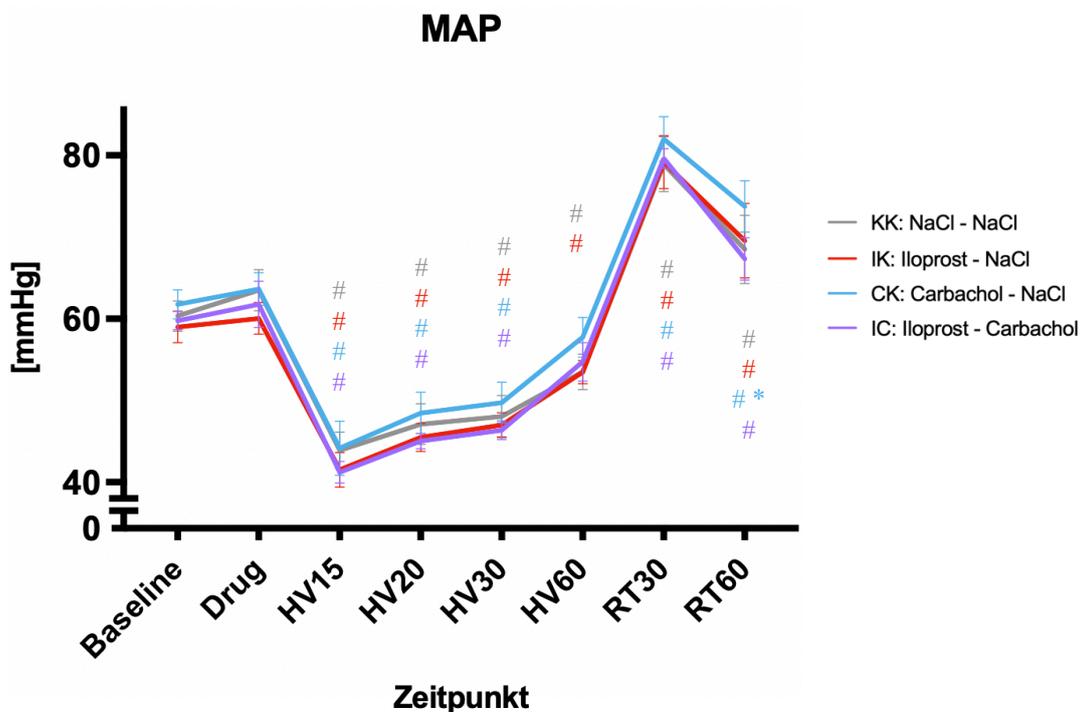


Abb. 10: Mittlerer arterielle Blutdruck (MAP) in mmHg. Versuchszeitpunkte (HV= Hypovolämie, RT= Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (15, 20, 30, 60) in Minuten. Dargestellt als MW ± SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur Kontrollgruppe, # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

Variabel [min]	Gruppe	Baseline 30	Drug 60	HV 15		HV 20		HV 30		HV 60		RT 30		RT 60	
				75		80		90		120		150		180	
DO ₂ [ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹]	KK	13 ± 1	13 ± 1					8 ± 0 #	8 ± 0 #	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
	IK	14 ± 1	14 ± 0					7 ± 0 #	8 ± 0 #	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1
	CK	15 ± 1	14 ± 1					8 ± 1 #	9 ± 1 #	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	14 ± 1	15 ± 1
	IC	14 ± 1	14 ± 1					8 ± 0 #	9 ± 1 #	15 ± 1	15 ± 1	15 ± 1	15 ± 1	15 ± 1	15 ± 1
SVR [mmHg·l ⁻¹ ·min]	KK	22 ± 1	24 ± 1					31 ± 2 #	31 ± 2 #	28 ± 2 #	28 ± 2 #	28 ± 2 #	28 ± 2 #	23 ± 2	23 ± 2
	IK	21 ± 1	22 ± 1					32 ± 3 #	31 ± 2 #	29 ± 2 #	29 ± 2 #	29 ± 2 #	29 ± 2 #	24 ± 3	24 ± 3
	CK	21 ± 1	22 ± 1					32 ± 4 #	32 ± 3 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #	23 ± 1	23 ± 1
	IC	22 ± 1	23 ± 2					30 ± 2 #	31 ± 1 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #	22 ± 0	22 ± 0
HZV [ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹]	KK	81 ± 4 *CK	81 ± 2					47 ± 1 #	52 ± 2 #	84 ± 4	84 ± 4	84 ± 4	84 ± 4	88 ± 5	88 ± 5
	IK	85 ± 3	83 ± 1					44 ± 2 #	52 ± 2 #	84 ± 4	84 ± 4	84 ± 4	84 ± 4	89 ± 4	89 ± 4
	CK	90 ± 6 *KK	87 ± 5					47 ± 4 #	56 ± 3 #	89 ± 5	89 ± 5	89 ± 5	89 ± 5	95 ± 6	95 ± 6
	IC	88 ± 6	85 ± 6					50 ± 2 #	56 ± 4 #	91 ± 6	91 ± 6	91 ± 6	91 ± 6	95 ± 6	95 ± 6
SV [ml]	KK	24 ± 1 *CK	24 ± 1					15 ± 1 #	16 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #
	IK	25 ± 2	24 ± 1					13 ± 1 #	15 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	29 ± 2 #	29 ± 2 #
	CK	26 ± 1 *KK	25 ± 1					14 ± 1 #	16 ± 1 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #	30 ± 1 #	30 ± 1 #
	IC	24 ± 1	23 ± 1					14 ± 1 #	16 ± 0 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	27 ± 1 #	28 ± 1 #	28 ± 1 #
dPmax [mmHg ⁻¹ ·s]	KK	432 ± 24	398 ± 22					332 ± 12 #	324 ± 16 #	392 ± 11 *IC	428 ± 24 *IC	428 ± 24 *IC			
	IK	486 ± 29	464 ± 29					326 ± 27 #	340 ± 25 #	418 ± 37 #	418 ± 37 #	418 ± 37 #	418 ± 37 #	428 ± 35 *IC	428 ± 35 *IC
	CK	486 ± 17	452 ± 19					334 ± 21 #	362 ± 25 #	418 ± 30 #	418 ± 30 #	418 ± 30 #	418 ± 30 #	454 ± 34	454 ± 34
	IC	482 ± 23	450 ± 20					358 ± 19 #	376 ± 22 #	476 ± 64 *KK	514 ± 59 *KK, IK	514 ± 59 *KK, IK			
MAP [mmHg]	KK	60 ± 2	64 ± 3					48 ± 3 #	54 ± 2 #	79 ± 3 #	79 ± 3 #	79 ± 3 #	79 ± 3 #	69 ± 4 # *CK	69 ± 4 # *CK
	IK	59 ± 2	60 ± 2					47 ± 1 #	53 ± 1 #	79 ± 3 #	79 ± 3 #	79 ± 3 #	79 ± 3 #	70 ± 5 #	70 ± 5 #
	CK	62 ± 2	64 ± 2					50 ± 2 #	58 ± 2 #	82 ± 3 #	82 ± 3 #	82 ± 3 #	82 ± 3 #	74 ± 3 # *KK, IC	74 ± 3 # *KK, IC
	IC	60 ± 1	62 ± 3					46 ± 1 #	55 ± 2 #	80 ± 1 #	80 ± 1 #	80 ± 1 #	80 ± 1 #	67 ± 3 # *CK	67 ± 3 # *CK
HR [min ⁻¹]	KK	114 ± 2	115 ± 2					109 ± 3 #	112 ± 2 #	103 ± 3 #	103 ± 3 #	103 ± 3 #	103 ± 3 #	108 ± 2 # *IK	108 ± 2 # *IK
	IK	116 ± 4	116 ± 3					111 ± 2 #	117 ± 4 #	104 ± 4 #	104 ± 4 #	104 ± 4 #	104 ± 4 #	102 ± 4 # *KK, CK, IC	102 ± 4 # *KK, CK, IC
	CK	116 ± 4	116 ± 3					111 ± 2 #	114 ± 3 #	105 ± 4 #	105 ± 4 #	105 ± 4 #	105 ± 4 #	107 ± 3 # *IK	107 ± 3 # *IK
	IC	116 ± 4	116 ± 4					110 ± 3 #	114 ± 2 #	107 ± 5 #	107 ± 5 #	107 ± 5 #	107 ± 5 #	108 ± 4 # *IK	108 ± 4 # *IK

Tabelle 3: Ergebnisse der systemischen Hämodynamik. Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT= Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (15, 20, 30, 60) in Minuten und Zeitangabe im Gesamtversuchsverlauf in Minuten, dargestellt als MW ± SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur jeweils angegebenen Gruppe (KK = NaCl–NaCl, IK = Iloprost–NaCl, CK = Carbachol–NaCl, IC = Iloprost–Carbachol), # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

3.5 Metabolische Parameter

In der Kontrollgruppe stieg das Laktat während der milden Hämorrhagie an, ohne jedoch signifikant höhere Werte zur Baseline zu erreichen. Sowohl in der Carbachol-Gruppe als auch in der Iloprost-Carbachol-Gruppe stieg das Laktat während der milden Hämorrhagie im Vergleich zur Baseline signifikant an (CK: BL = $0,6 \pm 0,1$ mmol/l auf HV30 = $2,2 \pm 0,6$ mmol/l; IC: BL = $0,9 \pm 0,0$ mmol/l auf HV30 = $2,2 \pm 0,6$ mmol/l) und auch zum Versuchsende (RT60) war das Laktat in der Carbachol-Gruppe noch im Vergleich zur Kontrollgruppe (KK) signifikant erhöht (KK = $1,6 \pm 0,2$ mmol/l vs. CK = $2,4 \pm 0,7$ mmol/l) (Abb. 11) (Tabelle 4). Weitere Unterschiede zwischen den Gruppen bezüglich Sauerstoffsättigung (SaO_2), pCO_2 , pO_2 , pH, HCO_3 , Hämoglobinmenge (ctHb) und Hämatokrit (Hkt) können der Tabelle 4 entnommen werden.

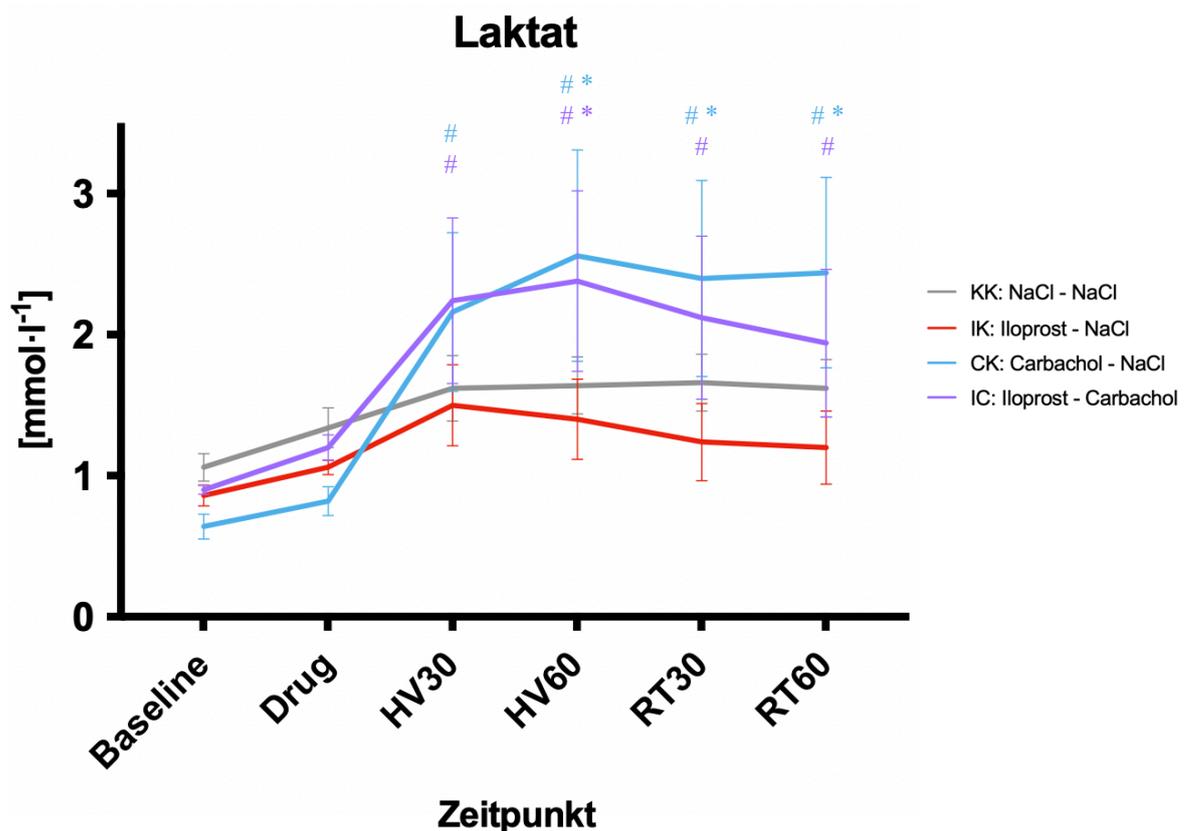


Abb. 11: Laktat in der Blutgasanalyse in mmol/l. Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (30, 60) in Minuten. Dargestellt als MW \pm SEM für n = 5 Hunde, * = $p < 0,05$ zur Kontrollgruppe, # = $p < 0,05$ zur jeweiligen Baseline.

Variabel	Gruppe	Baseline	Drug	HV 30	HV 60	RT 30	RT 60
[min]		30	60	90	120	150	180
SaO ₂ [%]	KK	99 ± 0	99 ± 0	98 ± 0 #	98 ± 0 #	99 ± 0	99 ± 0
	IK	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
	IC	99 ± 0	99 ± 0	98 ± 0 #	98 ± 0 #	99 ± 0	99 ± 0
pCO ₂ [mmHg]	KK	35 ± 0	36 ± 0	40 ± 1 #	39 ± 1 #	36 ± 1	37 ± 0 # *IC
	IK	35 ± 1	36 ± 1	41 ± 1 #	40 ± 1 #	36 ± 1	36 ± 1
	CK	35 ± 1	35 ± 1	40 ± 1 #	39 ± 1 #	36 ± 1	36 ± 1
	IC	35 ± 1	36 ± 1	41 ± 2 #	40 ± 2 #	36 ± 1	35 ± 1 *KK
pO ₂ [mmHg]	KK	151 ± 3	150 ± 3	146 ± 3	146 ± 4	156 ± 4	154 ± 4
	IK	152 ± 2	156 ± 2	145 ± 4 #	147 ± 2	160 ± 3 #	160 ± 2 #
	CK	147 ± 2	149 ± 4	144 ± 4	145 ± 3	158 ± 2 #	158 ± 3 #
	IC	148 ± 3	152 ± 4	143 ± 3	144 ± 2	157 ± 3 #	157 ± 3 #
pH	KK	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0 #	7 ± 0 # *CK	7 ± 0 #	7 ± 0 # *IC
	IK	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0 #	7 ± 0 # *CK, IC	7 ± 0 #	7 ± 0 # *CK
	CK	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0 #	7 ± 0 # *KK, IK	7 ± 0 #	7 ± 0 # *IK, IC
	IC	7 ± 0	7 ± 0	7 ± 0 #	7 ± 0 # *IK	7 ± 0 #	7 ± 0 # *KK, CK
HCO ₃ [mmol·l ⁻¹]	KK	21 ± 0	21 ± 1	20 ± 1 #	20 ± 0 # *CK	20 ± 0 # *CK	20 ± 0
	IK	21 ± 0	21 ± 0	20 ± 0 #	20 ± 0 # *CK	20 ± 0 # *CK	20 ± 0
	CK	21 ± 0	21 ± 0	20 ± 0 #	19 ± 1 # *KK, IK	20 ± 1 # *KK, IK	20 ± 0 #
	IC	21 ± 0	21 ± 0	20 ± 0 #	20 ± 1 #	20 ± 0 #	20 ± 0 #
ctHb [g·100ml ⁻¹]	KK	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0 #
	IK	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 #
	IC	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0	12 ± 0 #
Laktat [mmol·l ⁻¹]	KK	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0	2 ± 0 # *CK, IC	2 ± 0 # *CK	2 ± 0 # *CK
	IK	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 0 # *IC	1 ± 0 # *CK, IC	1 ± 0 # *CK, IC	1 ± 0 # *CK, IC
	CK	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 1 #	3 ± 1 # *KK, IK	2 ± 1 # *KK, IK	2 ± 1 # *KK, IK
	IC	1 ± 0	1 ± 0	2 ± 1 # *IK	2 ± 1 # *KK, IK	2 ± 1 # *IK	2 ± 1 # *IK
Hkt [%]	KK	37 ± 1	37 ± 1	38 ± 1	37 ± 1	37 ± 1	36 ± 1 #
	IK	37 ± 1	37 ± 1	38 ± 1	37 ± 1	37 ± 1	37 ± 1
	CK	37 ± 1	37 ± 1	38 ± 1	37 ± 1	36 ± 1 #	36 ± 1 #
	IC	37 ± 1	37 ± 1	38 ± 1	37 ± 1	36 ± 1	36 ± 1 #

Tabelle 4: Ergebnisse der metabolischen Parameter. Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Retransfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (30, 60) in Minuten und Zeitangabe im Gesamtversuchsverlauf in Minuten, dargestellt als MW ± SEM für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur jeweils angegebenen Gruppe (KK = NaCl–NaCl, IK = Iloprost–NaCl, CK = Carbachol–NaCl, IC = Iloprost–Carbachol), # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

3.6 Barrierefunktion

Die ermittelten Werte für die Sucrosekonzentration im Plasma stellten sich nicht normalverteilt dar. Daher wurde zunächst der Median ± Standardfehler des Medians bestimmt und für die statistische Auswertung der Kruskal-Wallis-Test für unabhängige Stichproben für den Vergleich zwischen den Gruppen und der Friedmann-Test für abhängige Stichproben für einen Vergleich der Werte im Zeitverlauf verwendet.

Die Werte für die Sucrosekonzentration zeigten zum Teil extreme interindividuelle Unterschiede, was zu sehr hohen Standardfehlern führte. Mit Hilfe der durchgeführten Tests konnte daher für keine der Versuchsgruppen eine

statistische Signifikanz im Versuchsverlauf oder zur Kontrollgruppe ermittelt werden (Tabelle 5).

Variabel	Gruppe	Baseline	Drug	HV 30	HV 60	RT 30
[min]		30	60	90	120	150
Sucrose Median	KK	25,3 ± 54,0	57,0 ± 245,4	201,3 ± 147,8	204,3 ± 88,5	185,7 ± 156,2
	IK	48,7 ± 96,3	41,2 ± 98,3	29,3 ± 51,2	23,2 ± 54,7	26,1 ± 779,5
	CK	22,0 ± 189,0	56,8 ± 47,8	29,8 ± 33,8	38,2 ± 54,4	39,5 ± 54,5
	IC	20,6 ± 13,6	24,4 ± 48,4	189,4 ± 1536,8	50,4 ± 78,3	146,3 ± 566,1

Tabelle 5: Ergebnisse der Plasmasucrose. Versuchszeitpunkte (HV = Hypovolämie, RT = Re-transfusion) mit Zeitangabe nach jeweiligem Beginn (30, 60) in Minuten und Zeitangabe im Gesamtversuchsverlauf in Minuten, dargestellt als Median für n = 5 Hunde, * = p < 0,05 zur jeweils angegebenen Gruppe (KK = NaCl–NaCl, IK = Iloprost–NaCl, CK = Carbachol–NaCl, IC = Iloprost–Carbachol), # = p < 0,05 zur jeweiligen Baseline.

4 Diskussion

4.1 Zentrale Aussagen

1. Die kombinierte lokale Applikation von Carbachol und Iloprost verbessert die Mikrozirkulation des Gastrointestinaltraktes im hämorrhagischen Schock.
2. Die additive Gabe von Carbachol hat keinen Effekt auf die Barrierefunktion *in vivo*.
3. Durch die kombinierte Gabe der zwei Vasodilatoren Carbachol und Iloprost kommt zu keinen systemischen Nebenwirkungen.

4.2 Methodenkritik

4.2.1 Experimentelle Rahmenbedingungen

Die experimentellen Rahmenbedingungen müssen gewährleisten, dass innere und äußere Störfaktoren minimiert werden, sodass die Versuchsbedingungen möglichst konstant und einheitlich gehalten werden können. So kann weitestgehend sichergestellt werden, dass alle auftretenden Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen interventionsbedingt sind.

Der Hund als Versuchstier weist bezüglich gastrointestinaler Durchblutung, Histologie und Physiologie deutliche Ähnlichkeit zum Menschen auf [79, 80]. Auch ermöglicht das Großtiermodell die Durchführung von Messmethoden, wie die atraumatische Platzierung einer Messsonde in den Magen zur Untersuchung der gastralen Mikrozirkulation und die serielle Abnahme von Blutproben für Blutgasanalysen und Plasmauntersuchungen, ohne die Hämodynamik relevant zu beeinflussen.

Die Versuchstiere waren alle weiblich und kastriert, um einen Einfluss des Oestrus auf die Versuchsergebnisse zu vermeiden. Das Gewicht wurde während der gesamten Versuchsreihe mittels standardisierter Fütterung stabil gehalten. Jeder Hund durchlief alle Versuche in randomisierter Reihenfolge, um die interindividuellen Unterschiede zwischen den Tieren zu minimieren. Außerdem fanden die Versuche immer zur selben Tageszeit statt, um einen Einfluss der circadianen Rhythmik auf die Ergebnisse auszuschließen (vgl. 2.2). Die Versuche wurden unter stabilen Laborbedingungen durchgeführt (vgl. 2.6).

Die jeweils nahezu identischen Baseline-Werte der einzelnen Versuchsgruppen belegen die Standardisierung der experimentellen Rahmenbedingungen (vgl. 3).

4.2.2 Iloprost- und Carbacholapplikation zur lokalen Therapie

Die Nutzung einer Magensonde ermöglichte die atraumatische intragastrale Applikation der Substanzen und erlaubte gleichzeitig die Messung unter annähernd physiologischen Bedingungen. In vorherige Versuchsreihen konnte sowohl die Applikation von Iloprost als auch von Carbachol durch eine Magensonde lokal messbare Effekte erzielen. Die eingesetzten Pharmaka scheinen daher grundsätzlich für diese Art der Applikation geeignet zu sein [2, 46]. Menge und Konzentration von Iloprost wurden entsprechend des vorangegangenen Versuchs gewählt [2]. Für die Menge und Konzentration des zu verabreichten Carbachols wurde sich an der vorhandenen Literatur orientiert [81].

4.2.3 Messungen der gastralen und oralen Mikrozirkulation

Die Messungen der gastralen und oralen Mikrozirkulation sind die zentralen Ergebnisse dieser Arbeit. Um diese quantitativ, aber auch valide qualitativ zu bestimmen, wurden insgesamt drei verschiedene Methoden zur Messung eingesetzt.

Das O₂C konnte als in der Arbeitsgruppe etabliertes und in zahlreichen Studien evaluiertes Instrument Messungen mittels Reflexionsspektrofotometrie und Laser-Doppler-Technik an der Mukosa vornehmen [82-84]. Über diese Messungen im kapillär-venösen Bereich können Rückschlüsse über die regionale Oxygenierung gezogen werden [59] und Aussagen über die Sauerstoffversorgung der besonders Hypoxie-sensitiven Zellen getroffen werden [85].

Als Messorte wurden die gastrale und orale Mukosa gewählt, um geeignete Rückschlüsse auf die intestinale Mikrozirkulation ziehen zu können [86, 87]. Zwar konnte so nicht die Heterogenität des Blutflusses abgebildet werden [88, 89], dennoch scheint diese punktuelle Messung der O₂C Sonde ausreichend zu sein, um Unterschiede der Mikrozirkulation zu erkennen, die mit einer Verbesserung der intestinalen Barrierefunktion einhergehen [90, 91].

Durch die geringe Größe der Messsonde war keine Laparotomie notwendig und die Messungen konnten unter nahezu physiologischen Bedingungen stattfinden.

Die Applikation der zu untersuchenden Substanzen fand in unmittelbarer Nähe der Messsonde statt, somit kann davon ausgegangen werden, dass die durch die Pharmaka verursachten Änderungen auch erfasst wurden. Aufgrund der hochfrequenten Aufzeichnung und der nahezu echtzeitigen Darstellung der Messwerte konnte auf Verschlechterungen des Signals sofort reagiert und die Messqualität konstant hochgehalten werden. Die Validität der Messmethode zeigte sich durch die hohe Übereinstimmung der Baseline-Werte mit den Werten aus vorherigen Arbeiten, die diese Messmethode verwendeten [2, 82, 92].

Zusätzlich zur Oxygenierung wurde die Qualität des Blutflusses und die Kapillardichte der oralen Mukosa mittels videomikroskopischer Aufnahmen beurteilt. Der Messort entsprach dabei dem Ort der lokalen Substanzapplikation und der oralen O₂C Messung (vgl. 2.5.2).

Die Aufnahmen wurden nach Empfehlung der Konsensuskonferenz De Backer et al. von 2007 angefertigt [67] und entsprechend der Qualitätskriterien ausgewertet (vgl. 2.4.10). Zusätzlich zur Softwaregestützten Auswertung der Daten wurde der MFI manuell wie durch Boerma et al. beschrieben bestimmt [93].

4.2.4 Messung der Barrierefunktion

Ziel war es, über die Quantifizierung des Übertritts von Sucrose über die Mukosa ins Blutplasma eine Aussage über die gastrale Barrierefunktion treffen zu können. In einigen Versuchen kam es zu einem variablen Reflux der Zuckerlösung über die einliegende Magensonde. Dies könnte einen Einfluss auf die Messungen gehabt haben. In der Gesamtheit stellten sich die Daten als nicht normalverteilt dar. Trotz Auswertung mittels Medians \pm Standardfehler des Medians zeigten sich zum Teil sehr große Abweichungen, was das Erreichen von statistischen Signifikanzen nur eingeschränkt möglich machte und die Interpretation der Werte erschwerte. Eine abschließende Beurteilung der Barrierefunktion scheint daher nur eingeschränkt möglich zu sein und beschränkt sich deshalb auf die Auswertung von deutlichen Trends, die sich auch ohne Vorliegen einer Signifikanz zeigten.

4.3 Ergebnisdiskussion

4.3.1 Ergebnisdiskussion der gastralen Mikrozirkulation

Die topische Applikation von Iloprost führte zu keiner verbesserten Perfusion der gastralen Mukosa. Weder die gastrale $\mu velocity$ noch der gastrale $\mu flow$ zeigten in der Iloprost-Gruppe (IK) signifikant höhere Werte im Vergleich zur Kontrollgruppe. Auch die zusätzliche lokale Applikation von Carbachol konnte den Effekt auf die gastrale Perfusion nicht verbessern. Es ist denkbar, dass die in dieser Studie gewählten Carbachol-Konzentrationen zu niedrig waren, um einen Effekt an der gastralen mikrozirkulären Perfusion zu zeigen.

Möglicherweise führte auch eine Verteilung der Substanz im Magen dazu, dass die Konzentration am Messort, anders als an der oralen Mukosa, zu niedrig war. Bezüglich der gastralen Oxygenierung zeigten sich in der Iloprost-Gruppe während der gesamten hämorrhagischen Phase (HV15 – HV60) tendenziell ein erhöhter μHbO_2 im Vergleich zur Kontrollgruppe. Diese Werte waren jedoch im Vergleich zur Vorstudie nicht signifikant [2]. In der Vorstudie waren die Baseline-Werte der μHbO_2 in der Iloprost-Gruppe höher als in dieser Studie. Bei ähnlichem Abfall der μHbO_2 im Schock, war daher der Unterschied der Interventions- zur Kontrollgruppe in der hier vorliegenden Studie geringer und damit nicht signifikant. Gleichzeitig zeigte sich in beiden Studien in der hämorrhagischen Phase ein hoher interindividueller Unterschied zwischen den Hunden, der zu einem vergrößerten Standardfehler führte. Dies kann die unterschiedlichen Ergebnisse der beiden Studien erklären.

In Kombination mit Carbachol (IC) war der gastrale μHbO_2 in der Hämorrhagie im Vergleich zur Kontrollgruppe deutlich erhöht. Die von der Perfusion unabhängige Verbesserung der gastralen Oxygenierung zeigt, dass von der Qualität der Perfusion keine Rückschlüsse auf die Qualität der Oxygenierung gezogen werden dürfen.

Die Steigerung des μHbO_2 in den post-kapillären Gefäßen kann mehrere Ursachen haben: Zum Einen eine effektivere Verwertung des Sauerstoffes und damit ein geringerer Sauerstoffbedarf der Zelle oder zum Anderen eine verschlechterte Aufnahme des Sauerstoffs aus dem Blut. Für Iloprost konnte bereits gezeigt werden, dass es die oxydative Phosphorylierung in ischämischen Leberzellen verbesserte [94]. So war zu beobachten, dass die ATP-Produktion

in den Zellen leicht erhöht war. Die Kopplung der mitochondrialen Atmungskette wird möglicherweise durch Iloprost verbessert, was zu einem reduzierten Sauerstoffbedarf pro phosphorylierten Molekül ATP führt. Und auch für Carbachol konnte nachgewiesen werden, dass die Produktion von ATP *in vitro* erhöht wird [95]. Die additiven Effekte dieser zwei Pharmaka auf die Zellen der gastralen Mukosa könnten die geringere Desaturierung des Blutes, also die Erhöhung des μHbO_2 der post-kapillären Gefäße, erklären.

Auffällig waren die signifikant erhöhten Laktatwerte in den Carbacholgruppen in der späten hämorrhagischen Phase. In der Carbachol-Gruppe blieben diese auch bis zum Versuchsende bestehen. Dies kann Hinweis auf einen anaeroben Stoffwechsel geben und deutet dadurch auf eine Gewebshypoxie hin, der aufgrund von reduzierter Sauerstoffausschöpfung in den Zellen entsteht. Möglicherweise ist dies ein Effekt des Carbachols. In diesem Fall wäre die Gabe von Carbachol kontraproduktiv für die Homöostase der Zelle. Allerdings stellt sich die Frage, ob die Erhöhung eine biologische Relevanz erreicht, da sie den oberen Laktat-Normwert für Hunde von 2,5 mmol/l nur marginal überschreitet [96].

4.3.2 Ergebnisdiskussion der oralen Mikrozirkulation

Nach der oralen Applikation von Iloprost zeigte sich initial ein signifikant höherer μflow im Vergleich zur Kontrollgruppe. Allerdings war bereits unter Ausgangsbedingungen der orale μflow in der Kontrollgruppe tendenziell niedriger als in den Versuchsgruppen. Die relativ kleine Standardabweichung der Kontrollgruppe ermöglicht dabei das Entstehen einer Signifikanz. Anders als zu erwarten, sinkt in der Iloprost-Gruppe absolut gesehen der orale μflow nach Substanzapplikation ab. Dies passt nicht zu den beschriebenen Effekten von systemisch angewendetem Iloprost auf die Perfusion im terminalen Ileum von Ratten [97]. Auch Kiefer et al. konnten zeigen, dass systemisch appliziertes Iloprost die Perfusion im Splanchnikusgebiet von septischen Patienten verbesserte [98]. Auch unter pathologischen Kreislaufbedingungen war dieser Effekt von Iloprost in dieser Untersuchung nicht nachweisbar. Vermutlich führt eine sympathische Aktivierung durch die milde Hämorrhagie zu einer Vasokonstriktion der dem mikrozirkulatorischen Kapillarbett vorgeschalteten Arteriole. Während systemisch appliziertes Iloprost diese Sympathikus-

aktivierung abschwächen kann, kann sich der vasodilatative Effekt lokal applizierten Iloprosts nicht voll entfalten [2].

Die Ergebnisse der Videomikroskopie deuten auf eine Verbesserung der oralen Perfusion durch Carbachol hin: Während der hämorrhagischen Phase (HV60) war in der Carbachol-Gruppe (CK) sowohl die gesamte Gefäßdichte (TVD), als auch die Dichte der durchbluteten Gefäße (PVD) signifikant zur Kontrollgruppe erhöht. Auch der MFI als Maß für die Flussqualität war hier besser als in der Kontrollgruppe. Allerdings scheint diese videomikroskopisch sichtbare Verbesserung der Kapillardurchblutung keinen Einfluss auf die mittels O₂C gemessene orale mikrozirkulatorische Oxygenierung und Perfusion zu haben: Weder der orale μflow noch die orale μHbO_2 waren nach Mono-Therapie mit Carbachol im Vergleich zur Kontrollgruppe erhöht.

In der Hämorrhagie kam es zu einem Abfall der oralen $\mu\text{velocity}$. Nach der kombinierten Applikation von Iloprost und Carbachol zeigte sich während der Hämorrhagie jedoch kein Abfall der oralen Flussgeschwindigkeit. Zum Zeitpunkt HV60 war die orale $\mu\text{velocity}$ sogar signifikant höher im Vergleich zur Kontrollgruppe. Das Kapillarbett verfügt aufgrund seines hohen Gefäßquerschnittes per se über eine niedrigere Flussgeschwindigkeit als die Gefäße der Makrozirkulation [59]. Dies ermöglicht die optimale Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe. Eine verminderte $\mu\text{velocity}$ kann nun auf eine venöse Stauung oder auf eine prä-kapilläre arterielle Vasokonstriktion hinweisen. Der $r\text{Hb}$ als Parameter für die im Gewebe enthaltene Blutmenge war jedoch ebenfalls vermindert. Dies spricht gegen eine venöse Stauung und für eine prä-kapilläre Vasokonstriktion [59]. Die erhaltene $\mu\text{velocity}$ im hämorrhagischen Schock nach paralleler Applikation von Iloprost und Carbachol könnte also die prä-kapilläre Vasokonstriktion abschwächen. Gleichzeitig war auch der orale μflow zu diesem Zeitpunkt tendenziell erhöht, jedoch war dieser Effekt aufgrund einer hohen Standardabweichung in der Iloprost-Carachol-Gruppe nicht signifikant. Die kombinierte Gabe von Iloprost und Carbachol scheint also die orale mikrozirkulatorische Perfusion unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen zu verbessern.

Carbachol vermittelt einen Teil seiner vasodilatatorischen Wirkung Endothel-abhängig über die Aktivierung der NO-Synthase und führt somit über eine erhöhte NO-Produktion zu einer Relaxierung der glatten Muskulatur der

Gefäße [99-102]. Doch auch hier könnte, ähnlich wie bei Iloprost, der Effekt auf das prä-kapilläre Gefäßbett durch die Aktivierung des sympathischen Nervensystems abgeschwächt werden. Allerdings kann Carbachol auch Endothel-unabhängig eine Relaxierung der glatten Muskulatur bewirken: Über die Aktivierung präsynaptischer M1- und M3-Rezeptoren führt Carbachol zu einer Freisetzung des Calcitonin-Gen-related-Peptid (CGRP), das über die Aktivierung am CGRP-Rezeptor zu einer Vasodilatation führt [101, 103, 104]. Jedoch reichten in Studien geringe Mengen von Acetylcholin (1 nmol) nicht aus, um einen Effekt zu zeigen. Erst höhere Dosierungen (10 – 100 nmol) konnten eine Endothel-unabhängige Wirkung hervorrufen [101, 103]. Möglicherweise kann eine Erhöhung der Carbacholdosis den Effekt auf den oralen μ flow verstärken. Die Ergebnisse zeigen, dass es durch die Applikation der gewählten Medikamente zu einer Modulation der Perfusion der oralen Mukosa kommt. Carbachol alleine kann die Perfusion videomikroskopisch nachweislich steigern, indem die TVD, die PVD und der MFI verbessert wird. In der Kombination mit Iloprost zeigt sich eine erhaltene μ velocity im hämorrhagischen Schock, möglicherweise durch eine Reduktion der vorgeschalteten Vasokonstriktion zuführender Arteriolen. Die Effekte auf die gastrale und orale Mikrozirkulation zeigten in ihrem Verhalten auf Medikamentenapplikation und Hämorrhagie deutliche Unterschiede. Verdant et al. konnte in einer Untersuchung an Schweinen im septischen Schock einen Zusammenhang zwischen oraler und gastralere Mikrozirkulation herstellen [35]. Die Studie sah die orale Mukosa als repräsentativen Ort für die Mikrozirkulation des gesamten Gastrointestinaltraktes. Im klinischen Setting wird daher die einfacher zugängliche orale Mukosa bevorzugt genutzt [31-33]. Es ist jedoch davon auszugehen, dass die Mechanismen zur Regulation der Mikrozirkulation nicht nur von systemischen hämodynamischen Faktoren abhängen und sich somit in allen Teilabschnitten des Gastrointestinaltraktes gleich verhält, sondern auch organspezifisch auf lokale Reize, wie Aktivierung der Koagulation und lokale Inflammationsaktivierung, reagieren. So weist die orale Mukosa im Vergleich zur gastralere Schleimhaut Unterschiede bezüglich Gefäßversorgung, histologischem Aufbau und Rezeptorverteilung auf [36, 105]. Boerma et al. konnte bei Patienten mit abdomineller Sepsis zeigen, dass eine vollständige Unabhängigkeit von oraler und gastralere Mikrozirkulation besteht. Auch in anderen Studien ließ die orale Mikrozirkulation keine Rückschlüsse auf

die gastrale Mikrozirkulation zu [36, 106]. Die Ergebnisse dieser Studien decken sich mit der Erfahrung unserer Arbeitsgruppe, wonach sich orale und gastrale Mikrozirkulation ungleich verhalten [2, 90]. Folglich sollten unterschiedliche Abschnitte des Gastrointestinaltraktes differenziert voneinander betrachtet werden.

4.3.3 Ergebnisdiskussion der Barrierefunktion

Wie in 4.2.4 beschrieben zeigten die Werte der Plasmasucrose zum Teil sehr große Abweichungen. Trotz fehlender Signifikanzen lassen die deutlichen Tendenzen der Ergebnisse nachfolgende Spekulationen zu:

Der Plasmasucrorespiegel zeigte in der Kontrollgruppe unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen einen Anstieg. Entsprechend der Annahme, dass Sucrose als Disaccharid die intakte Mukosa nicht passieren kann, kann dies als Hinweis für eine gestörte Barrierefunktion gesehen werden [71].

Nach alleiniger Applikation von Iloprost (IK) und Carbachol (CK) kam es unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen zu keinem Anstieg der Plasmasucrose. Hier kann von einer verbesserten Barrierefunktion der gastralen Mukosa ausgegangen werden. Für Carbachol konnte bereits eine Verbesserung der mukosalen Integrität über eine Stimulation muskarinerger Acetylcholin-Rezeptoren *in vitro* festgestellt werden [3]. Die lokale Applikation von Iloprost hatte keinen Einfluss auf den gastralen μ flow. Eine Verbesserung des Blutflusses durch Iloprost scheint daher kein Grund für die verbesserte Barrierefunktion zu sein. Birukova et al. konnte jedoch *in vitro* eine Verbesserung der Zell-Zell-Adhäsion über eine Erhöhung des intrazellulären cAMP und eine Verbesserung des Zytoskeletts durch Iloprost nachweisen [107].

In der Iloprost-Carbachol-Gruppe war keine gerichtete Veränderung darstellbar. Dies lässt sich am ehesten durch die interindividuell sehr unterschiedlichen Sucrorespiegel der Versuchstiere zu allen Versuchszeitpunkten erklären. Trotz Berechnung des Medians konnten keine validen Werte für die statistische Auswertung erhoben werden.

4.3.4 Ergebnisdiskussion der systemischen Kreislaufparameter

Neben der Mikrozirkulation spielen systemische Nebenwirkungen der applizierten Substanzen, insbesondere im Hinblick einer lokalen Therapie eine bedeutende Rolle.

Die gemessenen Unterschiede von HZV und SV zwischen der Kontroll- und der Carbacholgruppe zur Baseline sind mit Werten von 9 ml/kg/min (HZV) bzw. 2 ml (SV) als nicht klinisch relevante Unterschiede zu werten. Die statistische Signifikanz ist auf die geringe Standardabweichung zurückzuführen.

Weder HZV, DO_2 , SV, HR noch MAP unterschieden sich nach Applikation von Iloprost und/oder Carbachol von der Kontrollgruppe. Es ergibt sich also kein Anhalt für eine systemische Wirkung der lokalen Applikation.

Während der Hämorrhagie kam es in allen Versuchsgruppen zudem zum erwarteten Abfall des MAP. Durch Kompensationsmechanismen (z.B. Auto-transfusion) kam es im Verlauf der Hämorrhagie zu einer Erholung der Blutdruckwerte [108]. In der Carbachol-Gruppe und der Iloprost-Carbachol-Gruppe war die Normalisierung zum Ende der hämorrhagischen Phase (HV60) so ausgeprägt, dass kein signifikanter Unterschied mehr zur Baseline nachweisbar war.

Im hämorrhagischen Schock kam es zu keiner relevanten Steigerung der Herzfrequenz. Stattdessen kam es während der frühen Phase der Hämorrhagie (HV20) zu einem Abfall der HR. Der kompensatorische Anstieg der Herzfrequenz bei einem Blutdruckabfall wird hauptsächlich durch Aktivität der Barorezeptoren moduliert [109]. Narkosen mit dem volatilen Narkotikum Sevofluran (vgl. 2.6) können die Aktivität dieser Rezeptoren herabsetzen [110]. Eine weitere mögliche Erklärung könnte die Reaktion auf einen verminderten venösen Rückfluss zum Herzen sein (umgekehrter Bainbridge-Reflex) [111]. Auch durch Hypovolämie oder myokardialer Ischämie hervorgerufene Stimulation von mechano- und chemosensitiven Rezeptoren der kardialen Ventrikel können zu Bradykardie, Hypotension und peripherer Vasodilatation führen (Bezold-Jarisch-Reflex) [112]. Insgesamt waren die Veränderungen der Kreislaufparameter im Verlauf des Versuches in allen Versuchsgruppen und ohne Unterschied zur Kontrollgruppe zu beobachten. Eine Auswirkung der lokalen Applikation der Substanzen auf die systemische Hämodynamik ist nicht anzunehmen.

4.3.5 Ergebnisdiskussion der Blutgasanalyse

Die gemessenen Blutgase ($p\text{CO}_2$, $p\text{O}_2$), die S_aO_2 , der pH, das Bikarbonat sowie die Hämatokritwerte und Hämoglobinkonzentrationen in der Blutgasanalyse zeigten vereinzelt signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Dies ist vor allem durch die sehr geringe Standardabweichung zu erklären und erreichte zu keinem Zeitpunkt biologische Relevanz.

4.4 Klinische Relevanz der Ergebnisse

Der hämorrhagische Schock ist in Deutschland eine häufige Todesursache. Neben der akuten Gefahr einer lebensbedrohlichen Kreislaufstörung führt die gestörte Mikrozirkulation zu einer verminderten Oxygenierung wichtiger Organe. Die eingeschränkte Barrierefunktion der Darmmukosa kann über oft fulminante Krankheitsverläufe zu einer Sepsis führen und ein Multiorganversagen begünstigen.

Die Behandlung von Patienten im hämorrhagischen Schock stellt die Behandler vor große Herausforderungen. Bisherige Therapien zielen vor allem auf den Erhalt systemischer Kreislaufparameter ab, oft unter Inkaufnahme relevanter Nebenwirkungen auf das Splanchnikusgebiet.

Diese Studie konnte erneut das Prinzip der lokalen Substanzapplikation als vielversprechenden Therapieansatz hervorheben. Die kombinierte lokale Applikation von Iloprost und Carbachol konnte die Mikrozirkulation der Mukosa im hämorrhagischen Schock verbessern, ohne dabei den mikrozirkulatorischen Fluss oder die kapilläre Flussdichte zu beeinflussen. Auch die systemische Hämodynamik wurde durch die lokale Therapie mit Iloprost und Carbachol nicht verändert.

Offen blieb dagegen die Frage, inwieweit die Barrierefunktion der Mukosa verbessert werden konnte. Sowohl Carbachol als auch Iloprost könnten einen positiven Effekt auf die intestinale Barrierefunktion *in vivo* haben. Weitere Studien sind hier notwendig, um die möglichen protektiven Effekte auf die mukosale Barriere zu klären.

Offen blieb auch die Frage, wieso die Applikation von Carbachol zu einer Erhöhung der Laktatwerte führte. Sollten höhere Carbachol-Dosierungen, als sie in dieser Studie genutzt wurden, zu einer gleichsam biologisch relevanten

Erhöhung der Laktatwerte führen, stellt sich die Frage, ob ein anaerober Stoffwechsel durch ein Sauerstoffextraktionsdefizit den Einsatz von Carbachol relevant limitiert.

In der Therapie des hämorrhagischen Schocks sind lokale Therapien aktuell nur Gegenstand experimenteller Forschung. Die gastrale Applikation von Medikamenten in klinischen Studien, zum Beispiel als Zusatz zur enteralen Ernährung, ist jedoch denkbar und könnte in Zukunft erprobt werden, um die generelle Einsatzfähigkeit zu prüfen.

5 Literaturverzeichnis

1. Buwalda, M. and C. Ince, *Opening the microcirculation: Can vasodilators be useful in sepsis?* Intensive care medicine, 2002. **28**: p. 1208-17.
2. Truse, R., et al., *Effect of Topical Iloprost and Nitroglycerin on Gastric Microcirculation and Barrier Function during Hemorrhagic Shock in Dogs.* J Vasc Res, 2017. **54**(2): p. 109-121.
3. Lesko, S., et al., *Cholinergic modulation of epithelial integrity in the proximal colon of pigs.* Cells Tissues Organs, 2013. **197**(5): p. 411-20.
4. Adams, H.A., et al., *Die Definitionen der Schockformen.* Intensivmedizin und Notfallmedizin, 2001. **38**(7): p. 541-553.
5. Szopinski, J., K. Kusza, and M. Semionow, *Microcirculatory Responses to Hypovolemic Shock.* Journal of Trauma and Acute Care Surgery, 2011. **71**(6): p. 1779-1788.
6. Rossaint, R., et al., *The European guideline on management of major bleeding and coagulopathy following trauma: fourth edition.* Critical Care, 2016. **20**(1): p. 100.
7. Sakr, Y., et al., *Does dopamine administration in shock influence outcome? Results of the Sepsis Occurrence in Acutely Ill Patients (SOAP) Study.* Critical Care Medicine | Society of Critical Care Medicine, 2006. **34**(3): p. 589-597.
8. Mutschler, M., et al., *Renaissance of base deficit for the initial assessment of trauma patients: a base deficit-based classification for hypovolemic shock developed on data from 16,305 patients derived from the TraumaRegister DGU(R).* Crit Care, 2013. **17**(2): p. R42.
9. Vincent, J.-L. and D. De Backer, *Circulatory Shock.* New England Journal of Medicine, 2013. **369**(18): p. 1726-1734.
10. Weil, M.H. and H. Shubin, *Proposed Reclassification of Shock States with Special Reference to Distributive Defects,* in *The Fundamental Mechanisms of Shock: Proceedings of a Symposium Held in Oklahoma City, Oklahoma, October 1–2, 1971,* L.B. Hinshaw and B.G. Cox, Editors. 1972, Springer US: Boston, MA. p. 13-23.

11. Standl, T., et al., *The Nomenclature, Definition and Distinction of Types of Shock*. Dtsch Arztebl Int, 2018. **115**(45): p. 757-768.
12. Kleber, C., et al., *Overall distribution of trauma-related deaths in Berlin 2010: advancement or stagnation of German trauma management?* World J Surg, 2012. **36**(9): p. 2125-30.
13. Buschmann, C., et al., *Vermeidbare Todesfälle nach Trauma – Epidemiologie, Todesursachen und Managementfehler*. Der Notarzt, 2013. **29**.
14. Isbister, J.P., *Physiology and pathophysiology of blood volume regulation*. Transfus Sci, 1997. **18**(3): p. 409-23.
15. Toung, T., et al., *Mesenteric vasoconstriction in response to hemorrhagic shock*. Shock, 2000. **13**(4): p. 267-73.
16. Parks, D.A. and E.D. Jacobson, *Physiology of the Splanchnic Circulation*. Archives of Internal Medicine, 1985. **145**(7): p. 1278-1281.
17. Deitch, E.A., *Bacterial translocation of the gut flora*. J Trauma, 1990. **30**(12 Suppl): p. S184-9.
18. Balzan, S., et al., *Bacterial translocation: overview of mechanisms and clinical impact*. J Gastroenterol Hepatol, 2007. **22**(4): p. 464-71.
19. Merga, Y., B.J. Campbell, and J.M. Rhodes, *Mucosal barrier, bacteria and inflammatory bowel disease: possibilities for therapy*. Dig Dis, 2014. **32**(4): p. 475-83.
20. Stevenson, B.R., *Understanding tight junction clinical physiology at the molecular level*. J Clin Invest, 1999. **104**(1): p. 3-4.
21. Ceppa, E.P., K.C. Fuh, and G.B. Bulkley, *Mesenteric hemodynamic response to circulatory shock*. Current Opinion in Critical Care, 2003. **9**(2): p. 127-132.
22. Johnson, P.C., *Autoregulation of blood flow in the intestine*. Gastroenterology, 1967. **52**(2): p. 435-41.
23. Granger, H.J. and C.P. Norris, *Intrinsic regulation of intestinal oxygenation in the anesthetized dog*. Am J Physiol, 1980. **238**(6): p. H836-43.
24. Folkow, B., *Regional adjustments of intestinal blood flow*. Gastroenterology, 1967. **52**(2): p. 423-32.
25. Russell, D.H., et al., *Hemorrhagic shock increases gut macromolecular permeability in the rat*. Shock, 1995. **4**(1): p. 50-5.

26. Swank, G.M. and E.A. Deitch, *Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes*. World J Surg, 1996. **20**(4): p. 411-7.
27. Deitch, E.A., D. Xu, and V.L. Kaise, *Role of the gut in the development of injury- and shock induced SIRS and MODS: the gut-lymph hypothesis, a review*. Front Biosci, 2006. **11**: p. 520-8.
28. Deitch, E.A., *Multiple organ failure. Pathophysiology and potential future therapy*. Ann Surg, 1992. **216**(2): p. 117-34.
29. Rivers, E., et al., *Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock*. N Engl J Med, 2001. **345**(19): p. 1368-77.
30. Krejci, V., L.B. Hildebrand, and G.H. Sigurdsson, *Effects of epinephrine, norepinephrine, and phenylephrine on microcirculatory blood flow in the gastrointestinal tract in sepsis*. Crit Care Med, 2006. **34**(5): p. 1456-63.
31. De Backer, D., et al., *Microvascular blood flow is altered in patients with sepsis*. Am J Respir Crit Care Med, 2002. **166**(1): p. 98-104.
32. Sakr, Y., et al., *Persistent microcirculatory alterations are associated with organ failure and death in patients with septic shock*. Crit Care Med, 2004. **32**(9): p. 1825-31.
33. Trzeciak, S., et al., *Early increases in microcirculatory perfusion during protocol-directed resuscitation are associated with reduced multi-organ failure at 24 h in patients with sepsis*. Intensive Care Med, 2008. **34**(12): p. 2210-7.
34. Kerger, H., et al., *Systemic and microcirculatory effects of autologous whole blood resuscitation in severe hemorrhagic shock*. Am J Physiol, 1999. **276**(6): p. H2035-43.
35. Verdant, C.L., et al., *Evaluation of sublingual and gut mucosal microcirculation in sepsis: a quantitative analysis*. Crit Care Med, 2009. **37**(11): p. 2875-81.
36. Boerma, E.C., et al., *Relationship between sublingual and intestinal microcirculatory perfusion in patients with abdominal sepsis*. Crit Care Med, 2007. **35**(4): p. 1055-60.
37. Olschewski, H., et al., *Inhaled Iloprost for Severe Pulmonary Hypertension*. New England Journal of Medicine, 2002. **347**(5): p. 322-329.
38. Ewert, R., et al., *Inhaled iloprost for therapy in pulmonary arterial hypertension*. Expert Rev Respir Med, 2011. **5**(2): p. 145-52.

39. Whittle, B.J.R., *Role of prostaglandins in the defense of the gastric mucosa*. Brain Research Bulletin, 1980. **5**: p. 7-14.
40. Olschewski, H., et al., *Physiologic basis for the treatment of pulmonary hypertension*. J Lab Clin Med, 2001. **138**(5): p. 287-97.
41. Takeuchi, K., *Gastric cytoprotection by prostaglandin E(2) and prostacyclin: relationship to EP1 and IP receptors*. J Physiol Pharmacol, 2014. **65**(1): p. 3-14.
42. Whittle, B.J., et al., *Actions of prostacyclin (PGI₂) and its product, 6-oxo-PGF₁alpha on the rat gastric mucosa in vivo and in vitro*. Prostaglandins, 1978. **15**(6): p. 955-67.
43. Kauffman, G.L., Jr., *The role of prostaglandins in the regulation of gastric mucosal blood flow*. Prostaglandins, 1981. **21 Suppl**: p. 33-8.
44. Reed, M.K., et al., *Splanchnic prostanoid production: effect of hemorrhagic shock*. J Surg Res, 1990. **48**(6): p. 579-83.
45. Myers, S.I. and J. Small, *Prolonged hemorrhagic shock decreases splanchnic prostacyclin synthesis*. J Surg Res, 1991. **50**(5): p. 417-20.
46. Hu, S., et al., *Carbachol promotes gastrointestinal function during oral resuscitation of burn shock*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(13): p. 1746-52.
47. van Leersum, E.C., *Eine Methode zur Erleichterung der Blutdruckmessung bei Tieren*. Pflügers Archiv European Journal of Physiology, 1911. 142(7-8): p. 377-395.
48. Zollner, C., et al., *[Retrospective analysis of transpulmonary and pulmonary arterial measurement of cardiac output in ARDS patients]*. Anaesthesist, 1998. **47**(11): p. 912-7.
49. Sakka, S.G., K. Reinhart, and A. Meier-Hellmann, *Comparison of pulmonary artery and arterial thermodilution cardiac output in critically ill patients*. Intensive Care Med, 1999. **25**(8): p. 843-6.
50. Segal, E., et al., *Transpulmonary thermodilution cardiac output measurement using the axillary artery in critically ill patients*. J Clin Anesth, 2002. **14**(3): p. 210-3.
51. Johansson, A. and M. Chew, *Reliability of continuous pulse contour cardiac output measurement during hemodynamic instability*. J Clin Monit Comput, 2007. **21**(4): p. 237-42.

52. Hammel, H.T., C.H. Wyndham, and J.D. Hardy, *Heat production and heat loss in the dog at 8-36 degrees C environmental temperature*. Am J Physiol, 1958. **194**(1): p. 99-108.
53. Wilhelm, W., *Praxis der Anästhesiologie*. 2018. 127-131.
54. Hemmerling, T.M. and N. Le, *Brief review: Neuromuscular monitoring: an update for the clinician*. Can J Anaesth, 2007. **54**(1): p. 58-72.
55. Murphy, G.S., et al., *Intraoperative acceleromyography monitoring reduces symptoms of muscle weakness and improves quality of recovery in the early postoperative period*. Anesthesiology, 2011. **115**(5): p. 946-54.
56. Martin-Flores, M., et al., *Recovery from neuromuscular block in dogs: restoration of spontaneous ventilation does not exclude residual blockade*. Vet Anaesth Analg, 2014. **41**(3): p. 269-77.
57. Rossing, R.G. and S.M. Cain, *A nomogram relating pO₂, pH, temperature, and hemoglobin saturation in the dog*. J Appl Physiol, 1966. **21**(1): p. 195-201.
58. *DIN 58933-1:1995-01, Hämatologie - Bestimmung des Volumenanteils der Erythrozyten im Blut - Teil 1: Zentrifugationsmethode als Referenzmethode*.
59. Krug, A., *Mikrozirkulation und Sauerstoff-versorgung des Gewebes, Methode des so genannten O₂C (oxygen to see)*. Phlebologie, 2007. **36**: p. 300-312.
60. Gandjbakhche, A.H., et al., *Visible-light photon migration through myocardium in vivo*. Am J Physiol, 1999. **277**(2): p. H698-704.
61. Jakobsson, A. and G.E. Nilsson, *Prediction of sampling depth and photon pathlength in laser Doppler flowmetry*. Med Biol Eng Comput, 1993. **31**(3): p. 301-7.
62. Zijlstra, W.G., A. Buursma, and W.P. Meeuwse-van der Roest, *Absorption spectra of human fetal and adult oxyhemoglobin, de-oxyhemoglobin, carboxyhemoglobin, and methemoglobin*. Clin Chem, 1991. **37**(9): p. 1633-8.
63. Bonner, R.F. and R. Nossal, *Principles of Laser-Doppler Flowmetry*, in *Laser-Doppler Blood Flowmetry*, A.P. Shepherd and P.Å. Öberg, Editors. 1990, Springer US: Boston, MA. p. 17-45.
64. Sherman, H., S. Klausner, and W.A. Cook, *Incident dark-field illumination: a new method for microcirculatory study*. Angiology, 1971. **22**(5): p. 295-303.

65. Braedius Medical, Bikberweg 18 1272 PM Huizen Nederlande <https://braedius-medical.com/cytocam> [Stand 07.04.2020 16:30].
66. Goedhart, P.T., et al., *Sidestream Dark Field (SDF) imaging: a novel stroboscopic LED ring-based imaging modality for clinical assessment of the microcirculation*. Opt Express, 2007. **15**(23): p. 15101-14.
67. De Backer, D., et al., *How to evaluate the microcirculation: report of a round table conference*. Crit Care, 2007. **11**(5): p. R101.
68. Hilty, M.P., et al., *Assessment of endothelial cell function and physiological microcirculatory reserve by video microscopy using a topical acetylcholine and nitroglycerin challenge*. Intensive Care Med Exp, 2017. **5**(1): p. 26.
69. Carsetti, A., et al., *Accuracy of an automatic analysis software to detect microvascular density parameters*. Intensive Care Medicine Experimental, 2015. **3**(Suppl 1): p. A415.
70. Bjarnason, I., A. MacPherson, and D. Hollander, *Intestinal permeability: an overview*. Gastroenterology, 1995. **108**(5): p. 1566-81.
71. Meddings, J.B., et al., *Sucrose: a novel permeability marker for gastroduodenal disease*. Gastroenterology, 1993. **104**(6): p. 1619-26.
72. Silbernagel, S., *Physiologie*. 2009. 454-456.
73. Fiehn, O. and T. Kind, *Metabolite profiling in blood plasma*. Methods Mol Biol, 2007. **358**: p. 3-17.
74. Kortbeek, J.B., et al., *Advanced trauma life support, 8th edition, the evidence for change*. J Trauma, 2008. **64**(6): p. 1638-50.
75. von Engelhardt, W., *Physiologie der Haustiere*. 2010. 194-195.
76. Wiggers, H.C. and R.C. Ingraham, *Hemorrhagic shock; definition and criteria for its diagnosis*. J Clin Invest, 1946. **25**: p. 30-6.
77. Oura, T., et al., *Low tidal volume ventilation in healthy dogs*. J Vet Emerg Crit Care (San Antonio), 2012. **22**(3): p. 368-71.
78. Kazama, T. and K. Ikeda, *Comparison of MAC and the rate of rise of alveolar concentration of sevoflurane with halothane and isoflurane in the dog*. Anesthesiology, 1988. **68**(3): p. 435-7.
79. Dressman, J.B., *Comparison of canine and human gastrointestinal physiology*. Pharm Res, 1986. **3**(3): p. 123-31.

80. Haglund, U., et al., *Mucosal lesions in the human small intestine in shock*. Gut, 1975. **16**(12): p. 979-84.
81. Kraft, *Dosierungsvorschläge für Arzneimittel bei Hund und Katze*. 2005: Schattauer, 4. Auflage.
82. Vollmer, C., et al., *Hypothermia improves oral and gastric mucosal oxygenation during hypoxic challenges*. Br J Anaesth, 2014. **113**(3): p. 433-42.
83. Bludau, M., et al., *Quantitative measurement of gastric mucosal microcirculation using a combined laser Doppler flowmeter and spectrophotometer*. Diseases of the Esophagus, 2008. **21**(7): p. 668-672.
84. Maier, S., et al., *Microcirculatory parameters after isotonic and hypertonic colloidal fluid resuscitation in acute hemorrhagic shock*. J Trauma, 2009. **66**(2): p. 337-45.
85. Schmidt, L.H., *Physiologie des Menschen mit Pathophysiologie*. 32. Auflage, 2019.
86. Creteur, J., et al., *Sublingual capnometry tracks microcirculatory changes in septic patients*. Intensive Care Med, 2006. **32**(4): p. 516-23.
87. Fisher, E.M., et al., *A comparison of gastric and rectal CO₂ in cardiac surgery patients*. Biol Res Nurs, 2005. **6**(4): p. 268-80.
88. De Backer, D. and A. Durand, *Monitoring the microcirculation in critically ill patients*. Best Pract Res Clin Anaesthesiol, 2014. **28**(4): p. 441-51.
89. De Backer, D., K. Donadello, and D.O. Cortes, *Monitoring the microcirculation*. J Clin Monit Comput, 2012. **26**(5): p. 361-6.
90. Vollmer, C., et al., *Melatonin improves gastric mucosal microcirculatory perfusion and maintains intestinal barrier function during haemorrhagic shock in dogs: 4AP5-8*. European Journal of Anaesthesiology | EJA, 2014. **31**: p. 66-67.
91. Vollmer, C., et al., *Melatonin pretreatment improves gastric mucosal blood flow and maintains intestinal barrier function during hemorrhagic shock in dogs*. Microcirculation, 2017. **24**(4).
92. Truse, R., et al., *Local gastric RAAS inhibition improves gastric microvascular perfusion in dogs*. J Endocrinol, 2019. **241**(3): p. 235-247.

93. Boerma, E.C., et al., *Quantifying bedside-derived imaging of microcirculatory abnormalities in septic patients: a prospective validation study*. Critical care (London, England), 2005. **9**(6): p. R601-R606.
94. Okabe, K., P.S. Malchesky, and Y. Nose, *Protective effect of prostaglandin I₂ on hepatic mitochondrial function of the preserved rat liver*. Tohoku J Exp Med, 1986. **150**(4): p. 373-9.
95. Lu, J., et al., *Effect of cholinergic signaling on neuronal cell bioenergetics*. J Alzheimers Dis, 2013. **33**(4): p. 1135-46.
96. Hughes, D., et al., *Effect of sampling site, repeated sampling, pH, and PCO₂ on plasma lactate concentration in healthy dogs*. Am J Vet Res, 1999. **60**(4): p. 521-4.
97. Lehmann, C., et al., *Effects of iloprost, a stable prostacyclin analog, on intestinal leukocyte adherence and microvascular blood flow in rat experimental endotoxemia*. Crit Care Med, 2001. **29**(7): p. 1412-6.
98. Kiefer, P., et al., *Hepato-splanchnic metabolic effects of the stable prostacyclin analogue iloprost in patients with septic shock*. Intensive Care Medicine, 2001. **27**(7): p. 1179-1186.
99. Gericke, A., et al., *Identification of the muscarinic acetylcholine receptor subtype mediating cholinergic vasodilation in murine retinal arterioles*. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2011. **52**(10): p. 7479-84.
100. Khurana, S., et al., *Vasodilatory effects of cholinergic agonists are greatly diminished in aorta from M3R^{-/-} mice*. Eur J Pharmacol, 2004. **493**(1-3): p. 127-32.
101. Tangsucharit, P., et al., *Muscarinic acetylcholine receptor M1 and M3 subtypes mediate acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilatation in rat mesenteric arteries*. J Pharmacol Sci, 2016. **130**(1): p. 24-32.
102. Chiba, S. and M. Tsukada, *Possible involvement of muscarinic M1 and M3 receptor subtypes mediating vasodilation in isolated, perfused canine lingual arteries*. Clin Exp Pharmacol Physiol, 1996. **23**(9): p. 839-43.
103. Takenaga, M., et al., *Calcitonin gene-related peptide mediates acetylcholine-induced endothelium-independent vasodilation in mesenteric resistance blood vessels of the rat*. Circ Res, 1995. **76**(6): p. 935-41.

104. Horváth, B., P. Orsy, and Z. Benyó, *Endothelial NOS-mediated relaxations of isolated thoracic aorta of the C57BL/6J mouse: a methodological study*. J Cardiovasc Pharmacol, 2005. **45**(3): p. 225-31.
105. Welsh, U., T. Deller, and S. Elsberg, *Sobotta Lehrbuch Histologie*. 2011: Elsevier Health Sciences Germany.
106. Edul, V.S., et al., *Dissociation between sublingual and gut microcirculation in the response to a fluid challenge in postoperative patients with abdominal sepsis*. Ann Intensive Care, 2014. **4**: p. 39.
107. Birukova, A.A., et al., *Iloprost improves endothelial barrier function in lipopolysaccharide-induced lung injury*. The European respiratory journal, 2013. **41**(1): p. 165-176.
108. Carrara, M., et al., *Blood pressure variability, heart functionality, and left ventricular tissue alterations in a protocol of severe hemorrhagic shock and resuscitation*. Journal of Applied Physiology, 2018. **125**(4): p. 1011-1020.
109. Silbernagel, S., *Physiologie*. 2009. 197f.
110. Kurosawa, M., et al., *Effects of sevoflurane on autonomic nerve activities controlling cardiovascular functions in rats*. Journal of Anesthesia, 1989. **3**(2): p. 109-117.
111. Crystal, G.J. and M.R. Salem, *The Bainbridge and the "Reverse" Bainbridge Reflexes: History, Physiology, and Clinical Relevance*. Anesthesia & Analgesia, 2012. **114**(3): p. 520-532.
112. Campagna, J.A. and C. Carter, *Clinical relevance of the Bezold-Jarisch reflex*. Anesthesiology, 2003. **98**(5): p. 1250-60.

Danksagung

Ich möchte mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen und mich beim Entstehungsprozess unterstützt haben.

Mein erster Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Olaf Picker für die Überlassung dieses interessanten Promotionsthemas und die hervorragende Unterstützung während der gesamten Entstehungszeit dieser Dissertation.

Ein besonderer Dank gilt selbstverständlich auch den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe: Allen voran möchte ich mich bei Herrn PD Dr. Richard Truse bedanken, der mich während der gesamten Promotion eng betreut hat und viel Zeit und Mühe in die Korrektur der Arbeit investiert hat. Mein Dank gilt auch Herrn PD Dr. Christian Vollmer, der insbesondere während der Versuche ein häufiger Ansprechpartner und Ratgeber für mich war und Birgit Berke, die mit viel Leidenschaft und Expertise die Versuche mit mir durchgeführt hat.

Ein weiterer Dank gilt meiner Familie, besonders meinen Eltern Werner und Renate, die mich vor, während und nach meinem Studium immer unterstützt haben. Mit eurer Erziehung, emotionalen Unterstützung und nicht zuletzt finanziellen Hilfe habt ihr mein Medizinstudium und damit auch diese Doktorarbeit überhaupt erst möglich gemacht.

Danke auch an meinen Freund Patrick Otto, der diesen steinigen Weg bis zur fertigen Promotion miterleben konnte und leider auch die ein oder andere Prokrastinationsphase, häufige Selbstzweifel und ständige Verzweiflung über Wissenschaft und Formulierung aushalten musste.

Mein letzter Dank gilt Eva, Emma, Kathi, Kessi und Martha: Wau, wau!