

Aus der Klinik für Anästhesiologie
der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Direktor: Univ.-Prof. Dr. B. Pannen

Einfluss topischer Melatonin - Applikation auf die orale und
gastrale Mikrozirkulation unter physiologischen und
hämorrhagischen Kreislaufbedingungen

Dissertation

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

vorgelegt von

Lukas Gördes

2022

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

gez.:

Prof. Dr. Nikolaj Klöcker:

Prof. Dr. Olaf Picker:

Prof. Dr. Alexander Assmann:

Ich widme diese Arbeit meinen Eltern und danke ihnen gleichzeitig für ihre Geduld während der Arbeit an dieser Dissertation.

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht:

- Topical Melatonin Improves Gastric Microcirculatory Oxygenation During Hemorrhagic Shock in Dogs but Does Not Alter Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers. Truse R, Nolten I, Schulz J, Herminghaus A, Holtmanns T, Gördes L, Raupach A, Bauer I, Picker O, Vollmer C. Front Med (Lausanne). 2020 Aug 28;7:510. doi: 10.3389/fmed.2020.00510. eCollection 2020. PMID: 32984383 [1]

Einfluss topischer Melatonin-Applikation auf die orale und gastrale Mikrozirkulation unter physiologischen und hämorrhagischen Kreislaufbedingungen

Einleitung: Eine intakte mukosale Barrierefunktion im Gastrointestinaltrakt ist von klinischer Relevanz, so konnte gezeigt werden, dass eine Störung dieser Barriere, z.B. durch eine Minderperfusion im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks, zu einer erhöhten Rate systemischer Infektionen führt [I]. Eine intakte Perfusion und Oxygenierung wird vor allem auf der mikrozirkulatorischen Ebene vermittelt. Für die systemische Anwendung von Melatonin konnte ein positiver Effekt auf die Mikrozirkulation des Magendarmtraktes gezeigt werden [II]. Ob dieser Effekt lokal oder auf vorgeschalteter Ebene vermittelt wird ist unklar. Für topische Therapien mit vasoaktiven Substanzen (Nitroglycerin, Iloprost) konnte eine Verbesserung der lokalen, gastralen Mikrozirkulation belegt werden [III]. In diesem Zusammenhang könnte auch die topische Melatoninapplikation die Mikrozirkulation verbessern. Ziel dieser Studie war es daher zu untersuchen, welche Effekte die topische Melatoninapplikation auf die gastrale und orale Mikrozirkulation unter physiologischen und hämorrhagischen Kreislaufbedingungen hat.

Methoden: Nach behördlicher Genehmigung wurden die Experimente an sechs weiblichen Foxhounds in wiederholter, randomisierter Reihenfolge (4 Gruppen, n=6 pro Gruppe) durchgeführt. Die Tiere erhielten unter Normovolämie oder im hämorrhagischen Schock an der gastralen und oralen Mukosa entweder Melatonin (0,3 mg in 1 % Ethanol, gefolgt von 3 mg in 10 % Ethanol) oder das Vehikel. Die gastrale mikrovaskuläre Flussrate (μflow) und Oxygenierung (μHbO_2) wurden mittels Laser-Doppler bzw. Reflexionsspektrofotometrie kontinuierlich erfasst und systemische Kreislaufparameter gemessen.

Statistik: Durchgeführt wurde eine 2-way-ANOVA mit einem Dunnett-Mehrfachvergleichstest oder einem Sidak-Post-hoc-Test.

Ergebnisse: Unter physiologischen Kreislaufbedingungen hatte die lokale Applikation von Melatonin keinen Einfluss auf μflow und μHbO_2 . Unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen konnte Melatonin den gastralen μHbO_2 , aber nicht den oralen μHbO_2 verbessern. Auch zeigte das applizierte Melatonin keinen Einfluss auf den gastralen und oralen μflow . Systemische Kreislaufparameter zeigten ebenfalls keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

Schlussfolgerung: Die lokale Melatonin Applikation ist somit in der Lage, die regionale gastrale Mikrozirkulation zu beeinflussen. Auf Grund des gewählten Versuchsbaues sind lokale Faktoren vermutlich für die protektive Wirkung von Melatonin mitverantwortlich.

Literatur:

[I] 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.

[II] 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).

[III] 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.

Influence of topical melatonin application on oral and gastric microcirculation under physiologic and hemorrhagic conditions.

Introduction: An intact mucosal barrier function in the gastrointestinal tract is of clinical relevance, it has been shown that a disturbance of this barrier, e.g. due to reduced perfusion in the context of hemorrhagic shock, leads to an increased rate of systemic infections [I]. Intact perfusion and oxygenation are mediated primarily at the microcirculatory level. A positive effect on microcirculation in the gastrointestinal tract has been shown for systemic application of melatonin [II]. Whether this effect is mediated locally or at an upstream level remains unclear. Topical therapies with vasoactive substances (nitroglycerin and iloprost) have been shown to improve local gastric microcirculation [III]. In this context, topical application of melatonin could also improve the microcirculation in this area. Therefore, the aim of this study was to investigate the effects of topical melatonin application on gastric and oral microcirculation under physiological and hemorrhagic conditions.

Methods: After regulatory approval, experiments were performed on six female foxhounds in a repeated randomized order (4 groups, n=6 per group). Animals received either melatonin (0.3 mg in 1% ethanol followed by 3 mg in 10% ethanol) or the vehicle solution under normovolemia or in a hemorrhagic shock on the gastric and oral mucosa. Gastric microvascular flow rate (μ flow) and oxygenation (μ HbO₂) were continuously recorded by laser Doppler and reflectance spectrophotometry, respectively, and systemic circulation parameters were measured.

Statistics: 2-way ANOVA with Dunnett multiple comparison test or Sidak post-hoc test was performed.

Results: Under physiological conditions, local application of melatonin had no effect on μ flow and μ HbO₂. During hemorrhagic shock, melatonin improved gastric μ HbO₂ but not oral μ HbO₂. Gastric and oral μ flow was not altered by melatonin under hemorrhagic shock. Systemic parameters showed no significant difference between groups.

CONCLUSION: Local melatonin application is able to influence the regional gastric microcirculation. Based on the chosen experimental design, local factors are probably partly responsible for the protective effect of melatonin.

Literature:

[I] 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.

[II] 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).

[III] 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.

Abkürzungsverzeichnis

AFMK	N1-ace-tyl-N2-formyl-5-methoxykynuramine
AMK	N1-acetyl-5-methoxykynuramine
ZETT	Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben
Elektrokardiographie	EKG
Herzfrequenz	HF
mittlerer arterieller Druck	MAD
Herzzeitvolumen	HZV
systemischer Gefäßwiderstand	SVR
mikrozirkulatorische Oxygenierung	μHbO_2
mikrozirkulatorischen Blutfluss	μflow
Train of Four	TOF
Bispectral Index	BIS
Internationale Einheiten	IE
Natriumchlorid	NaCl
Atemfrequenz	AF
systemisches Sauerstoffangebot	DO_2
Körpergewicht	KG
LW 2222 oxygen to see	O_2C
Standartabweichung	SD

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	- 1 -
1.1.	Melatonin.....	- 1 -
1.2.	Mikrozirkulation	- 2 -
1.3.	Vorversuche	- 3 -
2.	Material und Methoden	- 5 -
2.1.	Versuchsgenehmigung	- 5 -
2.2.	Versuchstiere	- 5 -
2.3.	Operationen.....	- 5 -
2.4.	Messungen	- 6 -
2.4.1.	EKG / Herzfrequenz	- 6 -
2.4.2.	Mittlerer Arterieller Druck (MAD)	- 6 -
2.4.3.	Beatmung / Atemgase.....	- 6 -
2.4.4.	Registrierung der Daten	- 6 -
2.4.5.	Herzzeitvolumen (HZV)	- 7 -
2.4.6.	Der systemische Gefäßwiderstand (SVR)	- 8 -
2.4.7.	Regionale Oxygenierung / Blutfluss (Flow).....	- 8 -
2.4.8.	Relaxometrie	- 9 -
2.4.9.	Blutgase	- 10 -
2.4.10.	Substanzen zur topischen Therapie	- 10 -
2.4.11.	Melatoninkonzentration im Blutplasma	- 10 -
2.4.12.	Interventionen	- 11 -
2.4.13.	Versuchsprotokoll.....	- 11 -
2.4.14.	Statistik	- 14 -
3.	Ergebnisse	- 16 -
3.1.	Veröffentlichung der Ergebnisse.....	- 16 -
3.2.	Mikrozirkulatorische Parameter	- 16 -

3.2.1.	Auswirkungen von Melatonin unter physiologischen Bedingungen ...	- 16 -
3.2.2.	Auswirkungen von Melatonin während der Hämorrhagie und Retransfusion	- 16 -
3.3.	Systemische und metabolische Parameter.....	- 21 -
3.3.1.	Unter physiologischen Bedingungen	- 21 -
3.3.2.	Während Hämorrhagie und Retransfusion	- 21 -
3.4.	Melatonin Plasmaspiegel.....	- 24 -
4.	Diskussion	- 25 -
4.1.	Versuchsaufbau	- 25 -
4.2.	Ergebnisse	- 26 -
4.3.	Klinische Relevanz	- 28 -
5.	Quellen.....	- 31 -

1. Einleitung

1.1. Melatonin

Melatonin, N-acetyl-5-methoxytryptamine, ist ein in vielen Säugetieren vorkommendes Molekül. Im menschlichen Organismus wird Melatonin vor allem in der Epiphyse im Zwischenhirn aus Tryptophan produziert und unterliegt einem ausgeprägten zirkadianen Rhythmus. Melatonin wird aber nicht nur in der Epiphyse, sondern auch im Darm und in der Netzhaut gebildet [2]. Dabei konnte Melatonin im Magendarmtrakt in einer bis zu 400fach höheren Konzentration im Vergleich zur Epiphyse nachgewiesen werden [3]. Melatonin wirkt im menschlichen Körper einerseits über spezielle membrangebundene (MT1 und MT2), zytosolische (MT3) und nukleäre Rezeptoren (RZR und ROR), aber auch über Mechanismen welche nicht-Rezeptor vermittelt sind.

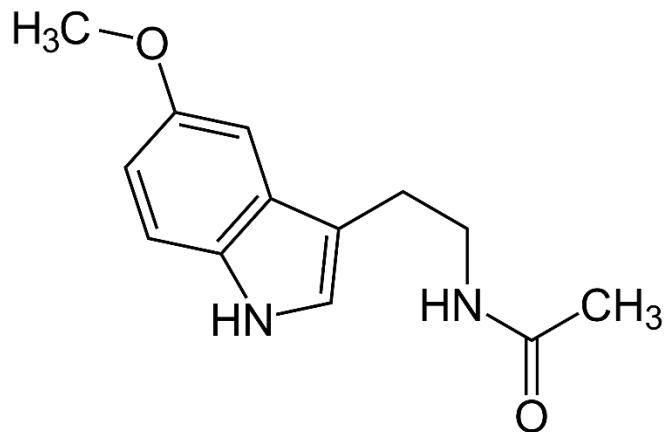


Abb. 1: Strukturformel von Melatonin [4]

Melatonin ist ein Indolamin-Derivat und auf Grund seiner teils aromatischen Strukturformel (s. Abbildung 1) in der Lage reaktive Sauerstoff- und Stickstoffverbindungen mittels Abgabe eines Elektrons bzw. eines Wasserstoffatom oder durch Adduktbildung zu neutralisieren [5]. Auf Grund seiner chemischen Struktur weist es ebenfalls einen ambiphilen Charakter auf. Es kann so prinzipiell in jeder Zelle als potentes Antioxidans wirken. Nicht nur Melatonin in seiner ursprünglichen Konfiguration weist diese antioxidativen Eigenschaften auf, auch die im Rahmen der Melatoninoxidation entstehenden Metabolite AFMK (N¹-ace-tyl-N²-formyl-5-methoxykynuramine) und AMK (N¹-acetyl-5-methoxykynuramine) weisen antioxidative

Eigenschaften auf und machen Melatonin im Vergleich zu seinen natürlich vorkommenden Strukturanaloga zu einem der potentesten Antioxidantien [5].

Die über die M1- und M2-Rezeptoren vermittelte Wirkung des Melatonins ist G-Protein gekoppelt und vermindert die zytosolische Konzentration von cAMP und cGMP. Der zytosolische MT3 Rezeptor ist Synonym zum Quinone Reductase 2 Enzym [6]. Über diesen Rezeptor, welcher vor allem in Leber, Niere, Herz, Lunge, Darm, Muskel und braunem Fettgewebe exprimiert wird, kommt es zu einer Reduktion von oxidativem Stress durch Hemmung der Elektronenübertragungsreaktionen von Quinonen. Dieser Rezeptor scheint wesentlich die antioxidativen Eigenschaften von Melatonin zu bestimmen [7].

Vorangegangene Arbeiten haben für Melatonin verschiedene organoprotektive Wirkungen gezeigt. So konnte in einer Arbeit gezeigt werden, dass exogen zugeführtes Melatonin bei Ratten die hepatische Mikrozirkulation und Funktion im milden hämorrhagischen Schock verbessern konnte. Auch konnte ein positiver Einfluss von Melatonin auf Stress-induzierte Läsionen im Magen von Ratten nachgewiesen werden [8]. Die Mikrozirkulation des Magens konnte bei Hunden im hämorrhagischen Schock ebenfalls nach prophylaktischer, systemischer Melatonin Gabe verbessert werden [9].

1.2. Mikrozirkulation

Als Mikrozirkulation erachtet man die Durchblutung der kleinsten Blutgefäße ab einem Diameter von unter 100 bis 150 µm. In diesem Bereich kommt das Blut in unmittelbare Nähe zu den versorgten Zellen, so dass hier wichtige Austausch- und immunologische Prozesse stattfinden. Auch findet auf dieser Ebene der Sauerstoffaustausch zum Gewebe mittels Diffusion statt. Störungen der Mikrozirkulation haben also einen unmittelbaren Einfluss auf die Funktion des entsprechenden Gewebes bzw. des Endorganes.

Störungen der Mikrozirkulation wurden für verschiedene akute und chronische Krankheitsbilder gezeigt. Verschiedene Schockformen stellen lebensbedrohliche Kreislaufzustände dar und gehen mit einem ausgeprägten Einfluss auf die systemische Makro- und Mikrozirkulation einher. Ein Schock ist definiert als ein Missverhältnis von Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf, welches durch verschiedene zugrundeliegende Krankheitsbilder ausgelöst werden kann. Aus ätiologischen Gesichtspunkten hat sich eine Einteilung in vier Schockformen etabliert: Hypovolämischer Schock, distributiver Schock, kardiogener Schock und obstruktiver Schock [10]. Der hämorrhagische Schock ist eine Form des hypovolämischem

Schockes, welcher durch eine (sub)akute Blutung ausgelöst wird. Blutungsursachen können atraumatischer, wie z.B. eine gastrointestinale Blutung, oder traumatischer Genese, wie z.B. bei einem Polytrauma, sein. Im Rahmen dieser akuten Hypovolämie bzw. Hämorrhagie kommt es im Körper zu einer systemischen und lokalen Minderversorgung mit Sauerstoff. Diese Minderversorgung mit Sauerstoff wird beim hämorrhagischen Schock durch verschiedene Mechanismen induziert. Einerseits spielt die akute Anämie mit Verlust von Erythrozyten als Sauerstoffträger eine Rolle, andererseits kommt es durch die kritische Abnahme des zirkulierenden Blutvolumens zu einer makrozirkulatorischen Hypotension mit unzureichender Gewebepfusion. Auf Ebene der Mikrozirkulation kommt es, verursacht durch Leukozyten-Endothel-Interaktionen, zu einer Destruktion der endothelial-membrangebundenen Proteoglykane und Glykosaminoglykane und zu einer mikrovaskulären Dysfunktion mit Capillary-Leak-Syndrom [10]. Auf intrazellulärer Ebene entsteht eine metabolische Imbalance [11] mit möglicher mitochondrialer Schädigung [12] und negativem Einfluss auf die Vasomotorik im Bereich der Arteriolen. Ähnliche Einflüsse auf die Makro- und Mikrozirkulation konnten auch im Rahmen anderer Schockformen wie z.B. des distributiven Schocks im Rahmen einer Sepsis gezeigt werden [13]. Störungen der Mikrozirkulation haben wie oben erwähnt akute Einflüsse auf die Funktion verschiedener Organe. Klinisch finden vor allem das akute Leber- und Nierenversagen große Beachtung. Im Bereich des Darmes kann eine Störung der Mikrozirkulation jedoch die Barrierefunktion der Schleimhaut schwächen und so eine Translokation von endoluminalen Toxinen und Bakterien begünstigen [14]. Die Aufrechterhaltung der gastrointestinalen Mikrozirkulation ist daher besonders unter pathologischen Kreislaufbedingungen von hohem klinischem Interesse und von potentieller therapeutischer Relevanz. In diesem Zusammenhang konnte gezeigt werden, dass Melatonin in der Lage ist die gastrale Mikrozirkulation positiv zu beeinflussen [9].

1.3. Vorversuche

Die prophylaktische, systemische Gabe von Melatonin zur Verbesserung der Mikrozirkulation bei Hunden unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen wurde bereits im Vorfeld von unserer Arbeitsgruppe untersucht [9]. Es konnte gezeigt werden, dass systemisch appliziertes Melatonin die gastrale Perfusion im Schock verbessert und die intestinale Barrierefunktion im Schock aufrechterhalten konnte. Rückschlüsse auf welche Weise Melatonin diese positiven Effekte bewirkt, konnten aus dieser Studie nicht gezogen werden. So verbleibt es unklar ob diese Effekte auf lokaler oder

vorgeschalteter systemischer Ebene vermittelt werden. Das lokale Therapien die Mikrozirkulation im Magendarmtrakt positiv beeinflussen könne, wurde ebenfalls im Rahmen von Vorversuchen unserer Arbeitsgruppe untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass topische Therapien mit vasoaktiven Substanzen (z.B. Nitroglycerin und Iloprost) potentielle protektive Effekte auf die gastrointestinale Mikrozirkulation und Barrierefunktion im hämorrhagischen Schock ausüben [15].

Ziel dieser Studie war es daher die Wirkung von lokal appliziertem Melatonin auf die gastrale und orale Mikrozirkulation bei Hunden unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen zu untersuchen. Ebenfalls sollten Effekte auf makrohämodynamische und metabolische Parameter untersucht werden.

2. Material und Methoden

2.1. Versuchsgenehmigung

Die für die Dissertation durchgeführten Versuche (n = 24) wurden mit Genehmigung durch das Landesamt für Natur, Umwelt und Verbraucherschutz Nordrhein-Westfalen an sechs Hunden weiblichen Geschlechts (Foxhounds, 28-36 kg) durchgeführt (Aktenzeichen 84-02.04.2011.A288). Alle an den Versuchen beteiligten Personen sind im Besitz eines Fachkundenachweises gemäß §9 und soweit von Nöten einer Sondergenehmigung nach § 9 Abs. 1 Satz 4 des Tierschutzgesetzes.

2.2. Versuchstiere

Die in den Versuchen eingesetzten Hunde lebten in der universitätseigenen Zentralen Einrichtung für Tierforschung und wissenschaftliche Tierschutzaufgaben (ZETT). Die Hunde wurden mit Standardnahrung (Dog High Energy, Extrudate V 3286-000, ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest) gefüttert. Vor jedem Versuch unterlagen die Hunde einer 24-stündigen Nahrungskarenz, der Zugang zu Wasser erfolgte *ad libitum*. Das Gewicht der sechs Hündinnen wurde während der Versuche konstant gehalten. Zwischen den Versuchen derselben Hunde wurde eine Pause von mindestens 21 Tagen eingehalten. Keine der Hündinnen war im Zeitraum der Versuche krank oder zeigte Verhaltensauffälligkeiten. Alle Hündinnen waren zum Zeitpunkt der Versuche kastriert, sodass Beeinflussungen durch den Oestrus der Tiere ausgeschlossen werden konnten.

2.3. Operationen

Vor den Versuchen wurde an jeder Hündin eine vorbereitende Operation in Allgemeinanästhesie (Propofol, Isofluran, Piritramid) unter aseptischen Bedingungen durchgeführt. Während der Operation wurden die Aa. carotides freipräpariert und nach außen in Hautschlingen verlagert [16]. Die leicht zugängliche Lage der Arterien ermöglichte eine vereinfachte, repetitive Punktion zur kontinuierlichen arteriellen Blutdruckmessung und Abnahme arterieller Blutproben während der Experimente. Außerdem ist so ein unkomplizierter Verschluss der Punktionsstelle nach den Experimenten möglich.

2.4. Messungen

2.4.1. EKG / Herzfrequenz

Ein 3-Kanal-EKG (MS 6 010, Lucius&Baer, Geretsried) wurde mit Nadelelektroden abgeleitet. Die Herzfrequenz wurde R-Zacken getriggert ermittelt (Chart 4.2).

2.4.2. Mittlerer Arterieller Druck (MAD)

Mittels Seldingertechnik wurde ein flüssigkeitsgefüllter, druckfester Katheter (PiCCO Catheter, Pulsion Medical Systems, München) in die A. carotis eingeführt und bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Der Katheter wurde über einen druckfesten Schlauch (Lectro-cath, Vygon, Ecoen, Frankreich) an einem Druckwandler (P23 ID Statham, Gould, Elk Grove, IL) angeschlossen. Der Druckwandler wurde auf Herzhöhe, orientierend am Proc. spinosus des 7. Halswirbels des liegenden Hundes, positioniert und vor jedem Versuch kalibriert (Druckeichgerät nach Gauer, Hugo Sachs Elektronik, March). Die Lagekontrolle des Katheters erfolgte durch die korrekte Darstellung der arteriellen Blutdruckkurve. Der Katheter wurde mit heparinisierter Kochsalzlösung (500 ml isotone Kochsalzlösung (Isotone Kochsalzlösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg), 1000 I.E. Heparin (Heparin 25.000 I.E./5ml, Rotexmedica, Trittau)) kontinuierlich gespült. Die ermittelten Werte wurden integriert und der mittlere arterielle Blutdruck (MAD) bestimmt (Chart 4.2).

2.4.3. Beatmung / Atemgase

Die Tiere wurden während der Narkose volumenkontrolliert über ein halbgeschlossenes System (Aestivia/5, Datex-Ohmeda, Madison, WI) beatmet. Ein Überwachungsmonitor (Capnomac Ultima, Datex, Helsinki, Finnland) wurde über einen Probenschlauch (Sampling line, Datex, Helsinki, Finnland) mit dem System verbunden und die Atem- und Narkosegaskonzentrationen (O₂, CO₂, Sevoflurane) in- und expiratorisch, kontinuierlich gemessen und dargestellt.

Über einen druckfesten Schlauch (Lectro-cath, Vygon, Ecoen, Frankreich) wurde ein Druckwandler (P23 ID Statham, Gould, Elk Grove, IL) mit dem System verbunden und der Atemdruck gemessen. Der Druckwandler wurde vor jedem Versuch kalibriert (Druckeichgerät nach Gauer, Hugo Sachs Elektronik, March).

2.4.4. Registrierung der Daten

Die beschriebenen Daten (vgl. Kapitel 2.4.1, 2, 3) wurden kontinuierlich von einem Acht-Kanal-Schreiber (RS 3800, Gould, Cleveland, OH) erfasst und nach Analog/Digital-

Wandlung der Signale (Powerlab/800, AD Instruments, Castle Hill, Australien) auf einem geeigneten Computer, mit entsprechender Software (Chart 4.2, ADInstruments), gespeichert.

2.4.5. Herzzeitvolumen (HZV)

Das Herzzeitvolumen (HZV) wurde mittels transpulmonaler Thermodilutionstechnik ermittelt (PiCCO 4.2 non US, PULSION Medical Systems, München, Deutschland).

Zu Beginn des Versuches wurden zwei Thermodilutionen durchgeführt. Die initiale Thermodilution gewährleistete die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse. Danach wurden die Messungen halbstündlich durchgeführt.

Zur transpulmonalen Thermodilution wurden 10 ml 0,9% Kochsalzlösung in einer Spritze (Omnifix 10 ml Luer Lock Solo, B. Braun, Melsung) auf Eis gekühlt (<8°C) und als Bolus, über eine Venenverweilkanüle (Vasofix Safety 16 G, B. Braun, Melsungen) am Vorderlauf des Hundes, injiziert. Die Temperatur der Lösung am Injektionsort wurde mit einem Sensor (PiCCO Monitoring Kit, Pulsion Medical Systems, München) gemessen. Über den arteriellen Katheter (PiCCO Catheter, Pulsion Medical Systems, München) (vgl. Kap 2.4.2) wurde die Temperaturänderung vor und nach Passage der Lungenstrombahn in der Aorta ascendens erfasst.

Mit dem Volumen des Injektats (V_i), der Injektattemperatur (T_i) und der Bluttemperatur vor Injektion (T_b) konnte das HZV nach der Stewart-Hamilton-Methode berechnet werden:

$$HZV = \frac{(T_b - T_i) * V_i * K}{(\int \Delta T_b * dt) * T}$$

T_b Bluttemperatur vor Injektion

T_i Temperatur des Injektats

V_i Injektatvolumen

$\int \Delta T_b * dt$: Fläche unter der Thermodilutionskurve

K : Korrekturfaktor, aus spezifischem Gewicht und spezifischer Wärmekapazität von Blut und Injektat

Mit Hilfe des HZV und der Herzfrequenz (HF) wurde das Schlagvolumen (SV) berechnet:

$$SV = \frac{HZV}{HF}$$

Die Daten wurden mit einer geeigneten Software (PiCCO-VoLEF Data Acquisition for Win32 4.0, Pulsion Medical Systems, München) erfasst und auf einem geeigneten Computer gespeichert.

2.4.6. Der systemische Gefäßwiderstand (SVR)

Der systemische Gefäßwiderstand wird als Quotient aus dem mittleren arteriellen Druck (MAD), dem Zentralvenösen Druck (ZVD) sowie des HZV mittels folgender Formel berechnet:

$$SVR = \frac{MAD - ZVD}{HZV}$$

Vorrausgegangene Experimente zeigten, dass der ZVD, vernachlässigbar klein und konstant war. Der SVR wurde daher annähernd als Quotient aus MAD und HZV, nach Eingabe der entsprechenden Daten mittels Microsoft Excel, berechnet.

2.4.7. Regionale Oxygenierung / Blutfluss (Flow)

Die mikrozirkulatorische Oxygenierung (μHbO_2) und der Blutfluss (μFlow , μVelo) wurden mittels Gewebe-Photospektrometrie (LW 2222 oxygen to see, LEA Medizintechnik, Gießen) an Magen- und Mundschleimhaut der Hunde ermittelt. Das Verfahren der Gewebe-Photospektrometrie bestimmt die μHbO_2 mittels Weißlichtspektrometrie sowie den μFlow und die Geschwindigkeit mittels Laser-Doppler.

Hierzu wurde eine Mikrosonde (LM-10, LEA Medizintechnik GmbH) über eine Magensonde in den Magen vorgeschoben und eine Flachsonde (LF-2, LEA Medizintechnik GmbH) an der oralen Mukosa platziert. Über diese Glasfasersonden wurden während der Messungen Weiß- sowie gleichzeitig Laserlicht in das Gewebe abgestrahlt.

Das zur Weißlichtspektrometrie emittierte Weißlicht hat ein Spektrum von 450 bis 1000 nm. Das Weißlicht wird im Schleimhaut-Gewebe an den Mitochondrien gestreut und reflektiert. Eine Änderung der Intensität sowie der Wellenlänge des reflektierten Lichts erfolgt in Abhängigkeit von der Farbe der Erythrozyten. Diese Veränderung kann durch die Sonde an der Oberfläche erfasst werden. Die Farbe der Erythrozyten ist abhängig von der Oxygenierung des in ihnen enthaltenen Hämoglobins. Oxygeniertes Hämoglobin zeigt eine hellrote, desoxygeniertes eine dunkelrote Farbe [17]. Somit kann aus der Wellenlänge des reflektierten Lichts die mikrozirkulatorische Oxygenierung (μHbO_2) der oralen und gastral Schleimhäute bestimmt werden [17].

Die Sonde emittiert einen Laser mit einer Leistung von 30 mW und eine Wellenlänge von 820nm. Das Laserlicht wird von den Erythrozyten reflektiert. Hierbei kommt es zu einer Änderung der Wellenlänge, dem sogenannten Doppler-Shift, in Abhängigkeit von der Flussgeschwindigkeit der Erythrozyten [18]. Zusätzlich verändert sich die Intensität des reflektierten Lichts abhängig von der Anzahl der sich bewegenden Erythrozyten. Diese Veränderungen werden von der Sonde an der Schleimhautoberfläche detektiert. Mittels dieser zwei ermittelten Größen lässt sich der Blutfluss berechnen [17].

Die, in den beiden voran gegangenen Absätzen, dargestellten Messmethoden stellen ein minimalinvasives Verfahren dar. Die atraumatische Platzierung der Mikrosonde über eine Magensonde lässt eine Messung unter nahezu physiologischen Bedingungen zu. Eine Laparotomie und Gastrotomie sind somit nicht erforderlich.

2.4.8. Relaxometrie

Die Relaxometrie wurde mittels *Train of Four* (TOF) durchgeführt. Vor Injektion des Muskelrelaxans wurden zwei Elektroden eines geeigneten Gerätes (TOF-Watch, Organon, Dublin, Irland) intramuskulär am Hinterlauf des Hundes platziert. Durch Stromimpulse von 15 mA wurden Muskelkontraktionen am Hinterlauf ausgelöst und die Ausschläge an der Pfote mittels eines Sensors gemessen. Die Elektroden wurden so platziert, dass eine TOF-Ratio von 1,0 erreicht wurde. Nach erfolgreicher Relaxierung lag eine TOF-Ratio von 0 vor.

Die Hunde wurden nach Abschluss der Versuche so lange in Narkose gehalten, bis eine TOF-Ratio von 1,0 vorlag. Die Kombination aus Relaxometrie und klinischen Zeichen, wie der wiedereinsetzenden Spontanatmung, ermöglichten eine Extubation der Hunde ohne Relaxantienüberhang.

2.4.9. Blutgase

Zur arteriellen Blutgasanalyse wurden über den arteriellen Katheter (vgl. Kapitel 2.4.2) nach Abnahme eines Totraumvolumens von 10 ml, 2 ml Blut mit einer Probenspritze (PICO50, Radiometer Medical, Brønshøj, Dänemark) entnommen. Das Totraumvolumen wurde reinfundiert. Das Blut wurde mit einem geeigneten Gerät (Rapidlab 865, Siemens, Eschborn) analysiert und die erfassten Daten darauf gespeichert. Erfasst wurden Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdruck, Sauerstoffsättigung, Hämoglobin, Sauerstoffsättigung, Laktat, Standardbikarbonat, *base excess*, pH sowie die Konzentrationen von Kalium, Natrium und Kalzium. Zur Hämatokrit Bestimmung wurden Kapillaren (Mikro-Hämatokrit-Kapillaren, Brand, Wertheim) mit Blut gefüllt und bei 13000 rpm für vier Minuten zentrifugiert (Tischzentrifuge, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen). Mit Hilfe der Auswertscheibe wurden die Werte abgelesen.

Mit Beginn des Versuchs wurden die arterielle Blutgasanalysen halbstündlich durchgeführt (vgl. Abb. 2)

2.4.10. Substanzen zur topischen Therapie

Zur topischen Therapie wurde Melatonin (Melatonin Pulver, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in einer Konzentration von 0,1 mg/ml bzw. 1 mg/ml verwendet. Als Kontrollsubstanz diente die 1 bzw. 10%ige Vehikellösung aus Ethanol und Kochsalzlösung (Isotone Kochsalzlösung, Fresenius Kabi, Bad Homburg). Gegeben wurden jeweils 3 ml der Lösungen.

Vor Beginn der Versuche wurde für jede Substanz entsprechend zwei Bolus-Lösung für den Magen und zwei Bolus-Lösungen für den Mund angesetzt.

Auf Grund der schlechten Wasserlöslichkeit von Melatonin musste zur Herstellung der Bolus-Lösungen mit 0,1 bzw. 1 mg/ml Melatonin entsprechend Ethanol als Lösungsmittel eingesetzt werden. Dies erfolgte in einer Konzentration von 1% für den 0,1 mg/ml Melatonin Bolus bzw. 10% für den 1 mg/ml Melatonin Bolus. Die Lösungen wurden für die Versuche in 10 ml Spritzen (Omnifix 10 ml Luer Lock Solo, B. Braun, Melsung) portioniert. Die Zuordnung der Spritzen erfolgte verblindet. Die Spritzen wurden danach bei -20 °C sowie im Dunkeln gelagert.

2.4.11. Melatoninkonzentration im Blutplasma

Die Bestimmung der Melatoninplasmaspiegel wurde mittels ELISA (IBL international, Melatonin ELISA (RE54021)) durchgeführt.

2.4.12. Interventionen

2.4.12.1. Substanzgabe zur topischen Therapie

Vor Beginn der Versuche wurden die für den Versuch zugeordneten Bolus-Lösungen aufgetaut. Zu den Zeitpunkten der Bolusgabe wurde die Boluslösung mit einer Spritze (Omnifix 10 ml Luer Lock Solo, B. Braun, Melsung) über eine Magensonde als Bolus an die Magenschleimhaut appliziert. Die Applikation der Boluslösung an die orale Schleimhaut erfolgte zu den gleichen Zeitpunkten.

2.4.12.2. Hämorrhagischer Schock und Retransfusion

Den Hunden wurde zur Induktion eines milden hämorrhagischen Schocks 16 ml Blut / kg KG, entsprechend 20 % des geschätzten Blutvolumens entnommen. Das Blut wurde möglichst zügig über den arteriellen Katheter und einen venösen Zugang im Vorderlauf des Hundes entnommen. Zur Abnahme des Blutes wurden Perfusorspritzen (Original Perfusor Spritzen 50 ml, B. Braun, Melsung) verwendet, die zuvor mit 0,1 ml Heparin (25.000 I.E./5 ml, Rotexmedica, Trittau) heparinisiert wurden. Das Blut wurde während des 60-minütigen Schocks bei 38 °C aufbewahrt. Nach Ende des Schocks wurde das heparinisierte Blut über ein Transfusionssystem (Sangofix, B. Braun Melsungen AG, Filter 200 µm) retransfundiert. Die Heparinwirkung wurde durch intravenös verabreichtes Protamin (Protamin ME 1000 I.E./ml, MEDA Pharma, Bad Homburg) antagonisiert. Hierzu wurden dem Hund 30 Minuten nach Retransfusion 0,5 I.E. Protamin je zugeführter I.E. Heparin verabreicht

2.4.13. Versuchsprotokoll

2.4.13.1. Allgemeines

Das Versuchsprotokoll umfasste 4 Versuchsgruppen (jeweils n = 6): Melatoningabe unter Normovolämie (Mela), Melatoningabe unter Hämorrhagie (Mela-H), Gabe des Vehikels unter Normovolämie (Kontrolle), Gabe des Vehikels unter Hämorrhagie (Kontrolle-H). Die Hunde nahmen in randomisierter Reihenfolge an jeder der Versuchsgruppen teil. Jedes Versuchstier diente so als eigene Kontrollgruppe, wodurch Effekte interindividueller Unterschiede in der Physiologie der Tiere reduziert werden konnten. Um 8 Uhr morgens begannen die Versuche in einem leicht abgedunkelten Raum, bei 24 °C Raumtemperatur. Diese Temperatur ist für Hunde temperaturneutral [19]. Die Hunde wurden auf einem Versuchstisch mit einer weichen Unterlage in Rechtsseitenlage gelagert. Eine periphere Venenverweilkanüle (Vasofix Safety 18G, B. Braun, Melsungen) wurde am Hinterlauf gelegt und eine venöse Blutprobe zur Blutgasanalyse entnommen. Zur Narkoseeinleitung erhielten die Hunde 6-8 mg

Propofol / kg KG intravenös (Propofol 1 % MCT, Fresenius Kabi, Bad Homburg), mit nachfolgender endotrachealer Intubation (Lo-Contur Murphy 9,0 CH, Mallinckrodt, Athlone, Irland) unter Laryngoskopie. Die Hunde wurden volumenkontrolliert über ein halbgeschlossenes Beatmungssystem (Aestivia/5, Datex-Ohmeda, Madison, WI) beatmet. Das Atemzugvolumen betrug 12,5 ml / kg KG und lag damit in einem für Hunde physiologischen Bereich [20]. Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration wurde konstant bei 30 Vol% gehalten. Das Verhältnis von Inspiration zu Expiration lag bei 1:1,5. Über die Kontrolle der Atemfrequenz wurde die endexpiratorische Kohlenstoffdioxidkonzentration konstant bei 35 mmHg gehalten. So konnten Einflüsse durch die Veränderung des Kohlenstoffdioxidpartialdrucks auf die Oxygenierung der Magenschleimhaut verhindert werden [21]. Die Narkose wurde mittels Sevofluran (Sevorane 100%, Abbott, Wiesbaden) bei einer endexpiratorischen Konzentration von 3,0 Vol% aufrechterhalten. Diese Konzentration entspricht einer minimalen alveolären Konzentration von 1,5 beim Hund [22]. Die Augen des Hundes wurden mit Augensalbe (Bepanthen Augen und Nasensalbe, Bayer Vital, Leverkusen) benetzt, um Hornhautschäden durch Austrocknung zu vermeiden. Die TOF-Relaxometrie, das Oberflächen -EKG und das BIS wurden abgeleitet (Vgl. Kapitel 2.4.8, 1, 9). Eine zweite periphere Venenverweilkanüle (Vasofix Safety 16G, B.Braun, Melsung) wurde am Vorderlauf gelegt und mit dem Thermistor zur transpulmonalen Thermodilution verbunden.

Die Arteria carotis wurde punktiert (Seldinger - Technik) und ein Thermodilutions-Katheter (PiCCO Catheter, Pulsion Medical Systems, München) bis in die Aorta ascendens vorgeschoben. Eine arterielle Blutprobe zur Blutgasanalyse wurde entnommen. Der Katheter wurde über einen druckfesten Schlauch mit dem Druckwandler (vgl. Kap. 2.4.2) und über ein Monitoring-Set (PiCCO Monitoring Kit, Pulsion Medical Systems, München) mit dem PiCCO verbunden (Vgl. Kapitel. 2.4.5).

Daraufhin wurde zur muskulären Relaxierung ein intravenöser Bolus von 0,6 mg Rocuronium/kgKG (Rocuronium Inresa, Inresa Arzneimittel, Freiburg) über die Venenverweilkanüle im Hinterlauf verabreicht. Durch die kontinuierliche Gabe von 1 mg/kg/h über einen Perfusor (PILOT Anästhesie, Fresenius Vial, Brezins, Frankreich) wurde die Relaxierung während des Versuchs aufrechterhalten.

Anschließend wurde die Mikrosonde des O₂C über eine Magensonde in den Magen vorgeschoben. Eine zweite Magensonde wurde, zur späteren Verabreichung der Bolus-

Lösung (vgl. Kap. 2.5.1), in den Magen vorgeschoben. Die Flachsonde des O2C wurde an der oralen Mukosa platziert.

Nachdem sich die Kreislaufparameter stabilisiert hatten, wurden zwei transpulmonale Thermodilution sowie eine arterielle Blutgasanalyse durchgeführt. Die Aufzeichnung der ersten 60 Minuten des Versuchsprotokolls dienten zur Darstellung stabiler Messwerte ("Baseline" in Abbildung. 2). Nach diesen 60 Minuten gestaltete sich der weitere Versuchsablauf abhängig der jeweiligen Versuchsgruppe.

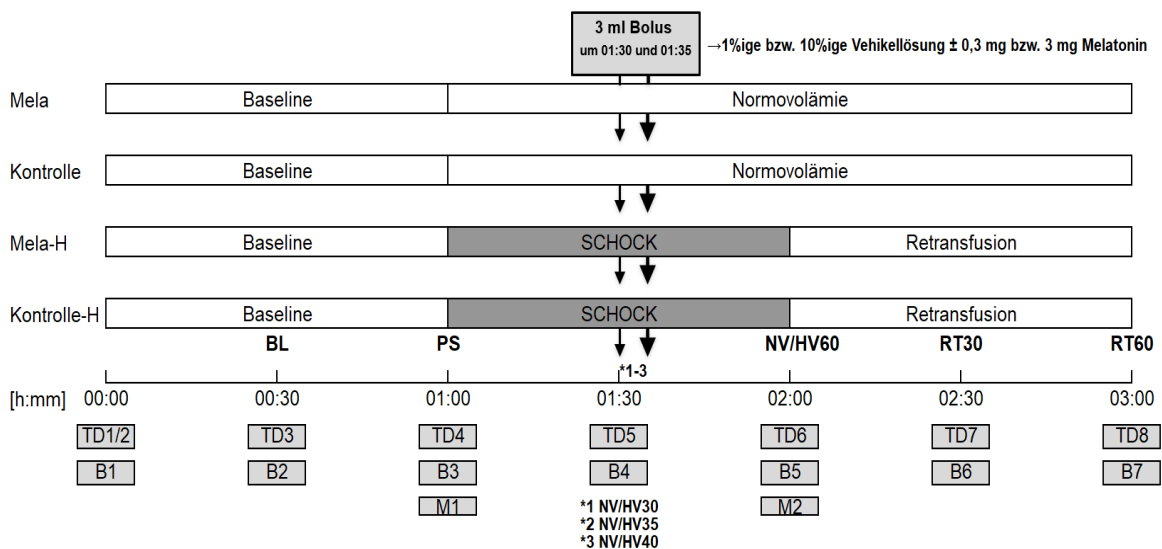


Abb. 2: Versuchsprotokoll Übersicht über die vier Versuchsgruppen (n=6) über einen Zeitraum von 3 Stunden. Melatoningabe unter physiologischen Bedingungen (Mela), Kontrollversuch mit Gabe der Vehikellösung unter physiologischen Bedingungen (Kontrolle), Melatoningabe unter hämorrhagischen Bedingungen (Mela-H), Kontrollversuch mit Gabe der Vehikellösung unter hämorrhagischen Bedingungen (Kontrolle-H). Durchgeführte Messungen: Thermodilution (TD), Blutgasanalyse (B), Melatoninkonzentration im Blutplasma (M) Untersuchungszeitpunkte: Baseline (BL), Prä-Schock (PS), Normovolämie bzw. Hämorrhagie (NV/HV 30, 35, 40 und 60), Retransfusion (RT 30 und 60)

2.4.13.2. Melatoningabe unter physiologischen Bedingungen (Mela)

90 Minuten nach Versuchsbeginn erfolgte in dieser Versuchsgruppe die lokale Applikation der Lösungen. Zunächst wurden 3 ml der Lösung mit einer Melatonin Konzentration von 0,1 mg/ml, entsprechend 0,3 mg Melatonin, als Bolus lokal auf die Magen- und Mundschleimhaut appliziert. Nach weiteren 5 Minuten erfolgte eine erneute Bolusgabe dieses Mal mit einer Melatonin Konzentration von 1 mg/ml, entsprechend 3 mg Melatonin, ebenfalls auf die Magen- und Mundschleimhaut.

2.4.13.3. Kontrollversuch mit Gabe der Vehikellösung unter physiologischen Bedingungen (Kontrolle)

In der Kontrollgruppe erfolgte ebenfalls 90 Minuten nach Versuchsbeginn die lokale Applikation des Vehikels als Bolus. Zunächst 3 ml einer 1%igen Lösung aus Ethanol und NaCl. Nach 5 Minuten dann die Gabe der zweiten Kontrolllösung bestehend aus 3 ml einer 10%igen Lösung aus Ethanol und NaCl. Der Kontrollversuch diente dem Ausschluss einer Beeinflussung der Messwerte durch die verwendete Trägerlösung oder den Versuchsaufbau.

2.4.13.4. Melatoningabe unter hämorrhagischen Bedingungen (Mela-H)

Bei dieser Versuchsgruppe wurde 60 Minuten nach Versuchsbeginn die Hämorrhagie induziert (vgl. Kap. 2.5.2). 30 Minuten nach Induktion der Hämorrhagie, also insgesamt 90 Minuten nach Versuchsbeginn, erfolgte auch hier die Applikation der Boluslösungen mit jeweils 0,3 bzw. 3 mg Melatonin auf 3 ml Trägerlösung. Der hämorrhagische Schock wurde nach einer Stunde mittels Retransfusion des entnommenen Blutes wieder aufgehoben.

2.4.13.5. Kontrollversuch mit der Vehikellösung unter hämorrhagischen Bedingungen (Kontrolle-H)

In dieser Kontrollgruppe erfolgte ebenfalls nach 60 Minuten die Induktion der Hämorrhagie sowie nach weiteren 30 Minuten die Applikation der Boluslösungen. Entsprechend der physiologischen Kontrolle wurde auch hier zunächst die 0,1%ige Ethanol Trägerlösung als Bolus appliziert und 5 Minuten später die 10%ige Ethanol Lösung. Auch in dieser Gruppe wurde die Hämorrhagie nach 60 Minuten durch Retransfusion des entnommenen Blutes beendet.

2.4.14. Statistik

Als primäre Endpunkte wurden der gastrale und orale μHbO_2 *in vivo* definiert. Als sekundäre Endpunkte wurden die systemischen hämodynamischen und metabolischen Variablen sowie die Melatoninspiegel im Plasma definiert. Alle Daten sind als Mittelwert $\pm$ Standardabweichung (Mittelwert $\pm$ SD) angegeben. Statistische Unterschiede wurden mit GraphPad Prism Version 6.03 für Windows, GraphPad Software, La Jolla, Kalifornien, USA, analysiert. Bei den Experimenten wurde eine Zwei-Wege-ANOVA mit wiederholten Messungen, gefolgt von einem Dunnett-Mehrfachvergleichstest (im Vergleich zu HV30) oder einem Sidak-Post-hoc-Test (im Vergleich zur jeweiligen Kontrollgruppe) durchgeführt. Eine *a priori* Power-Analyse (G*Power Version 3.1.9.2) ergab eine Power von 0,85 für die Erkennung von Unterschieden zwischen den

verschiedenen Gruppen mit $n = 6$ in 4 Gruppen, wiederholten Messungen, $\alpha < 0,05$ und η^2 von 0,5 (berechnet aus früheren Experimenten). $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

3. Ergebnisse

3.1. Veröffentlichung der Ergebnisse

Die im Folgenden aufgeführten und erhobenen Ergebnisse dieser Arbeit sind Teil einer bereits erfolgten Publikation [1]:

Topical Melatonin Improves Gastric Microcirculatory Oxygenation During Hemorrhagic Shock in Dogs but Does Not Alter Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers. Truse R, Nolten I, Schulz J, Herminghaus A, Holtmanns T, Gördes L, Raupach A, Bauer I, Picker O, Vollmer C. Front Med (Lausanne). 2020 Aug 28;7:510. doi: 10.3389/fmed.2020.00510. eCollection 2020. PMID: 32984383

3.2. Mikrozirkulatorische Parameter

3.2.1. Auswirkungen von Melatonin unter physiologischen Bedingungen

Unter physiologischen Bedingungen hatte Melatonin keinen Einfluss auf die gastrale und orale mikrozirkulatorische Oxygenierung (μHbO_2) sowie den mikrozirkulatorischen Blutfluss (μflow) (Tabelle 1). Unter den Ausgangsbedingungen war der gastrale μflow in der Gruppe Mela im Vergleich zur Kontrollgruppe niedriger. Dieser Effekt war im weiteren Verlauf der Studie nicht mehr nachweisbar. Die mikrozirkulatorischen Variablen sind in der Tabellen 2 aufgeführt.

3.2.2. Auswirkungen von Melatonin während der Hämorrhagie und Retransfusion

Im hämorrhagischen Schock sank die μHbO_2 -Wert im Magen von $79 \pm 8 \%$ auf $51 \pm 14 \%$ (Gruppe Kontrolle-H) und von $81 \pm 8 \%$ auf $50 \pm 15 \%$ (Gruppe Mela-H) (Tabelle 1). In der Melatonin Gruppe führte die Melatonin-Applikation zu einem signifikanten Anstieg der μHbO_2 (HV35: $60 \pm 13 \%$; HV40: $60 \pm 16 \%$) im Vergleich zu HV30 unmittelbar vor der lokalen Behandlung. In der Kontrollgruppe war dieser Effekt nicht nachweisbar. Nach der Retransfusion des entnommenen Blutes stieg der μHbO_2 -Wert in beiden Gruppen wieder auf $79 \pm 9 \%$ (Gruppe Kontrolle-H) bzw. $83 \pm 6 \%$ (Gruppe Mela-H), ohne dass sich die Gruppen voneinander unterschieden. Der μflow des Magens wurde während der Hämorrhagie von $98 \pm 21 \text{ aU}$ auf $69 \pm 7 \text{ aU}$ (Gruppe Kontrolle-H) und von $118 \pm 33 \text{ aU}$ auf $83 \pm 36 \text{ aU}$ (Gruppe Mela-H) reduziert (Tabelle 1). Die gastrale Flussgeschwindigkeit (μvel) war in der Gruppe Mela-H im Vergleich zur Kontrollgruppe

bereits unter den Ausgangsbedingungen höher. Nach der Retransfusion war der μvel -Wert in der Mela-H-Gruppe höher als in der Kontrollgruppe, ähnlich dem signifikant höheren Ausgangswerten (Tabelle 1). Die topische Anwendung von Melatonin veränderte die lokale Magendurchblutung nicht. Für einen graphischen Verlauf der gastral μHbO_2 und μflow Variablen siehe Abbildungen 3 und 5.

Während des hämorrhagischen Schocks sank der orale μHbO_2 -Wert von $85 \pm 5 \%$ auf $48 \pm 6 \%$ (Gruppe Kontrolle-H) und von $84 \pm 6 \%$ auf $47 \pm 6 \%$ (Gruppe Mela-H) (Tabelle 1). Während der anschließenden Schockperiode erholte sich der orale μHbO_2 in beiden Gruppen (Gruppe Kontrolle-H und Mela-H) auf $57 \pm 7 \%$. Im Gegensatz zur Mikrozirkulation des Magens wurde das Ausmaß der Rekompensation der mikrozirkulatorischen Oxygenierung nicht durch Melatonin beeinflusst. Während der Hämorrhagie waren der orale μflow und μvelo in beiden Gruppen vermindert. Parallel zu den Ergebnissen an der Magenschleimhaut hatte die topische Anwendung von Melatonin keinen Einfluss auf den oralen mikrozirkulatorischen Blutfluss und die Geschwindigkeit. Für einen graphischen Verlauf der oralen μHbO_2 und μflow Variablen siehe Abbildungen 4 und 6.

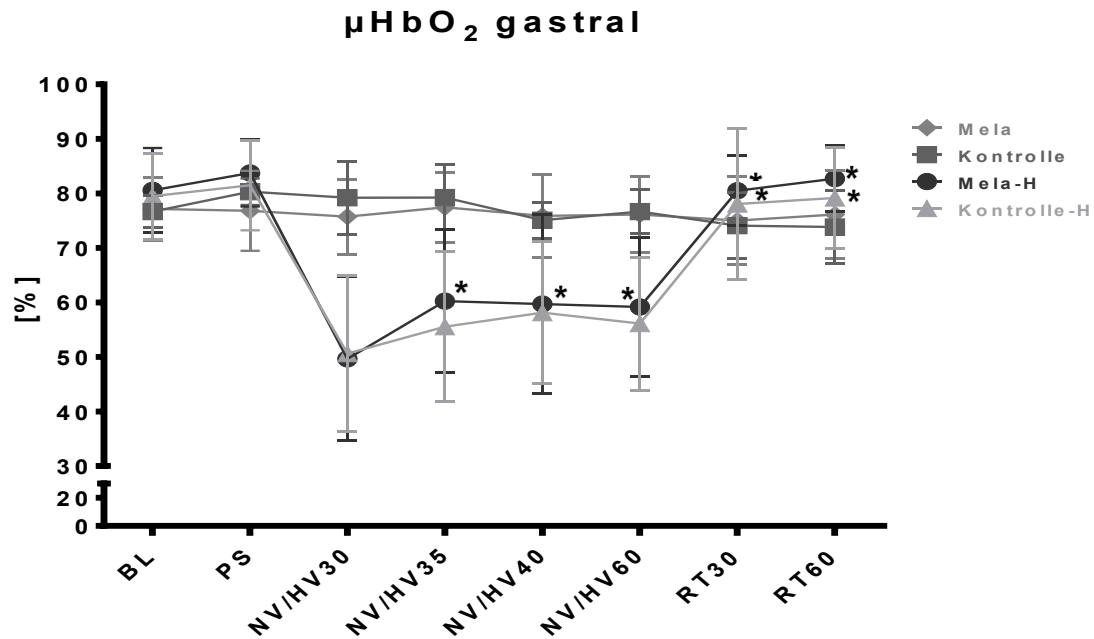


Abb. 3: Hämoglobin-Oxygenierung des Magens (μHbO_2); Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt, $n = 6$, $* = p < 0,05$ gegenüber NV/HV30, 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von Dunnett's Post-Hoc-Test; zwecks Übersichtlichkeit wurden nur Werte nach Melatonin bzw. Vehikel Applikation markiert. BL = Grundlinie, PS = Vorschock, NV/HV30/35/40/60 = 30/35/40/60 min nach Schockinduktion oder der jeweiligen Zeitkontrolle, RT30/60 = Retransfusion.

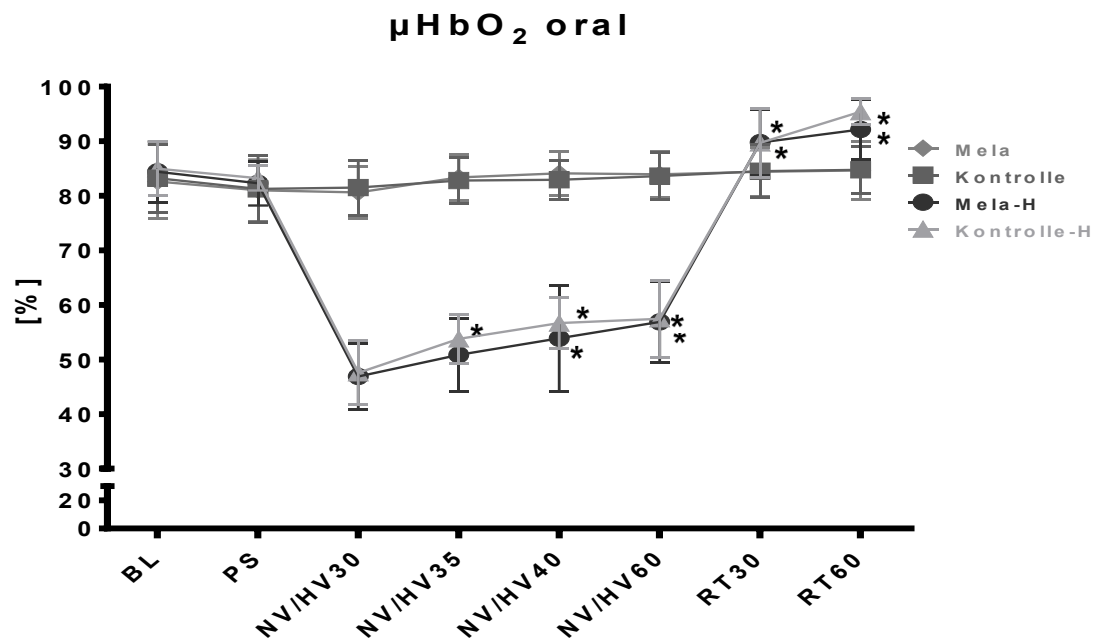


Abb. 4: Hämoglobin-Oxygenierung der Mundschleimhaut (μHbO_2); Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt, $n = 6$, $* = p < 0,05$ gegenüber NV/HV30, 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von Dunnett's Post-Hoc-Test; zwecks Übersichtlichkeit wurden nur Werte nach Melatonin bzw. Vehikel Applikation markiert. BL = Grundlinie, PS = Vorschock, NV/HV30/35/40/60 = 30/35/40/60 min nach Schockinduktion oder der jeweiligen Zeitkontrolle, RT30/60 = Retransfusion.

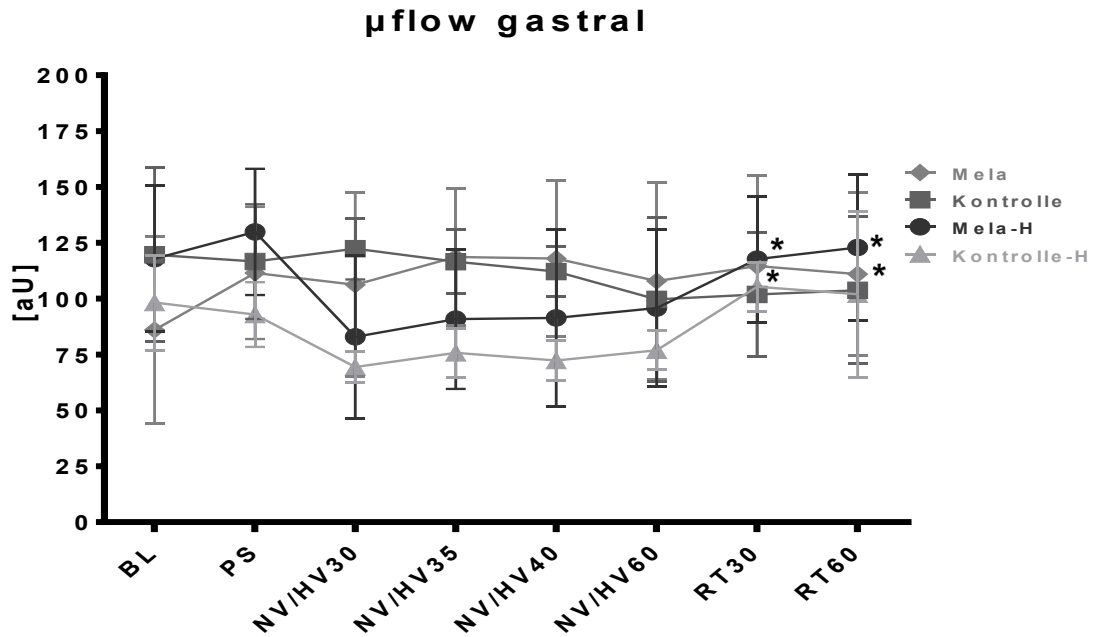


Abb. 5: Mikrozirkulatorische Perfusion des Magens (μ flow); Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt, $n = 6$, * = $p < 0,05$ gegenüber NV/HV30, 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von Dunnett's Post-Hoc-Test; zwecks Übersichtlichkeit wurden nur Werte nach Melatonin bzw. Vehikel Applikation markiert. BL = Grundlinie, PS = Vorschock, NV/HV30/35/40/60 = 30/35/40/60 min nach Schockinduktion oder der jeweiligen Zeitkontrolle, RT30/60 = Retransfusion.

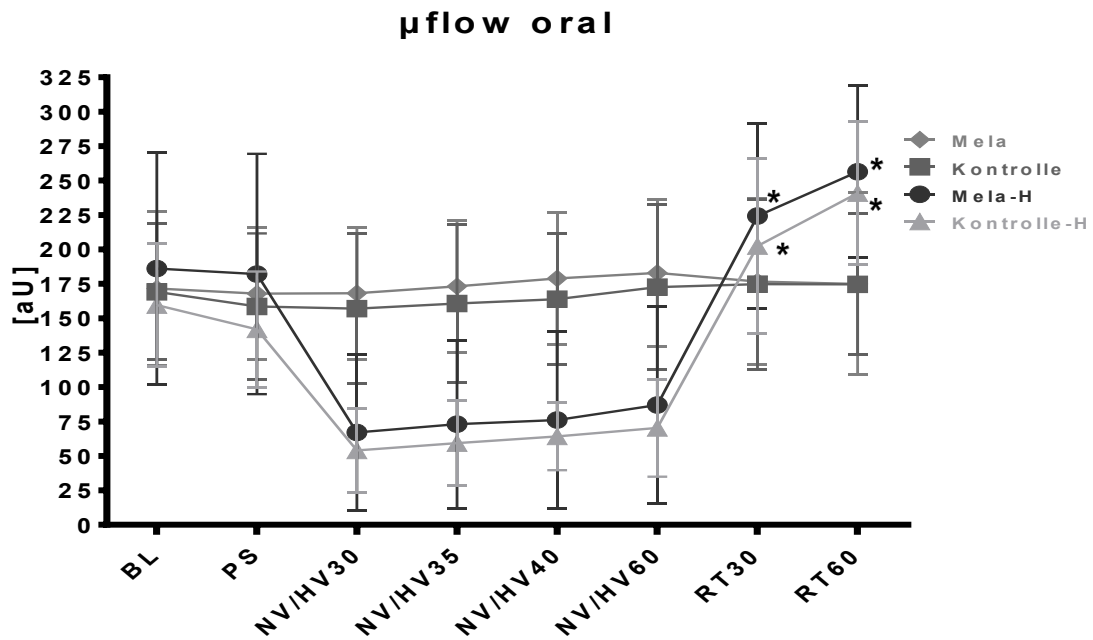


Abb. 6: Mikrozirkulatorische Perfusion der Mundschleimhaut (μ flow); Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD dargestellt, $n = 6$, * = $p < 0,05$ gegenüber NV/HV30, 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von Dunnett's Post-Hoc-Test; zwecks Übersichtlichkeit wurden nur Werte nach Melatonin bzw. Vehikel Applikation markiert. BL = Grundlinie, PS = Vorschock, NV/HV30/35/40/60 = 30/35/40/60 min nach Schockinduktion oder der jeweiligen Zeitkontrolle, RT30/60 = Retransfusion.

Parameter	Gruppe	BL				PS				NV/HV30				NV/HV35				NV/HV40				NV/HV60				RT30				RT60			
gastraler μHbO_2 [%]	Kontrolle	77	±	3		80	±	2		79	±	7		79	±	6		75	±	3		77	±	4		74	±	6		74	±	7	
	Kontrolle-H	79	±	8	*	81	±	8	*	51	±	14		56	±	14		58	±	13		56	±	12		78	±	14	*	79	±	9	*
	Mela	77	±	6		77	±	7		76	±	7		77	±	6		76	±	8		76	±	7		75	±	8		76	±	8	
	Mela-H	81	±	8	*	84	±	6	*	50	±	15		60	±	13	*	60	±	16	*	59	±	13	*	81	±	6	*	83	±	6	*
gastraler μflow [aU]	Kontrolle	120	±	39		117	±	26		122	±	14		117	±	14		112	±	11		100	±	37		102	±	28		104		33	
	Kontrolle-H	98	±	21	*	93	±	15		69	±	7		76	±	11		72	±	9		77	±	9		105	±	11	*	102		37	*
	Mela	86	±	42	#	112	±	30		106	±	41		119	±	31		118	±	35		108	±	44		115	±	40		111		37	
	Mela-H	118	±	33	*	130	±	28	#*	83	±	36		91	±	31		91	±	40		96	±	35		118	±	28	*	123		33	*
gastrale μvel [aU]	Kontrolle	17	±	2		16	±	2		16	±	1		16	±	1		15	±	0		16	±	2		16	±	2		16		2	
	Kontrolle-H	16	±	2		15	±	2		14	±	2		14	±	1		14	±	1		14	±	1		16	±	1		16		4	*
	Mela	15	±	4		17	±	3		16	±	3		17	±	2		17	±	2		16	±	3		17	±	3		17		3	
	Mela-H	18	±	4	#*	19	±	4	#*	15	±	3		15	±	2		15	±	3		16	±	3		16	±	1		18		4	#*
oralen μHbO_2 [%]	Kontrolle	83	±	6		81	±	6		81	±	5		83	±	4		83	±	4		84	±	4		85	±	5		85	±	4	
	Kontrolle-H	85	±	5	*	83	±	2	*	48	±	6		54	±	5	*	57	±	5	*	57	±	7	*	90	±	6	*	95	±	2	*
	Mela	83	±	7		81	±	6		81	±	5		83	±	4		84	±	4		84	±	4		84	±	5		85	±	5	
	Mela-H	84	±	6	*	82	±	4	*	47	±	6		51	±	7		54	±	10	*	57	±	7	*	90	±	6	*	92	±	6	*
oralen μflow [aU]	Kontrolle	169	±	49		158	±	53		157	±	55		161	±	57		164	±	48		173	±	60		175	±	62		175	±	51	
	Kontrolle-H	159	±	45	*	142	±	42	*	54	±	30		59	±	31		64	±	25		70	±	35		202	±	64	*	241	±	52	*
	Mela	172	±	56		168	±	48		168	±	48		173	±	48		179	±	48		183	±	53		177	±	61		175	±	66	
	Mela-H	186	±	84	*	182	±	87	*	67	±	57		73	±	61		76	±	64		87	±	72		224	±	67	*	256	±	62	*
orale μvel [aU]	Kontrolle	29	±	5		28	±	6		28	±	7		28	±	7		28	±	7		29	±	7		29	±	8		29	±	7	
	Kontrolle-H	26	±	5	*	25	±	5	*	17	±	5		17	±	5		18	±	4		18	±	5		31	±	7	*	35	±	6	*
	Mela	31	±	12		31	±	13		31	±	12		31	±	11		31	±	9		31	±	9		30	±	9		30	±	9	
	Mela-H	29	±	12	*	30	±	11	*	19	±	9		20	±	9		20	±	9		21	±	10		34	±	10	*	38	±	10	*

Tabelle 1: Mikrozirkulationsvariablen der Versuchsgruppen: Hämoglobin-Oxygenierung des Magens und der Mundschleimhaut (μHbO_2); mikrozirkulatorische Perfusion des Magens und der Mundschleimhaut (μflow) und Perfusionsgeschwindigkeit (μvel). Die Daten sind als absolute Werte dargestellt, Mittelwert $\pm$ SD, n = 6, * = p < 0,05 gegenüber NV/HV30, 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von Dunnett's Post-Hoc-Test; # = p < 0,05 gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe (vs. Kontrolle für Mela, vs. Kontrolle-H für Mela-H). 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von einem Sidak-Post-Hoc-Test. BL = Grundlinie, PS = Vorschock, NV/HV30/35/40/60 = 30/35/40/60 min nach Schockinduktion oder der jeweiligen Zeitkontrolle, RT30/60 = Retransfusion.

3.3. Systemische und metabolische Parameter

3.3.1. Unter physiologischen Bedingungen

Die systemischen hämodynamischen und metabolischen Variablen blieben während des gesamten Versuchs stabil und unterschieden sich nicht von denen der Kontrollgruppe. Die systemischen Variablen sind in den Tabelle 2 und 3 aufgeführt.

3.3.2. Während Hämorrhagie und Retransfusion

Das systemische Sauerstoffangebot (DO_2) sank während der Hämorrhagie in beiden Gruppen gleichermaßen von $12 \pm 3 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ auf $7 \pm 1 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Gruppe Kontrolle-H) und von $12 \pm 3 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ auf $7 \pm 2 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ (Gruppe Mela-H) und wurde nach der Retransfusion in beiden Gruppen wieder auf $12 \pm 3 \text{ ml kg}^{-1} \text{ min}^{-1}$ erhöht (Tabelle 2). Die Abnahme des DO_2 basierte auf einer ähnlichen Abnahme des Herzzeitvolumens und einem Anstieg des SVR. Die Gabe von Melatonin hatte keinen Einfluss auf die systemischen hämodynamischen Variablen während der folgenden 30 Minuten des Schocks und der anschließenden Retransfusionsphase (Tabelle 2).

Während der Hämorrhagie entwickelte sich eine metabolische Azidose, ohne dass es Unterschiede zwischen der mit Melatonin behandelten Gruppe und der Kontrollgruppe gab (Tabelle 3).

Parameter	Gruppe	BL			PS			NV/HV30			NV/HV35			NV/HV40			NV/HV60			RT30			RT60		
MAP [mmHg]	Kontrolle	60	± 4	*	63	± 5		64	± 5		63	± 5		63	± 4		63	± 4		64	± 6		64	± 7	
	Kontrolle-H	58	± 2	*	61	± 5	*	49	± 3		51	± 4		53	± 4		56	± 5	*	71	± 6	*	64	± 5	*
	Mela	61	± 4		62	± 3		62	± 3		62	± 3		62	± 3		62	± 3		63	± 4		62	± 5	
	Mela-H	63	± 6	#*	63	± 3	*	48	± 2		50	± 6		51	± 5		56	± 3	*	71	± 5	*	67	± 5	*
HR [min ⁻¹]	Kontrolle	116	± 9		117	± 11		115	± 11		114	± 11		114	± 11		114	± 11		112	± 11		109	± 12	
	Kontrolle-H	117	± 8		115	± 6		117	± 13		140	± 60		141	± 61		120	± 13		107	± 6		107	± 6	
	Mela	115	± 12		113	± 9		113	± 9		112	± 10		112	± 10		112	± 10		112	± 9		109	± 10	
	Mela-H	116	± 7		114	± 5		115	± 12		137	± 60		138	± 60		119	± 11		105	± 5		107	± 5	
HZV [ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹]	Kontrolle	80	± 12		79	± 11		77	± 8								75	± 7		76	± 8		77	± 9	
	Kontrolle-H	82	± 10	*	85	± 17	*	46	± 2								53	± 3		81	± 10	*	84	± 10	*
	Mela	79	± 13		78	± 12		77	± 9								76	± 9		76	± 9		77	± 10	
	Mela-H	78	± 9	*	77	± 8	*	45	± 7								52	± 5	*	79	± 9	*	82	± 10	*
DO ₂ [ml·kg ⁻¹ ·min ⁻¹]	Kontrolle	12	± 3		12	± 3		11	± 2								11	± 2		11	± 2		11	± 2	
	Kontrolle-H	12	± 3	*	13	± 3	*	7	± 1								8	± 1		12	± 2	*	12	± 3	*
	Mela	12	± 3		11	± 3		11	± 2								11	± 2		11	± 2		11	± 2	
	Mela-H	12	± 3	*	12	± 3	*	7	± 2								8	± 1		12	± 3	*	12	± 3	*
SVR [mmHg·l ⁻¹ ·min ⁻¹]	Kontrolle	25	± 5		27	± 6		28	± 5								28	± 5		28	± 6		27	± 5	
	Kontrolle-H	24	± 4	*	24	± 6	*	35	± 5								35	± 5		29	± 4	*	25	± 4	*
	Mela	22	± 6		22	± 6		21	± 5								21	± 5		21	± 5		22	± 6	
	Mela-H	26	± 5	*	27	± 5	*	35	± 6								35	± 5		30	± 5	*	27	± 4	*
SV [ml]	Kontrolle	22	± 5		21	± 5		21	± 5								21	± 4		21	± 4		22	± 4	
	Kontrolle-H	22	± 4	*	23	± 6	*	12	± 2								14	± 3		23	± 3	*	24	± 4	*
	Mela	22	± 6		22	± 6		21	± 5								21	± 5		21	± 5		22	± 6	
	Mela-H	21	± 4	*	21	± 4	*	12	± 2								14	± 2		24	± 4	*	24	± 5	*

Tabelle 2: Systemische hämodynamische Variablen der Versuchsgruppen: Mittlerer arterieller Druck (MAP), Herzfrequenz (HR), Herzzeitvolumen (CO), systemische Sauerstoffversorgung (DO₂), systemischer Gefäßwiderstand (SVR) und Schlagvolumen (SV). Die Daten werden als absolute Werte dargestellt, Mittelwert ± SD, n = 6, * = p < 0,05 gegenüber NV/HV30, 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von Dunnett-Post-Hoc-Test; # = p < 0,05 gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe (vs. Kontrolle für Mela, vs. Kontrolle-H für Mela-H). 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von einem Sidak-Post-Hoc-Test. Aufgrund gelegentlich fehlender Werte der Herzfrequenz wurde keine statistische Analyse durchgeführt. BL = Baseline, PS = Vorschock, NV/HV30/35/40/60 = 30/35/40/60 min nach Schockinduktion oder der jeweiligen Zeitkontrolle, RT30/60 = Retransfusion.

Parameter	Gruppe	BL				PS				NV/HV30				NV/HV35				NV/HV40				NV/HV60			
SAT [%]	Kontrolle	98.8	±	1.0		98.8	±	0.9		98.9	±	0.9		98.8	±	0.9		98.8	±	0.9		98.9	±	0.9	
	Kontrolle-H	98.3	±	1.1	*	98.5	±	0.9	*	97.6	±	1.4		98.0	±	1.2	*	98.6	±	0.8	*	98.6	±	0.8	*
	Mela	99.0	±	0.8	#	99.0	±	0.8	#	99.0	±	0.7	#	99.0	±	0.8	#	99.0	±	0.7	#	99.0	±	0.7	#
	Mela-H	98.8	±	1.0	#*	98.8	±	1.0	*	98.2	±	1.6	#	98.4	±	1.4	#	98.9	±	0.9	*	98.8	±	0.9	*
pCO ₂ [mmHg]	Kontrolle	37.4	±	2.5		37.1	±	2.7		37.4	±	2.3		37.9	±	2.2		37.9	±	1.8		38.8	±	3.4	*
	Kontrolle-H	36.7	±	2.6	*	36.6	±	2.1	*	41.5	±	3.1		40.2	±	2.5	*	36.8	±	1.9	*	36.8	±	1.9	*
	Mela	36.6	±	2.6		36.7	±	3.0		37.0	±	2.7		37.3	±	2.5		37.3	±	2.1		37.8	±	3.2	
	Mela-H	36.6	±	2.4	*	36.3	±	2.4	*	41.1	±	3.9		40.0	±	4.1		36.7	±	2.4	*	37.3	±	2.2	*
pO ₂ [mmHg]	Kontrolle	139.8	±	11.0	*	143.2	±	11.1		146.0	±	10.7		145.	±	9.2		146.3	±	11.3		144.9	±	8.3	
	Kontrolle-H	139.0	±	14.2	*	142.5	±	10.6	*	128.0	±	10.5		136.	±	9.9	*	148.8	±	10.9	*	149.2	±	10.5	*
	Mela	141.7	±	8.3		144.2	±	6.9		145.2	±	7.6		145.	±	5.5		147.0	±	6.2		147.8	±	9.6	
	Mela-H	143.2	±	11.2	*	144.0	±	9.0	*	131.5	±	10.3		137.	±	10.	*	152.5	±	8.9	*	148.2	±	7.8	*
pH	Kontrolle	7.38	±	0.03		7.38	±	0.03		7.38	±	0.02		7.38	±	0.0		7.38	±	0.03		7.37	±	0.03	
	Kontrolle-H	7.38	±	0.03	*	7.38	±	0.03	*	7.31	±	0.03		7.32	±	0.0	*	7.37	±	0.02	*	7.37	±	0.02	*
	Mela	7.38	±	0.02		7.38	±	0.03		7.38	±	0.02		7.38	±	0.0		7.38	±	0.02		7.37	±	0.03	
	Mela-H	7.38	±	0.03	*	7.38	±	0.02	*	7.32	±	0.04		7.33	±	0.0	*	7.37	±	0.03	*	7.37	±	0.03	*
HCO ₃ [mmol·l ⁻¹]	Kontrolle	21.3	±	0.7		21.3	±	0.7		21.3	±	0.7		21.5	±	0.6		21.4	±	0.6		21.7	±	0.8	*
	Kontrolle-H	21.0	±	0.6	*	20.9	±	0.5	*	20.2	±	0.6		20.1	±	0.5		20.4	±	0.6		20.4	±	0.5	
	Mela	21.1	±	0.8		21.0	±	0.9		21.0	±	0.6		21.1	±	0.5		21.1	±	0.4		21.1	±	0.5	#
	Mela-H	21.1	±	0.7	*	20.9	±	0.7	*	20.4	±	0.7		20.3	±	0.7		20.5	±	0.8		20.7	±	0.8	
Hb [g·100ml ⁻¹]	Kontrolle	11.1	±	1.1		11.0	±	1.1		10.9	±	1.0		10.8	±	1.1		10.9	±	1.2		10.8	±	1.3	
	Kontrolle-H	10.9	±	1.3		10.8	±	1.4		10.8	±	1.3		10.5	±	1.2	*	10.4	±	1.2	*	10.4	±	1.4	*
	Mela	10.7	±	1.2	#	10.5	±	1.3	#	10.5	±	1.3	#	10.4	±	1.3	#	10.5	±	1.3	#	10.4	±	1.3	#
	Mela-H	10.9	±	1.4		10.8	±	1.5		11.0	±	1.4	#	10.8	±	1.2	#	10.6	±	1.3	#*	10.6	±	1.4	#*
Lactate [mmol·l ⁻¹]	Kontrolle	0.9	±	0.4		1.0	±	0.4		1.1	±	0.4		0.9	±	0.3		0.9	±	0.3		0.9	±	0.3	
	Kontrolle-H	0.9	±	0.3		1.1	±	0.4		1.4	±	0.3		1.2	±	0.3		1.0	±	0.3		1.0	±	0.3	
	Mela	1.0	±	0.4		1.1	±	0.4		1.2	±	0.4		1.1	±	0.3		1.1	±	0.3		1.1	±	0.3	
	Mela-H	0.8	±	0.2		0.9	±	0.3		1.2	±	0.3		1.0	±	0.3		0.8	±	0.2		0.8	±	0.2	
BE [mmol·l ⁻¹]	Kontrolle	-3.0	±	1.2		-2.9	±	0.8		-3.0	±	0.9		-2.8	±	0.9		-2.9	±	1.0		-2.7	±	0.7	
	Kontrolle-H	-3.0	±	0.8	*	-3.2	±	0.7	*	-4.9	±	0.7		-4.8	±	0.8		-3.8	±	0.8	*	-3.8	±	0.6	*
	Mela	-2.9	±	0.8		-3.1	±	0.8		-3.1	±	0.6		-3.1	±	0.5		-3.0	±	0.5		-3.1	±	0.5	
	Mela-H	-2.9	±	0.9	*	-3.1	±	0.8	*	-4.6	±	0.8		-4.5	±	0.9		-3.7	±	1.0	*	-3.5	±	1.0	*

Tabelle 3: Metabolische Variablen der Versuchsgruppen: Arterielle Sauerstoffsättigung (SAT), art. Kohlendioxidpartialdruck (PaCO₂), art. Sauerstoffpartialdruck (PaO₂), pH-Wert, Bicarbonat (HCO₃), Hämoglobinkonzentration (Hb), Laktatplasmakonzentration, Basenüberschuss (BE). Die Daten sind als absolute Werte dargestellt, Mittelwert ± SD, n=6, * = p < 0,05 gegenüber NV/HV30, 2-way ANOVA für wiederholte Messungen gefolgt von Dunnett's post hoc Test; # = p < 0,05 gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe (vs. Kontrolle für Mela, vs. Kontrolle-H für Mela-H). 2-Wege-ANOVA für wiederh. Messungen gefolgt von Sidak-Post-Hoc-Test. Bei gelegentlich fehlenden Werten der Laktatplasmakonzentration erfolgte keine statistische Analyse. BL = Basislinie, PS = Vorschock, NV/HV30/60 = 30/60 min nach Schockinduktion oder der jeweiligen Zeitkontrolle, RT30/60 = Retransfusion.

3.4. Melatonin Plasmaspiegel

Die Melatonin-Plasmaspiegel blieben in allen Gruppen zu Beginn des Versuchs innerhalb des physiologischen Bereichs. Im Verlauf des Experiments wurden in den Kontrollgruppen keine signifikanten Schwankungen der Melatonin-Plasmakonzentrationen festgestellt jedoch zeigte sich ein Trend zu steigenden Melatoninspiegeln auch in den Kontrollgruppen. Die Melatonin-Plasmakonzentration stieg bei den mit Melatonin behandelten Tieren signifikant auf supraphysiologische Werte an (siehe Abbildung 3).

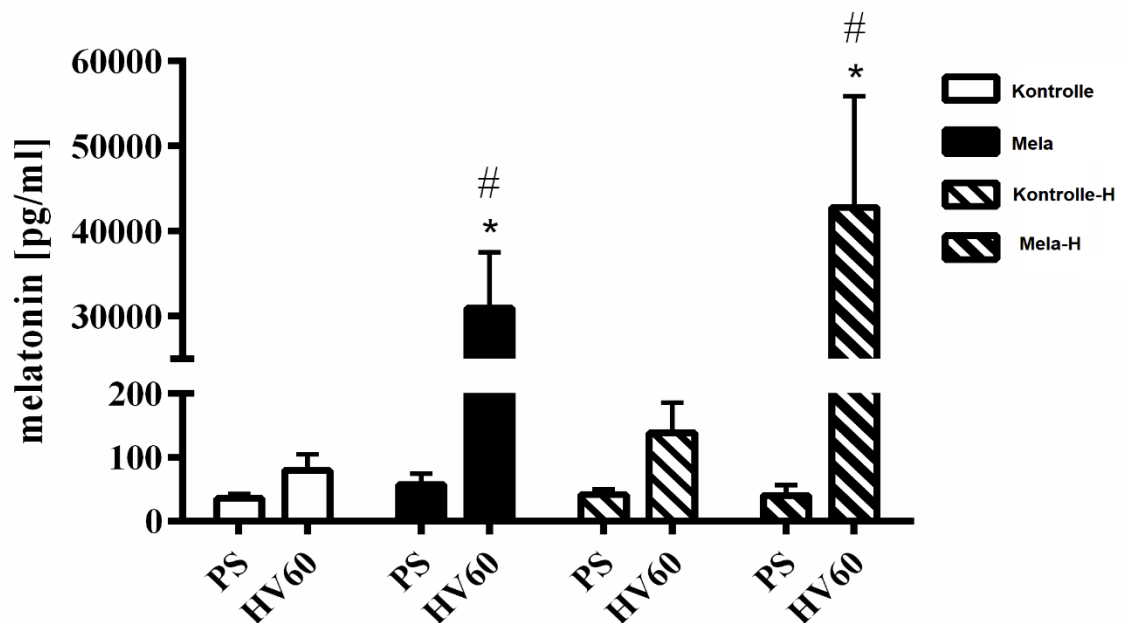


Abb. 7: Melatonin-Plasmakonzentrationen in pg/ml bei Ausgangsbedingungen und 30 Minuten nach topischer Applikation des Vehikels (Kontrolle, Kontrolle-H) oder Melatonin (Mela, Mela-H). Die Daten sind als Mittelwert $\pm$ SD für $n = 6$ Hunde dargestellt; * = $p < 0,05$ gegenüber dem Basiswert (PS), # = $p < 0,05$ gegenüber der jeweiligen Kontrollgruppe (vs. Kontrolle für Mela, vs. Kontrolle-H für Mela-H), 2-Wege-ANOVA für wiederholte Messungen, gefolgt von einem Sidak-Post-Hoc-Test. PS = vor dem Schock, HV60 = 60 Minuten nach der Schockinduktion

4. Diskussion

4.1. Versuchsaufbau

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss einer lokalen Melatonin Applikation auf die gastrale und orale Mikrozirkulation bei Hunden unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen zu untersuchen. Der Versuchsaufbau mit cross-over Design ermöglicht eine Reduktion der Versuchstieranzahl bei gleichzeitig suffizienter Teststärke. Ein *in vitro* Modell unter Verzicht einer Messung *in vivo* hätte bei der vorliegenden Fragestellung zu keiner ausreichenden Beantwortung beigetragen. Die Modulation der Mikrozirkulation ist komplexen Regelkreisen unterworfen [13] welche *in vitro* nicht ausreichend abgebildet werden können. Ebenso sind die dynamischen Bedingungen während eines hämorrhagischen Schocks nicht ausreichend *in vitro* simulierbar.

Derzeit gibt es in der klinischen Routine keine regelmäßig zum Einsatz kommenden Methoden zum Nachweis und zur Überwachung der Mikrozirkulation [13]. Im Rahmen unserer Versuchsreihe erfolgte die Messung der Mikrozirkulation mittels Gewebe-Photospektrometrie und Laser-Doppler Messung. Diese Messmethoden werden neben den Videomikroskopischen Methoden, wie dem *Sidestream dark-field (SDF) imaging* und dem *Incident dark-field (IDF) imaging*, als eine direkte Messmethode angesehen [13]. Zu den indirekten Messmethoden werden z.B. der transcutane Gewebesauerstoffpartialdruck (tPO₂) oder die Nah-infrarot Spektroskopie (NIRS) gezählt. Alle diese genannten Methoden weisen mehr oder weniger relevante Einschränkungen auf. Bei den indirekten Methoden werden nur Surrogat-Parameter erhoben welche indirekt auf die mikrozirkulatorische Funktion schließen lassen. Die direkten Messmethoden können bereits durch das auflegen der Messsonde an dem Ort der Untersuchung durch den verursachten Druck die Mikrozirkulation beeinflussen [23]. Auch sind die untersuchten Areale räumlich deutlich begrenzt (z.B. 1,55 x 1,16 mm im Rahmen einer Messung mittels der CytoCam-IDF, Braedius Medical, NL [13]) und erfassen damit nur einen kleinen Teil der Mikrozirkulation des untersuchten Organes. Entsprechend dieser kleinen untersuchten Areale müssen für die direkten Messungen stabile Messverhältnisse bestehen welche ein verrutschen der Messsonden verhindern. Messungen mittels des Dopplereffektes weisen zusätzlich eine hohe Winkelabhängigkeit auf. Insgesamt sind vor allem die letzten beiden Punkte ein Grund

für die deutliche Streuung der von uns erhobenen Messungen vor allem im Bereich des gastralen μ flow.

4.2. Ergebnisse

Melatonin zeigte im Rahmen des von uns zugrunde gelegten Versuchsaufbaus keinen Einfluss auf die erhobenen makro- und mikrozirkulatorischen Variablen unter physiologischen normovolämischen Bedingungen [1]. In den Untersuchungen von Vollmer et. al. wurde dies auch für eine systemische Melatonin Applikation gezeigt [9]. Unter hämorrhagischen Kreislaufbedingungen konnte die topische Gabe von Melatonin jedoch einen positiven Einfluss auf die gastrale Mikrozirkulation im Sinne einer verbesserten mikrozirkulatorischen Oxygenierung (μHbO_2) im hämorrhagischen Schock zeigen. In der Kontrollgruppe verblieb der μHbO_2 Wert während des Schockzustandes erniedrigt. Die Melatoninapplikation konnte eine bessere Erholung des gastralen μHbO_2 Wertes während der Häorrhagie im Vergleich zum Schockzustand vor Gabe des Melatonins zeigen. In einer früheren Studie konnten wir zeigen, dass eine Verbesserung der gastralen μHbO_2 durch eine Vorbehandlung mit Nitroglycerin vor einem hämorrhagischen Schock mit einer Verringerung der schockbedingten Schädigung der Magenschleimhautbarriere einherging [15]. In dieser Studie wurde die regionale Oxygenierung der Schleimhaut verbessert, die regionale Durchblutung blieb jedoch unverändert. Eine verbesserte Perfusion (μ flow) ist nicht zwingend mit einer verbesserten lokalen Sauerstoffbilanz (vermehrte lokale Sauerstoffversorgung bzw. einem verminderten lokalen Sauerstoffbedarf) assoziiert. Es konnten sowohl für eine verbesserte Perfusion, im Rahmen einer systemischen Melatoningabe [9], als auch für eine verbesserte mikrozirkulatorische Oxygenierung, im Rahmen einer lokalen Nitro- und Iloprost-Behandlung [15], ein positiver Einfluss auf die mukosale Barrierefunktion beobachtet werden. Die mikrozirkulatorische Oxygenierung hatte in klinischen Untersuchung zusätzlich relevante positive Assoziationen, z.B. eine verbesserte Heilung von enteralen Anastomosen, gezeigt [24].

Der isolierte Einfluss von Melatonin auf die mikrozirkulatorische Oxygenierung, welcher im Rahmen dieser Arbeit gezeigt wurde, steht im Gegensatz zu anderen Studien, die eine Verbesserung der Leber- und Magendurchblutung nach Vorbehandlung mit Melatonin bei Ratten [25, 26] und Hunden [9] unter gleichen Kreislaufbedingungen gezeigt hatten. In allen drei aufgeführten Untersuchungen erfolgte eine systemische intravenöse Gabe von Melatonin. In zwei der drei Untersuchungen erfolgte die systemische Melatoninapplikation vor Induktion der Häorrhagie [9, 25], in der dritten

Untersuchung erfolgte die systemische Gabe erst nach Aufhebung der Hämorrhagie [26]. Im Gegensatz zu diesen Untersuchungen wurde im Rahmen dieser Arbeit jedoch eine lokale Behandlung mit Melatonin während der bestehenden Hämorrhagie untersucht. Wie bereits erwähnt wird die Mikrozirkulation auf verschiedenen Ebenen reguliert. Einen großen Einfluss auf die enterale Durchblutung haben die mesenterialen Arteriolen [27]. Eine sympathikusvermittelte Gegenregulation zum akuten Blutverlust ist eine Vasokonstriktion im Abschnitt dieser Arteriolen, welche der mukosalen enteralen Mikrozirkulation vorgeschaltet ist. Eine potenzielle Melatonin-vermittelte Vasodilatation im Kapillarnetz könnte durch eine Vasokonstriktion dieser vorgeschalteten Arteriolen abgeschwächt werden. Da weder die systemische Sauerstoffzufuhr noch die lokale Magendurchblutung durch topische Gabe von Melatonin verbessert wurden, scheint die erhöhte mikrozirkulatorische Oxygenierung nicht auf eine verbesserte lokale Sauerstoffversorgung zurückzuführen zu sein. Ursächlich für die gesteigerte gastrale μHbO_2 könnten somit ein reduzierter Sauerstoffbedarf, ein vermehrter präkapillärer Shunt oder eine reduzierte Aufnahme von Sauerstoff aus dem Blut sein. Letztendlich sind die negativen Ursachen (Shunt, Extraktionsdefizit) nicht sicher auszuschließen. Beide genannten Ursachen würden in eine lokale anaerobe Glycolyse münden. Da im Rahmen dieser Studie die Laktatspiegel im postkapillären Blut, bzw. im portalvenösen Blut, nicht erfasst wurden, können diese Phänomene aktuell nicht ausgeschlossen werden. Die bekannten protektiven Effekte von Melatonin während kompromittierter Kreislaufverhältnisse (Quelle 27, 28) lassen dies allerdings eher unwahrscheinlich erscheinen [28, 29]. Darüber hinaus führte die Behandlung hypothermer Ratten zu einer Verschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve des Hämoglobins nach rechts. Das kann sogar eine verbesserte Sauerstoffabgabe im peripheren Gewebe bewirken [30].

Melatonin verbessert die mitochondriale Atmung unter pathologischen Bedingungen wie einem hämorrhagischen Schock, indem es die durch oxidativen Stress ausgelöste mitochondriale Schädigung hemmt [31]. Zusätzlich erhöht Melatonin die Aktivität der mitochondrialen Komplexe I und IV von Gehirn und Leber, den beiden bisher einzig untersuchten Geweben [32]. Diese Modulation der mitochondrialen Funktion könnte daher für den in der vorliegenden Studie beobachteten erhöhten postkapillären μHbO_2 -Wert mitverantwortlich sein und lässt den oben genannten Einfluss von negativen Effekten ebenfalls weiter unwahrscheinlich erscheinen.

Die basalen Melatonin-Plasmakonzentrationen lagen im Rahmen publizierter Plasmaspiegel bei unterschiedlichen Spezies [9, 33-35]. Die lokale Melatonin-

Applikation führte zu einem ausgeprägten Anstieg der Plasmaspiegel (Abbildung 3). Die 25 Minuten nach lokaler Applikation gemessenen Melatonin-Plasmaspiegel entsprechen ca. 30 bis 50% der Plasmakonzentrationen nach systemischer Melatoninapplikation [9].

Ob die beobachteten Auswirkungen auf den μHbO_2 -Wert im Magen durch lokale oder systemische Wirkungen von Melatonin vermittelt werden verbleibt unklar. Erwähnenswert ist, dass die topische Melatonin-Applikation innerhalb von nur wenigen Minuten zu einer Modulation des μHbO_2 im Magen führte. Eine direkte Wirkung auf die lokale Mikrozirkulation der Schleimhaut scheint damit plausibel. Ob die hier beobachteten Effekte von Melatonin allerdings überwiegend auf den antioxidativen Wirkungen von Melatonin beruhen oder über ihre Wirkung Rezeptor-vermittelt ausüben, bleibt unklar.

Der Einfluss von Melatonin auf die mucosale Mikrozirkulation konnte im Rahmen dieser Studie nur an der Magenschleimhaut jedoch nicht an der oralen Schleimhaut nachgewiesen werden. Frühere Untersuchungen mit einem sehr ähnlichem Versuchsaufbau hatten bereits ähnlich divergierende Reaktionen von gastraler und oraler Schleimhaut auf eine Behandlung mit vasoaktiven Substanzen gezeigt [15, 36]. Da unter der gewählten Sevofluran Anästhesie die enterale Motilität deutlich vermindert ist [37], kann von einer längeren lokalen Wirkzeit und einer höheren lokalen Konzentration von Melatonin bzw. von lokal gastral applizierten Substanzen im Vergleich zur oralen Applikation ausgegangen werden. Eine als Bolus applizierte Lösung verbleibt insgesamt eher lokal im Magen. Im Gegensatz dazu handelt es sich bei der oralen Schleimhaut um ein eher offenes System mit kürzerer Verweildauer der Agenzien am Wirkungsort. Auch kann die unterschiedliche histologische Struktur von oraler und gastraler Schleimhaut ein Faktor für die unterschiedliche Aufnahme und Wirkung der lokalen Melatonin Gabe sein.

4.3. Klinische Relevanz

Die bereits erwähnte Voruntersuchung [9] unserer Arbeitsgruppen hatte einen „präventiven“ Aspekt einer systemischen Gabe von Melatonin unter identischen Kreislaufbedingungen gezeigt. Nun sind klinisch relevante Schockzustände keine erwartbar auftretenden Situationen, sondern treten akut auf und sind weiterhin mit einer hohen Letalität (z.B. bis 24% für den septischen Schock [10]) verbunden. Eine präemptive Gabe von Melatonin erscheint daher im klinischen Alltag nicht praktikabel.

Eine weitere Reduktion der Mortalität von Patienten in Schock-Zuständen ist jedoch weiterhin klinisch von hoher Relevanz.

Die vorliegende Studie zeigt divergente Ergebnisse an der oralen und gastraln Mukosa. Bereits in früheren Untersuchungen konnten wir ein unterschiedliches Reaktionsmuster der gastraln und oralen Schleimhaut auf topische Therapien mit vasoaktiven Substanzen im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks zeigen [9, 15, 36]. Eine grundsätzliche Übertragbarkeit von Messungen der oralen Mukosa auf weiter aboral gelegene Abschnitte des Gastrointestinaltraktes ist daher nicht ohne weiteres möglich. Die Fokussierung auf die leicht zugängliche orale Mikrozirkulation im Rahmen von klinischen Messungen am Patientenbett bildet damit nur einen kleinen Teil der gesamten Mikrozirkulation im Menschen ab. Trotzdem konnten zahlreiche Studien insbesondere mit Messung der oralen Mikrozirkulation [38-41] zeigen, dass prinzipiell die Beachtung der Mikrozirkulation kritisch kranker Patienten eine wertvolle Ergänzung der klinischen Diagnostik sein kann. Die Beurteilung der enteralen Mikrozirkulation im klinischen Setting verbleibt weiterhin aufwändig, ist aber möglicherweise von erheblicher klinischer Relevanz.

Im Rahmen dieser Arbeit war es möglich, den Effekt einer lokalen Melatonin Applikation bei bereits bestehenden hypovolämen Kreislaufbedingungen (im Sinne eines hämorrhagischen Schockes) zu zeigen. Studien an Schweinen und Ratten hatten bereits positive Effekte von Melatonin Gaben während einer Reanimation auf das anschließende Überleben gezeigt [42, 43], so dass bereits Hinweise auf eine akute und damit auch durchaus als therapeutisch anzusehende Wirkung von Melatonin bestehen. In den beiden zitierten Untersuchungen wurden jedoch keine mikrozirkulatorischen Parameter beleuchtet bzw. untersucht. Hinweise auf einen klinisch positiven Effekt von Melatonin auf die Mikrozirkulation können jedoch anhand von einer erhöhten Urinausscheidung in Melatonin-behandelten Schweinen nach Reanimation [44] postuliert werden, da diese möglicherweise auf eine verbesserte renale Mikrozirkulation zurückgeführt werden können. Unsere Studie zeigte nun, dass eine lokale Gabe von Melatonin die Mikrozirkulation der gastraln Schleimhaut im Schock verbessert. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit dem bereits festgestellten präventiven Effekt von Melatonin [9, 25, 45] sowie den durchgeführten „therapeutischen“ Untersuchungen [46, 47]. Melatonin ist für die Anwendung im Menschen bereits zur kurzzeitigen Behandlung einer primären, durch schlechte Schlafqualität gekennzeichneten Insomnie zugelassen. Es steht in oraler Form bereits in Tabletten bis 5 mg zur Verfügung wobei die maximale

Dosis in der pharmazeutischen Literatur bis 10 mg am Tag angegeben wird. In den von uns untersuchten Versuchstieren entsprachen die gegebenen Melatoninmengen ca. 100 µg/kg KG. Auf einen ca. 80 kg schweren Menschen entspräche dies einer Einnahme von 8 mg Melatonin was unter der empfohlenen maximalen Tagesdosis von 10 mg liegt. Da in unseren Untersuchungen der Effekt bereits unter der niedrigen Dosis von 0,3 mg Melatonin beobachtet werden konnte erscheint eine Überschreitung der empfohlenen Tageshöchstdosis im Rahmen einer eventuellen Untersuchung am Patienten unnötig.

Diese Arbeit zeigt im Einklang mit bereits vorbestehenden Untersuchungen den positiven Effekt von Melatonin auf die Mikrozirkulation. Auf Grund des gewählten Versuchsaufbaus war ein klinischer positiver Effekt auf einzelne Organsysteme (Leber, Niere, Pankreas, usw.) im Rahmen dieser Studie nicht zu untersuchen. Der Effekt auf einzelne Organsysteme (Leber, Pankreas) wurde jedoch bereits bewiesen oder kann postuliert (Niere) werden.

Seit der Entdeckung und Benennung des Melatonins vor mehr als 60 Jahren konnten viele Studien, inklusiver dieser Arbeit, verschiedene protektive Effekte von Melatonin im menschlichen Organismus nachweisen. Sein *Image* als „Schlafhormon“ hat Melatonin in den letzten Jahrzehnten zunehmend ablegt und wandelt sich immer mehr zu einem potenten Mediator von organoprotektiven Wirkungen. In diesem Zusammenhang rücken auch die Beobachtung und Beeinflussung der Mikrozirkulation im menschlichen Organismus immer mehr in den Fokus des wissenschaftlichen und klinischen Interesses. Diese Arbeit zeigt erneut, dass Melatonin die Mikrozirkulation positiv beeinflusst. Weitere Untersuchungen über welchen Mechanismus Melatonin diese positive Wirkung entfaltet sowie ob Melatonin im Rahmen einer klinischen Studie einzusetzen wäre, sollten in den Fokus des wissenschaftlichen Interesses gerückt werden.

5. Quellen

1. Truse, R., et al., *Topical Melatonin Improves Gastric Microcirculatory Oxygenation During Hemorrhagic Shock in Dogs but Does Not Alter Barrier Integrity of Caco-2 Monolayers*. Front Med (Lausanne), 2020. **7**: p. 510.
2. Amaral, F.G.d. and J. Cipolla-Neto, *A brief review about melatonin, a pineal hormone*. Archives of Endocrinology and Metabolism, 2018. **62**: p. 472-479.
3. Chen, C.Q., et al., *Distribution, function and physiological role of melatonin in the lower gut*. World J Gastroenterol, 2011. **17**(34): p. 3888-98.
4. *NEUROtiker*, Public domain, via Wikimedia Commons.
5. Hardeland, R., *Antioxidative protection by melatonin: multiplicity of mechanisms from radical detoxification to radical avoidance*. Endocrine, 2005. **27**(2): p. 119-30.
6. Emet, M., et al., *A Review of Melatonin, Its Receptors and Drugs*. Eurasian J Med, 2016. **48**(2): p. 135-41.
7. Vella, F., et al., *NRH:quinone reductase 2: an enzyme of surprises and mysteries*. Biochem Pharmacol, 2005. **71**(1-2): p. 1-12.
8. Brzozowski, T., et al., *Importance of the pineal gland, endogenous prostaglandins and sensory nerves in the gastroprotective actions of central and peripheral melatonin against stress-induced damage*. J Pineal Res, 2005. **39**(4): p. 375-85.
9. 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).
10. Standl, T., et al., *The Nomenclature, Definition and Distinction of Types of Shock*. Dtsch Arztebl Int, 2018. **115**(45): p. 757-768.
11. Slaughter, A.L., et al., *The Metabolopathy of Tissue Injury, Hemorrhagic Shock, and Resuscitation in a Rat Model*. Shock, 2018. **49**(5): p. 580-590.
12. Karamercan, M.A., et al., *Can peripheral blood mononuclear cells be used as a proxy for mitochondrial dysfunction in vital organs during hemorrhagic shock and resuscitation?* Shock, 2013. **40**(6): p. 476-84.
13. Charlton, M., et al., *The microcirculation and its measurement in sepsis*. J Intensive Care Soc, 2017. **18**(3): p. 221-227.
14. 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.
15. 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.
16. van Leersum, E.C., *Eine Methode zur Erleichterung der Blutdruckmessung bei Tieren*. Pflüger's Archiv für die gesamte Physiologie des Menschen und der Tiere, 1911. **142**(7): p. 377-395.
17. Krug, A., *Mikrozirkulation und Sauerstoff-versorgung des Gewebes, Methode des so genannten O2C (oxygen to see)*. Phlebologie, 2007. **36**: p. 300-312.
18. Hoff, D.A.L., H. Gregersen, and J. Hatlebakk, *Mucosal blood flow measurements using laser Doppler perfusion monitoring*. World journal of gastroenterology : WJG, 2009. **15**: p. 198-203.
19. Hammel, H.T., C.H. Wyndham, and J.D. Hardy, *Heat Production and Heat Loss in the Dog at 8–36°C Environmental Temperature*. American Journal of Physiology-Legacy Content, 1958. **194**(1): p. 99-108.
20. Wolfgang von Engelhardt, G.B., Martin Diener, Gotthold Gäbel *Physiologie der Haustiere*. 2009. 244-245.

21. Schwartges, I., et al., *Hypercapnia induces a concentration-dependent increase in gastric mucosal oxygenation in dogs*. Intensive Care Med, 2008. **34**(10): p. 1898-906.
22. 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.
23. Cerny, V., Z. Turek, and R. Parizkova, *Orthogonal polarization spectral imaging*. Physiol Res, 2007. **56**(2): p. 141-147.
24. Sheridan, W.G., R.H. Lowndes, and H.L. Young, *Tissue oxygen tension as a predictor of colonic anastomotic healing*. Dis Colon Rectum, 1987. **30**(11): p. 867-71.
25. Mathes, A.M., et al., *Melatonin pretreatment improves liver function and hepatic perfusion after hemorrhagic shock*. Shock, 2008. **29**(1): p. 112-8.
26. Mathes, A.M., et al., *Melatonin receptors mediate improvements of liver function but not of hepatic perfusion and integrity after hemorrhagic shock in rats*. Crit Care Med, 2008. **36**(1): p. 24-9.
27. Shah, V., et al., *Nitric oxide in gastrointestinal health and disease*. Gastroenterology, 2004. **126**(3): p. 903-13.
28. Rodriguez-Reynoso, S., et al., *Effect of exogenous melatonin on hepatic energetic status during ischemia/reperfusion: possible role of tumor necrosis factor- α and nitric oxide*. J Surg Res, 2001. **100**(2): p. 141-9.
29. Wu, J.Y., et al., *Therapeutic effects of melatonin on peritonitis-induced septic shock with multiple organ dysfunction syndrome in rats*. J Pineal Res, 2008. **45**(1): p. 106-16.
30. Hlutkin, S. and V. Zinchuk, *Effect of melatonin on the blood oxygen transport during hypothermia and rewarming in rats*. Adv Med Sci, 2008. **53**(2): p. 234-9.
31. Reiter, R.J., et al., *Melatonin reduces oxidant damage and promotes mitochondrial respiration: implications for aging*. Ann N Y Acad Sci, 2002. **959**: p. 238-50.
32. Martin, M., et al., *Melatonin but not vitamins C and E maintains glutathione homeostasis in t-butyl hydroperoxide-induced mitochondrial oxidative stress*. FASEB J, 2000. **14**(12): p. 1677-9.
33. Wehr, T.A., D. Aeschbach, and W.C. Duncan, Jr., *Evidence for a biological dawn and dusk in the human circadian timing system*. J Physiol, 2001. **535**(Pt 3): p. 937-51.
34. Chuffa, L.G., et al., *Melatonin reduces LH, 17 beta-estradiol and induces differential regulation of sex steroid receptors in reproductive tissues during rat ovulation*. Reprod Biol Endocrinol, 2011. **9**: p. 108.
35. Lazado, C.C., et al., *Daily rhythmicity of clock gene transcripts in atlantic cod fast skeletal muscle*. PLoS One, 2014. **9**(6): p. e99172.
36. Truse, R., et al., *Local gastric RAAS inhibition improves gastric microvascular perfusion in dogs*. J Endocrinol, 2019. **241**(3): p. 235-247.
37. Boscan, P., et al., *Effect of prolonged general anesthesia with sevoflurane and laparoscopic surgery on gastric and small bowel propulsive motility and pH in dogs*. Vet Anaesth Analg, 2014. **41**(1): p. 73-81.
38. Voss, F., et al., *Sublingual Microcirculation predicts Survival after Out-of-Hospital Cardiac Arrest*. Microcirculation, 2021: p. e12729.
39. De Backer, D., J.A. Ortiz, and D. Salgado, *Coupling microcirculation to systemic hemodynamics*. Curr Opin Crit Care, 2010. **16**(3): p. 250-4.
40. Yeh, Y.C., et al., *Correlation between early sublingual small vessel density and late blood lactate level in critically ill surgical patients*. J Surg Res, 2013. **180**(2): p. 317-21.
41. Pan, P., et al., *Role of Combining Peripheral with Sublingual Perfusion on Evaluating Microcirculation and Predicting Prognosis in Patients with Septic Shock*. Chin Med J (Engl), 2018. **131**(10): p. 1158-1166.

42. Klein, A.H., et al., *Small-volume d-beta-hydroxybutyrate solution infusion increases survivability of lethal hemorrhagic shock in rats*. Shock, 2010. **34**(6): p. 565-72.
43. Mulier, K.E., et al., *Treatment with beta-hydroxybutyrate and melatonin is associated with improved survival in a porcine model of hemorrhagic shock*. Resuscitation, 2012. **83**(2): p. 253-8.
44. Wolf, A., et al., *Safety of D-ss-Hydroxybutyrate and Melatonin for the Treatment of Hemorrhagic Shock With Polytrauma*. Shock, 2015. **44 Suppl 1**: p. 79-89.
45. Li, J.Y., et al., *Melatonin protects liver from intestine ischemia reperfusion injury in rats*. World J Gastroenterol, 2008. **14**(48): p. 7392-6.
46. Karbownik, M., et al., *Melatonin reduces rat hepatic macromolecular damage due to oxidative stress caused by delta-aminolevulinic acid*. Biochim Biophys Acta, 2000. **1523**(2-3): p. 140-6.
47. Sewerynek, E., et al., *Lipopolysaccharide-induced hepatotoxicity is inhibited by the antioxidant melatonin*. Eur J Pharmacol, 1995. **293**(4): p. 327-34.