

AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK UND POLIKLINIK DER UNIVERSITÄT  
WÜRZBURG  
DIREKTOR: PROFESSOR DR. MED. A. THIEDE

---

**KAPILLARISIERUNG UND NO-REFLOW-PHÄNOMEN AM  
SKELETTMUSKEL DES GÖTTINGER MINIATURSCHWEINS**

Inaugural- Dissertation  
zur Erlangung der  
Doktorwürde der Medizinischen Fakultät  
der  
Bayerischen Julius- Maximilians- Universität  
zu Würzburg

vorgelegt von

**Matthias Weber**  
aus Höchberg

Würzburg, Juni 2002

Referent                    Professor Dr. med. H. A. Henrich

Korreferent                Professor Dr. med. O. Elert

Dekan:                      Professor Dr. med V. ter Meulen

Tag der mündlichen Prüfung: 11.12.2002

Der Promovend ist Arzt.

Meiner Frau Birthe und unserem Sohn Tizian

# Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Definition und Vorkommen des No-Reflow-Phänomens.....	1
1.2	Pathophysiologische Mechanismen.....	2
1.2.1	Leukozyten .....	5
1.2.2	Radikale.....	8
1.2.3	Endothel und Vasoregulation.....	12
1.2.4	Kapilläre Mikrozirkulation .....	17
1.2.5	Mikrothromben und intravasale Gerinnung.....	19
1.2.6	Muskelfunktion und -pathologie .....	20
1.2.7	Systemische Ursachen und Folgen .....	22
1.2.8	Zusammenfassung der Pathophysiologie des NoRe .....	24
1.3	Einflussfaktoren auf das Kapillarsystem .....	24
1.3.1	Hypertonie als Modell der Kapillarbettrarefikation.....	25
1.3.2	Chronische Ischämie als Modell einer Hyperkapillarisation.....	27
2	MATERIAL UND METHODIK .....	31
2.1	Versuchsreihen .....	31
2.1.1	Anästhesie, Versuchsvorbereitung und Nachbehandlung .....	33
2.1.2	Voroperationen .....	34
2.1.2.1	Stenosierung der linken Nierenarterien (Gruppe B und D) ..	35
2.1.2.2	Stenosierung der A. femoralis (Gruppe C) .....	36
2.1.3	Akute Ischämie und Reperfusion.....	36
2.1.3.1	Eröffnung des Bauchraumes und retroperitonealer Zugang	37
2.1.3.2	Gefäßpräparation .....	37
2.1.3.3	Messung der lokalen Hämodynamik.....	38
2.1.3.4	Experimentelle Ischämie.....	38
2.1.3.5	Reperfusionsexperimente.....	39
2.2	Histologie .....	40
2.2.1	Biopsieentnahme .....	40
2.2.2	Histologische Aufarbeitung .....	41
2.2.3	Lichtmikroskopische Arbeitsweise .....	44
2.3	Andere Methoden .....	53
2.4	Materialien .....	53
2.5	Statistische Bearbeitung .....	55
3	ERGEBNISSE .....	56
3.1	Kapillarzahlen .....	56
3.2	Histopathologie .....	60
3.2.1	Präparatequalität .....	61
3.2.2	Histologische Begutachtung .....	61
3.2.3	Korrelierende Betrachtung.....	66
4	DISKUSSION .....	70
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	81
5.1	Tabellenanhang .....	82
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	84

"Wenn ein Gewebe vom Blutfluss für eine bestimmte Zeit – das kann zwischen Minuten und Stunden liegen – ausgeschlossen ist, hängt dessen Überlebensfähigkeit von den funktionellen Eigenschaften der Parenchymzellen ab. Wenig Aufmerksamkeit wurde der Möglichkeit geschenkt, dass die Ischämie den Status des Blutes verändern oder die Blutgefäße verletzen könnte und somit die Rückkehr des Blutflusses beeinträchtigen könnte, mit irreversibler Schädigung des Parenchyms, die als sekundäre Veränderung auftritt.

Es gibt Beweise ... , dass frühe Veränderungen im ... Gefäßsystem eine Rolle in der Pathogenese des bleibenden ischämischen Schadens ... spielen könnten ... .Es wurde gezeigt, dass nach einer Ischämie, die eine gewisse Zeit überschreitet, und man dann den Blutfluss zurückkehren lässt, lokalisierte Bereiche ... in der Perfusion fehlschlagen. Es war sicher, dass sich Verlegungen des Blutflusses entwickelt haben ... . Die Dauer der Ischämie, die nötig war, die obstruktiven Gefäßveränderungen zu entwickeln, entsprach etwa genau der Minimaldauer, die auch den Tod ... verursachte.. . Das weist darauf hin, dass Gefäßveränderungen die Ursache für das überschreiten des Punktes ohne Rückkehr, und dass diese selbst die erste irreversible Veränderung darstellen. Es wäre also begründet, anzunehmen, dass das Gewebe noch lebensfähig wäre, wenn die Durchblutung ... im Ganzen zurückkäme – auch nach längerer Ischämie –, aber durch vaskuläre Schäden sind einige Bereiche nicht durchblutet und sterben letztlich."

Übersetzung der Erstbeschreibung des NoReflow-Phänomens, AMES (1968)

### 1 EINLEITUNG

#### 1.1 Definition und Vorkommen des No-Reflow-Phänomens

Nach ausreichend langer Ischämie und anschließender Reperfusion verschiedener Organe wird ein Phänomen beschrieben, das durch eine typische, teils irreversible Störung der Mikrozirkulation gekennzeichnet ist. In der Literatur wurde dieses Phänomen erstmals von AMES (1968) am Gehirn beschrieben; viele Autoren haben in der Folge ein ähnliches pathophysiologisches Reaktionsmuster für andere Organe gefunden. Für diese charakteristische Störung hat sich der Begriff des No-Reflow-Phänomens (NoRe) geprägt. Identisch wird der Begriff Reperfusionsversagen verwendet.

Das NoRe verhindert eine angemessene Wiederherstellung des Blutflusses und verlängert dadurch die Ischämie, verursacht aber per se keinen Gewebeeruntergang. Man spricht von Reflow-Paradox, weil erst die anschließende Reperfusion, bei längerer Persistenz des NoRe, einen zellulären Schaden nach sich zieht, den Reperfusionsschaden. Wesentlich ist die gleichzeitige Konstanz makrohämodynamischer Parameter.

Ischämie und Reperfusionsschäden treten in allen Bereichen der Medizin auf, überall dort, wo es zu einem vorübergehenden Stillstand des Blutflusses kommt. So wird es in der Gefäßchirurgie als gefürchtete Komplikation nach embolischem oder traumatischem Gefäßverschluss mit anschließender Rekanalisation, Angioplastie, Anastomosierung oder einer notwendigen Bypassoperation gefürchtet (ELERT 1988). Ferner kommt es nach Operationen an den großen Gefäßen, die dazu abgeklemmt werden müssen, zu entsprechend schwerwiegenden Folgeerscheinungen. Auch nach katheterinterventionellen, wie z. B. koronaren Eingriffen ist es möglich. In der Transplantationsmedizin kann das NoRe in allen zu ersetzenden Organen vorkommen, oft klinisch als Abstoßungsreaktion imponierend. In der plastischen Chirurgie tritt es bei nicht tolerierten muskulokutanen Lappenplastiken oder replantierten Amputaten auf.

Die Herzchirurgie sieht bei ACVB- Operationen das NoRe relativ häufig. Grundsätzlich kann es nach jeder Operation mit Perfusionsstopp oder langer Tourniquet- Ischämie auftreten. Nicht zuletzt kann das Kompartmentsyndrom mit einem NoRe einhergehen.

Als gemeinsamer pathophysiologischer Faktor könnte dem NoRe eine mikrozirkulatorischen Perfusionsstörung mit systemischen und lokalen Konsequenzen nach Wiederherstellung der makrozirkulatorischen Durchblutung im Anschluss an eine längere Unterbrechung der Blutversorgung zugrunde liegen (MENGER et al. 1997). IKEDA (1990) hält das NoRe für ein wichtiges Ereignis im Rahmen des post-ischämischen Schadens.

Die Wertigkeit der einzelnen Pathomechanismen, die das multifaktoriell verursachte NoRe auslösen, wird in der Literatur jedoch sehr unterschiedlich eingeschätzt.

### 1.2 Pathophysiologische Mechanismen

An den meisten Organen kann man, besonders am Skelettmuskel, nach einer länger dauernden Ischämie eine mehr oder weniger unvollständige Rückkehr des Blutflusses beobachten. So ist nach einer Ischämie in der Phase der Reperfusion in einigen Bereichen des Gefäßbetts ein Wiedereinsetzen des Blutflusses festzustellen, in anderen Arealen (ca. 30%) ist kein oder nur ein träger Zu- und Abfluss nachweisbar (SUVAL et al. 1987). In diesem Gebiet herrscht NoRe, bei minimal erhalttem Fluss sprechen viele Autoren auch von einer Low-Flow-Ischämie (RITTER/ MCDONAGH 1997). Man beobachtet im post-ischämischen Gefäßgebiet verschiedene charakteristische pathophysiologische und -morphologische Besonderheiten. Diese Veränderungen sind abhängig von der Ischämiedauer und individuellen Gegebenheiten des Gefäßsystems, worauf unter 1.3 eingegangen werden soll.

Die kritische Ischämiedauer für das Auftreten eines NoRe liegt je nach Organ bei mehreren Stunden. Der Skelettmuskel zeigt nach über 3- stündiger Ischämie Low-Flow, ein NoRe erst nach einer mindestens 4- 5 stündigen Ischämiezeit (QUINONES-BALDRICH et al. 1991; HARRIS et al. 1996). MENGER (1993) fand eine auf 30- 40% reduzierte Durchblutung nach 4 stündiger Ischämie, nach 24 Stunden Reperfusion war der Fluss auf immerhin 50% zurückgekehrt. Man kann also davon ausgehen, dass eine sechsstündige Ischämie, wie sie in dieser Studie gewählt worden ist, mit ausreichender Sicherheit zur Ausprägung eines messbaren NoRe führen sollte (Tabelle 1-1).

Ischämiezeiten	Reperusionsfolgen
< 2,5 Stunden	schneller Anstieg des Blutflusses und Hyperämie im gesamten Muskel
> 2,5 Stunden	verzögerter Flow in vielen Gewebsbezirken
> 3 Stunden	venöse Veränderungen mit Leukozytenadhäsion.
mit steigender Ischämiedauer	- wachsende NoRe- Areale, bis die Ausdehnung auf das ganze betroffene Gefäßgebiet erfolgt
	- regionale und fokale Vasospasmen
	- stehen der Blutsäule in distalen Abschnitten
	- Thrombenbildung mit Verschluss von kleinen Venen und Arterien, Thromozytenaggregate
	- Interstitielle Hämorrhagien
	- Mikronekrosen

Tabelle 1-1 Reperusionsbedingte Störungen nach SUVAL et al. (1987)

Zu beachten ist, dass mancherorts primär durchflossene Kapillaren in der späten Reperfusion (über 24 Stunden) nicht mehr perfundiert waren. Dieses Phänomen bezeichnet man als sekundäres kapilläres Perfusionsversagen (MENGER et al. 1993) und ist vom primären NoRe zu trennen.

Auch die Größe des vom NoRe betroffenen Areals sowie die Latenz bis zum Auftreten korreliert mit der Ischämiezeit (ENGLER et al. 1983, HARRIS et al. 1996, URBANIAK 1997).

Bei kurzen Ischämiezeiten oder günstigen Ausgangsbedingungen des Gefäßsystems können sich die Veränderungen (Volumenzunahme, Druckerhöhungen, Abnahme der funktionellen Kapillardichte, Kapillarstrukturveränderungen im Sinne von Kollaps oder Stenose; OKADA 1990) oft zurückbilden, bei Über-



schreiten einer bestimmten Ischämiedauer sind diese jedoch irreversibel (IKEDA 1990). Histopathologische Folge des NoRe ist dann mindestens eine ausgedehnte Nekrose des betroffenen Gewebes. Gleichzeitig mit diesem Reperfusionsschaden erhöht sich auch die Mortalität (SUVAL et al. 1987).

Kurz umrissen stellen sich die pathophysiologischen Vorgänge folgendermaßen dar (Tabelle 1-2):

Zeitpunkt	Pathologie
Ischämiebeginn	abruptes Absinken des Blutflusses, totaler Stopp 10 Min. nach Abklemmung.
1 Stunde	Leichte Abnahme des Gefäßdurchmessers.
1,5 Stunden	starke arterielle Vasokonstriktion mit komplettem Verschluss von kleinen Arterien und Arteriolen und Ansammlung von Blut im postkapillären venösen System.
3 Stunden	Endothelschwellung, Leukozytenakkumulation mit 'Rolling und Sticking'

Tabelle 1-2 Zeitliche Abfolge von ischämiebedingten Gefäßveränderungen nach SUVAL et al. 1987

Die ischämisch geschädigten Gefäßwände verlieren ihre Schutzfunktion. Plasmatische Flüssigkeit kann in Interstitium und Endothelzellen eindringen; sekundär kommt es zu Hämokonzentration, Endothelschwellung und interstitiellem Ödem, mit der Folge der Steigerung des hydraulischen Widerstands in der Mikrozirkulation. Im Bereich der Gewebsdefekte können Leukozyten eine Interaktion mit dem Endothel eingehen und werden aktiviert. Das zieht wiederum eine Reihe von pathologischen Mechanismen nach sich, die sich gegenseitig potenzieren und in einen Circulus vitiosus einmünden.

Zum einen werden von den aktivierten Granulozyten Arachidonsäuremetaboliten, Zytokine und proteolytische Enzyme ausgeschüttet, die direkt oder über die Bildung von Sauerstoffradikalen die Endothelzellen schädigen und darüberhinaus die Mikrozirkulation durch Permeabilitätsänderung und Endothelzellschwellung stören. Anschließend entstehen entzündliche Reaktionen. Die Endothelschwellung und Permeabilitätserhöhung mit Ödembildung in Myozyten

und Interstitium üben eine Kompression von außen auf die Gefäße aus und verengen die Mikrogefäßbahnen passiv. Eine Tonuserhöhung bis zur aktiven Vasokonstriktion der präkapillären Mikrogefäße würde zusätzlich den Strömungswiderstand steigern. Weiterhin ergeben sich rheologische Alterationen mit resultierender Minderdurchblutung der Muskelgewebes, wie von HENRICH (1983) beschrieben.

Die Ischämie ist primär nicht für den Gewebeschaden verantwortlich (BLEBEA et al. 1987), erst die pathophysiologischen Vorgänge im Lauf des Reflow führen zur Ausweitung der Nekrosegebiete bzw. zur Transplantatabstoßung (20- 30%, PEMBERTON et al. 1994) oder fehlenden Replantataakzeptanz (5-10%, PEMBERTON et al. 1994), dem Reperfusionsschaden (MENGER et al. 1992, 1993). In Gebieten, in denen das NoRe schnell rückläufig ist (proximale, arterielle Abschnitte; BLEBEA et al. 1987) treten bevorzugt Nekrosen auf (HICKEY et al. 1996).

### 1.2.1 Leukozyten

An wichtiger Stelle bei der Entwicklung eines NoRe und in der Folge des Reperfusionsschadens stehen die Leukozyten (MENGER et al. 1992, HARRIS et al. 1996). Sie akkumulieren bereits bei niedrigem Fluss (RITTER/MCDONAGH 1997) und haben im post-ischämischen Gewebe wohl eigentlich die Aufgabe, Schadstoffe zu eliminieren (SUVAL et al. 1987). Vor allem bei längeren Ischämien sollen sie aber für einen großen und irreversiblen Teil des Reperfusionsschadens verantwortlich sein (GO et al. 1988, am Herzen). Leukozyten können die Mikrozirkulation über verschiedene Wege stören.

Durch ihre Größe und geringere Verformbarkeit können Leukozyten die Kapillarstrecke des Gefäßbettes nur langsam passieren (REYNOLDS/ MCDONAGH 1989). Die Schwellung der Endothelien im Rahmen des NoRe verstärkt die physiologische Neigung zur Adhäsion am Endothel, was bis zur Verstopfung der Gefäßbahn (Plugging) gehen soll (QUINONES- BALDRICH et al. 1991). Im Rahmen der Ischämie werden die Adhäsionseigenschaften z. B. durch die Stase (REYNOLDS/

MCDONAGH 1989) und die Aktivierung (ENGLER et al. 1983, zytoplasmatische Viskositätserhöhung MAZZONI et al. 1995), sowie die Hypoxie (ischämieinduzierte Adenosinbildung aus Purin am Herzmuskel, BECKER et al. 1993) begünstigt. Die Adhäsivität ist hier auf etwa das 20-fache gesteigert (MENGER et al. 1992) und die Ablösung der einmal adhären Leukozyten ist durch die niedrige Fließgeschwindigkeit (Low-Flow) während der Reperfusion erschwert (REYNOLDS/MCDONAGH 1989).

Das Plugging stellt über die Verminderung der funktionellen Kapillarzahl und Inhomogenisierung der Kapillarperfusion primär ein rein mechanisches Hindernis dar (AMBROSIO/ TRITTO 1999). Man hält das Plugging jedoch nicht für einen entscheidenden Faktor in der Genese des NoRe (HARRIS et al. 1997), da die rein obturierenden Zellen in der Regel gar nicht aktiviert sind (HENRICH 1983, HAMMERSEN/ MESSMER 1989). Die Anzahl der dadurch verschlossenen Gefäße sind quantitativ aber nicht in der Lage alleine ein NoRe auszulösen (HENRICH 1983)

Alleine das Plugging der Leukozyten in den Mikrogefäßen ist wohl nur zu einem kleinen Teil für das NoRe verantwortlich. Die Interaktion von aktivierten Leukozyten mit dem Endothel wird von den meisten Autoren für einen sehr wichtigen Schritt in der mikrovaskulären Dysfunktion im Rahmen des NoRe gehalten (JEROME et al. 1994, KUROSE et al. 1994, HARRIS et al. 1996, PICKELMANN et al. 1997).

Die Leukozyten des post-ischämischen Gewebes zeigen verschiedene Stadien der Aktivierung mit jeweils speziellen pathophysiologischen Folgen.

Die erste Phase, das 'Rolling', ein langsames Rollen an der Gefäßwand ist die über L-Selectin der Leukozyten und endotheliales P-Selectin vermittelte Erstinteraktion (MENGER et al. 1992, KUROSE et al. 1994).

P- Selectin wird als Antwort auf Entzündungsreize wie Histamin, Thrombin oder H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> synthetisiert; im Gegensatz dazu ist L- Selectin immer präsent, seine Konzentration steigt im reperfundierten Gewebe (STOTLAND/ KERRIGAN 1997) bis es nach Aktivierung der Leukozyten verschwindet (MENGER et al. 1992, KUROSE et al. 1994). In der Ischämiephase wird E-Selektin vermehrt exprimiert, später sinkt sein Gehalt wieder. Die Blockade dieser Selektine kann den Reperfusionsschaden vermindern (STOTLAND/ KERRIGAN 1997). Die Rollingfraktion der Leukozyten steigt mit der Ischämiedauer und im Laufe der Reperfusion an (MENGER et al. 1992, HARRIS et al. 1996).

Gleichermaßen steigt die Anzahl haftender Leukozyten (WEISS et al. 1989), da Adhäsionsrezeptoren aktiviert werden (MENGER et al. 1992). Molekularpathologisch wurde bereits nachgewiesen, dass die Adhäsion über die Glykoproteine CD18 und 11b (MAC-1,  $\beta_2$ - Integrine) der Leukozytenmembran und das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) am Endothel geschieht (PICKELMANN et al. 1997, LEY/ HUO 2001). Die Mitbeteiligung eines nachgewiesenen Vascular cell adhesion molecule1 (VCAM-1) konnte im Zusammenhang mit atheroskleroti-

schen Läsionen gezeigt werden (LEY/ HUO 2001). ZAMBONI et al. (1997) konnten die Adhäsion von Leukozyten am Endothel durch Blockierung des CD18-Rezeptors durch Antikörper signifikant reduzieren. Die in diesem Versuch gleichzeitig verminderte arterioläre Vasokonstriktion zeigt die Beteiligung von CD18 an der post-ischämischen Regulation des Gefäßtonus. Mechanische Alterationen an der Gefäßwand scheinen die Leukozyten-Endothel Interaktion zu verstärken (MENGER et al. 1992), Dextran kann die Interaktion stören (STEINBAUER et al. 1997). Die adhäsiven Leukozyten schütten nun Mediatoren und Zytokine ( $TNF\alpha$ , IL-1, IL-6, IFN  $\gamma$ ; TSAPENKO 1998), die vasokonstriktiven Leukotriene (B<sub>4</sub>), Thromboxane (A<sub>2</sub>) und Serotonin aus. Daneben werden direkt toxische Enzyme wie Kollagenase, Elastase und Kathalapsin G freigesetzt (JEROME et al. 1994).

Nach 'Margination' der Leukozyten, dem Verlassen des Kapillarlumens und Wanderung in das Interstitium, induzieren sie dort eine Entzündungsreaktion. Es werden weitere Leukozyten ange lockt und aktiviert, andere immunkompetente Zellen wie Mastzellen und Makrophagen werden involviert (WY SOCKI 1992). Als Folge der Entzündung wird die Barrierefunktion des Endothels gestört (KUROSE et al. 1994 -am Mesenterium, IKEDA et al. 1997 am Gehirn). Phalloidin, das die Margination der Leukozyten behindert, verbessert auch die Schutzfunktion der Endothelbarriere (HARRIS et al. 1997).

Trotz des wesentlichen Beitrags zum NoRe, ist die Beteiligung der Leukozyten keine hinreichende Bedingung für seine Auslösung. Bei Versuchen mit leukopenischen Filtern (QUINONES-BALDRICH et al. 1991) oder bei Patienten mit Neutropenie (JEROME et al. 1994) fällt das NoRe zwar wesentlich schwächer aus, tritt aber dennoch auf.

Ansatzpunkte zur therapeutischen Intervention finden sich zum einen in Substanzen, die Aktivierung und Akkumulation von Granulozyten vermindern. Es wurden Lipoxigenasehemmer, Prostaglandinsynthesehemmer wie Indometacin, PAF- Antagonisten, Leukotrienantagonisten (NOLTE et al. 1995, KIRSCHNER et al. 1997, STOTLAND/ KERRIGAN 1997, WANG et al. 2000), Prostacyclin und dessen Agonisten getestet. Hemmung der PG E<sub>2</sub>- und Thromboxan A<sub>2</sub>- Synthese durch Daflon<sup>®</sup> (Diosmin/ Hesperidin- Komplex) kann die Entzündung vermindern und den lymphatischen Abfluss steigern und so eine Ödembildung nachhaltig verhindern (LABRID 1994). Prostaglandin E<sub>1</sub> und der Prostaglandinagonist Iloprost vermag das NoRe nur zu vermindern, die Reperfusionsschäden aber weitgehend abzuhalten, PG E<sub>2</sub> dagegen beeinflusst die Wiederherstellung des Flusses besser als den Reperfusionsschaden (ROWLANDS et al. 1999). Weiterhin besteht die Möglichkeit durch direkte Filtration, Hemmung der Leukozyten mit Antikörpern (BECKER et al. 1993) sowie auch an den Adhäsionsmolekülen selbst (NOLTE et al. 1995) einzugreifen.

1.2.2 Radikale

Außer im Skellettmuskel haben Autoren in vielen anderen Organen (Pankreas, Gehirn, Darm, Herz, Niere) Radikale als Hauptverursacher des Reperfusionsschadens festgemacht (PERLER et al. 1990, AMBROSIO/ TRITTO 1999). Da ihnen eine so wesentliche Rolle in der Ischämie- Reperfusion- Pathophysiologie zukommt, sprechen manche Autoren sogar von einem 'Reoxygenierungsschaden'.

Freie Sauerstoffradikale werden durch verschiedene Enzyme der aktivierten Leukozyten, Monozyten und durch lokale Enzymsysteme des Gewebes gebildet. In Tabelle 1-3 sind Enzyme/ bzw. -systeme und die jeweils entstehenden Radikale aufgelistet.

Superoxidradikal $O_2^-$	mitochondriale Atmungskette, v. a. zu Beginn der Reperfusion mit Überangebot an Sauerstoff und erhöhter Stoffwechselleistung durch Katecholamine, Arachidonsäuren und Purine NADPH- Oxidase (Phagozyten) Xanthinoxidase des post-ischämischen mikrovaskulären Endothels Monoaminoxidase Cyclooxygenase, Lipoxigenase (Gefäßwand, Thrombozyten, Leukozyten)
Wasserstoffperoxid $H_2O_2$	Superoxiddismutase Xanthinoxidase NO- Synthetase
Hydroxylradikal OH	Cu, Fe und hämoproteinkatalysierte Bildung aus $O_2^-$ und $H_2O_2$
Hypochlorid $OCl^-$	Myeloperoxidase (Granulozyten, Monozyten, Muskelgewebe [SMITH et al. 1989b])
Stickoxid NO (auch leicht antioxidativ)	NO- Synthetase (Gefäßendothel, Phagozyten, glatte Gefäßmuskulatur, neuronales Gewebe)

Tabelle 1-3 Radikalentstehung (nach BECKER et al. 1993 -am Herzmuskel)

Bei Ischämie und Reperfusion erfolgt die Radikalbildung als sog. 'oxidative burst'- Reaktion: Zu Beginn entsteht Superoxid, daraus  $H_2O_2$  und  $OH^-$  und  $HOCl^-$  (BECKER et al. 1993, PERLER et al. 1990). Wenn erst einmal  $O_2^-$  Radikale entstanden sind, folgt eine Kette von Reaktionen in Anwesenheit von Eisen, aus der die weitere Spaltung von Wasser zu Sauerstoffradikalen und  $OH^-$  resultiert. Die Xanthinoxidase gilt im Herzmuskel als eines der wichtigsten an der Radikalbildung beteiligten Enzyme. Sie steht im Gleichgewicht mit der Xanthindehydrogenase und wird im Rahmen einer Ischämie vermehrt gebildet (PERLER et al. 1990). Diese Reaktion ließ sich im Skelettmuskel bisher nicht nachweisen, möglicherweise liegt hierin der Grund für dessen höhere Ischämietoleranz (SUVAL et al. 1987, LEE/ LINEAWEAVER 1996). Trotzdem spielt die Xanthinoxidase auch im Skelettmuskel eine große Rolle (MENGER et al. 1992).

Ein seltener erwähnter Mechanismus der Radikalentstehung ist der mitochondriale Integritätsverlust mit Störungen des Elektronentransports und Bildung von  $H_2O_2$  (PERLER et al. 1990).

Radikale und entsprechende Enzyme wurden schnell aufgrund ihrer markanten Konzentrationserhöhung für die klinische Verlaufskontrolle von Ischämie-Reperfusionssituationen entdeckt. YOKOYAMA et al. (1995) zeigten nach vaskulären Rekonstruktionen traumatisch bedingter Ischämien und bei Lappentransplantationen regelmäßig Superoxidanstiege als Zeichen einer erfolgreichen Reperfusion und ein Absinken der Konzentration bei vaskulärer Insuffizienz.

Aussagen über das Ausmaß des oxidativen Stresses lassen sich auch indirekt über einen Anstieg der Myeloperoxidase (SMITH et al. 1989b, KUPINSKI et al. 1997), die Konzentration an reduziertem Glutathion (APPELL et al. 1997), aber auch über Reaktionsprodukte wie Malondialdehyd oder Lipidhydroperoxide (JEROME et al. 1994, HUK et al. 1995, KEUPP in Vorbereitung) machen. Zur quantitativen Bestimmung des Muskelschadens bei Ischämie-Reperfusionsexperimenten wird Triphenyltetrazoliumchlorid als Oxidations-/ Reduktionsindikator benutzt (BLEBEA et al. 1987).

Die körpereigenen Schutzmechanismen durch Enzymsysteme (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase, Peroxidation-hemmendes-Protein) und Antioxidanzien (Tocopherol,  $\beta$ - Carotin, Ascorbinsäure, Coeruloplasmin, Transferrin, Katecholamine, Methionin, Harnsäure, reduziertes Glutathion, N-Acetylcystein und andere SH- Verbindungen) werden schnell erschöpft. Der Harnsäurespiegel wird durch die Steigerung der Xanthinoxidaseaktivität zusätzlich gesenkt (BECKER et al. 1993).

Auch NO hat neben anderen sehr günstigen Eigenschaften ein mäßiges antioxidatives Potential (BECKER et al. 1993), NO-Mangel führt über die NO-Synthetase zu erhöhter Superoxidkonzentration. Somit kann man durch NO-Synthetasehemmung den Reperfusionsschaden verschlimmern

(PANNEN et al. 1998), durch Applikation des NO-Vorläufers L-Arginin lässt sich, evtl. über die Behinderung der Leukozyten- Endothel- Interaktionen (verminderte Adhäsionsmolekülexpression; ENGELMANN et al. 1995) eine Minderung der Radikalmenge erzielen (ENGELMANN et al. 1995, HUK et al. 1997). Die Wirksamkeit von Desferoxamin und Apotransferrin 1 erklärt sich durch die oben genannte Beteiligung von Eisen in der Reaktionskette der Radikalentstehung (SMITH et al. 1989a).

Radikale bewirken Schmerzempfindungen, Lipidperoxidation mit Schädigung der Zellmembran, Hyaluronsäureabbau und intrazelluläre Kollagenerniedrigung mit Verlust der Zellintegrität (WEISS et al. 1989) bis zur Gewebszerstörung (PERLER et al. 1990, MENGER et al. 1992, VAN DER LAAN et al. 1997).

Es kommt durch die Endothelschädigung zur gesteigerten Gefäßpermeabilität, die eine Proteinextravasation und damit ein Ödem verursacht.

Zusätzlich zur chemotaktischen Anlockung und Aktivierung von Immunzellen (WEISS et al. 1989, YOKOTA et al. 1989, PERLER et al. 1990, BECKER et al. 1993, HILLIER et al. 1994b) fördert die verletzte Kapillarwand die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten. Radikale führen weiterhin zur Up-Regulation der Adhäsionsmoleküle.

Die Leukozytenaktivierung geschieht oxidantien- induziert über Bildung und Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen wie Zytokinen, Leukotrienen und Platelet-Aktivations-Faktor (PAF) (MENGER et al. 1992, KORTHUIS/GRANGER 1993, GONZALES et al. 1994, JEROME et al. 1994).

Direkt und über die Beeinflussung von Enzymen und -systemen wirken Radikale auf die Gefäßmuskulatur. Es überwiegt dabei die Vasokonstriktion, die zu einer weiteren Perfusionsminderung führt.

Superoxidanionen sind starke Vasokonstriktoren (HASHIMOTO et al. 1991), die Inaktivierung von NO durch  $O_2^-$  vermindert gleichfalls die Gefäßdilatation.

Es seien weitere Radikalwirkungen erwähnt, die im NoRe eine Bedeutung haben. Die Oxidation von Enzymen kann diese hemmen, woraus je nach betroffenem Enzym eine entsprechende Störung resultiert, z. B. eine Energiendepletion durch Denaturierung der ATP-Bindungsstelle der  $Ca^{2+}$ -ATPase des sarkoplasmatischen Retikulums – deren Aktivität während der Ischämie sogar gesteigert ist (GREEN et al. 1997) – mit Funktionsstörung der Ca-Pumpe und anderer Transportsysteme und Beeinträchtigung der Muskelfunktion (BECKER et al. 1993, SUN et al. 1996).

Als Folge von Enzymstörungen kommt es zur Überladung der Zelle mit Calcium und Verletzung des Muskelgewebes (SUVAL et al. 1987, XU et al. 1997). Über Ca-Antagonisten lässt sich der intrazelluläre Ca-Konzentrationsanstieg jedoch nicht eindämmen (HEMPEL et al. 1999). Die intrakapillär erhöhte Calcium- Konzentration während der Ischämie, die am Reperfusionsschaden beteiligt zu sein scheint (IKEDA et al. 1997- am Gehirn), konnte mit Indometacin, Superoxiddismutase (IKEDA et al. 1997) und Ca-Antagonisten (MCDONAGH/ ROBERTS 1986, WU et al. 1997) gesenkt werden. Die Senkung des Calciumspiegels unterdrückt möglicherweise die Extravasation von Proteinen und Wasser. Durch Vergleichsstudien mit Nitroglycerin wurde gezeigt, dass die Wirkung der Calciumkanalblocker die der alleinigen Vasodilatation übertrifft (MCDONAGH/ ROBERTS

1986). Calciumkanalblocker können auch Muskelfunktionsstörungen durch Verhinderung der Radikalbildung (BECKER et al. 1993) graduell mildern (SUN et al. 1996).

Radikale bedingen über all diese sehr verschiedenen Mechanismen eine Störung der Kapillarperfusion (APELL et al. 1997) und haben insgesamt einen wesentlichen Anteil an der Entwicklung des Mikrogefäßschadens (MENGER et al. 1992).

Es wird sogar vermutet, dass das NoRe ein Schutzmechanismus des Organismus gegen die Freisetzung großer Mengen der aggressiven O<sub>2</sub>-Radikale im Initialstadium der Reperfusion ist (SUVAL et al. 1987).

Die radikalbedingten Gewebedefekte persistieren sehr lange. VAN DER LAAN et al. (1997) protokollieren einen Rückgang der Schmerzen und Permeabilitätssteigerung erst ca. 1 Woche nach Radikalinfusion, die Reparationsvorgänge waren nach 6 Wochen endlich abgeschlossen.

Untersuchungen von JEROME et al. (1994) zeigen, dass die anoxische Reperfusion von ischämischem Gewebe eine deutlich geringere Gewebszerstörung hinterlässt. Das beweist zum einen die zentrale Rolle des Sauerstoffs und seiner radikalen Spezies, zum anderen ist diese Tatsache zum Hauptangriffspunkt der therapeutischen Intervention geworden. Um die Schäden und Veränderungen durch Radikale zu vermindern wurden in Studien schon diverse Substanzen und -gruppen eingesetzt.

Zum einen sind das zum Teil schon genannte körpereigene Radikalfänger wie Superoxidismutase (PERLER et al. 1990, MENGER et al. 1992), Katalase, N-ACC (VAN DER LAAN et al. 1997) u. a., andererseits Radikalbildungshemmer wie die Xanthinoxidasehemmer (Allopurinol, Oxypurinol; PERLER et al. 1990, MENGER et al. 1992), Desferoxamin (Eisenbindung, s. o.) und Ca-Antagonisten (SUN et al. 1996). Allopurinol kann in hoher Dosierung Radikale auch abfangen (JEROME et al. 1994). Heparin wirkt wahrscheinlich über die körpereigene Freisetzung von Superoxidismutase (BECKER et al. 1994). Das VIP wirkt ebenfalls als Antioxidans (TUNCEL et al. 1997).

Neuere Substanzen wie Poly-Hb-Superoxidismutase-Katalase (D'AGNILLO et al. 1997), Lipidperoxidationsinhibitoren (21-Aminosteroide; KOROMPILIAS et al. 1997) und EPC-K1, ein Phosphatdiester von alpha-Tocopherol und Ascorbinsäure (HIROSE et al. 1997) konnten sehr positive Effekte erreichen. Die Vitamine A und E bringen auch einzeln angewandt Erfolge (LAGERWALL et



al. 1997). Vitamin E verhindert zudem die Ansammlung von Leukozyten (über verminderte Expression der Neutroadhäsionsproteine E-Selectin und ICAM1; FORMIGLI et al. 1997).

Weitere Ideen zielen auf die Stärkung antioxidativer Systeme (BECKER et al. 1993), z. B. von Stickoxid und Bradykinin (CHAHINE et al. 1992) durch ACE- Hemmung.

Organabhängig bestehen Wirkunterschiede der einzelnen Radikalantagonisten. Eine Rolle spielt auch der Zeitpunkt der Applikation der Radikalantagonisten. Untersuchungen von HICKEY et al. (1996) konnten keinen Effekt von unmittelbar post-ischämisch bzw. frühzeitig im Verlauf der Reperfusion verabreichten Allopurinol, Katalase/ Dismutase oder Desferoxamin feststellen.

### 1.2.3 Endothel und Vasoregulation

Störungen im Kapillar- oder Arteriolenbereich bedeuten den Verlust der Volumenregulationsfähigkeit (HAMMERSEN/ MESSMER 1989) mit perivaskulärer und endothelialer Schwellung und damit einer Kompression der kleineren Arteriolen oder Kapillaren und Einengung des kapillären durchflossenen Lumens (PAMPERTON et al. 1994). Es folgen Schädigungen der Intima und der Endothelzelle, die erst beim Reflow auftreten.

Die Gefäße sind zuerst vom NoRe betroffen (AMES et al. 1968), mosaikartig verteilt liegen über dem Ischämiebezirk pathologisch veränderte neben gesunden Arealen (HENRICH 1983, HAMMERSEN/ MESSMER 1989). Dieses Muster lässt vermuten, dass vorwiegend dort Endothel angegriffen wird, wo sich Leukozyten adhären (PAMPERTON et al. 1994).

Die morphologischen Endothelreaktionen sind gut untersucht. Elektronenmikroskopisch finden sich im Laufe der Reperfusion typische Veränderungen.

Schon in der frühen Phase scheint das Endothel der Mikrogefäße verdickt (SUVAL et al. 1987) und die Basalmembranen verbreitert (HAMMERSEN/ MESSMER 1989). MENDER/ MESSMER (1993) erklären dies durch das Versagen der Na-K- Pumpen mit konsekutiver Ionenverschiebung bei großem hypoxiebedingten Energieverlust. SUVAL et al. (1987) vermutet eine Einpressung von eiweißhaltigem Plasma, die einen Flüssigkeitsverlust in die Zellen und eine

konsekutive Hämokonzentration zur Folge hat. Dies trägt weiter zur verminderten Perfusion bei (MENGER/ MESSMER 1993). Die maximale Ausprägung der endothelialen Veränderungen sieht man kurz nach Beginn der Reperfusion, dabei korreliert das Ausmaß der Permeabilitätssteigerung wieder mit der Dauer der Ischämie (ab 3 Stunden Ischämie; SUVAL et al. 1987, HARRIS et al. 1996, KUPINSKI et al. 1997).

Die Endothelzellen schwellen vorwiegend im Bereich von Kapillaren und postkapillären Venulen an (ENGLER et al.1983 - am Herzen, SUVAL et al. 1987, HASHIMOTO et al. 1991, MENGER et al. 1992, URBANIAK et al. 1997). Typisch ist auch eine zunehmende intrazelluläre Blasenbildung (SUVAL et al. 1987) oder Vakuolisierung mit plasmaartigem Inhalt (HAMMERSEN/ MESSMER 1989), die eine lokale Ausstülpung der Endothelmembran bewirken. Als lokale Zellödeme bilden diese ein Strömungshindernis durch Vorbuckelung ins Gefäßlumen (HAMMERSEN/ MESSMER 1989). IKEDA (1990) beschreibt irreversible Endothelverdünnungen und Plasmalemmrisse - mit entsprechender Koagulationsneigung. HAMMERSEN/ MESSMER 1989 bemerkten, dass die endothelialen Veränderungen sich praktisch auf das luminale Plasmalemm beschränken.

Die oft versuchte Infusion von hyperosmolaren Lösungen (HAES, Mannitol, Dextran; HASHIMOTO et al. 1991, QUINONES-BALDRICH et al. 1991, NOLTE et al. 1995, WAAGSTEIN et al.1997) zur Hämodilution brachte keine Erfolge. Dextran kann lediglich die Extravasation von Makromolekülen reduzieren (STEINBAUER et al. 1997).

Ferner erkennt man das Auseinanderweichen der interendothelialen Zellkontakte (bzw. Gaps) (HAMMERSEN/ MESSMER 1989) mit teilweisem Ablösen der benachbarten Zellen (SUVAL et al. 1987), v. a. in postkapillären Venulen. Erythrozyten können durch die entstandenen Spalten das Gefäß verlassen (HAMMERSEN/ MESSMER 1989), manche Autoren beschreiben regelrecht auftretende interstitielle Blutungen (ENGLER et al.1983 - am Herzen, URBANIAK et al. 1997). Mancherorts sind keine echten Lücken vorhanden, aber durch Verlust der Haftstrukturen bildet sich eine freie Durchtrittspforte für Wasser und wasserlösliche Moleküle (HAMMERSEN/ MESSMER 1989).

Auch die transmikrovaskulären Wege sind erweitert (Mikroklasmatoze; GONCHAR/ MELMAN 1990). HAMMERSEN/ MESSMER 1989 beschreibt sie als tubuläre Einstülpungen, die den Markomolekültransport erleichtern sollen.

Venulen haben unregelmäßige Querschnitte und sind von Entzündungszellen (anfangs vorwiegend Monozyten, später Granulozyten) umgeben (SUVAL et al. 1987), die meist gleichzeitige Erweiterung der Venen hat eine Strömungsverlangsamung zur Folge (TSAPENKO 1998). Das durch die Permeabilitätssteigerung mit Proteinaustritt osmotisch bedingte perivasale Ödem führt zu einer Einengung der Kapillare mit weiterer Verlangsamung des Blutstroms.

Der Interzellularraum ist in Folge eines Ödems vergrößert (SUVAL et al. 1987, IKEDA 1990, HASHIMOTO et al. 1991 am Herzen). Ein Muskelödem entsteht meist schon während der Ischämie, erst bei Reperfusion beobachtet man zusätzlich ein interstitielles Ödem (HUK et al. 1995). Es kann durch die Ödembildung, z. B. bei Wiederdurchblutung nach akutem Arterienverschluss (bis 32 %; PERLER et al. 1990), bis zum Kompartmentsyndrom kommen.

Das Ausmaß der Ödembildung scheint (abgesehen von der Ischämiedauer) abhängig vom oxidativen Stress (PERLER et al. 1990, APELL et al. 1997), bzw. vom Gewebesauerstoffpartialdruck zu sein (KEUPP in Vorbereitung). Allerdings erschwert das interstitielle Ödem auch die Sauerstoffaufnahme in das Gewebe durch Verlängerung der Diffusionsstrecke (JEROME et al. 1994), und macht damit die Entscheidung über Ursache und Wirkung schwer. Über Hemmung der Proteinkinase C, unabhängig von der Beeinflussung von Ca-Kanälen, können Ca-Antagonisten den Anstieg der Endothelzellpermeabilität einschränken (LACOLLEY et al. 1998, HEMPEL et al. 1999).

Der Nachweis dieser Störungen läuft z. B. über markierte Dextran- (SUVAL et al. 1987) oder Albuminperfusion. Am post-ischämisch reperfundierten Darm korreliert der Albuminaustritt sogar mit der Anzahl der Leukozyten im NoRe-Gebiet (KUROSE et al. 1994). Messbar wird die Permeabilitätsstörung mit Ödembildung weiterhin durch Bestimmung des Muskelgewichts, des Proteingehalts (DUARTE et al. 1997) und durch den einfachen histologischen Nachweis (NEUMAYER et al. 1995, eigene Arbeit).

KUPINSKI et al. (1997) beschreiben einen Rückgang der pathologischen endothelialen Mechanismen nach vierstündiger Reperfusion unabhängig von der Ischämiedauer, hervorgerufen durch Auswaschen der verantwortlichen Mediatoren in den ersten Stunden.

Nach Ischämien von mehr als 4 Stunden misst man einen steigenden Widerstand in der Mikrozirkulation (QUINONES-BALDRICH et al. 1991). Interessan-

terweise verengen sich nur die vom NoRe betroffenen Kapillaren, die wieder-durchbluteten zeigen dagegen eine Erweiterung (MENGER et al. 1997).

HASHIMOTO et al. (1991) macht anhand von Untersuchungen am Herzen vier endothelabhängige Mechanismen für die Flussabnahme im post-ischämischen Stromgebiet verantwortlich:

(1) Der erste ist die oben beschriebene Einengung des Gefäßlumens über die Kompression von extraluminal durch die interstitielle Flüssigkeit und von intravasal durch die Vorbuckelung der geschwollenen Endothelzellen.

Weiter nennt HASHIMOTO et al. (1991) vasoregulatorische Störungen.

(2) Die angegriffenen Endothelzellen weisen eine geringere Produktion und Freisetzung von vasodilatativen Stoffen wie Prostacyclin und Endothel-derived-relaxing-factor (EDRF und dessen aktiver Komponente NO) auf (WANG et al. 1997), was bei Anwesenheit der, in dieser Situation natürlich in großen Mengen vorhandenen, Monoamine (Adrenalin, Noradrenalin, Histamin) zu einer starken Vasokonstriktion führt. Die Gabe des NO-Vorläufers L-Arginin verbessert die Vasodilatation (BOGER et al. 1995), NO-Hemmung steigert die Konstriktion (über PAF; WANG et al. 2000). Leider zeigte die Verabreichung von einfachen  $\beta$ -Blockern keinen Erfolg (ALLIBARDI et al. 1999 am Herz). Hoffnung gibt ein neues Antisymphotonikum, das Carvedilol. Es handelt sich um einen  $\alpha$ 1- und nichtselektiven  $\beta$ -Adrenoantagonisten mit zusätzlichen antioxidativen Eigenschaften, der die frühe Reperfusion verbessern und zu einer deutlichen Minderung der Muskelnekrosen führen soll (FEUERSTEIN/ RUFFULO 1995, HVAAL et al. 1999). Es liegen außerdem Hinweise auf einen protektiven Effekt gegen Arteriosklerose vor (FEUERSTEIN/ RUFFULO 1995). Erniedrigte EDRF-Konzentrationen erleichtern zusätzlich die endothelvermittelte Thrombozytenaggregation und -adhäsion.

(3) Die Gefäßreagibilität gegenüber endothelabhängigen Einflüssen auf den Tonus ist stark vermindert (BORSCH et al. 1997). Dabei ist das Ansprechen der Gefäße auf Relaxationsreize relativ mehr vermindert (HILLIER et al. 1994a) als auf Konstriktionsreize. Jedoch stellte HILLIER et al. (1994b) auch eine abgeschwächte Reaktion auf vasokonstriktorische Mediatoren (Noradrenalin, Angiotensin II, mechanische Reizung) fest. Trotzdem haben diese aber sehr wohl Einfluss, wie erfolgreiche Versuche mit dem ATII-Antagonist Candesartan beweisen (SHIMIZU et al. 1999).

Auch die endothelabhängigen Vasokonstriktoren Serotonin (aus aggregierten Thrombozyten) oder Acetylcholin (HILLIER et al. 1994a) lösen eine Antwort aus. WIERNBERGER (1994) hält Serotonin und dessen Rezeptor sogar für eine Schlüsselstelle für Vasokonstriktion, Thrombozytenaggregation und Permeabilitätssteigerung. Er beschreibt eine auf die Ischämie folgende Hypersensitivität von Gefäßen und Thrombozyten auf Serotonin. Der Serotoninrezeptorantagonist Naftidrofuryl verbessert die Blutversorgung und den Energiehaushalt des post-ischämischen Gewebes mittels antikonstriktiver, wenn auch nicht direkt dilatativer Wirkungen. Naftidrofuryl soll hierbei keine unerwünschten Nebeneffekte wie Stealphänomene oder Hypotension herbeiführen (WIERNBERGER 1994).

Erhalten bleiben die Wirkungen direkt glattnuskulär wirkender Dilatatoren, wie z. B. das Adenosin, Natriumnitroprussid (BOLLI et al. 1990, HILLIER et al. 1994a, WANG et al. 1997) oder Papaverin (BOLLI et al. 1990 am Herzen). Dies spricht für eine ungestörte Funktion der glatten Gefäßmuskulatur. Die erhaltene Adenosinwirkung erklärt ein von KELLER (1997) postulierter Wirkungsme-

chanismus, nach dem Adenosin die Mastzelldegranulation triggert. Die von den Mastzellen ausgeschütteten Mediatoren sind potente Vasokonstriktoren (KELLER 1997).

(4) Der letzte von HASHIMOTO et al. (1991) postulierte Mechanismus ist die sich verzögert anpassende metabolische Autoregulation. Durch die in der Ischämiephase verminderte Sauerstoff- und Nährstoffnachfrage des Gewebes findet eine Downregulation des Flusses statt. Diese pathophysiologische Einstellung wird zumindest in der frühen Reperfusionphase weiter aufrechterhalten.

Alle Vorgänge addieren, ja potenzieren sich, und es kommt zu dem pathologisch erhöhten Gefäßtonus in der post-ischämischen Mikrozirkulation. Dies trägt weiter zu einer erhöhten transkapillären Flüssigkeitsfiltration bei.

Da EDRF eine wichtige Rolle bei der Vasoregulationsstörung spielt, soll an dieser Stelle seine Freisetzung, Wirkung und die spezifischen Störungen, die durch seinen Mangel während einer Ischämie/ Reperfusionperiode auftreten, etwas genauer dargestellt werden.

Nach MARSHALL und KONTOS (1990) besteht die endothelabhängige Relaxation durch EDRF in allen Gefäßbetten, in großen Gefäßen wie in der Mikrozirkulation. Die EDRF-bedingte Gefäßerweiterung ist flussabhängig. EDRF kann durch Acetylcholin (Gehirn) oder Bradykinin gebildet werden. Im Skelettmuskel erfolgt die Vasodilatation teils über EDRF, sonst über Prostazyklin, das ebenfalls bradykininabhängig produziert wird. Dort sehen einige Autoren jetzt einen Ansatzpunkt für das medikamentöse Eingreifen, beispielsweise mittels ACE-Hemmer. Eine basale EDRF-Ausschüttung konnte zwar in vivo noch nicht nachgewiesen werden, gesichert ist jedoch sein vermindertes Vorkommen bei Gefäßkrankheiten im weitesten Sinne, wie akute und chronische Ischämien, Atherosklerose und im Rahmen eines Ischämie-Reperusionsprozesses. Erklärungen dafür werden in einer Bildungsstörung oder einer oxidantienvermittelten Zerstörung im Extrazellularraum nach der Freisetzung gesehen (MARSHALL/ KONTOS 1990, HASHIMOTO et al. 1991). HASHIMOTO (1991) weist bei Ischämie-Reperusions-Bedingungen bei Einsatz der Herz-Lungen-Maschinen auf die Verminderung von EDRF durch den extrakorporalen Kreislauf hin. Zusätzlich setzt die auftretende Hämolyse Hämoglobin frei, welches ein potenter EDRF-Inaktivator ist.

Über den Einfluss von Endothelin (ET) herrscht in der Literatur Uneinigkeit. Endothelin kann über Ca-Kanäle zur Vasokonstriktion führen (URBANIÄK et al. 1997). TSAPENKO (1998) vermutet, dass dem Verhältnis von ET1 zu EDRF größere Bedeutung zukommt, WANG et al. (1997) hat in seiner Untersuchung keine Beteiligung beweisen können, da ein applizierter ET-Antagonist nicht wirksam war, HVAAL et al. (1999) hatte mit dem ET A- und B- Rezeptoragonist Bosentan dagegen Erfolg.

Über Mediatoren der Leukozyten und Thrombozyten (PAF, Thromboxan A<sub>2</sub>; WANG et al. 2000, siehe oben) kommt es weiterhin zur Vasokonstriktion. Deshalb können Indometacin, Imidazol und auch PAF-Rezeptor-Antagonisten den Vasospasmus abschwächen und dadurch das NoRe eindämmen (WANG et al. 2000).

Unter den vasoaktiven Substanzen herrscht eine ungeordnete Balance-Störung (URBANIAK et al. 1997), insgesamt führt dies zu einer Gefäßverengung im post-ischämischen Stromgebiet.

Auch nervale Reize tragen dazu bei, die post-ischämische Gefäßtonusregulation zu steuern. Man beobachtet, dass an denervierten Muskeln der Reperfusionsschaden, in Bezug auf NoRe- Länge, Ödem, Blutungen, Gefäßgröße/-spasmen und verminderter reaktiver Hyperämie stärker ausfällt (CHEN LE et al. 1992).

Eine mit Beginn der Reperfusion auftretende Hypertonie kann als systemischer Faktor oftmals druckpassiv gegen den erhöhten hydraulischen Widerstand den Blutfluss steigern (MENGER/ MESSMER 1993, TSAPENKO 1998). In diesem Falle wirkt das Endothel eher flach und ausgewalzt (HAMMERSEN/ MESSMER 1989).

### 1.2.4 Kapilläre Mikrozirkulation

Weitere Funktionsstörungen im Bereich der Mikrozirkulation zeigen sich im Verlust von physiologischen Flussfluktuationen im Kapillarbereich (CAMILLERI et al. 1983, BÖHME 1984, SLAAF et al. 1995). Es werden im normalen Gefäßbett niemals alle Kapillaren gleichförmig durchströmt, vielmehr wechselt bedarfsadaptiert die Durchströmung mit sauerstofftransportierenden Erythrozyten. Der Fluss bleibt bedarfsgerecht. Die arterioläre Autoregulation der Kapillardurchblutung hilft bei gleicher anatomischer Gefäßdichte, die zur vollständigen Perfusion nötige Blutmenge, und damit den Gesamtfluss, zu verringern.

Bei Reperfusionsexperimenten kommt es zu einer kontinuierlicheren Durchblutung des gesamten Kapillarbetts mit erstarrter Dynamik, es entwickelt sich eine inhomogene, intermittierende und insgesamt reduzierte kapilläre Fließgeschwindigkeit (MCDONAGH et al. 1985, YOKOTA et al. 1989, MENGER et al. 1992). Außerdem bevorzugt ein größerer Anteil des Blutes den Weg des gerin-

geren Fließwiderstandes über Shuntgefäße (BÖHME 1984, MENGER/MESSMER 1993).

Die typische Gefäßerweiterung bei Muskelkontraktion (aktive Hyperämie) ist aufgehoben (DAWSON et al. 1990) durch Torbaphyllin- (DAWSON et al. 1990), Superoxiddismutase- oder Allopurinolgabe (MENGER et al. 1992) können diese Störungen klinisch oft wieder beseitigt werden.

Die funktionellen Kapillarveränderungen zeigen im Rahmen von Ischämie und Reperfusion einen typischen Ablauf. Während der Ischämie soll eine Verkleinerung der Kapillardurchmesser um 8%, in der Phase der Hyperämie (während der frühen Reperfusion) eine Vergrößerung um 12% eintreten, im Verlauf normalisiert sich die Kapillarweite angeblich wieder (SLAAF et al. 1995).

Die funktionelle Kapillarzahl (-dichte, =FCD) wird über die Anzahl perfundierter Kapillaren pro Gesichtsfeld (HEIMGÄRTNER 1986, HARTUNG 1986, NOLTE et al. 1995) bzw. pro Muskelfaser (MCDONAGH et al. 1985, eigene Arbeit) bestimmt. Sie ist nach NOLTE et al. (1995) ein guter Parameter für die Qualität der Gewebepерfusion. HARRIS et al. (1996) zeigte nach 5-stündiger Ischämie eine Reduktion der FCD auf ein Drittel (MENGER et al. 1992: 35%). Bei Versuchen von IKEDA (1990) blieb diese Dichteminderung von reperfundierten Kapillaren schon nach kurzer Ischämie für mehr als 24 Stunden bestehen. Dies kann mit einem irreversiblen NoRe gleichgesetzt werden, was natürlich eine massive Gewebeschädigung nach sich zieht. Teilweise resultiert die Verminderung der FCD auch durch die verstärkte kapilläre Shuntperfusion (s.o.).

Diese qualitativen und quantitativen Kapillarfunktionsstörungen resultieren in einer völligen Desorganisation der mikrozirkulatorischen Fließeigenschaften mit Wirbelbildung, regionaler Stase und einem konsekutiv entstehenden venösen Stau (URBANIAC et al. 1997). Zusätzlich kommt es im Laufe der Ischämie/ Reperfusion zu pathologischen Veränderungen der Erythrozyten mit starker Verformung und dem sog. Geldrollenphänomen (HAMMERSEN/ MESSMER 1989, URBANIAC et al. 1997).

Die relative Anzahl an perfundierten Kapillaren vermindert sich bei erhöhtem lokalen  $pO_2$  und kommt bei einem Gewebe-  $pO_2$  von  $\geq 70$  mmHg völlig zum Erliegen (SLAAF et al. 1995). Die Verringerung der freien Radikale über Superoxiddismutase oder Allopurinol hebt die FCD an (MENGER et al. 1992). Das über die Leukozyten- Endothel- Interaktion eingreifende Dextran kann in der Reperfusion einen Anstieg der FCD bewirken (PICKELMANN et al. 1997). Die NO-Synthetase- Hemmung mit entsprechend erniedrigtem NO-Spiegel kann eine verstärkte Abnahme der funktionellen Kapillarzahl und eine Ausweitung der minderperfundierten Gewebsareale mit resultierender Nekrose herbeiführen (PANNEN et al. 1998). Die Endothelin-A und -B- Hemmung durch Bosentan belegt eine Mitschuld des Endothelin an der Kapillardichteminderung im Rahmen von Ischämie und Reperfusion (PANNEN et al. 1998).

### 1.2.5 Mikrothromben und intravasale Gerinnung

Von REYNOLDS/ MCDONAGH (1989) wird die Rolle der Thrombozyten zwar als eher gering eingestuft, YOKOYAMA et al. (1996) schreibt ihnen aber einen großen Anteil an der Reperfusionstörung zu. Thrombozyten bilden Aggregate während der Ischämie, die als Mikrothromben die Reperfusion behindern können (MCDONAGH et al. 1985, HAMMERSEN/ MESSMER 1989, QUINONES-BALDRICH et al. 1991, MENGER/ MESSMER 1993, PAMPERTON et al. 1994, URBANIAK et al. 1997). Besonders bei kurzen Ischämiezeiten soll dieser Faktor sehr wichtig sein (MCDONAGH et al. 1985). Nach LEWIS (1984) kommt es dabei zur lokalen intravasalen Aktivierung der Gerinnungskaskade.

Endothelverletzungen können der Ausgangspunkt für Fibrinablagerungen sein, die kleine Gefäße verschließen (HAMMERSEN/ MESSMER 1989). Blutbestandteile, Leukozyten und Thrombozyten werden darin – im Sinne von Sludging – eingeschlossen und es folgt die gesamte Kaskade des Reperfusionsversagens.

Allerdings werden Thrombozyten- bzw. Leukozytenaggregate in den postkapillären Venulen auch über das thrombozytäre P-Selectin (KUROSE et al. 1994)



oder durch PAF- Ausschüttung (TSAPENKO 1998) gebildet. Nach Aktivierung können Thrombozyten, ähnlich den Leukozyten, Mediatoren (Serotonin, Thromboxan A<sub>2</sub>) ausschütten, die zu Permeabilitätssteigerung (LABRID 1994), Vasokonstriktion (HUK et al. 1995) und zum Verlust der präkapillären Autoregulation (RAWITSCHER et al. 1997) führen. Außerdem provozieren diese Stoffe wiederum eine Leukozytenakkumulation.

Die Vorbehandlung des reperfundierten Gewebes mit Thromboxan-Synthetasehemmern vermindert die Leukozyteninfiltration und damit die Rate der primären Dysfunktion (YOKOYAMA et al. 1996). Abeiximab, ein Thrombozytenadhäsionshemmer, kann den venösen Abfluss wiederherstellen (RAWITSCHER et al. 1997). QUINONES-BALDRICH et al. (1991) vermochte das NoRe durch Verabreichung von Urokinase einzudämmen, MENGER/ MESSMER 1993 hatten aber mit Heparinisierung überraschenderweise keinen Erfolg (Heparinwirkung auf Radikale s. Kap. 1.2.2).

Die Thrombenbildung soll geringer sein, wenn eine gute Kollateralisierung vorliegt (QUINONES-BALDRICH et al. 1991). Dies würde dem chronisch ischämischen Muskel in dieser Situation einen gewissen Vorteil bringen. Die verminderte Ausschüttung von EDRF, das die Plättchenhaftung herabsetzt, im Rahmen des NoRe steuert hier positive Effekte bei (HASHIMOTO et al. 1991), was als weiterer Hinweis auf den pathophysiologischen Sinn des NoRe angesehen werden kann.

### 1.2.6 Muskelfunktion und -pathologie

Zerstörungen des Skelettmuskels selbst folgen in der Regel denen im Bereich der Mikrogefäße (MENGER/ MESSMER 1993). Folglich muss das Muskelgewebe in der Umgebung von pathologisch veränderten Kapillaren oder ödematösem Gewebe nicht zwangsweise pathologisch verändert sein. Es kann aber in Abhängigkeit von der Ischämiedauer fokale diskoidale Nekrosen, Myozytolyse

und Sequestration von autolytischen Muskelfaserbündeln zeigen (GONCHAR/MELMAN 1990). Dies unterscheidet den Skelettmuskel vom Herzmuskel, in dem bei aufgetretenen vaskulären Veränderungen jedenfalls die Myozyten in Mitleidenschaft gezogen werden (CAMILLERI et al. 1983). Elektronenmikroskopisch sieht man bei eingetretener Schädigung zerstörte Organellen, v. a. das sarkoplasmatische Retikulum (GONCHAR/ MELMAN 1990), Mitochondrienschwellung und schließlich Zerreißen der Sarkomerorganisation (JEROME et al. 1994). Nach etwa einer bis zwei Wochen schon beginnen die Regenerationsvorgänge (RACZ et al. 1997).

Die Funktionseinschränkung des post-ischämischen Muskels ist in großem Maße von der Ischämiedauer und vom Fasertyp abhängig (JEROME et al. 1994, RACZ et al. 1997). Ab 3 Stunden Ischämiedauer sinkt der intramuskuläre ATP-Gehalt stark ab (HARRIS et al. 1996). Muskelkraft und ATP- Gehalt des schnellen Fasertyps normalisieren sich früher als die des langsamen (CARVALHO 1997), aufgrund der physiologischen Unterschiede in Bezug auf die Nährstoffanforderungen der einzelnen Muskelfasertypen (RACZ et al. 1997).

Die Muskelkontraktilität erholt sich ebenfalls in Korrelation zur Ischämiedauer unterschiedlich schnell (CARVALHO 1997, RACZ et al. 1997), ein bleibender Funktionsverlust ist meist nicht zu verzeichnen. Allerdings kann nach längerer Ischämie die vollständige Regeneration unterbleiben (RACZ et al. 1997) außerdem ist die Überlebenschance einer Extremität im irreversiblen NoRe keineswegs gut (PAMPERTON et al. 1994).

Die metabolische und reaktive Kontraktur der ischämischen Muskulatur bewirkt eine Kompression des Gewebes (MCDONAGH et al. 1985), die nur langsam wiederhergestellte Bewegungsfähigkeit führt zu einer venösen Abflussstörung mit einer Druckerhöhung im Kompartiment, die die Durchblutung weiter beeinträchtigt.

Man fand hier die Möglichkeit, durch energiesparende Maßnahmen, z. B. mit Trimetazidin eine Reduktion des NoRe zu erreichen (ALLIBARDI et al. 1998).

### 1.2.7 Systemische Ursachen und Folgen

Die Auswirkungen der Ischämie auf den Gesamtorganismus entstehen durch Einschwemmung von Toxinen aus dem vorher isolierten Gefäßgebiet und sind, wie alle post-ischämischen Vorgänge, sowohl abhängig von der Dauer der Ischämie wie auch von der Größe des betroffenen Bezirks. Das Zusammenspiel von Ischämie, der endothelialen Schädigung sowie den systemischen und lokalen Antworten nennen URBANIAK et al. (1997) die NoRe- Triade, sie sehen diese Kombination als Auslöser des NoRe.

Metaboliten aus dem anaeroben Stoffwechsel gelangen in den Kreislauf und aktivieren vegetative Mechanismen. Diese führen einmal durch Vasodilatation zu einem verbesserten Flow in der Makrozirkulation (reaktive Hyperämie), mit dem Sinn, die angesammelten Abfallprodukte zu entfernen (URBANIAK et al. 1997), haben aber auch erhebliche Nebenwirkungen auf den Körper.

Als Folge der eingeschwemmten Entzündungsmediatoren werden Herz- und Leberversagen, Lungenödem und -blutungen beobachtet (PAMPERTON et al. 1994).

TNF $\alpha$  soll eine große Rolle bei den systemischen Reaktionen auf die Reperfusion spielen. Wahrscheinlich führt TNF $\alpha$  zur Endothelin 1- Ausschüttung (STERNBERGH et al. 1994). TNF $\alpha$  ist beteiligt an Lungenödem und -entzündungsreaktionen, Azidose und Hypotension, was letztlich im Tod durch Kreislaufversagen endet (STERNBERGH et al. 1994).

Thromboxan B2 führt zu Permeabilitätssteigerung in der Lunge mit Proteinverlust in die Alveolen und Leukozytenaktivierung.

Diese Veränderungen werden durch die Hemmung der Thromboxansynthetase gestoppt (KLAUSNER et al. 1989). ENGLES (1997) konnte durch Applikation von IL10 über die Hemmung von  $TNF\alpha$  und IL1 die lokalen wie systemischen Schäden einschränken. Er zeigte hierbei verringerte  $TNF\alpha$ -Konzentrationen bei zunehmender Neutrophileninfiltration der betroffenen Organe und vermutet deshalb, dass die Leukozyten nur bedingt am Fernschaden schuldig sind.

Bei Ischämiezeiten von einer Stunde kann sich der Blutdruck auf niederem Niveau stabilisieren, zwei Stunden Ischämie führen zu einem ausgeprägten Blutdruckabfall (bei relativer Hypovolämie) mit dauerhaft auch während der Reperfusion erhöhtem Laktat, Übersäuerung (URBANIAK et al. 1997) und verzögertem pH- Wiederanstieg (JONAS et al. 1996, KEUPP in Vorbereitung). Weiterhin ist eine Hypothermie zu beobachten. Nach dreistündiger Ischämie des Arteria mesenterica superior- Gebietes beim Schwein tritt bei Reperfusion ein irreversibler Schock auf (JONAS et al. 1996).

Wie man weiß, verändert diese Azidose die Fließeigenschaften des Blutes negativ, indem sie die Verformbarkeit der Blutzellen im Allgemeinen vermindert und die viskoelastischen Eigenschaften der Erythrozyten im Speziellen nachhaltig beeinflusst (MENGER/ MESSMER 1993). Diese Blutzellveränderungen sind in der Arbeit von MOSER (2000) genauer untersucht.

Interessant ist, dass die Leukozytenansammlung in der Muscularis der ischämisierten Darmwand nach einer Stunde Ischämie am größten und bei längerer Ischämie geringer ausgeprägt ist. Jonas vermutet, die Perfusionsstörung würde die Akkumulation verhindern (JONAS et al. 1996). Vielleicht ist hier ein Sinn des NoRe für den Organismus zu suchen.

Wegen des Umfangs der im Rahmen dieser Dissertation untersuchten relevanten biochemischen, immunologischen und rheologischen Parameter muss an dieser Stelle für weitere Einzelheiten auf die Arbeiten von MOSER (2000) und

KEUPP (in Vorbereitung), in Bezug auf lokale und sytemische Hämodynamik auf die Arbeit von TSAPENKO (1998) verwiesen werden.

### 1.2.8 Zusammenfassung der Pathophysiologie des NoRe

Pathomechanismus	Autoren	Erklärungen
Leukozyten	GO et al. 1988, REYNOLDS/MCDONAGH 1989, MENGER et al. 1992, HARRIS et al. 1996, JEROME et al. 1994, KUROSE et al. 1994, MAZZONI et al. 1995, PICKELMANN et al. 1997	Adhäsion, 'Plugging', Gewebsschädigende Enzyme, Radikalenproduktion, gefäßwirksame Substanzen
Radikale	PERLER et al. 1990, MENGER et al. 1992, BECKER et al. 1993, KUROSE et al. 1994, URBANIAK et al. 1997, AMBROSIO/ TRITTO 1999	Gewebszerstörung, Ödembildung, Endothelzerstörung
Endothel und Vaso-regulation	SUVAL et al. 1987, MARSHALL/KONTOS 1990, HASHIMOTO et al. 1991, KELLER 1997, URBANIAK et al. 1997, WANG et al. 2000	ischämische Endothelschäden, Schwellung, Permeabilitätssteigerung mit mikrovasculärer Kompression, Gefäßtonusregulationsstörung
Kapillarfunktion	MC-DONAGH et al. 1985, YOKOTA et al. 1989, MENGER et al. 1992, MENGER/ MESSMER 1993, SLAAF et al. 1995	Verminderung der FCD, Kapillarverengung, Störung der Dynamik
Thrombozyten und Gerinnung	MCDONAGH et al. 1985, HAMMERSEN/ MESSMER 1989, PAMPERTON et al. 1994, YOKOYAMA et al. 1996	nach Endothelschäden oder durch Mediatoren vermittelt

Tabelle 1-4 Favorisierte Pathomechanismen des NoRe

### 1.3 Einflussfaktoren auf das Kapillarsystem

Viele Studien haben bereits Zusammenhänge zwischen bestimmten Vorerkrankungen und der Kapillarfunktion- bzw. -morphologie erkannt. Es wurde klar,

dass der Zustand des Gefäßsystems wesentlich den Verlauf einer Reperfusion nach Ischämie bestimmt.

### 1.3.1 Hypertonie als Modell der Kapillarbettrarefikation

Die Tatsache, dass die Hypertonie das Gefäßsystem verändert, haben viele Autoren gezeigt (HENRICH et al. 1978, HENRICH/ HERTEL 1979a, HENRICH/ HERTEL 1979b, HENRICH et al. 1983 GRAY 1984, HARTUNG 1986, HENRICH 1988). Man kann jedoch das Ausmaß des Blutdrucks nicht in eine enge Korrelation mit dem Grad der Gefäßalteration setzen (HENRICH et al. 1978).

Da sich ein großer Teil des Druckgradienten in der Hämodynamik über das mikrovaskuläre Netzwerk erstreckt (HENRICH et al. 1985, VICAUT 1999), verwundert es nicht, dass die Hypertonie vorwiegend Veränderungen in der Mikrozirkulation bewirkt.

Die Regulation des Blutflusses findet im hypertensiven Gefäßbett auf erhöhtem Niveau statt, zum einen durch eine zentrale sympathische Regulationsdysfunktion, weiterhin durch endotheliale Faktoren und schließlich durch eine gesteigerte Sensibilität auf Vasokonstriktoren (HENRICH et al. 1978, VICAUT 1999). Die lokale Aktivität des Angiotensin-Converting-Enzyms (ACE) ist erhöht und das endothelabhängige Dilatationsvermögen eingeschränkt. Darüberhinaus ist die reaktive Vasokonstriktion als myogene Anpassung an einen Druckanstieg – über Prostaglandine und Endothelin – verstärkt (VICAUT 1999).

Es existieren weiterhin auch morphologische Besonderheiten des hypertonen Gefäßbetts (HENRICH/ HERTEL 1979b), die mit hämodynamischen Veränderungen einhergehen.

Charakteristisch sind sowohl eine quantitative als auch eine qualitative Anpassung der Gefäße. Am bemerkenswertesten ist wohl die Verminderung der Ka-

pillarzahl und der Anzahl an präkapillären Arteriolen (um ca. 50%: HENRICH et al. 1978, HERTEL et al. 1978, HARTUNG 1986), Rarefikation genannt, und eine verminderte Verzweigung der Endstreckengefäße (Ramifikation) (HENRICH/ HERTEL 1979a, HENRICH/ HERTEL 1979b, GRAY 1984, VICAUT 1999). Zusätzlich zeigt sich eine markante Verkürzung von prä- und postkapillären Gefäßen und Kapillaren (um ca. 35%, HENRICH et al. 1978). Die im Alter physiologische Abnahme der Kapillarzahl ist durch die Hypertonie beschleunigt und intensiviert (HENRICH/ HERTEL 1979b, HENRICH et al. 1990 VICAUT 1999). Erster Schritt zur Rarefikation ist die Verminderung der Anzahl perfundierter Gefäße. In diesem Stadium können potente Dilatatoren noch ein Mikrogefäßrekrutment induzieren (VICAUT 1999).

Die Rarefikation bedeutet aber auch eine Schrumpfung der Diffusionsfläche (GRAY 1984). Damit geht eine Erhöhung des parallelen Widerstands der Perfusionsstrecke einher (nach HERTEL et al. 1978) vorwiegend in größeren präkapillären Arteriolen). Die arteriovenösen Shuntgefäße sind sekundär vermehrt (HENRICH et al. 1978).

Durch den erhöhten Sympathikotonus (MOHNIKE et al. 1983) mit hypertrophierter glatter Gefäßmuskulatur – vorwiegend im Bereich der kleinen Widerstandsgefäße (HENRICH et al. 1978) – weist der serielle Widerstand ebenfalls eine Erhöhung auf. Zusammen mit der ebenfalls nachgewiesenen Proliferation nicht kontraktiler Gefäßwandbestandteile (HEIMGÄRTNER 1986) imponiert das hypertone Gefäß durch eine mehr oder weniger deutliche Mediahypertrophie (FOLKOW 1982).

Die gleichzeitige Erhöhung des parallelen und seriellen Widerstands drosselt konsekutiv den Perfusionsdruck. Vermutlich stellt dies einen Ausgleichsmechanismus dar, der bei hohem Druck im Gefäßbett (HERTEL et al. 1978: Verdoppelung im Vergleich zu Kontrollen, HENRICH/ HERTEL 1979a, HENRICH/ HERTEL 1979b, GRAY 1984, HARTUNG 1986) die Hyperperfusion des Kapillarbetts durch einen erhöhten Widerstand herunterregulieren soll. Die Widerstandserhöhung alleine ist jedoch meist nicht ausreichend, um die kapilläre Gefäßstrecke gänzlich zu schützen (HERTEL et al. 1978). Die Wandspannung in diesem Gefäßbereich findet sich meist erhöht. Wahrscheinlich kann diese lokale Autoregulation nur vorübergehend das Gewebe vor Hyperperfusion schützen. Es findet sich schließlich doch eine Störung der Endothelbarriere mit gesteigerter Permeabilität und Leakage (HENRICH/ HERTEL 1979a) bzw. eine gesteigerte Abpressung von Mikrofiltrat (HERTEL et al. 1978). ACE-Hemmer sollen diese hypertoniebedingten morphologischen Veränderungen der Mikrozirkulation rückgängig machen können (STRAUER et al. 1993).

Ob nun die Erhöhung des Perfusionsdruckes am Anfang der Fehlregulation steht oder ob die Druckerhöhung eine Anpassung auf eine ursächliche Rarefizierung darstellt, wird diskutiert (GEYER 1986, HARTUNG 1986).

HENRICH et al. (1978) stellten fest, dass die Druckregulation hier zu Ungunsten einer suffizienten Blutversorgung vorrangig gesteuert wird. Die durch die Rarefizierung bedingte erhöhte Durchflusgeschwindigkeit und verringerte Austauschfläche könnte eine unzureichende Sauerstoff- und Nährstoffversorgung zur Folge haben. Zwar finden HENRICH/ HERTEL (1979b) eine unbeeinflusste Sauerstoffbilanz, jedoch verzeichnen andere Studien einen vermehrten Lymphfluss mit erhöhter Sauerstoffsättigung (HERTEL et al. 1978, HENRICH/ HERTEL 1979a).

Bei einem Rückgang des Blutflusses in dieser Situation könnte sich schnell eine manifeste Minderperfusion mit einer drohenden Unterernährung des hypertonen Gewebes entwickeln (HENRICH/ HERTEL 1979a).

Solch ein Abfall kann während eines NoRe auf der Basis einer sekundären Hypertonie stattfinden. Durch die Nichtperfusion von weiteren Kapillaren reduziert sich die Austauschfläche nochmals.

Sehr viele der typischen Veränderungen der kapillären Endstrecke des hypertonen Gefäßsystems lassen außerdem Ähnlichkeiten zur post-ischämischen Situation in der Mikrozirkulation erkennen. Es würde also nicht wundern, wenn sich die pathologischen Veränderungen von Hypertonie und NoRe gegenseitig steigernd beeinflussen würden.

Somit wäre das hypertone Gefäßsystem besonders durch ein NoRe gefährdet und soll deshalb als Modell dienen.

### 1.3.2 Chronische Ischämie als Modell einer Hyperkapillarisation

Über die Veränderungen im chronisch ischämischen Muskel existiert noch keine einheitliche Meinung. Sicher besteht eine metabolische und strukturelle Anpassung an eine eingeschränkte Blutzufuhr (NELISSEN-VRANCKEN et al. 1993). Die Veränderung der Muskelfaserzusammensetzung ist nach Veränderungen der Kapillanzahl die am häufigsten in der Literatur erwähnte Anpassungsreaktion.



In Bezug auf den Faserwandel ist man sich einig, dass unter Einfluss der chronischen Minderversorgung sich das Verhältnis der Fasertypen zugunsten von oxidativen Typ 1- Fasern verschiebt (HAMMARSTEN et al. 1980).

Viele Alterationen sind mit denen bei Trainingseffekten zu vergleichen. Muskeln (ausdauer-) trainierter Personen zeigen ähnliche morphohistologische Adaptationsprozesse wie chronisch ischämische Muskeln (HAMMARSTEN et al. 1980). Auch bei Muskelstimulierung folgt in überwiegend glykolytischen Muskeln (Typ 2) eine Veränderung der Faserzusammensetzung zugunsten der oxidativen Fasern (Typ 1) (ROUANET/ BACOU 1993). Oxidative Enzyme sind vermehrt aktiv und die Mitochondrien vergrößert (HAMMARSTEN et al. 1980). CORSI et al. (1990) vermuten, dass der stimulierte Muskel eine bessere Mikrozirkulation aufweist und damit eine Anhäufung von Laktat verhindern kann. Möglicherweise trifft dieser Mechanismus auch für den chronisch ischämischen Muskel zu.

Der trainierte Muskel weist zudem eine hohe Kapillarzahl auf (NELISSEN-VRANCKEN et al. 1993). Mehrere Autoren bestätigen eine Erhöhung der Kapillarzahl auch bei chronischer Ischämie. CORSI et al. (1990) kann dies jedoch nicht finden.

Andere Autoren beobachten eine Veränderung der Kapillardichte erst bei Kombination der chronischen Ischämie mit regelmäßigem Training (DAWSON/ HUDLICKA 1990, HUDLICKA et al. 1994, DESCHENES/ OGILVIE 1999). In dieser Situation sahen DESCHENES und OGILVIE (1999) eindeutig Endothelzellproliferationen.

Am Herzen kann man bereits nach 3 Wochen chronischer Ischämie eine zunehmende Erhöhung von Arteriolenzahl und Kapillardichte beobachten, die auch hämodynamisch relevant ist (WHITE/ BLOOR 1992). Neben neu sprossenden Gefäßen sind aber sehr wohl Endothelzelldefekte und Mediaschäden vorhanden (WHITE/ BLOOR 1992).

Untersuchungen zeigten, dass sich die Kapillarzahlen in Abhängigkeit vom Fasertyp unterschiedlich verändern können (HAMMARSTEN et al. 1980, NELISSEN-VRANCKEN et al. 1993). NELISSEN-VRANCKEN et al. (1993) fanden bei peripherer Ischämie bei Typ 1- Fasern einen höheren, bei Typ 2- Fasern einen etwas geringeren Anstieg der Kapillarzahlen. HAMMARSTEN et al. (1980) betonten eine wesentlich erhöhte Kapillarversorgung der Typ 2- Fasern und eine in Korrelation dazu erhöhte Glucoseaufnahmekapazität.

Ergänzend sollte bemerkt werden, dass die C/F- Ratio in Typ 1- Muskeln grundsätzlich höher ist als in Typ 2- Muskeln, d. h. pro Muskelfaser versorgen den oxidativen Muskel im Schnitt mehr Kapillaren als den glykolytischen (NELISSEN-VRANCKEN et al. 1993).

Der Gracilis beim Hausschwein (WEILER et al. 1995), beim Hasen (ROUANET/BACOU 1993) und beim Meerschweinchen (GRASBY et al. 1997) besteht aus relativ mehr Typ 2- Fasern. Deshalb kann man davon ausgehen, dass der in dieser Arbeit untersuchte *M. gracilis* der Göttinger Miniaturschweine ebenfalls vorwiegend glykolytische Fasern besitzt.

Man beobachtet bei Ischämien und Reperfusionsequenzen an chronisch minderversorgten Extremitäten eine verstärkte hyperämische Reaktion (NICHOLSON et al. 1985). Eine typische funktionelle Störung bei Aufhebung der chronischen Ischämie ist, v. a. in den ersten Tagen nach Reperfusion, die mangelnde Vasokonstriktion bei Lageänderung (UBBINK et al. 1992). Beides deutet auf ein erhöhtes dilatatives Bezugsniveau des vormals chronisch ischämischen Gefäßbetts hin. Bei Reperfusion führt diese Störung zu vermehrter Dilatation, was einem NoRe entgegenwirken würde.

Wochen bis Monate nach einem Gefäßverschluss kommt es zu Kollateralenwachstum (bis 11 Wochen ist noch Proliferation nachweisbar). Diese entstehen teils aus dilatierten, bereits vorliegenden Ästen, teils de novo. Das Kollateralwachstum führt zu einem abnehmenden Widerstand in den Kollateralgefäßen. Der Fluss ist dann bei annähernd gleichem Tonus innerhalb von 3- 9 Tagen wieder normal. Ein VEGF (Vascular Endothel Growth Faktor) wurde dafür verantwortlich gemacht (TAKESCHITA et al. 1994). Die Geschwindigkeit des Kollateralenwachstums korreliert nach CONRAD et al. (1971) nicht mit dem Druckgradienten oder den Fließgeschwindigkeiten im Gefäßgebiet. Reize dafür sollen die Konzentrationserhöhung von Metaboliten und der Abfall der Sauerstoffsättigung darstellen. Die rein mechanischen Faktoren wie Druckgefälle und Fließgeschwindigkeiten im Kollateralbett sind wohl eher für die akute Dilatation bestimmend (TAKESCHITA et al. 1994).

Typische pathologische Veränderungen des chronisch ischämischen Muskels sind elektronenmikroskopisch desorganisierte Myofibrillen mit Zerfließen der Z-linien, geschwollene und degenerierte Mitochondrien, ein dilatiertes sarkoplasmatisches Retikulum und Muskelareale mit zerrissenem Sarkolemm.

Die Funktionsstörungen des Muskels betreffen in ausgeprägterem Maße den oxidativen Typ, weil der glykolytische seine Energie anaerob unter Laktatproduktion gewinnen kann (DAWSON/HUDLICKA 1990).

Interessant ist die Studie von BIRNBAUM et al. (1997), in der mittels partieller Femoralarterien-Stenose und elektrischer Skelettmuskelstimulation die Ausdehnung eines anschließend provozier-

ten Herzinfarktes reduziert werden konnte. Es existieren also humorale systemische Mechanismen, die in Herz- und Skelettmuskel gleichermaßen wirken.

Weiterhin weisen Untersuchungen z. B. von NELISSEN-VRANCKEN et al. (1993) darauf hin, dass Langzeitgabe von Vasodilatoren zu Kapillarwachstum führt.

Wenn die These der Hyperkapillarisation im chronisch ischämischen Kapillarsystem zuträfe, wäre – analog zur Situation bei Hypertonie – ein selteneres und schwächer ausfallendes NoRe in derartig angepassten Gefäßgebieten zu erwarten.

In der vorliegenden Arbeit sollen die Einflussfaktoren auf das NoRe untersucht und das kapilläre Proliferationsverhalten auf die verschiedenen Vorbedingungen überprüft werden. Gegebenenfalls soll ein Zusammenhang zwischen der Kapillarisation und der Intensität des NoRe bzw. der Resistenz gegenüber den ischämie- und reperfusionsbedingten Schäden geprüft werden. Im Umkehrschluss soll ein positiver Effekt von Calciumkanalblockern auf diese Reaktionskette zu erkennen geben, ob dieser Effekt über eine Kapillarvermehrung läuft oder über andere Veränderungen im biochemischen, rheologischen oder immunologischen Bereich (TSAPENKO 1998, MOSER 2000, KEUPP in Vorbereitung).

## 2 MATERIAL UND METHODIK

### 2.1 Versuchsreihen

Die Untersuchungen sollten am Tiermodell durchgeführt werden, dazu wurde das Göttinger Miniaturschwein als Versuchsobjekt gewählt (Abbildung 2-1). Die Tiere erwiesen sich als kooperativ, und ihre Größe ( $46,05 \pm 7,7$  kg, Tabelle 2-1) praktikabel. Wichtig war, dass die Gefäßkaliber der Miniaturschweine noch in einem Bereich lagen, der keine Mikrochirurgie erforderlich machte, bzw. für gefäßchirurgische Manipulationen keine größeren Schwierigkeiten bereitete.



Abbildung 2-1 Das Göttinger Miniaturschwein

Das Alter der Tiere schwankte zwischen 11 und 54 Monaten, der Durchschnitt lag bei 19 Monaten (Tabelle 2-1). Dabei waren unter den Versuchstieren 12 Männchen und 17 Weibchen, wobei 2 der Männchen kastriert waren.

Gruppe

		A	B	C	D	Gesamt
Gewicht (kg)	Mw	49	41	47	46	46
	Min - Max	40 - 57	32 - 56	36 - 65	40 - 60	32 - 65
Alter (Monate)	Mw	21	29	13	13	19
	Min - Max	11 - 36	18 - 54	12 - 13	11 - 21	11 - 54
Geschlecht	M:W:M-kastr.	1:6	5:2	3:3:2	1:6	10:17:2

Tabelle 2-1 Gewicht, Alter und Geschlecht der Versuchstiere nach Gruppen

Um die Abhängigkeit der Reperfusionparameter von der Kapillarzahl überprüfen zu können, musste zuvor das Kapillarbett bestimmter Tiere gezielt verändert werden. Es wurden vier verschiedene Gruppen gebildet (Tabelle 2-2).

Die Tiere wurden den Versuchsgruppen zufällig zugeteilt.

Gruppe	Eingriff	Ziel	Kapillarbett
Gruppe A	∅	gesundes Gefäßbett	normal
Gruppe B	Nierenarterienstenose	Hypertonie	rarefiziert
Gruppe C	Femoralarterienstenose	chronische Ischämie	hyperkapillarisiert
Gruppe D	Nierenarterienstenose	Hypertonie	rarefiziert + Ca-Kanalblocker =Re-kapillarisiert

Tabelle 2-2 Gruppenkennzeichen

Eine erste Gruppe (Gruppe A) wurde nur dem Akute-Ischämie/ Reperfusionsexperiment (= aI/R) unterzogen. Man ging davon aus, dass diese Tiere eine durchschnittliche, physiologische Kapillarzahl aufwiesen.

Über den Goldblattmechanismus durch eine einseitige subtotale Nierenarterienstenose wurde bei einer zweiten Gruppe (B) ein Bluthochdruck erzeugt. Nach einer Hypertoniezeit von  $41 \pm 7$  Tagen folgte dann das aI/R. Zu dieser Zeit sollte sich eine Kapillarbetrarefizierung manifestiert haben.

Die Tiere der dritten Gruppe (C) durchliefen das aI/R  $63 \pm 6$  Tage nach einer partiellen Femoralarterienstenose. Eine Hyperkapillarisation sollte in diesem Zeitraum induziert werden.

Außerdem wurde einer vierten Gruppe (D), die zuvor ebenfalls einen Bluthochdruck bzw. eine Rarefizierung des Kapillarbetts nach der Nierenarterienstenose entwickeln sollte,  $51 \pm 3$  Tage vor dem abschließenden Experiment der

Calcium-Kanalblocker Nifedipin (Nifehexal<sup>®</sup>) als Kapsel in einer Dosierung von 1 mal 5 mg täglich verabreicht. Eine Kontrollbiopsie wurde den Tieren  $88 \pm 8$  Tage nach der Nierenarterienstenosierung entnommen. Die Gesamtdauer von der Voroperation bis zum abschließenden aI/R betrug bei diesen Schweinen  $363 \pm 6$  Tage, also ca. ein Jahr. Mit diesen Experimenten sollte die Reversibilität der Kapillarbettrarefektion und evtl. eine reduzierte Neigung zur Entwicklung eines NoRe gezeigt werden.

### 2.1.1 Anästhesie, Versuchsvorbereitung und Nachbehandlung

Nach Sedierung der Miniaturschweine mit Azaperon (Stressnil<sup>®</sup> 15mg/kg i. m.) wurde ein Venenkatheter in eine Ohrvene gelegt und die Narkose mittels Thiopental-Natrium (Trapanal<sup>®</sup> 5-7 mg/kg) i. v. eingeleitet. Die Tiere wurden anschließend endotracheal intubiert und eine Inhalationsnarkose mit Lachgas (N<sub>2</sub>O; 2,4:1,0/ Min) und Überdruckbeatmung (DRÄGER Pulmolog) mit einer Frequenz von 12/ Min durchgeführt. Vor jedem Operationsbeginn und vor vermutlich schmerzhaften Manipulationen wurde Fentanyl<sup>®</sup> als Analgetikum (0,1-0,30 mg i. v.) appliziert. Bei der teilweise bis zu 12 Stunden dauernden Narkose im aI/R wurde Fentanyl<sup>®</sup> auch prophylaktisch in regelmäßigen Abständen bzw. zur Narkosevertiefung verabreicht. Die Narkose wurde mit Thiopental-Natrium in einer Dosierung von 5 mg pro Stunde aufrechterhalten.

Als Dauerinfusion liefen Natriumchloridlösung 0,9% und Glukoselösung 10%, der Kalium und Insulin zugegeben war, im Wechsel. Das Gesamtvolumen der Infusionen betrug etwa 2,5-3 Liter in 24 Stunden. Darüber hinaus wurden Flüssigkeitsverluste und evtl. Symptome eines drohenden Schocks mit 500 ml HAES 6% oder 250 ml Albuminlösung 20% behandelt.

Bei auftretenden Komplikationen während Operation oder Narkose, wie zum Beispiel Herzrhythmusstörungen, Blutdruckanstieg oder -abfall, Zeichen von beginnender Herzinsuffizienz oder Schock, wurde symptomorientiert therapiert. Dabei wurde darauf geachtet, Substanzen zu verwenden, die keinen Einfluss auf Gefäßtonus oder Hämodynamik haben.

Die Überwachung der Versuchstiere erfolgte via EKG, Pulsoxymeter für Puls und Sauerstoffsättigung, eine blutige Blutdruckmessung über den arteriellen Katheter und regelmäßig entnommene arterielle und venöse Blutproben zu Gasanalyse. An charakterischen Zeitpunkten des Versuchsablaufs wurden daneben verschiedene Laborparameter (Elektrolyte, Blutbild, rheologische Kenngrößen usw.) bestimmt als Teil weiterer Dissertationen (TSAPENKO 1998, MOSER 2000, KEUPP in Vorbereitung).

Das al/R wurde mit der Injektion von T61<sup>®</sup> bei bestehender Narkose beendet. Die Beatmungsmaschine wurde erst bei eingetretener EKG- Nulllinie, Pulslosigkeit in der Oxymetrie und Fehlen jeglicher Lebenszeichen abgestellt.

Die Tiere der Vorversuchsgruppen (B, C, D) wurden nach Abschluss der Voroperationen durch Beendigung der N<sub>2</sub>O- Zufuhr ausgeleitet. Bis zum Eintreten einer suffizienten Spontanatmung wurden die Versuchstiere mit dem Pulsoxymeter überwacht und weiterhin beatmet. Nach Extubation und Erwachen wurden sie noch für einige Stunden beobachtet. Diese Miniaturschweine bekamen postoperativ eine prophylaktische Antibiotikatherapie mit Tardomyzel<sup>®</sup> (Breitpektrumantibiotikum für Tiere; Kombinationssuspension aus Penicillin und Streptomycin mit Depotwirkung) 10ml i. m. und eine regelmäßige postoperative Schmerztherapie mit Metamizol (Novalgin<sup>®</sup>; 3 x 2 ml/ die für 3 Tage).

### 2.1.2 Voroperationen

Alle Eingriffe wurden unter den allgemein üblichen sterilen Kautelen durchgeführt. Der Inzisionsbereich wurde rasiert, gewaschen, chemisch desinfiziert und steril abgedeckt.

### 2.1.2.1 Stenosierung der linken Nierenarterien (Gruppe B und D)

In Seitenlagerung wurde ein Rippenbogenrandschnitt durchgeführt. Nach Durchtrennung der Abdominalmuskulatur erfolgte stumpf das Vordringen ins Retroperitoneum. Es wurden die linke Niere mit Gefäßstil und zur Übersicht die A. renalis bis zu ihrem Abgang aus der Aorta freipräpariert. Durch Bestimmung der Nierendurchblutung mit der Laserflow-Sonde vor und nach Abbinden der Nierenarterie mit einem Nabelbändchen konnte das Ausmaß der Verengung festgelegt werden. Die Stenose wurde im distalen Drittel der A. renalis angelegt und die Perfusion laseroxymetrisch auf etwa 65-80% (Tabelle 2-3) reduziert.

Vor Verschluss der Bauchdecken wurden zur Infektionsprophylaxe 80 mg Gentamycin lokal instilliert.

Es folgten Muskel-, Subkutan- und auch Intrakutannaht jeweils mit resorbierbaren Fäden, um die Belastung der Tiere auf ein Minimum zu beschränken. Der Blutverlust betrug bei diesen Eingriffen insgesamt jeweils weniger als 100ml. Bei keiner Nierenarterienstenose traten Komplikationen auf.

Stichprobenartig wurde bei 2 Schweinen 4 Wochen postoperativ der Blutdruck blutig an der A. axillaris gemessen, um die Effektivität des Eingriffs zu bestätigen.

Laserflow	vor Nierenarterienstenose	nach	Laserflow in Prozent bezogen auf normal
Mittelwert	33,21	6,73	21,59%
Sx	21,05	4,1	4,81%

Tabelle 2-3 Stenosierungsgrad der Nierenarterie gemessen mittels laseroxymetrischem Flow



### 2.1.2.2 Stenosierung der A. femoralis (Gruppe C)

In Rückenlagerung wurde ein Hautschnitt etwa 2 cm kranial vom Lig. Inguinale, zu diesem parallel, durchgeführt. Nach vorsichtigem Trennen von parietalem Peritoneum und Psoasfaszie wurde am M. psoas entlang die A. femoralis aufgesucht. Kurz vor ihrem Eintritt in den Muskel wurde ein Nabelbändchen so um das Gefäß gelegt und mit Naht so fixiert, dass eine Stenose von etwa 50 % (Tabelle 2-4) erreicht wurde. Der Erfolg wurde laseroxymetrisch kontrolliert. Lokal wurden 80 mg Gentamycin zur Infektionsprophylaxe appliziert. Es folgte der sukzessive Verschluss der Bauchdecke. Alle Nähte wurden mit resorbierbaren Fäden angelegt. Der Blutverlust lag unter 50 ml und damit vernachlässigbar. Peri- und postoperativ waren keine Komplikationen zu verzeichnen.

Blutdruck in mmHg	vor Femoralarterienstenose	nach	Blutdruck in Prozent bezogen auf normal
Mittelwert	79	36,86	45,47%
Sx	19,24	13,34	7,74%

Tabelle 2-4 Stenosierungsgrad an der A. femoralis nach Blutdruck

### 2.1.3 Akute Ischämie und Reperfusion

Der abschließende Versuch verlief in verschiedenen Etappen, wobei zunächst, nach Narkoseeinleitung und -durchführung in vorbeschriebener Weise, die Messinstrumente angebracht und die Ischämie des Hinterlaufs vorgenommen wurden. Anschließend wurde nach 6 Stunden die Durchblutung der A. femoralis wiederhergestellt. Es folgten stündliche Messungen verschiedener Parameter und Biopsieentnahmen an markanten Versuchszeitpunkten.

### 2.1.3.1 Eröffnung des Bauchraumes und retroperitonealer Zugang

In Rückenlage wurden beidseits paramedian am lateralen Rand des M. rectus abdominis Hautschnitte von etwa 5 cm unterhalb des Rippenbogens bis zur Mitte des Lig. inguinale gelegt. Unter Blutstillung wurde die Bauchhöhle mit Diathermiemesser und stumpfer Untermination gefäßschonend eröffnet. Es sollten Muskelblutungen und v. a. eine Verletzung des Peritoneums weitestgehend vermieden werden. Auf diese Weise wurden Flüssigkeitsverluste über Blutung oder Transsudation, die die Hämodynamik hätten beeinflussen könnten, auf ein Minimum reduziert.

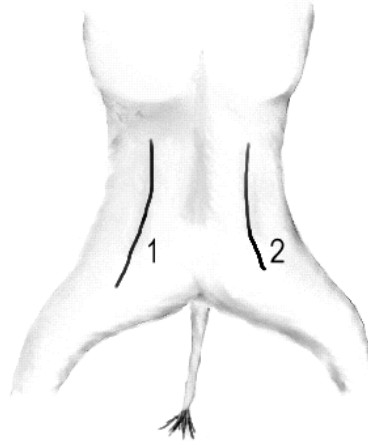


Abbildung 2-2 Schnittführung bei dem Ischämie/ Reperfusion- Versuch.

1) zur Ligatur der A. iliaca rechts, 2) zur Flussmessung in der A. iliaca links (Kontrolle)

### 2.1.3.2 Gefäßpräparation

Zur Darstellung der Gefäße wurde in den Retroperitonealraum eingegangen und diese vorsichtig soweit präpariert bis kaudale Aorta, A. iliaca communis beidseits, die Gefäßstraße ins rechte Bein und deren Abgänge 1. Ordnung vollständig sichtbar wurden. Zur kontinuierlichen Blutdruckmessung wurde ein Katheter in die linke A. iliaca com. gelegt. Ein weiterer Katheter wurde in die rechte V. iliaca com. für Blutabnahmen aus dem zu untersuchenden Bein und eventuelle therapeutisch- medikamentöse Interventionen eingebracht.

### 2.1.3.3 Messung der lokalen Hämodynamik

Induktive Fluss- Messköpfe (HELLIGE VDE 0750) wurden zur Dokumentation der Flussrate jeweils auf die linke und rechte A. iliaca externa gesetzt. Außerdem wurde die kapilläre Perfusion des zu untersuchenden Muskels in Form von Fluss, Volumen und Fließgeschwindigkeit mittels zweier Laseroxymetriesonden (LASERFLO BMP-403A / MOOR INSTRUMENTS DRT4) quantitativ festgehalten. Die Laserflowmetrie wird für eine sehr geeignete Methode zur Blutflussmessung im postischämischen Muskelgewebe angesehen (NICHOLSON et al. 1985, SKJELDAL et al. 1993, PEMBERTON et al. 1994). Dazu wurde die Haut über den Mm. graciles beidseits inzidiert (analog den Biopsien, Abbildung 2-3). Nach stumpfer Präparation von Subkutangewebe, Faszie und Epimysium wurde ein ca. 1 cm<sup>2</sup> großer Bereich der Muskeln freigelegt. Die Sonden wurden direkt am Muskel angebracht.

Dabei dienten die Werte der linken Seite als Indikatoren für die systemische Hämodynamik und ermöglichten eine Differenzierung zwischen lokaler ischämiebedingter Minderperfusion und einer Makrozirkulationsstörung im Rahmen eines eventuellen Schocks.

### 2.1.3.4 Experimentelle Ischämie

Kurz vor Induzieren der Ischämie wurden zur Thromboseprophylaxe 5000 i. E. Heparin (Liquemin®) intraarteriell injiziert. Nach diesen Vorbereitungen, die etwa 3-4 Stunden in Anspruch nahmen, wurde die rechte A. iliaca com. am Abgang aus der Aorta mit Gefäßklemmen unterbunden. Ebenso wurden sämtliche vom Hauptstamm der Iliaca abzweigende Gefäße zwischen A. ilicaca interna und dem Austritt der A. iliaca ext. aus dem Becken – als A. femoralis – abgeklemmt. Somit war die Durchblutung über eventuelle Kollateralschlüsse von kontralateral auf ein Minimum reduziert. Die Gefäße wurden von zentral nach peripher verschlossen und jeweils zuvor nach distal ausgestrichen. Damit sollte die Koagulation von in nicht durchflossenen Gefäßabschnitten verbliebenem Blut verhindert werden, die bei der späteren Eröffnung zu Embolien der Extremität hätte führen können. Die daraus entstehende Makrozirkulationsstörung

hätte eine mikrozirkulatorische Störung bzw. ein No- Reflow vortäuschen können. Eine eventuell noch vorhandene Versorgung über Hautgefäße wurde durch Anlegen einer Massen- Ligatur am proximalen Oberschenkel vermindert. Durch diese Maßnahmen und zusätzliches Hochlagern konnte die Durchblutung des M. gracilis laseroptisch auf 2-8% abgesenkt werden. Damit befand sich der rechte Hinterlauf des Tieres im Zustand einer akuten Ischämie.

Für die Dauer der Ischämie von 6 Stunden und auch anschließend während der 12 Stunden Reperfusion wurde die Bauchdecke mit Backhaus- Klemmen verschlossen und die verbleibenden Wundränder mit feuchten Tüchern bedeckt. Diese Vorgehensweise war nötig, um den Flüssigkeitsverlust über das peritoneale Transsudat einzuschränken. Kontinuierlich wurden die Vitalzeichen des Schweins und die Perfusionsparameter für den linken Hinterlauf kontrolliert.

#### 2.1.3.5 Reperfusionsexperimente

Nach 6 Stunden wurde die Reperfusion durch Entfernung der Ligatur und Öffnen aller Klemmen eingeleitet. In dieser Zeit wurden Vitalzeichen und Perfusionsparameter besonders engmaschig überwacht.

Die Reperfusion nach der akuten Ischämie wurde für alle Gruppen in dieser Art und Weise durchgeführt; nur bei der Gruppe mit vorbestehender chronischer Ischämie (Gruppe C) war ein weiterer Arbeitsschritt notwendig: Durch die länger bestehende Stenosierung waren die Gefäßlumina nicht mehr durchgängig, so dass eine alleinige Lösung der Ligatur nicht für die Reperfusion ausreichte.

Das ligierte Segment der Arterie wurde exzidiert und diese durch eine fortlaufende Naht mit Prolene 7-0 reanastomosiert. Diese zusätzliche Praktik führte bei keinem Tier dieser Gruppe zu Komplikationen.

Versuchsende. Nach 12- stündiger Reperfusion – bei fortlaufender Protokollierung der wichtigsten Parameter und regelmäßiger Entnahme von Blutproben und Muskelgewebe für die histologische Aufarbeitung – wurden alle Miniaturschweine durch intravenöse Verabreichung von 10- 20 ml T61<sup>®</sup> (Injektionslösung aus Embutramid, Mebezonium und Tetracain) getötet.

## 2.2 Histologie

Im Folgenden sollen die Entnahme der Biopsien, deren Aufarbeitung und die mikroskopischen Techniken beschrieben werden.

### 2.2.1 Biopsieentnahme

Jedem Schwein wurden nach Einleitung der Narkose, vor Beginn der jeweiligen Operationen (Renalis- Stenose/ Iliaca- Stenose) und während des a/R Muskelbiopsien entnommen. Dazu wurde ein je ca. 1cm x 2cm großes Muskelstück am medialen Teil des M. gracilis exzidiert. Der Gracilis stellt beim Schwein einen breiten flachen Muskel der obersten Schicht dar, der sich für die Biopsie günstig erwies. Dabei wurde vor den Voroperationen zur Muskelschonung links (Abbildung 2-3, B), beim akuten Versuch selbstverständlich rechts (Abbildung 2-3, A), biopsiert. Die Biopsien wurden vor Anlegen der Ischämie, eine Stunde nach Reperfusionbeginn und nach zwölfstündiger Reperfusion entnommen.

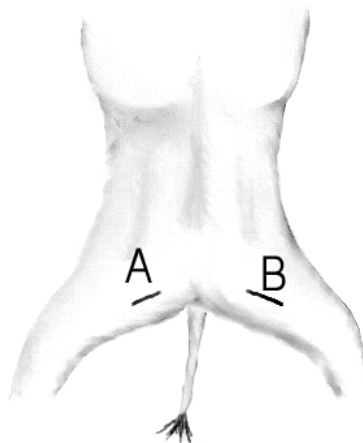


Abbildung 2-3 Schnittführung zur Biopsieentnahme

### 2.2.2 Histologische Aufarbeitung

Konservierung und Fixierung. Das entnommene Gewebe wurde geteilt, ein Drittel wurde sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und anschließend im Gefrierschrank bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Der Rest wurde in Formalin (4%; phosphatgepuffert) eingelegt und einige Tage darin belassen.

Es war darauf zu achten, dass das Formalin auf keinen Fall Schwermetallsalze enthielt, da diese die Polymerisation hätten stören können (HAGEMANN/ROSEMUND 1989).

Einbettung in GMA. Das formalinfixierte Präparat wurde nach HEINE (1973a, 1973b) in Glycolmethacrylat (GMA) eingebettet.

Für die Einbettung der Biopsien in Kapseln mussten Stücke von ca. 1,2 cm Länge und 0,5 cm Durchmesser geschnitten werden.

Diese Muskelstücke wurden unter fließendem Aqua demineralis für einige Minuten ausgewaschen, um das Formalin zu entfernen, dann in das Grundgemisch oder in reine GMA-Lösung eingelegt, damit der flüssige Kunststoff das Muskelstück infiltrieren konnte. Nach etwa 48 Stunden, wenn das Präparat auf den Grund gesunken war, war die Infiltration beendet. Das Endergebnis war hierbei mit beiden Infiltrationsmedien in etwa gleich.

Das Grundgemisch, das immer frisch hergestellt werden sollte, bestand aus 95% GMA, 5% Polyethylenglycol 400 (PEG = Weichmacher) und je 5 mg Benzoylperoxidpulver (=Starter) pro ml Gesamtmenge Grundgemisch (GEIER 1986). Die Lösungszeit des Gemisches lag bei Raumtemperatur bei ca. 24 Stunden. Ohne Beeinträchtigung der Präparatequalität oder des Polymerisierungsprozesses, konnte die Lösung des Benzoylperoxidpulvers, durch Mischen auf dem Magnetrührer bei  $40-50^{\circ}\text{C}$ , auf wenige Minuten reduziert werden (RUDELLE 1967).

In Gelatine kapseln der Größe 00 wurde eine Lösung aus 15 Teilen PEG und einem Teil N-N-Dimethylanilin (N-DMA) gegeben, dem die Rolle eines Akzelerators zukam. Danach wurden sie mit Grundgemisch aufgefüllt.

Zur gleichmäßigen, vollständigen Polymerisierung mussten beide Komponenten gut gemischt werden. Die schon bei Zimmertemperatur stattfindende

Polymerisation setzte augenblicklich ein, deshalb musste das Biopsiestück sofort in die gefüllten Kapseln eingebracht werden.

Dabei war darauf zu achten, dass die nochmals angefrischten Muskelfasern parallel zur Längsachse der Gelatinekapsel ausgerichtet waren, um zu gewährleisten, dass beim Schneiden die Muskelstücke – und damit die parallel zur Faserrichtung verlaufenden Kapillaren – möglichst quer getroffen wurden.

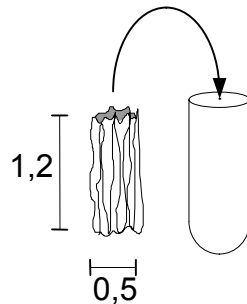


Abbildung 2-4 Platzierung des Muskelpräparats in der Gelatinekapsel

Das Muskelstück sollte im Übrigen tief am Grund der Kapsel plaziert sein, um das Anschneiden und Trimmen zu erleichtern.

Bei einer entstehenden Polymerisationswärme von etwa 60-80° C (ASHFORD et al. 1986) war die Polymerisation nach etwa 5-10 Minuten abgeschlossen. Anschließend musste die Kapsel jedoch noch für mindestens 24 Stunden im Brutschrank durchhärten.

Da alle verwendeten Substanzen mehr oder weniger toxisch sind, wurden alle Arbeiten mit entsprechenden Schutzmaßnahmen unter dem Abzug durchgeführt.

Methodisch- praktische Probleme. Leichte Schwankungen in den Konzentrationen der einzelnen Komponenten hatten keinen Einfluss auf die Polymerisation, d. h. Zustandekommen der Polymerisation, Polymerisationszeit oder Ausmaß der Polymerisation (RUDELLE 1967, RUDELLE 1983). So mussten die Substanzen nicht sehr genau abgemessen werden. Am ehesten waren noch Probleme bei groben Dosierungsfehlern des N- DMA zu erwarten (RUDELLE 1967). Beispielsweise wurde bei Zugabe einer zu großen Menge der Kunststoff zu hart und teilweise trüb, bei Unterschreitung einer gewissen

Konzentration lief die Polymerisation nicht vollständig ab. Das führte zur Beeinträchtigung der Schneidefähigkeit (GERRITS et al. 1990). Die Härte der Präparate ließ sich durch die Menge an Weichmachern, wie Wasser und PEG, regulieren. (RUDELLE 1967, MYHRE/ DEPAOLI 1985, GERRITS et al. 1990)

Sollte man trotzdem zu weiche Kapseln erhalten haben, konnte man versuchen, diese in Trocknern (MHYRE/ DEPAOLI 1985, ABOIT et al. 1994) noch etwas nachzuhärten oder nach MHYRE/ DEPAOLI (1985) die Kapseln zusammen mit Kaliumkarbonat in einem verschlossenen Gefäß aufzubewahren.

Die Kapseln konnten unbegrenzte Zeit gelagert werden; der mit der Zeit eintretende Wasserverlust konnte durch kurzes Einlegen in eine Feuchtluftkammer ausgeglichen werden (RUDELLE 1967). Die Ausprägung der Polymerisation und damit der Härte zeigte auch eine Abhängigkeit von Temperatur und Luftfeuchtigkeit, so dass in dieser Arbeit unterschiedliche Konsistenzen resultierten.

Chemisch/ physikalische Eigenschaften von Glycolmetacrylat. GMA ist eine klare, farblose Flüssigkeit aus Monomeren.

GMA zeigt hygroskopische Eigenschaften und ist folglich gut wasserlöslich. Der Siedepunkt liegt bei ca. 90°C, die Dichte beträgt 1,065 (bei 20°C), die Viskosität 0,701 (20°C) (ROSENBERG et al. 1960, RUDELLE 1967)

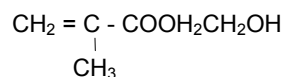


Abbildung 2-5 Strukturformel von GMA

Die Einbettung mit GMA beruht auf folgendem Mechanismus:

Es wird angenommen, dass die Polymerisation auf der Wirkung von Sauerstoffradikalen beruht (RUDELLE 1983). Die Monomere der Lösung diffundieren ins Gewebe, nach Zugabe des Akzelerators N- DMA wird die Sauerstoffradikalbildung initiiert. Diese setzt sich fort und es kommt dadurch zur katalytischen Lyse der Benzoylperoxide (RUDELLE 1983). Diese wiederum setzen die Polymerisation in Gang und es entstehen lange polymere Ketten des GMA, die das Gewebe umhüllen (GERRITS et al. 1990).

Schneiden der Präparate. An einem Rotationsmikrotom (MICROM) wurden mit einem D- Stahlmesser 2 mm dicke Schnitte angefertigt. Anschließend



wurden diese im Wasserbad gestreckt und jeweils 3 Schnitte pro Objektträger bei 50-60° C luftgetrocknet. Von jeder Biopsie wurden so 9 Schnitte angefertigt.

Da das Trimmen des doch recht harten Kunststoffes das Messer schnell abstumpfte, wurde dazu eine Rasierklinge (RUDELLE 1967) oder eine Feile benutzt.

Die optimale Messerneigung des Mikrotoms war dabei etwa 11°. Sie ist abhängig von der Gewebearbeit, der Konsistenz des Kunststoffes und von der Bauart des Mikrotoms. Wenn sich die Schnitte zusammenschoben oder die Schnittdicke schon makroskopisch innerhalb des Schnittes variierte, musste die Neigung steiler eingestellt werden. Zu steil war das Messer angesetzt, wenn das Material splitterte oder mikroskopische Querrillen bzw. -wellen zu sehen waren (ROMEIS 1989).

Färben der Muskelpräparate. Die in einigen Arbeiten (BLAAUW et al. 1987, STRAATEN et al. 1987, GERRITS et al. 1990, ABBOTT et al. 1994) verwendete Toluidinblaufärbung stellte sich für die Kapillarzählung als weniger geeignet heraus, da die Färbung sehr sensibel sowohl auf leicht schwankende Schnittstärken, wie auch auf die Härte des Materials reagierte. Zudem war die optimale Färbekonzentration recht schwierig durch Differenzierung und Färbedauer einzustellen, und das Präparat erschien inhomogen und insgesamt verwaschen. Nach GERRITS et al. (1990) führen unterschiedliche Mischungsverhältnisse der GMA-Lösung zu Unterschieden in der Anfärbbarkeit, woraus man schließen kann, dass die in dieser Arbeit verwendete Rezeptur für die Toluidinblaufärbung ungeeignet gewesen wäre.

Aus diesen Gründen wurde sowohl die pathologische Beurteilung, als auch die Kapillarzählung bei HE-Übersichtsfärbung durchgeführt. Die Färbedauer wurde hierbei, wegen des schlecht penetrierenden Kunststoffes, verdoppelt. Abschließend wurden alle Gewebeschnitte mit Xylol abgedeckt.

### 2.2.3 Lichtmikroskopische Arbeitsweise

Zur Bestimmung der Kapillanzahl wurden die Präparate nach Verblindung am Lichtmikroskop bei 400-facher Vergrößerungen betrachtet und die Kapillaren im Verhältnis zum Muskelfaseranteil gezählt. Dabei wurden Zahlen von mindestens drei verschiedenen Schnitten erhoben, um eine zufällige Verteilung der

Stichproben zu sichern. Auch die histopathologische Beurteilung erfolgte am Lichtmikroskop. Über einen Adapter wurden die Photographien angefertigt.

Kapillarzählung. Die Kapillaren wurden nach einem streng standardisierten Verfahren identifiziert, um eine vergleichbare relative Kapillanzahl pro Biopsie zu erhalten (HARTUNG 1986).

So wurden Kapillaren nur als solche anerkannt, wenn sich in ihrem Lumen genau ein Erythrozyt befand. Dabei spielte es keine Rolle, ob ein Endothelkern der Kapillare angeschnitten war oder nicht (Abbildung 2-6 a).

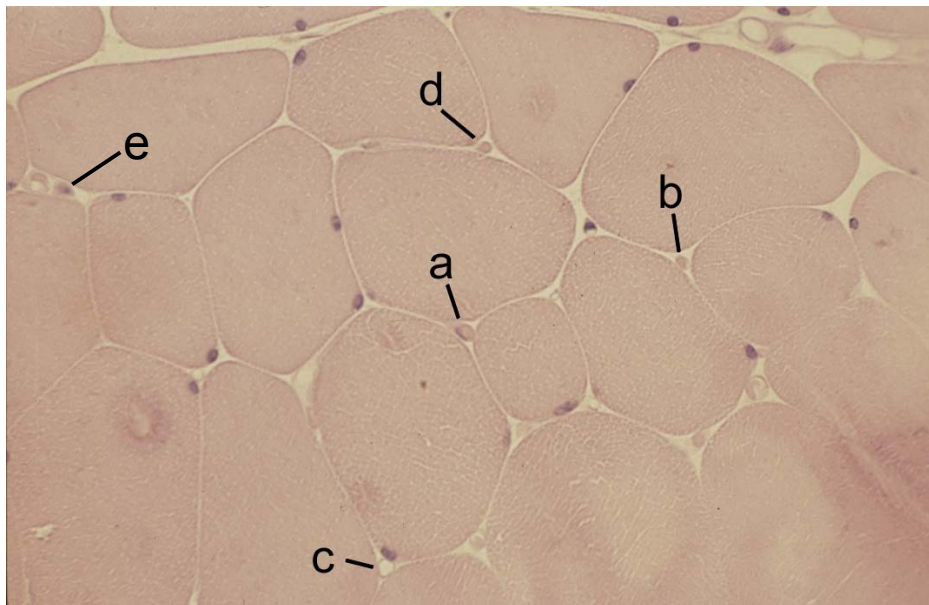


Abbildung 2-6 Kapillardifferenzierung. a Kapillare mit angeschnittenem Endothelkern; b Erythrozyt mit umgebender Kapillarwand; c eindeutige Kapillarstruktur ohne Erythrozyt; d freier Erythrozyt; e Fibrozyt

Gezählt wurden also nur runde Erythrozyten mit klar erkennbarem Randsaum, der der Kapillarwand entsprach (Abbildung 2-6 b). Ausgeschossen waren somit freie Erythrozyten (Abbildung 2-6 d), die vor allem im Laufe der Reperfusion regelmäßig extravasal gesehen wurden; außerdem andere runde Bindegewebsstrukturen im Bereich der Muskelfasersepten, wie z. B. Fibrozyten (Abbildung 2-6 e). Kapillaren, in denen sich kein Erythrozyt befand, wurden also mit diesem System nicht erfasst (Abbildung 2-6 c). Schwierigkeiten bereiteten verformte Erythrozyten, die in einer Kapillare zweimal angeschnitten wurden. Sie

hätten mit Arteriolen mit mehreren Erythrozyten im Lumen verwechselt werden können (Tabelle 2-5). Vorsicht war geboten bei Muskelbündeln, deren Interstitium ausgetretenes Plasma bzw. Fibrin enthielt. Freie Erythrozyten, die von diesem umgeben waren, konnten für Kapillaren gehalten werden. Ebenso ähnelte manchmal Plasma/ Fibrin in Kapillaren stark den Erythrozyten (Abbildung 2-7). Je nach Schnittebene wurden Erythrozyten in Kapillaren teilweise tangential angeschnitten und somit nicht als Kapillare gezählt.

Fehlerquelle	Morphologie	Folge
Plasma um Erythrozyt		Kapillare?
<u>Erythrozyt</u>		
quer getroffen		normal
tangential getroffen		
tangential getroffen		
Intrakapillär verformt, zweifach getroffen		2 Kapillaren?

Tabelle 2-5 Probleme beim Kapillarzählen

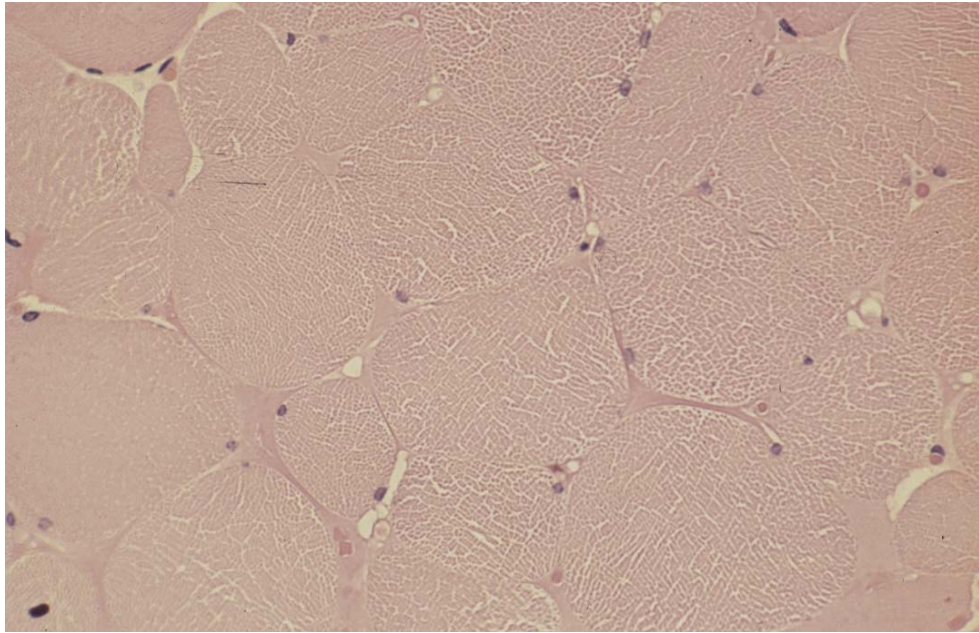


Abbildung 2-7 ausgetretenes Plasma um Erythrozyten

Da – möglicherweise durch das während des Versuchs auftretende Ödem – das Gewebe auf manchen Präparaten ungleichmäßig verteilt war (Abbildung 2-8 bis Abbildung 2-10), wurde nicht nach Gesichtsfeldern ausgezählt, sondern das Verhältnis zwischen Kapillaren und den von diesen versorgten Muskelfasern bestimmt (Capillary/ Fiber- Ratio = C/ F- Ratio).

Nur Muskelfasern, die ganz im jeweiligen Schnitt lagen, rundum beurteilbar und quer getroffen waren, wurden gezählt. Es wurde versucht, eine repräsentative Anzahl von etwa 1000 Fasern pro Biopsie auf ihre Kapillarversorgung zu untersuchen.

An dieser Stelle muss nochmals darauf hingewiesen werden, dass es in dieser Arbeit nicht darum ging, die absolute Kapillardichte in den untersuchten Muskelproben zu bestimmen, sondern eine, im Verlauf des Experiments und mit den anderen Parametern gut vergleichbare, *relative* Kapillanzahl.

Diese Vorgehensweise bietet eine höhere Standardisierungsmöglichkeit. Abgesehen davon ist die Einheit C/ F- Ratio international gebräuchlicher und daher mit anderen Forschungen besser vergleichbar.

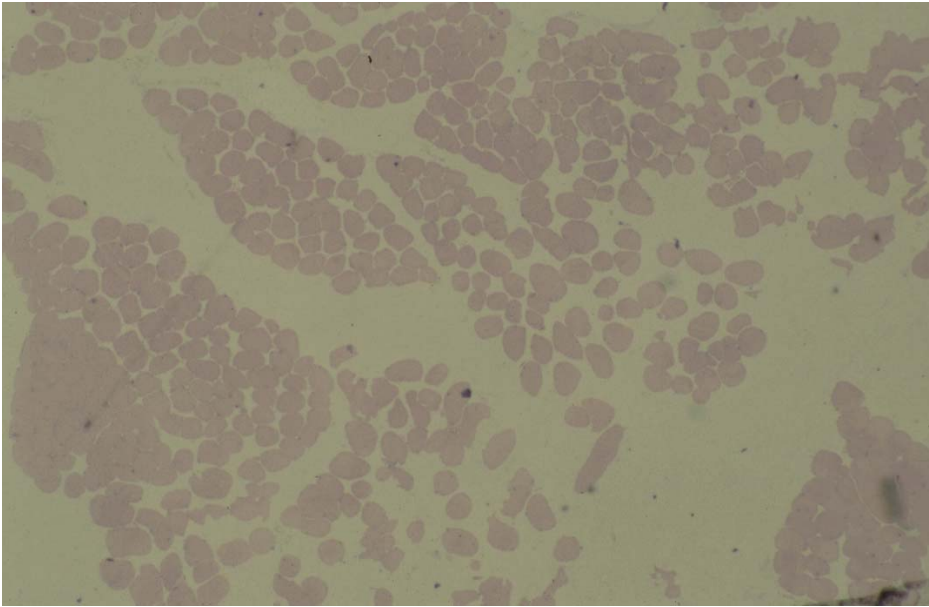


Abbildung 2-8  
Muskefaserödem

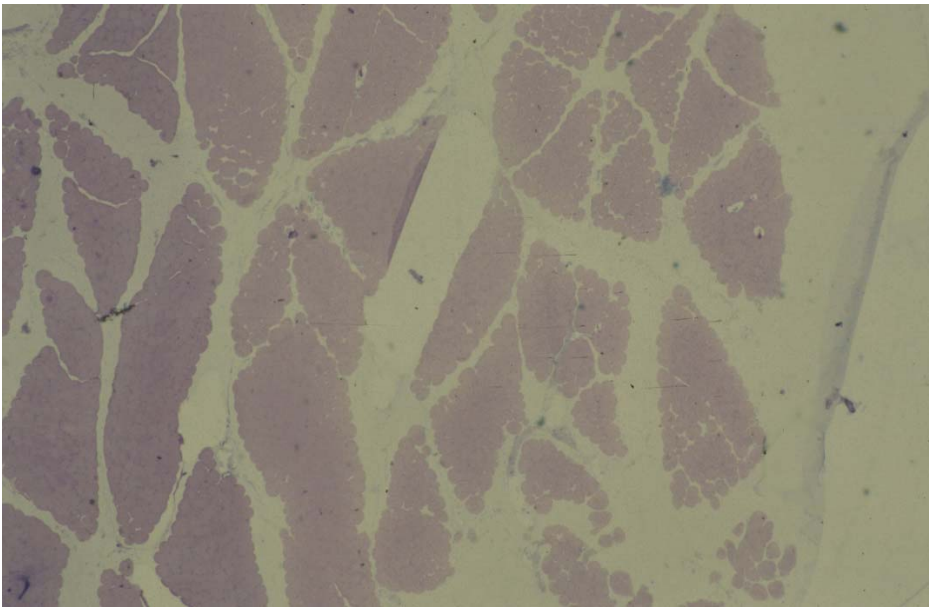


Abbildung 2-9  
Interstielles  
Muskelödem

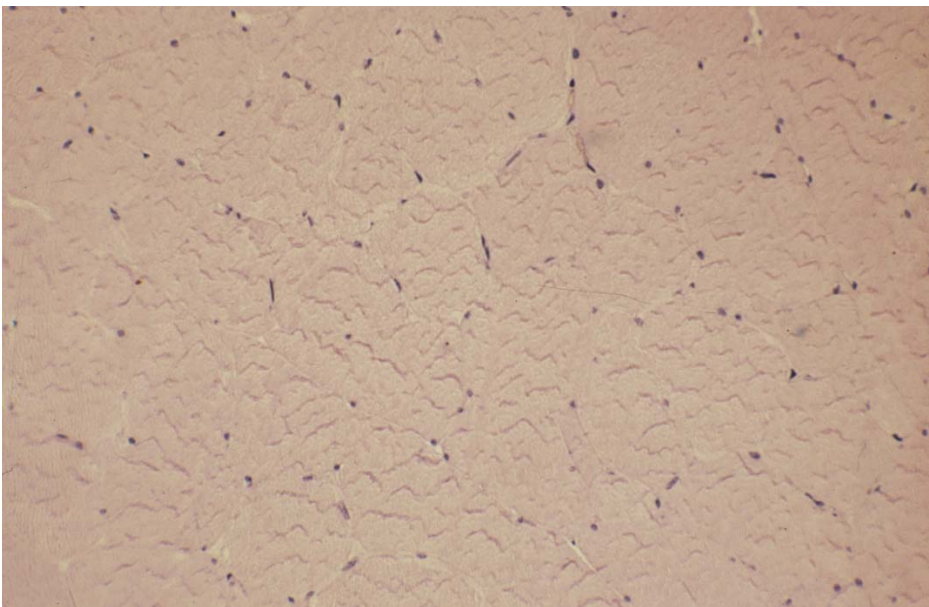


Abbildung 2-10  
Aufgehobene In-  
terzellularräume

Histomorphologie. Für die histopathologische Begutachtung wurden die Präparate nach verschiedenen Gesichtspunkten beurteilt (Tabelle 2-6).

Kriterium	Parameter		Beispiel	Vergrößerung (X)
Qualität	Einbettung/ Biopsie	Gewebemenge		32
		Quetschung/ Verschmelzung		100
	Schnitt	Schnittartefakte	(Querrillen, Abschürfung, Faltung, Löcher)	32
	Färbung	Färbeartefakte	(Flecken, Inhomogenität, Fremdkörper)	32
		Färbung Erys		250
	Färbung Gesamt		32	
Blutzellen	Erys	extravasal		250
	Leukos	extravasal		250
		intravasal		250
Gefäße	Ruptur			32/ 100
	Erythrozytenfülle			250
	Permeabilitätssteigerung	Plasma/ Fibrinaustritte		100
Ödem	Muskelfaserabstand			100
	Muskelbündelabstand			32
Nekrose	Stadium			100

Tabelle 2-6 Histologische Bewertungskriterien

Das erste Kriterium war die Qualität: Es sollten Artefakte differenziert werden, die durch morphologische und vor allem färberische Veränderungen die Kapillarbestimmung erschwerten (Abbildung 2-11 und 2-12). Damit wurde versucht, die Zählungsgenauigkeit einzuschätzen.

Die Erythrozyten und Leukozyten in den Präparaten stellten Indikatoren für die Perfusion und den Entzündungsprozess dar. Die Verteilung der Erythrozyten zwischen Intravasalraum und Interstitium wurde u. a. zur Beurteilung der Gefäßfragilität herangezogen, die der Leukozyten zur Bestimmung des Entzündungsgrades (Abbildung 2-13 und 2-14). Die Beurteilung der Gefäße (Wandödem, Leukozytenadhäsion, Endotheldefekte, usw.) gestaltete sich schwierig. Da die unterschiedlichen Abschnitte des Gefäßbaums in unterschiedlicher Häufigkeit in den Präparaten vorkamen und aufgrund unspezifischer Färbung



scher Färbung die Differenzierungsfähigkeit zwischen Arteriolen und Venulen stark eingeschränkt war, konnten hier keine sinnvollen Aussagen gemacht werden. Lediglich der massive Austritt des azidophilen Plasmas zwischen die Fasern (Abbildung 2-7) wurde als Hinweis auf Gefäßpermeabilitätsstörungen angesehen.

Über den Abstand der Muskelfasern bzw. -bündel wurde ein Ödem festgestellt (Abbildung 2-8, Abbildung 2-9, Abbildung 2-10 und Abbildung 2-14).

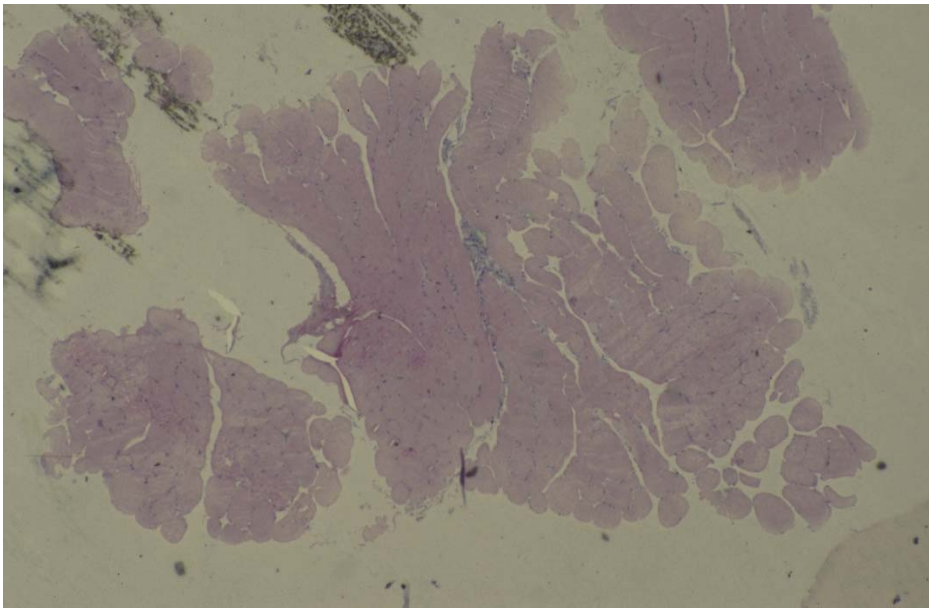


Abbildung 2-11  
überwiegend quer  
angeschnittene  
Muskelfasern

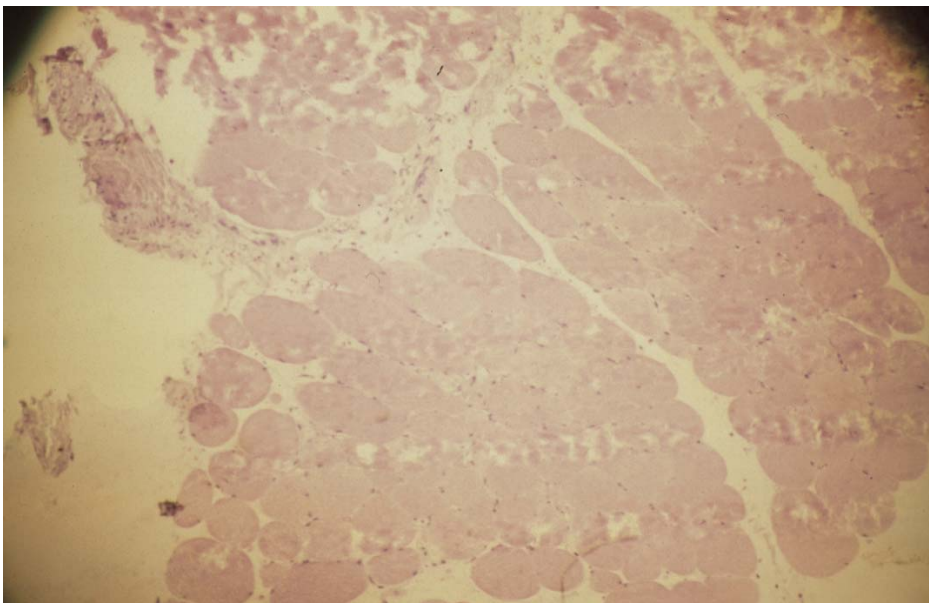


Abbildung 2-12  
durch Schneiden  
bedingte Querril-  
len, unterschiedli-  
che Schichtdik-  
ken, zerrissenes  
Muskelgewebe

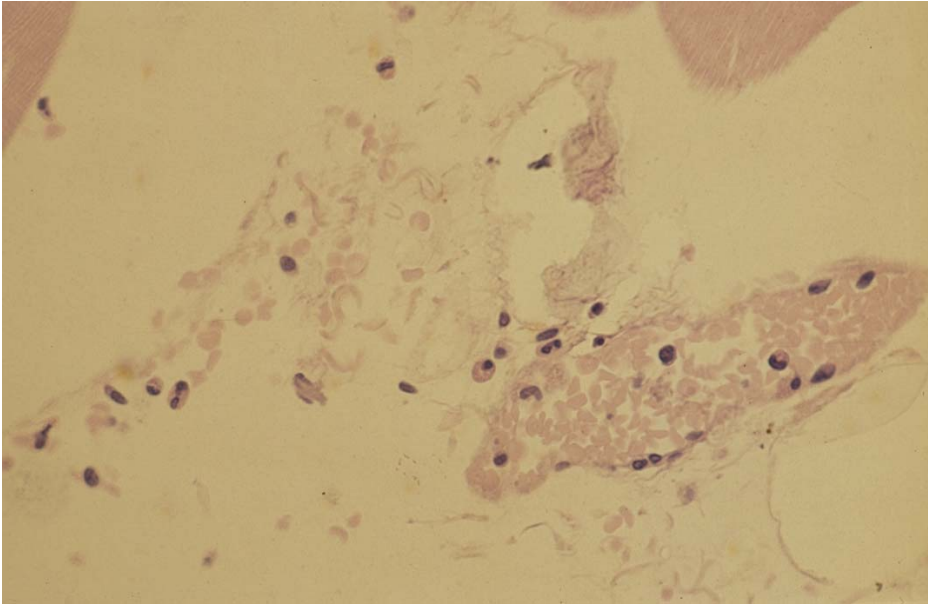


Abbildung 2-13  
quer angeschnittene Venule,  
reichlich Leukozyten  
innerhalb und  
außerhalb des  
Gefäßes



Abbildung 2-14  
Leukozyten im  
Muskelgewebe  
verteilt, beginnen-  
de Auflösung der  
Cohnheimschen  
Felderung

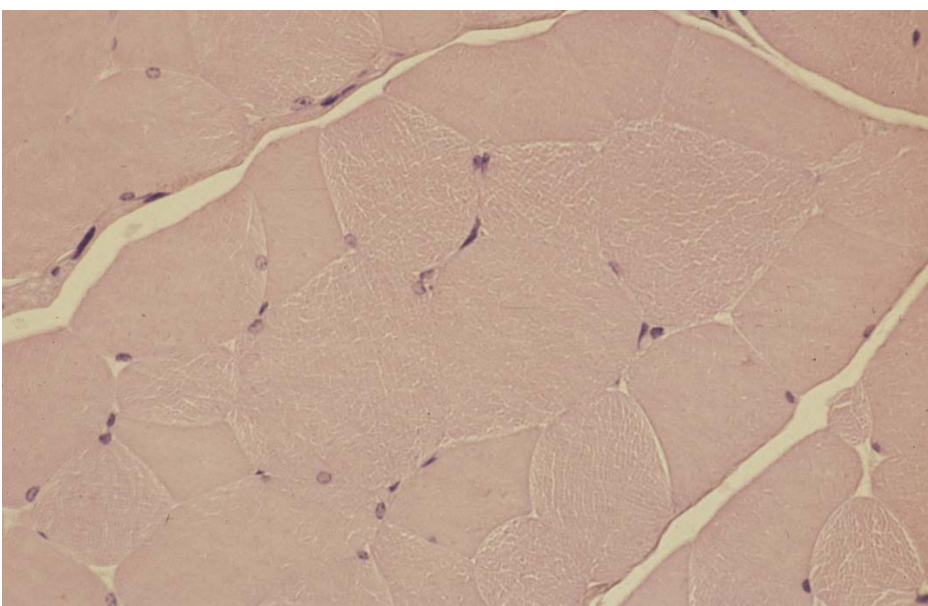


Abbildung 2-15  
einzelne Muskel-  
fasern zeigen eine  
Homogenisierung  
und vermehrte  
Eosinophilie als  
Zeichen begin-  
nender Nekrose



Schließlich wurden Nekrosen und deren Ausmaß und Verteilung im Präparat analysiert (Abbildung 2-15, Abbildung 2-16 und Abbildung 2-17).

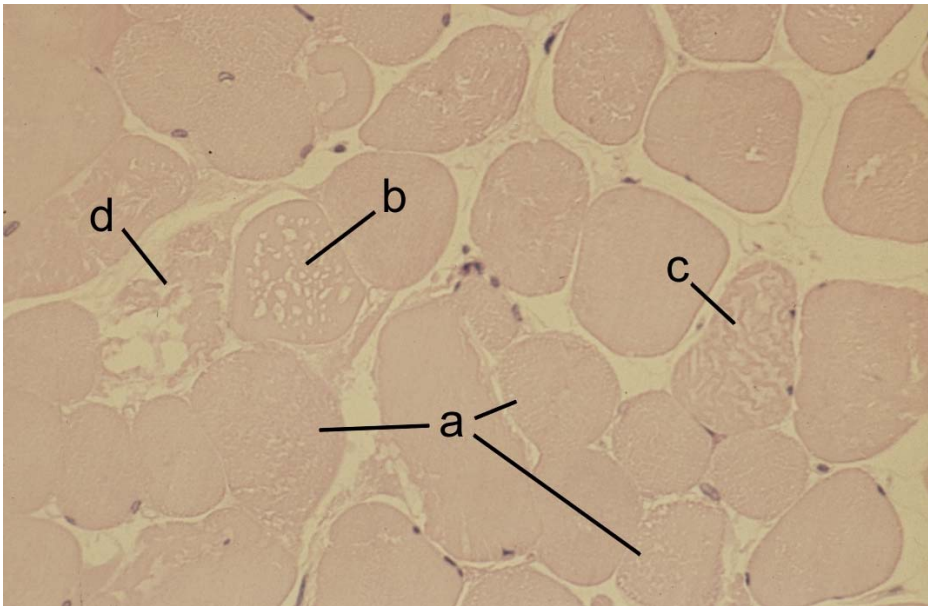


Abbildung 2-16  
Muskefasernekro-  
sen in verschiede-  
nen Stadien  
a Auflockerung  
der Cohnheim-  
schen Felder  
b beginnende  
Vakuolisierung  
c girlandenartige  
Auflösung der  
Fibrillen  
d völlig nekroti-  
sche Faser

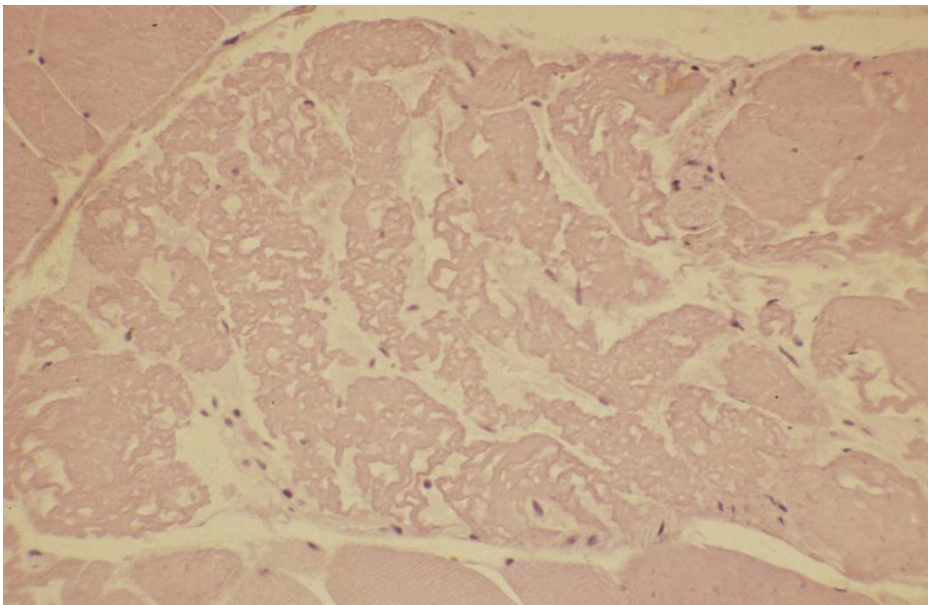


Abbildung 2-17  
gesamtes Mus-  
kelbündel in  
nekrotischem  
Zerfall

### 2.3 Andere Methoden

Da diese Dissertation Teil eines umfangreicheren Forschungsprojektes war, ist die Kapillarzählung und histologische Beurteilung der Versuchsreihe nur ein Teilaspekt der Fragestellung. Daneben wurden auch makro- und mikro-zirkulatorische, biochemische (Elektrolyte, Blutgase, Glucose, Laktat, LDH, Tri-carbonsäuren, Malondialdehyd, etc.), rheologische (Fibrinogen, Gerinnungsparameter, Thrombozyten) und hämatologische Parameter (Erythrozyten, Leukozyten, Hämatokrit) und außerdem spezielle Eigenschaften der Erythrozytenfluidität (mittels Mini-Erythrozyten-Aggregometer Myrenne, Oszillierendem Kapillarrheometer OCR-D, St. George-Filtrometer) bestimmt. Die Durchblutung wurde durch halbstündliche Protokollierung von laseroxymetrischen Werten des Muskels und Flowmessung an der A. iliaca externa kontrolliert. Die Bestimmung der restlichen oben genannten Parameter erfolgte durch Blutentnahmen an charakteristischen Zeitpunkten des Versuchsablaufs.

Diese Untersuchungen wurden in Schwesterdissertationen dargestellt (TSAPENKO 1998, MOSER 2000 und KEUPP in Vorbereitung). Sie werden deshalb nur soweit im Rahmen dieser Arbeit relevant abgehandelt.

### 2.4 Materialien

#### *zum Fixieren*

Formaldehydlösung 3,5 % (Art. 4001, E. Merck, Darmstadt)

Pufferlösung (Phosphat), gebrauchsfertig, pH 7,0 (Art. 1.09439, E. Merck, Darmstadt)

#### *zum Einbetten*

Glycolmethacrylat (Art. 28744, Serva, Heidelberg)

Benzoylperoxid (Art. 12435, E. Merck, Darmstadt)

N,N- Dimethylanilin (Art. 803060, E. Merck, Darmstadt)

Polyethylenglycol 400 (Art. P- 3265, Sigma- Aldrich Chemie, Steinheim)

Gelatinekapseln, Größe 00

*zum Schneiden*

Rotationsmikrotom HM 360 (MICROM Laborgeräte, Walldorf)

Stahlmesser 'D' (MICROM Laborgeräte, Walldorf)

Standardmesserträger N (MICROM Laborgeräte, Walldorf)

Kapselhalterung (MICROM Laborgeräte, Walldorf)

*zum Färben (HE)*

Hämalaun nach Mayer:

Hämatoxylin (Art. 3816.2, Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe)

Chloralhydrat (Art. 1.02425, E. Merck, Darmstadt)

Citronensäuremonohydrat (Art. 1.00244, E. Merck, Darmstadt)

Aluminium-Kalium-Sulfat-Dodekahydrat (Art. 1.01042, E. Merck, Darmstadt)

Eosin 1% (Art. 15935, E. Merck, Darmstadt)

*zum Eindecken*

Xylol (Art. 8685, E. Merck, Darmstadt)

## 2.5 Statistische Bearbeitung

Die Ergebnisse wurden den üblichen Standardmethoden der Statistik unterzogen. Es wurde der Mittelwert und dessen Standardabweichung  $S_x$  sowie der Standardfehler des Mittelwerts  $S_x$  berechnet. Da die erhaltenen Zahlenwerte keine Normalverteilung bildeten, erfolgte die Signifikanzprüfung innerhalb der Gruppen mittels des Wilcoxon-Tests für verbundene Stichproben, zwischen den Gruppen mit dem U-Test (Whitney- Mann) für ungepaarte Stichproben, jeweils in einem Vertrauensbereichs von 95% ( $p < 0,05$ ). Die stochastische Abhängigkeit der Parameter wurde mit dem Korrelationskoeffizienten ( $r$ ) gemessen.

### 3 ERGEBNISSE

Die gewonnenen histologischen Präparate wurden sowohl rein mathematisch auf die Kapillarzahl, als auch auf die pathomorphologischen Veränderungen hin untersucht.

#### 3.1 Kapillarzahlen

Über alle Gruppen und Versuchsetappen betrachtet ergaben sich Kapillar-/Muskelfaser-Verhältnisse (C/F- Ratio) von 0,011 bis 0,201. Der maximale Einzelwert fand sich bei einem Tier der Gruppe A (Kontrollgruppe), der minimale innerhalb der Gruppe B (durch Hypertonus rarefizierte Gruppe). Im Mittel lagen die Werte bei 0,077.

Im Vergleich der Gruppen lagen die Basiswerte der C/F- Ratio (vor Ischämie) bei 0,057- 0,142, im Mittel bei 0,0976. Gruppe A wies die höchsten Kapillarzahlen auf, die Gruppen C (chronisch ischämisiert und dadurch hyperkapillarisiert) und D (hypertonie- rarefizierte Gruppe mit medikamentöser Rekapillarisierung) lagen auf mittlerem Niveau etwa gleich. Die niedrigste C/F- Ratio hatte Gruppe B (Abbildung 3-1 und Tabelle 6-1).

Bei diesen Werten handelte es sich um gruppenspezifische Grundwerte, die im Verlauf sowohl direkt, als auch nach ihrer relativen Veränderung prozentual verglichen wurden.

Im direkten Vergleich waren die Unterschiede nicht bei allen Gruppen statistisch eindeutig (Abbildung 3-1). Signifikant höher lag die Basiskapillarzahl der Gruppe A gegenüber Gruppe B ( $p < 0,001$ ) und D ( $p < 0,05$ ). Die Kapillarzahl von B war signifikant niedriger als die von C ( $p < 0,05$ ) und D ( $p < 0,01$ ). Die C/F- Ratio von C, die zwar beinahe der von D entsprach, lag aber nicht signifikant unterhalb der Gruppe A.

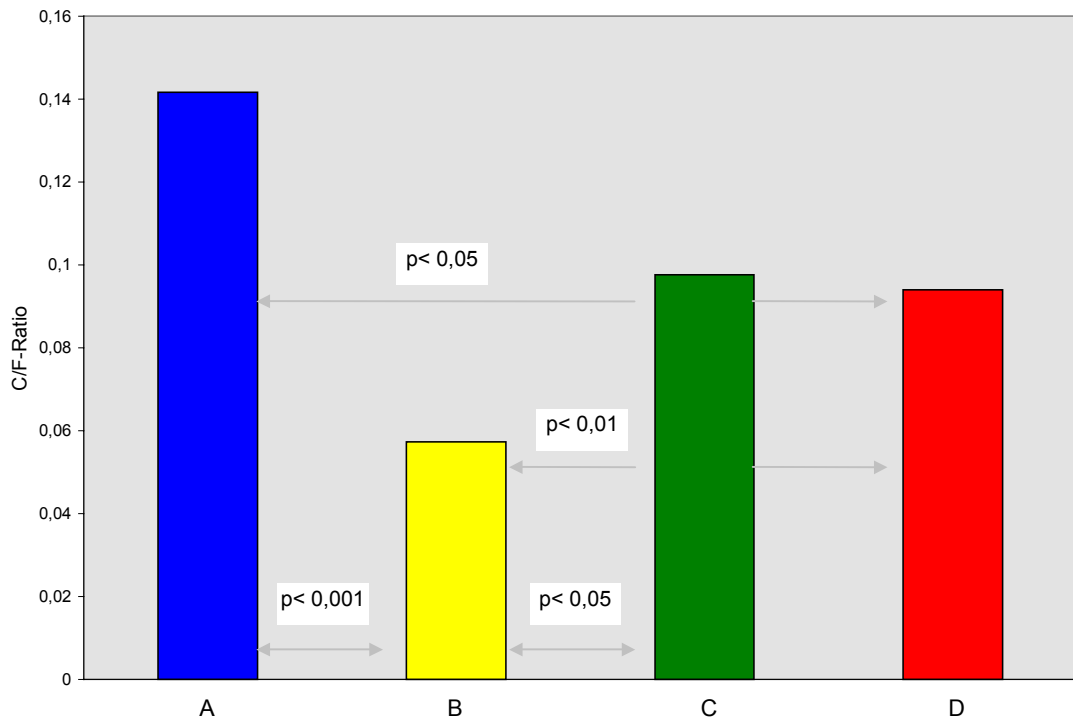


Abbildung 3-1 Kapillarzahlen vor Ischämie (Basiswerte der einzelnen Gruppen)

Insbesondere waren diese Signifikanzen nicht über den Verlauf des Versuchs konstant (Abbildung 3-2 und Tabelle 6-2), es waren oft lediglich Tendenzen erkennbar (Abbildung 3-3 Kapillarzahlen im Verlauf).

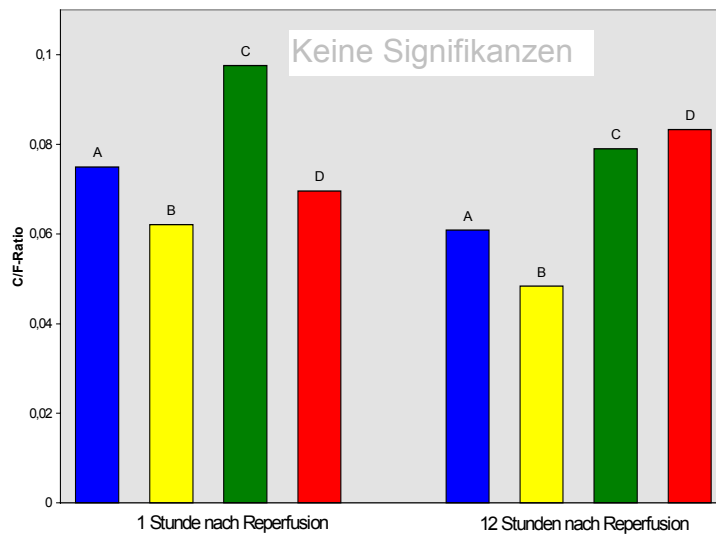


Abbildung 3-2 Kapillarzahlen bei Reperfusion, links nach einer Stunde, rechts nach 12 Stunden Reperfusion

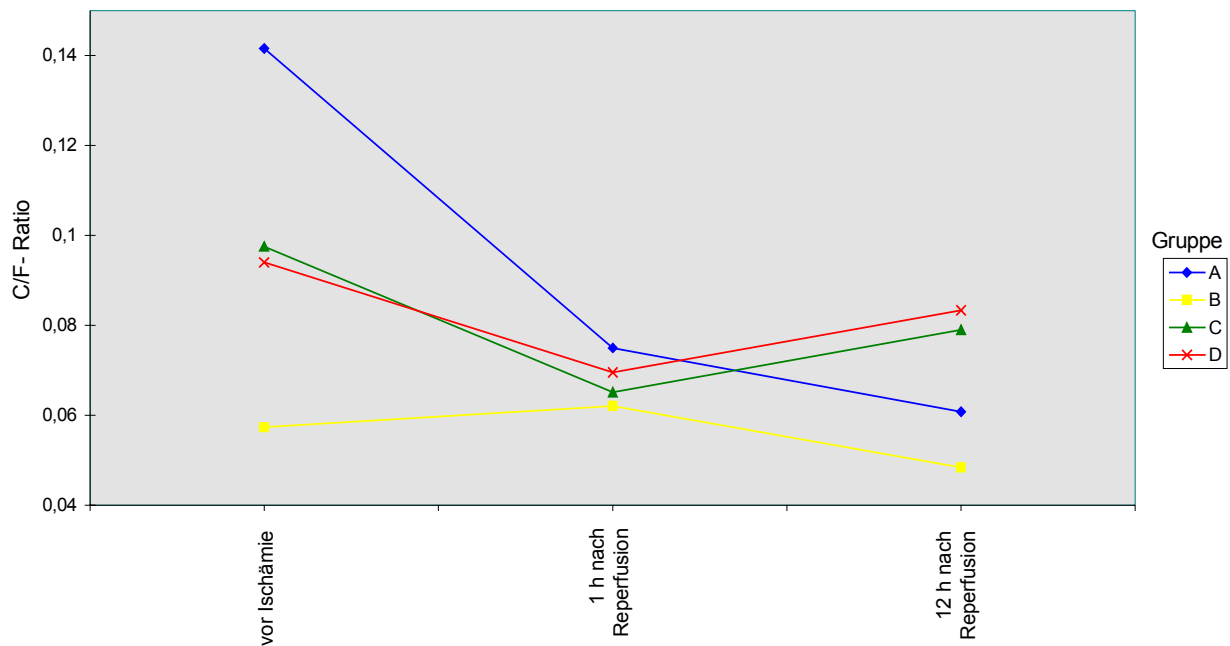


Abbildung 3-3 Kapillarzahlen im Verlauf

Die Kapillardichte sank bereits 1 Stunde nach Reperfusion in allen Gruppen außer Gruppe B stark ab (A: 0,142 → 0,075 [52,9%]; C 0,098 → 0,065 [66,7%]; D: 0,094 → 0,070 [74,1%]). Zu diesem Zeitpunkt lagen die Kapillarzahlen der verschiedenen Gruppen insgesamt sehr eng beieinander. In der rarefizierten Gruppe B blieb sie hier zunächst konstant (+ 8,8%) und fiel 12 Stunden nach Reperfusion auf lediglich 84,4% des Ausgangswertes. Nur die Gruppen C (0,079) und D (0,083) erholten sich (auf 81% bzw. 88,7%). Bei A sank die Kapillarzahl noch weiter (auf 43%) (Abbildung 3-3 Kapillarzahlen im Verlauf, Tabelle 6-2 und 6-3).

In der Kontrollgruppe A hatte die Ischämie also den größten Schaden verursacht. Die rarefizierten Tiere der Gruppe B hatten wohl das kleinste Kapillarzahlniveau vor der Ischämie, dieses zeigte aber in Bezug auf die untersuchte funktionelle Kapillarzahl fast keine Reaktion auf den Reperfusionsschaden. Somit schien die niedrige Kapillarisation, bzw. Rarefizierung, primär keinen nachteiligen Effekt auf die Reperfusion zu haben. Die Kapillarzahlveränderungen im Laufe der Reperfusion waren jedoch nur in Gruppe D signifikant.

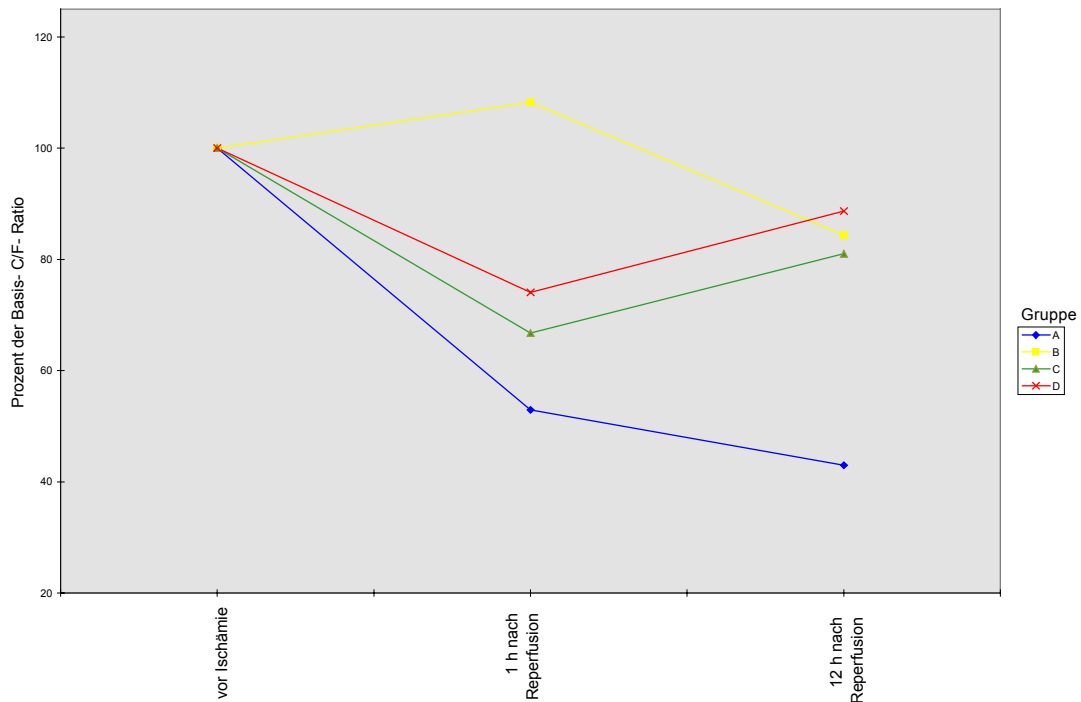


Abbildung 3-4 Kapillarzahntwicklung in Relation zu den Basiszahlen

Die prozentuale Entwicklung ist in Abbildung 3-4 (Tabelle 6-3) dargestellt und veranschaulicht die vorhandenen Tendenzen, deutlich die Restitution der Kapillardichte in den Gruppen C und D, die in den anderen Gruppen fehlte.

Bei einer Gruppeneinteilung nach Kapillarzahlen ergab sich folgendes Bild: Die erste Gruppe bestand aus den 10 Biopsien mit den vor Ischämie höchsten ermittelten C/F- Ratios, eine zweite mit den 10 niedrigsten C/F- Ratios und die dritte aus den restlichen 9, die eine mittlere Kapillarzahl hatten (Tabelle 6-4). Wie in Abbildung 3-5 zu sehen, waren die Tiere der Gruppe mit den zu Beginn höchsten Kapillarzahlen die einzigen, deren Kapillarzahl nach 12 Stunden Reperfusion wieder stieg. Die Gruppe mit den mäßigen und jene mit den anfangs sehr geringen Kapillarzahlen trafen sich auf einem gemeinsamen niedrigeren Niveau und zeigten während der Reperfusion in etwa gleich hohe Kapillarzahlen. Vor allem die Kapillardichte nach einer Stunde Reperfusion war sowohl im



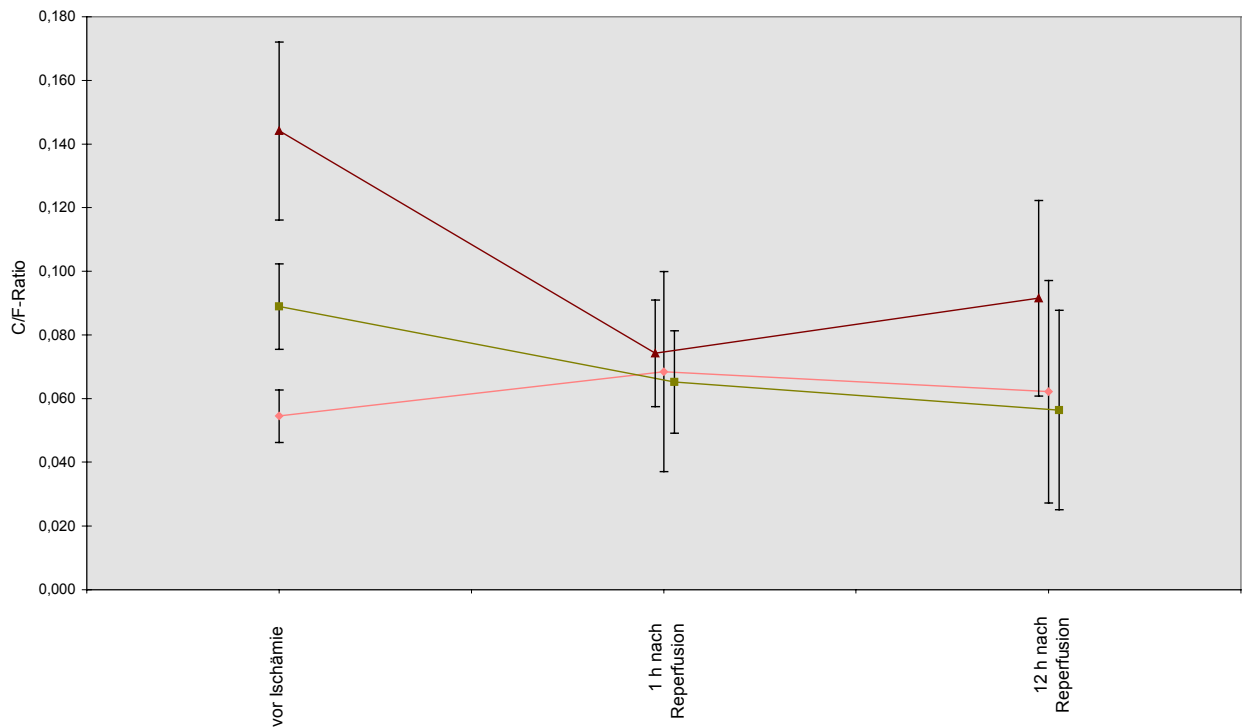


Abbildung 3-5 Verlauf der C/F- Ratio bei Einteilung nach Basiskapillarzahlen  $\pm$  Standardabweichung

Vergleich der Gruppen, als auch in der Neuaufteilung nach Basiskapillarzahlen annähernd gleich, was als Hinweis auf eine gewisse Kapillarzahlunabhängigkeit der frühen postischämischen Veränderungen gewertet werden kann.

### 3.2 Histopathologie

Die histologische Begutachtung sollte die Zusammenhänge zwischen Präparatequalität und Kapillarzahlungen bestimmen und typische post-ischämisch beschriebene Veränderungen nachweisen. Dabei ging es auch darum, die Folgen des Reperfusionsschadens in Form von mehr oder weniger schweren Gewebsschädigungen zu zeigen.

### 3.2.1 Präparatequalität

Es wurde vermutet, dass manche Präparate aufgrund mangelhafter Methodik in Bezug auf Einbettung, Schnitt oder Färbung schwer zu beurteilen waren. Zur Feststellung, ob die Kapillarzahlen auch von der Qualität der Präparate abhängen, wurde die Qualität in einem Schema mit 0-17 Punkten mit 0,5- Punkteschritten bewertet (s. Kap. 2.2.3)

Die minimale erreichte Punktzahl war 2,5, die maximale 17, im Durchschnitt lag die Qualität bei etwas über 10. Dies erwies sich in der Praxis als *tolerable* Qualität, mit der Zählung und histomorphologische Auswertung problemlos möglich war. Nur 8 von 84 gezählten Präparaten (9,5%) wiesen jedoch eine *gute* Qualität mit mehr als 14 Punkten auf.

Es ließ sich bei einer durchschnittlichen Kapillarzahl von 0,078 aller 84 Präparate eine Abhängigkeit von der Präparatequalität festmachen.

Bei den Präparaten mit überdurchschnittlicher Qualität ( $\geq 10$  Punkte,  $n= 53$  [63,1%]) war die C/F- Ratio im Mittel bei 0,83, die mit unterdurchschnittlicher Punktzahl ( $<10$  Punkte,  $n= 31$  [36,9%]) lagen bei 0,68 deutlich niedriger.

Der Vergleich der 10% hochwertigsten Schnitte (C/F= 0,89) mit den schlechtesten 10% (C/F= 0,67) bestätigte dies.

### 3.2.2 Histologische Begutachtung

Die feingeweblichen Parameter wurden weiterhin – vorwiegend deskriptiv – im Verlauf der einzelnen Gruppen und gruppenübergreifend an den drei Biopsiezeitpunkten (vor Ischämie, 1 Stunde und 12 Stunden nach Reperfusion) ausgewertet.

In den folgenden Tabellen wurden die Anzahl der Präparate, die eine bestimmte Ausprägung der untersuchten pathomorphologischen Eigenschaft auf-

### Erythrozyten extravasal

	Etp	Anzahl
keine wenige viele	vor	10
	Ischämie	11
		7
keine wenige viele	1 h nach Reperfusion	4 15 8
	12 h nach Reperfusion	4 14 9

Tabelle 3-1

### Leukozyten extravasal

	Etp	Anzahl
keine wenige viele	vor	26
	Ischämie	2
		1
keine wenige viele	1 h nach Reperfusion	18 6 4
	12 h nach Reperfusion	6 8 13

Tabelle 3-2

### Leukozyten intravasal

	Etp	Anzahl
keine wenige viele	vor	23
	Ischämie	2
		2
keine wenige viele	1 h nach Reperfusion	13 5 9
	12 h nach Reperfusion	9 9 8

Tabelle 3-3

wiesen, nach Versuchsetappen (Etp) getrennt, aufgelistet. Der erste histomorphologische Beurteilungsaspekt, die nach extravasal ausgetretenen Erythrozyten, zeigte, dass diese bei der Reperfusion die Gefäße verlassen haben. Vor der Ischämie waren in 10 Präparaten keine, in 18 Präparaten wenige oder auch viele Erythrozyten frei im Gewebe zu finden. Während der Reperfusion waren nur bei 4 Präparaten keine Erythrozyten außerhalb des Gefäßsystems zu sehen. Der Anteil der Präparate, v. a. mit vielen ausgetretenen Erythrozyten, stieg. Diese Entwicklung war jedoch aufgrund der schwachen Ausprägung statistisch nicht abzusichern.

In Bezug auf die Leukozyten sah die Situation schon eindeutiger aus: In der präischämischen Phase waren bei den meisten Präparaten (90%) keine extravasalen Leukozyten zu sehen. In der Reperfusion nahm der Anteil ab, nach 12 Stunden Reperfusion waren im überwiegenden Teil der Präparate die Leukozyten ins Gewebe abgewandert.

Im Gefäßsystem ließen sich diese Veränderungen ebenfalls nachvollziehen. Vor Ischämie befanden sich keine Leukozyten

### Erythrozytendichte im Gefäß

	Etp	Anzahl
voll mäßig leer	vor	7
	Ischämie	19
		1
voll mäßig leer	1 h nach	5
	Reperfusion	15
		7
voll mäßig leer	12 h nach	5
	Reperfusion	17
		4

Tabelle 3-4

### Plasmaaustritt

	Etp	Anzahl
viel und wenig kein	vor	6
	Ischämie	23
viel und wenig kein	1h nach	5
	Reperfusion	23
viel und wenig kein	12h nach	7
	Reperfusion	20

Tabelle 3-5

im Lumen, nach Reperfusion nahm die Anzahl der Präparate mit Gefäßen ohne Leukozyten stetig ab. Die Anzahl der Präparate mit Gefäßen, in denen sich wenige oder viele Leukozyten befanden, stieg.

Die Gefäße wiesen zu jedem Zeitpunkt eine durchschnittliche Erythrozytendichte auf, die leichte Zunahme leerer Gefäße könnte in diesem geringen Ausmaß zufällig gewesen sein.

Der teilweise vermeintliche Plasmaaustritt – auch die Exsudation von Fibrin könnte ein ähnliches Bild ergeben haben – ließ keine Veränderung im Lauf des Versuchs erkennen. Stetig war dieses Phänomen bei 21% der Präparate zu sehen.

Am häufigsten fand sich in den Präparaten ein unauffälliger Muskelfaserabstand, vor

der Ischämie war er öfter klein, es gab jedoch keine Zunahme der großen Abstände im Versuchszeitraum. Vergleichbar waren die Verhältnisse bei den Abständen der Muskelbündel. Hier wurden die großen Abstände nach 1 Stunde Reperfusion etwas häufiger, um dann wieder abzunehmen.

### Muskelfaserabstand

	Etp	Anzahl
groß unauffällig klein	vor	1
	Ischämie	18
		10
groß unauffällig klein	1 h nach	2
	Reperfusion	22
		4
groß unauffällig klein	12 h nach	0
	Reperfusion	23
		4

Tabelle 3-6

### Muskelbündelabstand

	Etp	Anzahl
groß unauffällig klein	vor	6
	Ischämie	21
		2
groß unauffällig klein	1 h nach	11
	Reperfusion	15
		2
groß unauffällig klein	12 h nach	9
	Reperfusion	16
		2

Tabelle 3-7

Die kleinen und unauffälligen Befunde blieben im Verhältnis mehr oder weniger konstant.

Weiterhin sehr interessant war die Beurteilung der Nekrose sowie deren Ausmaß und Verteilung über die Präparate.

### Nekrose

	Etp	Anzahl
St. 0	vor	24
St. 1-3	Ischämie	3
St. 4 u. 5		2
St. 0	1 h	14
St. 1-3	nach	10
St. 4 u. 5	Reperfusion	4
St. 0	12 h	12
St. 1-3	nach	5
St. 4 u. 5	Reperfusion	10

Tabelle 3-8

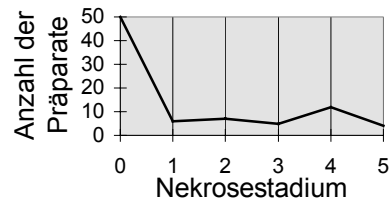


Abbildung 3-6 Anzahl der Präparate in verschiedenen Nekrosestadien

Nekrosestadium	Anzahl
0	50
1	6
2	7
3	5
4	12
5	4

Tabelle 3-9 Anzahl der Präparate in verschiedenen Nekrosestadien

Über alle Präparate betrachtet, waren die meisten Biopsien (n= 50 [60%]) ohne ersichtliche Nekrosen (Stadium 0), die mittleren Nekrosestadien (1-3) lagen homogen verteilt (zusammen n= 18 [21%]) eine weitere Häufung fand über die Stadien 4 und 5 (n= 161 [19%]), also den schweren Nekrosen statt.

Die Splittung nach Versuchsabschnitten zeigte in der prä-ischämischen Phase viele Präparate ohne Nekrosen. Schon 1 Stunde nach Ischämie waren die mittleren Nekrosestadien betont, 12 Stunden nach Reperfusion gab es bereits 10 schwere Nekrosen.

Der Vergleich von histologischen Befunden mit der Kapillarzahl ergab weiteren Aufschluss: In den Präparaten ohne feststellbare Nekrosen oder mit den Nekrotestadien 1-3 bestand eine hochnormale Kapillarzahl (C/F= 0,080 bzw. 0,079), in den Stadien 4 und 5 lag sie mit 0,070 unterhalb des Durchschnitts.

Ähnliche Konstellationen fanden sich bei anderen histologischen Kriterien. In Präparaten ohne extravasale Leukozyten lag die C/F- Ratio bei 0,084, in Präparaten mit wenigen oder vielen emigrierten Leukozyten dagegen mit 0,068 deutlich niedriger.

Waren die Gefäße leukozytenfrei, betrug die C/F- Ratio 0,085, waren viele oder wenige Leukozyten intravasal, 0,066.

Die volleren Gefäßnetze hatten eine knapp überdurchschnittliche Kapillarzahl mit 0,080, die leeren nur eine Kapillarzahl von 0,061 (Hinweis auf NoRe!).

Das im Gewebe verteilte Plasma war gehäuft in Geweben mit einer eher höheren Kapillarzahl (0,082) zu sehen, Präparate ohne Plasmaübertritte zeigten eine etwa durchschnittliche C/F- Ratio (0,076). Bei großem Muskelfaserabstand lag die Kapillarzahl bei 0,106 weit über dem Mittelwert, bei unauffälligem im mittleren Bereich (0,077), bei kleinem niedriger (0,073). Bei unauffälligem Befund der Muskelbündelabstände lagen die Zahlen bei 0,081, bei großen oder kleinen Abständen der einzelnen Bündel war die Kapillarzahl niedriger (0,073/0,071) als der Mittelwert.

In Gruppe A waren vor der Ischämie in den Präparaten keine Leukozyten extra- oder intravasal anzutreffen, es traten quasi keine Nekrosen auf. Eine Stunde nach Reperfusion fanden sich in den meisten Präparaten viele Erythrozyten außerhalb, mäßig viele Leukozyten innerhalb von Gefäßen oder frei im Gewebe. Die Summe der Nekrotestadien betrug 9. Nach 12- stündiger Reperfusion waren noch wenige Erythrozyten und mäßig viele Leukozyten extravasal, aber die Nekrosesumme war auf 23 angestiegen.

Gruppe B zeigte Präparate ohne Leukozyten, volle Gefäße und einen eher kleinen Muskelfaserabstand. In der zweiten Biopsiereihe fielen mehrere freie Erythrozyten, wenige Leukozyten extravasal und viele Leukozyten in den Gefäßen auf. Die untersuchten Gefäße waren mäßig gefüllt. Der Muskelfaserab-

stand war bei mäßigem bis tendenziell großem Abstand der Bündel weiter auffallend klein. Nekrosen waren vorhanden, mit einer Summe der Stadien von 13. In der dritten Muskelprobe war die Nekrosesumme ebenfalls 13, die Abstände waren jetzt alle unauffällig. Die Gefäße waren immer noch nur mäßig gefüllt und beinhalteten einige Leukozyten. Extravasal befanden sich aber neben etwas Plasma viele Erythrozyten und Leukozyten.

Der Verlauf in der Gruppe C wies von Anfang an mehrere freie Erythrozyten im Gewebe, sowie auch Plasma auf, dieses verschwand jedoch später. Zunächst waren keine Leukozyten zu sehen, später nahmen sie langsam zu (1 Stunde sehr wenig, 12 Stunden wenig). Die Nekrosesumme stieg von 10 nach einer Stunde Reperfusion auf 15 nach zwölf Stunden. Der eher große Muskelbündelabstand blieb konstant über den Versuch in Gruppe D gleich. Erythrozyten waren im Gewebe vor der Ischämie und nach 1 Stunde Reperfusion selten, nach 12 Stunden deutlich vermehrt. Auch die Leukozyten nahmen sowohl in den Gefäßen, als auch ausserhalb stetig zu. Waren zu Beginn keine Leukozyten zu sehen, zeigten sich später wenige, am Ende aber viele. Nekrosen fanden sich in dieser Gruppe nur vereinzelt.

### 3.2.3 Korrelierende Betrachtung

Die bisher erhaltenen Ergebnisse wurden auf Korrelation hin überprüft. Zum einen interessierte natürlich, ob die Kapillarzahl (Basiswerte vor Ischämie) von den Eigenschaften der Individuen, wie Gewicht, Alter oder Geschlecht abhängt, zum anderen, ob die einzelnen Gruppen oder Biopsiezeitpunkte untereinander korrelierten.

In der vorliegenden Studie ergab sich keine Korrelation der C/F- Ratio zum Alter (Abbildung 3-7).

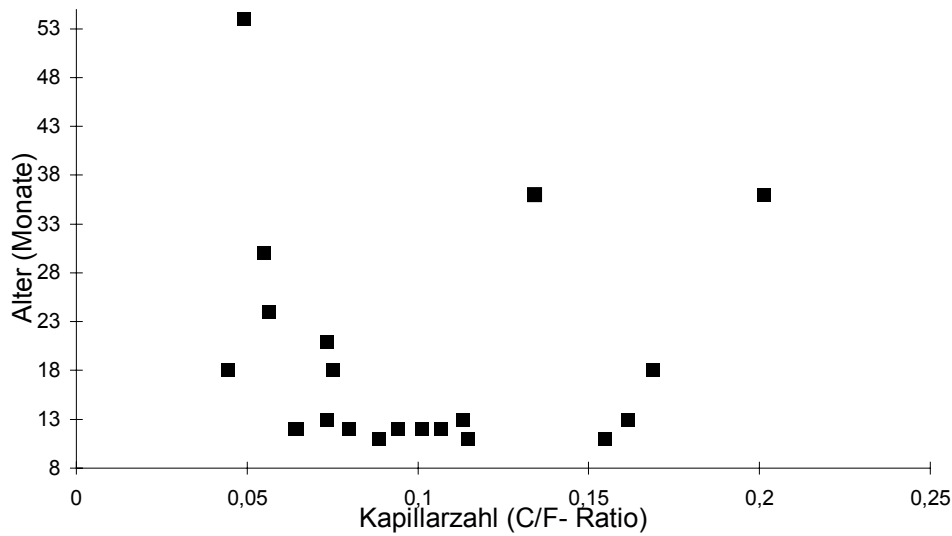


Abbildung 3-7 Korrelation Kapillarzahl - Alter, alle Gruppen  
 - Keine Korrelation messbar -

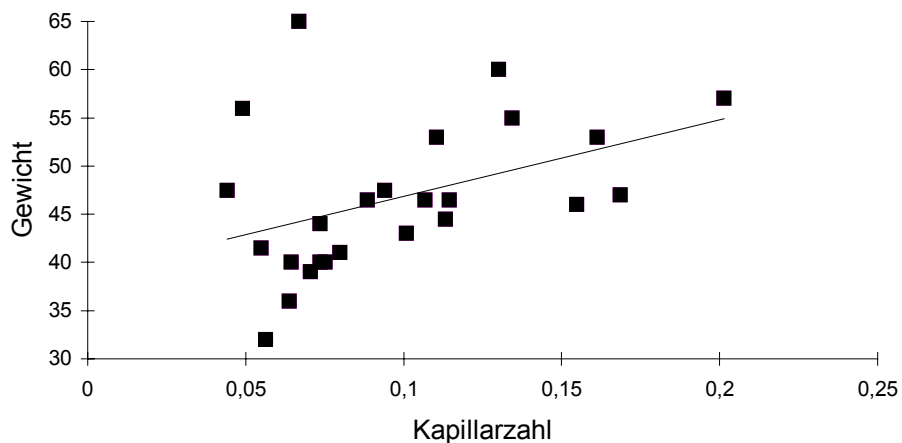


Abbildung 3-8 Korrelation Kapillarzahl - Gewicht, alle Gruppen  
 - Die Kapillarzahlen lagen bei schwereren Schweinen höher -

Vergleicht man das Gewicht der Schweine mit der C/F- Ratio, so findet sich eine Korrelation mit einem Koeffizienten von +0,42. Mit dem Gewicht stieg also die Kapillardichte im untersuchten Muskel (Abbildung 3-8). Die Aufteilung nach Gruppen zeigt, dass diese Korrelation in Gruppe A ( $K_{\text{eff}} = +0,61$ ) und D ( $K_{\text{eff}} = +0,86$ ) enger war (Abbildung 3-9 und Abbildung 3-10). In den Gruppen B und C war dagegen keine Abhängigkeit messbar.



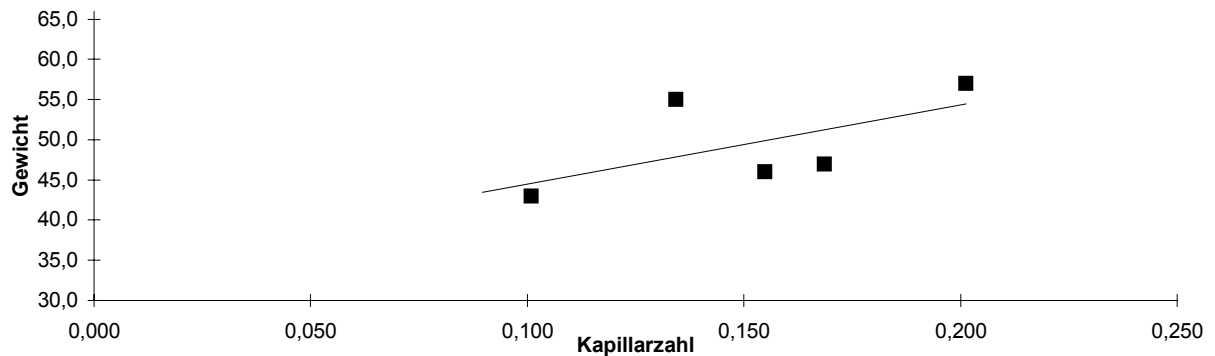


Abbildung 3-9 Korrelation Kapillarzahl - Gewicht Gruppe A

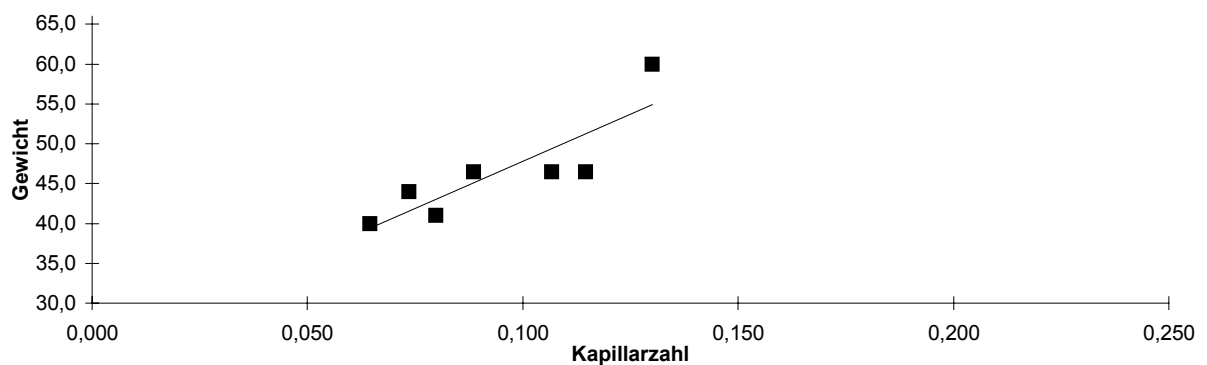


Abbildung 3-10 Korrelation Kapillarzahl - Gewicht Gruppe D

- Die Korrelation zwischen Kapillarzahl und Gewicht war nur in den Gruppen A und D nachweisbar. -

Es muss jedoch ergänzt werden, dass die ältesten Schweine auch durchschnittlich schwerer waren (56 kg) und andererseits die schwersten älter (36,3 Monate) und umgekehrt (Jüngste: 44 kg, Leichteste 16,5 Monate; Tabelle 3-10).

In starkem Maße fanden sich auch Parallelen zwischen Geschlecht und Kapillarzahl (Tabelle 3-10). Männchen hatten mit 0,081 die niedrigste durchschnittliche C/F- Ratio, weibliche Tiere lagen im Mittel bei 0,107 und damit deutlich höher.

Der laseroxymetrisch gemessene Fluss oder das auf diese Weise bestimmte Volumen ergab keine bzw. in manchen Fällen eine nur sehr schwache Korrelation

Versuchstier

Gruppe A	1	2	3	4	5	6	7	8
Gewicht (kg)	47	55	57	46	54	40	43	
Alter (Mo)	18	36	36	11	19	11	12	
Geschlecht	m	w	w	w	w	w	w	

Gruppe B	1	2	3	4	5	6	7	8
Gewicht (kg)	32	40	48	42	33	56	39	
Alter (Mo)	24	18	18	30	30	54		
Geschlecht	m	m	m	m	m	w	w	

Gruppe C	1	2	3	4	5	6	7	8
Gewicht (kg)	65	36	40	48	53	45	53	40
Alter (Mo)		12	12	12		13	13	13
Geschlecht	w	mc	m	m	w	m	mc	w

Gruppe D	1	2	3	4	5	6	7	8
Gewicht (kg)	60	44	47	47	41	47	47	40
Alter (Mo)		11	21	11	12	11	12	12
Geschlecht	w	w	w	w	w	w	m	w

Tabelle 3-10 Alter, Gewicht und Geschlecht der Versuchstiere in den einzelnen Gruppen

## 4 DISKUSSION

Den Hauptteil dieser Arbeit sollten die quantitativen Kapillanzahlveränderungen als Reaktion auf Ischämie und Reperfusion in Abhängigkeit von der Ausgangskapillarisation bestimmen. Im Laufe der Versuche waren jedoch histopathologische Veränderungen an den Muskelfasern bzw. dem Interstitium zu erwarten und diese durften keinen Einfluss auf die gemessenen Kapillanzahlen haben. Es schien deshalb die GMA-Einbettung besonders günstig, da sie die für eine richtige Kapillanzählung wichtigen Bedingungen erfüllt: Bei vielen Einbettungsmethoden kommt es, hauptsächlich durch Entwässerung der Proben, zu einer Schrumpfung (HANSTEDDE/ GERRITS 1986) und zu Veränderungen der Größenverhältnisse (BOON et al. 1994) des Gewebes. Ein Ödem könnte dadurch verschleiert werden und die Kapillarlumina dabei kollabieren. Auf dieses Artefakt hat die hier verwendete Fixierungsmethode nur einen geringen Einfluss. Da GMA wasserlöslich ist, wird eine Entwässerung der Proben nicht notwendig. So kommt es bei der Einbettung mit GMA nach ausführlichen Untersuchungen von HANSTEDDE und GERRITS (1986) nicht zu einer Größenänderung. ROSENBERG (1960) gibt eine Schrumpfung von 6% an.

Ferner müssen die Schnitte im Ultradünnbereich liegen, um Doppelzählungen zu vermeiden. In GMA eingebettete Kapseln können ohne Schwierigkeiten dünner als 3 µm geschnitten werden.

Nach ASHFORD (1986) ist die Verwendung von GMA bei Zimmertemperatur gut geeignet. Auch bei niedrigeren Temperaturen dringt GMA gut in das Gewebe ein, verhindert so Enzymverdauungen (HAGEMANN/ ROSEMUND 1989) und liefert gute morphologische Ergebnisse (ABOTT et al. 1994). Eine Gefrier-substitution wurde beschrieben (ROSENBERG 1960, ASHFORD et al. 1986, HAGEMANN/ ROSEMUND 1989). Auch größere Gewebestücke sind ohne Probleme durch das gute Infiltrationsvermögen mit dieser Methode einzubetten. Der in den einzelnen Gruppen vorliegende Kapillarisationsgrad wurde über die Kapillanzahl, die die einzelnen Versuchstiere vor dem akuten Ischämieversuch aufwiesen, als Basiskapillanzahl bestimmt. Dieser Grundwert sollte in den ein-

zelenen Gruppen durch verschiedene Maßnahmen variiert werden. Die Basiskapillarzahl der nicht vorbehandelten Gruppe A sollte die Kapillarisation des gesunden Göttinger Miniaturschweins widerspiegeln. Dennoch ist ein direkter Vergleich der hier gefundenen Kapillarzahlen mit anderen Arbeiten, die die C/F-Ratio zur Bestimmung der Kapillardichte gewählt haben, schwer, da oft andere oder spezielle Färbe- oder Markierungsmethoden zum Einsatz kommen. Unsere Zahlen bauen auf die in dieser Arbeit gewählten und sehr differenzierten Bestimmungskriterien und geben somit eine *relative Kapillarzahl* an.

Aufgrund der per definitionem festgelegten intraluminalen Erythrozyten handelt es sich um einen *funktionellen* Wert, nur mit Erythrozyten perfundierte Kapillaren werden eingeschlossen. Je nach Funktionszustand ändert sich die in den Kapillaren vorgefundene Erythrozytenmenge bei gleicher Plasmadurchströmung über Rekrutierung von Strickleiterkapillaren. Diese Querverbindungen zwischen den längsgerichteten nutritiven Kapillaren werden aufgrund ihres schräg zur Faser gerichteten Verlaufs nach dieser Methodik nicht erfasst.

Unter Ruhebedingungen, wie sie vor der Ischämie anzunehmen sind – nähert sich die C/F-Ratio der anatomischen Kapillardichte (LANG 1977, HUDLICKA 1986). Unter Voraussetzung der Durchströmung mit unterschiedlicher Erythrozytendichte werden bei geringerem Erythrozytendurchfluß weniger Kapillare gesehen. In der frühen Reperfusionphase findet eine geringere Durchströmung statt, es werden weniger Kapillaren gezählt, da weniger Erythrozyten auf das Mikrogefäßbett verteilt sind. Die Kapillarzählung nach der hier gewählten Methode ergibt in dieser Phase eine falsch niedrigere C/F-Ratio. Durch den selben Fehler bedingt ist bei den hypertonen Tieren durch die gesteigerte Ruheperfusion mit höherer Erythrozytendurchströmung die effektive Kapillarzahl noch niedriger anzunehmen. Somit stellt die hier bestimmte Kapillarzahl einen dynamischen Parameter dar, der für die Bestimmung des NoRe sehr gut geeignet ist (Funktionelle Kapillardichte FCD). Nach Untersuchungen von JOZSA (1985) sind die Ergebnisse einer Kapillarzählung unter pathologischen Bedingungen je nach Zählmethodik sehr variabel. Die C/F-Bestimmung ist danach die verlässlichste Methode.

Es sei angemerkt, dass die Kapillarzahl in Relation zur Muskelfaserzahl gesehen werden muss, da das Kapillarnetz eine Versorgungseinheit für eine Faser darstellt (SCHMALBRUCH 1985). Eine scheinbare Vermehrung kann durch eine Abnahme der Muskelfaserzahl, eine Verminderung der Kapillarzahl durch Faserhypertrophie vorgetäuscht werden. Eine Atrophie der Muskelfaser - wie sie auch bei Alterung und Inaktivität bei chronischer Ischämie zu sehen ist - könnte so bei gleichbleibender Kapillarzahl den Quotienten der C/F in gleicher Weise erhöhen. So müssen derartige strukturelle Differenzen, z. B. durch unterschiedlichen Trainingszustand der Tiere (NELISSEN-VRANCKEN et al. 1993) bei der Bestimmung der C/F einbezogen werden. Insbesondere ist davon auszugehen, dass bei Tieren der Gruppe C, bei denen durch chronische Ischämie eine Claudicatio-Symptomatik angenommen werden muss, die Kapillarzahlen falsch hoch liegen. Training fördert auch das Kapillarnewachstum (DESCHENES/ OGILVIE 1999). AHMED (1997) konnte zeigen, dass die C/F-Ratio vorwiegend von der Fasergröße abhängt.

Die Grundwerte der C/F- Ratio waren in Gruppe A am höchsten. Die Werte vor der Ischämie hatten in den voroperierten Gruppen genügend Zeit, sich den veränderten Konditionen anzupassen.

Die Kapillarzahlen korrelierten zum Gewicht der Tiere, nicht aber zu ihrem Alter. In der Literatur wird jedoch vor allem die altersbedingte Rarefizierung oft bestätigt (HENRICH et al. 1990). Warum in dieser Arbeit eine Korrelation nicht gefunden wurde, mag daran liegen, dass unsere Versuchstiere nur sehr geringe Altersdifferenzen zeigten. Das höhere mittlere Alter in Gruppe B war teilweise durch einen Ausreißer mit 54 Monaten bedingt, dessen Kapillarzahl mit 0,049 sehr niedrig lag. Auch in Gruppe D war die gleiche Konstellation vorhanden: Ein Ausreißer (mit 21 Monaten beinahe doppelt so alt wie die übrigen Gruppenmitglieder) wies eine der niedrigsten Kapillarzahlen auf. Die vorhandene Beziehung zwischen Gewicht und Alter bei unseren Tieren bestätigt den bereits bekannten Zusammenhang zwischen Alter und Kapillarzahl (HENRICH 1990) auch in dieser Arbeit.

Die höhere Kapillarzahl der Weibchen (Kap. 3.1.3) trifft unglücklicherweise mit der zufällig gehäuften Gruppenteilung von Weibchen zu Gruppe A und D zusammen. Die beiden kastrierten Männchen kamen beide zu Gruppe C, was die recht hohe Kapillarzahl dieser beiden Tiere – neben möglicherweise vorhandenen hormonellen Einflüssen – erklären könnte.

Da die oben beschriebene FCD die Kapillarzahl des Muskels unter Ruhebedingungen darstellt, entsteht eine lokal verminderte FCD sowohl durch Erniedrigung der Durchströmung, als auch durch pathophysiologischen Einflussfaktoren, wie sie im postischämischen Gefäßbett vorkommen.

Die Neuaufteilung der Tiere nach Kapillarzahlen bestätigte den erwarteten Zusammenhang zwischen der C/F- Ratio mit dem Erscheinen eines NoRe nochmals (Abbildung 3-5). Die Tiere mit guter Ausgangskapillarisation sind bei Entstehung, aber auch bei Rückbildung der Minderdurchblutung im Zuge eines Low Flow oder NoRe eindeutig im Vorteil. Gruppen mit niedriger Basiskapillarzahl zeigten keine bis nur geringe Wiederherstellung des Flusses. Überraschenderweise sank die FCD der mittleren Kapillargruppe genauso wie die der Gruppe mit schlechten Kapillarbedingungen. Dies deutet darauf hin, dass die Kapillarzahl durchaus nur eine anteilige Bedeutung bei Protektionsmechanismen gegen das NoRe haben könnte.

Durch Induzieren einer sekundären *Hypertonie* wies Gruppe B stark erniedrigte Kapillarzahlen, im Sinne einer Rarefizierung, auf (HENRICH 1985). Die Rarefizierung bei Hypertonie ist in der Literatur bei Tieren und auch bei Menschen gesichert (HENRICH et al. 1978, HENRICH et al. 1979, GRAY 1984, HEIMGÄRTNER 1986, HARTUNG 1986, HENRICH et al. 1988). Bei der Hypertonie dürfte das Ausmaß der Kapillarzahlveränderung nicht, wie es im chronisch ischämischen Muskel wahrscheinlich ist, vom Fasertyp abhängen (HAMMARSTEN et al. 1980, MOHNIKE et al. 1983). Allerdings konnten KROTKIEWSKI et al. (1998) unlängst eine Veränderung der Faserzusammensetzung zugunsten der Typ 2- Fasern in Abhängigkeit vom systemischen Blutdruck feststellen.

Mit Gruppe D, in der sich also die Kapillarbettrarefektion durch Medikation mit Calciumkanalblockern wieder normalisieren sollte, sollte die Umkehrbarkeit der Rarefektion versucht werden. Die Kapillarzahlen lagen in einem Bereich zwischen Gruppe A und B. Es ist also anzunehmen, dass unter der Wirkung der Calciumkanalblocker, die anfangs rarefizierten Kapillaren wieder zu proliferieren begonnen haben. Offensichtlich hatte aber die Zeit der Wirkstoffapplikation nicht ausgereicht, um die Rarefektion ganz aufzuheben oder gar eine Hyperkapillarisation zu induzieren. Auf einen ähnlichen Effekt wiesen NELISSEN-VRANCKEN et al. (1993) hin, die bei Gabe von Vasodilatoren Kapillarwachstum nachweisen konnten.

Ein anderer Mechanismus, der bei der hier nur mäßigen Kapillanzahlerhöhung in Betracht gezogen werden muss, ist der zum Zeitpunkt der akuten Ischämie möglicherweise noch bestehende erhöhte Nifedipinspiegel. Es wurde gezeigt, dass Calciumkanalblocker über verschiedene Wege [Verminderung der Permeabilität (MCDONAGH/ ROBERTS 1986, LACOLLEY et al. 1998, HEMPEL et al. 1999), der Radikalfreisetzung (BECKER et al. 1993, SUN et al. 1996, WU et al. 1997), ET1-Hemmung, Vasodilatation (URBANIAC et al. 1997)] die Entwicklung eines NoRe vermindern kann. Es handelt sich also nicht ausschließlich nur um die dilatative Wirkung der Ca-Kanalblocker (MCDONAGH/ ROBERTS 1986, UNTERBURGER 1992), die das NoRe verringern sollte. Unter Nifedipingabe kommt es nämlich auch zu einer Zunahme von Typ2- Fasern (TORRES et al. 1994), die eine geringere Empfindlichkeit auf Mangeldurchblutung aufweisen. Alternativ zur echten Kapillarbettproliferation könnte nach VICAUT (1999) auch eine dilatatorisch bedingte Mikrogefäßrekrutierung die von Erythrozyten durchströmte Kapillanzahl funktionell erhöhen.

Eine zu starke Blutdrucksenkung, in der Literatur oft bei Einsatz von ACE-Hemmern beschrieben, kann bei nicht ausreichender Autoregulation die Zahl der perfundierten Kapillaren reduzieren. In dieser Studie gab es in der mit Nifedipin vorbehandelten Gruppe D keine vermehrte Blutdrucksenkung (TSAPENKO 1998). Der untersuchte M. gracilis des Miniaturschweins soll als glycolytischer Muskel (Typ 2- Fasern) weniger mit sympathiko- nicht- noradre-

nergen Nerven versorgt sein, woraus ein starkes vasodilatatorisches Potenzial resultieren würde (GRASBY et al. 1997).

Durch eine experimentell angelegte *chronische Ischämie* in Gruppe C sollte am primär gesunden Versuchstier ein Zustand erreicht werden, der im Bereich der Mikrozirkulation eine makroangiopathische Situation simulieren sollte. Vor dem akuten Ischämie-Reperfusionsexperiment, wie auch im Reperfuionsverlauf, lagen die Basis-Kapillarzahlen bei Gruppe C und D jedoch fast gleich.

Es fand also bei den Tieren mit chronischer Extremitätenischämie keine Hyperkapillarisation, wie es bei einem jungen Versuchstier erwartet worden wäre, statt. Es war sogar eher eine leichte Kapillarzahlverminderung zu messen. Gegen Ende der Reperfusion trat in der Gruppe C im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen allerdings eine signifikant stärkere Blutdrucksenkung ein (TSAPENKO 1998), die die Ursache einer gegebenenfalls funktionell verminderten Kapillarzahl darstellen könnte. In der bestehenden Literatur sind die Erkenntnisse über den Grad der Kapillarisation unter chronischer Ischämie ebenfalls divergent. Zum einen werden Unterschiede für verschiedene Fasertypen angegeben: HUDLICKA (1986) stellte eine ausbleibende Hyperkapillarisation bei zu starker Ischämisierung mit konsekutiver Kollateralenbildung fest. YAMAGUCHI et al. (1994) nehmen an, dass die von manchen Autoren gesehene Kapillarvermehrung eher das Resultat einer Muskelatrophie als eines echten Kapillarwachstums sei. Es gilt weitere Faktoren zu finden, die bei der chronischen Ischämie das Kapillarwachstum in die eine oder andere Richtung beeinflussen.

Im Folgenden sei die Entwicklung eines experimentellen NoRe diskutiert:

Im Verlauf des Versuchs entwickelte sich in Gruppe A und B ein NoRe, zu sehen an der sinkenden C/F- Ratio in beiden Gruppen (Abbildung 3-3). Die ohnehin in Gruppe B niedrige Kapillarzahl führte bis zum Ende des Versuchs zu einer stetigen Verminderung der FCD. Auch in Gruppe A kam es zu keiner Verbesserung der Kapillarzahl. In beiden Gruppen sind möglicherweise bei einem zu starken NoRe irreversible Schäden entstanden.



Die Tiere der Gruppe C konnten ihre Kapillarperfusion trotz einer schlechteren Startkapillarzahl – im Vergleich zu A – nach 12 Stunden Reperfusion bereits wieder steigern. Die chronische Ischämie scheint unabhängig von der Kapillarisierung einen protektiven Effekt bezüglich des NoRe zu haben. Erstaunlicherweise war auch das beginnende NoRe in Gruppe D reversibel. Der positive Einfluss der Calcium-Blocker würde gewissermaßen als Medikation die Kapillarvermehrung begünstigen. Absolut gesehen war die C/F- Ratio nicht signifikant erhöht. Es kam trotz relativ niedriger Kapillarzahl zu keinem NoRe. Diese Kapillarzahlverbesserungen waren allerdings gegenüber der basalen C/F- Ratio signifikant.

Die mangelnden Signifikanzen lagen vermutlich an der zu klein gehaltenen Versuchstierzahl, möglicherweise auch an der relativ starken Streuung der C/F- Werte bei allen Tieren (s. Tabellen im Anhang).

Zudem besitzt der *M. gracilis* der Göttinger Miniaturschweine vorwiegend glykolytische Typ 2- Fasern (ROUANET/ BACOU 1993, WEILER et al. 1995, GRASBY et al. 1997) mit faserabhängig niedrigerer C/F- Ratio und geringerem Anstieg der Kapillarzahl, z. B. bei chronischer Ischämie (NELISSEN-VRANCKEN et al. 1993 ). Dies lässt die Zahlen in geringem Maße differieren, was die Aussagekraft statistisch beeinträchtigt. Die metabolischen Vorteile des Typ 2- Muskels erklären eine schwache NoRe-Ausprägung durch die glykolytische Energiegewinnung (HAMMARSTEN et al. 1980). Man kann vermuten, dass auch deshalb die Ergebnisse sehr eng beieinander liegen.

Systematische Ursachen für die Streuung sind einerseits die Umstände der Muskelbiopsie, andererseits die in der Methodik bereits aufgeführten Schwierigkeiten in der histologischen Aufbereitung und Auswertung.

Die zu Beginn der Reperfusion kritische Kreislaufsituation der Schweine erschwerte im Versuchsablauf die Biopsie. Aufgrund gleichzeitig notwendiger medikamentöser Interventionen konnten die Gewebestücke nicht sofort optimal versorgt werden, was in manchen Fällen zu Materialverlust und Qualitätseinbußen führte.

Möglicherweise verhinderten diese systematischen Fehler ein statistisch beweisendes Ergebnis. Man kann bei Verwendung von immunhistochemischen Färbungen und computergestützter videooptischer Auswertung (NOLTE et al. 1995, ANDERSON et al. 1997, QU et al. 1997) sicher eher Signifikanzen erreichen. Unter diesen Umständen wären die vorliegenden Tendenzen ein bestätigendes Resultat.

Um die Schwächen der hier verwendeten Methoden auszugleichen, wurde die Einschätzung von qualitätsbedingten Zählungsfehlern und eine intensive zusätzliche *histomorphologische Beurteilung* angeschlossen. Das etwas kompliziert erscheinende Schema hat sich dabei sehr gut bewährt.

Der geringe Anteil wirklich guter Präparate demonstriert die Schwierigkeiten bei der Zählung; die Beispielbilder der typischen Artefakte (Abbildung 2-11, Abbildung 2-12) bestätigen dies.

Deshalb muss man kritisch beleuchten, ob Faktoren aus diesem Bereich die Richtigkeit der Kapillarzählung beeinträchtigt haben könnten. Da die Überzahl der Biopsiequalitäten im tolerablen Bereich lag, können die Ergebnisse, vor allem bei den doch geringen Kapillarzahldifferenzen in Abhängigkeit von der Qualität der Biopsien, insgesamt als zuverlässig gelten. Die höheren Kapillarzahlen der guten Präparate zeigen eindeutig einen Einfluss auf die Zählung. Gruppe B enthält die meisten schlechten Präparate und weist auch deshalb eine eher niedrige C/F- Ratio auf. Gruppe D dagegen enthält viele 'gute' und wenige 'schlechte' Präparate. Gruppe C und A beinhalten mittlere Qualitäten.

Die Parallelen zwischen den statistischen Tendenzen und den Resultaten der histologischen Auswertung im Vergleich und die Stabilität der Ergebnisse gegenüber der Neueinteilung nach Kapillarzahlen (die keine Qualitätsvorteile besitzen) untermauern aber durchaus die Glaubwürdigkeit der erhaltenen Zahlen.

Die im Rahmen dieser histomorphologischen Beurteilung gewonnenen Erkenntnisse belegen auch die in der Literatur beschriebenen typischen Folgen des NoRe am Muskelgewebe (MASTIGLIA 1982, SCHRÖDER 1982). Dabei ist zu berücksichtigen, dass der hier untersuchte, vorwiegend glykolytische M. gra-

cilis ischämietoleranter ist und somit die Ausprägung der Veränderungen weniger deutlich zu erwarten war.

Die Erythrozyten dringen im Laufe des Versuchs vermehrt in den Extravasalraum ein, möglicherweise bedingt durch steigende Gefäßfragilität oder eine Hämorrhagie (ENGLER et al. 1983). Sicher sind diese Befunde jedoch durch Artefakte bei der Biopsieentnahme überlagert, sie könnten bei der Exzision des Muskelstückes zwischen die Bündel gedrückt worden sein.

Vor der Ischämie sind fast keine Leukozyten nachweisbar, die wenigen physiologisch anwesenden werden mikroskopisch nicht erfasst. Das anschließende Auftreten erfolgt in typischer Weise. Die Leukozyten sind eine Stunde nach Reperfusion intravasal vermehrt, das entspricht den Phasen 'Rolling' und 'Adhäsion'. 11 Stunden später findet sich der Hauptteil im Gewebe, d. h. die Leukozyten sind emigriert. In den Gefäßen verbliebene Leukozyten werden immer seltener. Das könnte bereits eine Folge der NoRe- bedingten Perfusionsstörung sein (JONAS et al. 1996).

Weiterhin steigt das Ausmaß beobachteter Nekrosen. Die gefundenen Nekrosen waren meist ausgeprägt und fanden sich gegen Ende der Reperfusion. Der hohe Anteil an Präparaten ohne Nekrosen und die Verteilung der Nekrosen spricht dafür, dass diese weder systematisch durch die Technik der Biopsie, noch durch die histologische Weiterverarbeitung verursacht waren. Biopsien ohne Nekrose waren in späten Phasen seltener zu sehen. Artifizial verursachte Nekrosen treten wohl eher in den Hintergrund. Die Vergleiche zwischen pathologischem Befund und dazugehöriger durchschnittlicher Kapillarzahl bestätigen die Abhängigkeit der Schädigung von der Kapillarzahl. Ausgeprägte Nekrosen gingen mit sehr viel niedrigeren Kapillarzahlen einher, woraus geschlossen werden kann, dass das NoRe zum Gewebeuntergang geführt hat. Man muss sich dabei nochmals bewusst machen, dass es sich bei der C/F- Ratio um eine relative und funktionelle Kapillarzahl handelt; sie stellt demnach einen Perfusionsparameter und nicht eine anatomische Gegebenheit dar. Die verminderte absolute Kapillarzahl als Folge der Gewebszerstörung dürfte eine eher untergeordnete Rolle spielen.

Bei niedrigeren Kapillarzahlen waren häufiger Leukozytenansammlungen sowohl in den Gefäßen, als auch im Gewebe zu finden. Das entspricht der Auffassung über die Rolle der Leukozyten beim NoRe.

Der Muskelfaser- und bündelabstand, der als Parameter für ein Muskelzell-ödem- oder interstitielles Ödem dienen sollte, zeigte keine gruppenabhängige Verteilung. Die uneindeutigen Veränderungen der Muskelfaser- und bündelabstände machen deutlich, dass der einfache Rückschluss von Abständen im Muskelgewebe auf einen Ödemzustand (NEUMAYER et al. 1995) nicht gezogen werden kann. Es bedarf hierfür einer quantitativ fassbaren Methodik. Die bei großem Faserabstand höheren Kapillarzahlen könnten einen Beurteilungsfehler bei artifiziell erniedrigtem intramuskulären Flüssigkeitsgehalt darstellen, weshalb man den Zusammenhang zur Kapillarzahl in Frage stellen muss.

Die intravasale Erythrozytendichte, die subjektiv als sehr unterschiedlich imponierte, erwies sich über die Gruppen und Biopsiezeitpunkte gesehen als diffus und muss somit als zufällige Gegebenheit betrachtet werden. Trotzdem fand sich bei leeren Gefäßbetten eine deutlich kleinere C/F- Ratio als bei dicht gefüllten Gefäßen. Dies verdeutlicht die Abhängigkeit der festgelegten Kapillanzahlkriterien von der Durchblutung und zeigt damit die Funktionalität der Werte. Die beobachteten Geldrollen aus aggregierten Erythrozyten sind typisch im Rahmen des Reperusionsversagens (HAMMERSEN et al. 1989, URBANIAK et al. 1997).

Eine häufig aufgefallene Veränderung war eine interstitielle eosinophile Flüssigkeitsansammlung. Von pathologischer Seite könnte diese entweder einen Plasmaaustritt, Fibrinausschwitzungen oder einen ungeklärten Artefakt darstellen. Der Vergleich der Kapillarzahlen mit dem Vorhandensein der eosinophilen Extravasate ist wenig markant und bietet keine Erklärung. Das Auftreten dieser Massen war weder gruppenspezifisch noch für bestimmte Versuchsabschnitte typisch.

Betrachtet man die einzelnen Versuchsgruppen im Verlauf, so sieht man die typischen histologischen Befunde bei Ischämie und anschließender Reperfusion in unterschiedlicher Ausprägung.

In Gruppe A mit – nach Kapillarzahl betrachtet – starkem NoRe treten Erythrozyten aus den Gefäßen, Leukozyten akkumulieren und später finden sich Nekrosen. Die durch Hypertonie rarefizierten Skelettmuskeln der Gruppe B, mit ebenfalls markant auftretendem NoRe, zeigen deutlich mehr Nekrosen und der Blutzellnachweis ist betonter. Die Leukozyten nahmen in Gruppe C nur langsam zu, auffallend sind bei einem schwachen NoRe die häufigen Nekrosen. In Gruppe D zeigen sich dagegen trotz Nachweis von Leukozyten nur sehr wenige Nekrosen.

Die Tatsache, dass ein Gewebeuntergang erst bei Reperfusion auftritt, weist deutlich auf die Schädigung durch das Reperfusat hin und lässt Überlegungen über die Möglichkeit eines physiologischen Sinns des NoRe zu. Schließlich wird durch eine Low- Flow bis NoRe- Situation das Eindringen des zerstörenden Agens hinausgezögert. Die verminderte Leukozytenzahl im Gewebe bei NoRe (JONAS et al. 1996) stellt bereits einen Vorteil in Bezug auf die Nekrosezone dar. Möglicherweise kann das NoRe die Freisetzung der toxischen Substanzen aus dem isolierten Ischämiegebiet drosseln, so dass nach einer eingetretenen Ischämie die Wahrscheinlichkeit des Überlebens des Gesamtorganismus durch das Opfer eines Gliedes vielleicht erhöht werden kann.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Am Göttinger Miniaturschwein sollten die Rolle der Kapillarisation des Skelettmuskels und die möglichen Pathomechanismen für das Zustandekommen des No-Reflow-Phänomens untersucht werden.

Deshalb wurden zunächst über verschiedene Manipulationen die Ausgangsbedingungen des Kapillarbett variert: Durch Induzieren einer Rarefizierung sollte die Situation im hypertonen bzw. altersveränderten Gefäßbett dargestellt werden, eine anschließende Behandlung mit Calciumkanalblockern die Umkehrbarkeit dieser Kapillarbettveränderungen zeigen. Eine Hyperkapillarisation sollte durch eine operativ angelegte chronische Ischämie erzeugt werden. Diese drei Kapillarbett-situationen wurden während einer akuten Ischämie und der anschließenden Reperfusion analysiert und einem unbeeinträchtigten Kapillarsystem als Kontrolle gegenübergestellt.

Folgende Erkenntnisse ergeben sich:

Die Basiskapillarzahlen beeinflussen die Reperfusion nach einer experimentellen Ischämie. Sowohl das Auftreten als auch die Intensität eines NoRe hängt hierbei von der Kapillarisation ab.

Das kapillarrarefizierte Gefäßsystem erweist sich gegenüber der Entwicklung eines NoRe nach Muskelischämien gefährdeter als das normale Kapillarbett. Auch bei nicht vollständig restituerter Kapillarzahl wird das hypertonieinduziert rarefizierte Gefäßbett nach Behandlung mit Calciumkanalblockern postischämisch besser perfundiert. Calciumkanalblocker können hier möglicherweise einen positiven Effekt zur Prävention eines NoRe ausüben. Der chronisch ischämische Muskel zeigt trotz unbeabsichtigt erniedrigter Kapillarzahl eine verbesserte Kapillarreperfusion nach akuter Ischämisierung.

Das Auftreten von Nekrosen und deren Ausmaß wird zusätzlich von anderen Faktoren bestimmt. Um diese genau zu bestimmen, bedarf es weiterer quantitativer Messungen.

5.1 Tabellenanhang

		Gruppe			
		A	B	C	D
Versuchstiere	1	0,169	0,056	0,067	0,130
	2	0,134	0,075	0,064	0,074
	3	0,201	0,044	-	-
	4	0,155	0,055	0,094	0,115
	5	-	0,049	0,110	0,080
	6	-	-	0,113	0,065
	7	0,101	0,070	0,161	0,089
	8	0,090	0,052	0,074	0,107
Mw		0,142	0,057	0,098	0,094

Tabelle 5-1 C/F- Ratio vor Ischämie (Basiswerte)

	1 Stunde nach Reperfusion					12 Stunden nach Reperfusion			
	A	B	C	D		A	B	C	D
1	0,080	0,040	0,044	0,095	1	0,063	0,070	0,035	0,120
2	0,086	0,048	0,065	0,069	2	0,039	0,033	0,037	0,038
3	0,076	0,103	0,046	0,042	3	0,095	0,041	0,052	0,131
4	0,066	0,098	0,052	0,076	4	0,071	0,085	0,040	0,098
5	0,031	0,049	0,103	0,061	5	0,041	0,011	0,125	0,065
6	0,130	0,043	0,094	-	6	0,098	0,074	0,136	-
7	0,055	0,054	0,052	0,069	7	0,019	-	0,128	0,077
8	-	-	-	0,076	8	-	0,025	-	0,056
Mw	0,075	0,062	0,065	0,070	Mw	0,061	0,048	0,079	0,083

Tabelle 5-2 Kapillarzahlen bei Reperfusion

	A		B		C		D	
	C/F-Ratio	%	C/F-Ratio	%	C/F-Ratio	%	C/F-Ratio	%
vor Ischämie	0,142	100,0	0,057	100,0	0,098	100,0	0,094	100,0
1 Stunde nach Reperfusion	0,075	52,9	0,062	108,3	0,065	66,7	0,070	74,1
12 Stunden nach Reperfusion	0,061	43,0	0,048	84,4	0,079	81,0	0,083	88,7

Tabelle 5-3 Prozentuale Änderung der Kapillarzahlen

### Höchste

	C6	D5	B7	D2	A2	A4	C7	A1	A3	Mw	Sx
vor	0,113	0,115	0,119	0,130	0,134	0,155	0,161	0,169	0,201	0,144	0,028
1h	0,094	0,076	0,043	0,095	0,086	0,066	0,052	0,080	0,076	0,074	0,017
12h	0,136	0,098	0,074	0,120	0,039	0,071	0,128	0,063	0,095	0,092	0,031

### Mittlere

	B8	D3	B2	D7	D8	A8	C4	A7	D9	C5	Mw	Sx
vor	0,070	0,074	0,075	0,080	0,089	0,090	0,094	0,101	0,107	0,110	0,089	0,013
1h	0,054	0,069	0,048	0,061	0,069		0,052	0,055	0,076	0,103	0,065	0,016
12h		0,038	0,033	0,065	0,077		0,040	0,019	0,056	0,125	0,056	0,031

### Niedrigste

	C3	B3	B6	A6	D4	B4	B1	C2	C1	D6	Mw	Stab
vor	0,041	0,044	0,049	0,050	0,054	0,055	0,056	0,064	0,067	0,065	0,055	0,008
1h	0,046	0,103	0,049	0,130	0,042	0,098	0,040	0,065	0,044		0,068	0,031
12h	0,052	0,041	0,011	0,098	0,131	0,085	0,070	0,037	0,035		0,062	0,035

Tabelle 5-4 Neueinteilung der Gruppen nach Basiskapillarzahlen

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	A8	Mittelwert	Standardabweichung $S_x$	St-fehler des Mw $S_x$ quer	n
vor	0,169	0,134	0,201	0,155	-	-	0,101	0,09	0,1416	0,0384	0,0157	6
1h	0,08	0,086	0,076	0,066	0,031	0,13	0,055	-	0,0750	0,0283	0,0107	7
12h	0,063	0,039	0,095	0,071	0,041	0,098	0,019	-	0,0608	0,0276	0,0104	7

	B1	B2	B3	B4	B6	B7	B8	B9	Mittelwert	Standardabweichung $S_x$	St-fehler des Mw $S_x$ quer	n
vor	0,056	0,075	0,044	0,055	0,049	-	0,07	0,052	0,0574	0,0105	0,0040	7
1h	0,04	0,048	0,103	0,098	0,049	0,043	0,054	-	0,0621	0,0247	0,0093	7
12h	0,07	0,033	0,041	0,085	0,011	0,074	-	0,025	0,0484	0,0259	0,0098	7

	C1	C2	C3	C4	C5	C6	C7	C8	Mittelwert	Standardabweichung $S_x$	St-fehler des Mw $S_x$ quer	n
vor	0,067	0,064	-	0,094	0,11	0,113	0,161	0,074	0,0976	0,0319	0,0121	7
1h	0,044	0,065	0,046	0,052	0,103	0,094	0,052	-	0,0651	0,0222	0,0084	7
12h	0,035	0,037	0,052	0,04	0,125	0,136	0,128	-	0,0790	0,0442	0,0167	7

	D2	D3	D4	D5	D7	D8	D9	D6	Mittelwert	Standardabweichung $S_x$	St-fehler des Mw $S_x$ quer	n
vor	0,13	0,074	-	0,115	0,08	0,089	0,107	0,065	0,0940	0,0220	0,0083	7
1h	0,095	0,069	0,042	0,076	0,061	0,069	0,076	-	0,0696	0,0149	0,0056	7
12h	0,12	0,038	0,131	0,098	0,065	0,077	0,056	-	0,0833	0,0317	0,0120	7

Tabelle 5-5 Gesamtdatensatz der Kapillarzahlmessungen mit Standardabweichung, Standardfehler des Mittelwerts und Anzahl n der Tiere pro Gruppe



## 6 LITERATURVERZEICHNIS

Abbott, L. C., Conforti, M. L., Isaacs, K. R., Crawley, J. N., Sterchi, D.: A simplified technique for histologic analysis of central nervous system tissues using GMA- plastic coupled with pre- embedding immunocytochemistry.  
J. Neurosci. Methods 54 (1994) 23-29

Ahmed, S. K., Egginton, S., Jakeman, P. M., Mannion, A. F., Ross, H. F.: Is human skeletal muscle capillary supply modelled according to fibre size or fibre type?  
Exp. Physiol. 82 (1997) 231-234

Allibardi, S., Chierchia, S. L., Margonato, V., Merati, G., Neri, G., Dell'Antonio, G., Samaja, M.: Effects of trimetazidin on metabolic and functional recovery of postischemic rat hearts.  
Cardiovasc. Drugs Ther. 12 (1998) 543-549

Allibardi, S., Merati, G., Chierchia, S., Samaja, M.: Atenolol depresses post-ischaemic recovery in the isolated rat heart.  
Pharmacol. Res. 39 (1999) 431-435

Ambrosio, G., Tritto, I.: Reperfusion injury: experimental evidence and clinical implications.  
Amer. Heart J. 138 (1999) 69-75

Ames, A. 3<sup>rd</sup>, Wright, R. L., Kowada, M., Thurston, J. M., Majno, G.: Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon.  
Amer. J. Pathol. 52 (1968) 437-453

Anderson, S.I., Hudlicka, O., Brown, M. D.: Capillary red blood cell flow and activation of white blood cells in chronic muscle ischemia in the rat.  
Amer. J. Physiol. 272 (1997) H2757-2764

Appell, H. J., Duarte, J. A., Gloser, S., Remiao, F., Bastos, M. L., Soares, J. M.: Administration of tourniquet. II. Prevention of postischemic oxidative stress can reduce muscle edema.  
Arch. Orthop. Trauma Surg. 116 (1997) 101-105

Ashford, A. E., Allaway, W. G., Gubler, F., Lennon, A., Slegers, J.: Temperature control in Lowicryl K4M and GMA during polymerisation: is there a low-temperature embedding method.  
J. Microsc. 144 (1986) 107-126

Banie, A., Sigerdsson, G. H., Wheatley, A. M.: Continuous perioperative monitoring of microcirculatory blood flow in pectoralis musculocutaneous flaps. *Microsurgery* 16 (1995) 469-475

Becker, B. F., Massoudy, P., Permanetter, B., Raschke, P., Zahler, S.: Possible significance of free oxygen radicals for reperfusion injury. *Z. Kardiol.* 82 (1993) 49-58

Becker, M., Menger, M. D., Lehr, H. A.: Heparin-released superoxide dismutase inhibits postischemic leukocyte adhesion to venular endothelium. *Amer. J. Physiol.* 267 (1994) H925-930

Birnbaum, Y., Hale, S. L., Kloner, R. A.: Ischemic preconditioning at a distance: reduction of myocardial infarct size by partial reduction of blood supply combined with rapid stimulation of the gastrocnemius muscle in the rabbit. *Circulation* 96 (1997) 1641-1646

Blaauw, E. H., Jonkman, M. F., Gerrits, P. O.: A rapid connective tissue stain for GMA embedded tissue. *Acta Morph. Neerl. Scand.* 25 (1987) 167-172

Blebea, J., Kerr, J. C., Shumko, J. Z., Feinberg, R. N.: Quantitative histochemical evaluation of skeletal muscle ischemia and reperfusion injury. *J. Surg. Res.* 43 (1987) 311-321

Böhme, M. W. J.: Die Konstanz der Erythrozytenpassagerate im Dienste der Kapillarbettversorgung. *Inaug. Diss. Med. Fak., Universität Würzburg*, 1984

Boger, R. H., Bode-Boger, S. M., Mugge, A., Kienke, B., Bordes, R., Dwenger, A., Frohlich, J. C.: Acute supplementation with the nitric oxide precursor L-arginin does not improve cardiovascular performance in patients with hypercholesterolemia. *Atherosclerosis* 118 (1995) 223-231

Bolli, R., Triana, J. F., Jeroudi, M. O.: Prolonged impairment of coronary vasodilation after reversible ischemia. Evidence for microvascular „stunning“. *Circ. Res.* 67 (1990) 332-343

Borsch, D. M., Cilento, E. V., Reilly, F. D.: The effects of vascular tone at physiologic suffusate pO<sub>2</sub> on acetylcholine- and sodiumnitroprusside- induced relaxation of cremaster third- order arterioles in 5- hour ischemia- reperfusion control rats. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 17 (1997) 113-122

Carvalho, A. J., McKee, N. H., Green, H. J.: Metabolic and contactile responses of fast and slow twitch rat skeletal muscles to ischemia and reperfusion. *Plast. Reconstr. Surg.* 99 (1997) 163-171

Chahine, R., Adam, A., Yamaguchi, N., Nadeau, R.: Effects of bradykinin and Des-Arg9-bradykinin on the ischemic rat heart. *Agents Actions Suppl.* 38 (1992) 103-109

Chen L., Seaber A. V., Urbaniak J. R.: Combined effect of acute denervation and ischemia on the microcirculation of skeletal muscle. *J. Orthop. Res.* 10 (1992) 112-120

Conrad, M. C., Anderson, J. L. 3<sup>rd</sup>, Garrett, J. B. jr.: Chronic collateral growth after femoral artery occlusion in the dog. *J. Appl. Physiol.* 31 (1971) 550-555

D`Agnillo, F., Chang, T. M.: Reduction of hydroxyl radical generation in a rat hindlimb model of ischemia- reperfusion injury using crosslinked hemoglobin-superoxide dismutase- catalase. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 25 (1997) 163-180

Dawson, J. M., Hudlicka, O.: Changes in the microcirculation in slow and fast skeletal muscles with long term limitations of blood supply. *Cadiovasc. Res.* 24 (1990a) 390-395

Dawson, J. M., Okyayuz-Baklouti, I., Hudlicka O.: Skeletal muscle microcirculation: the effects of limited blood supply and treatment with torbafylline. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 9 (1990b) 385-400

Deschenes, M. R., Ogilvie, R. W.: Exercise stimulates neovascularization in occluded muscle without affecting bFGF content. *Med. Sci. Sports Exerc.* 31 (1999) 1599-1604

Duarte, J. A., Gloser, S., Remiao, F., Carvalho, F., Bastos M. L., Appell, H. J.: Administration of tourniquet. I. Are edema and oxidative stress related to each other and to the duration of ischemia in reperfused skeletal muscle? *Arch. Orthop. Trauma Surg.* 116 (1997) 97-100

Ehrly, A. M.: Mikrozykulatorische Blutverteilungsstörung als pathophysiologisches Prinzip bei chronisch arteriellen Verschlusskrankungen. In: Müller- Wiefel M (Hrsg.): *Mikrozirkulation und Blutrheologie, Mikrozykulatorische Blutverteilungsstörung bei AVK* Gerhard Witzstrock, Baden-Baden - Köln - New-York, 1980

Elert, O., Steinau, H. U.: Postischämische Reperfusionsschäden und ihre Verminderung.

In: Kramer G.: Weichteilschäden.

VHC, Weinheim, 1988, S. 55-63

Engelmann, D. T., Watanabe, M., Maulik, N., Cordis, G. A., Engelmann, R. M., Rousou, J. A., Flack, J. E. 3<sup>rd</sup>, Deaton, D. W., Das, D. K.: L-arginine reduces endothelial inflammation and myocardial stunning during ischemia/ reperfusion. *Ann. Thorac. Surg.* 60 (1995) 1275-1281

Engler, R. L., Schmid- Schönbein, G. W., Pavelec, R. S.: Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog.

*Amer. J. Pathol.* 111 (1983) 98-111

Engles, R. E., Huber, T. S., Zander, D. S., Hess, P. J., Welborn, M. B., Molawer, L. L., Seeger, J. M.: Exogenous human recombinant interleukin-10 attenuates hindlimb ischemia- reperfusion injury.

*J. Surg. Res.* 69 (1997) 425-428

Feuerstein, G. Z., Ruffolo, R. R. jr.: Carvediol, a novel multiple action antihypertensive agent with antioxidant activity and the potential for myocardial and vascular protection.

*Eur. Heart J.* 16 (1995) 38-42

Folkow, B.: Physiological aspects of primary hypertension.

*Physiol. Rev.* 62 (1982): 347-504

Formigli, L., Ibba-Manneschi, L., Tani, A., Gandini, E., Adembri, C., Pratesi, C., Novelli, G. P., Zecchi-Orlandi, S.: Vitamin A prevents neutrophil accumulation and attenuates tissue damage in ischemic- reperfused human skeletal muscle.

*Histol. Histopathol.* 12 (1997) 663-669

Gerrits, P. O., Horobin, R. W., Hardonk, M. J.: A numerical procedure for choosing effective, low toxicity plasticizers for GMA embedding.

*Histochem. J.* 22 (1990) 439-451

Geyer, P.: Ist die Kapillarbettrarifikation im hypertonen Gefäßbett der Ratte ein Artefakt?

Inaug. Diss. Med. Fak., Universität Würzburg, 1986

Go, L. O., Murry, C. E., Richard, V. J., Weischedel, G. R., Jennings, R. B., Reimer, K. A.: Myocardial neutrophil accumulation during reperfusion after reversible or irreversible ischemic injury.

*Amer. J. Physiol.* 255 (1988) H1188-1198

Gonchar, M. G., Melman, E. P.: Morphofunctional changes in the muscle of the limbs and their microcirculatory bed in acute ischemia.  
Arkh. Anat. Gistol. Embriol. 98 (1990) 13-18

Gonzales, A. P., Sepulveda, S., Massberg, S., Baumeister, R., Menger, M. D.: In vivo fluorescence microscopy for the assessment of microvascular reperfusion injury in small bowel transplants in rats.  
Transplantation 58 (1994) 103-108.

Grasby, D. J., Gibbins, I. L., Morris, J. L.: Projections of sympathetic non-noradrenergic neurons to skeletal muscle arteries in guinea-pig limbs vary with the metabolic character of muscles.  
J. Vasc. Res. 34 (1997) 351-364

Gray, S. D.: Morphometric analysis of skeletal muscle capillaries in early spontaneous hypertension.  
Microvasc. Res. 27 (1984) 39-50

Green, H. J., McKee, N. H., Carvalho, A. J., Phillips, S. M.: Reductions in sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase activity in rat skeletal muscles of different fibre composition with ischemia and reperfusion.  
Can. J. Physiol. Pharmacol. 75 (1997) S. 78-82

Hagemann, P., Rosemund, K. (Hrsg.): Histotechnik (Ergänzungsheft)  
S. Hirzel, Stuttgart, 1989

Hammarsten, J., Bylund-Fellenius, A. C., Holm, J., Schersten, T., Krotkiewski, M.: Capillary supply and muscle fibre types in patients with intermittend claudication: relationships between morphology and metabolism.  
Eur. J. Clin. Invest. 10 (1980) 301-305

Hammersen, F., Messmer, K. (Hrsg.): Ischämie und Reperfusion  
Karger, Basel - München - Paris - London - New York - New Dehli - Singapore - Tokyo - Sydney, 1989

Harris, A. G., Leiderer, R., Peer, F., Messmer, K.: Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia.  
Amer. J. Physiol. 271 (1996) H2388-2398

Harris, A. G., Steinbauer, M., Leiderer, R., Messmer, K.: Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury.  
Amer. J. Physiol. 273 (1997) H989-996

Hartung, E.: Die GMA- Methode zum Nachweis der Kapillarbettrarefikation im Skelettmuskel des Hypertonikers.  
Inaug. Diss. Med. Fak., Universität Würzburg, 1986

- Hashimoto, K., Pearson, P. J., Schaff, H. V., Cartier, R.: Endothelial cell dysfunction after ischemic arrest and reperfusion: a possible mechanism of myocardial injury during reflow.  
Thorac. Cardiovasc. Surg. 102 (1991) 688-694
- Heimgärtner, W.: Rarefizierung des Kapillarnetzes der Skelettmuskulatur von Hypertonikern.  
Inaug. Diss. Med. Fak., Universität Würzburg, 1986
- Heine, H.: Helle Kerne im Myokard von Säugetieren unter normalen Bedingungen.  
Z. mikr. anat. Forsch. 87 (1973) 272-286
- Heine, H.: Zur Entwicklungsgeschichte angeborener Zwerchfellhernien bei Säugetieren.  
Anat. Anz. 133 (1973) 382-393
- Hempel, A., Lindschau, C., Maasch, C., Mahn, M., Bychkov, R., Noll, T., Luft, F. C., Haller, H.: Calcium antagonists ameliorate ischemia-induced endothelial cell permeability by inhibiting protein kinase C.  
Circulation 99 (1999) 2523-2529
- Henrich, H.: Die praktische Bedeutung des Fließverhaltens des Blutes für die Kreislauffunktion.  
Therapiewoche 33 (1983) 817- 823
- Henrich, H.: Mikrozirkulation im hypertonen Gefäßsystem.  
In: Ganten, G., Ritz, E. (Hrsg.): Lehrbuch der Hypertonie.  
Schattauer, Stuttgart - New York, 1985, S. 137-141
- Henrich, H., Böhme, M.: Kapilläre Durchströmungsmuster im Skelettmuskel.  
In: Grote J., Witzleb E. (Hrsg.): Durchblutungsregulation und Organstoffwechsel.  
Steiner, Wiesbaden, 1982, S. 128- 135
- Henrich, H., Geyer, P., Conrad, F., Silber, R.E.: Altersabhängigkeit und pathophysiologische Bedeutung der Kapillarnetzrarefizierung im hypertonen Gefäßsystem.  
Z. Gerontol 23 (1990) 147- 151
- Henrich, H., Hertel, R.: Hemodynamics and rarification of the microvasculature in spontaneously hypertensive rats.  
Bibl. Anat. 18 (1979) 184-186

Henrich, H., Hertel, R.: Microvascular hemodynamics in spontaneous hypertension.

In: Henrich H. (Hrsg.): Microvascular aspects of spontaneous hypertension. Hans Huber Publishers, Bern - Stuttgart - Wien, 1982, S. 21- 39

Henrich, H., Hertel, R., Assmann, R.: Structural differences in the mesentery microcirculation between normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Pflügers Arch.* 375 (1978) 153-159

Henrich, H., Romen, W., Heimgärtner, W., Hartung, E., Bäumer, F.: Capillary rarefaction characteristic of the skeletal muscle of hypertensive patients. *Klin. Wochenschr.* 66 (1988) 54-60

Hertel, R., Henrich, H., Assmann, R.: Intravital measurement of arteriolar pressure and tagential wall stress in normotensive and spontaneously hypertensive rats (established hypertension). *Experientia* 34 (1978) 865-867

Hertel, R., Henrich, H.: Microvascular pressures and permeability in spontaneously hypertensive and normotensive rats. *Bibl. Anat.* 18 (1979) 180-183

Hickey, M. J., Knight, K. R., Lepore, D. A., Hurley, J. V., Morrison, W. A.: Influence of postischemic administration of oxyradical antagonists on ischemic injury to rabbit skeletal muscle. *Microsurgery* 17 (1996) 517-523

Hickey, M. J., Hurley, J. V., Morrison, W. A.: Temporal and spatial relationship between no-reflow phenomenon and postischemic necrosis in skeletal muscle. *Amer. J. Physiol.* 271 (1996) H1277-1286

Hillier, C., Sayers, R. D., Watt, P. A. C., Bell, P. R., Thurston, H.: Impaired endothelium-dependent relaxation in critical limb ischemia. *J. Vasc. Res.* 31 (1994a) 17

Hillier, C., Sayers RD, Watt PAC, Bell PR, Thurston H  
Microvessel structure and function in critical limb ischemia. *J. Vasc. Res.* 31 (1994b) 16

Hirose, J., Yamaga, M., Die, J., Tanoue, M., Takagi, K.: Reduced ischemia-reperfusion injury in muscle. Experiments in rats with EPC-K1, a new radical scavenger. *Acta Orthop. Scand.* 68 (1997) 369-373

Hudlicka, O., Brown, M. D., Egginton, S., Dawson, J. M.: Effect of long term electrical stimulation on vascular supply and fatigue in chronically ischemic muscles.

J. Appl. Physiol. 77 (1994) 1317-1324

Hudlicka, O., Egginton, S., Brown, M. D., Okyayuz-Baklouti, I.: Effect of torbaphylline on muscle blood flow, performance, and capillary supply in ischemic muscles subjected to varying levels of activity.

Can. J. Physiol. Pharmacol. 72 (1994) 811-817

Hudlicka, O., Tyler, K. R.: Angiogenesis. The growth of the vascular system.

Academic Press, London - Orlando - SanDiego - New York - Austin - Montreal - Sydney - Tokyo - Toronto, 1986

Huk, I., Nanobashvili, J., Neumayer, Ch., Müller, M., Holzäpfel, A., Siegel, H., Mittlböck, M., Dryuk, M., Teufelsbauer, H., Prager, M., Polterauer, P., Roth, E.: Vasomotilität der Kapillaren während Ischämie/ Reperfusion an einem experimentellen Kaninchenmodell.

Angiologie - 95, X. Gemeinsame Jahrestagung d. Gesellschaften f. Angiologie, Wien, Vasa, 1995

Huk, I., Nanobashvili, J., Neumayer, C., Punz, A., Mueller, M., Afkhampour, K., Mittlboeck, M., Losert, U., Polterauer, P., Roth, E., Patton, S., Malinski, T.: L-arginin treatment alters the kinetics of nitric oxide and superoxide release and reduces ischemia/ reperfusion injury in skeletal muscle.

Circulation 96 (1997) 667-675

Hvaal, K., Mathisen, S. R., Svindland, A., Kirkeby, O. J.: Carvedilol reduces ischaemic skeletal muscle necrosis.

J. Orthop. Res. 17 (1999) 720-724

Hvaal, K., Mathisen, S. R., Svindland, A., Nordsletten, L., Skjeldal, S.: Protective effect of the endothelin antagonist Bosentan against ischemic skeletal muscle necrosis.

Acta Orthop. Scand. 70 (1999) 293-297

Ikeda, K.: Reversible changes of skeletal muscular capillaries after application of a tourniquet.

Microvasc. Res. 39 (1990) 156-168

Ikeda, K., Nagashima, T., Wu, S., Yamaguchi, M., Tamaki, N.: The role of calcium ion in anoxia/ reoxygenation damage of cultured brain capillary endothelial cells.

Acta Neurochir. Suppl. 70 (1997) 4-7



- Jerome, S. N., Kong, L., Korthuis, R. J.: Microvascular dysfunction in postischemic skeletal muscle.  
J. Invest. Surg. 7 (1994) 3-16
- Jonas, J., Heimann, A., Alebrahim-Dehkordy, A., Kempfski, O.: Reperfusion shock after occlusion of the superior mesenteric artery and accumulation of leukocytes within the wall of the small intestine.  
Langenbecks Arch. Chir. 38 (1996) 95-101
- Jozsa, L., Reffy, A., Demel, Z., Balint, J. B.: Analysis of skeletal muscle capillarization: methodological problems.  
Acta Physiol. Hung 66 (1985) 161- 168
- Keller, M. W.: Arteriolar constriction in skeletal muscle during vascular stunning: role of mast cells.  
Amer. J. Physiol. 272 (1997) H2154-2163
- Keupp, M.: Inaug. Diss. Med. Fak., Universität Würzburg, in Vorbereitung
- Kirschner, R. E., Fyfe, B. S., Hoffman, L. A., Chiao, J. J., Davis, J. M., Fantini, G. A.: Ischemia-reperfusion injury in myocutaneous flaps: role of leukocytes and leukotrienes.  
Plast. Reconstr. Surg. 99 (1997) 1485-1495
- Klausner, J. M., Paterson, I. S., Golman, G., Kobzik, L., Valeri, C. R., Shepro, D., Hechtman, H. B.: Thromboxane A<sub>2</sub> mediates increased pulmonary microvascular permeability following limb ischemia.  
Circ. Res. 64 (1989) 1178-1189
- Korompilias, A. V., Chen, L. E., Seaber, A. V., Urbaniak, J. R.: Studies of ischemia-reperfusion injury in skeletal muscle: efficacy of 21-aminosteroids on microcirculation and muscle contraction after an extended period of warm ischemia.  
J. Orthop. Res. 15 (1997) 512-518
- Korthuis, R. J., Granger, D. N.: Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue reperfusion.  
Clin. Cardiol. 16 (1993) 119-26
- Krotkiewski, M., Lithell, H., Shono, N., Wysocki, M., Holm, G.: High blood pressure and muscle morphology/metabolism--causal relationship or only associated factors?  
Clin. Physiol. 18 (1998) 203-213
- Kupinski, A. M., Bock, D. E., Bell, D. R.: Skeletal muscle ischemia-reperfusion causes transitory increase in microvascular protein permeability.  
Amer. J. Physiol. 273 (1997) H303-309

Kurose, I., Anderson, D. C., Miyasaka, M., Tamatani, T., Paulson, J. C., Todd, R. F., Rusche, J. R., Granger, D. N.: Molecular determinants of reperfusion-induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage.  
Circ. Res. 74 (1994) 336-343

Laan van der, L., Oyen, W. J., Verhofstad, A. A., Tan, E. C., ter Laak, H. J., Gabreels-Festen, A. Hendriks, T., Goris, R. J.: Soft tissue repair capacity after oxygen-derived free radical damage in one hindlimp of the rat.  
Surg. Res. 72 (1997) 60-69

Labrid, C.: Pharmacologic properties of Daflon 500 mg.  
Angiology 45 (1994) 524-530

Lacolley, P., Poitevin, P., Koen, R., Levy, B. I.: Different effects of calcium antagonists on fluid filtration of large arteries and albumin permeability in spontaneously hypertensive rats.  
J. Hypertension 16 (1998) 349-355

Lagerwall, K., Madhu, B., Daneryd, P., Schersten, T., Soussi, B.: Purine nucleotides and phospholipids in ischemic and reperfused rat skeletal muscle: effect of ascorbate.  
Amer. J. Physiol. 272 (1997) H83-90

Lang, J: Angioarchitektonik der terminalen Strombahn.  
In: Mikrozirkulation. Handbuch der allgemeinen Pathologie.  
Springer, Berlin - Heidelberg - New York, 1977

Lee, H. T., Lineaweaver, W. C.: Protection against ischemic-reperfusion injury of skeletal muscle: role of ischemic preconditioning and adenosine pretreatment.  
J. Reconstr. Microsurg. 12 (1996) 383-388

Lewis, D. H.: The response of the microvasculature in skeletal muscle to hemorrhage, trauma and ischemia.  
In: Hammersen F, Messer K. (Hrsg.), Skeletal Muscle Microcirculation  
Karger, Basel, 1984

Ley, K., Huo, Y.: VCAM-1 is critical in atherosclerosis.  
J. Clin. Invest. 107 (2001) 1209-1210  
Marshall J. J., Kontos H. A.: Endothelium derived relaxing factors. A perspective from in vivo data.  
Hypertension 16 (1990) 371-386

Mastiglia, F. L., Walton, Sir J.: Skeletal Muscle Pathology  
Churchill Livingstone, New York, 1982

Mathieu-Costello, O., Manciet, L. H., Tyml, K.: Capillary ultrastructure and functional capillary density.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 15 (1995) 231-237

Mazzoni, M. C., Borgstrom, P., Warnke, K. C., Intaglietta, M., Arfors, K. E.: Mechanisms and implications of capillary endothelial swelling and luminal narrowing in low-flow ischemias.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 15 (1995) 265-270

McDonagh, P. F., Cohen, D. M., Suaudeau, J., Laks, H.: The effects of myocardial ischemia followed by reperfusion on perfused coronary capillarity.

Microcirc. Endoth. Lymph. 2 (1985) 67-84

McDonagh, P. F., Roberts, D. J.: Prevention of transc coronary macromolecular leakage after ischemia-reperfusion by the calcium entry blocker nifedipine.

Direct observations in isolated rat hearts.

Circ. Res. 58 (1986) 127-136

Menger, M. D., Hammersen, F., Barker, J., Feifel, G., Messmer, K.: Tissue PO<sub>2</sub> and functional capillary density in chronically ischemic skeletal muscle.

Adv. Exp. Med. Biol. 222 (1998) 631-636

Menger, M. D., Messmer, K.: Microcirculation of skeletal muscle after ischemia and reperfusion.

Wien. Med. Wochenschr. 143 (1993) 148-158

Menger, M. D., Pelikan, S., Steiner, D., Messmer, K.: Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „reflow paradox“.

Amer. J. Physiol. 263 (1992) H1901-1906

Menger, M. D., Rucker, M., Vollmar, B.: Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/ reperfusion: on the mechanisms of capillary „no-reflow“.

Shock 8 (1997) 2-7

Messina, L. M.: In vivo assessment of acute microvascular injury after reperfusion of sicheimich tibialis anterior muscle of the hamster.

Surg. Res. 48 (1990) 615-621

Messmer, K.: Compromised perfusion. Prog. Appl. Microcirc. (Vol. 22)

Karger, Basel, 1996

Mohnike, W., Schmidt, J., Strangfeld, D., Siewert, H., Heine, H.: Studies on central and peripheral hemodynamics using radiocardiography and Xenon-133 muscle clearance in patients with essential hypertension.

Cor. Vasa 25 (1983) 349-357

Moser, A.: Die Bedeutung des Kapillarierungsgrades für die Entstehung des Reperfusionsschadens im Tiermodell.

Inaug. Diss. Med. Fak., Universität Würzburg, 2000

Motz, W., Vogt, M., Scheler, S., Schwartzkopf, B. E., Kelm, M., Strauer, B. E.: Prophylaxe mit gefäßaktiven Substanzen.

Z. Kardiol. 81 (1992) 199-204

Myhre, J. L., DePaoli, A.: A GMA method for the routine histologic evaluation of rat inner ear.

Stain Tech. 60 (1985) 63-68

Nelissen-Vrancken, H. J., Boudier, H. A., Daemen, M. J., Smits, J. F.: Anti-hypertensive therapy and adaptive mechanisms in peripheral ischemia.

Hypertension 22 (1993) 780-788

Neumayer, Ch., Huk, I., Nanobashvili, J., Holzäpfel, A., Sigel, H., Mittlböck, M., Teufelsbauer, H., Prager, M., Gruber, H., Polterauer, P.: Morphologie der I-schämie/ Reperversionsveränderung an einem experimentellen Kaninchenmodell.

Angiologie - 95, X. Gemeinsame Jahrestagung d. Gesellschaften f. Angiologie, Wien, Vasa, 1995

Nicholson, C. D., Schmitt, R. M., Wilke, R.: The effect of acute and chronic femoral artery ligation on the blood flow through the gastrocnemius muscle of the rat examined using laser Doppler flowmetry and xenon-133 clearance.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 4 (1985) 157-171

Nolte, D., Menger, D., Messmer, K.: Microcirculatory models of ischemia-reperfusion in skin and striated muscle.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 15 (1995) 9-16

Nolte, D., Messmer, K.: Tissue protection by anti-ischemic drugs.

Minaerva Cardioangiol. 42 (1995) 485-491

Nolte, D., Zeintl, H., Steinbauer, M., Pickelmann, S., Messmer, K.: Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion?

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 15 (1995) 244-249

Okada, K.: Reversible changes of skeletal muscular capillaries after application of a tourniquet.

Microvasc. Res. 39 (1990) 156-168

Pannen, B. H., Al-Adili, F., Bauer, M., Clemens, M. G., Geiger, K. K.: Role of endothelins and nitric oxide in hepatic reperfusion injury in the rat.

Hepatology 27 (1998) 755-764

Pemberton, M., Anderson, G., Parker, J.: In vivo microscopy in microcirculatory injury in skeletal muscle following ischemia-reperfusion.  
Microsurgery 15 (1994) 374-382

Perler, B. A., Tohmeh, A. G., Bulkley, B. G.: Inhibition of the compartment syndrome by the ablation of free radical-mediated reperfusion injury.  
Surgery 108 (1990) 40-47

Pickelmann, S., Flemisch, S., Enders, G., Vestweber, D., Messner, K., Nolte, D.: Biological significance of the vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1, CD 106) for post-ischemic leukocyte/endothelium interaction in skin muscle of the BALB/c mouse.  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Kongressbd. 114 (1997) 643-646

Qu, Z., Andersen, J. L., Zhou, S.: Visualisation of capillaries in human skeletal muscle.  
Histochem. Cell. Biol. 107 (1997) 169-174

Quinones-Baldrich, W. J., Chervu, A., Hernandez, J. J., Colburn, M., Moore, W. S.: Skeletal muscle function after ischemia: no-reflow versus reperfusion injury.  
J. Surg. Res. 51 (1991) 5-12

Racz, I. B., Illyes, G., Sarkadi, L., Hamar, J.: The functional and morphological damage of ischemic reperfused skeletal muscle.  
Eur. Surg. Res. 29 (1997) 254-263

Rawitscher, D., Levin, T. N., Cohen, I., Feldmann, T.: Rapid reversal of no-reflow using Abeximab after coronary device intervention.  
Cathet. Cardiovasc. Diagn. 42 (1997) 187-190

Reynolds, J. M., McDonagh, P. F.: Early in reperfusion, leukocytes alter perfused capillarity and vascular resistance.  
Amer. J. Physiol. 256 (1989) H982-989

Ritter, L. S., McDonagh, P. F.: Low-flow reperfusion after myocardial ischemia enhances leukocyte accumulation in coronary microcirculation.  
Amer. J. Physiol. 273 (1997) H1154-1165

Romeis, B., Böck, P. (Hrsg.): Mikroskopische Technik  
Urban und Schwarzenberg, München - Wien - Baltimore, 1989

Rosenberg, M., Bartl, P., Lesko, J.: Water-soluble methacrylate as an embedding medium for the preparation of ultrathin sections.  
J. Ultrastruct. Res. 4 (1960) 298-303

Rouanet, P.; Bacou, F.: Changes in fibre type, metabolic character and acetylcholinesterase forms in rabbit skeletal muscle following stretch and electrical stimulation.

Neuromuscul. Disord. 3 (1993) 401-405

Rowlands, T. E., Gough, M. J., Homer-Vanniasinkam, S.: Do prostaglandins have a salutary role in skeletal muscle ischaemia-reperfusion injury?

Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 18 (1999) 439-444

Ruddell, C. L.: Hydroxyethyl methacrylate combined with polyethylen glycol 400 and water; an embedding medium for routine 1- 2 micron sectioning.

Stain Tech. 42 (1967) 119-123

Ruddell, C. L.: Initiating polymerisation of GMA with cyclic diketo carbon acids.

Stain Tech. 58 (1983) 329-336

Schmalbruch, H., Oksche, A., Vollrath, L.: The vascular supply

In: Handbook of microscopic anatomy

Springer, Berlin - Heidelberg - New York - Tokyo, 1985, S. 22- 30

Schröder, J. M.: Pathologie der Muskulatur

In: Doer W. (Hrsg.) Spezielle pathologische Anatomie, Bd 15;

Springer, Berlin - Heidelberg, 1982

Shimizu, M., Wang, Q. D., Sjoquist, P. O., Ryden, L.: The angiotensin II AT1 Rezeptor antagonist candesartan improves functional recovery and reduces the no-reflow area in reperfused ischemic rat hearts.

J. Cardiovasc. Pharmacol. 34 (1999) 78-81

Skjeldal, S., Nordstetten, L., Kirkeby, O. J., Groggaard, B., Bjerkheim, I., Mowinckel, P., Torvik, A., Reikeras, O.: Perfusion in the anterior tibial muscle measured by laser Doppler flowmetry after graded periods of hindlimb ischemia in rats.

Int. J. Microcirc. Clin. Exp. 12 (1993) 107-118

Smith, J. K., Carden, D. L., Grisham, M. B., Granger, D. N., Korthuis, R. J.:

Role of iron in postischemic microvascular injury.

Amer. J. Physiol. 256 (1989) H1472-1477

Smith, J. K., Grisham, M. B., Granger, D. N., Korthuis, R. J.: Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle.

Amer. J. Physiol. 256 (1989) H789-793

Steinbauer, M., Harris, A. G., Messmer, K.: Effects of dextran on microvascular ischemia- reperfusion injury in striated muscle.

Amer. J. Physiol. 272 (1997) H1710-1716

Sternbergh, W. C. 3<sup>rd</sup>, Tuttle, T. M., Makhoul, R. G., Bear, H. D., Sobel, M., Fowler, A. A. 3<sup>rd</sup>: Postischemic extremities exhibit immediate release of tumor nekrosis faktor.

J. Vasc. Surg. 20 (1994) 474-481

Stotland, M. A., Kerrigan, C. L.: The role of platelet- activating factor in muscu-locutaneous flap reperfusion injury.

Plast. Reconstr. Surg. 99 (1997) 1989-2001

Stotland, M. A., Kerrigan, C. L.: E- and L- selectin adhesion molecules in mus- culocutaneous flap reperfusion injury.

Plast. Reconstr. Surg. 99 (1997) 2010-2020

Straaten van, H. W. M., Hekking, J. W. M., Drukker, J.: A HCl- toluidine blue staining procedure specific for nuclei, mitotic figures and axons in GMA- em- bedded embryonic neural tissue.

Stain Tech. 62 (1987) 360-363

Strauer, B. E., Vogt, M., Motz, W.: ACE- Inhibitors and coronary microcircula- tion.

Basic Res. Cardiol. 88 (1993) 97-10

Sun, J. Z., Tang, X. L., Park, S. W., Qiu, Y., Turrens, J. F., Bolli, R.: Evidence for an essential role of reactive oxygen species in the genesis of late precondi- tioning against myocardial stunning in conscious pigs.

J. Clin. Invest. 97 (1996) 562-576

Suval, W. D., Duran, W. N., Boric, M. P., Hobson, R. W. 3<sup>rd</sup>, Berendsen, P. B., Ritter, A. B.: Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury.

Amer. J. Surg. 154 (1987) 211-218

Takeschita, S., Pu, L. Q., Stein, L. A., Snidermann, A. D., Bunting, S., Ferrara, N., Isner, J. M., Symes, J. F.: Intramuscular administration of vascular endothe- lial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia.

Circulation 90 (1994) II228-234

Tuncel, N., Erden, S., Uzuner, K., Altiocka, G., Tuncel, M.: Ischemic- reper- fused rat skeletal muscle: the effect of vasoactive intestinal peptide (VIP) on contractile force, oxygenation and antioxidant enzyme systems.

Peptides. 18 (1997) 269-275

Tsapenko, M. W.: Der postischämische Reperfusionsschaden im Tiermodell  
Inaug. Diss. Med. Fak., Universität Würzburg, 1998

- Ubbink, D. T., Kistlaar, P. J., Tordoir, J. H., Tangelder, J. J., Reneman, R. S., Jacobs, M. J.: The relevance of posturally induced microvascular constriction after revascularisation in patients with chronic leg ischaemia.  
Eur. J. Vasc. Surg. 6 (1992) 525-532
- Unterburger, J.: Funktionelle Verknüpfung von Kapillarbetrreffikation und Permeabilität im Skelettmuskel von Spontan Hypertonen Ratten (SHR).  
Inaug. Diss. Med. Fak., Universität Würzburg, 1992
- Urbaniak, J. R., Seaber, A. V., Chen, L. E.: Assessment of ischemia and reperfusion injury.  
Clin. Orthop. 334 (1997) 30-36
- Vicaut, E.: Microcirculation and arterial hypertension.  
Drugs. 58 (1999) 1-10
- Waagstein, L. M., Jivegard, L., Haljamae, H.: Hypertonic saline infusion with or without dextran 70 in the reperfusion phase of experimental acute limb ischaemia.  
Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 13 (1997) 285-295
- Wang, W. Z., Anderson, G., Acland, R. D., Barker, J.: Endothelin-1 does not contribute to ischemia/ reperfusion induced vasoconstriction in skeletal muscle.  
J. Reconstr. Microsurg. 13 (1997) 439- 447
- Wang, W. Z., Anderson, G., Fleming, J. T., Peter, F. W., Franken, R. J., Acland, R. D., Barker, J.: Lack of nitric oxide contributes to vasospasm during ischemia/ reperfusion injury.  
Plast. Reconstr. Surg. 99 (1997) 1099-1108
- Wang, W. Z., Guo, S. Z., Tsai, T. M., Anderson, G. L., Miller, F. N.: Platelet-activating factor contributes to postischemic vasospasm.  
J. Surg. Res. 89 (2000) 139-146
- Weiler, U., Appell, H. J., Kremser, M., Hofacker, S., Claus, R.: Consequences of selection on muscle composition. A comparative study on gracilis muscle in wild and domestic pigs.  
Anat. Histol. Embryol. 24 (1995) 77-80
- Weiss, A. P., Carey, L. A., Randolph, M. A., Moore, J. R., Weiland, A. J.: Oxygen radical scavengers improve vasculare patency and bone muscle and cell survival in an ischemic extremity replant model.  
Plast. Reconstr. Surg. 84 (1989) 117-123
- Wiernsperger, N. F.: Serotonin, 5-HT<sub>2</sub> receptors, and their blockade by naftidrofuryl: a targeted therapy of vascular diseases.  
J. Cardiovasc. Pharmacol. 23 (1994) 37-43



Wu, S., Nagashima, T., Ikeda, K., Kondoh, T., Yamaguchi, M., Tamaki, N.: The mechanism of free radical generation in brain capillary endothelial cells after anoxia and reoxygenation.

Acta Neurochir. Suppl. Wien 70 (1997) 37-39

Wysocki, H.: The role of polymorphonuclear neutrophils in myocardial damage during ischemia and reperfusion.

Arch. Immunol. Ther. Exp. Warsz. 40 (1992) 49-53

Xu, K. Y., Zweier, J. L., Becker, L. C.: Hydroxyl radical inhibits sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> ATPase function by direct attack on the ATP binding site.

Circ. Res. 80 (1997) 76-81

Yokota, J., Minei, J. P., Fantini, G. A., Shires, G. T.: Role of leukocytes in reperfusion injury of skeletal muscle after partial ischemia.

Amer. J. Physiol. 257 (1989) H1068-1075

Yokoyama, I., Negita, M., Kobayashi, T., Hayashi, S., Hachisuka, T., Sato, E., Orihara, A., Uchida, K., Takagi, H.: Beneficial effect of donor pretreatment with thromboxane A<sub>2</sub> synthase inhibitor on the graft survival in pig liver transplantation.

J. Surg. Res. 60 (1996) 232-238

Yokoyama, K., Nakamura, K., Itoman, M., Kimura, M., Ohyatsu, Y., Ui, K., Wakita, R.: Do superoxide radicals in blood indicate anastomotic patency after microvascular tissue reperfusion?

J. Reconstr. Microsurg. 11 (1995) 467-471

Zamboni, W. A., Stephenson, L. L., Roth, A. C., Suchy, H., Russell, R. C.: Ischemia-reperfusion induced injury in skeletal muscle: CD 18- dependent neutrophil- endothelial adhesion and arteriolar vasoconstriction.

Plast. Reconstr. Surg. 99 (1997) 2002-2009

Herrn Prof. Dr. med. H. A. Henrich danke ich für die Überlassung des Dissertationsthemas sowie für die Unterstützung bei Durchführung und Ausarbeitung.

Herrn Prof. Dr. med. O. Elert danke ich für sein Interesse an der vorliegenden Arbeit und die freundliche Übernahme des Korreferats.

Mykola Tsapenko danke ich für die Anleitung und kollegiale Zusammenarbeit an unserem gemeinsamen Projekt, an dem auch Michael Keupp und Alexander Moser mit viel Zeitaufwand beteiligt waren.

Weiterhin bedanke ich mich bei Herrn Reichert, Frau Panzner, Frau Scheuer, Frau Emmert, Herrn Dr. Trenkel, Herrn Meitz und allen anderen, die ich hier nicht einzeln erwähne, sowohl für ihre praktische Unterstützung als auch für die wertvollen Ratschläge.

Die Herstellung, Färbung und Auswertung der histologischen Präparate durfte ich im Pathologischen Institut der Universität Würzburg durchführen, wobei mir neben den Medizinisch-technischen-Assistentinnen vor allem Dr. med. Ott und Dr. med. Krein behilflich waren. Die Fotografien der Präparate konnte ich unter der freundlichen Hilfestellung von Herrn Schmidt anfertigen.

Schließlich danke ich meinen Eltern und Schwiegereltern für das gleichbleibend starke Interesse an der Fertigstellung, sowie meinem Bruder für die Hilfe bei Layout und Druck.

Ganz besonderer Dank gilt meiner Frau für die Geduld, die Mithilfe und Rücksicht während der Durchführung der Experimente und beim Verfassen dieser Arbeit.

## LEBENS LAUF

Matthias Weber

geboren am 2. August 1972 in Würzburg

1978 - 1982	Grundschule Kürnach
1982 - 1991	Riemenschneider Gymnasium Würzburg
1991	Abitur
1993 - 2000	Studium der Humanmedizin an der Julius- Maximilians- Universität Würzburg,
6/ 2000	3. Staatsexamen
9/ 2000- 2/2001	AiP in der chirurgischen Abteilung der Mainklinik Och- senfurt
3/ 2001- 2/2002	AiP in der Abteilung für Chirurgie der Missionsärztlichen Klinik Würzburg
3/ 2002	Approbation
seit 3/ 2002	Assistenzarzt in der chirurgischen Abteilung des Kreis- krankenhauses Kitzingen

Höchberg, im Juni 2002