

Aus dem Fachbereich Humanmedizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
Direktor: Prof. Dr. I. Marzi

**Kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (MRT)
zur non-invasiven Analyse intrahepatischer Funktionsstörungen
nach hämorrhagischem Schock**

-Tierexperimentelle Studie an der Ratte-

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main

vorgelegt von
Patrick Hahn
aus Illingen/Saar

Frankfurt am Main, 2002

Meinen Eltern gewidmet.

INHALTSVERZEICHNIS

1. ZUSAMMENFASSUNG.....	6
2. SUMMARY.....	9
3. EINLEITUNG.....	12
3.1 Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks.....	13
3.1.1 Bedeutung der Leber im Schock.....	13
3.1.2 Bedeutung und Entstehung freier Sauerstoffradikale.....	14
3.1.3 Lipidperoxidation.....	16
3.1.4 Arachidonsäurestoffwechsel.....	17
3.1.4.1 Wirkung der Arachidonsäurederivate.....	17
3.1.5 Zytokine.....	19
3.1.6 Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	21
3.1.7 Einfluß des Ischämie/Reperfusionsschadens auf die Makrophagen....	23
3.1.8 Einfluß des Ischämie/Reperfusionsschadens auf die Hepatozyten.....	24
3.2 Kernspintomographie der Leber.....	25
3.2.1 Klinische Bedeutung der MRI.....	25
3.2.2 Verbesserung der Darstellung durch Kontrastmittel.....	26
3.2.3 Experimenteller Ansatz der Leberdiagnostik mittels MRI im Tierexperiment.....	27
3.3 Intravitalmikroskopie der Leber.....	28
3.4 Fragestellung.....	29
4. MATERIAL UND METHODE.....	31
4.1 Versuchsvorbereitung.....	31
4.1.1 Versuchstiere und Versuchsdesign.....	31
4.1.2 Operative Vorbereitung.....	33
4.1.3 Hämorrhagisches Schockmodell.....	34

4.2	Magnetresonanztomographie (MRT).....	35
4.2.1	Kontrastmittel.....	37
4.2.1.1	Gd-EOB-DTPA.....	37
4.2.1.2	ENDOREM.....	38
4.2.2	MRT-Untersuchungsablauf.....	39
4.3	Intravitalmikroskopie (IVM).....	43
4.3.1	Mikroskop.....	43
4.3.2	Fluoreszenzfarbstoffe.....	45
4.3.3	Untersuchungsablauf.....	45
4.3.3.1	Laparotomie.....	45
4.3.3.2	Mikroskopie.....	47
4.3.3.2.1	Intravitalmikroskopische Leukozytenbeobachtung.....	47
4.3.3.2.2	Intravitalmikroskopische Aufzeichnung der Makrophagenaktivität nach Gabe von Latex Partikeln.....	48
4.4	Bestimmung der Gallesekretion.....	48
4.4.1	Operatives Vorgehen.....	48
5.	AUSWERTUNG.....	49
5.1	Quantitative Analyse der kernspintomographischen Daten.....	49
5.1.1	Auswertung nach ENDOREM Gabe.....	49
5.1.2	Auswertung nach Gd-EOB-DTPA Gabe.....	51
5.2	Intravitalmikroskopische Auswertung.....	53
5.2.1	Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	54
5.2.2	Digitale Bildanalyse.....	55
5.2.2.1	Bestimmung der Leukozytengeschwindigkeit.....	55
5.2.2.2	Bestimmung der Sinusoidweiten.....	56
5.2.2.3	Bestimmung des volumetrischen Blutflusses.....	56
5.2.2.4	Berechnung der Makrophagenaktivität.....	56

6. ERGEBNISSE.....	58
6.1 Makrohämodynamische Parameter und Labordaten.....	58
6.1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck und Herzfrequenz.....	59
6.1.2 Säure Basen Haushalt.....	60
6.1.3 Hämoglobin und Hämatokrit.....	62
6.2 Kernspintomographische Auswertung.....	64
6.2.1 Bestimmung der Makrophagenaktivität.....	64
6.2.2 Bestimmung der Gallesekretion.....	62
6.3 Intravitalmikroskopische Parameter.....	67
6.3.1 Leukozytengeschwindigkeit, Sinusoidbreiten, volumetrischer Blutfluß.....	67
6.3.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion.....	69
6.3.2.1 Temporär adhärenente Leukozyten.....	69
6.3.2.2 Dauerhaft adhärenente Leukozyten.....	70
6.3.2.3 Mittlere Adhärenzzeit, Adhäsionsindex.....	71
6.3.3 Makrophagenaktivität.....	73
6.3.4 Gallesekretion.....	74
7. DISKUSSION.....	75
7.1 Hämodynamische Parameter und Laborwerte.....	76
7.2 Kontrastmittelgestützte MRT.....	78
7.2.1 Hepatobiliäre Sekretion.....	79
7.2.2 Makrophagenaktivität nach Ischämie/Reperfusion.....	82
7.3 Intravitalmikroskopische Untersuchung.....	85
7.3.1 Mikrozirkulationsveränderungen.....	85
7.3.1.1 Leukozyten Endothel Interaktion.....	85
7.3.1.2 Leberperfusion.....	87
7.4 Schlußfolgerung.....	89
8. Literaturverzeichnis.....	90
9. Danksagung.....	109
10. Lebenslauf.....	110

1. Zusammenfassung

Die Leber spielt eine zentrale Rolle in der Entwicklung des Multiorganversagens nach Ischämie, Schock und Trauma. Hierbei nehmen die Veränderungen der Makrophagenaktivität, der Hepatozytenfunktion und der Mikrozirkulation eine besondere Stellung ein.

Bisherige Untersuchungen zu dieser Thematik erfolgten meist mit Hilfe von in-vitro Methoden oder mittels der Intravitalmikroskopie.

Ziel der vorliegenden Studie war, frühe Leberveränderungen nach hämorrhagischem Schock mit Hilfe der kontrastmittelverstärkten Magnetresonanztomographie zu erfassen. Im Kleintierexperiment wurde dazu die Makrophagenaktivität und die Gallesekretion der Leber 3 bzw. 24 Stunden nach hämorrhagischem Schock untersucht und mit den Ergebnissen der Intravitalmikroskopie bzw. der Gallesekretionmessung über den D. Choledochus verglichen.

Zur Versuchsdurchführung wurden weibliche Sprague-Dawley Ratten mit 50 mg/kg Kg Pentobarbital narkotisiert. Zur kontinuierlichen Messung von Herzfrequenz, mittlerem arteriellen Blutdruck und zur Blutentnahme wurde den Tieren ein arterieller Katheter in die A. femoralis eingebracht. Über diesen erfolgte die Schockinduktion durch fraktionierte Blutentnahmen bis auf Werte von 40 ± 5 mmHg. Diese hypotone Kreislaufsituation wurde über einen Zeitraum von 90 Minuten durch intermittierende Blutentnahmen konstant gehalten. Im Anschluß folgte eine dreistündige Reperfusionphase mit Reinfusion von 60% des Shed-Blutes und Ringer-Laktat-Lösung nach einem standardisierten Schema.

Die randomisierte Aufteilung der Tiere erfolgte in 8 Gruppen:

Zum einen wurden an zwei Sham und Schockgruppen kernspintomographische Untersuchungen im Anschluß an die Reperfusionphase nach 3 bzw. 24 Stunden durchgeführt. Die Untersuchung erfolgte an einem Kleintierkernspintomographen mit einer 2,4T Magnetfeldspule (Bruker, Biospec, Germany). Mit Hilfe von ENDOREM ($15 \mu\text{mol/kg KG i.v.}$) als Kontrastmittel wurde die Makrophagenaktivität der Leber untersucht, wobei Veränderungen der Signalintensität und Relaxationszeit in T2-gewichtetem Gewebe gemessen wurden. Gd-EOB-DTPA ($200 \mu\text{mol/kg KG i.v.}$) diente zur kernspintomographischen Darstellung der Gallesekretion

durch Signalintensitätsmessung in T1-gewichtetem Gewebe. Die Untersuchungssequenzen folgten dabei einem festgelegten Zeitablauf.

Im Anschluß an die MRT wurden die Tiere laparotomiert und der linke Leberlappen auf einem speziellen Plexiglastisch zur intravitalmikroskopischen Untersuchung horizontal ausgelagert. Nach i.v. Gabe des Leukozytenfluoreszenzfarbstoffes Acridine Orange (1 $\mu\text{mol/kg KG}$) begann die Epifluoreszenzmikroskopie. Pro Versuchstier wurden fünf Lobuli für jeweils 30 Sekunden und fünf Zentralvenen als Standbilder aufgezeichnet. Diese Untersuchung diente der Auswertung der Leukozyten-Endothel-Interaktion und der Beurteilung der Mikrozirkulationsveränderungen nach hämorrhagischem Schock.

In einer weiteren Versuchsreihe wurde an zwei Sham und Schockgruppen die Makrophagenaktivität mit Hilfe der Intravitalmikroskopie und die Gallesekretion durch quantitative Messung bestimmt. Hierzu wurden die Tiere 3 bzw. 24 Stunden postischämisch laparotomiert und ein spezieller Kunststoffkatheter in den D. Choledochus eingebracht. Über diesen wurde die Galle für eine Stunde abgeleitet und das Volumen bestimmt. Anschließend wurde wie in den vorherigen Gruppen, der linke Leberlappen zur Intravitalmikroskopie ausgelagert. Zur Darstellung der Makrophagenaktivität wurden Latexpartikel (3×10^8 Beads/kg KG) über einen Schwanzvenenzugang injiziert und fünf Lobuli nach 12 Minuten als Standbilder aufgezeichnet.

Die Auswertung der makrohämodynamischen und klinisch-chemischen Parametern zeigte keine signifikanten Unterschiede, so daß von vergleichbaren Versuchsbedingungen ausgegangen werden kann.

Hingegen zeigte die postischämische intravitalmikroskopische Auswertung nach dreistündiger Reperfusion eine signifikante Erhöhung der Makrophagenaktivität im periportal und perizentralen Bereich gegenüber der Schockgruppe, wobei die Kernspintomographie im Gegensatz dazu nach Applikation von ENDOREM keine signifikanten Unterschiede bezüglich Signalintensität und T2-Relaxationszeit aufzeigte. 24 Stunden postischämisch konnten weder mittels Kernspintomographie noch mittels der Intravitalmikroskopie Veränderungen der Makrophagenaktivität nachgewiesen werden.

Demgegenüber zeigte sich in der Schockgruppe mit Hilfe der MRT nach 24 Stunden eine signifikant verminderte Ausscheidung von Gd-EOB-DTPA, die mit Hilfe der quantitativen Gallesekretionsmessung über den D. Choledochus ebenfalls dargestellt werden konnte.

Die Untersuchung der Mikrohämodynamik zeigte postischämisch eine signifikante Zunahme der temporären sowie der dauerhaft adhärenen Leukozyten im Reperfuisionsverlauf. Ebenso wurde 24 Stunden nach Reperfuisionsbeginn eine signifikante Verengung der Sinusoiddurchmesser, eine Abnahme des volumetrischen Blutflusses und eine Verminderung der Leukozytengeschwindigkeit gemessen.

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, daß mit Hilfe der kontrastmittelverstärkten, nichtinvasiven Magnetresonanztomographie Funktionsstörungen der Hepatozyten nach hämorrhagischem Schock dargestellt werden können. Demgegenüber zeigte die Makrophagenaktivität kernspintomographisch keine Veränderungen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Obschon sublobuläre Veränderungen nicht erfaßt werden können, ermöglicht die non-invasive Magnetresonanztomographie klinisch anwendbare Verlaufsuntersuchungen. Mit der weiteren Entwicklung spezifischer Kontrastmittel und Verbesserung der technischen Ausstattung kann diese klinisch etablierte Untersuchungstechnik weiter ausgedehnt werden.

2. Summary

Contrast-enhanced magnetic resonance imaging (MRI) for the non invasive analysis of intrahepatic disturbances after hemorrhagic shock

-An intravital microscopic study in the rat-

The liver plays an important role to the development of multiple-organ failure syndrome after ischemia, shock and trauma. Therefore, changes to the macrophage activity, hepatocyte function and microcirculation are very important.

Early studies to investigate these problems were mostly made with in-vitro models and intravital microscopy.

In this study we examined in an animal model if it is possible to show early liver disturbances after hemorrhagic shock with the magnetic resonance imaging. Therefore, we investigated the changes of the macrophage activity and hepatobiliary excretion and compared them with the results of the intravital microscopy and the quantitative measurement of the bile flow.

Female Sprague-Dawley rats were anesthetized by intraperitoneal injection of 50mg/kg body weight pentobarbital. For invasive haemodynamic monitoring (heart rate (HR), mean arterial blood pressure), a polyethylene catheter was inserted into the left femoral artery. The animals were bled within five minutes to a mean arterial pressure of 40 ± 5 mmHg. This hypotension was maintained for 90 minutes by intermittent blood withdraws. Following the shock period, a resuscitation with 60% shed blood volume and four times of shed volume as lactated Ringer's was performed to restore the systemic circulation.

Eight groups were compared after randomisation:

Two shock and sham groups were examined after three hours and 24 hours of resuscitation by magnetic resonance imaging (MRI). Therefore, we used a small animal magnetic resonance tomograph, operating with a field strength of 2,4 T (BRUKER, Biospec, Germany).

A superparamagnetic contrast agent (ENDOREM) was applied to examine changes in macrophage activity after hemorrhagic shock by reducing the signal intensity and T2 relaxation time. MR-imaging was undertaken with 15µmol/kg body weight ENDOREM.

Gd-EOB-DTPA (200 μ mol/kg body weight) as a hepatocellular contrast agent was used to examine the hepatobiliar excretion after shock.

At the end of the MR-imaging, the abdomen of the rats was opened, the liver was mobilized and the left liver lobe was positioned horizontally on a plexiglas stage for the ensuing intravital fluorescence microscopy.

We used Acridine orange (1 μ mol/kg body weight) to stain the leukocytes. Five liver lobules were recorded to assess the leukocyte-endothelial interaction and the microcirculatory disturbances after shock.

In an further experiment with two sham and two shock groups we've examined changes in macrophage activation by using the intravital microscopy. Hepatocellular function was estimated by the rate of bile production.

Therefore, the common bile duct of the rats was cannulated after midline laparotomy. The bile production was measured for one hour.

Following the cannulation, the left liver lobe was mobilized to accomplish the intravital microscopy. Fluorescence - labeled latex beads (3×10^8 /kg body weight) were injected intravenously and five randomly chosen liver lobules were recorded 12 minutes after injection for five seconds each.

The study did not show significant differences in respect to hemodynamic (mean arterial blood pressure, heart rate), respiratory (pCO₂) or metabolic (base excess, pH) parameters between the shock groups.

The evaluation of the macrophage activity with fluorescence-labeled latex beads however showed three hours after reperfusion a significant increase of the macrophage activity in periportal and pericentral areas in the shock group. On the contrary, the magnetic resonance imaging with Endorem did not show significant changes in macrophage activation with regard to signal intensity and T2 weighted pictures. 24 hours after reperfusion, neither the intravital microscopy nor the MR-imaging could have shown changes in macrophage activation.

However, the analysis of the hepatobiliary excretion with MR-imaging showed 24 hours after reperfusion a significant decrease of Gd-EOB-DTPA in the shock group. These results correlated with the quantitative measurement of the bile production.

The microhemodynamic parameters showed a significant increase for the temporary adherent leukocytes (<20 sec.) and the permanent adherent leukocytes (defined as 20 sec. or more) in the shock groups. In addition, a significant constriction of the sinusoids was shown 24 hours after shock.

The results of this study indicate that the contrast-enhanced magnetic resonance can demonstrate disturbances of the hepatocytes after hemorrhagic shock. However, changes in macrophage activity after hemorrhagic shock were not detectable in the model used.

Even if the MR-imaging could not show sublobular changes, it could be used for clinical important follow-ups. With the improvement of the contrast agents and the equipment the clinical MR-imaging to follow changes of the hepatic in microcirculation may be applicable.

3. Einleitung

Schwere Mehrfachverletzungen (Polytrauma) und penetrierende Verletzungen großer Gefäße führen durch prolongierte Hypovolämie häufig zum generalisierten Ischämie/Reperfusionsschaden. Diese Situationen sind mit dem Begriff des hämorrhagisch/traumatischen Schocks verbunden (Buhren, 1996). Der dabei entstehende Volumenmangel führt u.a. zu Gewebshypoxie durch Mangel an Sauerstoffträgern, Makro- und Mikrozirkulationsstörungen sowie Veränderungen im Gewebstoffwechsel und Immunsystem (Jiang *et al.*, 1997; Sturm *et al.*, 1979). Im Zuge einer überschießenden Ausschüttung verschiedener humoraler und zellulärer Mediatoren wie z.B. Komplement, Zytokine, Eicosanoide und der Aktivierung von Leukozyten und Makrophagen, kann es dann zu einer generalisierten, systemischen Entzündungsreaktion, dem sogenannten „Systemic Inflammatory Response Syndrom“ (SIRS) (Rose and Marzi, 1996a; Rose and Marzi, 1996b) kommen. Es liegt hierbei per Definitionem ein sepsisähnliches Bild ohne Bakteriämie oder Sepsisherde vor (Benoit *et al.*, 1998; Goris *et al.*, 1985). Im Verlauf dieser Entzündungsreaktion kann bei anhaltenden Mikrozirkulationsstörungen eine Schädigung verschiedener Organe bis hin zum Multiorganversagen resultieren (Goris 1996). 1975 definierte BAUE das Multiorganversagen als Funktionsverlust von mindestens zwei Organen bei gleichzeitigen septiformen Symptomen (Vollmar *et al.*, 1996a; Baue, 1975).

Als Motor bei der Ausbildung des Multiorganversagens stehen dabei der Gastrointestinaltrakt (Deitch *et al.*, 1994; Regel *et al.*, 1996) und die Leber im Vordergrund. Nachfolgend werden die verschiedenen Pathomechanismen welche im Verlauf eines hämorrhagischen Schockgeschehens von Bedeutung sein können beschrieben. Besonderes Augenmerk wird dabei auf die Bedeutung der Leber im Rahmen eines Schockgeschehen gelegt.

3.1 Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks

3.1.1 Bedeutung der Leber im Schock

In der Pathogenese des Multiorganversagens stehen Mikrozirkulationsstörungen mit fokaler Minderperfusion und Hypoxie durch Volumenverlust im Vordergrund. Die Lage der Leber im Abstromgebiet des Gastrointestinaltraktes spielt dabei eine bedeutende Rolle. Im Rahmen der Ischämie/Reperfusion kommt es im Dünndarmgebiet zur ausgeprägten Zerstörung der intestinalen Mukosabarriere und nachfolgend zu einer Translokation von Bakterien und Endotoxinen aus dem Darmlumen in die Mesenterialgefäße (Hawker, 1991; Berg, 1992). Über die geschädigte Mukosa gelangen diese über den Portalkreislauf in die Leber und sind dort maßgeblich über eine Aktivierung lokaler Entzündungsmediatoren an der Entstehung von Leberschäden beteiligt (Chiu *et al.*, 1970; Swank and Deitch, 1996).

Bei der Erklärung der ablaufenden Pathomechanismen in der Leber spielt die morphologische und funktionelle Differenzierung der Leberzellen in parenchymale und nichtparenchymale Zellen eine wichtige Rolle.

Mit ca. 94% besitzen die Hepatozyten als parenchymale Zellen den größten Anteil am Zellvolumen. Sie sind entlang der Lebersinusoiden vom portalen zum zentralen Feld angeordnet und erfüllen viele Stoffwechselabläufe wie Proteinbiosynthese, Glukoneogenese, Liponeogenese, die Konjugation von Gallensäure und verschiedene Detoxifikationsprozesse (Jungermann and Katz, 1982; Rappaport, 1963). Man findet hier eine zonentypische Funktionsaufteilung vor, die u.a. mit dem Verlauf des Sauerstoffgradienten zusammenhängt.

Die nichtparenchymatösen Zellen umfassen etwa 4% des Zellvolumens und werden in Endothelzellen (ca. 60%), Makrophagen (v. Kupffersche Sternzellen, ca. 30%) und ITO-Zellen (ca. 10%) eingeteilt (Wake *et al.*, 1989). Die Kupfferschen Sternzellen bilden mit 80-90% den größten Anteil aller ortsständigen Makrophagen im Körper (Clemens *et al.*, 1994) und somit den größten Teil des retikulo-endothelialen Systems. Ihre Aufgabe besteht in der Phagozytose von Zellbestandteilen, Bakterien, Endotoxine oder anderen Partikeln. Über diese Detoxifikationsprozesse kommt es zur Makrophagenaktivierung mit einer verstärkten Sezernierung verschiedener hochpotenter Mediatoren. Hier sind vor allem die Zytokine wie z.B. Tumor Nekrose Faktor (TNF α), Interleukin 1 (Dzik *et al.*, 1988) und Interleukin 6 (Pardy and Dudley,

1977) zu erwähnen. Die Ausschüttung dieser Mediatoren hat direkten Einfluß auf die hepatozytäre Proteinbiosynthese im Rahmen der Akutphasenreaktion (Heinrich *et al.*, 1990; Pizanis *et al.*, 1999; Svoboda *et al.*, 1994). Diese führt zum einen zu einer verstärkten Aktivierung körpereigener Abwehrmechanismen, zum anderen können proinflammatorische Mediatoren zu einer vom Körper nicht mehr kontrollierbaren, überschießenden Reaktion bis hin zur Autoaggression übergehen (Kishimoto, 1989; Baue *et al.*, 1996; Wang *et al.*, 1998) und zur Schädigung anderer Organsysteme insbesondere der Lunge führen und im irreversiblen Multiorganversagen enden.

3.1.2 Bedeutung und Entstehung freier Sauerstoffradikale

Die im Rahmen eines hypovolämischen Schockgeschehens herbeigeführte Gewebsischämie kann in Abhängigkeit von der Zeitdauer des Geschehens zu einer hypoxischen Zellschädigung führen. Mit Behandlung des Schocks und somit folgender Reperfusion des Gewebes kann es jedoch zusätzlich zu Organveränderungen kommen. Die als Ischämie/Reperfusionssyndrom bezeichnete Gewebsschädigung wird maßgeblich durch Sauerstoffradikale nach Wiederherstellung der Gewebsdurchblutung hervorgerufen. Hierbei spielt deren membran-schädigende Wirkung eine entscheidende Rolle (McCord, 1985; Barroso *et al.*, 1995; Redl *et al.*, 1993).

Einer der Hauptfaktoren bei der Entstehung von Sauerstoffradikalen ist das Hypoxanthin-Xanthinoxidase-System in Endothelzellen (Charpentier *et al.*, 1997; Granger *et al.*, 1986a). Im Verlauf der hypoxischen Phase kommt es intrazellulär durch Substratmangel zu einer vermehrten Katabolisierung von ATP über AMP, Adenosin und Inosin zu Hypoxanthin (Jiang *et al.*, 1997; Menger *et al.*, 1991a). Dieses wird bei regulärer Zellaktivität über das Enzym Xanthindehydrogenase NAD-abhängig zu Harnsäure umgewandelt (Brown *et al.*, 1988). In der hypoxischen Zelle kommt es jedoch durch einen erhöhten intrazellulären Ca^{2+} Spiegel zur Aktivierung zellulärer Proteasen. Diese führen zu einer Konversion der Xanthindehydrogena-

se zur sauerstoffabhängigen Xanthinoxidase (Charpentier *et al.*, 1997; Granger *et al.*, 1986b). Während der Reperfusionphase des ischämischen Gewebes mit erneuter Zufuhr von Sauerstoff reagiert Hypoxanthin dann mit dem Enzym Xanthinoxidase zu Harnsäure. Bei diesem Umwandlungsprozess entsteht zudem eine große Anzahl von Superoxidanionen (O_2^-). Diese werden durch die anschließende Haber-Weiss-Reaktion unter Fe_3^+ Katalyse zu Wasserstoffperoxid (H_2O_2) und dem extrem giftigen Hydroxylradikal (OH^\cdot) umgewandelt (FLOHE, 1987; FLAHERTY, 1988).

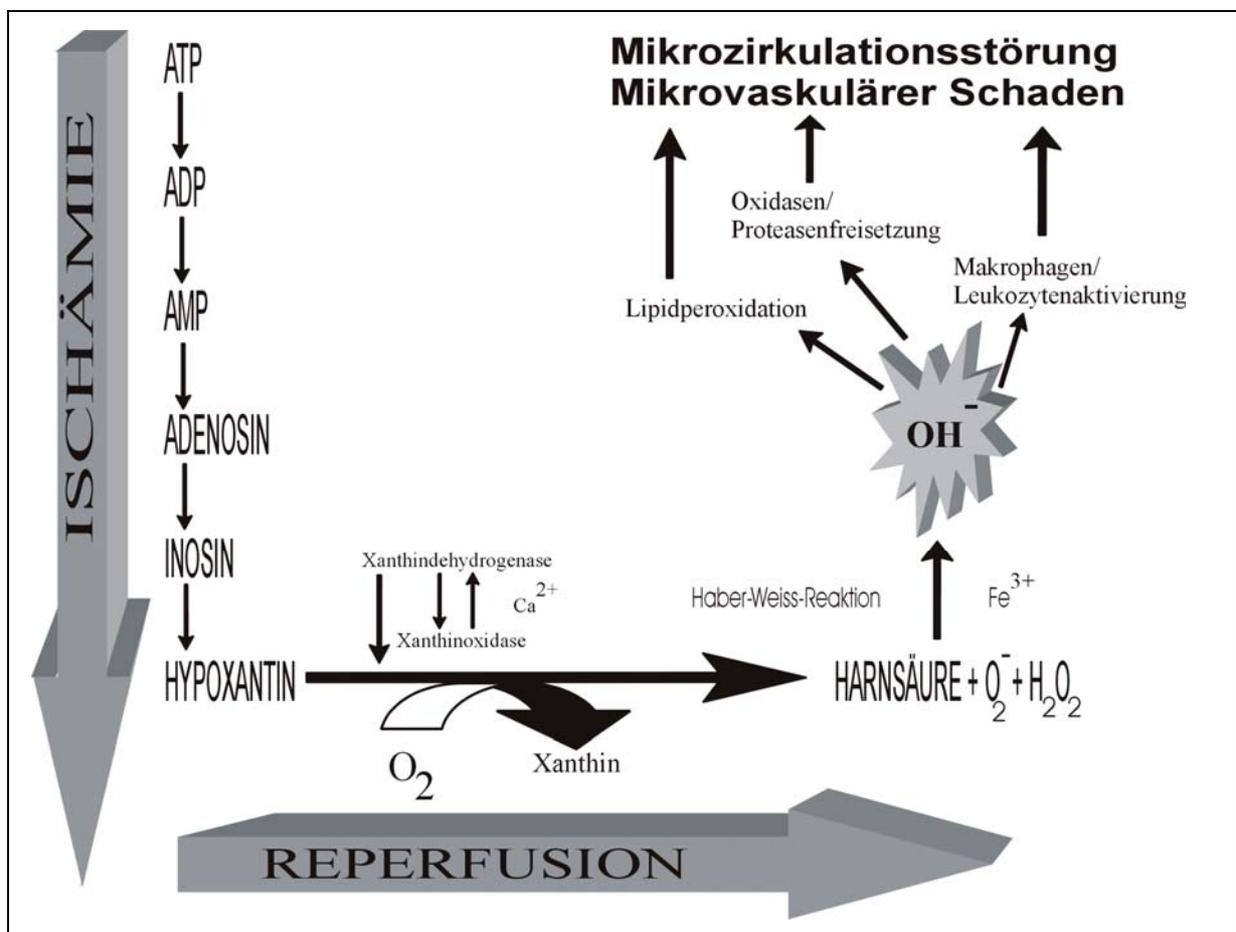


Abb. 3.1: Entstehung reaktiver Sauerstoffradikale während der Ischämie/Reperfusionphase

Desweiteren können durch Aktivierung von Leukozyten und Makrophagen schlagartig große Mengen an Sauerstoffradikalen freigesetzt werden. Dieser Vorgang wird auch als „respiratory burst“ bezeichnet (Babior, 1984; Bellavite, 1988; Silomon *et al.*, 1999).

Am empfindlichsten reagieren mehrfach ungesättigte Fettsäuren auf die entstandenen Hydroxylradikale. Durch Peroxidation mit Phospholipidmembranen kommt es somit zu einer Schädigung der Endothelzellen und nachfolgenden Permeabilitätsveränderungen.

Zudem induzieren Sauerstoffradikale Leukozyten-Endothel-Interaktionen durch Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle auf Endothelien und Leukozyten.

Im betroffenen Gewebe kann die Summation dieser Wirkungen somit zu Mikrozirkulationsstörungen bis hin zu einem Verschluss der kleinsten Gefäße, dem sog. „no-reflow“ Phänomen führen.

3.1.3 Lipidperoxidation

Die freigesetzten Sauerstoffradikale führen zu einer starken Schädigung von Zellstrukturen. Diese erfolgt durch Angriff an mehrfach ungesättigten Fettsäuren innerhalb der Phospholipidschicht von Zellmembranen. In einer lipidperoxidativen Kettenreaktion interagieren die Phospholipide mit den reaktiven Sauerstoffradikalen zu Lipidradikalen, Lipidhyperperoxide und Lipidperhydroxylradikale (Barroso *et al.*, 1995; Dart *et al.*, 1993). Die entstandenen Metaboliten verursachen nun eine Gewebszerstörung durch Erhöhung der Zellpermeabilität, Auflösung der interstitiellen Matrix, Ausbildung intestinaler Ödeme und Freisetzung lysosomaler Enzyme und Arachidonsäure (Lefer, 1989; Wang *et al.*, 1998).

3.1.4 Arachidonsäurestoffwechsel

Ein wesentlicher Bestandteil der Endothelmembranen sind Arachidonsäure-Produkte. Das Interesse dieser Stoffwechselmetaboliten der Arachidonsäure hat in den letzten 30 Jahren hinsichtlich ihrer physiologischen, pharmakologischen und pathophysiologischen Bedeutung stark zugenommen (Flohe and Giertz, 1987; Sun *et al.*, 1997). Die Arachidonsäure ist hierbei Substrat vieler, auch für den Verlauf eines Schockgeschehens, wichtiger Substanzen. Sie besteht aus vierfach ungesättigten C-20 Fettsäuren und liegt in veresterter Form in den Membranphospholipiden von Zellen vor. Da nur freie Arachidonsäure als Ausgangssubstanz dienen kann, muß sie zuerst mit Hilfe einer membrangebundenen Phospholipase A₂ aus dem Phospholipidverband freigesetzt werden. Diese wird durch eine erhöhte intrazellulär Kalziumkonzentration, wie sie auch in der hypoxisch geschädigten Zelle vorkommt, aktiviert. Es folgt nun ein zweigeteilter Stoffwechselweg an dessen Ende hochpotente Entzündungsmediatoren (Prostaglandine (PG), Thromboxane (TX) und Leukotriene (LT)), sogenannte Eicosanoide, stehen.

Über den Cyclooxygenase-Stoffwechsel entstehen die PG-Endoperoxide Prostaglandin H₂ (PGH₂) und Prostaglandin G₂ (PGG₂). Diese werden weiter zu PGE₂, PGF₂, PGI₂ und TXA₂ metabolisiert.

Auf einem zweiten Stoffwechselweg entstehen über das Enzym 5-Lipoxygenase die Leukotriene A-F.

3.1.4.1 Wirkung der Arachidonsäurederivate

Die Metaboliten des Arachidonsäurestoffwechsels sind wichtige Mediatoren im Hinblick auf die Entwicklung eines Ischämie/Reperfusionsschadens (Post *et al.*, 1993).

TXA₂ wird durch das Enzym TX-Synthase metabolisiert. Es entsteht v.a. in Thrombozyten und wirkt vasokonstriktorisch und thrombozytenaggregationsfördernd. Zudem führt es zu einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität. Als funktioneller Antagonist zu TXA₂ wird beson-

ders in Endothelzellen Prostazyklin (Besse *et al.*, 1989) gebildet. Es wirkt vasodilatierend und hat hemmenden Einfluß auf die Aggregation der Blutplättchen (Bitterman *et al.*, 1988a). Darüber hinaus hat es zytoprotektive Eigenschaften (Lefer, 1989; Moncada *et al.*, 1986).

LTB₄ wirkt auf Leukozyten chemotaktisch, proaggregatorisch und degranulierend. Die ausgelöste Leukozytenaktivierung führt zur Sekretion von Enzymen und Sauerstoffradikalen. Desweiteren führt eine LTB₄ induzierte Leukozytenadhäsion zu Ödembildung und einer Erhöhung der Gefäßpermeabilität an Endothelien. In der Lunge kommt es neben einer starken Bronchokonstriktion zur Steigerung der Mucosasekretion und zur Hemmung des trachealen Schleimtransports. Die Leukotriene sind somit maßgeblich an der Entstehung des ARDS beteiligt.

Über eine direkte, relaxierende Wirkung von PGE₂ und PGF₂, auf die Gefäßmuskulatur kommt es ebenfalls zu einer Vasodilatation (Bitterman *et al.*, 1988b). Die Prostaglandine der E-Serie haben hemmenden Einfluß auf die Aktivierung von Makrophagen und die Freisetzung von Sauerstoffradikalen und LTB₄ aus aktivierten Leukozyten. Sie haben zudem eine schmerzerregende und fiebersteigernde Wirkung. Daneben sind sie wichtige Immunmodulatoren.

Untersuchungen von MARZI *et al.* zur Leukozyten-Endothel-Interaktion geben Grund zur Annahme, daß es durch Cyclooxygenasemetaboliten die Kurzzeitige und durch Lipooxygenasemetaboliten die dauerhafte Adhärenz der Leukozyten am Endothel gesteigert wird (Marzi *et al.*, 1993).

3.1.5 Zytokine

Bei der Aktivierung des Immunsystems wie es im Rahmen des SIRS beobachtet wird, spielen Zytokine als Botenstoffe eine wichtige Rolle. So wurde beobachtet, daß TNF- α nahezu alle Symptome eines potentiellen SIRS hervorrufen kann (Schmid-Schönbein, Skalak, et al. 1991).

Bei dem Tumor Nekrose Faktor alpha (TNF- α) handelt es sich um einen hochpotenten Entzündungsmediator der v.a. in Monozyten und Makrophagen produziert wird. Nach Stimulation dieser Zellen durch Endotoxine, Sauerstoffradikale, Leukotriene, PAF, C5a u.a. erfolgt die TNF- α Freisetzung innerhalb 15 Minuten (Strieter *et al.*, 1993; Tracey *et al.*, 1986). Wie verschiedene Arbeitsgruppen zeigen konnten, hat TNF- α in Abhängigkeit von der Konzentration eine protektive oder schädigende Wirkung auf den Organismus (Tracey and Cerami, 1993).

TNF- α hat einerseits einen direkten zytotoxischen Effekt der an Endothelzellen zu Veränderung der Zellstrukturen und erhöhter Permeabilität führt und so letztendlich an der Ausbildung des ARDS beteiligt ist (Sato *et al.*, 1986). Desweiteren führt es zu einer Aktivierung von Makrophagen, Monozyten und neutrophilen Granulozyten was mit einer Sezernierung von Sauerstoffradikalen, Degranulation und Chemotaxis verbunden ist. Im späteren Verlauf kommt es durch TNF- α zur Ausschüttung weiterer Zytokine wie z.B. Interleukin 1 (Dzik *et al.*, 1988), Interleukin 6 (Pardy and Dudley, 1977), Interleukin 8 (Thurman *et al.*, 1988), PAF und TNF- α selbst. Zudem moduliert TNF- α Stoffwechselforgänge: Erhöhung des Proteinabbau, des Glycogenstoffwechsel und der Lactatproduktion sind die Folgen (Starnes-HF *et al.*, 1988). Über die Expression endothelialer Adhäsionsmoleküle kommt es zu einer vermehrten Leukozytenadhäsion (Pober and Cotran, 1990a) mit anschließender Transmigration und Akkumulation der Leukozyten im Gewebe. Dies geht mit einem vermehrten Zellschaden einher (Bauer *et al.*, 1995a).

Ein ähnliches Wirkspektrum wie TNF- α besitzt auch Interleukin-1 (IL-1) (Pober and Cotran, 1990b). In Studien nach hämorrhagischem Schock konnten signifikante IL-1 Erhöhungen gezeigt werden (Schwartz *et al.*, 1995). Hauptquellen von IL-1 sind dabei Monozyten und Makrophagen, wobei aber auch neutrophile Granulozyten, Endothelzellen und Lymphozyten IL-1 bilden können. Die Sekretion erfolgt nach Aktivierung durch Endotoxine (LPS), intakte

Mikroorganismen, TNF- α , C5a oder durch IL-1 selbst. Freigesetztes Interleukin-1 wirkt dabei vor allem auf Granulozyten, Fibroblasten, Endothelzellen, Lymphozyten und Makrophagen. Hierdurch kommt es zu einer weiteren Aktivierung der Entzündungskaskade durch Freisetzung von akute Phase Proteinen, IL-6, IL-8, und PAF (Pober and Cotran, 1990a) sowie zu einer Expression von Adhärenzmolekülen wie E-Selektine (ELAM-1) und ICAM-1 Rezeptoren (Bauer *et al.*, 1994a). Lokale Sekretion von IL-1 führt somit zu einer verstärkten Leukozyten-Endothel-Interaktion (Bauer *et al.*, 1995a) mit anschließender transendothelialer Migration neutrophiler Granulozyten ins Lebergewebe. IL-1 und TNF- α bewirken ihre eigene sowie gegenseitige Ausschüttung und potenzieren sich in ihrer Wirkung (Waage and Espevik, 1988).

Interleukin-6 spielt ebenfalls bei der Entstehung des Ischämie/Reperfusion-Schadens eine entscheidende Rolle (Hierholzer *et al.*, 1998). Es ist der Hauptregulator der Akut-Phase Reaktion in Hepatozyten. Ähnlich wie TNF- α und IL-1 wird es v.a. von Monozyten, Makrophagen, Endothelzellen und Fibroblasten gebildet. Hierbei verstärken TNF- α und IL-1 die IL-6 Produktion synergistisch (Xu *et al.*, 1998). Nach Aktivierung dieser Zellen durch Endotoxine, TNF- α , IL-1 u.a. führte es zusammen mit anderen Zytokinen zur vermehrten Sekretion von Akut-Phase Proteinen in der Leber. Hierzu zählen vor allem das C-Reaktive Protein, Haptoglobin, Coeruloplasmin, α_2 -Makroglobulin und Fibrinogen. Eine weitere Reaktion ist die Ausschüttung von Immunglobulinen der Klassen M, G, und A aus B-Zell Tumoren nach deren Stimulation durch IL-6.

3.1.6 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Lebermikrozirkulationsstörungen und eine erhöhte Leukozytenadhäsion am Leberendothel sind frühe Zeichen des Ischämie/Reperfusionsschadens nach hämorrhagischen Schock. Insbesondere die gesteigerte Leukozyten-Endothel-Interaktion mit anschließender Migration und Akkumulation der Leukozyten im geschädigten Gewebe scheint eine wichtige Rolle in der Genese des Ischämie/Reperfusionsschadens zu spielen (Athlin *et al.*, 1991; Bauer and Marzi, 1994). Hierbei entscheidend ist die durch inflammatorische Mediatoren wie z.B. TNF- α oder IL-1 generierte Expression verschiedener Adhäsionsmoleküle. Diese werden zum einen an der Oberfläche von Endothelzellen und zum anderen an der Oberfläche von Leukozyten exprimiert. Man unterscheidet hier die Gruppe der Selektine, Integrine und der Immunglobuline voneinander.

Die Familie der Selektine ist durch eine N-terminale Lecithinanlagerung charakterisiert (Picker *et al.*, 1991). Sie können auf Endothelzellen sowie auf Leukozyten ausgebildet werden. L-Selektine, die auch als „leucocyte-endothelial cell adhesion molecule 1“ (LECAM-1) bezeichnet werden, befinden sich auf Leukozyten und korrespondieren dabei z.B. mit Sial-Lewis-X Liganden am Endothel. Dies verursacht das typische „slow rolling“ der Leukozyten nach Ischämie (von Andrian *et al.*, 1991).

Auf Endothelzellen werden desweiteren P- und E-Selektine ausgebildet. P-Selektin (CD62 P, GMP-140, „granule membrane protein“) wird dabei nach Stimulation durch Sauerstoffradikale oder Histamin innerhalb weniger Minuten auf der Zellmembran exprimiert und bindet u.a. Sial Lewis-X (sL^X), Sial Lewis-a (sL^a) oder Lewis-X (L^X) Liganden der Granulozyten (Carlos and Harlan, 1994). E-Selektin (Polley *et al.*, 1991) wird hingegen erst nach mehreren Stunden auf den Leukozyten ausgebildet und kann dann u. a an L-Selektin oder ebenfalls am Sial Lewis-X Liganden der Leukozyten binden (Bevilacqua *et al.*, 1991).

Integrine kommen auf Oberflächen von Leukozyten vor und spielen bei den Adhäsionsprozessen eine wichtige Rolle.

Man unterscheidet drei Untergruppen:

- LFA-1 („Lymphocyte function associated antigen“ oder CD11a/CD18),
- MAC-1 (Macrophage antigen-1, oder CD11b/18)
- p 159/95 (CD11c/18)

Bei den korrespondierenden Rezeptoren handelt es sich um Immunglobuline, zu denen ICAM-1 („intercellular adhesion molecule-1“, CD54), ICAM-2 (CD102), VCAM-1 („vascular cell adhesion molecule-1, CD106) und PECAM-1 (CD31) zählen. Hierbei ist ICAM-1 für die Adhäsion von PNM's, Monozyten und Lymphozyten verantwortlich (Adams *et al.*, 1993). VCAM-1 bindet neben Mono- und Lymphozyten zudem noch basophile und eosinophile Granulozyten.

Die Beobachtung der Leukozyten mit Hilfe der Intravitalmikroskopie ermöglicht eine in vivo Darstellung der pathophysiologischen Vorgänge. Der Übergang von frei fließenden Leukozyten bis hin zur Emigration und Akkumulation im Gewebe wird dabei in einem zwei Phasen Modell beschrieben. Hierbei wird initial von einem lockeren Kontakt zwischen Leukozyten und Endothel ausgegangen. Dieser zeigt sich in einem langsamen Rollen oder Gleiten der Leukozyten entlang postkapillärem Gefäßendothel (von Andrian *et al.*, 1991). Vermittelt wird diese temporäre Adhärenz in Kapillaren durch L-Selektine an Leukozyten und besonders durch P-Selektine am aktivierten Endothel. Über eine Aktivierung durch Sauerstoffradikale, PAF, Thrombin u.a. kommt es dann zu einem Abstoßen der L-Selektine an Leukozyten und einer nachfolgenden Expression von Integrinen, v.a. MAC-1 (CD11b/18) (Jutilla, 1992). Es folgt eine Abstoßung der P-Selektine und Ausbildung von E-Selektinen und ICAM-1 Rezeptoren am Endothel.

In der zweiten Phase kommt es nun zur einer festen Bindung zwischen MAC-1 und ICAM-1 die zum sogenannten „sticking“, der festen Adhärenz der Leukozyten am Endothel führt (Steinhoff *et al.*, 1993a). Sie bildet die Voraussetzung für die Transmigration ins Gewebe. Gleichzeitig kommt es unter Einfluß verschiedener Mediatoren wie z.B. Endotoxinen, PAF, IL-8 und Komplement zum Abstoßen der Rezeptoren auf beiden Oberflächen. Dieser Prozeß wird als „Rezeptorshedding“ bezeichnet und ist als Autoregulationsmechanismus des Organismus zu verstehen (Jutilla, 1992).

3.1.7 Einfluß des Ischämie/Reperfusionsschadens auf die Makrophagen

Die Kupfferschen Sternzellen der Leber stellen die größte Population ortsständiger Makrophagen im retikuloendothelialen Systems des Organismus dar (Wake *et al.*, 1989). Sie spielen eine entscheidende Rolle bei der Abwehr bzw. der Entfernung einer großer Anzahl von körpereigenen und körperfremden Substanzen (Bakterien, Viren, Toxine, LPS, u.a.) durch Phagozytose. Bei der Entwicklung des MOV nach hämorrhagischem Schock wird ihnen durch Freisetzung proinflammatorischer Mediatoren eine besondere Bedeutung zugeschrieben.

Die im Rahmen des Ischämie/Reperfusionsschadens herbeigeführte Zerstörung der intestinalen Mukosabarriere führt zu einer Einschwemmung von Bakterien und Endotoxine über die Mesenterialgefäße. Dies führt in der Leber zu einer gesteigerten frühen Aktivierung der Makrophagenaktivität einige Stunden nach Schock was sich aus dem Anstieg verschiedener, v.a. in Makrophagen produzierter Mediatoren (TNF- α , IL, Phospholipase A, PAF, Sauerstoffradikale u.a.) ableiten läßt (Wanner *et al.*, 1996). Diese Annahme wird von vielen früheren Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen untermauert (Waydhas *et al.*, 1992). Im Gegensatz dazu kommt es im späteren Verlauf (nach Tagen) zu einer deutlichen Depression der Makrophagenaktivität (Chaudry *et al.*, 1990; Athlin *et al.*, 1991).

Die Auswirkung der Makrophagenaktivierung sind multipel. Die ausgeschütteten Mediatoren führen u.a. zu direkten Zellschädigungen, Veränderungen der Mikrozirkulation und Erhöhung der Leukozyten-Endothel Interaktion. Eine weitere wichtige Folge ist die Modulation der Hepatozytenfunktion durch die Kupffer Sternzellen.

Intravitalmikroskopisch kann die Makrophagenaktivität durch i.v. Gabe von fluoreszierenden Latexpartikel mit einer Partikelgröße von 0,8-1 μm erfaßt werden (McCuskey *et al.*, 1993).

Da die Kupffer Zellen nahezu 85% des Makrophagen-Pool im Körper ausmachen, führt ihre Aktivierung zu einer starken inflammatorischen Antwort (Wanner *et al.*, 1996; Colletti *et al.*, 1990). Desweiteren zeigten Untersuchungen, daß Kupffer Zellen eine vorherrschende Quelle von Sauerstoffradikalen und weiteren Metaboliten während der initialen Reperfusionsphase darstellen. Letztlich wird damit den Kupffer Zellen eine wichtige Rolle bei der Entstehung des Ischämie/Reperfusionsschaden zugeschrieben, während die Leukozytenadhäsion für Spätschäden verantwortlich gemacht werden (Jaeschke *et al.*, 1990).

3.1.8 Einfluß des Ischämie/Reperfusionsschaden auf die Hepatozyten

Die schockinduzierte Minderperfusion der Leber führt zu unzureichendem Sauerstofftransport, anaerobem Stoffwechsel, Verlust energiereicher Phosphate und gleichzeitigem Anstieg saurer Metaboliten (Mori 1987; Blum, 1989). Als schockbedingte Leberschädigung ist die perizentrale Hepatozytennekrose bekannt, die man beim protrahierten Schock als histologisches Bild erkennen kann (Dinges, 1993). Diese wird aufgrund des abfallenden Sauerstoffgradienten von portal nach zentral als direkte Hypoxiefolge gedeutet. Bei einem primär erfolgreich behandelten Schock mit Ischämie/Reperfusion-Situation muß mit einer frühen midzonalen Schädigung durch den massiven Anfall freier Sauerstoffradikale in dieser Region gerechnet werden. Ursache ist hierbei eine Zunahme der Substratkonzentration zur Radikalgenerierung (v.a. Xanthinoxidase, Hypoxanthin und Xanthin) und eine Abnahme des Sauerstoffgradienten von portal nach zentral (Marotto *et al.*, 1988). Somit weist die midzonale Region im Leberläppchen in der Reperusionsphase eine optimale Konstellation zur Generierung freier Sauerstoffradikale auf. Da diese zu einer verstärkten Leukozytengenerierung führen können, tragen aktive Granulozyten ebenfalls zu einer weiteren Hepatozytenschädigung bei (Marzi *et al.*, 1992). Untersuchungen von WANG *et al.* zeigten mittels Indozyaningrün (ICG)-Clearance eine Reduktion der Leberfunktion von 50% nach hämorrhagischem Schock als Zeichen der hepatozytären Schädigung bei einer Ischämie/Reperfusion-Situation (Wang *et al.*, 1992). Weitere Studien mittels chemisch induzierter Hypotension zeigten eine ähnliche Reduktion der ICG-Clearance. Als Ursache wird hierbei eine verstärkte Ausschüttung der proinflammatorischen Zytokine IL-6 und TNF- α aus Kupffer Zellen in Rahmen der Hypotension diskutiert (Wang *et al.*, 1998).

Weiterhin konnte eine Untersuchung von VOLLMAR *et al.* eine signifikant Abnahme des Gallefluß über den Ductus choledochus als Exkretionsfunktion der Hepatozyten darstellen (Vollmar *et al.*, 1993). Sie zeigte zudem eine signifikante Korrelation von Gallefluß mit sinusoidaler Perfusionsrate bzw. Leukozytenadhärenz als kausaler Zusammenhang zwischen Mikrozirkulationsstörung und hepatozytärer Dysfunktion.

3.2 Kernspintomographie der Leber

3.2.1 Klinische Bedeutung der MRT

In der Leberdiagnostik muß die Bedeutung bildgebender Verfahren vor allem vor dem Hintergrund der verbesserten Diagnostik und der verbesserten Entscheidungshilfe zwischen operativer und konservativer Therapie betrachtet werden. Eine der fortschrittlichsten Methode zur Detektion sowohl generalisierter wie auch fokaler Leberpathologien ist die Magnetresonanztomographie (MRT) die sich aus der 1946 von Felix Bloch und Edward Purcell entdeckten Kernspinresonanz entwickelte. Die MRT ist wie die Computertomographie und der Ultraschall ein Schnittbildverfahren. Aufgrund des völlig andern physikalischen Prinzip gegenüber Ultraschall und CT eröffnet sie der medizinischen Diagnostik neue Möglichkeiten. Sie verwendet zur Bildgebung statt Röntgenstrahlen Magnetfelder. Hierbei werden Dichte und Relaxationsverhalten der Protonen im Körper als Funktion von Zeit und Ort gemessen und in unterschiedlichen Graustufen im Tomogramm abgebildet.

Die klinischen Indikationen der MRT kommen vor allem aus dem Bereich der Neuroradiologie (Veränderungen der Gehirnstrukturen, des Rückenmarks), Untersuchungen des Herzens, des Muskelsystems, der Nieren und Leber und zunehmend auch der Gelenke und Knochen (Vogl et al., 1997; Mack et al., 1999).

Die MRT des Abdomens war zu Beginn ihrer Entwicklung durch Bewegungsartefakte stark eingeschränkt. Erst die Entwicklung verschiedener Bewegungskompensationsverfahren (z.B. Flußrephasierung, atemexkursiongesteuerte Phasenkodierung), schnelle Bildgebung und Verbesserungen der Sequenzparameter führten zu einer deutlichen Steigerung der Bildqualität. Trotzdem spielt die MRT zur Zeit im Bereich des Abdomens noch eine eher untergeordnete Rolle. Die Gründe hierfür liegen wahrscheinlich in den höheren Kosten, die Beschränkung auf begrenzte anatomische Gebiete, die längere Untersuchungsdauer und die hohe Anforderung an die technische Ausstattung. Sie gilt jedoch, als der Computertomographie in der Diagnostik fokaler Läsionen klar überlegen.

Gegenüber der Computertomographie bietet die MRT jedoch auch viele Vorteile:

- Keine ionisierende Strahlung

- Deutlich höheren Kontrastauflösung
- Durch die variable Schnittführung in koronaren, axialen und sagitalen Schichten ist eine deutlich bessere räumliche Zuordnung veränderter Prozesse möglich
- Aufgrund von Flußphänomenen kann die Darstellung des Gefäßsystems ohne Kontrastmittelanwendung erfolgen
- Störungsfreie Darstellung der Grenzflächen zwischen Knochen- und Weichteilgewebe
- Bessere Verträglichkeit und fehlende Nephrotoxizität der verwendeten Kontrastmittel

Bei der Differentialdiagnose fokaler Leberläsionen ist die höhere Spezifität der MRT gegenüber der Computertomographie unbestritten, mehrere wissenschaftliche Untersuchungen berichten sogar von einer höheren Sensitivität der MRT (Helmberger *et al.*, 1999). Im klinischen Alltag stellt sich der Einsatz der MRT im Bereich fokaler Leberläsionen besonders zur Differentialdiagnose von Leberzellkarzinomen, Lebermetastasen, fokal nodulärer Hyperplasie (FNH) oder Angiomen (Vogl *et al.*, 1995).

3.2.2 Verbesserung der Darstellung durch Kontrastmittel

Bei der nativen MRT werden Kontraste durch unterschiedliche Relaxationszeiten (T1-Relaxation, T2-Relaxation) und Protonendichte erzeugt. Um die Sensitivität der Magnetresonanztomographie weiter zu steigern kommen verschiedene Kontrastmittel zum Einsatz die auch bei der MR-Diagnostik fokaler Leberläsionen zunehmend an Bedeutung gewinnen. Diese entfalten ihre Wirkung indem sie die Relaxationszeiten lokal verändern.

Grundsätzlich stehen für die MRT der Leber 3 verschiedene Kontrastmittelgruppen zur Verfügung:

1. T1-gewichtete, signalanhebende, niedermolekulare Substanzen, die sich nach der i.v. Injektion rasch im Extrazellulärraum verteilen (sog. unspezifische Kontrastmittel, z.B. Gd-DTPA)
2. T1-gewichtete, signalanhebende, niedermolekulare Substanzen, die hepatobiliär ausgeschieden werden (z.B. Gd-EOB-DTPA/Gd-BOPTA)

3. Partikuläre, T2-gewichtete signalvermindernde Eisenoxidpartikel die von den Zellen des RES aufgenommen werden (Eisenoxid, FeO, ENDOREM).

Von diesen Kontrastmitteln reichern sich die Gruppen 2.) und 3.) im normalen Lebergewebe an und werden deshalb als organspezifische Kontrastmittel bezeichnet.

Die allgemeinen Anforderungen die zur Leberdiagnostik herangezogenen Kontrastmittel sind:

1. Verbesserung des Bildkontrastes und damit verbesserte Diagnostik pathologischer Prozesse
2. Verbesserte Differenzierbarkeit zwischen benignen und malignen Prozessen
3. Durchführbarkeit von Funktionsstudien der Hepatozyten und der hepatobiliären Exkretion
4. Verkürzung der Untersuchungsdauer

3.2.3 Ansatz der Leberdiagnostik mittels MRI im Tierexperiment

In der vorliegenden Studie wurde mittels der magnetresonanztomographischen Untersuchung ein besonderes Augenmerk auf hepatozytäre Funktionsveränderungen sowie Veränderungen der Makrophagenaktivität gelegt. Hierzu wurden zwei organspezifische Kontrastmittel eingesetzt:

- Zum einen diente ENDOREM (Eisenoxid, FeO) als signalabschwächendes Kontrastmittel zur Untersuchung des retikuloendothelialen Systems (RES). Dieses KM kann aufgrund seiner Größe (150 ± 30 nm) von den Kupffer-Sternzellen der Leber aufgenommen werden. Im Tomogramm zeigt sich dann eine Signalminderung durch die Beeinflussung der T2-Relaxationszeit. Hiermit sollten schockbedingte Veränderungen der Makrophagenaktivität nach Ischämie/Reperfusion im Vergleich zu den Kontrollgruppen dargestellt werden.
- Als zweites Kontrastmittel wurde Gd-EOB-DTPA eingesetzt. Dieses wird zum Teil von den Hepatozyten aufgenommen und biliär ausgeschieden. In der MRT-Auswertung läßt sich so eine Hyperintensität im Bereich der Gallengänge darstellen. Somit kann man über die Auswertung der KM-Exkretion indirekt eine Aussage über die exkretorische Hepatozytenfunktion treffen. Auch hier wurden die Ergebnisse von Schock- und Kontrollgruppe miteinander verglichen um Veränderungen nach hämorrhagischem Schock darzustellen.

3.3 Intravitalmikroskopie der Leber

Seit vielen Jahren stellt die von McCuskey et al. mitbegründete Form der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie eine zuverlässige und etablierte Methode zur Untersuchung der Mikrozirkulation verschiedener Gewebe dar (McCuskey, Reilly, et al. 1978). Da es im Verlauf eines ischämischen Ereignisses in der Ischämie/Reperfusionsphase zur Minderdurchblutung des Lebergewebes kommt, konnte das Verfahren der Durchlichtmikroskopie in dieser Studie nicht angewandt werden. Ausgeprägte und nichtrepräsentative Durchblutungsstörungen der hierbei untersuchten marginalen Leberrandregionen würden zu Ergebnisverfälschungen führen. Statt dessen wurde die von Marzi et. al. beschriebene Epifluoreszenztechnik verwendet die eine Untersuchung aller Leberbezirke ermöglicht. Bei diesem Auflichtverfahren wird mittels fluoreszenzmarkierter Partikel die Untersuchung durchgeführt. Es handelt sich hierbei um spezielle Fluoreszenzmarker, die nach Anregung mit einer definierten Wellenlänge Lichterscheinungen abgeben. In der vorliegenden Studie kamen zwei Marker zum Einsatz:

1. *Latex Beads*: Hierbei wird die Phagozytosefähigkeit der Kupffer-Sternzellen genutzt um in vivo Aussagen über den Aktivierungszustand der Lebermakrophagen zu treffen. Dabei eignen sich fluoreszierende Latex Partikel mit einer Größe von 0,8-1µm am besten. Diese werden nach i.v. Injektion durch Lebermakrophagen phagozytiert und können dann im Auflichtverfahren erfaßt und ausgewertet werden.
2. *Acridine Orange*: Es handelt sie um einen basischen Farbstoff, der selektiv an Nukleinsäuren bindet und sich zur Darstellung weißer Blutkörperchen eignet. Der Einsatz von Acridine Orange dient somit besonders der Darstellung von Leukozyten-Endothel-Interaktionen.

3.4 Fragestellung

Wie Eingangs beschrieben kommt der Leber in der Pathogenese des hämorrhagischen Schocks eine besondere Bedeutung zu. Durch Veränderungen der Mukosabarriere in der Ischämie/Reperfusionphase kommt es zur Einschwemmung von Bakterien und Endotoxinen über die Pfortader. Dies führt in der Leber zu weitreichenden Veränderungen. Über eine Aktivierung der Makrophagen und eine damit verbundene Ausschüttung hochpotenter proinflammatorischer Mediatorstoffe kommt es zu Makro- und Mikrozirkulationsstörungen mit Leukozyten-Endothel-Interaktion und Veränderungen der hepatozytären Stoffwechsellleistungen. Durch eine Überschreitung der Detoxifikationskapazität der Leber können zudem Bakterien, Endotoxine und weitere Mediatorstoffe in den systemischen Kreislauf gelangen. Dies kann zu einer Schädigung weiterer Organe führen, wobei hier besonders die Lunge als sehr schocksensibles Organ hervorzuheben ist. Die Leber steht somit im Mittelpunkt bei der Ausbildung eines Multiorganversagens nach hämorrhagischem Schock.

Bisher wurden pathophysiologische Veränderungen der Leber hauptsächlich mit Hilfe der Intravitalmikroskopie oder mit in-vitro Methoden (Perfusionsmodelle) untersucht. Verlaufsuntersuchungen sind mit diesen Methoden jedoch kaum durchzuführen, unter Berücksichtigung der mehrtägigen klinische Verläufe jedoch unerlässlich.

Als nicht invasives, bildgebendes Verfahren ermöglicht die Magnetresonanztomographie (MRT) ein mehrzeitiges Vorgehen. Aufgrund ihrer hervorragenden Auflösung insbesondere in der Weichteildiagnostik fand sie in den letzten Jahren zunehmend Verbreitung bei klinischen Fragestellungen. Durch zusätzliche Applikation von Kontrastmitteln konnte die Darstellung zudem verbessert und funktionelle Veränderungen erfaßt werden.

Ziel der vorgelegten Studie war es Veränderungen der Makrophagenaktivität und Gallesekretion nach hämorrhagischem Schock mit Hilfe der kontrastmittelverstärkten Kernspintomographie zu analysieren. Es wurden hierbei Untersuchungen in der frühen (3 Stunden Reperfusion) und der späten Reperfusionphase (24 Stunden Reperfusion) durchgeführt. Das gleiche Schockmodell wurde zudem zur intravitalmikroskopischen Untersuchung der Makrophagen-

aktivität und zur quantitativen Messung der Gallesekretion über den D. Choledochus an weiteren Gruppen durchgeführt.

Die so erhaltenen Ergebnisse wurden anschließend miteinander verglichen um die Untersuchungsverfahren zu validieren.

Zur genauen Verifizierung der Schockauswirkung wurde weiterhin pathophysiologische Veränderungen der Lebermikrozirkulation untersucht. Hierbei standen intravitalmikroskopische Beobachtungen der Leukozyten-Endothel-Interaktion, Änderungen der Sinusoidweiten und Flußgeschwindigkeiten im Vordergrund.

Letztlich wurden zur Beurteilung der Leberschädigung nach hämorrhagischem Schock die oben genannten Untersuchungsmethoden unter folgenden Aspekten miteinander verglichen:

- Läßt sich eine Veränderung der Makrophagenaktivität nach hämorrhagischem Schock mit Hilfe der MRT darstellen?
- Sind diese Ergebnisse mit der etablierten intravitalmikroskopischen Untersuchungsmethode vergleichbar?
- Zeigt sich im Kernspintomogramm nach hämorrhagischem Schock eine hepatozytäre Funktionsbeeinträchtigung?
- Gibt es eine Übereinstimmung dieser Ergebnisse mit der invasiv über den D. choledochus gemessenen Gallesekretionsmessung?
- Zeigen sich Unterschiede im Vergleich zwischen früher und später Reperfusionphase mittels kernspintomographischer Untersuchung?
- Lassen sich hierbei vergleichbare Ergebnisse bezüglich der intravitalmikroskopischen Untersuchung erzielen?
- Kann man die auf lobulärer Ebene mittels Intravitalmikroskopie gewonnenen Daten auf die makroskopische Auswertung mittels MRI übertragen und bietet die Kernspintomographie eine Alternative zur invasiven Intravitalmikroskopie?

4. Material und Methode

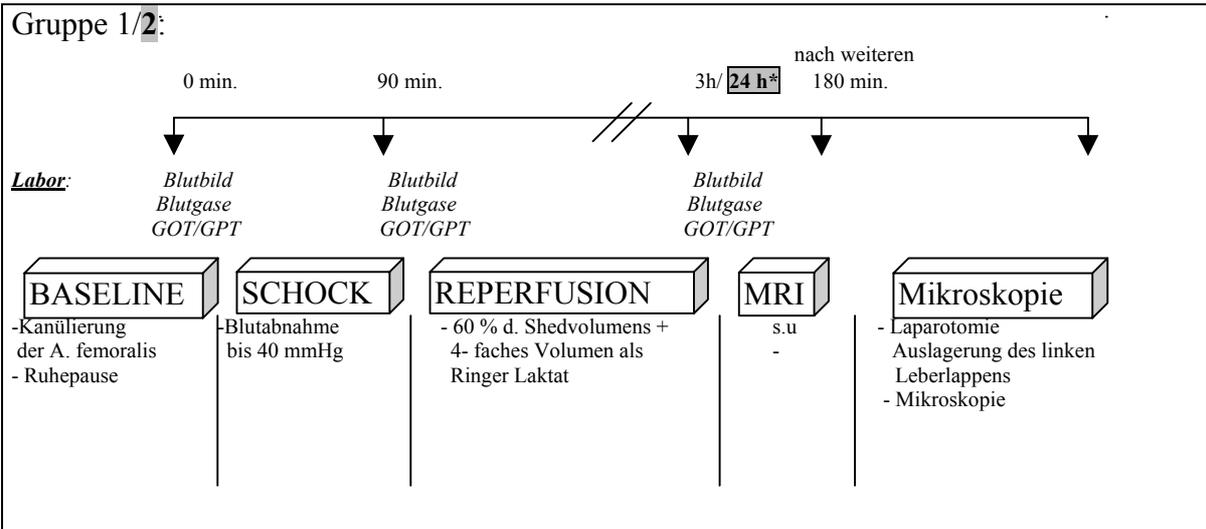
4.1 Versuchsvorbereitung

4.1.1 Versuchstiere und Versuchsdesign

Die Studie wurden an weiblichen Sprague-Dawley Ratten mit einem Gewicht von 200-250g durchgeführt. Sie wurden nach Genehmigung der lokalen Ethikkommission und unter Aufsicht der Tierschutzbeauftragten von der Tierzuchtanstalt Hannover zur Verfügung gestellt. Die Narkose erfolgte durch intraperitoneale Gabe von Pentobarbital (50 mg/kg Kg).

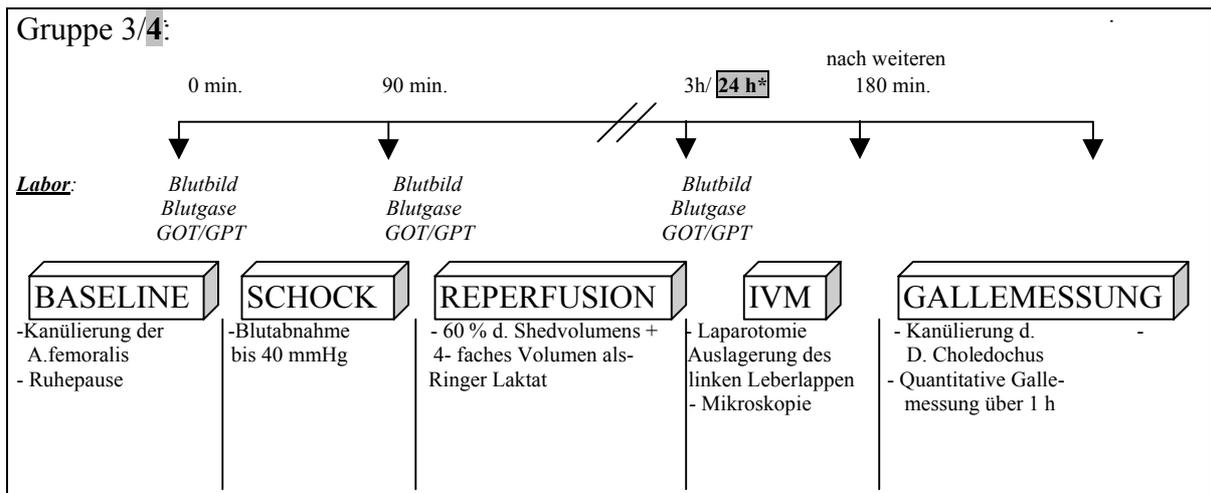
Die Tiere wurden in 8 Gruppen randomisiert aufgeteilt. Bei den Schocktieren wurde ein hämorrhagischer Schock über 90 Minuten durchgeführt, die Shamgruppe durchlief die gleichen Versuchsbedingungen jedoch ohne hämorrhagischen Schock. Ihnen wurde statt dessen 2 ml/h Ringer-Laktat-Lösung i.v. verabreicht.

In den ersten beiden Gruppen wurden 7 Schock und 7 Sham-Tiere nach 3 bzw. 24 Stunden im Kleintierkernspintomographen untersucht. Hierbei wurde mit Hilfe des ersten Kontrastmittels ENDOREM die Makrophagenaktivität und mittels des zweiten Kontrastmittels Gd-EOB-DTPA die Hepatozytenfunktion gemessen. Im Anschluß an die MRI Untersuchung erfolgte die Intravitalmikroskopie, wobei hier das Verhalten der Leukozyten bzw. der Sinusoidweiten aufgezeichnet wurde.



*:In der 24 h Gruppe erwachten die Versuchstiere nachdem der OP-Schnitt mit fortlaufender Naht verschlossen wurde. 24 Stunden später wurden sie wieder mittels intraperitonealer Gabe von Pentobarbital (50 mg/kg KG) narkotisiert und erneut ein venöser Zugang über eine Schwanzvene gelegt. Es folgte die MRI und die IVM nach dem gleichen Zeitschema wie in der 3h Gruppe.

In der 3. und 4.-ten Gruppe wurden Schock/Sham-Tiere (n=6) nach 3 bzw. 24 Stunden intravitalmikroskopisch bezüglich der Aufnahme von Latexpartikel in Makrophagen und nach Kanülierung d. D. Choledochus zur quantitativen Messung der Gallesekretion untersucht.



*:In der 24 h Gruppe erwachten die Versuchstiere nachdem der OP-Schnitt mit fortlaufender Naht verschlossen wurde. 24 Stunden später wurden sie wieder mittels intraperitonealer Gabe von Pentobarbital (50 mg/kg KG) narkotisiert und erneut ein venöser Zugang über eine Schwanzvene gelegt. Es folgte die IVM und die Gallesekretionsmessung nach dem gleichen Zeitschema wie in der 3h Gruppe.

4.1.2 Operative Vorbereitung

Nach Narkotisierung erfolgte die Entfernung des Haarkleides in der Abdominal- und Leistenregion und die Fixation des Tieres in Rückenlage. Zur Gewährleistung der Reperfusion und Kontrastmittelgabe wurde nach Desinfektion eine Schwanzvene punktiert (Venflon 2, 0,8/25 mm, 22G,BOC-OHMEDA-AB, Schweden). Danach wurde die Haut der Abdominal- und Leistenregion desinfiziert und das Tier bis auf die linke Inguinalregion steril abgedeckt. Durch das sterile Arbeiten sollte eine iatrogene Kontamination mit Endotoxinen vermieden werden.

Durch eine ca. 1 cm lange Längsinzision, parallel zum femoralen Gefäßnervenbündel, wurde die Haut eröffnet und anschließend das femorale Gefäßnervenbündel zur Darstellung gebracht. Die Freilegung der Arterie erfolgte nach vorsichtigem Abtrennen von Bindegewebe, Vene und Nerv. Die Arteria femoralis wurde distal unterbunden und vorsichtig aufgespannt. Proximal wurden ein Knoten und eine Gefäßklemme vorgelegt und das Gefäß inzidiert. Hier wurde ein mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllter Polyethylenkatheter (Portex-Polyethylene Tubing 0,4*0,8 mm) eingelegt und mit dem vorgelegten Knoten befestigt. Zur kontinuierlichen Herzfrequenz- und Blutdruckmessung wurde ein Druckwandler (Statham, P32Db, Gould, Oxford, California) angeschlossen. Die arterielle Kanülierung ermöglichte die kontinuierliche Messung der erwähnten Parameter sowie eine fraktionierte Blutentnahme.

Die Zeitgrenzen für die OP wurden auf 20-30 min. festgelegt. Es folgte eine 15 minütige Ruhephase zur Kreislaufstabilisierung, an deren Anschluß die Ausgangsparameter (BB, B-Gase, GOT, GPT, LDH,) bestimmt wurden.

4.1.3 Hämorrhagisches Schockmodell

Zur Schockinduktion am Ende der Ruhephase wurde innerhalb von 5 Minuten der mittlere arterielle Blutdruck durch fraktionierte Blutentnahmen über den Femoraliskatheter auf 40 ± 5 mmHg gesenkt. Durch weitere Blutentnahmen wurde dieser hypotensive Kreislaufzustand über 90 Minuten konstant gehalten. Um das entnommene Blut zur Re-Transfusion ungerinnbar zu machen wurde es in 5 ml Spritzen entnommen, in welche 0,8 ml Zitratpuffer (CPDA) aufgezo-gen waren. Die Reperfusionphase begann 90 Minuten nach Schockbeginn wobei 60% des entnommenen Blutes innerhalb von 5 Minuten über den Schwanzvenenzugang retransfundiert wurden. Anschließend wurde in der 1. Stunde das Doppelte und in der 2. und 3. Stunde das Einfache der entzogenen Blutmenge als Ringer-Laktat-Lösung verabreicht. Als Erhaltungsdosis dienten ab der 3. Stunde 2 ml/h der RL-Lösung. Blutdruck und Herzfrequenz wurden in den ersten beiden Stunden 15 minütig, anschließend halbstündig dokumentiert. Am Ende von Schock- und Reperfusionphase wurden weitere Blutproben zur Bestimmung von Blutbild (BB), Blutgasen, GOT, GPT, LDH über den arteriellen Katheter gewonnen.

4.2 Magnetresonanztomographie (MRT)

Als leistungsfähiges Schnittbildverfahren hat die Magnet-Resonanz-Tomographie (MRT, MRI Kernspintomographie, NMR) in den letzten Jahren eine rasche Entwicklung erfahren. Die MRT beruht auf dem Zusammenwirken statischer Magnetfelder, zeitlich veränderlicher Magnetfelder sowie elektromagnetischer Felder. Der Vorteil gegenüber anderen Schnittbildverfahren wie z.B. der Computertomographie darin, daß hier eine variable Schnittführungen in axialer, saggitaler oder koronarer Ebene ohne Lageveränderung des Patienten möglich sind. Desweiteren besteht im Gegensatz zur Computertomographie eine bessere Weichteildiskriminierung und keine Strahlenbelastung.

Bei der Untersuchung wird das Versuchstier in ein von Feldspulen erzeugtes statisches, möglichst homogenes Magnetfeld gebracht. Hier ordnen sich seine Protonen in Längsrichtung zum angelegten Magnetfeld parallel bzw. antiparallel an, es entsteht die sogenannte Longitudinalmagnetisierung. Über Gradientenspulen werden zeitlich veränderliche Magnetfelder erzeugt mit denen eine räumliche Zuordnung der Bilddaten realisiert wird. Anschließend werden über eine Hochfrequenzspule Serien von sehr kurzen Radiowellen (HF-Impulse) eingestrahlt. Durch diese elektromagnetischen Wellen gelangen die Kerne auf ein höheres Energieniveau (Anregung). Die Frequenzwahl des HF-Pulses entscheidet welche Kerne angeregt werden (in dieser Arbeit handelt es sich um die Wasserstoffkerne). Unter Abnahme der Longitudinalmagnetisierung entsteht so eine Transversalmagnetisierung. Durch Wechselwirkung mit ihrer Umgebung (Spin-Gitter-Wechselwirkung) und unter Abstrahlung der aufgenommenen Energie kehren die Protonen nach Abschaltung des HF-Pulses wieder in ihren Ausgangszustand zurück. Dieser Relaxationsprozess (Zunahme der longitudinalen Magnetisierung) wird als Zeitkonstante T1 bezeichnet. Die Abnahme der transversalen Magnetisierung durch Wechselwirkung der Protonen untereinander (Spin-Spin-Wechselwirkung) bezeichnet man als T2 Relaxationszeit. Jeder eingestrahlte Impuls führt so zu einer Impulsantwort die von einer HF-Antenne empfangen werden kann. Aus der Analyse dieser Signale können nun mit Hilfe eines Computers die Wasserstoffionenkonzentration sowie die Relaxationszeiten T1 und T2 bestimmt und ein zweidimensionales Schnittbild errechnet werden. Mit Hilfe von Kontrastmittelapplikationen können die Darstellungen zusätzlich verbessert und funktionelle Veränderungen erfaßt werden.

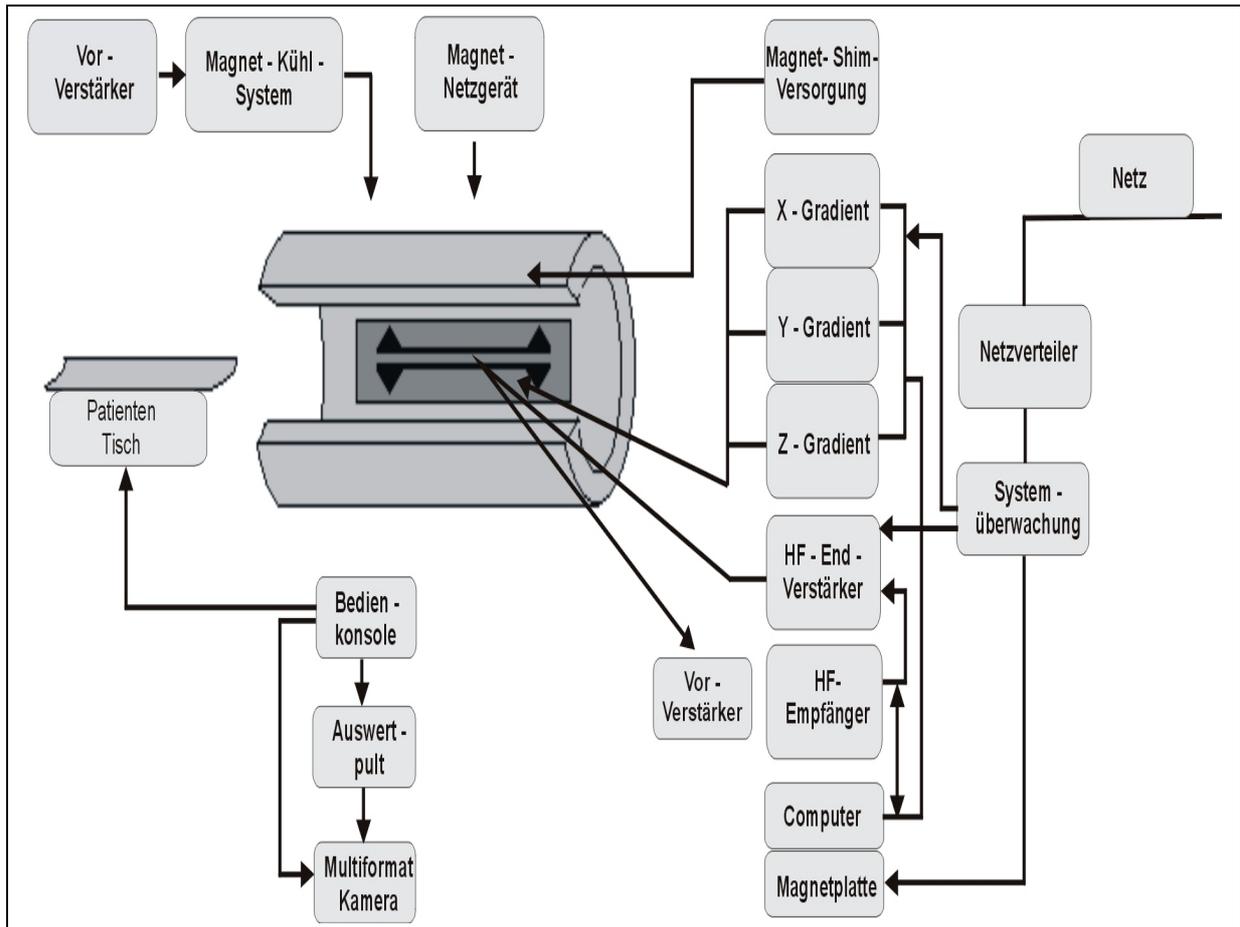


Abb. 4.3: Technischer Aufbau eines Magnetresonanztomographen

4.2.1 Kontrastmittel

Bei der nativen Kernspintomographie erzeugen unterschiedliche Relaxationszeiten (T1 und T2) und unterschiedliche Protonendichte die Kontraste. Um die Signalintensitäten von untersuchten Geweben zu verändern setzt man verschiedene MR Kontrastmittel ein (DUROUX, 1995). In dieser Versuchsreihe kamen zwei verschiedene Substanzklassen zur Anwendung. Zum einen wurde Gd-EOB-DTPA (Schering AG, Berlin) als sog. hepatobiliäres Kontrastmittel (Cavagna *et al.*, 1991) und zum anderen ENDOREM (Geuerbet GmbH, Paris) als RES-spezifisches KM verwendet (Clement *et al.*, 1992a; Daldrup *et al.*, 1995).

4.2.1.1 Gd EOB-DTPA

Aus der Gruppe der hepatobiliären Kontrastmittel wurde in dieser Versuchsreihe Gd-EOB-DTPA (Gadolinium-Ethoxybenzyl-Diethylenetriamin-Pentaessigsäure) als Substanz ausgewählt (Weinmann *et al.*, 1991). Das Präparat wird in Ratten zu 63%-80% hepatozellulär verstoffwechselt, der verbleibende Teil glomerulär abfiltriert (Clement *et al.*, 1992b, Vogl *et al.*, 2001). Die Aufnahme des Kontrastmittels in die Hepatozyten erfolgt wahrscheinlich ATP unabhängig über ein Anionentransportersystem der Zellmembran. Über eine ATP-abhängige Glutathion-S-Transferase wird die Substanz später biliär ausgeschieden (Schuhmann *et al.*, 1992). Aufgrund dieses Mechanismus wurde das Präparat zur Untersuchung hepatozytärer Funktionsstörungen nach hämorrhagischen Schock herangezogen.

Gd-EOB-DTPA zählt zur Klasse der paramagnetischen Kontrastmittel. Diese entfalten ihren Effekt überwiegend auf die T1-Relaxationszeit indem diese verlängert und die Signalintensität der Leber im T1-gewichteten Bild zunimmt (Rummeny and Peters, 1992; Mahfouz *et al.*, 1997).

Die Gd-EOB-DTPA Gabe erfolgte in einer Konzentration von 200 μ mol/kg KG.

4.2.1.2 ENDOREM

ENDOREM zählt zur Gruppe der superparamagnetischen Kontrastmittel (Saini *et al.*, 1987a). Es handelt sich hierbei um Eisenoxidpartikel die aufgrund ihrer nanopartikulären Struktur mit einem mittleren Durchmesser von 150nm (\pm 30nm), ihrer ständigen Bewegung (Brown Phänomen) und durch ihren starken magnetischen Moment Inhomogenitäten im Magnetfeld erzeugen. Solch kleine Eisenpartikel lassen sich nicht permanent magnetisieren und entfalten ihre Wirkung erst unter Einfluß eines äußeren Magnetfeldes wobei die Spindephasierung beschleunigt wird. Hierdurch kommt es zu einer Abnahme bzw. Verkürzung der transversalen Relaxationszeit T₂. Dies führt auf MR Bildern zu einer drastischen Reduktion der Signalintensität in Geweben die mit ENDOREM angereichert sind. Sie erscheinen deutlich hypointens (signalarm) (Vogl *et al.*, 1995).

Der aktive Bestandteil des Kontrastmittels ist eine Kristallsuspension aus Eisenoxid (Fe₂O₃ und Fe₃O₄). Als Transportmedium dient ein niedermolekulares Dextran, welches den Nanopartikel Eisenoxid umhüllt. Die Substanz wird selektiv vom retikuloendothelialen System der Leber (80%) und der Milz (20%) aufgenommen und kann somit zur Untersuchung der Makrophagenaktivität herangezogen werden (Saini *et al.*, 1987b; Stark *et al.*, 1988; Urhahn *et al.*, 1996).

ENDOREM wurde in einer Konzentration von 15µmol/kg KG langsam i.v. appliziert. Hierzu wurde die entsprechende Menge (entspricht 0,075ml/kg KG) auf 0,2ml mit Glucose 5% verdünnt (Rummeny *et al.*, 1995).

4.2.2 MRT-Untersuchungsablauf

Die Untersuchungen wurden alle an einem 2,4 Tesla MR-Tomographen (BIOSPEC, 2,4 Tesla, BRUKER, Karlsruhe, Deutschland) mit Ganzkörperspule durchgeführt.



Abb. 4.4: Magnetresonanztomograph (BIOSPEC 2,4 Tesla, Bruker/Germany)

Die MRT erfolgte in Gruppe 1 drei Stunden nach Schock/Sham, in Gruppe 2 nach 24 Stunden. Hierzu wurden die Narkosen der 3h Gruppe über den Schwanzvenenzugang aufrecht gehalten, die Tiere der 24h Gruppe wurden erneut narkotisiert (50mg Pentobarbital/kg KG i.p.) und ein Schwanzvenenzugang gelegt. Zur Verminderung von Atemartefakten wurden die Versuchstiere auf einem speziell angefertigten Plexiglastisch gelagert und fixiert. Kontrastmittel und Pentobarbital wurden den Versuchstieren im Tomographen in konstanter Position über eine eigens angefertigte Verlängerung verabreicht.

Die Aufnahmen erfolgten als coronare Schnitte mit einer Schichtdicke von 3 mm. Um alle Tiere korrekt positionieren zu können wurde eine schnelle Übersichtsaufnahme in drei Ebenen gestartet. Es folgten vier verschiedene Nativsequenzen an deren Anschluß das erste Kontrastmittel, Gd-EOB-DTPA appliziert wurde. Sofort folgten zwei gadoliniumspezifische, T1 gewichtete Sequenzen. Nach Beendigung dieser wurde ENDOREM langsam i.v. verabreicht. Die postkontrast-MRT-Untersuchungen wurden 45 min. nach Gabe der Partikel gestartet, wobei zur optimalen Kontrastdarstellung T2-gewichtete Sequenzen verwendet wurden.

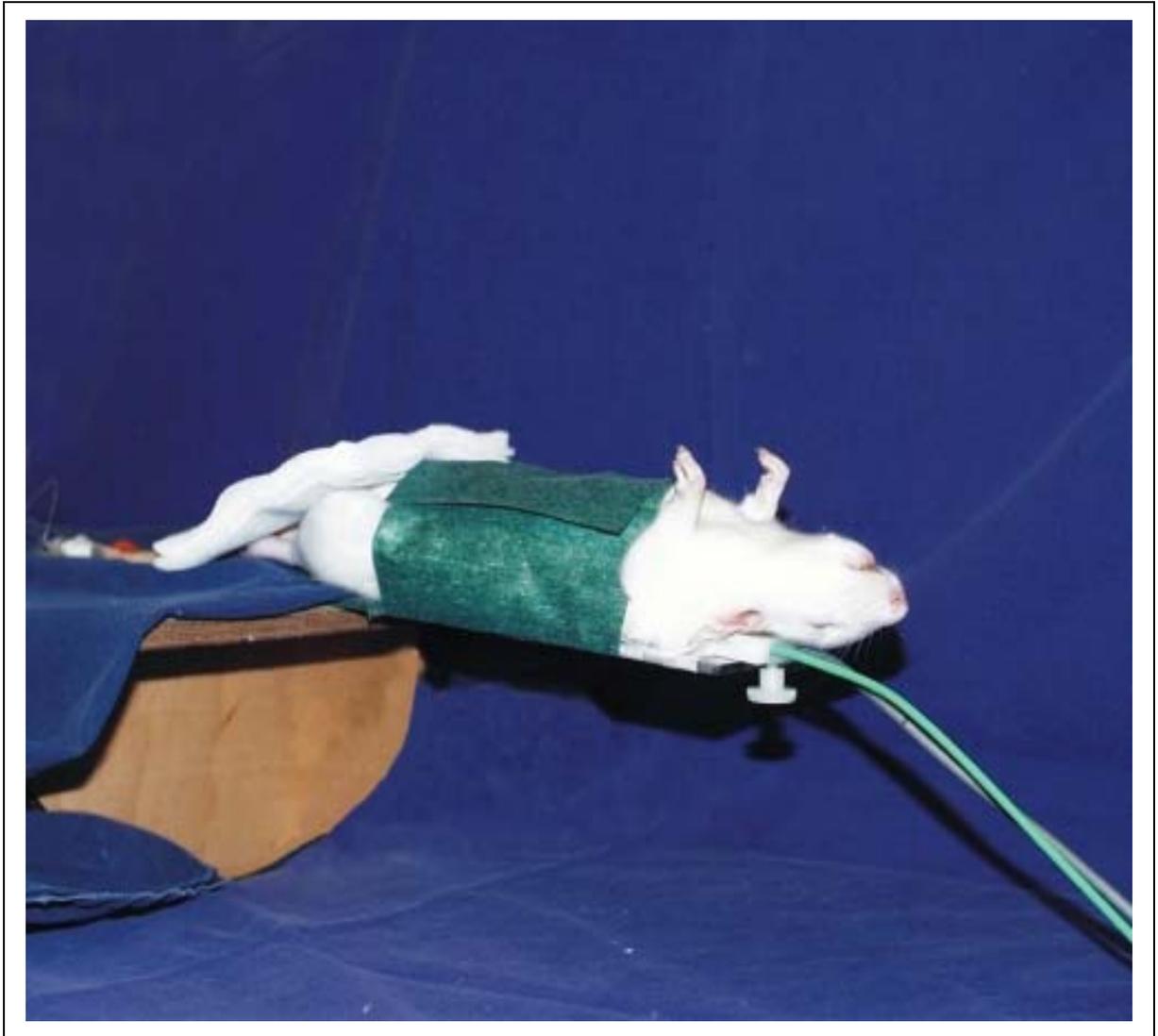


Abb. 4.5: Lagerung der Versuchstiere zur Magnetresonanztomographie

Im Detail folgte das Untersuchungsprotokoll folgendem Ablauf:

Ablauf der MRI-Sequenzen:

1. Übersichtsaufnahme in 3 Ebenen zur Lagekontrolle der Versuchstiere

TR: 110 ms; TE: 5 ms; Puls: 30°

2. Multislice-Multiecho-Sequenz

7 Schnitte (MS), 3mm Schichtdicke

Jeder Schnitt hat 4 hintereinanderfolgende Aufnahmen (ME)

3. T1 gewichtete Mehrschicht Sequenz, nativ:

10 Schnitte, 3 mm Schichtdicke

je 1 Bild TR: 1190 ms; TE: 25 ms

4. T2 gewichtete Mehrschicht Sequenz, nativ:

10 Schnitte, 3 mm Schichtdicke

je 1 Bild, TR: 2000 ms; TE: 40 ms

5. T2 gewichtete Relaxationszeit:

1 Schnitt; 16 Aufnahmen hintereinander

TR: 1190 ms; TE: 25 ms

⇒ Gabe von GD – EOB – DTPA

6. Sofort nach Gabe T1–Sequenz wie in (3.) beschrieben.

7. Nach (6.) Sofort gleiche Sequenz wieder starten

⇒ Gabe von ENDOREM

⇒ 45 min. warten

8. Sequenz starten wie in (5.) beschrieben

9. T2 Sequenz starten wie in (4.) beschrieben

4.3 Intravitalmikroskopie

4.3.1 Mikroskop

Zur Untersuchung wurde ein Fluoreszenzmikroskop vom Typ MM-11 (Nikon, Düsseldorf) mit 100 Watt Quecksilberlampe als Auflicht-Beleuchtungsquelle verwendet. Ein in den Strahlengang der Lampe eingebrachter Anregungsfilter (546 nm, EX546/10) diente der Anregung des Fluoreszenzfarbstoffs Acridine Orange und der Latex Partikel. Das optische System bestand aus einem 10x Okular, einem Zoom Objektiv (0,7-2,25x) und einem Wasserimmersionsobjektiv (10x/0,30). Diese Anordnung ermöglichte eine 330-fache Vergrößerung des zu untersuchenden Gewebes. Eine auf 37°C erwärmte Ringer-Laktat-Lösung welche am Immersionsobjektiv entlang herangepumpt wurde diente zum einen der Wasserimmersion und zum anderen als Schutz vor Austrocknung des Lebergewebes. Die Versuche wurden über eine hochauflösende CCD (charge coupled device) Video Kamera (FK6990, Pieper, Schwerte) auf einen Monitor übertragen und auf einem S-VHS Videorecorder (Panasonic FS 1) aufgezeichnet. Ein zwischengeschalteter Echtzeitgenerator (VTG 33 FOR A Company, Tokyo, Japan) mit 1/100 Sekundenauflösung diente der synchronen Zeiteinblendung zur späteren Auswertung auf dem S-VHS Band.



Abb. 4.10: Technische Ausstattung zur Intravitalmikroskopie: Mikroskop, Kamera, Echtzeitgenerator, Monitor und Videorecorder

4.3.2 Fluoreszenzfarbstoffe

Die intravitalmikroskopische Untersuchung der Leukozyten in Gruppe 1 und 2 erfolgte durch fraktionierte i.v. Gabe von Acridine Orange. Wie von JAHNMEHR beschrieben kommt es hierdurch zu einer direkten Aufnahme in die Leukozyten, welche nun per Fluoreszenzmikroskopie beobachtet werden können. Um eine Überstrahlung der Bilder durch Acridine Orange zu vermeiden wurde der Farbstoff nur in kleinsten Mengen (0,1 ml/Leberläppchen) i.v. verabreicht. Insgesamt wurden 5 Leberläppchen für einen Zeitraum von jeweils 30 Sekunden aufgezeichnet.

In Gruppe 3 und 4 wurde durch Gabe von fluoreszenzmarkierten Latexpartikeln die phagozytäre Aktivität der Lebermakrophagen bestimmt. Hierfür wurde eine standardisierte Konzentration von 3×10^8 Latexpartikeln mit einer Größe von $0,88 \mu\text{m}$ über die Schwanzvene verabreicht. Es wurden insgesamt 12 Minuten eines Lobulus aufgenommen und dabei alle 4 Minuten eine Fraktion Latex-Beads verabreicht. Anschließend wurden Standbilder von insgesamt 5 Lobuli aufgezeichnet.

4.3.3 Untersuchungsablauf

4.3.3.1 Laparotomie

Die Versuchstiere wurden auf einer Korkplatte gelagert und das rasierte Abdomen mit Kodanspray desinfiziert. Durch einen medianen Längsschnitt von supravesical bis zum Xiphoid wurde das Abdomen eröffnet. Nach Durchtrennung des Lig. falciforme und des Lig. hepaticum konnte der linke Leberlappen mobilisiert werden. Um ein Hervorquellen des Intestinums in Seitenlage zu verhindern wurde eine U-förmige, in Kochsalzlösung getränkte Kompresse

über das Intestinum gelegt. Anschließend wurde das Tier auf einer speziell angefertigten Plexiglasbühne in Linksseitenlage gelagert. Der linke Leberlappen wurde mit zwei Watteträgern mobilisiert und mit der planen Seite nach oben in eine vorgefertigte Knetmulde auf einem separaten Bühnenarm ausgelagert. Dieser mit einem Kugelgelenk verbundene Seitenarm konnte frei bewegt und die Leber damit optimal positioniert werden. Das Auslagern erfolgte ohne die zu mikroskopierende Seite zu berühren und ohne Zug auf das Organ auszuüben. Atemartefakte bei der Aufzeichnung sollten durch diese Lagerung größtenteils reduziert werden. Eine kontinuierliche Befeuchtung mit physiologischer Kochsalzlösung war von nun an gewährleistet.

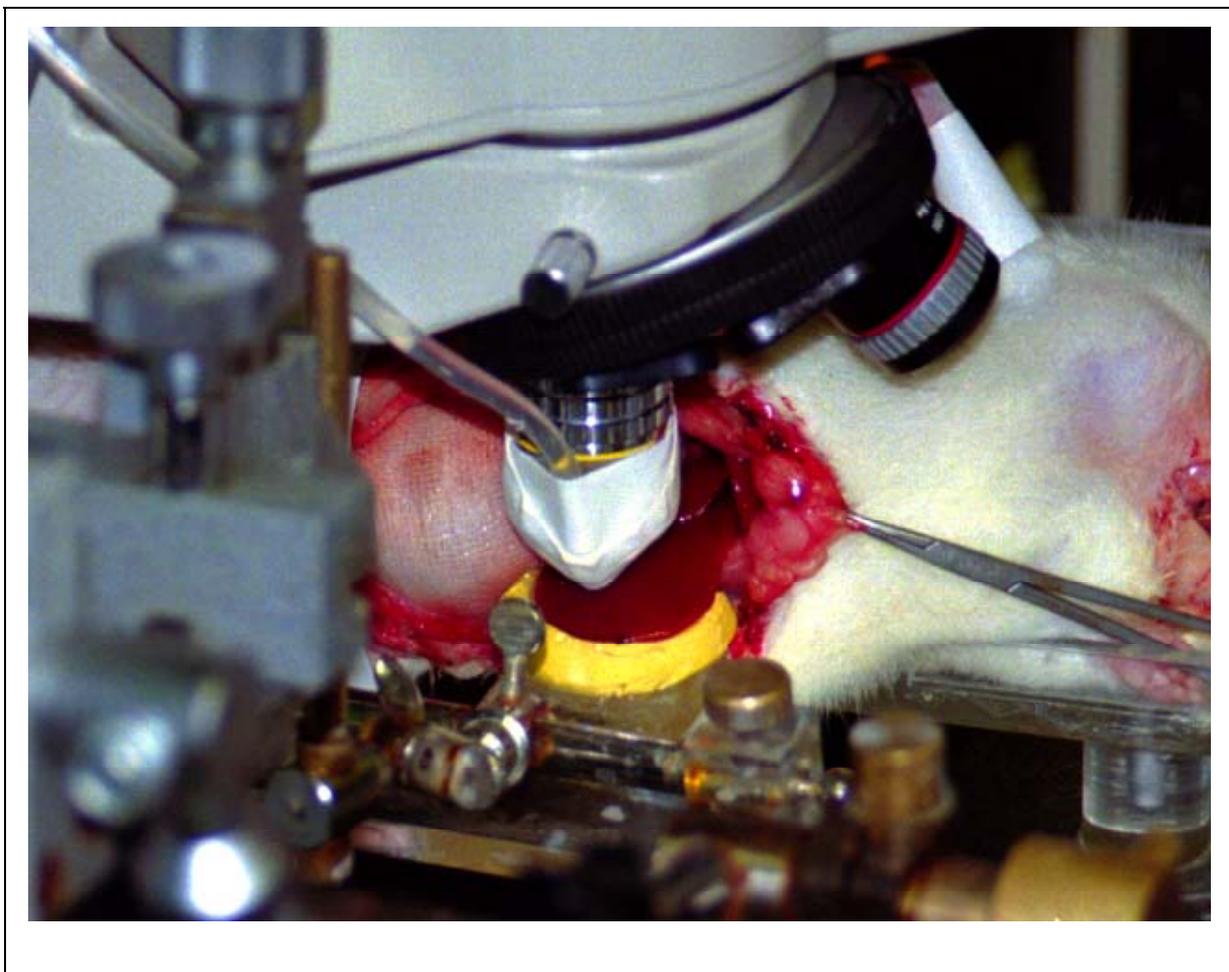


Abb. 4.11: Intravitalmikroskopische Leberuntersuchung eines Versuchstieres

4.3.3.2 Mikroskopie

4.3.3.2.1 Intravitalmikroskopische Leukozytenbeobachtung

Nach Fokussierung eines Leberläppchens wurde in den Gruppen 1 und 2 nach Gabe von 0.1 ml Acridine Orange 5 Lobuli über jeweils 35 Sekunden aufgezeichnet. Hierbei wurde das Bild so eingestellt, daß ein zentraler Azinus einem portalen Azinus gegenüber lag.

Zur späteren Messung der Sinusoidweiten wurden anschließend fünf quergetroffene Zentralvenen mit den einmündenden Sinusoiden für jeweils fünf Sekunden aufgezeichnet.

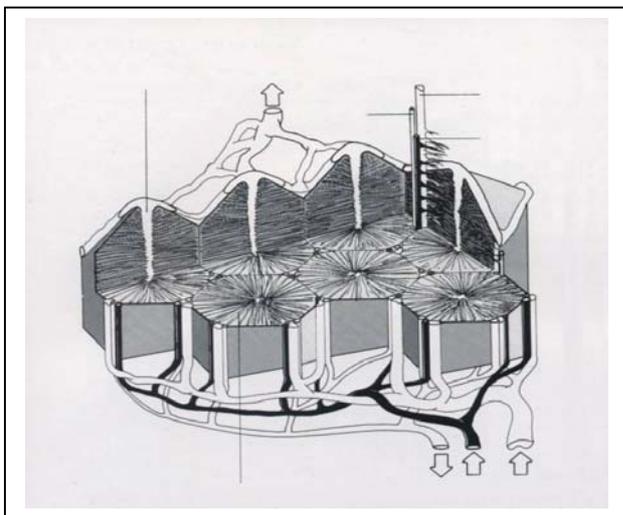


Abb. 4.12: Schematischer Aufbau mehrerer Leberläppchens

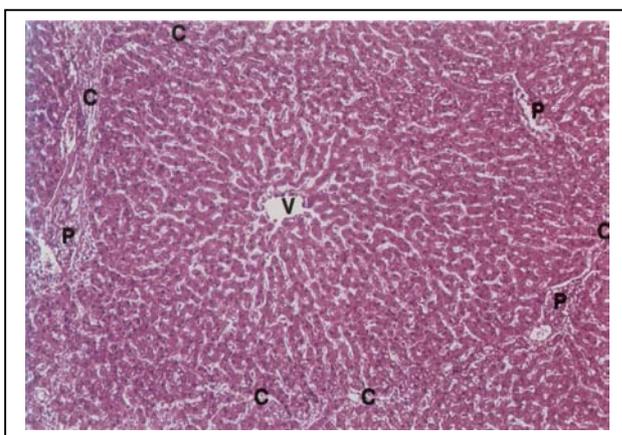


Abb. 4.12: Übersicht eines Leberläppchen

4.3.3.2 Aufzeichnung der Makrophagenaktivität nach Gabe von Latex Partikeln

Auch in Gruppe 3 und 4 wurde zuerst ein entsprechendes Leberläppchen fokussiert. Dann wurde in vierminütigem Abstand jeweils ein Bolus Latex Beads i.v. injiziert. Das Lämpchen wurde über den gesamten Zeitrahmen von 12 Minuten aufgezeichnet.

Anschließend wurden noch 4 weitere Leberläppchen für jeweils 5 Sekunden aufgenommen.

4.4 Bestimmung der Gallesekretion

4.4.1 Operatives Vorgehen

In Gruppe 3 und 4 wurde nach medianer Laparotomie das Intestinum nach links aus dem Abdomen ausgelagert und der D. choledochus darstellt. Nachdem dieser von umgebenden Gefäßen und Bindegewebe freipräpariert war, wurde er kaudal unterbunden und kranial ein Knoten vorgelegt. Ein speziell gefertigter, steriler Katheter wurde in den D. choledochus eingeführt und fest verknötet. Der Katheter hatte eine fest definierte Länge. An seinem Ende war ein Eppendorfhütchen zur Gallesammlung angebracht. Das Intestinum wurde nun wieder repositioniert und das Tier zur intravitalmikroskopischen Untersuchung vorbereitet. Insgesamt wurde die Galle über einen Zeitraum von einer Stunde gesammelt und die gewonnene Gallenmenge gemessen.

5. Auswertung

5.1 Quantitative Analyse der kernspintomographischen Daten

Bei der Analyse der nativen vs. kontrastverstärkten Bildgebung wurden die Aufnahmen der beiden Kontrastmittel nach verschiedenen Verfahren ausgewertet.

5.1.1 Auswertung nach ENDOREM Gabe

Die Auswertung der MR-Bilder erfolgte durch Signalintensitätsmessung in vom Untersucher abhängigen, frei ausgewählten Leberregion (ROI- „region of interest“) unter Aussparung von Gefäßbereichen wie z.B. V. cava inferior, Pfortaderäste und ascendierenden Lebervenen. Die Größe der ROI variierte im Bereich von ca. 10 mm, wurden aber in der nativen und in der postkontrastverstärkten Aufnahmen identisch konfiguriert.

Der prozentuale Intensitätsverlust wurde bei den Sham bzw. Schock-Tieren wie folgt berechnet:

$$\text{Prozentualer Intensitätsverlust} = ((SI_{\text{post}} - SI_{\text{pre}}) / SI_{\text{pre}}) \times (-100)$$

(SI pre = Signalintensität vor Kontrastmittelgabe

SI post = Signalintensität nach Kontrastmittelgabe)

Desweiteren wurde die prozentuale Zunahme der T2 Relaxationszeit in Normalem- bzw. Postschockgewebe untersucht.

$$\text{Prozentuale Zunahme der T2 Relaxationszeit} = ((T2_{\text{post}} - T2_{\text{pre}}) / T2_{\text{pre}}) \times (-100)$$

(T2 pre = T2 Relaxationszeit vor Kontrastmittelgabe

T2 post = T2 Relaxationszeit nach Kontrastmittelgabe)

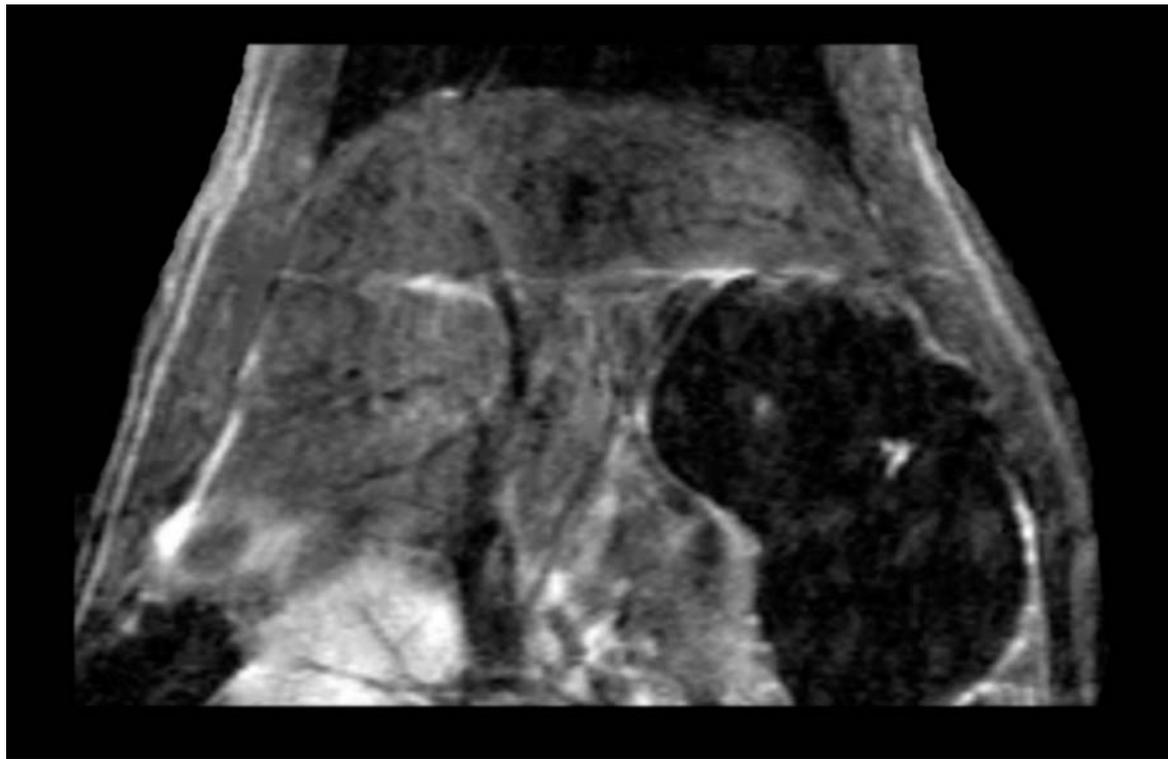


Abb. 4.6: T2 Nativaufnahme vor ENDOREM Gabe

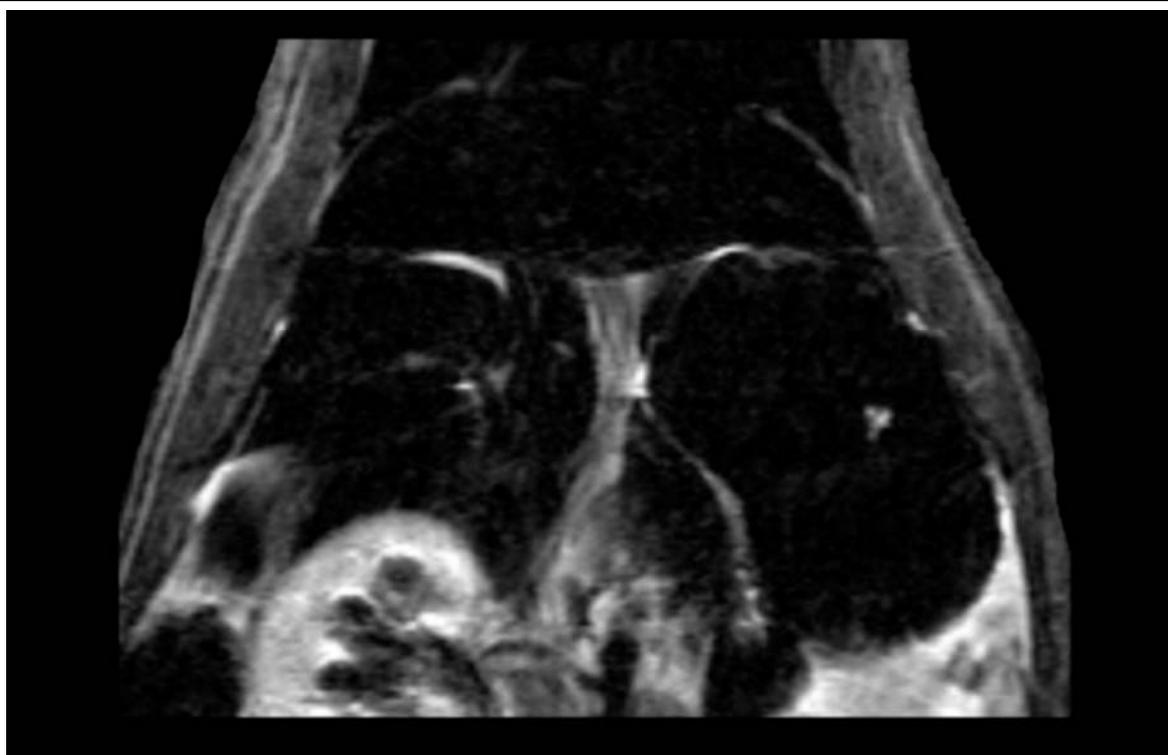


Abb. 4.7: T2 Aufnahme nach ENDOREM Gabe

5.1.2 Auswertung nach Gd-EOB-DTPA Gabe

Zur Bewertung der hepatobiliären Gd-EOB-DTPA-Exkretion wurden in allen MR-Bildern digital mehrere Gallengänge umfahren. In den entstandenen Volumina wurden nun T1 Signalintensitätsmessungen durchgeführt und aus den entstandenen Ergebnissen die prozentualen Signalintensitätsänderungen errechnet:

Prozentuale Signalintensitätsänderung = $((SI_{post} - SI_{pre}) / SI_{pre}) \times (-100)$

(SI pre = Signalintensität vor Kontrastmittelgabe

SI post = Signalintensität nach Kontrastmittelgabe)

bedeutet.

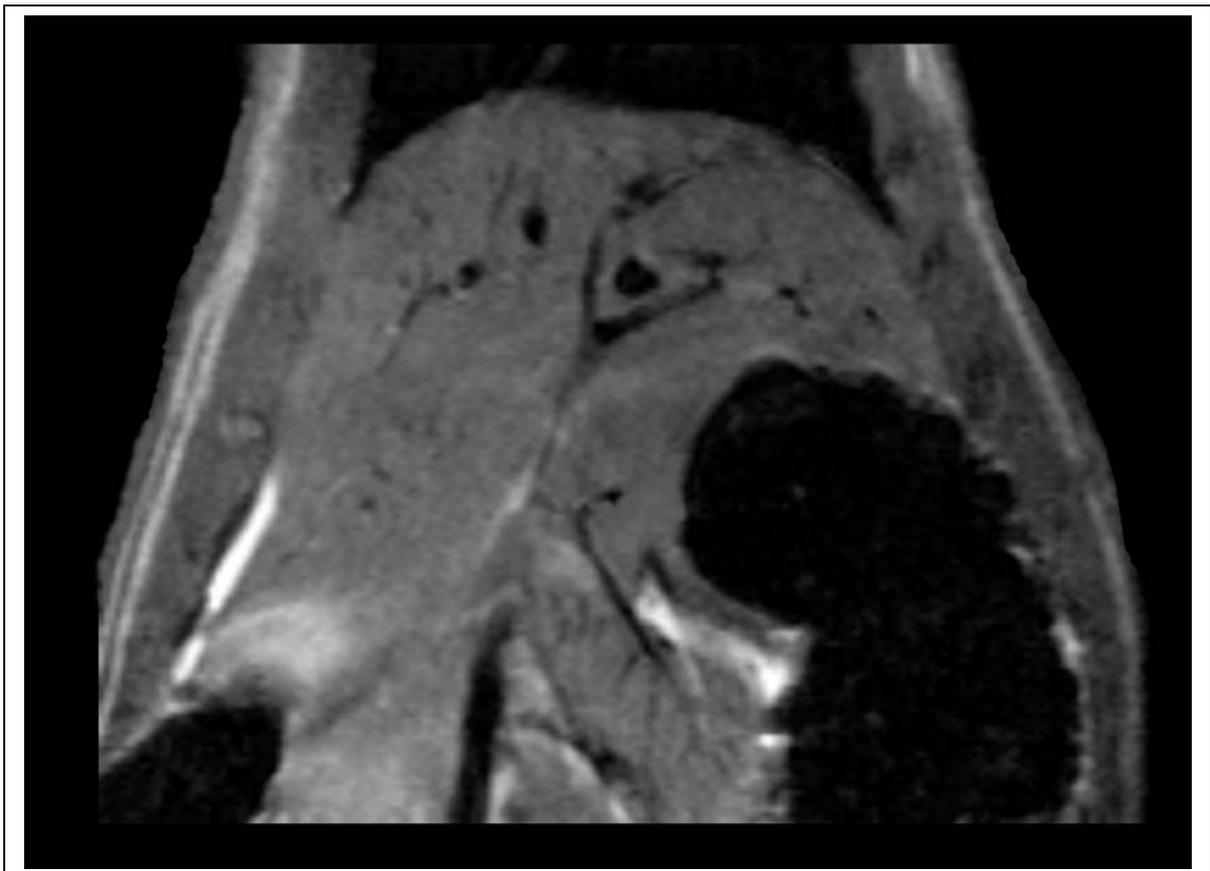


Abb. 4.8: T1 Nativaufnahme vor Gd-EOB-DTPA- Gabe

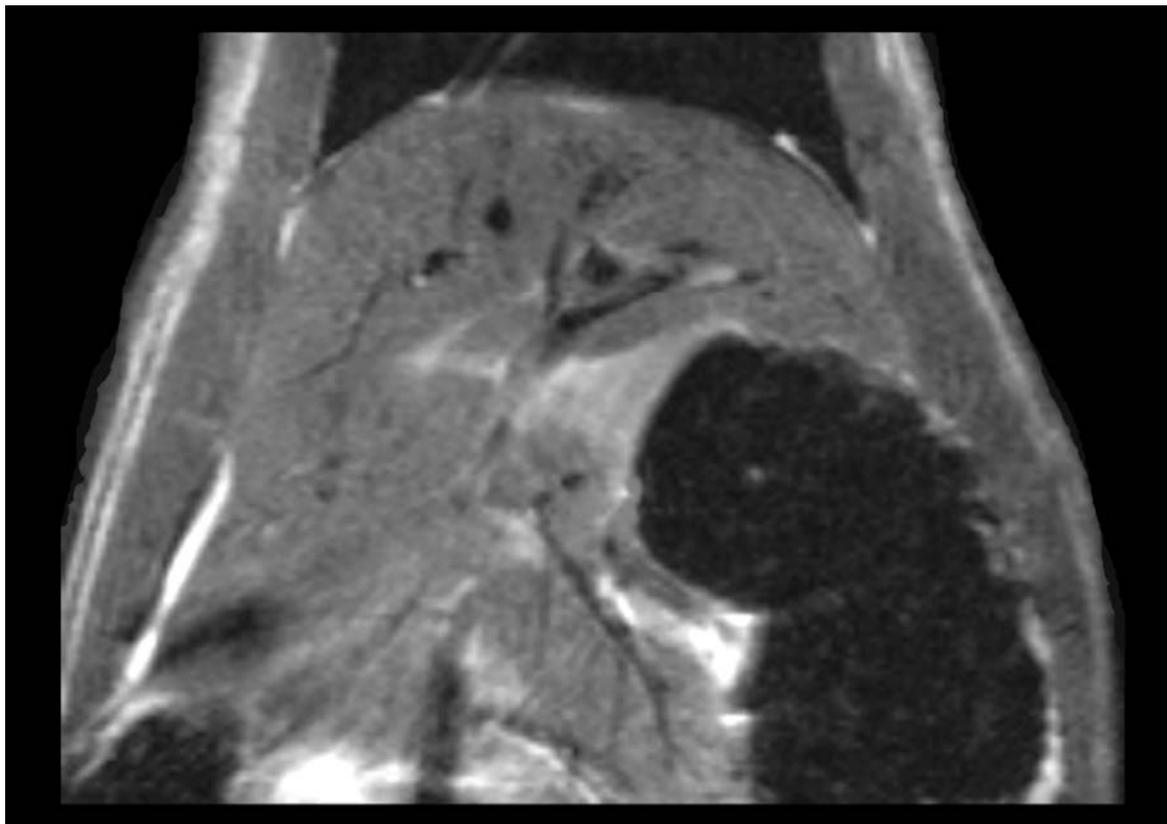


Abb.4.9: T1 Aufnahme 15 min nach Gd-EOB-DTPA-Gabe

5.2 Intravitalmikroskopische Auswertung

Mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie können Mikrozirkulationsstörungen der Leber beurteilt werden. In dieser Versuchsreihe wurden verschiedene Untersuchungstechniken zur differenzierten Auswertung angewandt.

Zum einen diente eine computergestützte Auswerteinheit der Bestimmung der Sinusoidweiten, der Leukozytengeschwindigkeit und des sinusoidalen Blutflusses.

Zum anderen konnten Leukozyten und Makrophagen mit Hilfe zweier Kontrastmitteln dargestellt werden.

Acridine Orange wurde hierbei zur Bestimmung der Leukozyten-Endothel-Interaktion angewendet, fluoreszierende Latexpartikel dienten der Beurteilung der Makrophagenaktivität.

Die intravitalmikroskopisch gewonnenen Bilder wurden mit Hilfe eines S-VHS Videorecorders mit exakter Zeitlupenfunktion (Panasonic AG-7355-E, 0,2 sec. Einzelbildschaltung) ausgewertet. Das Bild wurde auf einen 51 cm Monitor (JCV Color Monitor TM-210 PS) übertragen. Die aufgenommenen Läppchenunterfelder wurden durch Auflegen eines ellipsoiden Overlays in drei Regionen unterteilt: periportale (PP), midzonale (MZ) und perizentrale (PZ) Region. Die Spitzen der ovalen Schablone lagen dabei jeweils auf dem Mittelpunkt der Zentralvene bzw. auf dem Mittelpunkt des Portalfeldes.

Diese Technik wurde sowohl zur Auswertung der Leukozyten-Endothel-Interaktion wie zur Auswertung der phagozytierten Latexpartikel angewandt.

5.2.1 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Bei der Auswertung wurden folgende Parameter nach MARZI et al.(1993) für jedes sublobuläre Feld für einen Zeitraum von 30 Sekunden getrennt untersucht:

1. Frei passierende Leukozyten (FPL) - Hierbei wurde die Anzahl der von periportal nach perizentral fließenden Leukozyten ausgezählt.
2. Temporär adhärente Leukozyten (TAL) – Haften Leukozyten in einem Zeitraum von 0,2-20 Sekunden am Endothel, so werden sie als TAL definiert.
3. Dauerhaft adhärente Leukozyten (DAL) – Zellen die länger als 20 Sekunden am Endothel haften wurden als DAL ausgezählt.
4. Das Verhältnis der TAL zum absoluten Leukozytendurchfluß wird als Adhäsionsquotient errechnet:

$$\text{TAL (\%): } \frac{\text{TAL} * 100}{\text{FPL}}$$

5. Mit Hilfe der Mittelwerte der temporären Adhärenzzeiten wird die mittlere Adhärenzzeit (MAT) der Leukozyten pro Läppchenunterfeld errechnet

$$\text{MAT (s): } \frac{t_{(\text{TAL}1)} + t_{(\text{TAL}2)} + \dots t_{(\text{TAL}n)}}{n}$$

6. Eine Auskunft über die prozentuale Kontaktzeit der Leukozyten mit dem Endothel erhält man, indem der Adhäsionsquotient (%) mit der mittleren Adhärenzzeit MAT(s) multipliziert wird:

$$\text{Adhäsionsindex (s/100L.): TAL(\%) * MAT(s)}$$

7. Der prozentuale Anteil dauerhaft adhärenter Leukozyten am Gesamtdurchsatz wird wie folgt berechnet:

$$\text{DAL (\%)}: \frac{\text{DAL} * 100}{(\text{DAL} + \text{FPL})}$$

5.2.2 Digitale Bildanalyse

Mit Hilfe eines computerunterstützten Bildverarbeitungssystems (Lobulus, Medical Vision Systems, Saarlouis) konnten aus den intravitalmikroskopisch gewonnenen Bildern sinusoidale Durchmesser sowie Flußgeschwindigkeiten der Leukozyten errechnet werden. Hierzu mußten die analog aufgezeichnete Bilder mittels eines Personal Computer in digitale Daten umgewandelt werden.

5.2.2.1. Bestimmung der Leukozytengeschwindigkeit:

Die Messung erfolgte indem für eine zurückgelegte Strecke im Sinusoid das benötigte Zeitintervall gemessen wurde. Gewertet wurden nur frei fließende Leukozyten auf geraden Sinusoidabschnitten. Der Auswertbereich erstreckte sich hierfür in einem Bereich von 90µm-190µm um die Zentralvene. Insgesamt wurden pro Lobulus 20 Leukozyten gemessen.

Berechnet wurde wie folgt.

$$v = \frac{p1-p2}{dt}$$

5.2.2.2. Bestimmung der Sinusoidweiten

In einem definierten Radius von 90 µm um die Zentralvene wurde von insgesamt 20 Sinusoiden der Lumendurchmesser ermittelt. Aus der Summe der Einzelwerte wurde dann der Mittelwert errechnet.

5.2.2.3. Näherungsweise Bestimmung des volumetrischen Blutflusses

Dieser Parameter wurde aus der Flußgeschwindigkeit und den Sinusoidweiten errechnet:

$$\text{SFL} = v * \frac{\pi}{4} * d^2$$

5.2.2.4. Berechnung der Makrophagenaktivität

Für einen Zeitraum von fünf Minuten nach Gabe der Latexpartikel wurde die Zeit ermittelt bis keine Partikel mehr durch die Sinusoide flossen

Ähnlich der Bestimmung der Leukozytenadhärenzen erfolgte die Auswertung der resorbierten Latexpartikel fünf Minuten nach Gabe der letzten Latexfraktion. Über den aufgezeichneten Sinusoiden wurden die gleichen ovalen Schablonen angebracht und die als helle Punkte zu erkennenden Latex Beads für jedes Feld (PP, MZ, PZ) gezählt. Insgesamt wurden fünf Azini pro Tier ausgewertet.

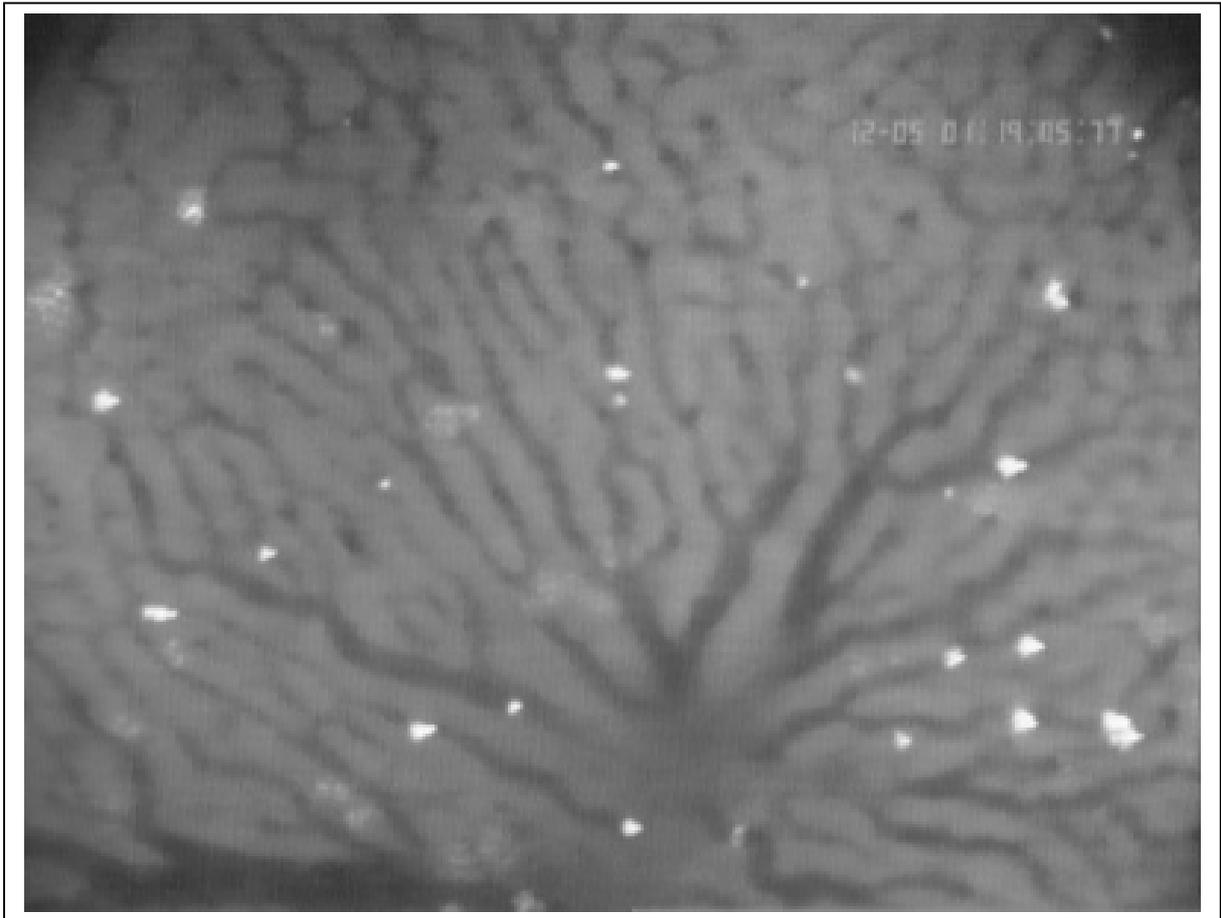


Abb. 4.15: Intravitalmikroskopische Aufnahme nach Gabe von Latex Beads

6. ERGEBNISSE

6.1 Makrohämodynamische Parameter und Labordaten

Die Auswertung der verschiedenen systemischen Parameter wie Puls, MABD, Säure-Basen-Haushalt, Hb und Hkt in Schock- bzw. Shamgruppe verdeutlichen die schon von mehreren Arbeitsgruppen beschriebenen unterschiedlichen Phasensverläufe.

Das Schockmodell läßt sich dabei prinzipiell in drei Phasen einteilen:

1. Steady State
2. Hämorrhagischer Schock
3. Reperfusion

Da es bis zur Beendigung der Reperfusionsphase innerhalb der vier verschiedenen Untersuchungsgruppen (3h bzw., 24h MRI- und Latexgruppe) nicht zu signifikanten Parameterveränderungen kam, kann hier von vergleichbaren Ausgangssituationen für die folgenden Untersuchungen ausgegangen werden.

6.1.1 Mittlerer arterieller Blutdruck (MABD) und Herzfrequenz (HF)

Der MABD wurde in der Schockgruppe durch fraktionierte Blutentnahmen für einen Zeitraum von 90 Minuten auf Werte von 40 ± 5 mmHg gesenkt.

In der Reperfusionphase kam es in allen Gruppen zu einer Blutdruckerhöhung auf fast 100% der Ausgangswerte. Die Shamgruppen zeigten im Versuchsverlauf keine signifikanten Blutdruckschwankungen auf.

Die Herzfrequenz zeigte während der Schockphase einen deutlichen Frequenzabfall, welcher sich jedoch in der Reperfusionphase wieder erholte. In den Vergleichsgruppen zeigten die Frequenzwerte während des Versuches eine Konstanz im Niveau der Ausgangswerte.

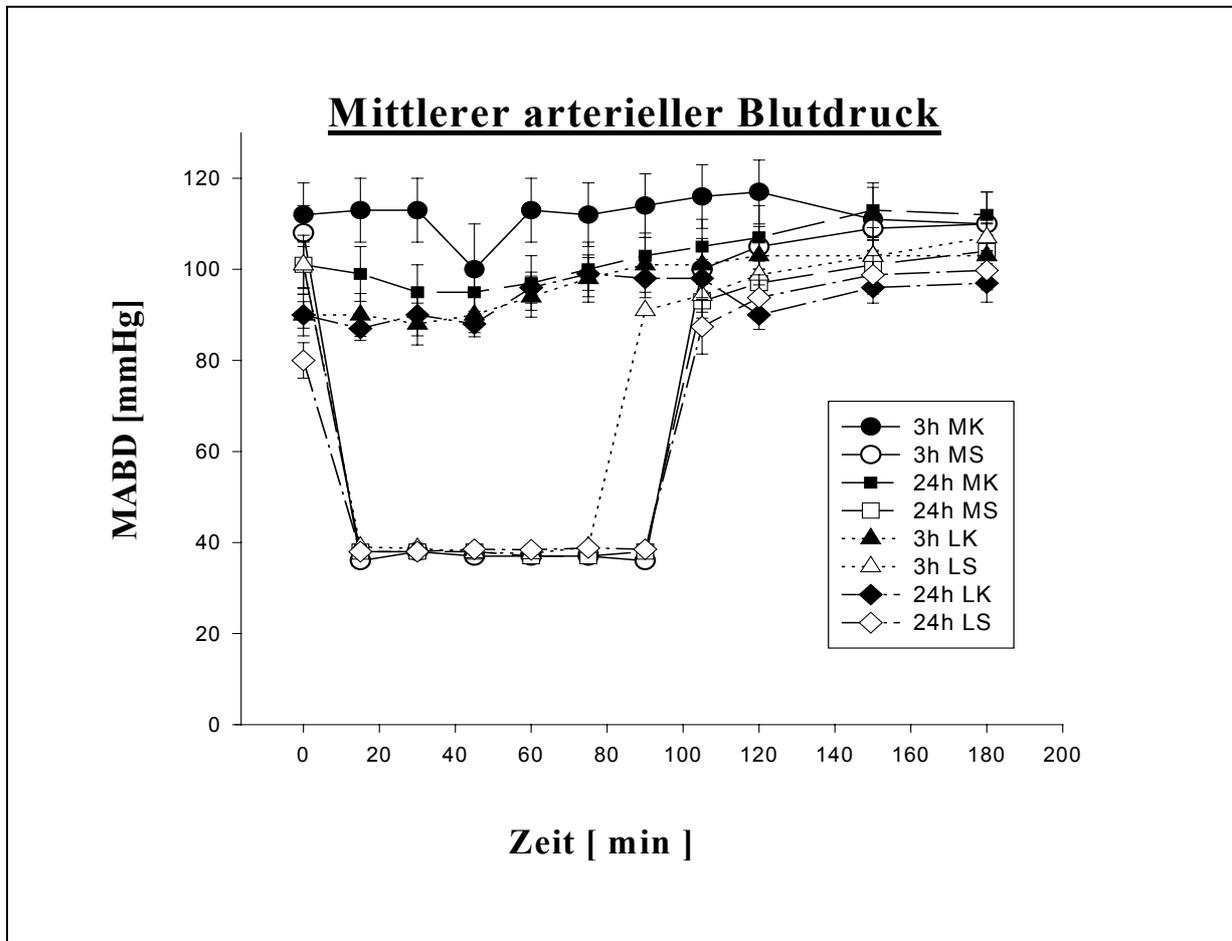


Abb. 6.1: MK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Acridine Orange), MS: Mikroskopie Schockgruppe (Acridine Orange), LK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Latex Beads), LS: Mikroskopie Schockgruppe (Latex Beads)

6.1.2 Säure-Basen-Haushalt

Im Verlauf der Ischämiephase kam es in der Schockgruppe zu einem deutlichen Abfall des Base Excess. Aufgrund einer ausgeprägten Hyperventilation der Tiere fielen die $p\text{CO}_2$ -Werte stark ab, während es zu einem Anstieg der $p\text{O}_2$ -Werte kam. Der pH-Wert blieb während des hypoxischen Zustandes relativ konstant.

Bei fast allen Schock-Tieren wurde diese azidotische Stoffwechsellaage in der Reperfusionsphase wieder ausgeglichen.

In der Sham-Gruppe zeigte die Blutgasanalyse einen konstanten Verlauf im physiologischen Bereich.

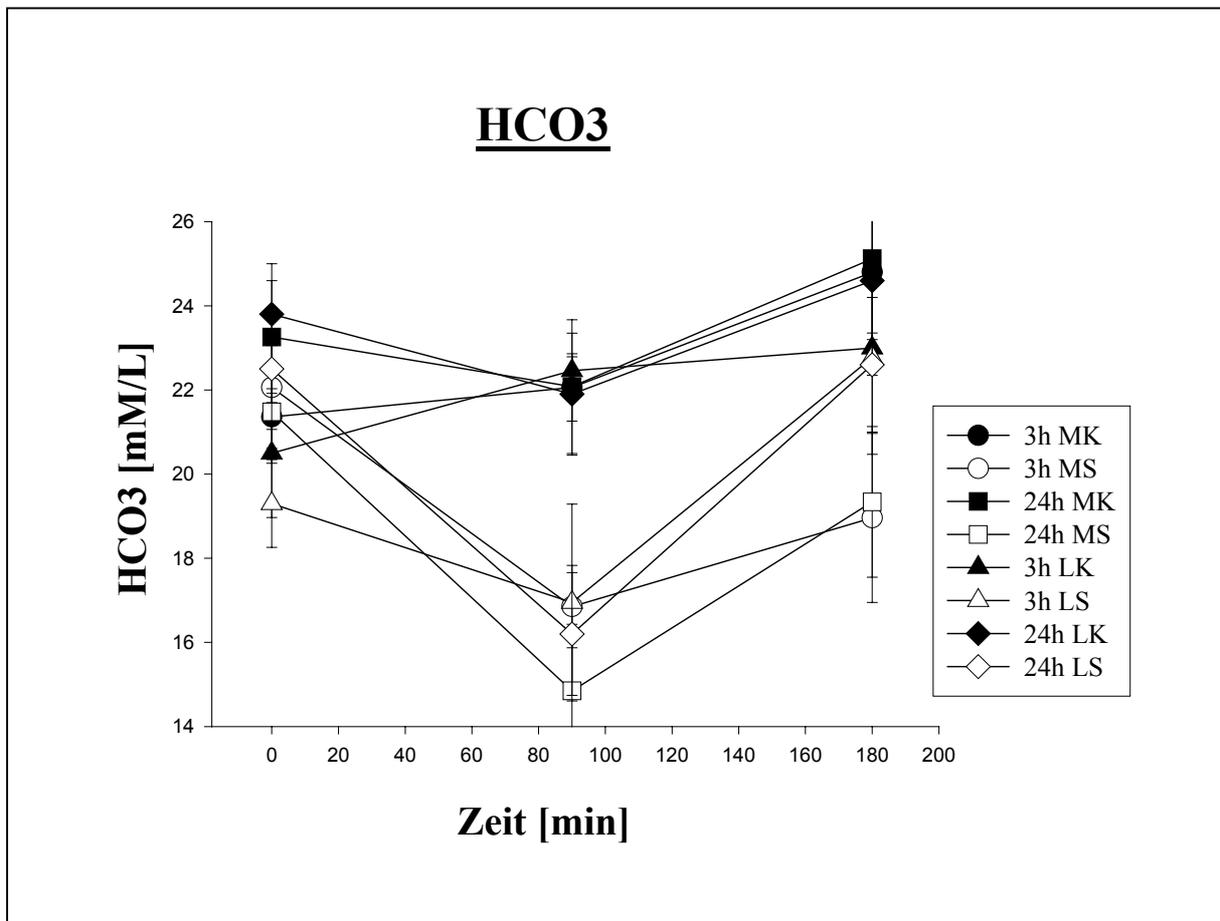


Abb. 6.2: MK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Acridine Orange), MS: Mikroskopie Schockgruppe (Acridine Orange), LK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Latex Beads), LS: Mikroskopie Schockgruppe (Latex Beads)

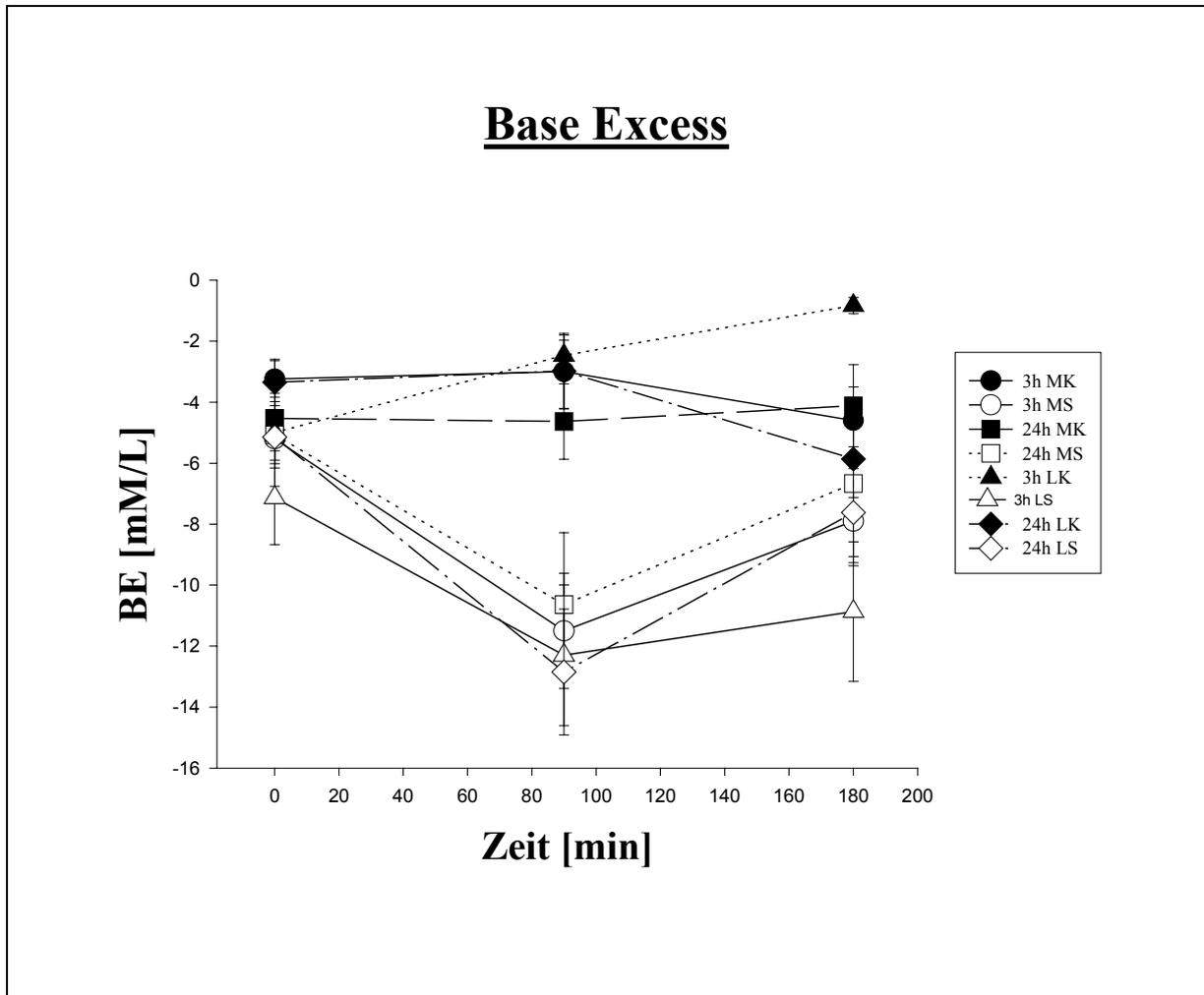


Abb. 6.3: MK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Acridine Orange), MS: Mikroskopie Schockgruppe (Acridine Orange),
LK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Latex Beads), LS: Mikroskopie Schockgruppe (Latex Beads)

6.1.3 Hämoglobin und Hämatokrit

Die Ausgangswerte aller Gruppen befanden sich vor Schockbeginn im Normalbereich. Durch die fraktionierten Blutentnahmen wurde nach Schockbeendigung ein Hämoglobin-, und Hämatokritabfall verzeichnet. Dieser betrug circa 5g/dl im Hb-Bereich und durchschnittlich 10% im Hkt-Bereich. Im Verlauf der Reperfusion stiegen beide Werte wieder auf ca. 75% der Ausgangswerte an.

Entsprechend kam es zu Veränderungen der systemischen Leuko-, und Thrombozytenkonzentrationen während der verschiedenen Versuchsphasen. Auch hier kam es nicht zu signifikanten Unterschieden innerhalb der Gruppen.

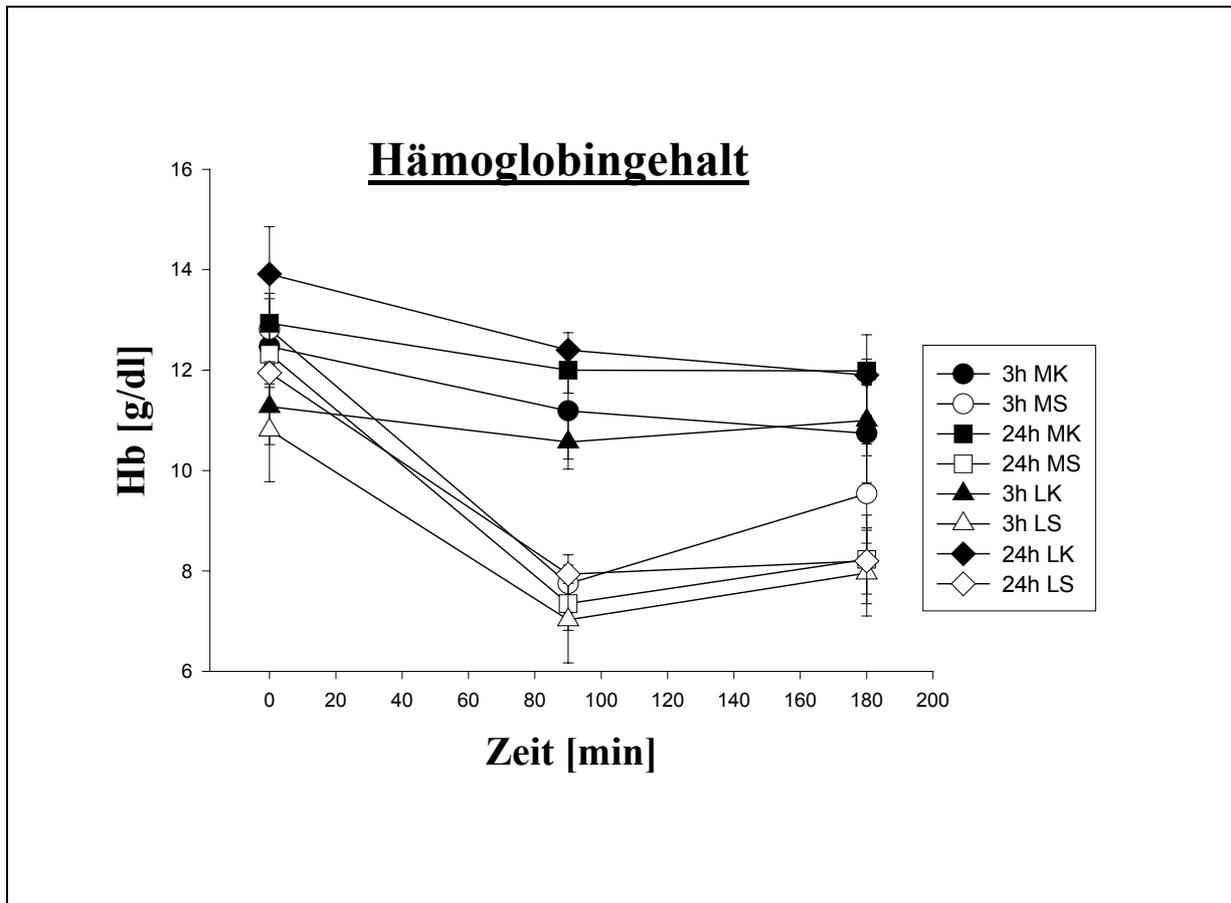


Abb. 6.4: MK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Acridine Orange), MS: Mikroskopie Schockgruppe (Acridine Orange), LK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Latex Beads), LS: Mikroskopie Schockgruppe (Latex Beads)

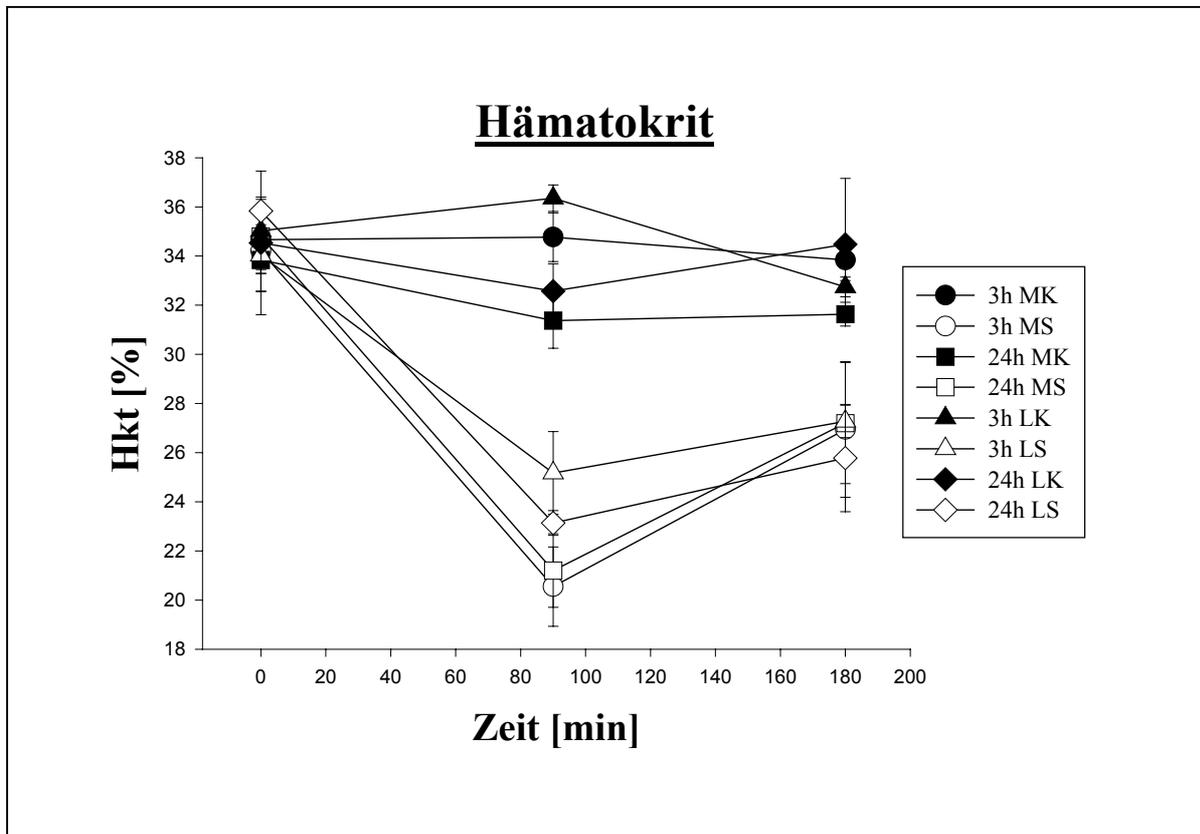


Abb. 6.5: MK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Acridine Orange), MS: Mikroskopie Schockgruppe (Acridine Orange),
LK: Mikroskopie Kontrollgruppe (Latex Beads), LS: Mikroskopie Schockgruppe (Latex Beads)

6.2 Kernspintomographische Auswertung

6.2.1 Magnetresonanztomographische Bestimmung der Makrophagenaktivität

Nach Applikation des superparamagnetischen Kontrastmittels ENDOREM konnte kernspintomographisch keine signifikante Abnahme der Signalintensität drei Stunden nach Schock gemessen werden. Ebenso zeigte sich keine Verminderung in der 24 Stunden Gruppe. Auch die Messung der T2- Relaxationszeit konnte in keiner der beiden Gruppen eine signifikante Veränderung gegenüber den Shamgruppen aufweisen. Jedoch zeigte der Vergleich beider Schockgruppen gegeneinander eine signifikant vermehrte Abnahme der Signalintensität drei Stunden nach Schock gegenüber der 24 Stunden Reperfusiongruppe.

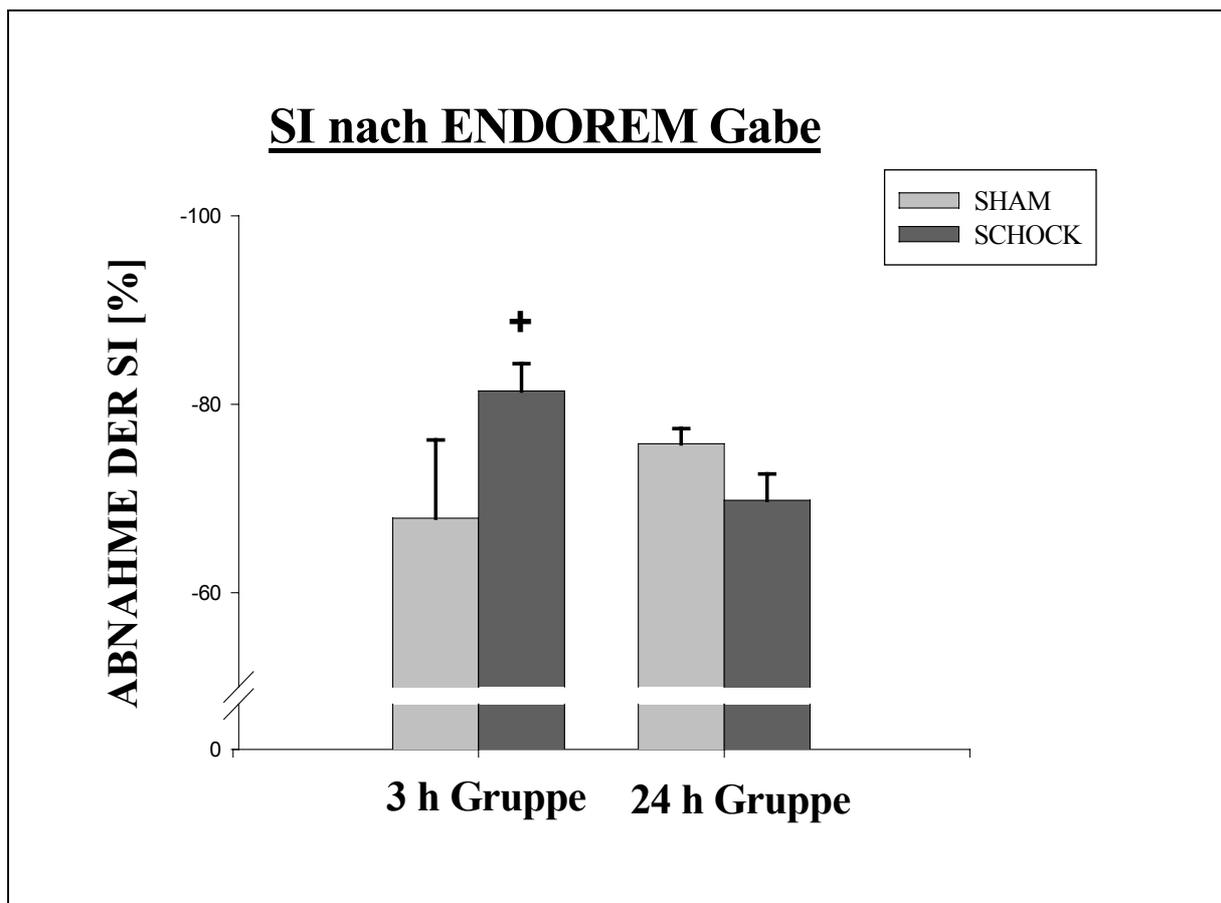


Abb. 6.6: Abnahme der SI in T2 gewichtetem Lebergewebe nach Gabe von Eisenoxidpartikeln (+: $p < 0,05$ 3h Gruppe vs. 24h Gruppe)

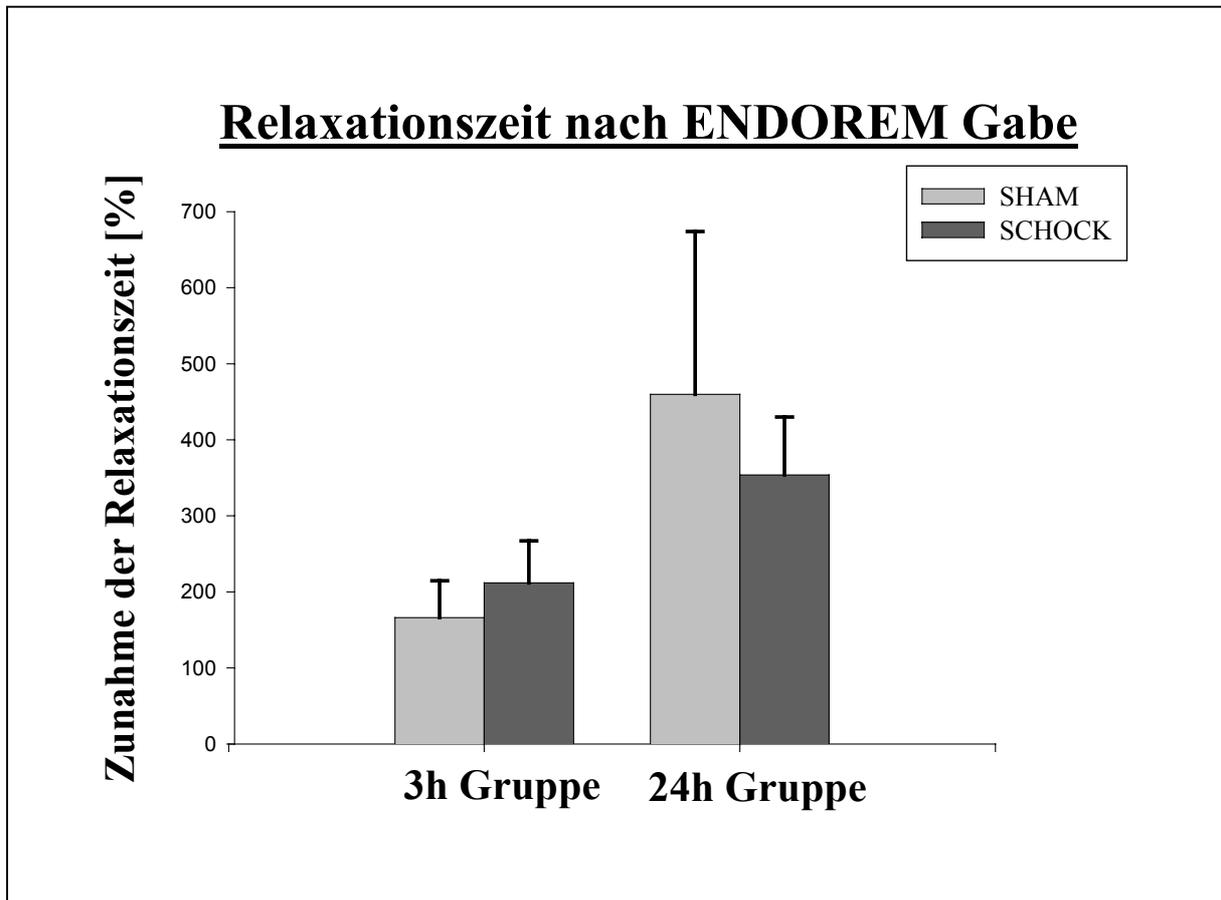


Abb. 6.7: Zunahme der Relaxationszeit nach Gabe von Eisenoxidpartikeln

6.2.2 Magnetresonanztomographische Bestimmung der Hepatozytenfunktion

Die Gallesekretion wurde mittels Gd-EOB-DTPA analysiert. Dieses Kontrastmittel wird wie oben beschrieben von den Hepatozyten aufgenommen und von dort über die Galle ausgeschieden. Diese Sekretion konnte kernspintomographisch als Veränderung der T1-Signalintensität (SI) nachgewiesen werden.

Das untersuchte Lebergewebe zeigte hierbei drei Stunden postischämisch gegenüber der Sham-Gruppe keine wesentlichen Unterschiede. Die Untersuchung der 24 Stunden Gruppe ergab jedoch eine signifikant geringere Signalintensitätserhöhung der Schockgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe.

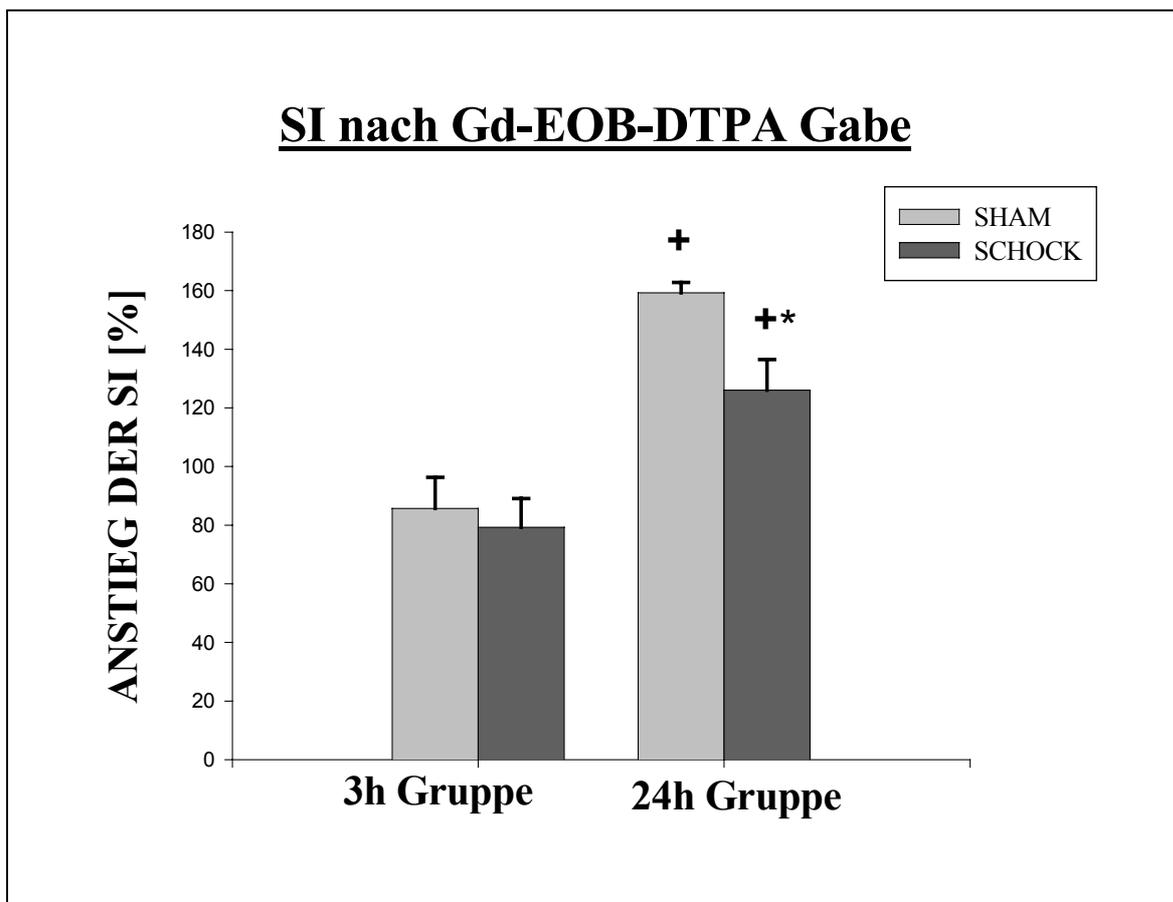


Abb.6.8: Anstieg der Signalintensität in T1 gewichtetem Lebergewebe nach Gabe von Gd-EOB-DTPA zur indirekten Messung der Gallesekretion (+: $p < 0.05$ 3h vs. 24h; *: $p < 0.05$ Schock vs. Sham)

6.3 Intravitalmikroskopische Parameter

6.3.1 Leukozytengeschwindigkeit, Sinusoidbreiten, volumetrischer Blutfluß

Die morphometrische Messung der Leukozytengeschwindigkeit zeigte 24 Stunden nach Schock keine signifikante Geschwindigkeitsabnahme in der Schock- Gruppe gegenüber der Sham-Gruppe. Hingegen waren die Sinusoidbreiten im Vergleich zur Sham-Gruppe signifikant verengt. Die Berechnung des volumetrischen Blutflusses aus diesen beiden Parametern führte zu einer signifikanten Flußabnahme in der Schock- Gruppe.

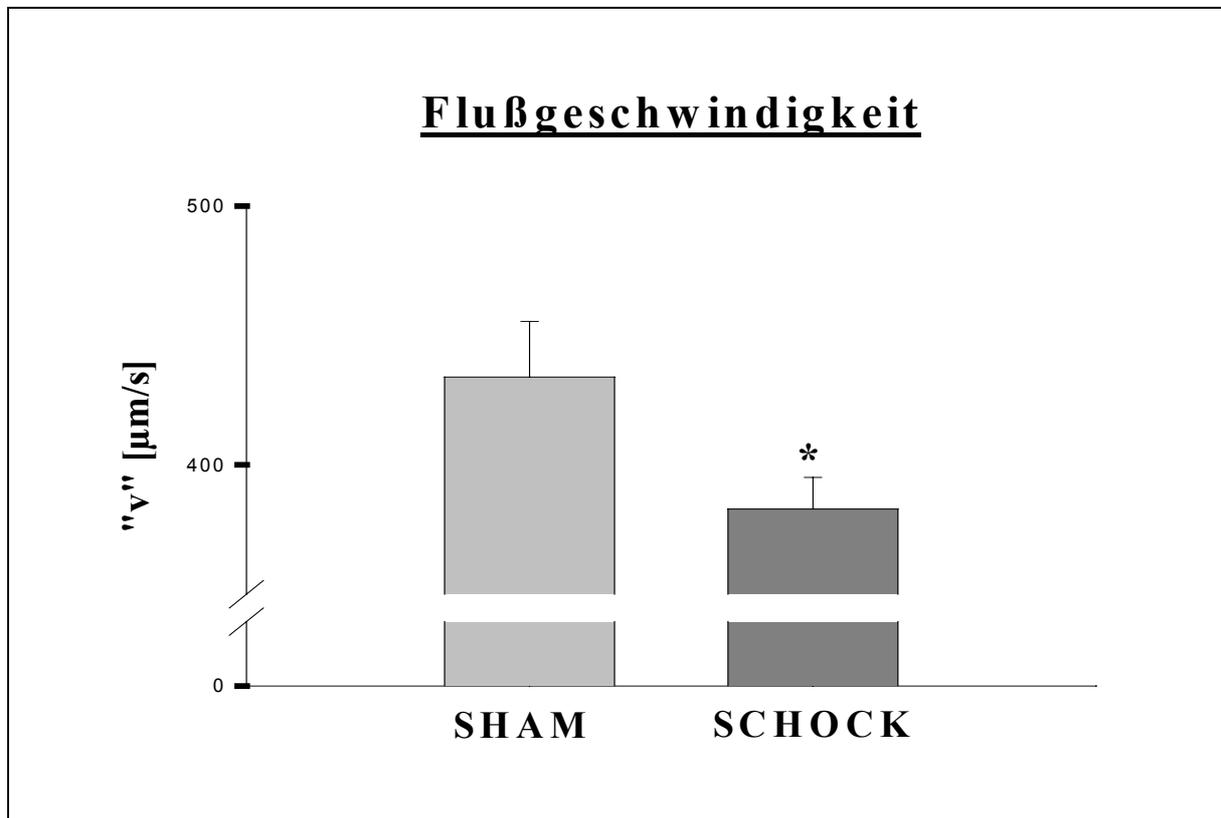


Abb. 6.9: (*: $p < 0,05$ Schock vs. Sham)

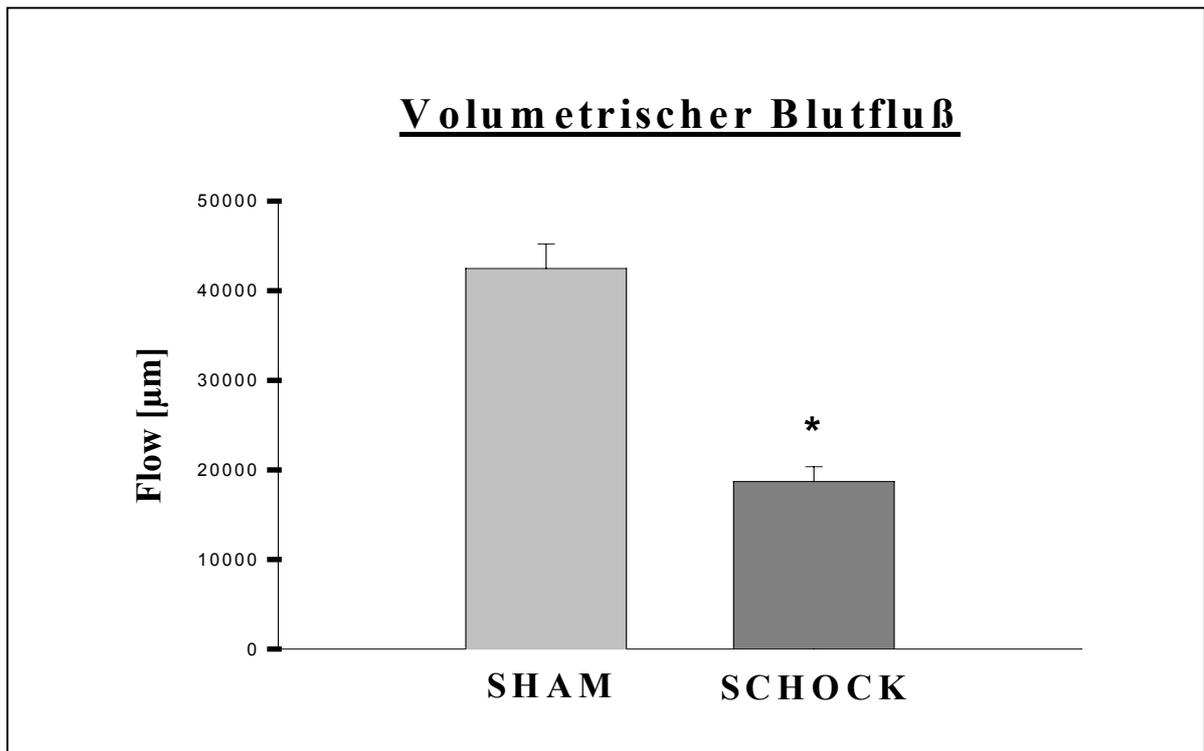


Abb. 6.10: (*: $p < 0,05$ Schock vs. Sham)

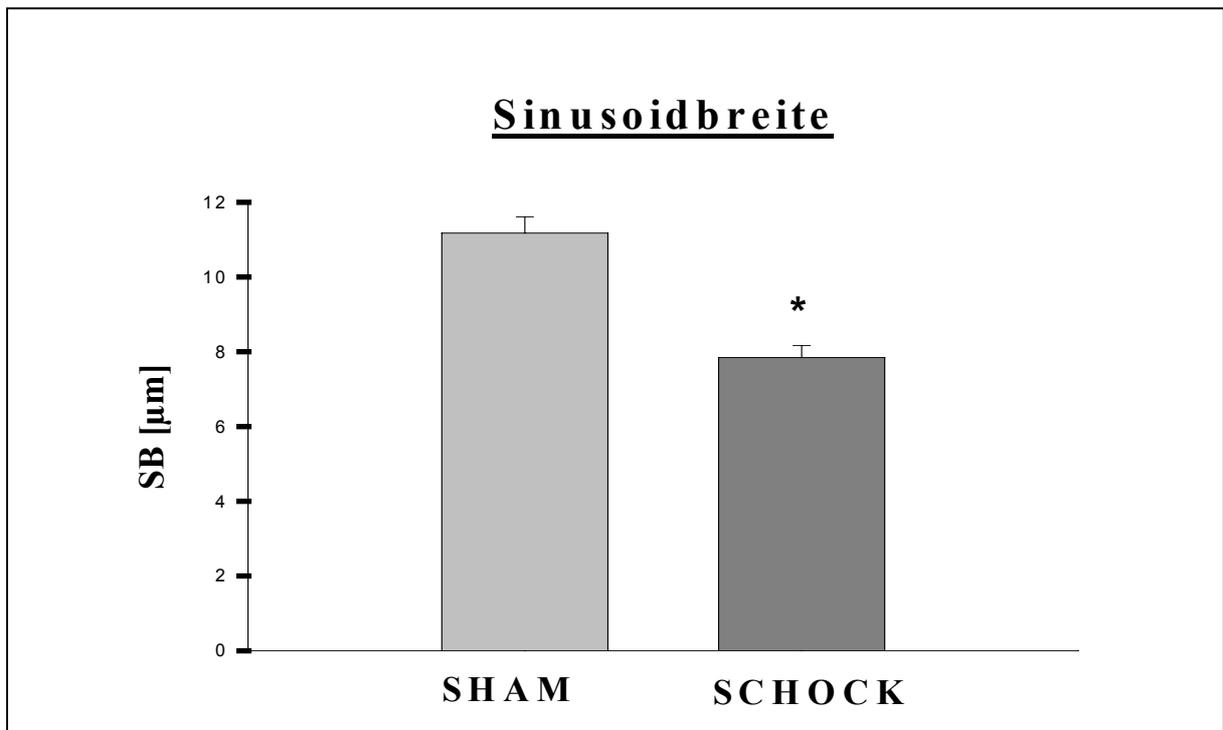


Abb. 6.11: (*: $p < 0,05$ Schock vs. Sham)

6.3.2 Leukozyten- Endothel- Interaktion

Die sequentielle intravitalmikroskopische Auswertung erlaubte die Differenzierung zwischen frei fließenden, temporär adhären (TAL, 0,2-2 Sekunden Haftung am Endothel) und dauerhaft adhären (DAL, >2 Sekunden Haftung am Endothel) Leukozyten. Es ergaben sich signifikante Unterschiede zwischen Sham und Schock-Tieren, sowie Unterschiede aufgrund der verschiedenen Auswertzeitpunkte nach induziertem Schock.

6.3.2.1 Temporär adhären Leukozyten (TAL)

Es zeigte sich eine signifikante Erhöhung der temporär adhären Leukozyten in der Ischämiegruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

In den Schockgruppen selbst konnte man 24 Stunden nach Einleitung der Reperfusion deutlich mehr TAL verzeichnen als 3 Stunden nach Schock. Die größte Fraktion temporär adhären Leukozyten fand man dabei in allen Gruppen im Midzonalfeld.

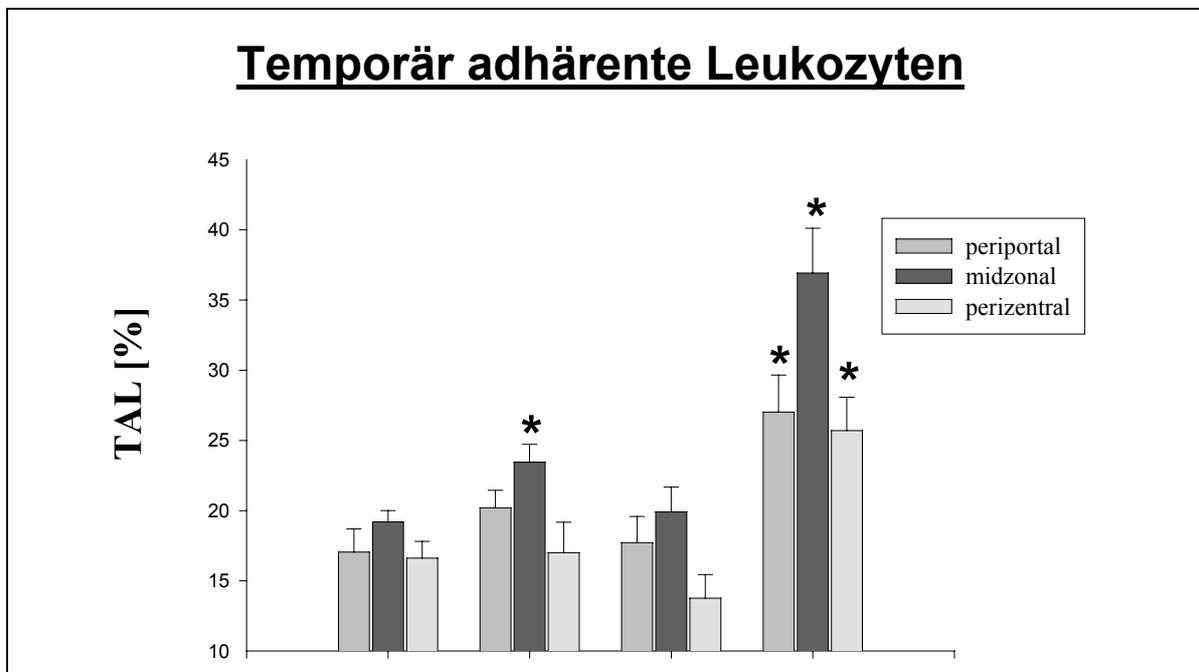


Abb. 6.12: (*: $p < 0,05$ Schock vs. Sham)

6.3.2.2 Dauerhaft adhärenente Leukozyten (DAL)

Die Auswertung der dauerhaft adhärenenten Leukozyten ergab eine deutliche postischämische Erhöhung gegenüber der Kontrollgruppe. Die sublobuläre Adhäsionsverteilung der dauerhaft adhärenenten Leukozyten stellte sich wie folgt dar:

- Kontrollgruppe: 1,0 : 1,3 : 0,9 (PP : MZ : PZ)
- 3h Schockgruppe: 1,0 : 1,4 : 0,8 (PP : MZ : PZ)
- 24h Schockgruppe: 1,0 : 1,4 : 0,9 (PP : MZ : PZ)

Somit liegt auch hier eine typische graduelle Abstufung zwischen der portalen, midzonalen und perizentralen Region vor.

Signifikante Adhärenzunterschiede zwischen 3 Stunden Schock Gruppe und 24 Stunden Schock-Gruppe lagen nicht vor.

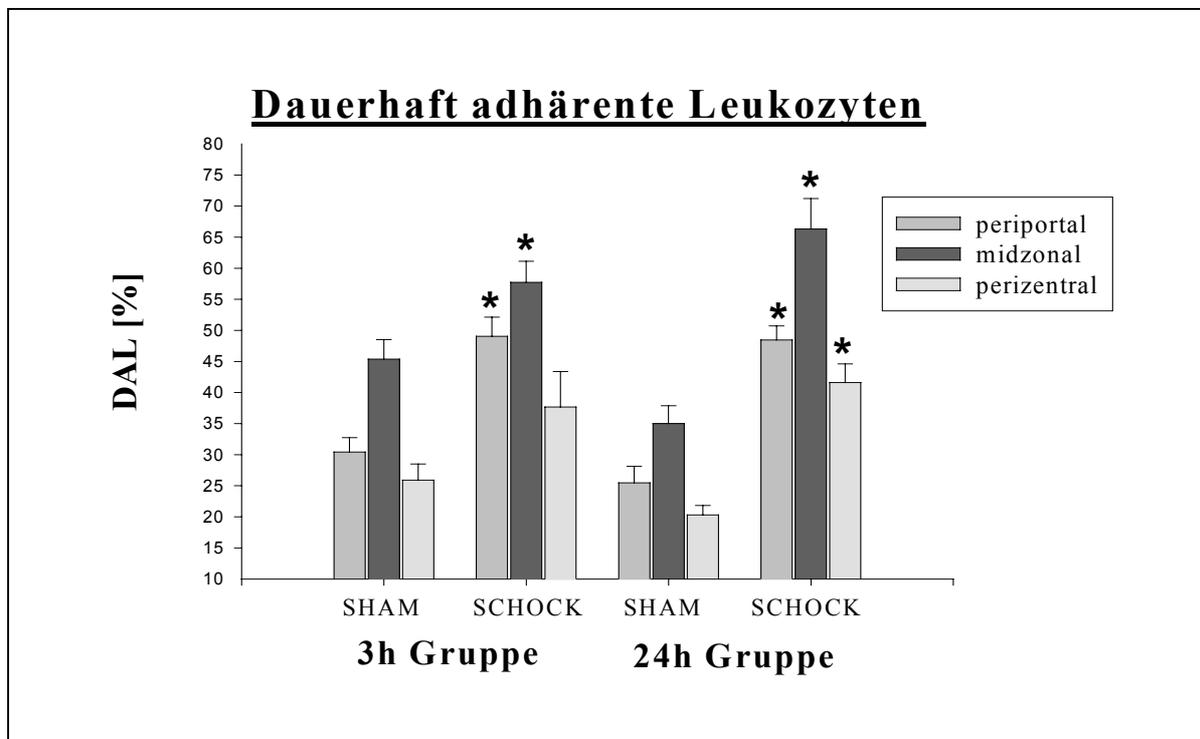


Abb. 6.13: (*: $p < 0,05$ Schock vs. Sham)

6.3.2.3 Mittlere Adhärenzzeit (MAT), Adhäsionsindex (ADI)

Die Adhäsionsdauer der TAL dient der Berechnung der mittleren Adhärenzzeit (MAT). Diese veränderte sich in der 3 Stunden Schockgruppe nur geringfügig, in der 24 Stunden Schockgruppe hingegen kam es zu signifikanten MAT Erhöhungen gegenüber der Kontrollgruppe. Ein typisches sublobuläres Verteilungsmuster konnte nicht festgestellt werden.

Der aus MAT und TAL berechnete Adhäsionsindex (ADI) zeigt eine Erhöhung in den Schockgruppen wobei ein signifikanter Unterschied nur in der 24 Stunden Gruppe zu erkennen war.

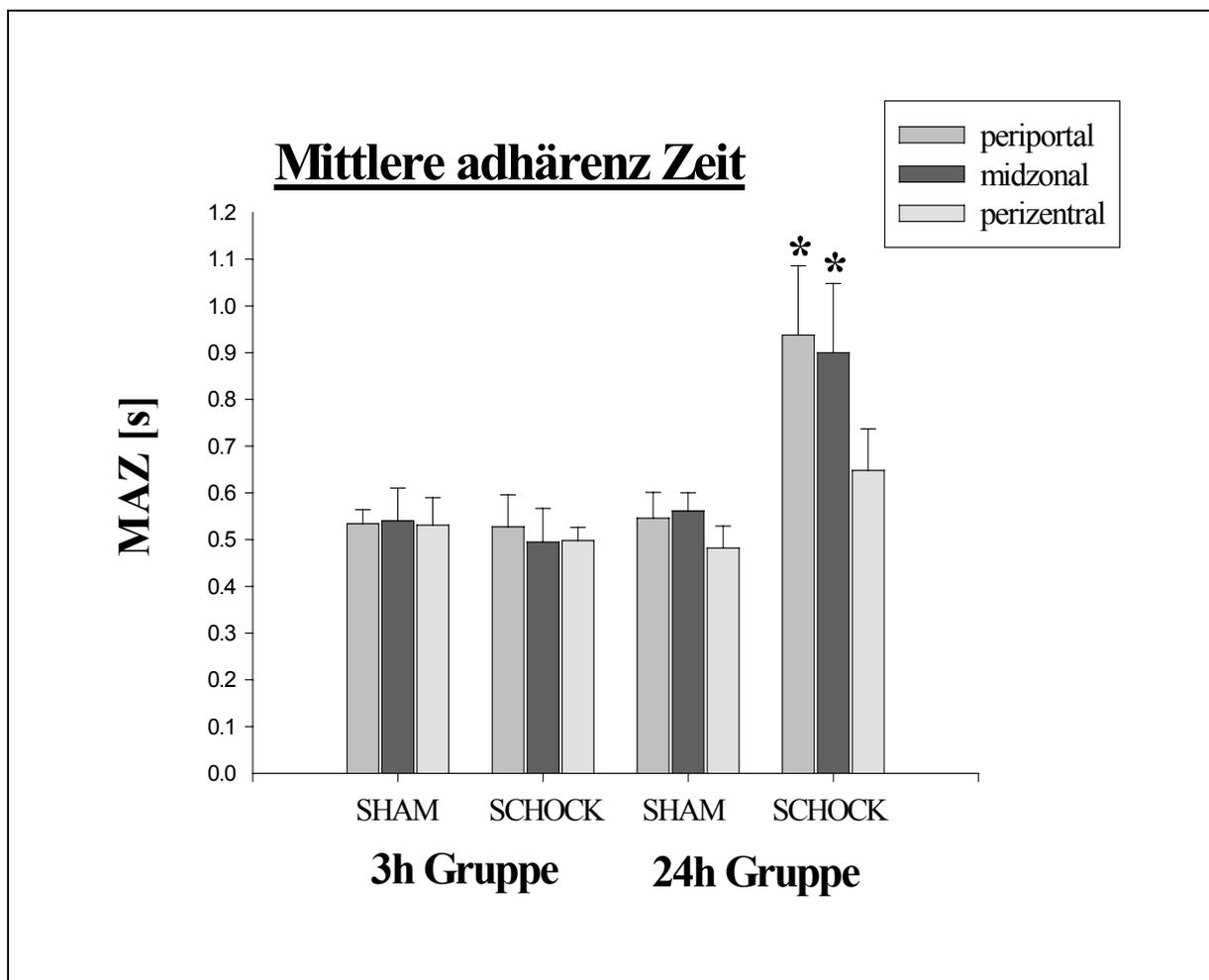


Abb. 6.14: (*: $p < 0,05$ Schock vs. Sham)

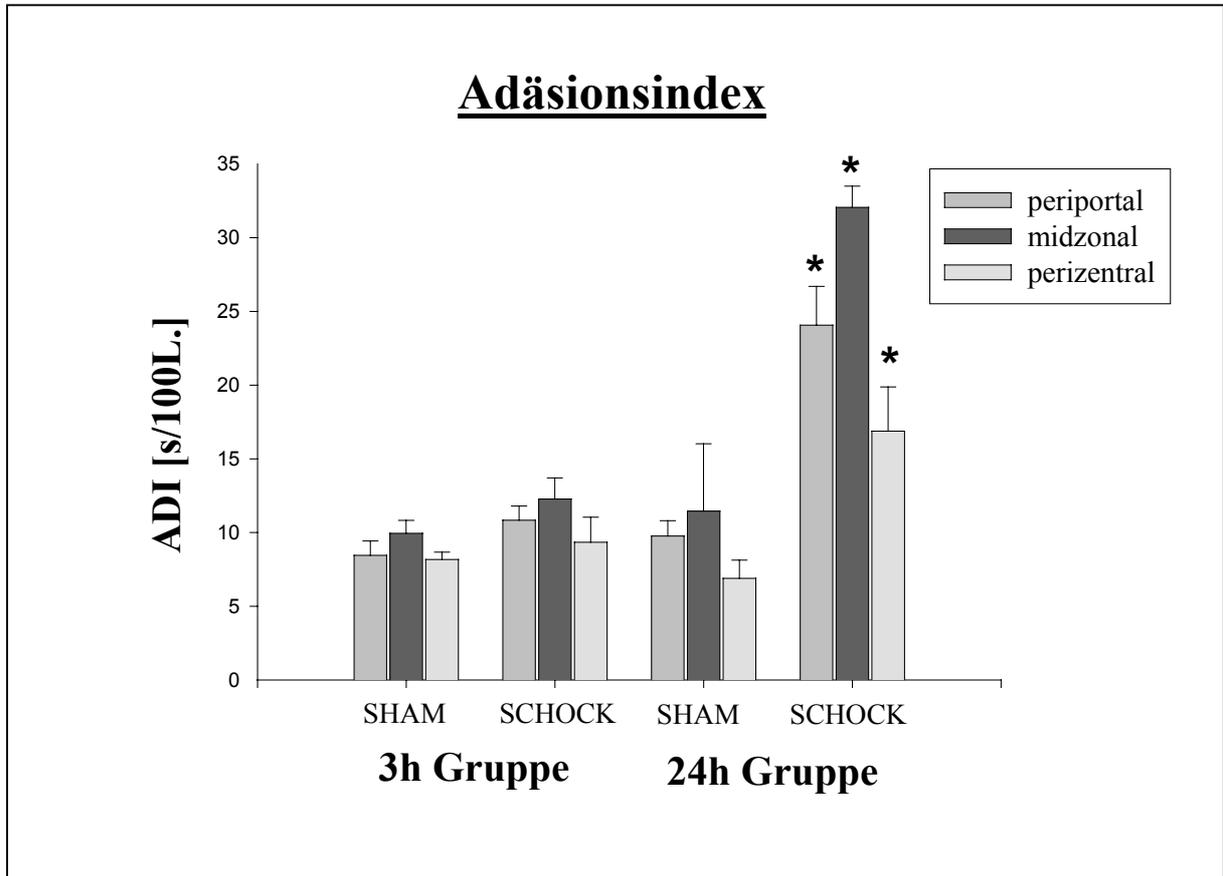


Abb. 6.15: (*: $p < 0,05$ Schock vs. Sham)

6.3.3 Makrophagenaktivität

Die intravitalmikroskopische Auswertung der Makrophagenaktivität wurde mit Hilfe von fluoreszierenden Latexpartikeln dargestellt.

Die phagozytäre Aufnahme der Latexpartikel stieg drei Stunden nach Beendigung des hämorrhagischen Schocks signifikant an. Die sublobuläre Differenzierung zeigte hierbei die größte Differenz perizentral (Schockgruppe: $12,07 \pm 0,73$; Shamgruppe: $7,6 \pm 0,63$) und periportal (Schockgruppe: $3,3 \pm 0,94$; Shamgruppe: $1,8 \pm 0,0,24$) gelegen. Im midzonalen Bereich waren keine signifikanten Unterschiede feststellbar.

Bei der Auswertung der 24 Stunden Gruppe konnte keine erhöhte Makrophagenaktivität in der Schockgruppe gemessen werden.

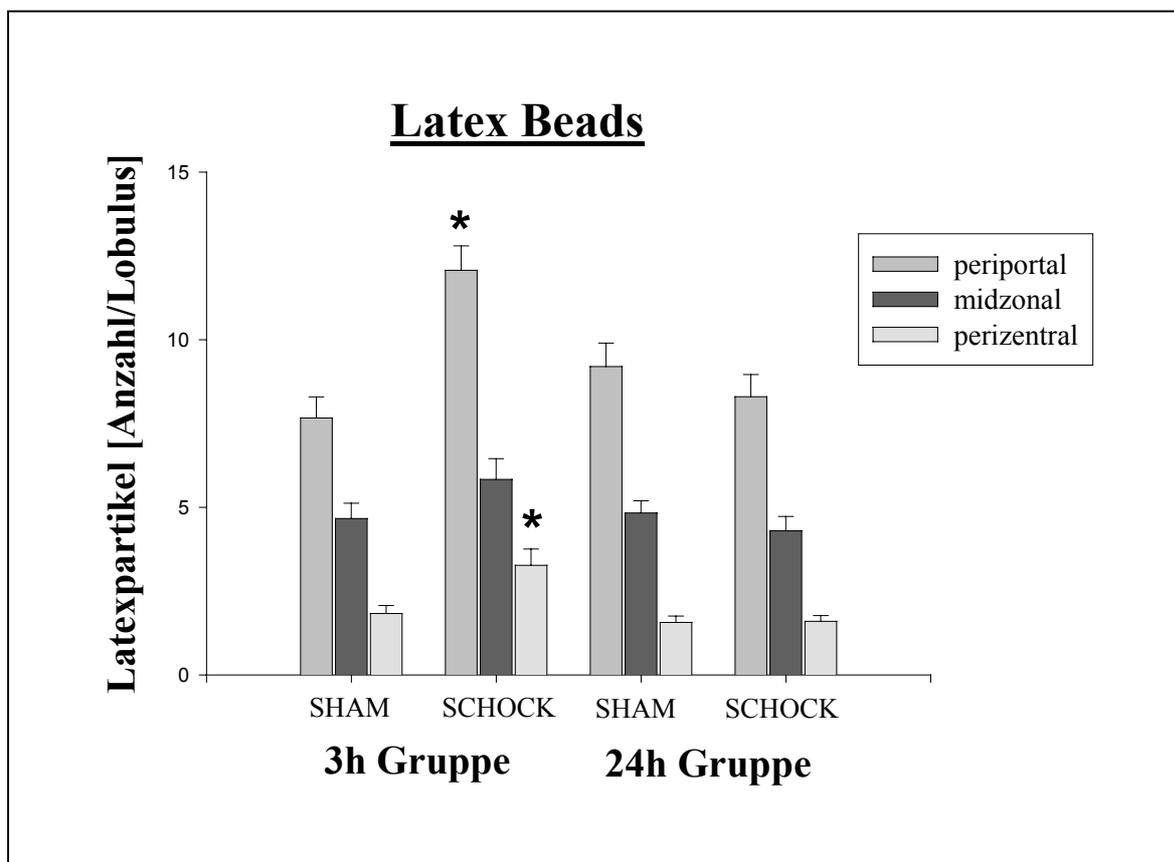


Abb. 6.16: (*: $p < 0,05$ Schock vs. Sham)

6.2.4 Gallesekretion

Die kontinuierliche Messung der Gallesekretion über den Ductus Choledochus für einen Zeitraum von einer Stunde zeigte drei Stunden nach Schockbeendigung keine signifikanten Veränderungen auf. Hingegen konnte in der 24 Stunden Gruppe eine deutliche Verminderung der Gallesekretion verzeichnet werden (Schockgruppe: $428\mu\text{l} \pm 64$; Shamgruppe: $555\mu\text{l} \pm 23$; $p=0,09$).

Ein Vergleich beider Kontrollgruppen zeigt eine signifikant vermehrte Gallesekretion in der 24 Stunden Reperfusiongruppe.

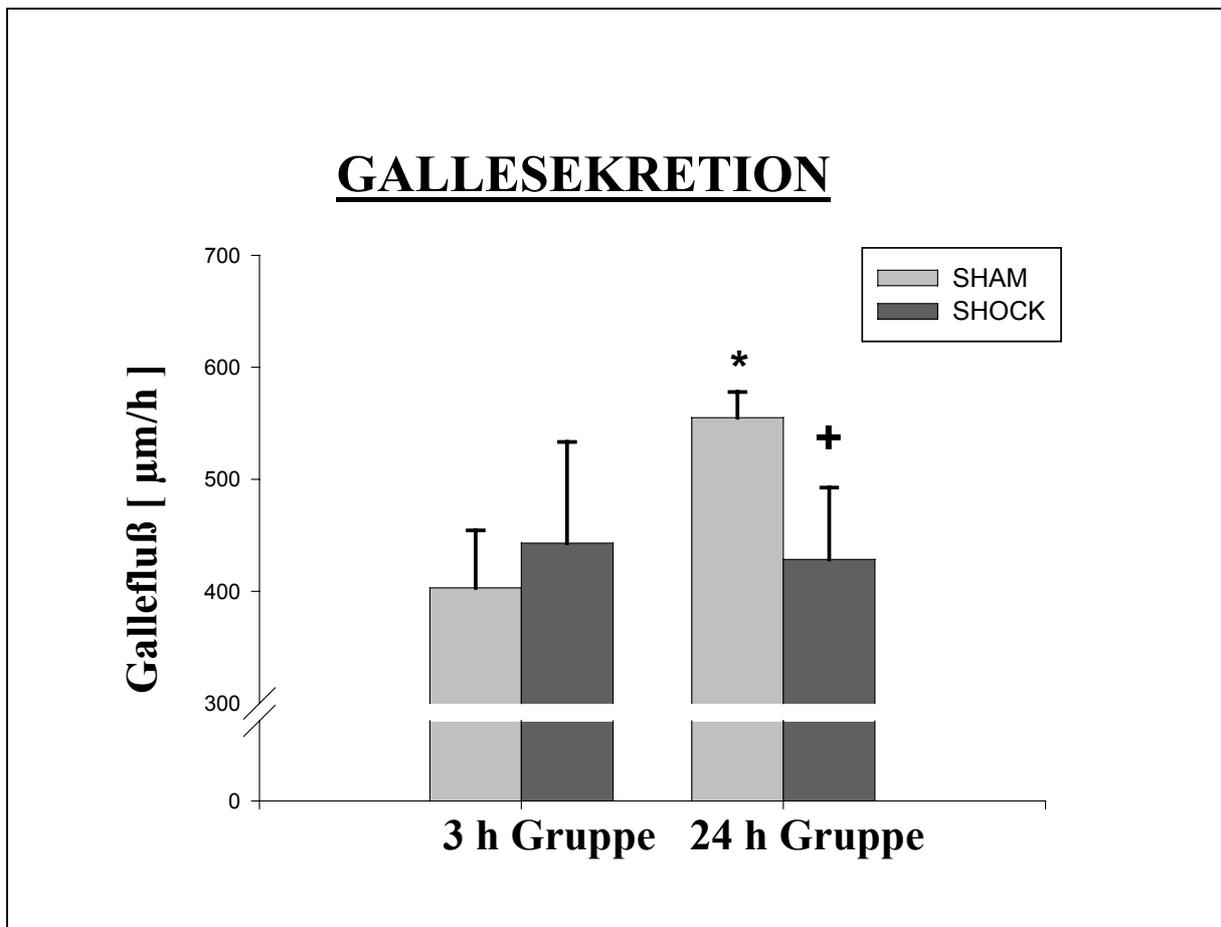


Abb. 6.17: (+: $p=0,09$ Schock vs. Sham; * $p<0,05$ 3h Gruppe vs. 24h Gruppe)

7. Diskussion

Ziel der vorgelegten Arbeit war es, die Anwendbarkeit der kontrastmittelgestützten Magnetresonanztomographie (MRT) zur nichtinvasiven Diagnostik schockinduzierter Veränderungen in der Leber zu untersuchen. Hierzu wurde die Kernspintomographie zum einen mit der bereits etablierten Methode der Intravitalmikroskopie verglichen wobei es galt, postischämische Veränderungen der Makrophagenaktivität darzustellen. Desweiteren wurden hepatobiliäre Sekretionsveränderungen untersucht und mit der quantitativen Gallesekretionsmessung über den D. Choledochus verglichen.

Um die Auswirkungen des Ischämie/Reperfusionsschadens zu verdeutlichen wurden zudem die hepatischen Mikrozirkulationsstörungen mit Hilfe der Intravitalmikroskopie untersucht. Hier stand die Bewertung der Leukozyten-Endothel-Interaktion, die Berechnung der Sinusoidweiten und des volumetrischen Blutflusses in Vordergrund.

Die Versuche wurden mit Hilfe eines tierexperimentellen, hämorrhagischen Schockmodells durchgeführt. Dazu wurde ein 90 minütiger hämorrhagischer Schock mit Blutdruckwerten von 40 ± 5 mmHg und anschließender Reperfusion in Anlehnung an das von BÜHREN modifizierte klassische WIGGERSCHE Modell induziert (Wiggers and Ingraham, 1946). Die Untersuchungen erfolgten zu frühen (3 Stunden Reperfusion) bzw. zu späten Untersuchungszeitpunkten (24 Stunden Reperfusion).

7.1 Hämodynamische Parameter und Laborwerte

Die fortlaufende Erfassung der Herzfrequenz (HF), des mittleren arteriellen Blutdrucks (MABD) sowie klinisch chemischer Parameter dienten als Referenzwerte zur Beurteilung der Gesamtschädigung des Organismus in Relation zu den intravitalmikroskopisch und kernspintomographisch gewonnenen Daten. Erst die Gewährleistung einer vergleichbaren Kreislaufsituation läßt Rückschlüsse und Interpretationen auf schockinduzierte Veränderungen zu (Marzi, Bauer, et al. 1993).

Das hier angewandte Schockmodell weist prinzipiell drei verschiedene Phasen auf: Steady State, hämorrhagischer Schock und Reperfusionsphase, in denen jeweils schocktypische Parameter beobachtet werden konnten.

Die Blutdruck- und Herzfrequenzwerte zeigten typische Veränderungen wie sie schon von anderen Studien gezeigt wurden. Der während der Schockphase auf 40 ± 5 mmHg abgesenkte MABD nahm in der Reperfusionsphase wieder Werte nahe dem Ausgangswert an. Auch bei der Herzfrequenz kam es während der Schockphase zu einem deutlichen Frequenzabfall der sich ebenfalls im Verlauf der Reperfusion wieder erholte. Untersuchungen mit Herzzeitvolumenmessungen (HZV) zeigten zudem, daß es kurzzeitig zu einer hyperdynamen Kreislaufsituation während der Reperfusionsphase kommt (Bauer *et al.*, 1995b). Als Ursache werden hier Abnahmen des Gefäßwiderstandes beschrieben.

Typische Veränderungen konnten desweiteren im Säure-Basen-Haushalt beobachtet werden. So zeigte der Base Excess Werte bis auf -13 mmol/l in den Schockgruppen. Die Abnahme der Basenkonzentration kann hierbei durch die im hypoxischen Stoffwechselgeschehen entstandenen sauren Valenzen erklärt werden. Diese werden durch Basen abgepuffert und führen somit zu einem negativen BE. Die Kompensation dieser azidotischen Stoffwechsellaage erfolgt durch Hyperventilation der Schocktiere die sich in einem Abfall des $p\text{CO}_2$ widerspiegelt. Eine Wiederherstellung der Ausgangssituation konnte in der Reperfusionsphase schon nach 90 Minuten gezeigt werden.

Die Auswertung der Laborwerte ließen die für Blutverluste typischen Abnahmen bezüglich Hämoglobin und Hämatokrit während des Schockes erkennen. So zeigten sich Hb-, sowie Hkt-Verringerungen um ca. 35% gegenüber den Ausgangswerten. Im Anschluß an die Reperfusion mit 60% des entnommenen Blutes und RL-Lösung kam es zu einem leichten Anstieg beider Parameter.

Insgesamt kam es innerhalb der Schock- bzw. Sham-Gruppen zu keinen signifikanten Abweichungen der Hämodynamischen- und Laborparameter, so daß in der vorliegenden Studie von vergleichbaren Bedingungen ausgegangen werden kann (Marzi, Bauer, et al. 1993).

7.2. Kontrastmittelgestützte MRT

In dieser Studie wurden spezifische Leberveränderungen nach hämorrhagischen Schock unter Zuhilfenahme der kontrastmittelgestützten Magnetresonanztomographie (MRI) analysiert. Zur Differenzierung fokaler Leberläsionen wie z.B. hepatozellulärem Karzinom (HCC), fokal nodulärer Hyperplasie (FNH) oder Hämangiomen wurde die MRI schon früher herangezogen. (Vogl, Hammerstingl, et al. 1995; Stark, Weissleder, et al. 1988, Clement, Muhler, et al. 1992). Sie spielt vor allem in der Diagnose benigner und maligner Veränderungen eine große klinische Bedeutung (Taupitz and Hamm, 1995). Ein großer Vorteil gegenüber anderen bildgebenden Verfahren ist dabei die gute Weichteildarstellung, der eine herausragende Bedeutung zukommt. Allerdings stößt die MRT-Untersuchung im alleinigen Einsatz bei der Erkennung kleiner Läsionen schnell an ihre Grenzen, so daß diese dem Nachweis entgehen können. Durch Verwendung leberspezifischer Kontrastmittel kann hier eine Verbesserung der Detektion kleiner Leberläsionen durch eine Steigerung des Kontrastes erzielt werden.

In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen des Ischämie/Reperfusionsschadens auf Hepatozyten und Makrophagen untersucht. Besonderes Augenmerk galt hierbei der hepatobiliären Sekretion und der Veränderung der Makrophagenaktivität nach hämorrhagischem Schock.

Aufgrund dessen kamen zwei verschiedene Kontrastmittel zum Einsatz:

Zum einen wurde das für das retikuloendotheliale System spezifische ENDOREM angewandt. ENDOREM zählt zu den superparamagnetischen Substanzen und bewirkt eine Veränderung bevorzugt der T2-Relaxationszeit. Die Partikelgröße von 150nm (\pm 30nm) Durchmesser ermöglicht hierbei die selektive Aufnahme in Zellen des retikuloendothelialen Systems. Dies läßt eine spezifische Visualisierung der Makrophagenaktivität der Leber vermuten (Saini *et al.*, 1987c). Aufgrund dieser Tatsache wurde ENDOREM für diese Versuchsreihe ausgewählt. Die Kontrastmittelgabe erfolgte in der von mehreren Autoren verwendeten Dosierung von 0,075 ml/kg KG (entspricht 15 μ mol/kg KG) (DURUX, 1995; Vogl *et al.*, 1995; LANIADO, 1995).

Die Analyse der hepatobiliären Sekretion wurde mit Hilfe von Gd-EOB-DTPA als Kontrastmittel durchgeführt. Studien von SCHUHMANN *et al.* und BREMER *et al.* zeigten, daß nach i.v. Gabe 63-80% des KM durch das Anionen-Transportersystem der Hepatozyten aufge-

nommen und über die Galle mittels der Glutathion-S-Transferase wieder ausgeschieden (Schuhmann *et al.*, 1992; Bremer *et al.*, 1995). Der restliche Anteil wird glomerulär abfiltriert (Muhler *et al.*, 1992). Dies läßt Grund zur Vermutung, postischämische Hepatozytenveränderungen bzgl. der Gallesekretion mittels MRI erfassen zu können. Gd-EOB-DTPA wurde dabei in einer Konzentration von 200 µmol/kg KG i.v. verabreicht. Vorklinische Dosierungen wurden in früheren Studien in Dosen zwischen 50-250µmol/kgKG verabreicht, wobei die mittlere letale Dosis für Ratten bei 10mmol/kgKG liegt (Bremer, Spiegel, et al. 1995; Schuhmann, Schmitt, et al. 1992) . Um optimale Ergebnisse zu erzielen wurde vor Versuchsbeginn eine Dosisstestung durchgeführt.

7.2.1 Hepatobiliäre Sekretion

Die Auswertung der drei Stunden Gruppe zeigte nach Gd-EOB-DTPA Gabe keine signifikanten postischämische Veränderungen der Gallesekretion im Vergleich zur Kontrollgruppe. Im Gegensatz dazu wurde in der 24 Stunden Gruppe postischämisch eine signifikant verminderte Zunahme der Signalintensität gegenüber der Shamgruppe festgestellt. Dies läßt Grund zu der Annahme, daß eine Beeinflussung der hepatozytären Funktion erst nach einer Latenzzeit entsteht. Gestärkt wird diese Annahme dadurch, daß auch die quantitative Messung der Galleausscheidung über den D. Choledochus erst in der 24 Stunden Gruppe eine Verminderung ($p=0,09$) der Sekretion in der Schockgruppe zeigte. Hierbei kann eine späte Schädigung hepatozytärer Zellstrukturen mit Nekrosen und damit eine Funktionsverminderung als Erklärung in Erwägung gezogen werden.

Eine von BREMER et al. durchgeführte kernspintomographische Studie mit Gd-EOB-DTPA, 45- minütigem cross-clamped Schock (Okklusion der A. hepatica, V. portae und D. hepaticus) und 90- minütiger Reperfusionphase zeigte postischämisch eine signifikante Reduktion der Signalintensität. Es wurde hierbei angenommen, daß es durch eine Verringerung der intra-

zellulären ATP Konzentration während der Ischämiephase zu einer frühzeitigen Funktionsbeeinträchtigung der ATP-abhängigen Glutathion-S-Transferase kommt. Da diese für die Sekretion von u.a. Gd-EOB-DTPA wahrscheinlich zuständig ist, hätte der ATP Mangel eine Verminderung der hepatobiliären Sekretion zur Folge (Bremer *et al.*, 1995).

Zudem kann es im Rahmen eines hämorrhagischen Schocks durch Zellödeme, hepatozelluläre Nekrose und durch die Infiltration neutrophiler Granulozyten zu einer starken Beeinträchtigung der Lebermikrozirkulation kommen und dies zu einer insgesamt verminderten Gd-EOB-DTPA-Aufnahme führen. Auch hier wäre eine verminderte Darstellbarkeit des Kontrastmittels in den Gallengängen die Folge.

Diese frühen Auswirkungen auf die Gd-EOB-DTPA Aufnahme bzw. Ausscheidung durch die Hepatozyten sind in der vorliegenden Studie drei Stunden nach Reperfusionbeginn noch nicht festzustellen, allerdings zeigte sich eine signifikante Abnahme der Gd-EOB-DTPA Sekretion nach 24-stündiger Reperfusionsphase in der Schockgruppe gegenüber der Kontrollgruppe.

Desweiteren konnte insgesamt eine signifikant verminderte Gd-EOB-DTPA Ausscheidung in der 3 Stunden Gruppe gegenüber der 24 Stunden Gruppe gezeigt werden.

Eine mögliche Erklärung der unterschiedlichen Ergebnisse gegenüber BREMER *et al.* besteht darin, daß eine warme Ischämie mittels Cross-Clamp-Technik zu einer stärker Ausprägung der Hypoxie als bei dem hier durchgeführten Schockmodell führt. Dadurch könnte die Auswirkungen auf die Glutathion-S-Transferase wesentlich ausgeprägter sein.

Wie schon in früheren Studien dargelegt wurde, führt eine Freisetzung multipler proinflammatorischer Mediatoren (Sauerstoffradikale, Zytokine, Arachidonsäurederivate) aus Makrophagen zu einer Funktionsveränderung der Hepatozyten. Dies kann ebenfalls die Ursache einer späteren Verminderung der Gallesekretion sein.

Insgesamt läßt sich eine Übereinstimmung in den Untersuchungsergebnissen der hepatobiliären Sekretion zwischen indirekter Kernspintomographie und direkter, quantitativer Gallemesung über den D. Choledochus feststellen. Die kontrastmittelunterstützte MRI scheint hierbei überlegen zu sein.

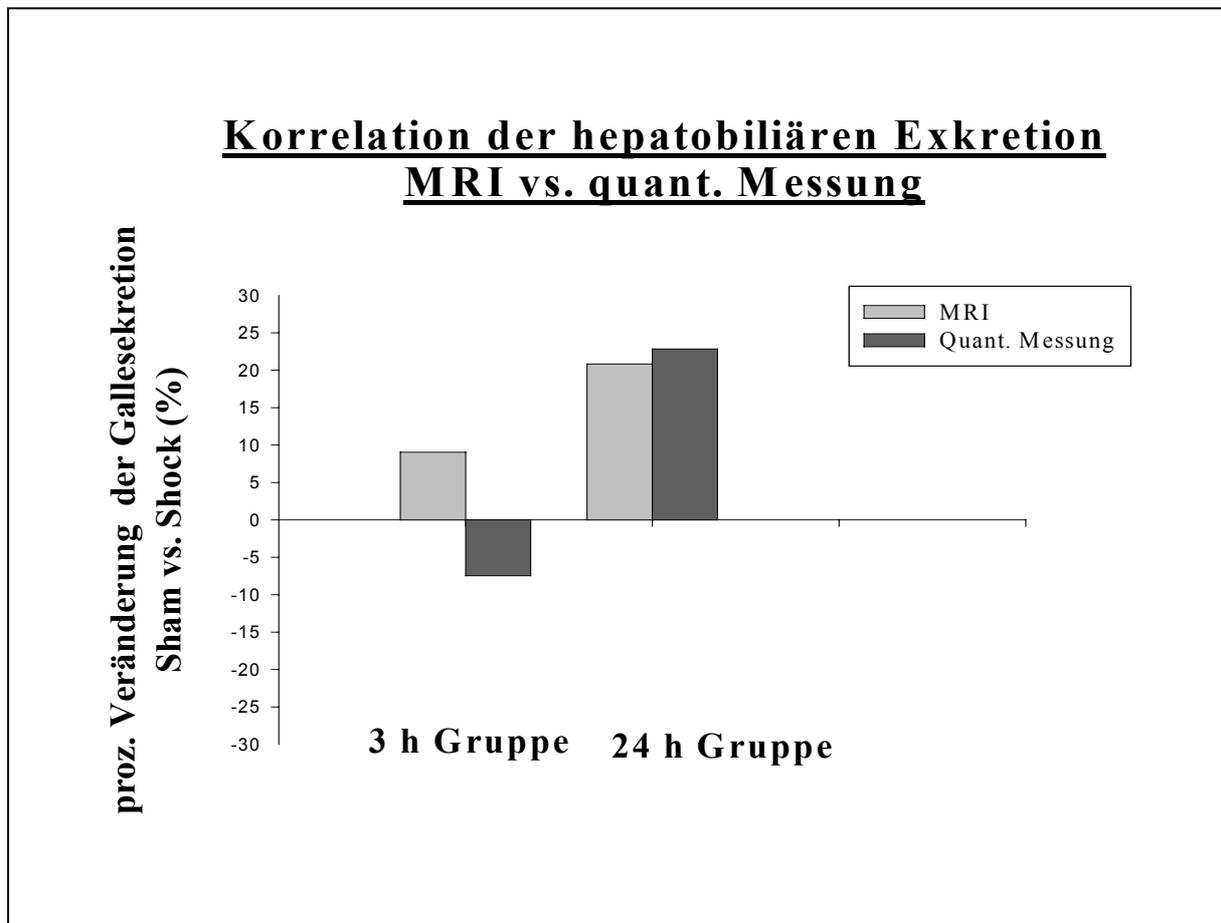


Abb 7.1

Vorteile bietet die kernspintomographische Untersuchung der Hepatozytenfunktion gegenüber der invasiven Methode der quantitativen Gallemessung durch:

- Geringere Invasivität
- Reproduzierbarkeit
- Verlaufskontrollen durchführbar
- Geringere Fehlerbehaftung (z.B.: Katheterperforation durch den D. Choledochus)
- Optimierung der Kontrastmittel und der Tomographen und damit einer noch exakteren Darstellung der Gallengänge.

7.2.2 Makrophagenaktivität nach Ischämie/Reperfusion

Die kernspintomographische Untersuchung der Makrophagenaktivität mittels ENDOREM zeigte weder drei, noch 24 Stunden nach Reperfusionbeginn signifikante Unterschiede bezüglich einer Veränderung der Signalintensität bzw. der T2-Relaxationszeit.

Im Gegensatz dazu steht die Auswertung der i.v. verabreichten Latexpartikel. Hier ist drei Stunden nach Reperfusionbeginn periportal und perizentral eine signifikant erhöhte Aufnahme von Latex-Beads in Makrophagen zu erkennen, während in der 24 Stunden Gruppe die Auswertung keine signifikanten Unterschiede zwischen Sham- und Schockgruppe vorliegen. Wie schon von anderen Studien beschrieben (Hower *et al.*, 1990), scheint dies auf eine frühe Aktivierung der Makrophagen nach einer ischämischen Periode hinzuweisen, die kernspintomographisch jedoch nicht dargestellt werden konnte.

Hingegen zeigten Studien von BREMER *et al.* mit 45 minütigem Cross-Clamped Shock (Pringle Manöver) eine signifikant geringere Reduktion der Signalintensität nach 90 minütiger Reperusionsphase in der Schockgruppe nach Gabe von ENDOREM. Als Erklärung wurde hier zum einen, eine durch Mikrozirkulationsstörung verminderte Aufnahmefähigkeit der Kupffer Zellen angeführt. Diese postischämischen Veränderungen der Mikrozirkulation konnten auch in der vorliegenden Studie durch eine signifikante Reduktion der Sinusoidweiten, sowie eine signifikante Abnahme des volumetrischen Blutflusses mittels Intravitalmikroskopie festgestellt werden.

Weiterhin wird die verstärkte postischämische Freisetzung von toxischen Mediatoren und Sauerstoffradikalen als Hindernis der FeO-Aufnahme über die Zellmembran angesehen (Bremer, Spiegel, *et al.* 1995).

Die intravitalmikroskopische Auswertung der Makrophagenaktivität zeigte 3 Stunden postischämisch im Vergleich zur Shamgruppe eine signifikant vermehrte Aufnahme von Latexpartikeln. Desweiteren konnte ein typisches Verteilungsmuster mit einem Maximum der Latexpartikel im Periportalbereich gezeigt werden. Hier kommt es zu einer signifikant höheren Phagozytose gegenüber dem Perizentralbereich. Dies beweist jedoch nicht unbedingt eine höhere Aktivität in dieser Region. Wie von POST *et al.* dargestellt kommt es periportal durch einen sogenannten first-pass Effekt zu einer raschen Phagozytose. Die führt zu einem steil

abfallenden Gradienten von frei fließenden Latex Beads entlang der Sinusoide und somit zu einer Verringerung der aufnehmbaren Teilchen midzonal und perizentral (Post *et al.*, 1992b).

Insgesamt konnten Veränderungen der Makrophagenaktivierung sowie sublobulären Verteilungsmuster mit diesem Modell der Kernspintomographie nicht dargestellt werden.

Optimierungen könnte man hierbei durch die Entwicklung neuer Eisenoxidpartikel erhalten. Dadurch könnten eine bessere dosisabhängige SI-Beeinflussung erzielt und in den Darstellungen reproduziert werden. Weiterhin bieten Optimierungen der Untersuchungssequenzen eine Reduzierung von Bewegungsartefakte und somit eine bessere Darstellungen.

Eine nachteilige Beeinträchtigung der kernspintomographischen Untersuchung lag zudem in der Untersuchungsdauer. Obschon die Tiere zum Schutz zum Wärmeschutz mit Baumwolltüchern bedeckt wurden, ließ sich eine Auskühlung im Verlauf der Untersuchung nicht vermeiden. Auch dies könnte zu Ergebnisverfälschungen gegenüber anderen Untersuchungsmethoden führen.

Spezielle kernspintomographische Untersuchungen zur Detektion postischämischer Mikrozyklationsstörungen, wurden in dieser Studie nicht durchgeführt. Jedoch zeigte sich, daß nach Gabe von Endorem alle Bereiche der Leber eine homogene Kontrastmittelanreicherungen aufwiesen. Kontrastmittelaussparungen die auf makroskopisch erkennbare Zirkulationsveränderungen hindeuten hätten können, stellten sich nicht dar. Um Untersuchungen dieser Art durchzuführen, müßten zudem andere Untersuchungssequenzen sowie ggf. weitere Kontrastmittel zum Einsatz kommen. Problematisch ist hierbei jedoch die Darstellung von Mikrozyklationsstörungen wie sie mit der Intravitalmikroskopie beobachtet werden können. In der vorliegenden Studie konnten dabei mit Hilfe der IVM postischämisch eine signifikante Abnahmen des volumetrischen Blutflusses, sowie eine signifikante Verminderung der Sinusoidbreite gegenüber den Kontrolltieren festgestellt werden. Durch das eingeschränkte Auflösungsvermögen der Kernspintomographie die bei dem verwendeten Tomographen bei theoretisch 0,1 mm lag, sind solche Untersuchungen auf sublobulärer Ebene zur Zeit noch nicht

durchführbar. Zudem wird das theoretische Auflösungsvermögen durch Bewegungsartefakte (Atmung, Blutflußpulsationen) weiter verringert.

In der vorliegenden Studie wurden keine speziellen kernspintomographischen Untersuchungen zur Darstellung von Leberzellnekrosen durchgeführt. Da es durch Veränderungen der Lebermikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock wie Perfusionsstörungen, Leukozytenadhäsion und Makrophagenaktivierung zu substantziellen hepatischen Schäden kommt, die je nach Ausmaß das Überleben limitieren, wäre ein solcher Ansatz sicher interessant. Als schockbedingte Leberzellschädigung ist dabei die perizentrale Hepatozytennekrose bekannt, die sich histologisch nach protrahiertem Schock darstellen läßt (Dinges, 1993).

7.3 Intravitalmikroskopische Untersuchung

Die Intravitalmikroskopie ist eine seit vielen Jahren etablierte Methode um Leberveränderungen darzustellen. Besonders geprägt wurde sie durch die Arbeiten von McCUSKEY der dieses Untersuchungsmodell schon 1979 beschrieb. Untersuchungen der Lebermikrozirkulation, Makrophagen- und Hepatozytenaktivität und weiterer Parameter wurden zudem in modifizierten Studien von CLEMENS et al., MARZI et al. und MENGER et al. in Anlehnung an in-vitro Studien systematisch durchgeführt. Sie lieferten wichtige Ergebnisse für die Auswirkungen verschiedener Transplantations- und Schockmodellen in Bezug auf die Leber. Hierbei konnte besonders die Bedeutung verschiedener Mediatoren wie Interleukine (Bauer *et al.*, 1994b), Sauerstoffradikale (Menger *et al.*, 1991a) oder TNF- α (Marzi *et al.*, 1995) am Schockgeschehen gezeigt werden. Zudem ermöglicht die Intravitalmikroskopie die Untersuchung der hepatischen Mikroarchitektur (Marzi *et al.*, 1990a) und des Zusammenspiels der verschiedenen Zellpopulationen untereinander (Post *et al.*, 1992a).

7.3.1 Mikrozirkulationsveränderungen

7.3.1.1 Leukozyten Endothel Interaktion

Zur Verdeutlichung der postischämischen Mikrozirkulationsveränderung wurden in der vorliegenden Studie zusätzlich intravitalmikroskopische Untersuchungen durchgeführt. Hierbei wurde besonderes Augenmerk auf Leukozyten-Endothel-Interaktionen und Leberperfusionsveränderungen gelegt.

NOLTE et al. zeigten, daß Wechselwirkungen zwischen Leukozyten und Endothelzellen auch im intakten Organismus vorzufinden sind (Nolte *et al.*, 1992). Im Rahmen eines Ischämie/Reperfusion-Schadens kommt es jedoch im Körper zu einer Verstärkung dieser Interaktionen. Intravitalmikroskopische Studien zu diese Thematik wurden insbesondere von

SCHMID-SCHÖNBEIN, MARZI et al. und MENGER et al. durchgeführt (Menger *et al.*, 1991b; Schmid-Schönbein *et al.*, 1991). Sie zeigen, daß es im Zuge einer inflammatorischen Reaktion zu einer vermehrten Freisetzung verschiedener Mediatoren (IL, TNF α , Leukotriene) kommt. Dies führt zu einer Aktivierung von Leukozyten- und Endothelzellen mit anschließender Expression von Adhäsionsmolekülen (Carlos and Harlan, 1994). Es folgt ein primär „lockerer“ Kontakt zwischen Endothel und Leukozyten der später in einen festen Kontakt übergeht. Am Ende steht die Migration der Leukozyten ins Gewebe (von Andrian *et al.*, 1991).

Intravitalmikroskopisch können bei der Haftung der Leukozyten am Endothel grundsätzlich frei fließende, „rollende“, temporär Adhärente (<20 sec. Haftung) und dauerhaft adhärenten Leukozyten (>20 sec. Haftung) voneinander unterscheiden werden (Marzi *et al.*, 1990b).

In der vorliegenden Studie konnten die schon von anderen Untersuchungsgruppen beschriebenen Veränderungen nach hämorrhagischem Schock festgestellt werden (Marzi *et al.*, 1993). So kam es im Verlauf der postischämischen Phase zu einer progredienten Steigerung der Wechselwirkung zwischen Leukozyten und Endothel. Dabei zeigte die Auswertung der temporär adhärenten Leukozyten (TAL) drei Stunden postischämisch eine signifikante Leukozytenanhäufung im midzonalen Bereich, wohingegen nach 24 Stunden eine signifikante Erhöhung der TAL in allen drei Subregionen erkennbar ist. Zudem konnte gezeigt werden, daß in der 24 Stunden Gruppe signifikant mehr TAL nach Schockinduktion vorhanden sind als 3 Stunden nach Schock. Dies läßt Grund zur Annahme, daß es mit zunehmender Reperfusionsdauer zu einer verstärkten Expression von Adhäsionsmolekülen kommt.

Desweiteren kommt es im Rahmen des hämorrhagischen Schocks durch eingeschwemmte Stoffe (Bakterien, LPS u.a.) zu einer frühen Aktivierung der Makrophagen die auch in dieser Studie gezeigt werden konnte. Dies führt zu einer Freisetzung weiterer proinflammatorischer Mediatoren (v.a. TNF α und IL-1) und einer zeitlich verzögerten Steigerung der Leukozytenadhärenz am Endothel. Untersuchungen zur temporären Adhärenz bzw. zum „rolling“ entlang des Endothels zeigen einen besonderen Einfluß der Selektine auf diese Phase der Leukozytenadhärenz (Carlos and Harlan, 1994). Da P-Selektine noch nicht in Lebersinusoiden nachgewiesen werden konnten und die Expression von E-Selektinen ein Maximum nach 6-12 Stunden erreicht, kann so die erst nach 24 Stunden erhöhte TAL erklärt werden. Das

besonders in postsinusoidalen Venolen beobachtete „slow rolling“ der Leukozyten konnte in den Sinusoiden nicht festgestellt werden (Ley *et al.*, 1995).

Die Untersuchung der dauerhaft adhärenenten Leukozyten (DAL) zeigte drei Stunden sowie 24 Stunden postischämisch einen signifikanten Anstieg gegenüber den Kontrolltieren, wobei jedoch keine Unterschiede innerhalb der Schockgruppen selbst beobachtet werden konnten. DAL stellen die irreversible Form der Leukozytenadhärenz dar und werden besonders durch ICAM-1 (an Endothelzellen) und CD11b/CD18 (an Leukozyten) vermittelt. (Menger and Vollmar, 1996; Steinhoff *et al.*, 1993b). Sie sind der Ausgangspunkt für die transendotheliale Migration der Leukozyten ins Gewebe (Jutila, 1992; Carlos and Harlan, 1994).

Im engen Zusammenhang hierzu stehen die Veränderungen der mittleren Adhärenzzeit. Diese zeigt nur in der 24 Stunden Gruppe eine signifikante Erhöhung. Betrachtet man sich die sublobuläre Verteilung, so fällt auf, daß nur im periportalen und midzonalen Bereich Veränderungen vorhanden sind.

7.3.1.2 Leberperfusion

Neben der Interaktion zwischen Leukozyten und Endothelzellen fanden sich Veränderungen der Sinusoidbreiten und des Leukozytenflusses in den Lebersinusoiden. Die mikrohämodynamischen Untersuchungen der 24 Stunden Gruppe zeigten dabei eine signifikante Reduktion der Sinusoidbreite nach Schock um 30% gegenüber der Sham Gruppe. Ursächlich hierfür kann zum einen die Ausschüttung vasoaktiver Substanzen mit reaktiver Sinusoidkontraktion sein (Wake *et al.*, 1993). Als Mediatoren fungieren hierbei z. B. Endothelin-1, cholinerge, adrenerge oder aminerge Substanzen (McCuskey and Reilly, 1993). Besonders Endothelin-1 führt dabei zu einer Kontraktion von intermediären Filamenten der ITO Zellen. Diese umspannen die Endothelzellen und führen somit zu einer Sinusoidverengung (Zhang *et al.*, 1994). Zum anderen wird eine Schwellung von Parenchymzellen oder Endothelzellen für die Verengung der Sinusoide verantwortlich gemacht (Leaf, 1973). Die Ursache ist hierbei ein in der hypoxischen Phase entstehender intrazellulärer Mangel an ATP, durch den es zu einer Einschränkung der Na⁺/K⁺-Pumpe kommt. Dies führt zu einem verstärkten Eintritt von Wasser in

die Zellen was letztendlich mit einem Anschwellen verbunden ist (Corso *et al.*, 1998). Zu den physiologischen Gegenspieler dieser Reaktionen zählt u. a. Stickstoffmonoxid (NO, „Endothelial derived relaxing factor“, EDRF) über das es zu einer Vasodilatation bzw. zu einer Verminderung der Kontraktion und somit auch der Einengung der Sinusoidlumen kommt (Bauer *et al.*, 1995c).

Die signifikant verminderte Leukozytengeschwindigkeit läßt sich zum einen durch eine postischämisch verstärkte Interaktion mit Endothelzellen wie sie oben gezeigt wurde, erklären (Jutila, 1992). Ebenso spielt die Zellgröße (\varnothing : 13 μ m) sowie die schlechte Verformbarkeit der Leukozyten eine wichtige rheologische Rolle bei der Minimierung der Geschwindigkeit (Vollmar *et al.*, 1993).

Da beide Parameter, Sinusoidbreite und Leukozytengeschwindigkeit in die Berechnung des volumetrischen Blutflusses eingehen kommt es somit auch hier zu einer signifikanten Verringerung nach induziertem Schock. Die erhaltenen Ergebnisse kamen zu einer Übereinstimmung mit Studien von KOO *et al.* und VOLLMAR *et al.* (Koo and Liang, 1977; Vollmar *et al.*, 1996b).

Mit Hilfe der Intravitalmikroskopie kann somit ein direkter Zusammenhang zwischen hämorrhagischem Schock und Mikrozirkulationsveränderungen bestätigt werden.

7.4 Schlußfolgerung

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen, daß eine Beurteilung der funktionellen Leberveränderungen nach hämorrhagischem Schock mit Hilfe der Kernspintomographie möglich ist. Die erhaltenen Daten sind dabei mit den durch invasive Meßverfahren wie z.B. der Intravitalmikroskopie oder der quantitativen Gallesekretionmessung über den D. Choledochus erhaltenen Ergebnissen vergleichbar. Durch den Einsatz spezieller Kontrastmittel zur Signalverstärkung und spezifischen Funktionsanalysen können die Untersuchungen zusätzlich erweitert und präzisiert werden.

Ein Vorteil gegenüber den invasiven Untersuchungsmethoden besteht vor allem in der Möglichkeit mehrtägige Verlaufskontrollen durchführen zu können. Ein Nachteil liegt in der begrenzten räumlichen Auflösung der MRT. So können im Gegensatz zur Intravitalmikroskopie keine sublobulären Veränderungen dargestellt werden.

Durch weitere Verbesserung der verwendeten Spulen und Untersuchungssequenzen könnte jedoch eine bessere morphologische Differenzierung möglich werden. Ebenso besteht die Möglichkeit, kontrastmittelgestützte Blutflußuntersuchungen an der Leber durchzuführen.

8. References

1. (1984) National Institute of Health Consensus Development Conference. *Hepatology* 4: 107S-110S.
2. Adams, D. H., Mainolfi, E., Elias, E., Neuberger, J. M., and Rothlein, R. (1993) Detection of circulating intercellular adhesion molecule-1 after liver transplantation - evidence of local release within the liver during graft rejection. *Transplantation* 55: 83-87.
3. Athlin, L., Holmberg, S. B., and Hafström, L. (1991) Macrophage function and surgery. *Eur J Surg* 157: 163-170.
4. Babior, B. M. (1984) The respiratory burst of phagocytes. *J Clin Invest* 73: 599-601.
5. Barroso, Aranda J., Zweifach, B. W., Mathison, J. C., and Schmid, Schonbein GW (1995) Neutrophil activation, tumor necrosis factor, and survival after endotoxic and hemorrhagic shock. *J Cardiovasc Pharmacol* 25 Suppl 2.
6. Baue, A. E. (1975) Multiple, progressive, or sequential systems failure: A syndrome in the 1970s. *Arch Surg* 110: 779-781.
7. Bauer, C., Bach, F., Deutschmann, P., Larsen, R., and Marzi, I. Impact of TNF and IL-1 on the energetic status of the liver after hemorrhagic shock. *Shock* 2[Suppl.], 27-27. 1994.
Ref Type: Abstract

8. Bauer, C., Marzi, I., Bauer, M., Fellger, H., and Larsen, R. (1995) Interleukin-1 receptor antagonist attenuates leukocyte-endothelial interactions in the liver following hemorrhagic shock in the rat. *Crit Care Med* 23: 1099-1105.

9. Bauer, C., Marzi, I., Kallweit, U., Walcher, F., and Larsen, R. Effects of nitric oxide on hepatic microcirculation in vivo. *Shock* 3[Suppl.], 70. 1995.
Ref Type: Abstract

10. Bauer, M., Feucht, K., Ziegenfuss, T., and Marzi, I. (1995) Attenuation of shock-induced hepatic microcirculatory disturbances by the use of a starch-deferoxamine conjugate for resuscitation. *Crit Care Med* 23: 316-322.

11. Bauer, M. and Marzi, I. (1994) [The leukocyte-endothelial interaction as an expression of a hepatic inflammation reaction during an experimental shock syndrome]
Leukozyten-Endothel-Interaktion als Ausdruck einer hepatischen Entzündungsreaktion im experimentellen Schocksyndrom. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 29: 46-50.

12. Bauer, M., Zhang, J. X., Bauer, I., and Clemens, M. G. (1994) Endothelin-1 as a regulator of hepatic microcirculation: sublobular distribution of effects and impact on hepatocellular secretory function. *Shock* 1: 1-9.

13. Bellavite, P. (1988) The Superoxide-Forming Enzymatic System of Phagocytes. *Free Radic Biol Med* 4: 225-261.

14. Benoit, R., Rowe, S., Watkins, S. C., Boyle, P., Garrett, M., Alber, S., Wiener, J., Rowe, M. I., and Ford, H. R. (1998) Pure endotoxin does not pass across the intestinal epithelium in vitro. *Shock* 10: 43-48.
15. Berg, R. D. (1992) Bacterial translocation from the gastrointestinal tract. *J Med* 23: 217-244.
16. Besse, T., Gustin, T., Claeys, N., Schroeyers, P., and Lambotte, L. (1989) Effect of PGI₂ and thromboxane antagonist on liver ischemic injury. *Eur Surg Res* 21: 213-217.
17. Bevilacqua, M., Butcher, E., Furie, Barbara, Furie, Bruce, Gallatin, M., Gimbrone, M., Harlan, J., Kishimoto, K., and et al. (1991) Selectins: A family of adhesion receptors. *Cell* 67: 233.
18. Bitterman, H., Lefer, D. J., and Lefer, A. M. (1988) Novel mechanism of action of a prostacyclin enhancing agent in haemorrhagic shock. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 337: 679-686.
19. Bitterman, H., Stahl, G. L., Terashita, Z., and Lefer, A. M. (1988) Mechanisms of action of PGE₁ in hemorrhagic shock in rats. *Ann Emerg Med* 17: 457-462.
20. Bremer, C., Spiegel, H. U., Allkemper, T., Reimer, P., Rummeny- EJ, and Peters, P. E. (1995) Contrast-enhanced magnetic resonance imaging with intracellular contrast agents--a new way of monitoring hepatic reperfusion injury? *Transplant Proc* 27: 2849-2851.

21. Brown, J. M., Terada, L. S., Grosso, M. A., Whitmann, G. J., Velasco, S. E., Patt, A., Harken, A. H., and Repine, J. E. (1988) Xanthine oxidase produces hydrogen peroxide which contributes to reperfusion injury of ischemic, isolated, perfused rat hearts. *J Clin Invest* 81: 1297-1301.
22. Buhren, V. (1996) [Pathophysiology of shock]. *Unfallchirurg* 99: 207-220.
23. Carlos, T. M. and Harlan, J. M. (1994) Leukocyte-endothelial adhesion molecules. *Blood* 84: 2068-2101.
24. Carrico, C. J., Meakins, J. L., Marshall, J. C., Fry, D., and Maier, R. V. (1986) Multiple-Organ-Failure Syndrome. *Arch Surg* 121: 196-208.
25. Cavagna, F., Dapra, M., Maggioni, F., de Haen, C., and Felder, E. (1991) Gd-BOPTA/Dimeg: experimental disease imaging. *Magn Reson Med* 22: 329-333.
26. Charpentier, C., Audibert, G., Dousset, B., Weber, M., Garric, J., Welfringer, P., and Laxenaire, M. C. (1997) Is endotoxin and cytokine release related to a decrease in gastric intramucosal pH after hemorrhagic shock? *Intensive Care Med* 23: 1040-1048.
27. Chaudry, I. H., Ayala, A., Ertel, W., and Stephan, R. N. (1990) Hemorrhage and resuscitation: immunological aspects. *Am J Physiol* 259: R663-R678.
28. Chiu, C.-J., McArdle, A. H., Brown, R., Scott, H. J., and Gurd, F. N. (1970) Intestinal mucosal lesion in low flow states. *Arch Surg* 101: 484-488.

29. Clemens, M. G., Bauer, M., Gingalewski, C., Miescher, E., and Zhang, J. (1994) Hepatic intercellular communication in shock and inflammation [editorial] . *Shock* 2: 1-9.
30. Clement, O., Muhler, A., Vexler, V., Berthezene, Y., and Brasch- RC (1992) Gadolinium-ethoxybenzyl-DTPA, a new liver-specific magnetic resonance contrast agent. Kinetic and enhancement patterns in normal and cholestatic rats. *Invest Radiol* 27: 612-619.
31. Clement, O., Muhler, A., Vexler, V. S., Rosenau, W., Berthezene, Y., Kuwatsuru, R., and Brasch, R. C. (1992) Evaluation of radiation-induced liver injury with MR imaging: comparison of hepatocellular and reticuloendothelial contrast agents. *Radiology* 185: 163-168.
32. Colletti, L. M., Burtch, G. D., Remick, D. G., Kunkel, S. L., Strieter, R. M., Guice, K. S., Oldham, K. T., and Campbell, D. A., Jr. (1990) The production of tumor necrosis factor alpha and the development of a pulmonary capillary injury following hepatic ischemia/reperfusion. *Transplantation* 49: 268-272.
33. Corso, C. O., Okamoto, S., Leiderer, R., and Messmer, K. (1998) Resuscitation with hypertonic saline dextran reduces endothelial cell swelling and improves hepatic microvascular perfusion and function after hemorrhagic shock. *J Surg Res* 80: 210-220.
34. Daldrup, H. E., Reimer, P., Rummeny, E. J., Tombach, B., Berns, T., Balzer, T., Schimpfky, C., and Peters, P. E. (1995) [New super-paramagnetic iron particles for MRI. Phase II study of malignant liver tumors]

Neue superparamagnetische Eisenpartikel für die MRT. Phase-II-Studie bei malignen Lebertumoren. *Radiologe* 35: 486-493.

35. Dart, R. C., Liebler, D. C., and Sipes, I. G. (1993) Hepatic injury and lipid peroxidation during hemorrhagic shock and resuscitation. *Life Sci* 53: 1685-1690.
36. Deitch, E. A., Xu, D., Franko, L., Ayala, A., and Chaudry, I. H. (1994) Evidence favoring the role of the gut as a cytokine-generating organ in rats subjected to hemorrhagic shock. *Shock* 1: 141-145.
37. Dinges, H.P., Schlag, G., Redl, H. (1993) Morphology of the liver in shock: Pathophysiology of shock, sepsis and organ failure, hrsg. Von Schlag, G., Redl, Springer, Berlin, Heidelberg, pp 257-264
38. Dzik, W. H., Arkin, C. F., Jenkins, R. L., and Stump, D. C. (1988) Fibrinolysis during liver transplantation in humans: Role of tissue-type plasminogen activator. *Blood* 71: 1090-1095.
39. Flohe, L. and Giertz, H. (1987) Endotoxins, arachidonic acid, and superoxide formation. *Rev Infect Dis* 9: s553-s561.
40. Goris, R. J. (1996) MODS/SIRS: result of an overwhelming inflammatory response? [see comments]. *World J Surg* 20 : 418-421.
41. Goris, R. J. A., Te Boekhorst, T. P. A., Nuytinck, J. K. S., and Gimbere, J. S. F. (1985) Multiple-organ failure. *Arch Surg* 120: 1109-1115.

42. Granger, D. N., Höllwarth, M. E., and Parks, D. A. (1986) Ischemia-reperfusion injury: role of oxygen-derived free radicals. *Acta Physiol Scand Suppl.* 548: 47-63.
43. Hawker, F. (1991) Liver dysfunction in critical illness. *Anaesth Intens Care* 19: 165-181.
44. Heinrich, P. C., Castell, J. V., and Andus, T. (1990) Interleukin-6 and the acute phase response. *Biochem J* 265: 621-636.
45. Helmberger, T., Gregor, M., Holzknacht, N., (1999) Detektion und Charakterisierung fokaler Leberläsionen. *Radiologe* 39:678-684
46. Hierholzer, C., Kalff, J. C., Omert, L., Tsukada, K., Loeffert- JE, Watkins, S. C., Billiar, T. R., and Tweardy, D. J. (1998) Interleukin-6 production in hemorrhagic shock is accompanied by neutrophil recruitment and lung injury. *Am J Physiol* 275: L611-L621.
47. Hower, R., Rehkopf, A., Marzi, I., and Harbauer, G. (1990) Untersuchungsmethode zur Erfassung der hepatischen Mikrozirkulation und des Granulozytenverhaltens nach hämorrhagischem Schock an der Ratte. *1 Bochumer Symposium fuer Experimentelle Chirurgie* in press.
48. Jaeschke, H., Smith, C. W., and Farhood, A. (1990) The pathophysiological role of kupffer cells and neutrophils in hepatic ischemia/reperfusion injury in vivo. *5th International Symposium on Cells of the Hepatic Sinusoid.*

49. Jiang, J. X., Diao, Y. F., Tian, K. L., Chen, H. S., Zhu, P. F., and Wang, Z. G. (1997) Effect of hemorrhagic shock on endotoxin-inducing TNF production and intra-tissue lipopolysaccharide-binding protein mRNA expression and their relationship. *Shock* 7: 206-210.
50. Jungermann, K. and Katz, N. (1982) Functional hepatocellular heterogeneity. *Hepatology* 2: 385-395.
51. Jutila, M. A. (1992) Leukocyte traffic to sites of inflammation. *APMIS* 100: 191-201.
52. Keshav, S., Chung, L.-P., and Gordon, S. (1990) Macrophage products in inflammation. *Diagn Microbiol Infect Dis* 13: 439-447.
53. Kishimoto, T. (1989) The biology of interleukin-6. *Blood* 74: 1-10.
54. Koo, A. and Liang, I. Y. S. (1977) Blood flow in hepatic sinusoids in experimental hemorrhagic shock in the rat. *Microvasc Res* 13: 315-325.
55. Leaf, A. (1973) Cell swelling. A factor in ischemic tissue injury. *Circulation* 48: 455-458.
56. Lefer, A. M. (1989) Significance of lipid mediators in shock states. *Circ Shock* 27: 3-12.
57. Ley, K., Bullard, D. C., Arbones, M. L., Bosse, R., Vestweber, D., Tedder, T. F., and Beaudet, A. L. (2-1-1995) Sequential contribution of L- and P-selectin to leukocyte rolling in vivo. *J Exp Med* 181: 669-675.

58. Mack M.G., Vogl T.J. (1999) MR imaging of Head and Neck. *Eur Radiol* 9(7): 1247-51
59. Mahfouz, A. E., Hamm, B., and Taupitz, M. (1997) Hepatic magnetic resonance imaging: new techniques and contrast agents. *Endoscopy* 29: 504-514.
60. Mainous, M. R., Ertel, W., Chaudry, I. H., and Deitch, E. A. (1995) The gut: a cytokine-generating organ in systemic inflammation? *Shock* 4: 193-199.
61. Marotto, M. E., Thurman, R. G., and Lemasters, J. J. (1988) Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated, perfused rat liver: protection by allopurinol. *Hepatology* 8: 585-590.
62. Marzi, I., Bauer, C., Hower, R., and Bühren, V. (1993) Leukocyte-endothelial cell interactions in the liver after hemorrhagic shock in the rat. *Circ Shock* 40: 105-114.
63. Marzi, I., Bauer, M., Secchi, A., Bahrami, S., Redl, H., and Schlag, G. (1995) Effect of anti-TNF α on leukocyte adhesion in the liver after hemorrhagic shock: An intravital microscopic study in the rat. *Shock* 3 : 27-33.
64. Marzi, I., Bauer, M., Secchi, A., Hower, R., Larsen, R., and Bühren, V. (1992) Time course and pattern of hepatic leukocyte-endothelial interaction after hemorrhagic shock in the rat. *Circ Shock* 37: 15.
65. Marzi, I., Knee, J., Menger, M. D., Bühren, V., Harbauer, G., and Trentz, O. (1990) Intravitalmikroskopische Untersuchungen zur Granulozytenadhärenz

und Mikrozirkulation an der orthotop transplantierten Rattenleber. *Langenbecks Arch Chir* (Chir Forum 90): 373-377.

66. Marzi, I., Takei, Y., Knee, J., Menger, M. D., Gores, G. J., Bühren, V., Trentz, O., Lemasters, J. J., and Thurman, R. G. (1990) Assessment of reperfusion injury by intravital fluorescence microscopy following liver transplantation in the rat. *Transplant Proc* 22: 2004-2005.
67. McCord, J. M. (1985) Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163.
68. McCuskey, R. S. and Reilly, F. D. (1993) Hepatic microvasculature: Dynamic structure and its regulation. *Semin Liver Dis* 13: 1-12.
69. Menger, M. D., Lehr, H. A., and Messmer, K. (12-15-1991) Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury [published erratum appears in *Klin Wochenschr* 1990 Dec 30;69(24):1185]. *Klin Wochenschr* 69: 1050-1055.
70. Menger, M. D., Marzi, I., and Messmer, K. (1991) In vivo fluorescence microscopy for quantitative analysis of the hepatic microcirculation in hamsters and rats. *Eur Surg Res* 23: 158-169.
71. Menger, M. D. and Vollmar, B. (1996) Adhesion molecules as determinants of disease: from molecular biology to surgical research. *Br J Surg* 83: 588-601.

72. Moncada, S., Palmer, R. M. J., and Gryglewski, R. J. (1986) Mechanism of action of some inhibitors of endothelium-derived relaxing factor. *Proc Natl Acad Sci USA* 83: 9164-9168.
73. Muhler, A., Clement, O., Vexler, V., Berthezene, Y., Rosenau- W, and Brasch, R. C. (1992) Hepatobiliary enhancement with Gd-EOB-DTPA: comparison of spin-echo and STIR imaging for detection of experimental liver metastases. *Radiology* 184: 207-213.
74. Nolte, D., Lorenzen, A., Lehr, H. A., Zimmer, F. J., Klotz, K. N., and Messmer, K. (1992) Reduction of postischemic leukocyte-endothelium interaction by adenosine via A2 receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 346: 234-237.
75. Pardy, B. J. and Dudley, H. A. F. (1977) Post-traumatic pulmonary insufficiency. *Surg Gynecol Obstet* 144: 259-269.
76. Picker, L. J., Warnock, R. A., Burns, A. R., Doerschuk, C. M., Berg, E. L., and Butcher, E. C. (1991) The neutrophil selectin LECAM-1 presents carbohydrate ligands to the vascular selectins ELAM-1 and GMP140. *Cell* 66: 921-933.
77. Pizanis, A., Mutschler, W., and Rose, S. (1999) Monoclonal antibody to tumor necrosis factor-alpha modulates hepatocellular Ca²⁺ homeostasis during hemorrhagic shock in the rat [see comments]. *J Mol Med* 77: 8-13.
78. Pober, J. S. and Cotran, R. S. (1990) Cytokines and endothelial cell biology. *Physiol Rev* 70: 427-451.

79. Pober, J. S. and Cotran, R. S. (1990) The role of endothelial cells in inflammation. *Transplantation* 50: 537-544.
80. Polley, M. J., Phillips, M. L., Wayner, E., Nudelman, E., Singhal, A. K., Hakomori, S., and Paulson, J. C. (1991) CD62 and endothelial cell-leukocyte adhesion molecule 1 (ELAM-1) recognize the same carbohydrate ligand, sialyl-Lewis x. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 6224-6228.
81. Post, S., Gonzalez, A. P., Palma, P., Rentsch, M., Stiehl, A., and Menger, M. D. (1992) Assessment of hepatic phagocytic activity by in vivo microscopy after liver transplantation in the rat. *Hepatology* 16: 803-809.
82. Post, S., Menger, M. D., Rentsch, M., Gonzalez, A. P., Herfarth, C., and Messmer, K. (1992) The impact of arterialization on hepatic microcirculation and leukocyte accumulation after liver transplantation in the rat. *Transplantation* 54: 789-794.
83. Post, S., Palma, P., Gonzalez, A. P., Rentsch, M., Otto, G., and Menger, M. D. (1993) Role of eicosanoids in reperfusion injury in rat liver transplantation. *Transplant Proc* 25: 2547.
84. Rappaport, A.M. (1963) Acinar units and the pathophysiology of the liver. In *The liver. Morphology, biochemistry, physiology. Vol.I.* Rouiller, Ch. (ed.) London: Academic Press, pp. 265-328.
85. Redl, H., Gasser, H., Schlag, G., and Marzi, I. (1993) Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *Br Med Bull* 49: 556-565.

86. Regel, G., Grotz, M., Weltner, T., Sturm, J. A., and Tscherne, H. (1996) Pattern of organ failure following severe trauma. *World J Surg* 20: 422-429.
87. Rose, S. and Marzi, I. (1996) [Pathophysiology of polytrauma]
Pathophysiologie des Polytraumas. *Zentralbl Chir* 121: 896-913.
88. Rummeny, E. J. and Peters, P. E. (1992) [Status and development of new clinical contrast media for MR diagnosis of liver diseases (published erratum appears in *Radiologie* 1992 Jun;32(6):289)]
Stand und Entwicklung neuer klinischer Kontrastmittel für die MR-Diagnostik von Lebererkrankungen. *Radiologie* 32: 225-231.
89. Rummeny, E. J., Reimer, P., Daldrup, H., and Peters, P. E. (1995) [Detection of liver tumors]
Detektion von Lebertumoren. *Radiologie* 35: S252-S258.
90. Saini, S., Stark, D. D., Hahn, P. F., Bousquet, J. C., Introcasso- J, Wittenberg, J., Brady, T. J., and Ferrucci-JT, Jr (1987) Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for enhanced detection of liver carcinoma. *Radiology* 162: 217-222.
91. Saini, S., Stark, D. D., Hahn, P. F., Wittenberg, J., Brady, T. J., and Ferrucci-JT, Jr (1987) Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology* 162: 211-216.
92. Saini, S., Stark, D. D., Hahn, P. F., Wittenberg, J., Brady, T. J., and Ferrucci-JT, Jr (1987) Ferrite particles: a superparamagnetic MR contrast agent for the reticuloendothelial system. *Radiology* 162: 211-216.

93. Sato, N., Eguchi, H., Inoue, A., Matsumura, T., Kawano, S., and Kamada, T. (1986) Hepatic microcirculation in Zucker fatty rats. *Adv Exp Med Biol* 200: 477-483.
94. Schmid-Schönbein, G. W., Skalak, R., Simon, S. I., and Engler, R. L. (1991) The interaction between leukocytes and endothelium in vivo. *Ann N Y Acad Sci* 516: 348-361.
95. Schuhmann, Giampieri G., Schmitt, Willich H., Press, W. R., Negishi, C., Weinmann, H. J., and Speck, U. (1992) Preclinical evaluation of Gd-EOB-DTPA as a contrast agent in MR imaging of the hepatobiliary system. *Radiology* 183: 59-64.
96. Schwartz, M. D., Repine, J. E., and Abraham, E. (1995) Xanthine oxidase-derived oxygen radicals increase lung cytokine expression in mice subjected to hemorrhagic shock. *Am J Respir Cell Mol Biol* 12: 434-440.
97. Scommotau, S., Uhlmann, D., Löffler, B. M., Breu, V., and Spiegel, H. U. Involvement of endothelin/nitric oxide balance in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Langenbecks Archiv für Chirurgie* 384, 65-70. 1999.
Ref Type: Abstract
98. Silomon, M., Pizanis, A., and Rose, S. (1999) Oxyradical-mediated hepatocellular Ca²⁺ alterations during hemorrhagic shock and resuscitation. *Shock* 11: 193-198.
99. Stark, D. D., Weissleder, R., Elizondo, G., Hahn, P. F., Saini, S., Todd, L. E., Wittenberg, J., and Ferrucci, J. T. (1988) Superparamagnetic iron oxide: clinical

application as a contrast agent for MR imaging of the liver. *Radiology* 168: 297-301.

100. Starnes-HF, Jr, Warren, R. S., Jeevanandam, M., Gabrilove, J. L., Larchian, W., Oettgen, H. F., and Brennan, M. F. (1988) Tumor necrosis factor and the acute metabolic response to tissue injury in man. *J Clin Invest* 82: 1321-1325.
101. Steinhoff, G., Behrend, M., Schrader, B., Duijvestijn, A. M., and Wonigeit, K. (1993) Expression patterns of leukocyte adhesion ligand molecules on human liver endothelia. *Am J Pathol* 142 (2): 481-488.
102. Steinhoff, G., Schrader, B., Behrend, M., and Wonigeit, K. (1993a) Different endothelial ligand molecule expression in human liver transplant inflammation. In *Cells of the Hepatic Sinusoid. Vol. 4*. Wisse, E. and Knook, D.L. (eds.) Leiden, Netherlands: Kupffer Cell Foundation, pp. in press.
103. Strieter, R. M., Kunkel, S. L., and Bone, R. C. (1993) Role of tumor necrosis factor- α in disease states and inflammation. *Crit Care Med* 21 (10): 447-463.
104. Sturm, J. A., Lewis, F. R., Trentz, O., Oestern, H.-J., Hempelmann, G., and Tscherne, H. (1979) Cardiopulmonary parameters and prognosis after severe multiple trauma. *J Trauma* 19: 305-318.
105. Sun, Y., Hardaway, R. M., and Williams, C. H. (1997) Comparison of bacterial translocation during traumatic shock and hemorrhagic shock in rats. *Int Surg* 82: 134-136.

106. Svoboda, P., Kantorova, I., and Ochmann, J. (1994) Dynamics of interleukin 1, 2, and 6 and tumor necrosis factor alpha in multiple trauma patients. *J Trauma* 36: 336-340.
107. Swank, G. M. and Deitch, E. A. (1996) Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 20: 411-417.
108. Taupitz, M. and Hamm, B. (1995) [Value of MRI in diagnosis of focal liver lesions]
Stellwert der MRT in der Diagnostik fokaler Leberlasionen. *Radiologe* 35: S243-S247.
109. Thurman, R. G., Marzi, I., Seitz, G., Thies, J., Lemasters, J. J., and Zimmermann, F. A. (1988) Hepatic reperfusion injury following orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 46: 5020-506.
110. Tilney, N. L., Bailey, G. L., and Morgan, A. P. (1973) Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: An unsolved problem in postoperative care. *Ann Surg* 178: 117-122.
111. Tracey, K. J., Beutler, B., Lowry, S. F., Merryweather, J., Volpe, S., Milsark, I. W., Hariri, R. J., Fahey, T. J., Zentella, A., Albert, J. D., and et al. (1986) Shock and tissue injury induced by recombinant human cachectin. *Science* 234: 470-474.
112. Tracey, K. J. and Cerami, A. (1993) Tumor necrosis factor: An updated review of its biology. *Crit Care Med* 21 (10): 415-422.

113. Urhahn, R., Adam, G., Busch, N., Chen, J. H., Euringer, W., and Gunther, R. W. (1996) [Superparamagnetic iron oxide particles: what value has the T1 effect in the MR diagnosis of focal liver lesions?]
Superparamagnetische Eisenoxidpartikel: Welchen Stellenwert hat der T1-Effekt für die MR-Diagnostik fokaler Leberläsionen? *Rofo Fortschr Geb Rontgenstr Neuen Bildgeb Verfahr* 165: 364-370.
114. Vogl, T. J., Hammerstingl, R., Keck, H., and Felix, R. (1995) [Differential diagnosis of focal liver lesions with MRI using the superparamagnetic contrast medium endorem]. *Radiologe* 35: S258-S266.
115. Vollmar, B., Lang, G., Post, S., Menger, M. D., and Messmer, K. (1993) Die Mikrozirkulation der Leber im hämorrhagischen Schock der Ratte und ihre Bedeutung für Energiestoffwechsel und Funktion. *Zentralbl Chir* 118: 218-225.
116. Vollmar, B., Richter, S., and Menger, M. D. (1996) Leukocyte stasis in hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 270: G798-G803.
117. Vollmar, B., Ruttinger, D., Wanner, G. A., Leiderer, R., and Menger, M. D. (1996) Modulation of kupffer cell activity by gadolinium chloride in endotoxemic rats. *Shock* 6: 434-441.
118. von Andrian, U. H., Chambers, J. D., McEvoy, L. M., Bargatze, R. F., Arfors, K.-E., and Butcher, E. C. (1991) Two-step model of leukocyte-endothelial cell interaction in inflammation: Distinct roles for LECAM-1 and the leukocyte $\beta 2$ integrins in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7538-7542.

119. Waage, A. and Espevik, T. (6-1-1988) Interleukin 1 potentiates the lethal effect of tumor necrosis factor alpha/cachectin in mice. *J Exp Med* 167: 1987-1992.
120. Wake, K., Decker, K., Kim, A., Knook, D. L., McCuskey, R. S., Bouwens, L., and Wisse, E. (1989) Cell biology and kinetics of Kupffer cells in the liver. *Int Rev Cytol* 118: 173-229.
121. Wake, K., Kishiye, T., Yamamoto, H., Bhunchet, E., and Sakamoto, Y. (1993) Kupffer cells modulate configuration and contractility of perisinusoidal stellate cells. In *Cells of the hepatic sinusoid. Vol 4*. Wisse, E. and Knook, D.L. (eds.) Leiden, Netherlands: Kupffer Cell Foundation, pp. in press.
122. Wang, J. F., Komarov, P., Sies, H., and de Groot, H. (1992) Inhibition of superoxide and nitric oxide release and protection from reoxygenation injury by ebselen in rat Kupffer cells. *Hepatology* 15: 1112-1116.
123. Wang, P., Ba, Z. F., Cioffi, W. G., Bland, K. I., and Chaudry, I. H. (2-1-1998) Is gut the "motor" for producing hepatocellular dysfunction after trauma and hemorrhagic shock? *J Surg Res* 74: 141-148.
124. Wanner, G. A., Ertel, W., Müller, P., Höfer, Y., Leiderer, R., Menger, M. D., and Messmer, K. (1996) Liver ischemia and reperfusion induces a systemic inflammatory response through Kupffer cell activation. *Shock* 5: 34-40.
125. Waydhas, C., Nast-Kolb, D., Jochum, M., Trupka, A., Lenk, S., Fritz, H., Duswald, K.-H., and Schweiberer, L. (1992) Inflammatory mediators, infec-

tion, sepsis, and multiple organ failure after severe trauma. *Arch Surg* 127: 460-467.

126. Weinmann, H. J., Schuhmann, Giampieri G., Schmitt, Willich, Vogler, H., Frenzel, T., and Gries, H. (1991) A new lipophilic gadolinium chelate as a tissue-specific contrast medium for MRI. *Magn Reson Med* 22: 233-237.
127. Wiggers, H. C. and Ingraham, R. C. (1946) Hemorrhagic shock: Definition and criteria for its diagnosis. *J Clin Invest* 25: 30-36.
128. Xu, Y. X., Ayala, A., and Chaudry, I. H. (1998) Prolonged immunodepression after trauma and hemorrhagic shock. *J Trauma* 44: 335-341.
129. Zangos; S., Hammerstingl R., Mack M.G., Straub R., Engelmann K., Eichler K. Balzer T., Vogl T.J. (2001) Renales Anreicherungsverhalten und Elimination des hepatobiliären Kontrastmittels Gd-EOB. *Fortschr. Röntgenstr.* 173:1034-1040
130. Zhang, J. X., Pegoli, W., and Clemens, M. G. (1994) Endothelin-1 induces direct constriction of hepatic sinusoids. *Am J Physiol* 266: G624-G632.

8. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. I. Marzi für die Bereitstellung des Themas und die wertvollen Anregungen bei der Erstellung dieser Arbeit.

DANKE

- Herrn Dr. M. Maier für die intensive Betreuung und Unterstützung bei dieser Studie
- Herrn Prof. Dr. Menger, Leiter der Abteilung für experimentelle Chirurgie, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes innerhalb des Institutes
- Herrn Prof. Kramann, Leiter der radiologischen Klinik, für die Bereitstellung des Kleintierkernspintomographen zur Versuchsdurchführung
- Herrn Dr. G. Schneider, Leiter der Arbeitsgruppe Kernspintomographie für seine Unterstützung und hilfreichen Anregungen.
- Frau D. Wagner-Jochum, für ihre ausdauernde Unterstützung und Hilfe bei der Durchführung und Auswertung der kernspintomographischen Experimente
- Allen, die zum Gelingen der Arbeit beigetragen haben

9. Tabellarischer Lebenslauf

Persönliche Angaben:

Name:	Patrick Hahn
Geburtsdatum:	4. Mai 1972
Geburtsort:	Illingen/Saar
Familienstand:	ledig
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Vater:	Helmut Hahn, Rentner
Mutter:	Marlene Hahn, Hausfrau

Schulbildung:

1978-1982:	Grundschule Uchtelfangen
1982-1991:	Illtalgymnasium Illingen
Mai 1991:	Abitur

Zivildienst:

01.04.92-30.06.93:	Zivildienst beim deutschen roten Kreuz
--------------------	--

Studium:

1993-2000:	Studium der Humanmedizin an der Universitätsklinik Homburg/Saar
Oktober 2000:	3. Staatsexamen
Seit 01.04.2001	AiP an der Universitätsklinik der Johann Wolfgang Goethe Universität Frankfurt/Main, Abt. für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie, Prof. Marzi

Schriftliche Erklärung

Ich erkläre hiermit, daß ich die dem Fachbereich Humanmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main zur Promotionsprüfung eingereichte Dissertation mit dem Titel

Kontrastmittelverstärkte Magnetresonanztomographie (MRT) zur non-invasiven Analyse intrahepatischer Funktionsstörungen nach hämorrhagischem Schock

in der Klinik für Unfall-, Hand- und Wiederherstellungschirurgie
unter Betreuung und Anleitung von Prof. Dr. I. Marzi

ohne sonstige Hilfe selbst durchgeführt und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ich habe bisher an keiner in- oder ausländischen Universität ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht.

Die vorliegende Arbeit wurde bisher nicht als Dissertation eingereicht.

Frankfurt am Main, Juli 2002

(P. Hahn)

Dekan: Prof. Dr. J. Pfeilschifter
Referent: Prof. Dr. I. Marzi
Koreferent: Prof. Dr. T. Vogl

Tag der mündlichen Prüfung: 12.11.2002