

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin  
(Direktor Univ.- Prof. Dr. Michael Wendt)  
der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald

**„Mechanismen der Polyhexanid bedingten Vasodilatation während  
Peritoneallavage: Ergebnisse tierexperimenteller Untersuchungen“**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen

Grades

Doktor der Medizin  
(Dr. med.)

der

Medizinischen Fakultät

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2004

vorgelegt von:  
Helge Frieling  
geb. am: 26.03.1977  
in: Langen

Dekan: Prof. Dr. Heyo K. Kroemer

1. Gutachter: Prof. Dr. Christian Lehmann, Greifswald

2. Gutachter: Prof. Dr. Claudia Spieß, Berlin

Ort, Raum: Greifswald, Seminarraum 1 der Klinik für Anästhesiologie und  
Intensivmedizin (Alte Küche)

Tag der Disputation: 02. März 2005

## Inhaltsverzeichnis

1.	Einführung.....	5
1.1	Problemstellung.....	5
1.2	Regulation des arteriellen Tonus.....	6
1.2.1	Aufbau und Funktion der glatten Gefäßmuskulatur.....	6
1.2.2	Kontraktion und Kontraktilität: Rolle intrazellulärer Calciumionen ....	8
1.2.3	Membranpotential und Ionen-Kanäle .....	10
1.2.3.1	K <sup>+</sup> -Kanäle.....	12
1.2.3.2	Cl <sup>-</sup> -Kanäle .....	14
1.2.4	NO und das Endothel .....	15
1.3	Lokale Antiinfektiva .....	17
1.4	Ziel der Studie .....	20
2.	Material und Methoden .....	21
2.1	In vivo I – Abdominelle Instillation von Polyhexanid.....	21
2.2	In vivo II – Intravitalmikroskopie .....	22
2.3	In vitro – Isometrische Myotonometrie an der thorakalen Aorta der Ratte .....	25
2.3.1	Ablauf der Untersuchung .....	26
2.3.2	Substanzen.....	26
2.4	Datenanalyse .....	27
2.4.1	In vivo I + II .....	27
2.4.2	In vitro .....	28
3.	Ergebnisse .....	29
3.1	Auswirkungen der intraperitonealen Instillation von Polyhexanid auf zirkulatorische Parameter.....	29
3.1.1	Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks .....	29
3.1.2	Verlauf der Herzfrequenz.....	30
3.2	Intravitalmikroskopie .....	30
3.3	Mechanismen der Polyhexanid bedingten Vasodilatation der thorakalen Aorta der Ratte .....	31
3.3.1	Fertiglösung Polyhexanid 0,04% .....	31
3.3.2	Wirkstoff Polyhexanid .....	32

---

3.3.3	Inkubation mit NO-Synthetasehemmer: L-NAME.....	34
3.3.4	Inkubation mit ODQ / SQ .....	36
3.3.5	Inkubation mit $\beta$ -Adrenozeptorantagonist: Propranolol .....	37
3.3.6	Inkubation mit M-Cholinrezeptorantagonist: Atropin .....	39
3.3.7	Inkubation mit $K^+$ -Kanalblockern.....	40
3.3.8	KCl induzierte Kontraktion.....	40
3.3.9	Na-Orthovanadat induzierte Kontraktion.....	42
4.	Diskussion .....	43
4.1	Hämodynamik .....	43
4.2	Mikrozirkulation.....	44
4.3	Mechanismen der Polyhexanid bedingten Vasodilatation .....	47
4.3.1	Endothel vermittelter Effekt.....	47
4.3.2	Rolle des NO .....	48
4.3.3	Zyklische Nukleotide .....	50
4.3.4	Muskarinische Acetylcholinrezeptoren.....	51
4.3.5	Weitere Mechanismen.....	51
4.4	Vergleichende Bewertung der Teilstudien.....	52
5.	Zusammenfassung.....	55
6.	Literaturverzeichnis.....	57
7.	Abkürzungsverzeichnis .....	63
8.	Anhang .....	66
8.1	Abstracts.....	67
8.1.1	Kongreß der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensivmedizin (DIVI), Hamburg 2002.....	67
8.1.2	World Congress of Anesthesiology (WCA), Paris 2004 .....	68
8.1.3	World Congress of Anesthesiology (WCA), Paris 2004 .....	69
8.1.4	Hauptstadtkongreß für Anästhesie und Intensivmedizin, Berlin 2004.....	70
8.2	Eidesstattliche Erklärung.....	71
8.3	Lebenslauf .....	72
8.4	Danksagung.....	73

# 1. Einführung

## 1.1 Problemstellung

Sepsis ist eine schwere, systematische Erkrankung und stellt die häufigste Todesursache auf anästhesiologischen Intensivstationen dar. Häufig entsteht sie infolge einer fokalen Infektion wie zum Beispiel der Peritonitis. Bei der intensivmedizinischen Behandlung von Sepsis und Peritonitis kommen unter anderem die Peritoneallavage und die medikamentöse Beeinflussung der Makro- und Mikrozirkulation zum Einsatz. Gerade der intestinalen Mikrozirkulation scheint eine entscheidende Rolle in der Pathophysiologie schwerer septischer Zustände und des Multiorganversagens zuzukommen (25). Im Rahmen einer systemischen Inflammation werden Kapillargebiete im Dünndarm minderperfundierte, wobei verschiedene Mechanismen beteiligt sind: Präkapilläre arteriovenöse Shunts werden geöffnet, der kapilläre Blutfluß durch Konstriktion der zuführenden Arteriolen gemindert und der Blutfluß innerhalb der Darmwand zuungunsten der Mukosa umverteilt. Diese Minderperfusion der Mukosa bedingt wiederum einen Zusammenbruch der intestinalen Barriere, die die im Darmlumen vorhandenen Bakterien vom Kreislauf trennt. Es folgt eine Einschwemmung von Erregern in die Zirkulation, die den septischen Prozeß aufrechterhalten oder aggravierern können. Der Darm als „körpereigenes Erregerreservoir“ wird daher auch als „undrainierter Abszeß der Sepsis“ oder als „Motor des Multiorganversagens“ bezeichnet (14; 17; 63). Die gezielte Beeinflussung der intestinalen Mikrozirkulation, die eine Option in der Therapie von Sepsis und Multiorganversagen sein könnte, findet bislang jedoch allenfalls in tierexperimentellen Forschungsansätzen Beachtung.

*Hersh et al.* schlagen die sogenannte selektive Darmmikrozirkulationskontrolle (selective gut microcirculatory control, SGMC) vor. Mit einer intravital-mikroskopischen Arbeit konnten sie die Effektivität einer mukosalen Applikation von Natrium-Nitroprussid im Ileum der Ratte nachweisen: Durch die lokale Anwendung dieses starken Vasodilators wurden sepsistypische Alterationen der intestinalen Mikrozirkulation signifikant reduziert (26). Wenngleich ein gezielter „mucosal approach“ in der Praxis nur bedingt durchführbar zu sein scheint, ist

eine regionale Anwendung vasoaktiver Substanzen als „peritoneal approach“ gerade im Rahmen einer Peritoneallavage durchaus vorstellbar.

Bei der Behandlung der diffusen Peritonitis stellt die Peritoneallavage neben der Sanierung der Infektionsquelle einen Hauptpfeiler der Therapie dar (4; 11). Zur Steigerung der Effektivität werden der Spüllösung häufig lokale Antiinfektiva beigefügt, um eine regionale antibakterielle Wirkung zu erzielen (40). Die klinische Erfahrung zeigt, daß während der Lavage mit Substanzen wie Polyhexanid oder Taurolidin Blutdruckabfälle auftreten können; bislang ist jedoch nicht untersucht, wie diese Substanzen auf die Zirkulation wirken.

In der vorliegenden Arbeit wird deshalb in einem ersten Versuchsteil die klinische Beobachtung eines Blutdruckabfalls während und nach der Peritoneallavage mit Polyhexanid tierexperimentell überprüft. Im zweiten Versuchsteil wird untersucht, ob diese Hypotension im Zusammenhang mit einer lokalen, durch Polyhexanid verursachten Vasodilatation im intestinalen Gefäßbett steht. Schließlich wird im dritten Versuchsteil möglichen Mechanismen der Polyhexanid induzierten Vasodilatation an der isolierten thorakalen Aorta der Ratte nachgegangen.

Zunächst werden einige Grundlagen der Regulation des arteriellen Tonus sowie die untersuchte Substanz vorgestellt. Anschließend wird auf die verwendeten Methoden, die Fluoreszenz-Intravitalmikroskopie und die isometrische Myotonometrie, eingegangen. Danach werden die Untersuchungsergebnisse vorgestellt und abschließend im Zusammenhang mit dem aktuellen Forschungsstand diskutiert.

## **1.2 Regulation des arteriellen Tonus**

### **1.2.1 Aufbau und Funktion der glatten Gefäßmuskulatur**

Die Blutgefäße der Säugetiere haben prinzipiell einen ähnlichen Wandaufbau. Gefäße oberhalb der Kapillarebene besitzen eine aus 3 Schichten bestehende Gefäßwand: Hauptbestandteil der innersten Schicht, *Intima*, ist das Endothel. Die als *Media* bezeichnete mittlere Schicht enthält vor allem ringförmig angeordnete glatte Muskelzellen, zwischen denen in unterschiedlichem Maße Elastin, Kollagen und Proteoglykane vorkommen. Die äußere Schicht, *Adventitia*, besteht aus Bindegewebe und elastischen Fasern. Die Adventitia ist mit dem Bindegewebe des

Organs verbunden, zu dem das Gefäß gehört. In der Adventitia verlaufen Nerven, die vor allem adrenerge und cholinerge Nervenfasern enthalten und die vegetative Steuerung des Gefäßtonus leisten (31). Wichtigstes Stellglied des Gefäßtonus sind die glatten Muskelzellen der Media. Änderungen des Gefäßdurchmessers, also Vasokonstriktion und -dilatation, hängen von Veränderungen des Kontraktionsgrades der glatten Muskelzellen ab. Grundlage der kontraktiven Eigenschaften sowohl von glatten als auch von quergestreiften bzw. Herzmuskelzellen ist das Zusammenspiel der sogenannten Myofilamente Aktin und Myosin. Aktinfilamente haben einen Durchmesser von etwa 6 nm. Sie bestehen in glatten Muskelzellen aus den Proteinen Aktin, Tropomyosin (Tm), Caldesmon (CaD) und Calponin (CaP). Entlang des fadenförmigen Tm ordnen sich bis zu 400 kugelförmige Aktinmoleküle (G-Aktin) zu einer doppelhelikalen Struktur, dem F(fibröses)-Aktin an. Jedes G-Aktin hat Bindungsstellen für weitere G-Aktinmoleküle, für Tropomyosin und Myosin. Die Myosinbindungsstelle ist im Ruhezustand durch CaD und CaP blockiert. Das Zusammenwirken von Aktinmolekülen und die Kraftübertragung auf das Cytoskelett werden durch das Tm vermittelt. Aktinfilamente bilden in glatten Muskelzellen ein Netzwerk, das über Integrinmoleküle in der Zellmembran mit dieser und der extrazellulären Matrix verbunden ist (20; 36).

Myosinfilamente werden durch Zusammenlagerung von Myosinmolekülen gebildet. Jedes Myosinmolekül besteht aus zwei Eiweißmonomeren, die ineinander verdrillt sind und sich an einem Ende zu zwei Köpfchen verdichten. Dabei werden Kopf und Hals des Myosins als schwere Kette (Myosine-heavy-chain, HMM), der Schaft als Leichtkette (Myosine-light-chain, LMM) bezeichnet. An den Myosinköpfchen befinden sich wiederum einzelne, ebenfalls als leichte Ketten bezeichnete, Moleküle mit regulatorischen Funktionen (regulatory light-chains of myosine, rMLC). HMM bilden mittels des Köpfchens Querbrücken zum Aktin, die in einem definierten Winkel (Myosinköpfchenwinkel) zur Seite abstehen. Die Kopfreion enthält eine ATPase-Aktivität, über die die Affinität der ebenfalls am Köpfchen liegenden Aktin-Bindungsstelle reguliert wird. Die MyosinATPase ist im Ruhezustand ebenfalls durch CaD blockiert (36).

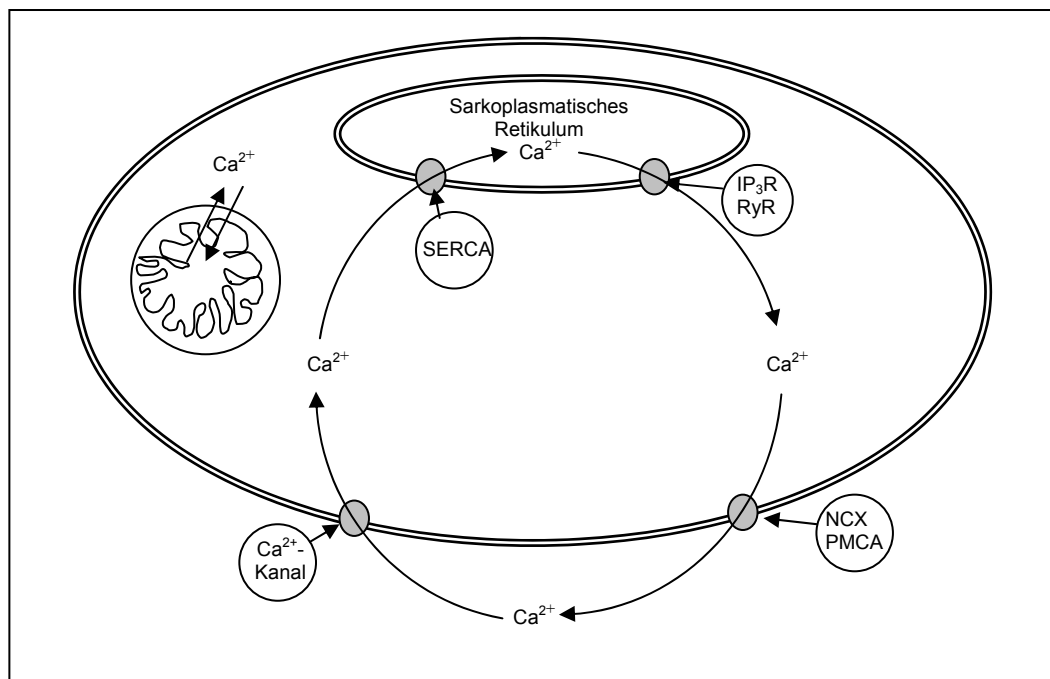
Entsprechend der *Gleitfilamenttheorie* entsteht die Muskelkontraktion durch ATP-abhängige Bindung und Lösung des Myosinköpfchens vom Aktin. Dieser Vorgang wird durch die Phosphorylierung der rMLC in Gange gesetzt. Dadurch wird

die MyosinATPase aktiviert und die Aktin-Bindungsstelle des Myosins kann an das Aktin binden. Im nächsten Schritt wird ATP gebunden, dies löst die Bindung zwischen Aktin und Myosin, ändert wohl aber auch die Konformation des Myosinköpfchens. Die Spaltung des ATP erlaubt die erneute Bindung an ein Aktinmolekül, die Abgabe des Phosphations bewirkt eine erneute Konformationsänderung des Myosinkopfes, der das nun gebundene Aktin mitbewegt.

Ebenfalls wichtig für den Beginn des Kontraktionszyklus ist die Phosphorylierung von CaD, das im Ruhezustand die Bindungsstellen am Aktin besetzt hält und die MyosinATPase vom Aktin fernhält. Phosphorylierung des CaD löst die Bindung vom Aktin und gibt so die Myosinbindungsstelle frei. Feine Regulationen des Vorgangs werden auch durch Veränderungen an den anderen kleinen Filamenten (Tm, CaP) realisiert (36; 49; 70).

### 1.2.2 Kontraktion und Kontraktilität: Rolle intrazellulärer Calciumionen

$\text{Ca}^{2+}$  spielt als second messenger eine überragende Rolle in der Steuerung sowohl der Kontraktion selbst als auch der Kontraktilität von Muskelzellen. Darüber hinaus werden über die  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration auch Vorgänge wie Genexpression,

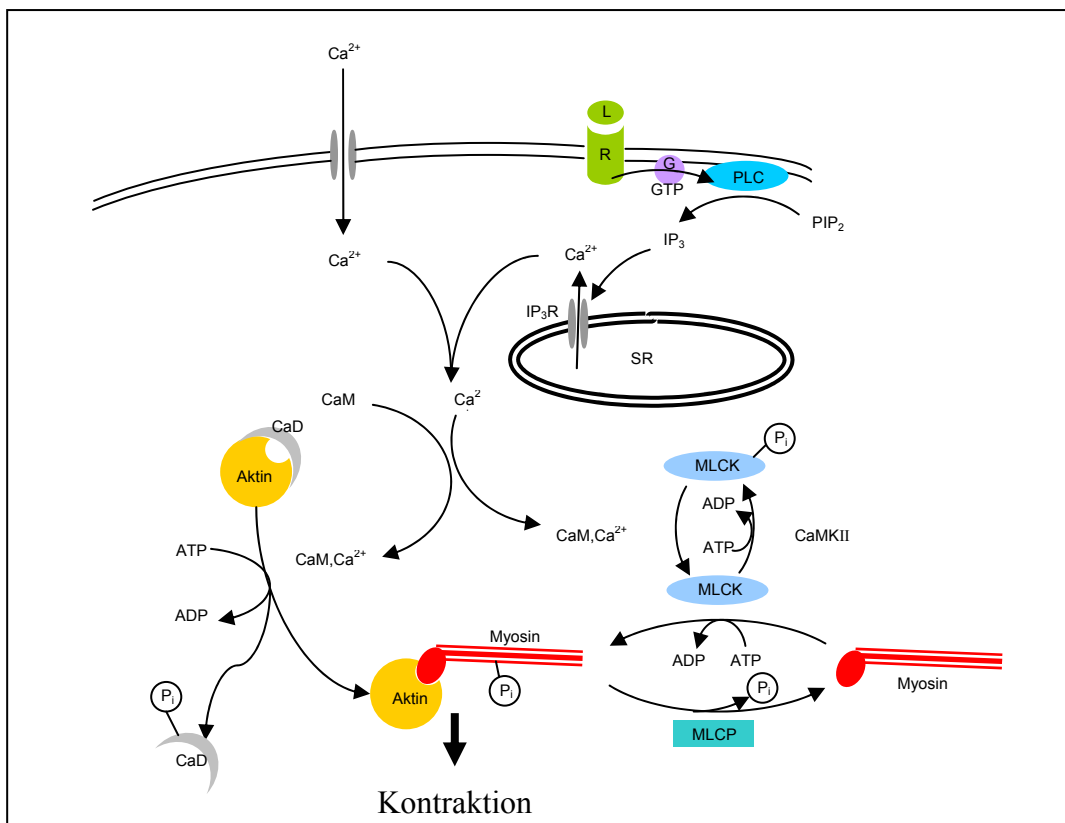


**Abbildung 1.1:**  $\text{Ca}^{2+}$ -Homöostase in der glatten Muskelzelle (Abkürzungen s. Text). Modifiziert nach *Smith*, 1996 (61).



Metabolismus und Sekretion in glatten Muskelzellen gesteuert.

Eine Aktivierung der glatten Muskelzellen führt zur Erhöhung der intrazellulären  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration,  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . Dies geschieht auf mehreren Wegen. Quantitativ am wichtigsten ist dabei die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem sarkoplasmatischen Retikulum (SR). Eine Aktivierung der glatten Muskelzelle durch Pharmaka oder neuronale Reize wird häufig über den Phosphatidylinositolweg vermittelt. Die Belegung entsprechender Rezeptoren, z.B.  $\alpha_1$ -Adrenozeptoren, durch Adrenalin bewirkt eine G-Protein vermittelte Aktivierung der Phospholipase C (PLC), die das in der Plasmamembran ubiquitär vorkommende Arachidonsäurederivat Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ) in Inositol-1,4,5-trisphosphat ( $\text{IP}_3$ ) und Diacylglycerol (DAG) hydrolytisch spaltet.  $\text{IP}_3$  öffnet einen  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanal in der Membran des SR, der aufgrund seiner Bindungsstelle für  $\text{IP}_3$  als  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ) bezeichnet wird. Fein reguliert wird  $\text{IP}_3\text{R}$  durch die Bindung von ATP sowie Phosphorylierungen durch verschiedene im Sarkoplasma vorhandene



**Abbildung 1.2:** Steuerung der Kontraktion glatter Muskulatur durch Calciumionen: G-Protein (G) gekoppelter Rezeptor (R), Phospholipase C (PLC), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat ( $\text{PIP}_2$ ), Inositol-1,4,5-trisphosphonate ( $\text{IP}_3$ ),  $\text{IP}_3$ -Rezeptor ( $\text{IP}_3\text{R}$ ), Sarkoplasmatisches Retikulum (SR), Calmodulin (CaM), Caldesmon (CaD), Myosinleichtenkettenkinase (MLCK), Myosinleichtenkettenphosphatase (MLCP), Calmodulin-abhängige-Kinase II (CaMKII).

Proteinkinasen (Proteinkinase C (PKC), cAMP abhängige Kinase A (PKA) und  $\text{Ca}^{2+}$ -Calmodulin-Kinase II) (61). Interessant ist dabei, daß PKC von DAG aktiviert wird und durch Phosphorylierung der Myosinleichtkette (rMLC) direkt zu einer Kontraktion beitragen kann (1).

Für die Steuerung des Muskeltonus spielt aber auch der  $\text{Ca}^{2+}$ -Einstrom durch spannungsabhängige  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle ( $\text{Ca}_v$ -Kanäle) in der Plasmamembran eine Rolle. Die extrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration ist etwa zehntausendmal höher als die intrazelluläre Konzentration, so daß der Extrazellularraum eine unerschöpfliche Kalziumquelle für die Zelle ist. Die rasche Reduktion der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  erfolgt trotzdem vor allem durch Abgabe in den Extrazellularraum mittels eines  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -Austauschers (NCX) und einer  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase der Plasmamembran (plasma membrane  $\text{Ca}^{2+}$  adenosine triphosphatase (PMCA)). Das SR als  $\text{Ca}^{2+}$ -Speicher füllt sich hingegen langsamer wieder auf. Vor allem mittels der sarkoplasmatischen  $\text{Ca}^{2+}$ -ATPase (SERCA) wird  $\text{Ca}^{2+}$  vom Cytosol ins SR gepumpt. Ebenfalls an der Steuerung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  sind die Mitochondrien beteiligt (s. Abbildung 1.1) (32; 50; 57; 61).

$\text{Ca}^{2+}$ -Ionen bewirken mittels zweier Hauptwege die Kontraktion der glatten Muskelzelle. In beiden Fällen binden sie zunächst an das cytosolische Protein Calmodulin (CaM). Der Ca-CaM-Komplex kann dann sowohl an CaD binden und dadurch die Myosinbindungsstelle des Aktins und die MyosinATPase freigeben, als auch die Myosinleichtkettenkinase (MLCK) aktivieren, die dann die rMLC phosphoryliert und den Querbrückenzyklus in Gang setzt. Die Dephosphorylierung der rMCL und damit auch die Beendigung des Querbrückenzyklus wird durch die Typ1-Myosin-Phosphatase (MLCP) gewährleistet (s. Abbildung 1.2). Auf verschiedenen Wegen kann die Empfindlichkeit der Myofilamente gegenüber  $\text{Ca}^{2+}$  angepaßt und damit die Kontraktilität der glatten Muskelzelle reguliert werden. Eine erhöhte Ca-Sensitivität wird vor allem durch Inhibition der MLCP, eine Verringerung unter anderem durch Aktivitätsverminderung der MLCK durch Phosphorylierung erreicht. Eine gute Übersicht zu Myosin-Phosphorylierung und Ca-Sensitization bietet *Pfitzer* (49).

### 1.2.3 Membranpotential und Ionen-Kanäle

Während die Tonussteuerung in der quergestreiften Muskulatur und im Herz-

muskel durch die Ausbreitung von Aktionspotentialen, also raschen und sprunghaften Wechseln des Membranpotentials, realisiert wird, spielen in der glatten Gefäßmuskulatur kontinuierliche Veränderungen des Membranpotentials eine große Rolle. Das Membranpotential glatter Gefäßmuskelzellen bei normalem intravasalen Druck liegt *in vitro* zwischen -40 und -60mV, *in vivo* wurden Werte zwischen -40 und -55mV gemessen. Wichtigste Träger dieses Potentials sind die Permeabilitäten für  $K^+$  und  $Cl^-$ . Das Gleichgewichtspotential für  $K^+$  liegt bei etwa -85mV, das für  $Cl^-$  bei ca. -31mV. Bereits Veränderungen des Membranpotentials im Millivoltbereich können signifikante Änderungen des Gefäßdurchmessers bewirken. Die Kopplung zwischen Muskelkontraktilität und Membranpotential wird vorwiegend durch spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle in der Plasmamembran gewährleistet, wobei Potentialänderungen um 3mV den  $Ca^{2+}$ -Einfluß verdoppeln oder halbieren können. Des weiteren beeinflusst das Membranpotential die intrazelluläre  $Ca^{2+}$ -Konzentration durch Regulation des NCX und aufgrund der Spannungsabhängigkeit der  $IP_3$ -Produktion (44).

An der Steuerung des Membranpotentials sind also vor allem  $K^+$ - und  $Cl^-$ -Ionenkanäle beteiligt, für die Änderungen des intrazellulären  $Ca^{2+}$  spannungsabhängige  $Ca^{2+}$ -Kanäle. Auf die Funktion von  $Ca^{2+}$ -Kanälen wurde bereits eingegangen. Die Rolle von  $K^+$  - und  $Cl^-$ -Kanälen wird im folgenden behandelt.

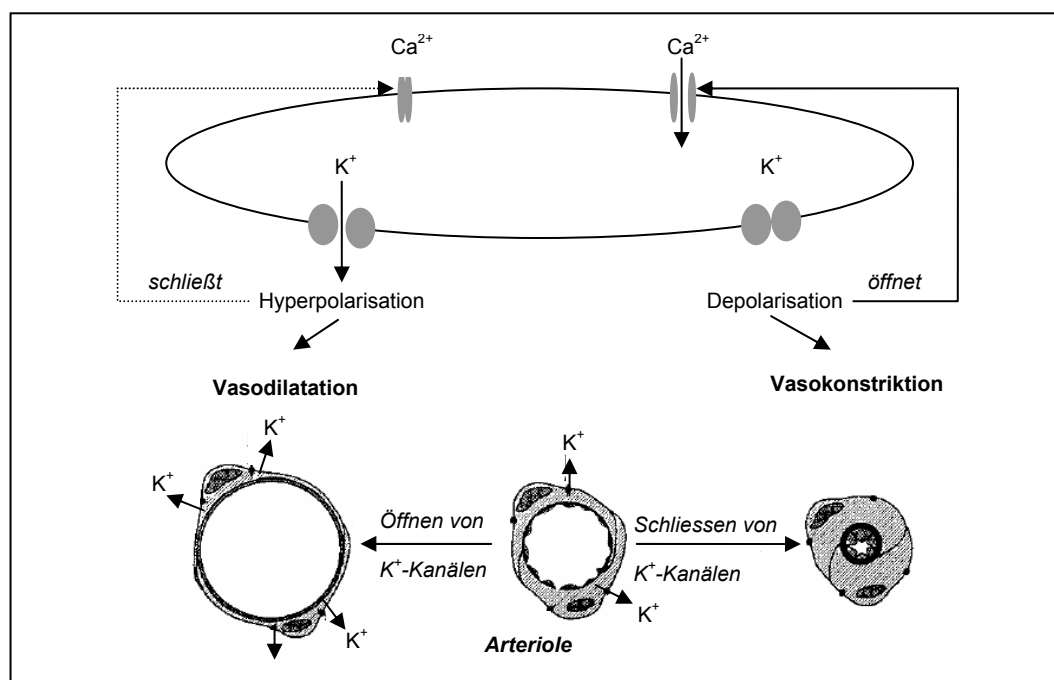


Abbildung 1.3:  $K^+$ -Kanäle und Gefäßtonus. Modifiziert nach Jackson, 2000 (29).

### 1.2.3.1 $K^+$ -Kanäle

Die Hyperpolarisation der Plasmamembran durch die Aktivierung von  $K^+$ -Kanälen führt zu einer Verringerung des  $Ca^{2+}$ -Einstromes und dadurch zur Vasodilatation (s. Abbildung 1.3). In der glatten Gefäßmuskulatur werden derzeit vier Familien von  $K^+$ -Kanälen unterschieden: spannungsabhängige  $K_V$ -Kanäle,  $Ca^{2+}$  gesteuerte  $K_{Ca}$ -Kanäle, ATP abhängige  $K_{ATP}$ -Kanäle und sogenannte *inward rectifier*  $K_{IR}$ -Kanäle, bei denen der  $K^+$ -Einstrom den  $K^+$ -Ausstrom überwiegt. Die verschiedenen Kanaltypen unterscheiden sich in ihren physiologischen Eigenschaften und können durch unterschiedliche Pharmaka weitestgehend selektiv beeinflusst werden.

#### *$K_V$ -Kanäle*

Mit Depolarisierung des Membranpotentials erhöht sich die Offenwahrscheinlichkeit der spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanäle und damit auch das Ausmaß des  $K^+$ -Ausstroms. Dadurch kommt es zur Stabilisierung des Membranpotentials, weil der  $K^+$ -Ausstrom eine weitere Depolarisation verlangsamt oder ausgleicht. Da  $K_V$ -Kanäle erst ab bestimmten Schwellenwerten reagieren, dann aber das Membranpotential wiederherstellen, werden sie auch als *delayed rectifier* bezeichnet.  $K_V$ -Kanäle gelten als Zielstrukturen sowohl vasokonstriktorisch als auch –dilatatorisch wirksamer Pharmaka. Dabei wirken Vasodilatoren, deren Signaltransduktion über den cAMP-Weg verläuft, häufig auch als Kanalöffner, während Vasokonstriktoren über erhöhtes intrazelluläres  $Ca^{2+}$  und PKC  $K_V$ -Kanäle schließen können.  $K_V$ -Kanälen wird auch eine Rolle in der Entstehung der essentiellen Hypertonie zugeschrieben. Die wichtigste blockierende Substanz des  $K_V$ -Kanals ist 4-Aminopyridin(4-AP) (29; 44; 65).

#### *$K_{Ca}$ -Kanäle*

$Ca^{2+}$ -aktivierte  $K^+$ -Kanäle kommen ebenfalls ubiquitär in glatten Muskelzellen vor. Die Aktivierung des Kanals erfolgt durch die Erhöhung der intrazellulären  $Ca^{2+}$ -Konzentration und auch durch Membrandepolarisation. Als Hauptfunktionen der  $K_{Ca}$ -Kanäle werden die Stabilisierung des Membranpotentials und die Regulation des muskulären Tonus bei fokaler Erhöhung der  $Ca^{2+}$ -Konzentration vermittelt über Ryanodinrezeptoren angesehen. In Gefäßmuskelzellen aus der

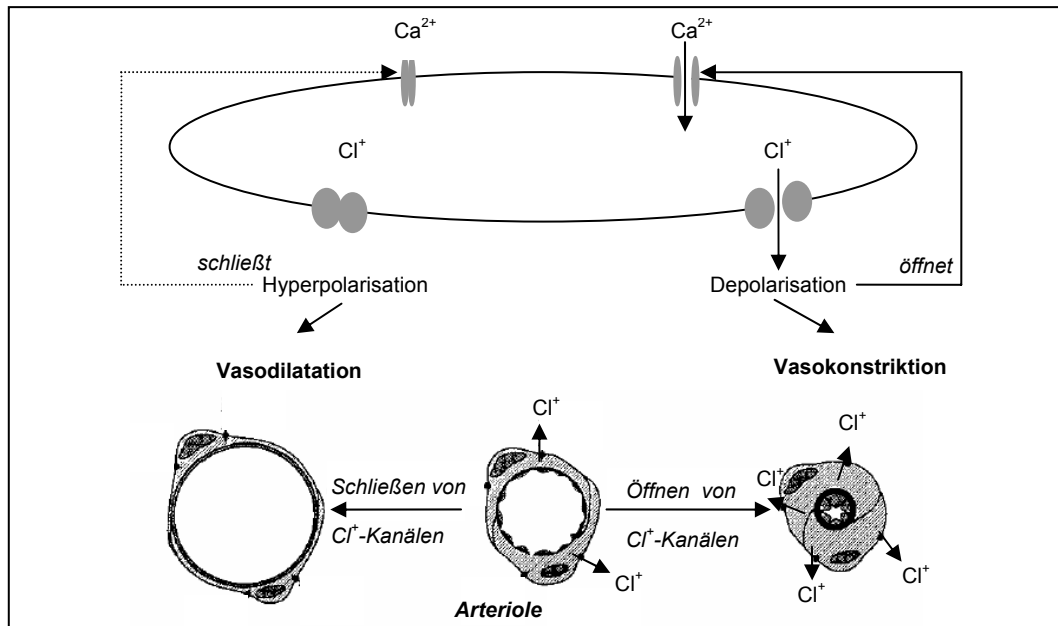
Mikrozirkulation haben  $K_{Ca}$ -Kanäle einen sehr hohen  $Ca^{2+}$ -Schwellenwert für die Aktivierung. Allerdings werden die Kanäle bei aktiv herbeigeführter Vasokonstriktion (z.B. durch Noradrenalin oder bei erhöhter Sauerstoffspannung) aktiviert und limitieren so die überschießende Vasokonstriktion.  $K_{Ca}$ -Kanäle werden ebenfalls von verschiedenen Substanzen über die cAMP und cGMP-Kaskade, Arachidonsäureepoxide und CO aktiviert, während unter anderem die durch Cytochrom P450<sub>4a</sub> gebildete 20-OH-Arachidonsäure die Kanäle verschließen kann. Bei Hypertension werden  $K_{Ca}$ -Kanäle vermehrt exprimiert und gelten als gegenregulatorische Antwort auf die erhöhte Gefäßreaktivität, die unter Hypertension auftritt. Als Kanalblocker werden Tetraethylammoniumchlorid (TEA), Charybdotoxin und Iberiotoxin verwendet (29; 44).

#### *K<sub>ATP</sub>-Kanäle*

Diese Kanalfamilie wird durch erhöhte intrazelluläre ATP-Konzentration geschlossen. Allerdings spielen auch hier weitere Signaltransduktionswege eine Rolle, so werden  $K_{ATP}$ -Kanäle auch durch Vasodilatoren, wie Prostazykline und Adenosin auf dem Weg über cAMP/Proteinkinase A aber auch davon unabhängig aktiviert. Vasokonstriktoren, die über die Proteinkinase C wirken, können auch einen Verschuß des  $K_{ATP}$ -Kanals bewirken.  $K_{ATP}$ -Kanäle scheinen eine wichtige Rolle für die Regulation des Ruhepotentials und damit auch für den Gefäßtonus zu spielen. Als selektiver Blocker wird Glibenclamid eingesetzt (29; 44; 52).

#### *K<sub>IR</sub>-Kanäle*

Die Hyperpolarisierung der Plasmamembran aktiviert die Familie der *inward rectifier*-Kanäle, durch die dann mehr  $K^+$ -Ionen in die Zelle hinein als aus ihr herausströmen. Wahrscheinlich sind auch  $K_{IR}$ -Kanäle an der Aufrechterhaltung des Membranruhepotentials beteiligt. Bei dem in Gehirn, Herz und Skelettmuskulatur beobachteten Phänomen der Vasodilatation durch eine Erhöhung der extrazellulären  $K^+$ -Konzentration gilt die Aktivierung sowohl von  $K_{IR}$ -Kanälen als auch von  $Na^+/K^+$ -ATPase als entscheidender Mechanismus. Zur Blockade von  $K_{IR}$ -Kanälen werden  $Ba^+$ -Ionen eingesetzt (29; 44; 51; 52).

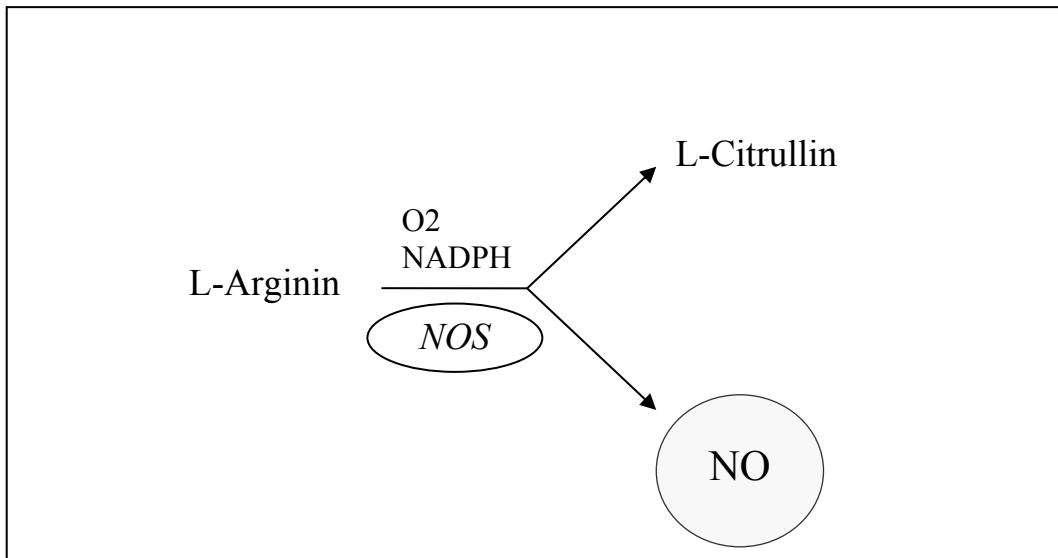


**Abbildung 1.4:** Cl<sup>-</sup>-Kanäle und Gefäßtonus. Modifiziert nach Jackson, 2000 (29).

Zusammenfassend ist festzuhalten, daß K<sup>+</sup>-Kanäle den Gefäßtonus über die Regulation des Membranpotentials glatter Gefäßmuskelzellen beeinflussen und somit verschiedene Signalwege zur Vasokonstriktion wie -dilatation integrieren.

### 1.2.3.2 Cl<sup>-</sup>-Kanäle

Auch Cl<sup>-</sup>-Kanäle sind an der Regulation des Membranpotentials beteiligt. Da im Gegensatz zum K<sup>+</sup> hierbei negative Ladungsträger durch die Kanäle ausgetauscht werden, führt die Öffnung von Cl<sup>-</sup>-Kanälen zu einer Depolarisation und Vasokonstriktion, während der Verschluss von Cl<sup>-</sup>-Kanälen hyperpolarisiert und damit eine Vasodilatation bedingt (s. Abbildung 1.4). Es sind zwei verschiedene Typen von Cl<sup>-</sup>-Kanälen bekannt, kalziumabhängige Cl<sub>Ca</sub> und Volumen-regulierte Cl<sub>VR</sub>-Kanäle. Cl<sub>Ca</sub>-Kanäle werden wie K<sub>Ca</sub>-Kanäle durch erhöhte Ca<sup>2+</sup>-Konzentrationen aktiviert. Umstritten ist, wie groß ihr Einfluß auf das Membranpotential ist, da K<sub>Ca</sub>-Kanäle in wesentlich höherer Dichte in der Plasmamembran vorkommen. Allerdings gibt es vermehrt Hinweise darauf, daß Cl<sup>-</sup>-Kanäle wesentlich an der Steuerung der intrazellulären Ca<sup>2+</sup>-Konzentration beteiligt sind. Zur Funktion von Cl<sub>VR</sub>-Kanälen ist bislang nur wenig bekannt (29).



**Abbildung 1.5:** Schema der NO-Synthese.

#### 1.2.4 NO und das Endothel

Die Erforschung der Steuerung des arteriellen Tonus gewann an Dynamik, seit *Furchgott* und *Zawadzki* die entscheidende Steuerungsrolle des Endothels und *Palmer et al.* sowie *Ignarro et al.* die Funktion des Stickstoffmonoxids (NO) als wichtigem Botenstoff zwischen Endothel und glatter Muskulatur aufzeigen konnten (18; 27; 46).

Das stabile Gas NO wird aus L-Arginin durch das Enzym NO-Synthetase (NOS)

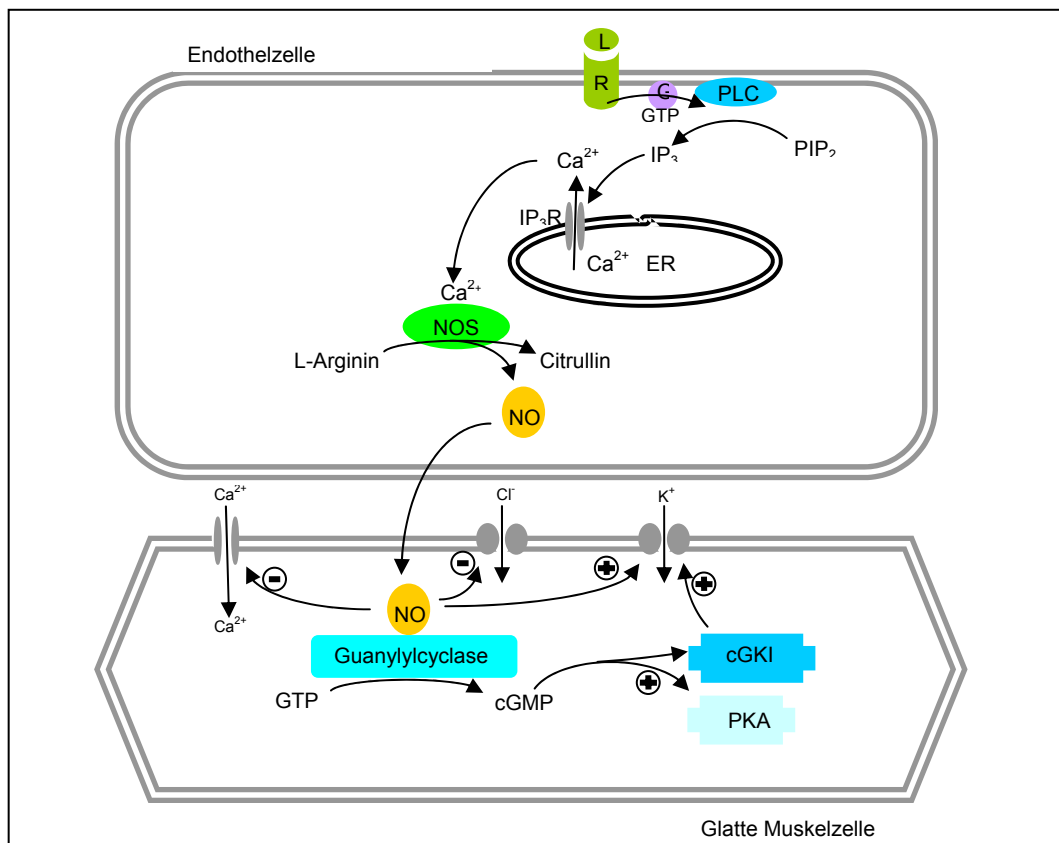
Merkmal	cNOS	iNOS
Vorkommen	Endothel-Zellen, Thrombozyten, Neuronen	Leukozyten, Makrophagen, Kupffer-Zellen, Mesangium-Zellen, verschiedene Parenchym-Zellen, Endothel-Zellen, glatte Muskelzellen
Aktivität	Permanent	Induzierbar durch inflammatorische Stimuli, Zytokine
Calcium-Einfluß	Abhängig	Unabhängig
Membranbindung	Ja	Nein
NO-Freisetzung	Kurzlebig und schnell	Verzögert und nachhaltig
NO-Konzentration	Picomolar (physiologisch)	Nanomolar (pathologisch)
Hemmstoffe	L-Argininanaloga	L-Argininanaloga Glucocorticoide

**Tabelle 1.1:** Merkmale von konstitutiver (cNOS) und induzierbarer (iNOS) NO-Synthetase. Nach *Kirkeboen und Strand*, 1999 (35).

synthetisiert (s. Abbildung 1.5). Von der NOS sind drei Isoformen bekannt: endotheliale, neuronale und induzierbare (iNOS) NO-Synthetase. Die beiden erstgenannten sind konstitutiv exprimierte Enzyme und werden daher auch als konstitutive NOS (cNOS) bezeichnet. Neuere Forschungsergebnisse von *Buchwalow et al.* zeigen, daß die verschiedenen NOS-Unterformen in fast allen Geweben nachweisbar sind. Daher werden die drei Subtypen auch als NOS 1 (neuronaler Typ), NOS 2 (induzierbarer) und NOS 3 (endothelialer Typ) bezeichnet (12).

Zwischen cNOS und iNOS bestehen eine Reihe wesentlicher Unterschiede, die in Tabelle 1.1 zusammengefaßt sind.

Verschiedenste Hormone und Pharmaka wirken rezeptorvermittelt über NO relaxierend auf die glatte Gefäßmuskulatur. Beispielsweise aktivieren die, in der apikalen Membran von Endothel-Zellen befindlichen muskarinischen Cholinozeptoren, in Gefäßen vor allem  $M_3$ -Rezeptoren, nach Bindung von Acetylcholin über den  $IP_3$ -Weg und die Erhöhung des intrazellulären  $Ca^{2+}$  die eNOS. Das daraufhin gebildete NO diffundiert in die benachbarten glatten



**Abbildung 1.6:** Vereinfachtes Schema der NO-vermittelten Vasodilatation - Signaltransduktion zwischen Endothel und glatter Gefäßmuskulatur: G-Protein(G) gekoppelter Rezeptor (R), Phospholipase C (PLC), Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP<sub>2</sub>), Inositol-1,4,5-trisphosphonat (IP<sub>3</sub>), IP<sub>3</sub>-Rezeptor (IP<sub>3</sub>R), Endoplasmatisches Retikulum (SR), Stickstoffmonoxid (NO), NO-Synthetase (NOS), cGMP-dependente Proteinkinase I (cGKI), Proteinkinase A (PKA).



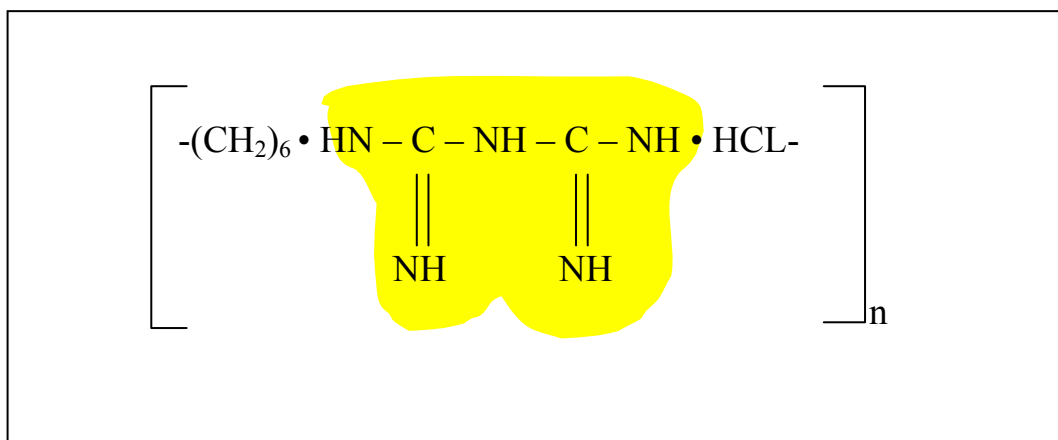
Muskelzellen und aktiviert dort das Enzym Guanylylcyclase. Die Guanylylcyclase synthetisiert dann aus GTP zyklisches Guanosinmonophosphat (cGMP). cGMP wirkt auf verschiedenen Wegen muskelrelaxierend. Ein Weg ist die Aktivierung der cGMP-abhängigen Proteinkinase I (cGKI), die wiederum durch Phosphorylierung  $K_{Ca}$ -Kanäle aktivieren und damit die Zellmembran hyperpolarisieren kann (s.o.) (2).

Versuche mit cGKI-knock-out Mäusen haben gezeigt, daß neben der  $K_{Ca}$ -vermittelten Relaxation auch noch andere Signaltransduktionswege durch NO aktiviert werden. Dabei spielen sowohl eine cGMP-cAMP cross-activation als auch eine Aktivierung der cAMP abhängigen Proteinkinase A (PKA) eine Rolle (s.Abbildung 1.6) (24; 56; 71).

NO spielt über die Regulation des Gefäßtonus hinaus eine wichtige Rolle in Inflammationsprozessen und bei der Apoptose. Gerade bei systemischen Inflammationen, wie z.B. Sepsis und SIRS, kommt NO sowohl als pro- als auch als antiinflammatorischer Mediator ein zentraler Platz in der Pathogenese zu (30; 35).

### 1.3 Lokale Antiinfektiva

Lokale Antiinfektiva, auch als Antiseptika bezeichnet, wurden bereits Anfang des letzten Jahrhunderts in der Wundbehandlung und der Therapie der Peritonitis verwendet. Seit der Entdeckung der Antibiotika spielten sie eine nur kleine Rolle, erfahren aber seit etwa 15-20 Jahren eine Renaissance. Gegenüber den Antibiotika als systemischen Antiinfektiva haben Antiseptika verschiedene Vorteile:



**Abbildung 1.7:** Chemische Struktur des zugrundeliegenden Biguanid-Monomers von Polyhexanid. Gelb markiert ist die Biguanidgruppe.

1. Ihre Wirkweise ist mikrobizid mit weitem Wirkspektrum im gram-positiven wie –negativen Bereich sowie gegen Pilze.
2. Resistenzentwicklungen sind bisher nicht beschrieben und aufgrund der bakteriziden Wirkung nicht zu erwarten.
3. Hohe Wirkkonzentrationen werden am Einsatzort erreicht, während nur geringe systemische Konzentrationen auftreten.
4. Von Sensibilisierungen wird wesentlich seltener berichtet als bei Antibiotika.

Vor allem wegen der hohen lokal erreichbaren Wirkstoffkonzentrationen werden an lokale Antiinfektiva jedoch auch sehr hohe Anforderungen bezüglich der Gewebeverträglichkeit gestellt. Diese Untersuchungen finden vor allem an Zellkulturen, Kressesaat und der Chorionallantoismembran von Hühnereiern statt. Allerdings gibt es kaum Untersuchungen zu Auswirkungen auf den lebenden Gesamtorganismus. Als besonders effektiv und verträglich gilt das Polyhexanid.

Polihexamethylenbiguanid-Hydrochlorid, international abgekürzt als Polyhexanid, gehört zur Stoffklasse der Biguanide. Vertreter dieser Stoffklasse werden seit langem zur oralen Diabetesbehandlung (z.B. Metformin) und als Antiseptika eingesetzt. Polyhexanid ist ein Polymer mit einer durchschnittlichen Polymerlänge von  $n=5$  Monomeren (Molekulargewicht ca. 1100 Da), enthält aber auch sehr kurze ( $n=2$ ; MW: 400 Da) und sehr lange ( $n=15$ ; MW: 3300 Da) Ketten (s. Abbildung 1.7). Längerkettige Polymere zeigen erhöhte mikrobizide Aktivität, dabei steigt die Aktivität mit der Anzahl der Ketten. Allerdings schwächt sich dieser Trend bei Kettenlängen mit  $n>6$  ab (9).

Das basische Polymer besitzt eine hohe Affinität zu sauren Phospholipiden wie dem Phosphatidylglycol, aus denen vor allem bakterielle Membranen aufgebaut sind, während neutrale Phospholipide wie Phosphatidylethanolamin, einer der Hauptkomponenten der Zellmembran von Säugetieren, weitestgehend unaffektiert bleiben. Die Komplexierung von Phosphatidylglycol mit Biguanid an der Außenseite der bakteriellen Plasmamembran induziert komplementierende Ladungen auf der Gegenseite. Diese Alteration der Doppelmembran bewirkt eine Änderung der Löslichkeitseigenschaften und führt zum „Leck“ niedrigmolekularer zytoplasmatischer Substanzen und zum Funktionsverlust membranständiger Enzyme (z.B.:  $\text{Na}^+/\text{K}^+$ -ATPase). Es bilden sich in Folge der Desintegration der Plasmamembran Präzipitate aus Biguaniden und phosphathaltigen Plasmabestandteilen

(ATP, Nukleinsäuren), und es kommt zum subsequenten Untergang des Bakteriums. Da der zugrunde liegende Prozeß ladungsvermittelt, also rein physikochemisch ist, zeigen langkettige Biguanidpolymere durch die größeren entstehenden Komplexe stärkere Auswirkungen auf die Doppelmembran als kurzkettige Polymere oder Biguanidmonomere (8; 10; 21; 22; 28). Eventuell verbessert Macrogolum durch hydrophobe und -phile Wechselwirkungen mit Zellmembranen die mikrobizide Wirkung des Polyhexanid noch zusätzlich (16).

*Kramer et al.* konnten in vitro die deutliche Überlegenheit von Lavasept<sup>®</sup>, einer Lösung von Polyhexanid in Macrogolum (Polyethylenglycol), gegenüber anderen üblichen Antiseptika (z.B. Iod, Wasserstoffperoxyd, Benzalkoniumchlorid u.a.) in Bezug sowohl auf mikrobizide Wirksamkeit als auch auf Verträglichkeit nachweisen. Polyhexanid führt innerhalb von Minuten zu hohen Keimzahlreduktionen. Diese werden sowohl bei grampositiven wie -negativen Bakterien als auch bei Candida-Arten erreicht. In verschiedenen Toxizitätsprüfungen (Kressetest, FL-Zellkultur, Prüfung an der Chorionallantoismembran des Hühneris, Explantationstests mit Haut und Peritoneum der neonatalen Ratte) zeigte Lavasept<sup>®</sup> eine hohe Gewebeerträglichkeit und eine günstige therapeutische Breite (38; 39). Im Gegensatz zur Anwendung von Antibiotika trat unter Polyhexanid-Anwendung keinerlei Resistenzentwicklung auf.

Klinische Anwendung findet Polyhexanid vor allem in der Wundbehandlung, der intraoperativen Spülung und in der Ophthalmologie. *Schmidt-Neuerburg et al.* zeigten in einer kontrollierten, randomisierten, prospektiven Doppelblindstudie die Wirksamkeit von Polyhexanid in der Behandlung infizierter Weichteilwunden. Dabei kam es unter Anwendung feuchter Kompressenverbände mit Polyhexanid verglichen mit Ringer-Lösung zu einer schnelleren und signifikanten Keimreduktion. Auch die Gewebeerträglichkeit von Polyhexanid wurde signifikant besser beurteilt als diejenige von Ringer-Lösung (59). Darüber hinaus liegen leider nur eine begrenzte Anzahl von Fallberichten und retrospektiven Studien vor, die vermuten lassen, daß Polyhexanid günstige Effekte in der Behandlung von Osteitis, Osteomyelitis, Infektionen der Mundhöhle, infizierten Endoprothesen, Brandwunden, Ulcus cruris, Schußverletzungen und bei septischen Operationen der Bauchhöhle besitzt (5; 37; 48; 54; 55; 68; 69; 72).

In der Augenheilkunde wird Polyhexanid zur Behandlung von Keratitiden vor allem aufgrund seiner Wirksamkeit gegen Acanthamoeben und deren Trophozyten

sowie verschiedene Pilze eingesetzt (33; 34; 42; 47; 53; 67).

An unerwünschten Arzneimittelnebenwirkungen wurde bisher von anaphylaktische Reaktionen und die Gefahr von Knorpelschädigungen berichtet (16; 45). Untersuchungen zum Einfluß von Polyhexanid auf die Mikrozirkulation bzw. auf die glatte Gefäßmuskulatur liegen bisher nicht vor.

#### **1.4 Ziel der Studie**

Die vorliegende Arbeit soll mögliche Wirkungen einer peritonealen Anwendung von Polyhexanid auf Makrohämodynamik und intestinale Mikrozirkulation untersuchen. Weiterhin sollen mögliche Mechanismen einer vasoaktiven Wirkung des Polyhexanids auf isometrische Präparationen der thorakalen Rattenaorta betrachtet werden.

Folgenden Fragestellungen soll nachgegangen werden:

1. Senkt die peritoneale Instillation von Polyhexanid den mittleren arteriellen Blutdruck von Ratten im Vergleich zur Anwendung von physiologischer Kochsalzlösung?
2. Führt die lokale Anwendung von Polyhexanid zu einer Dilatation von Gefäßen der Mikrozirkulation im intestinalen Gefäßbett?
3. Hat Polyhexanid eine relaxierende Wirkung auf isometrische Präparationen der thorakalen Rattenaorta? Wird ein möglicher Effekt durch das Endothel vermittelt? Über welche Signaltransduktionswege kommt dieser Effekt zustande?

## 2. Material und Methoden

Alle Untersuchungen an Tieren wurden nach den Richtlinien der Ernst-Moritz-Arndt-Universität für Tierversuche und gemäß der geltenden Tierschutzgesetzgebung durchgeführt. Um unnötigen Tierverbrauch zu vermeiden, wurden die Gruppen so klein wie möglich dimensioniert. Insgesamt wurden in den Teilstudien 40 männliche Lewis-1A Ratten (EMA-Universität, Abteilung Versuchstierkunde, Tierhaus Karlsburg, Deutschland) mit einem Körpergewicht zwischen 250 und 350g verwendet. Alle Tiere wurden bei einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus mit freiem Zugang zu Wasser und Kleintiernahrung gehalten.

### 2.1 In vivo I – Abdominelle Instillation von Polyhexanid

10 männliche Lewis-1A Ratten wurden in zwei Gruppen (Lavage mit Polyhexanid 0,04% (POLY) vs. Lavage mit NaCl (NaCl)) geteilt. Die Narkose wurde durch intraperitoneale Injektion von Trapanal® 100mg/kgKG (Thiopental, Byk Gulden, Konstanz, Deutschland) eingeleitet. Anschließend wurden Hals und Abdomen rasiert. Nach 15 minütiger Stabilisierungsperiode wurde mit der Präparation begonnen. Zunächst wurde das vordere Halsdreieck eröffnet, dann die rechte Arteria carotis communis aufgesucht, mobilisiert und mit Ligaturfäden versehen. Die Zirkulation wurde mit einem Mikroclip (Aesculap®, Tuttlingen, Deutschland) so proximal wie möglich unterbunden. Anschließend erfolgte die Einlage eines Polythene-Katheters (ID 0,75mm/OD 1,22mm, SIMS Portex, UK) in Vasae sectio Technik. Der Katheter wurde mit Ligaturfäden und mittels einer Naht fixiert und über einen Druckmesser (1DT-XX-1 Safedraw, Becton Dickinson, Singapore) an einen Perfusor (Perfusor securi FT, Braun, Melsungen, Deutschland) angeschlossen. Das arterielle Drucksignal wurde auf einen HP-Monitor (Model 66S, H-P GmbH, Böblingen, Deutschland) übertragen, die Herzfrequenz wurde aus dem Pulswellenverlauf ermittelt. Blutdruck und Herzfrequenz wurden alle 15 min. dokumentiert.

Anschließend wurde die linke V. jugularis externa aufgesucht und ebenfalls mittels Vasae sectio Technik katheterisiert. Der Katheter (s.o.) war ebenfalls mit

einem Perfusor (selbes Modell, s.o.) verbunden. Die gesamte Infusionsrate (NaCl 0,9%) wurde auf 15ml/kg/h eingestellt. Danach wurde eine Tracheotomie durchgeführt und ein 16G Venenverweilkatheter (1,7 x 20 mm, Vialon<sup>TM</sup> Insyte-W, Becton-Dickinson, USA) in die Luftröhre eingelegt, über den die Tiere spontan Raumluft atmeten.

Im letzten Schritt wurde die Bauchhöhle über eine Mittellinien-Laparotomie von Xiphoid bis Symphyse eröffnet. Dabei wurde die Elektrokauterisation (Geiger coutery unit, Modell 100, Geiger Instrument Co. INC., USA) eingesetzt, um Blutungen ins Abdomen zu verhindern.

Die Tiere wurden dann auf einen geheizten Plexiglastisch (37°C) gelegt. Dort wurde eine rektale Temperatursonde eingeführt, um die Körpertemperatur der Versuchstiere zu kontrollieren.

Nach einer 60 minütigen Stabilisierungsperiode erfolgte die Instillation von 10ml 37°C warmer gebrauchsfertiger Polyhexanid-Ringer-Lösung, bestehend aus Polyhexanid 0,04% in Macrogol (Lavasept<sup>®</sup>-Ringer-Lösung, Universitätsapotheke Greifswald / Konzentrat: Fresenius KaBi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) (POLY), oder NaCl 0,9% (NaCl) als Kontrolle. Zum Zeitpunkt der Instillation, sowie nach 2 und nach 5 min. wurden Blutdruck und Puls dokumentiert. Nach 10 min. wurde das Abdomen durch Seitenlagerung entleert. Weitere Blutdruck und Pulsmessungen erfolgten 10, 15, 45 und 60 min. nach der Instillation.

Nach Abschluß des Experiments wurden die Versuchstiere durch eine intravenöse Thiopentalinjektion getötet.

## **2.2 In vivo II – Intravitalmikroskopie**

Sieben männliche Lewis-1A Ratten wurden wie im vorherigen Abschnitt präpariert. Nach Eröffnung des Abdomens erfolgte die Umlagerung in Seitenlage auf einen geheizten Plexiglastisch (37°C) (gemeinsam entwickelt mit Dr.med. D. Pavlovic; s. Abbildung 2.1).

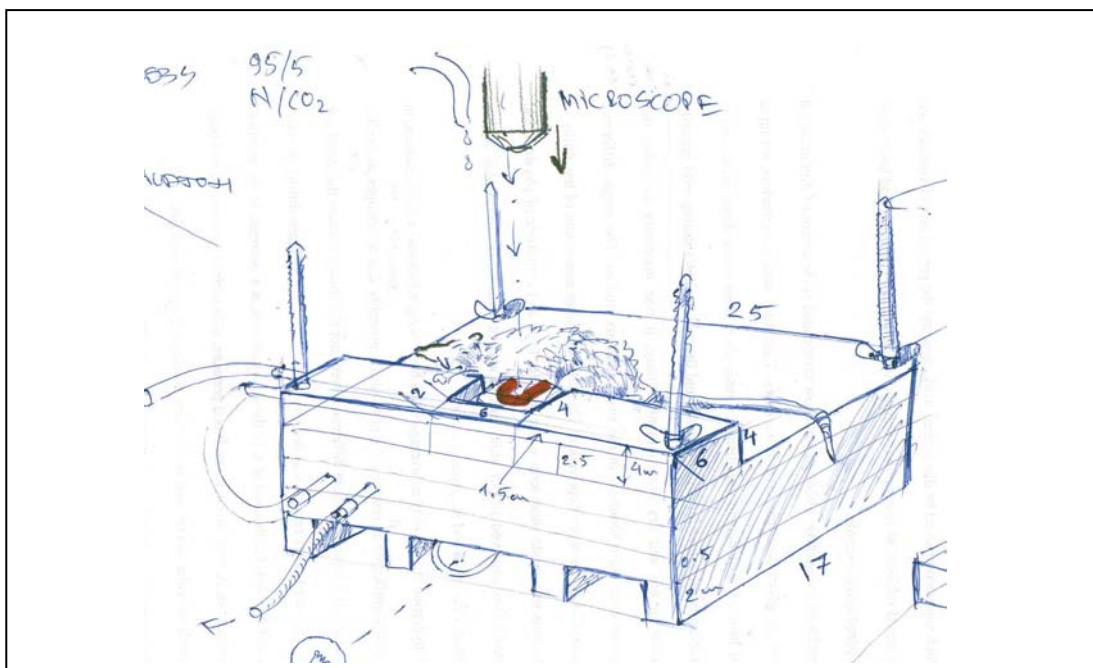
Das terminale Ileum wurde aufgesucht und mit Wattetupfern mobilisiert. Eine etwa 2 cm lange Schlinge wurde aus der Bauchhöhle auf eine Plexiglas-Plattform ausgelagert und permanent mit NaCl 0,9% 37°C aus einem Hotline<sup>®</sup> Flüssig-

keitswärmer (HL-90, LEVEL 1, USA) superfundiert. Die Superfusionslösung stellte den Kontakt zu einem darüber gelagerten Deckgläschen her (s. Abbildung 2.2).

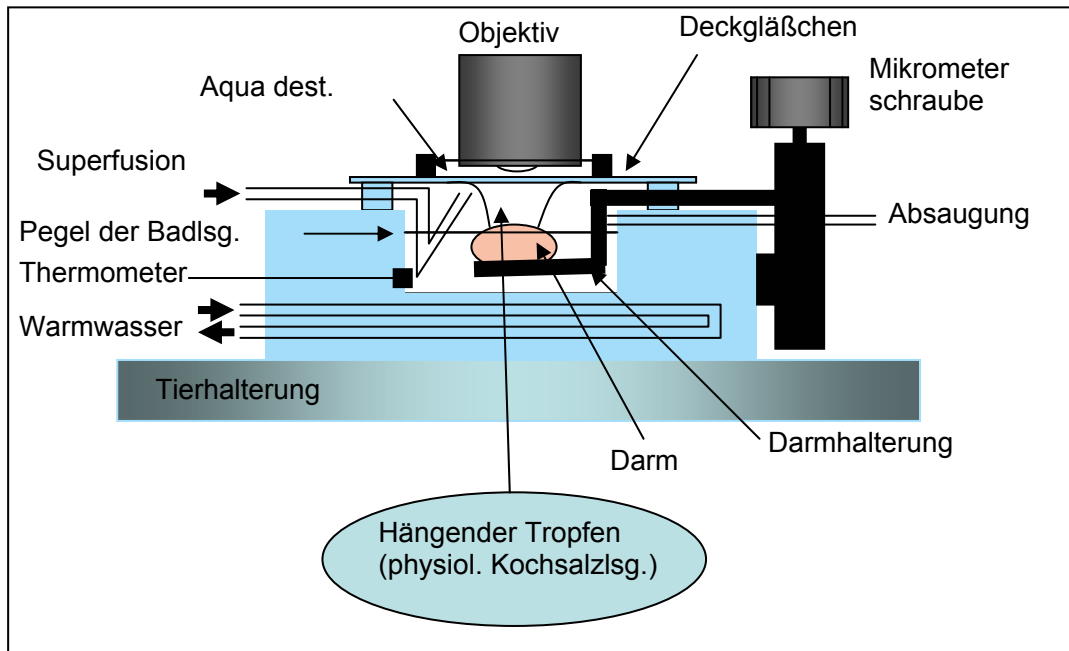
Es erfolgte dann die Plasmakontrastierung durch Infusion von 5% FITC-Dextran 1ml/kg iv (FITC-Dextran, Dextran-Bovine, Fluorescein Isothiocyanat, Sigma Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland).

Die Intravitalmikroskopie wurde mit folgender technischer Ausrüstung durchgeführt

- Epifluoreszenzmikroskop Axiotech Vario, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Lichtquelle HBO 50, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Okulare 10 x, Carl Zeiss, Jena, Deutschland
- Objektiv - 20 x / 0,5; Achroplan, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Detailaufnahmen)
- Filtersatz Nr. 10, Carl Zeiss, Jena, Deutschland (Anregung: BP 450 - 490; Frequenzteiler: 510; Emission: BP 515 - 565) für Beobachtungen mit FITC-Dextran
- Videokamera: AVT-BC 12, AVT-Horn, Aalen, Deutschland
- Videorekorder: Panasonic AG 6200, Matsushita, Tokio, Japan



**Abbildung 2.1:** Schematische Darstellung des neu konstruierten Plexiglasuntersuchungstisches. Zur Verfügung gestellt von Dr. D. Pavlovic.



**Abbildung 2.2:** Schema der Lagerung der Darmschlinge. Zu unterscheiden sind Superfusionslösung und Immersionslösung unter und über dem Deckgläschen.

- Monitor: PM-159, Ikegami Electronics GmbH, Neuss, Deutschland

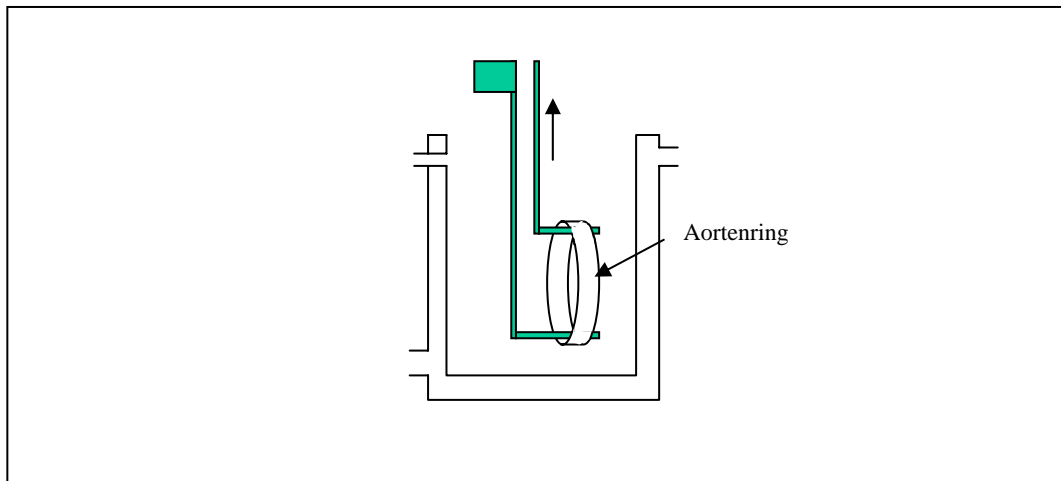
In der beschriebenen Konfiguration wurde eine 270fache Vergrößerung erreicht. Durch die Immersion des Objektivs in einen Tropfen destillierten Wassers konnte eine weitgehende Homogenität der optischen Medien erreicht werden.

Nach einer 15 minütigen Stabilisierungsphase wurde mikroskopisch ein Bereich der Submukosa fokussiert, so daß pro Gesichtsfeld eine Arteriole und eine Venule in ihrem größten Durchmesser (50-350µm) scharf eingestellt waren. Für die offline-Videoanalyse wurde jedes Gesichtsfeld 30 sec. lang aufgezeichnet. Um Verfälschungen der Ergebnisse durch potentielle phototoxische Effekte, wie sie *Steinbauer et al.* beschreiben (62), vorzubeugen, wurden die Belichtungszeiten so kurz wie möglich gewählt.

Nach der Aufzeichnung des Ausgangszustands wurde die ausgelagerte Darmschlinge mit 5ml 37°C warmer gebrauchsfertiger Polyhexanid-Ringer-Lösung (Lavasept®-Ringer-Lösung; Universitätsapotheke Greifswald / Konzentrat: Fresenius KaBi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland) (POLY) über einen Zeitraum von 5 min. superfundiert. Anschließend wurden die zuvor untersuchten Gefäße aufgesucht und erneut für 30 sec. aufgezeichnet. Die Versuchstiere wurden nach Abschluß der Untersuchung mittels einer Überdosis Thiopental iv. getötet.

Zur offline-Bildanalyse wurde die Software Vlength – Interactive Irregular Shape





**Abbildung 2.3:** Schematische Darstellung des verwendeten Systems zur isometrischen Myotonometrie.

Length Measurement (Dipl. Ing. Düsener, Berlin) eingesetzt, um die Durchmesser der aufgezeichneten Gefäße zu bestimmen. Diese computergestützte Erfassung der Gefäßdurchmesser erfolgte an Standbildern. Mittels der Software konnten Meßstrecken bestimmt werden. Diese wurden so gewählt, daß sie senkrecht zur Gefäßwand standen. Gemessen wurde das durchströmte Gefäßlumen, das sich durch die Fluoreszenzmarkierung deutlich vom umliegenden Gewebe und der Gefäßwand abhob. Die angegebenen Durchmesser entsprechen daher dem Innendurchmesser der Gefäße. Für jede Venole und Arteriole erfolgten fünf unabhängige, über das Gesichtsfeld verteilte Messungen.

### 2.3 In vitro – Isometrische Myotonometrie an der thorakalen Aorta der Ratte

19 männliche Lewis-1A Ratten wurden durch einen Schlag auf das Hinterhaupt betäubt und anschließend durch Eröffnung der Bauchaorta ausgeblutet. Die thorakale Aorta wurde entfernt, in Krebs-Lösung (Zusammensetzung s. Tabelle 2.1) gebadet und von anhaftendem Gewebe befreit. In einigen Präparationen wurde das Endothel durch vorsichtiges Reiben mit einem feuchten, mit Watte bezogenen Metallstäbchen entfernt. Die Aorta wurde in acht etwa 3mm breite Ringe geschnitten.

Die Aortenringe wurden auf der Organhalterung des Meßsystems montiert. Der obere Metallhaken wurde an einen isometrischen Kraft-Übermittler (IT1-25, EMKA Tech., Frankreich) angeschlossen. Dieser wurde an einem Mikro-

manipulator aufgehängt, über den der obere Haken entlang der vertikalen Achse bewegt werden konnte (s. Abbildung 2.3).

Das elektrische Signal wurde verstärkt (STA 2808, EMKA Tech., Frankreich) und mit einem Schreiber (Rikadenki multiten recorder, R50-Serie, Hugo Sachs Elektronik, Freiburg, Deutschland) registriert. Nach einer kurzen Stabilisierungsperiode wurden die Aortenringe auf ihre optimale Länge vorgedehnt. In Vorversuchen entsprach diese einem Kontergewicht von 2g. Die Krebs-Lösung im Organbad (37°C; pH 7,4; begast mit 95% O<sub>2</sub>/ 5% CO<sub>2</sub>) wurde alle 20 min. gewechselt.

### 2.3.1 Ablauf der Untersuchung

Es wurde der Effekt der gebrauchsfertigen Lösung von Polyhexanid 0,04% in Macrogol 0,02% und Ringer-Lösung und von der Reinsubstanz Polyhexanid auf den Muskeltonus bestimmt (beide Substanzen: Fresenius KaBi Deutschland GmbH, Bad Homburg, Deutschland). Die Präparationen wurden durch Zugabe verschiedener Substanzen zur Kontraktion gebracht; dem  $\alpha$ -Sympathomimetikum Phenylephrin (PE  $5 \times 10^{-7}$ M), KCl 20 oder 40 mM oder dem Ca-ATPase-Inhibitor Na-Orthovanadat (VAN  $5 \times 10^{-5}$ M) (alle Substanzen: Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland). Sobald die Spannung ihr Maximum erreicht hatte, wurden die Präparationen mit kumulativ aufsteigenden Dosierungen von Polyhexanid behandelt.

### 2.3.2 Substanzen

Einige Präparationen wurden vor Präkontraktion mit PE mit verschiedenen, blockierenden Substanzen für 20 Minuten inkubiert:

	mM		mM
NaCl	113,0	NaHCO <sub>3</sub>	25,0
KCl	4,8	CaCl <sub>2</sub>	2,5
MgCl <sub>2</sub> x 6 H <sub>2</sub> O	1,3	Glucose	5,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,2		

**Tabelle 2.1:** Zusammensetzung der Krebs-Henseleit-Lösung.

*Inhibitor der Guanylylcyclase*

- 1H-(1,2,4)Oxodiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ  $5 \times 10^{-4}$ M)

*Inhibitor der Adenylylcyclase*

- 9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine (SQ,  $5 \times 10^{-5}$ M).

Anderen Präparationen wurde nach Präkontraktion mit PE eine der folgenden Substanzen zugesetzt:

*Inhibitor der NO-Synthetase*

- N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME,  $5 \times 10^{-4}$ M)

 *$\beta$ -Rezeptorenblocker*

- Propranolol (PROP  $5 \times 10^{-5}$ M)

*Muscarinischer Acetylcholinrezeptorantagonist*

- Atropin (AT  $5 \times 10^{-7}$ M)

*Blockade von spannungsabhängigen  $K^+$ -Kanälen ( $K_V$ )*

- 4-Aminopyridin (4-AP,  $5 \times 10^{-5}$ M)

*Blockade von Kalzium-abhängigen  $K^+$ -Kanälen ( $K_{Ca}$ )*

- Charybdotoxin (ChTx,  $5 \times 10^{-8}$ M)
- Tetraethylammonium (TEA,  $5 \times 10^{-4}$ M)

*Blockade von ATP-abhängigen  $K^+$ -Kanälen ( $K_{ATP}$ )*

- Glibenclamid (GLIB,  $5 \times 10^{-6}$ M)

(alle Substanzen: Sigma – Aldrich GmbH, Steinheim, Deutschland).

## 2.4 Datenanalyse

Für alle Untersuchungen wurde das Signifikanzniveau bei  $P < 0,05$  festgelegt. Soweit nicht anders angegeben, werden alle Werte als Mittelwert  $\pm$  Standardabweichung dargestellt.

### 2.4.1 In vivo I + II

Für die statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse wurden die Statistikpakete SigmaStat und SigmaPlot (SPSS Inc., Chicago, Ill., USA) sowie GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, San Diego, Cal., USA) benutzt. Zunächst wurde eine deskriptive Statistik erstellt (Mittelwert, Varianz, Standardabweichung, Standardfehler). Die Testung auf Normalverteilung erfolgte nach *Kolmogorov-*

*Smirnov*.

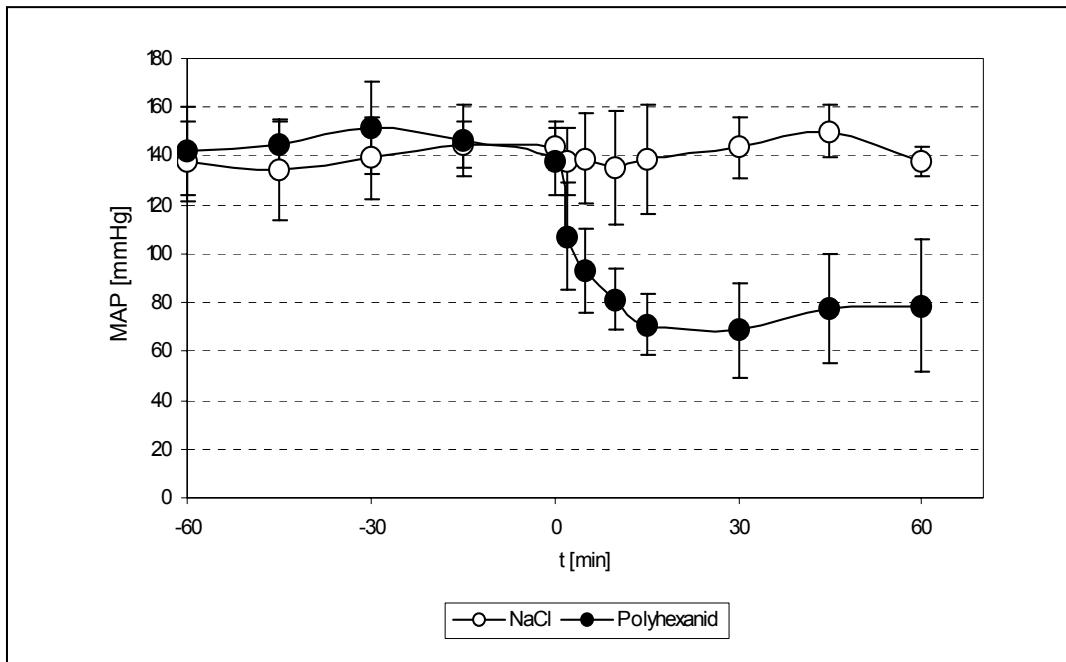
Lag eine Normalverteilung vor, erfolgte ein einfaktorielles Mittelwertvergleich mittels t-Test für gepaarte Proben oder ein mehrfaktorielles Mittelwertvergleich mittels Zwei-Weg-Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA), mit anschließender Anpassung für multiple Vergleiche nach *Bonferroni*.

#### **2.4.2 In vitro**

Für die statistische Analyse und Darstellung der Ergebnisse wurde das Statistikpaket GraphPad Prism 3 (GraphPad Software, San Diego, Cal., USA) benutzt.

Bei allen Präparationen wurden zunächst die absoluten Werte in Gramm sowohl der maximal erreichten Kontraktion, als auch sämtlicher Konzentrationsstufen von LS/Polyhexanid bestimmt. Die absoluten Werte der einzelnen Konzentrationsstufen wurden dann in Relation zur maximalen Spannung gesetzt. Dann wurde eine deskriptive Statistik erstellt (Mittelwert, Varianz, Standardabweichung, Standardfehler) und auf Normalverteilung mit der Methode nach *Kolmogorov-Smirnov* getestet.

Die mittlere Wirkkonzentration zur halb-maximalen Kontraktion ( $EC_{50}$ ) wurde mit der nicht-linearen Regressionsanalyse ermittelt, die Angabe der  $EC_{50}$  erfolgt als negativer Logarithmus der LS/Polyhexanid-Konzentration. Da es sich bei Polyhexanid um ein Polymergemisch handelt, werden die Konzentrationen in g% einer 1%-Lösung in Aqua dest. bzw. als deren negativen Logarithmen angegeben. Der mehrfaktorielles Mittelwertvergleich erfolgte entweder mittels des t-Tests für gepaarte Proben oder der Ein-Weg-Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) mit anschließender Anpassung für multiple Vergleiche nach *Bonferroni*.



**Abbildung 2.1:** Verlauf des mittleren arteriellen Blutdruckes nach intraperitonealer Instillation von 10ml Polyhexanid/NaCl (38°C). Zehnminütige Instillation bei t=0. Bei t=10 Entleerung des Bauchraums durch Umlagerung. n=10.

### 3. Ergebnisse

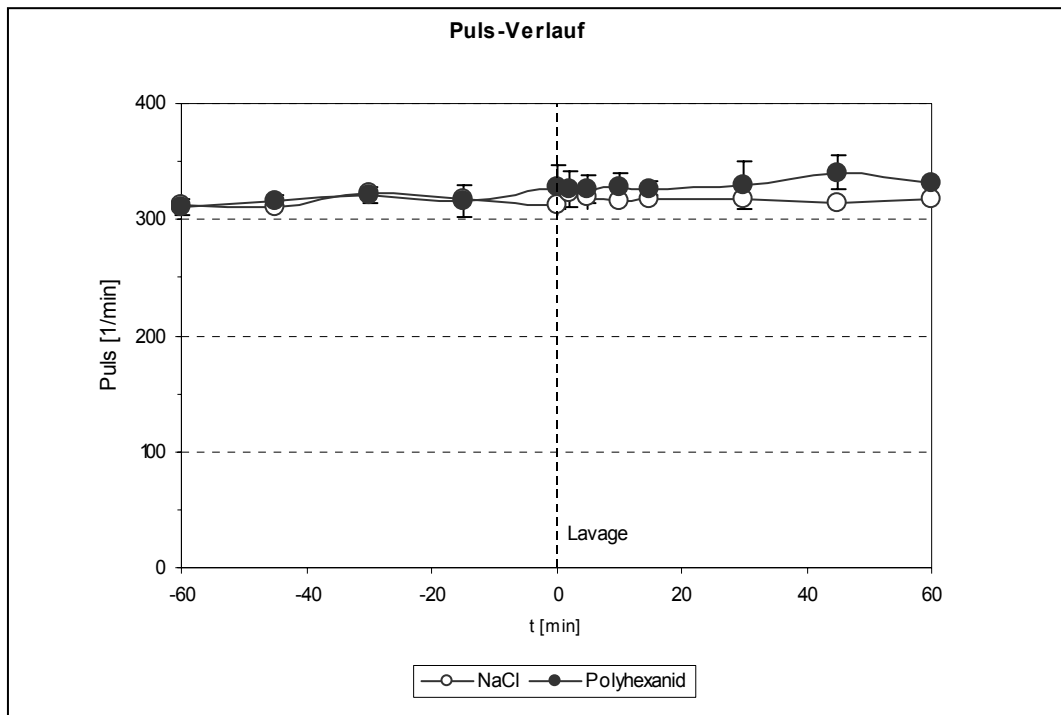
#### 3.1 Auswirkungen der intraperitonealen Instillation von Polyhexanid auf zirkulatorische Parameter

##### 3.1.1 Verlauf des mittleren arteriellen Blutdrucks

Sowohl die Behandlungs- als auch die Kontrollgruppe zeigten in den 60 min. vor der Lavage keine signifikanten Unterschiede (MAP t=-60 – t=0: 144,6±14,8 vs. 140,1±14,5 mmHg; POLY vs. NaCl; n=10; P=0,3).

Mit Beginn der Instillation fielen die Blutdruckwerte in der Polyhexanidgruppe (POLY) rasch stark ab von 138±13,8 auf 81±12,5 mmHg. Vergleicht man den mittleren arteriellen Druck vor und nach Lavage, so zeigt sich eine deutliche Differenz zwischen POLY und Kontrollgruppe (NaCl) (s. Abbildung 2.1). So blieb der mittlere arterielle Druck in NaCl mit 142,8 ± 16,6 mmHg annähernd konstant, während in POLY ein Abfall des MAP auf 76,2 ± 18,7 mmHg zu verzeichnen war (P<0,001).

Einem zu vernachlässigenden Blutdruckanstieg von 2,7±11,9 mmHg in der NaCl-Gruppe stand ein statistisch signifikanter Blutdruckabfall von 68,3±17,9 mmHg in der POLY-Gruppe gegenüber (P<0,001).



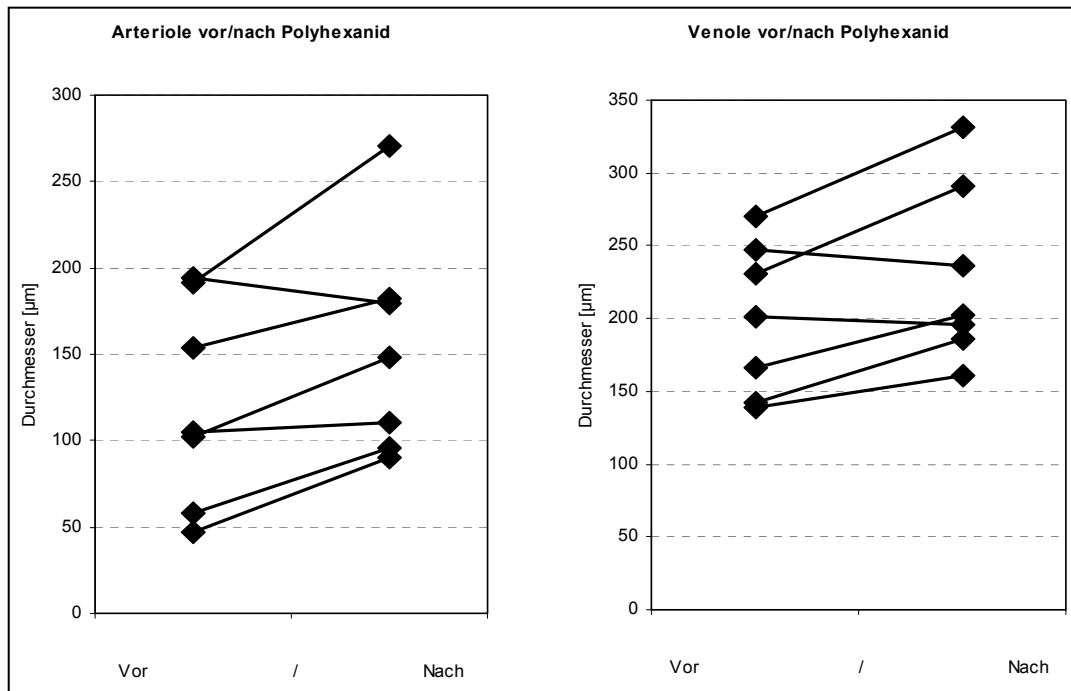
**Abbildung 3.2:** Verlauf der Herzfrequenz vor, während und nach Instillation von 10ml Polyhexanid/NaCl (38°C) in den Bauchraum der Ratte. Zehnminütige Instillation bei t=0. Bei t=10 Entleerung des Bauchraums durch Umlagerung. n=10.

### 3.1.2 Verlauf der Herzfrequenz

Sowohl Behandlungs- als auch Kontrollgruppe zeigten weder in den 60 min. vor, noch in den 60 min. nach Lavage signifikante Unterschiede in der Herzfrequenz (HR t=-60 bis t=0:  $318,4 \pm 19,9$  vs.  $315,0 \pm 15,9$  bpm; POLY vs. NaCl; n=10; P=0,64; HR t=10 bis t=60;  $331,0 \pm 29,2$  vs.  $317,0 \pm 14,9$  bpm; LS vs. NaCl; n=10; P=0,44). Ebenfalls traten keine signifikanten Unterschiede in der Herzfrequenz vor, während und nach Lavage innerhalb der einzelnen Gruppen auf (s. Abbildung 3.2)

### 3.2 Intravitalmikroskopie

Die Superfusion der Serosa mit 5ml 37°C warmer Polyhexanid 0,04% Lösung über 5 min. bewirkte eine signifikante Vergrößerung des Gefäßdurchmessers sowohl der Venen als auch der Arterien.



**Abbildung 3.3:** Durchmesser submuköser Arteriolen und Venolen vor und nach serosaler Superfusion mit 5ml 37°C Polyhexanid 0,04%-Lösung über 5 min. n=7

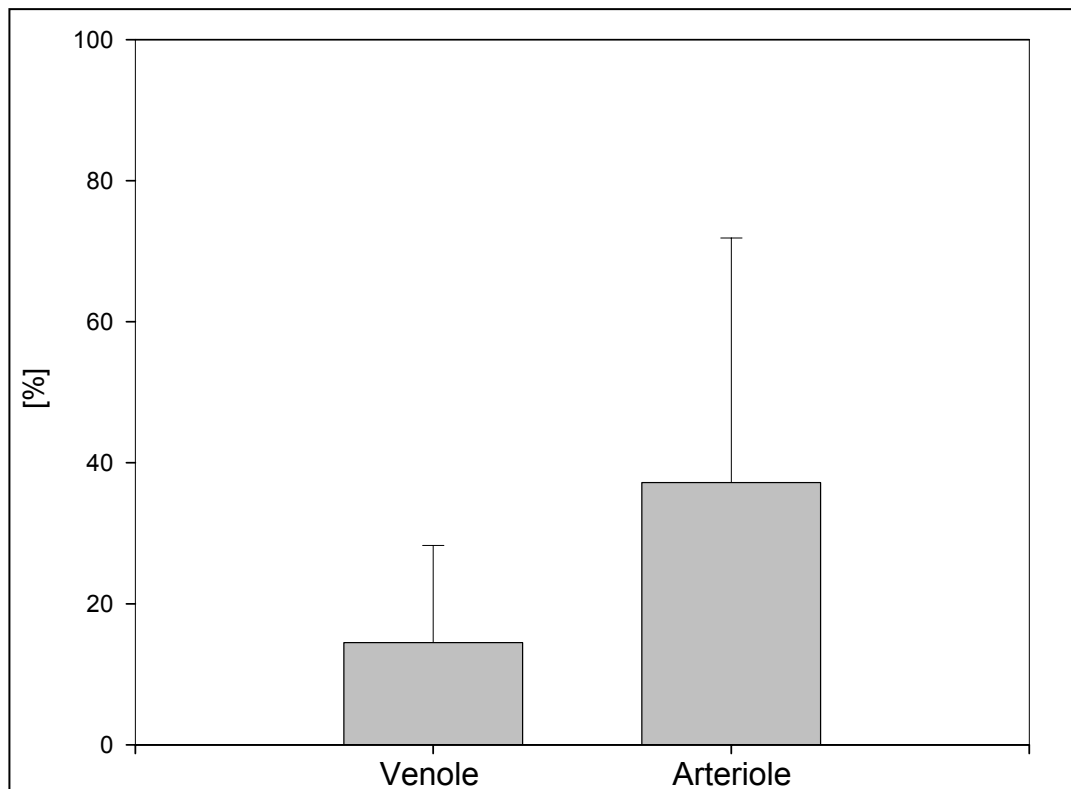
Dabei erweiterten sich die Venen von  $201,5 \pm 20,2 \mu\text{m}$  (MW $\pm$ SEM) auf  $229,2 \pm 25,8 \mu\text{m}$ . Der arterielle Durchmesser stieg von  $121,4 \pm 22,3 \mu\text{m}$  auf  $153,9 \pm 24,1 \mu\text{m}$  (s. Abbildung 3.3).

Das entspricht einer signifikanten Zunahme des venösen Durchmessers um  $14,4 \pm 4,5\%$  ( $p < 0,05$ ) und des Durchmessers der Arterien um  $37,2 \pm 10,5\%$  ( $P < 0,05$ ) (s. Abbildung 3.4). Während der lokalen Superfusion des ausgelagerten Ileumabschnitts wurden keine Veränderungen der systemischen Parameter (MAP, Herzfrequenz) beobachtet

### 3.3 Mechanismen der Polyhexanid bedingten Vasodilatation der thorakalen Aorta der Ratte

#### 3.3.1 Fertiglösung Polyhexanid 0,04%

Die Zugabe der Gebrauchslösung von Polyhexanid 0,04% in Macrogol und Ringer-Lösung in aufsteigender Konzentration von 5,3 bis 2,4 (-log 0,04%) zu Präparationen, die durch PE  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  zur Kontraktion gebracht worden waren, führte zu einer vollständigen Relaxation der Gefäßringe mit Endothel (+End).



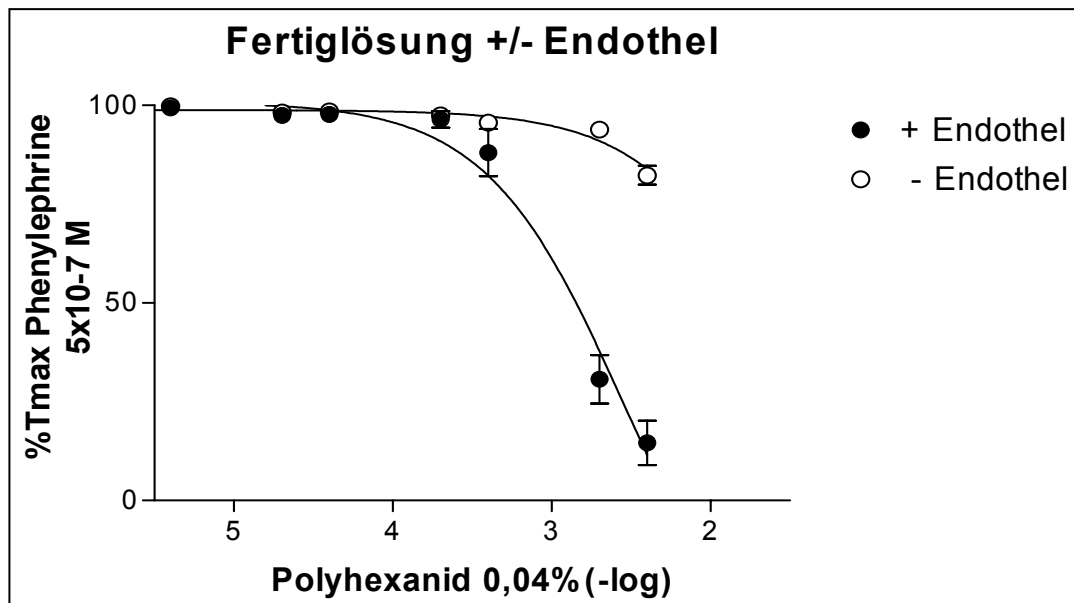
**Abbildung 3.4:**Prozentuale Veränderung des Durchmessers submuköser Arteriolen und Venolen vor und nach serosaler Superfusion mit 5ml 37°C Polyhexanid 0,04% Lösung über 5 min. n=7; P<0,05.

Dabei wurde eine mittlere effektive Konzentration ( $EC_{50}$ ) von  $2,53 \pm 0,16$  (alle Werte als  $MW \pm SEM$ ; angegeben wird der negative Logarithmus der erreichten Konzentration der 0,04%igen Lösung.) ermittelt. Wurde zunächst das Endothel entfernt, so erreichte Polyhexanid nur noch eine schwache Relaxation auf  $82,3 \pm 2,3\%$  der unter PE erzielten maximalen Spannung ( $T_{max}$ ). Es resultierte eine  $EC_{50}$  von  $1,36 \pm 0,16$ . Die erzielbaren Effekte von Polyhexanid in Präparationen mit und ohne Endothel waren signifikant verschieden (n=4; P<0,05) (s. Abbildung 3.5).

### 3.3.2 Wirkstoff Polyhexanid

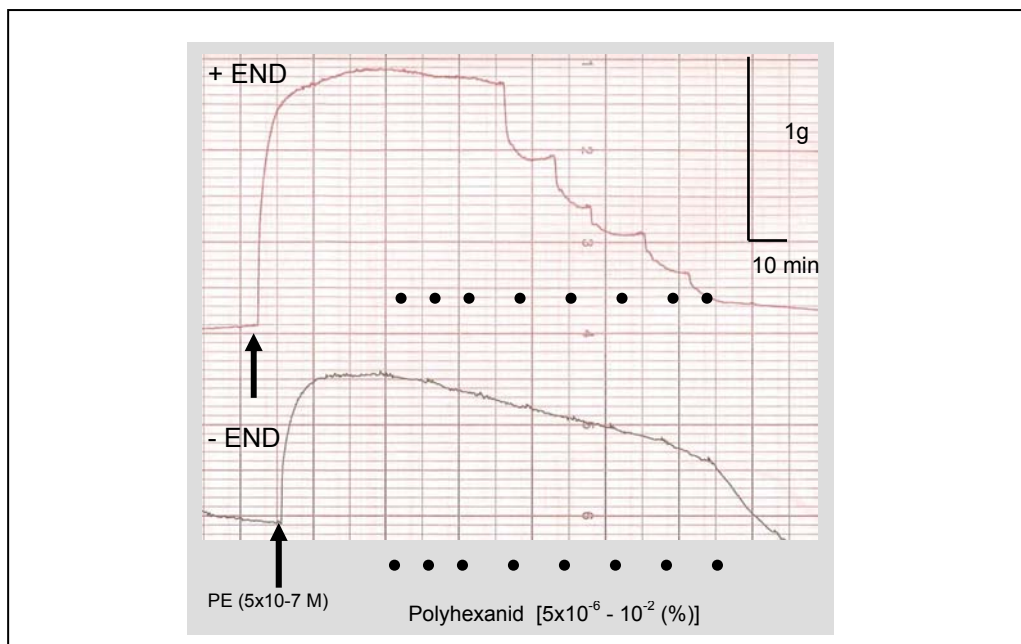
Aufsteigende Konzentrationen von Polyhexanid von 6,7 bis 2,4 (-log g%) führten zu einer vollständigen Relaxation der Präparationen, die durch Zugabe von PE  $5 \times 10^{-7} M$  zur Kontraktion gebracht worden waren (s. Abbildung 3.6). Präparationen mit Endothel (+End) reagierten dabei sensibler als Präparationen ohne Endothel (-End). Polyhexanid führt aber auch in Präparationen -End zu voll-



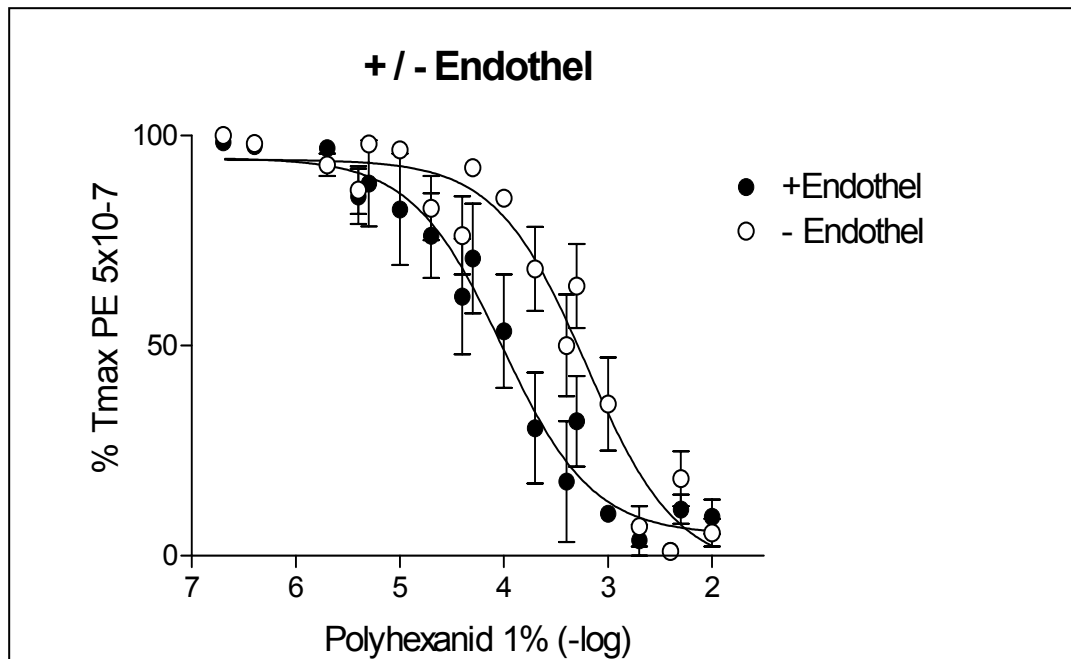


**Abbildung 3.5:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung der Fertiglösung von Polyhexanid 0,04%. PE induzierte Kontraktion; Aortenringe mit bzw. ohne Endothel.  $n=4$ ,  $P<0,05$ , Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse

ständiger Relaxation. In Präparationen +End wurde eine  $EC_{50}$  von  $4,02 \pm 0,1$  (alle Werte:  $MW \pm SEM$ ; angegeben wird der negative Logarithmus der erreichten Konzentration in g% (gilt für alle Untersuchungen mit Polyhexanid)) erreicht, während zur Relaxation der Präparationen -End höhere Konzentrationen ( $EC_{50}$ :  $3,21 \pm 0,1$ ) benötigt wurden.



**Abbildung 3.6:** Typischer Verlauf einer Dosis-Wirkungsaufzeichnung von Polyhexanid. Oberer Graph: Präparation mit Endothel, unterer Graph: ohne Endothel. Kontraktion ausgelöst durch PE  $5 \times 10^{-7}$  M.

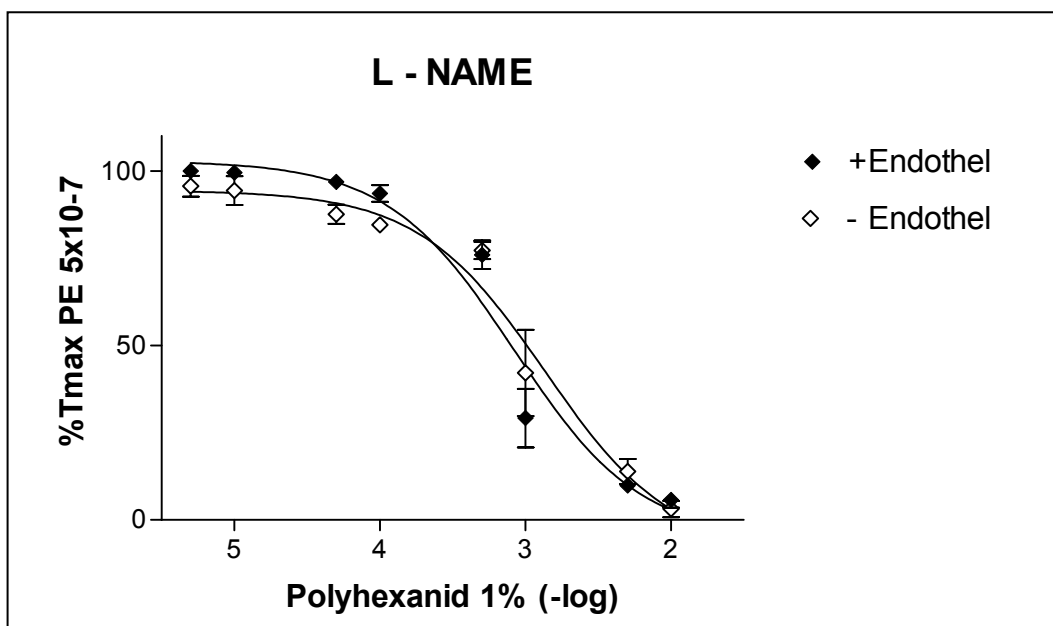


**Abbildung 3.7:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid; PE-induzierte Kontraktion; Aortenringe mit bzw. ohne Endothel. n=12, P<0,001, Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse.

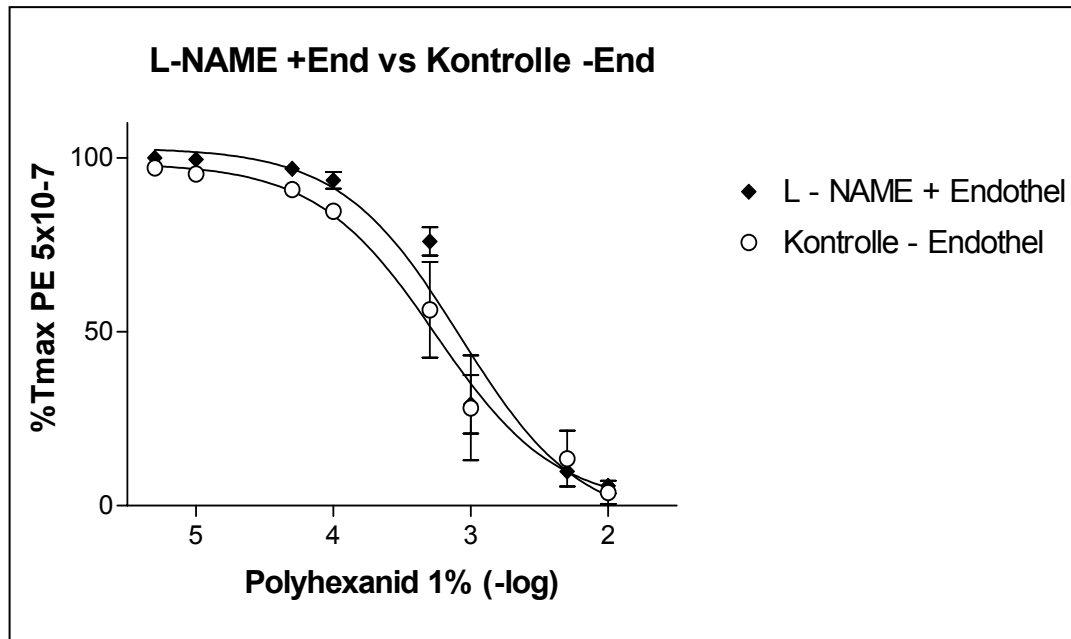
Die erzielbaren Effekte von Polyhexanid in Präparationen mit und ohne Endothel waren signifikant verschieden (n=12; P<0,001) (s. Abbildung 3.7).

### 3.3.3 Inkubation mit NO-Synthetasehemmer: L-NAME

Nach Induktion einer Kontraktion mit PE 5x10<sup>-7</sup>M und Inkubation mit L-NAME

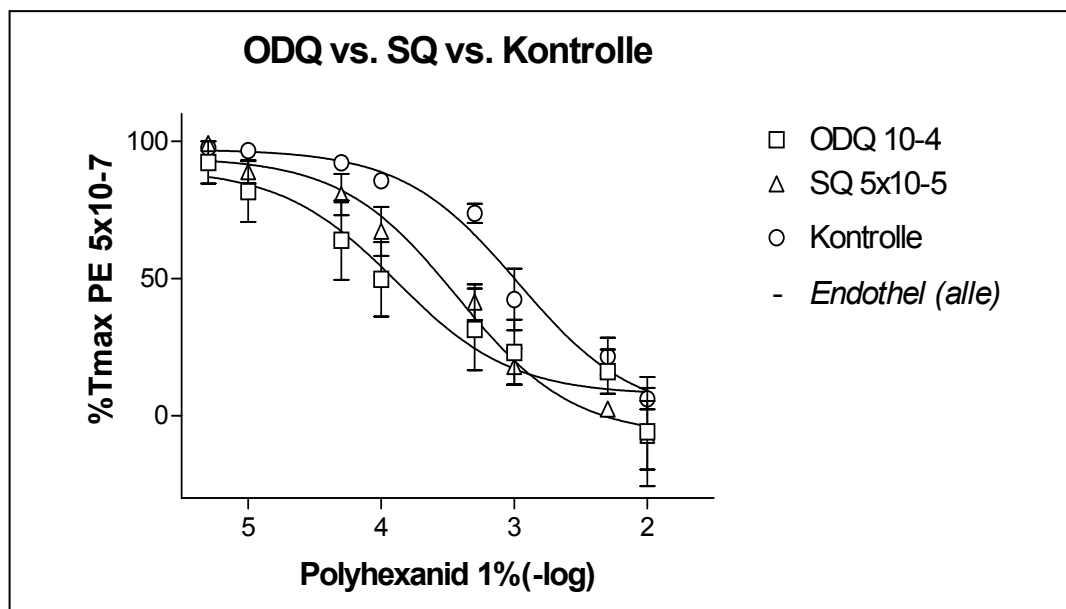


**Abbildung 3.8:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid nach Inkubation mit L-NAME; PE-induzierte Kontraktion; Aortenringe mit bzw. ohne Endothel. n=4, p=0,46, Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse

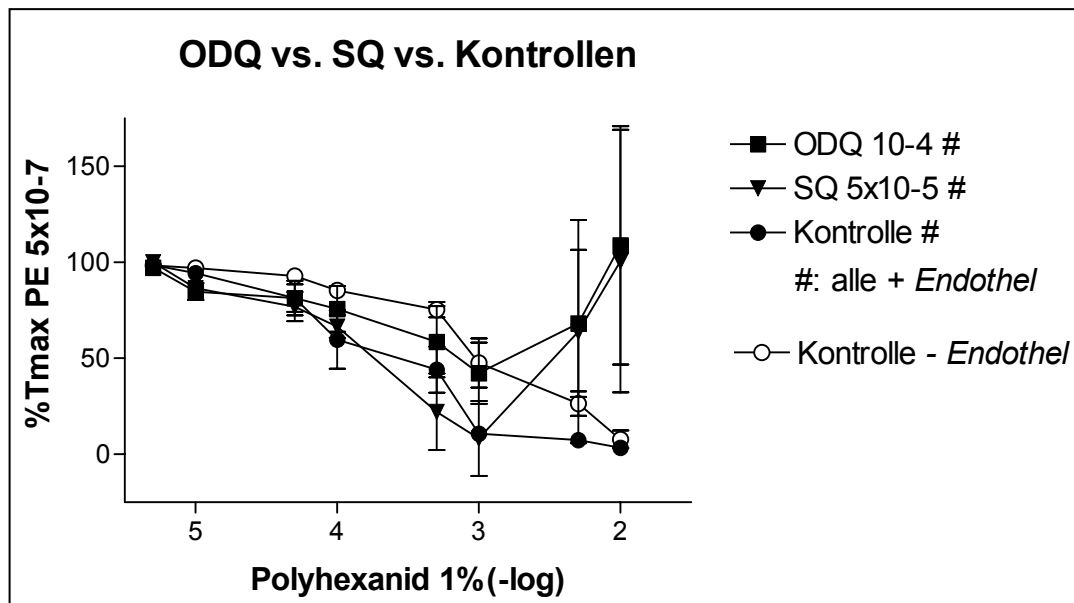


**Abbildung 3.9:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid. Vergleich zwischen nicht vorbehandelten Präparationen ohne Endothel und Präparationen mit Endothel nach Vorbehandlung mit L-NAME; PE-induzierte Kontraktion; Aortenringe. n=4, P=0,054, Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse

$5 \times 10^{-4} \text{M}$  (L-NAME) führten aufsteigende Konzentrationen von Polyhexanid von 5,2 bis 2,0 (-log g%) zur vollständigen Relaxation der Aortenringe. Dabei unterschieden sich Präparationen + und -End nur geringfügig:  $EC_{50}$ :  $3,08 \pm 0,1$  (+End +L-NAME) vs.  $2,866 \pm 1,1$  (-End +L-NAME); n=4; P=0,46 (s. Abbildung 3.8).



**Abbildung 3.10:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid. Vergleich zwischen nicht vorbehandelten Präparationen und Präparationen, die mit ODQ  $4 \times 10^{-4}$  oder SQ  $5 \times 10^{-5}$  inkubiert wurden. PE-induzierte Kontraktion; Aortenringe ohne Endothel. n=5, Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse.



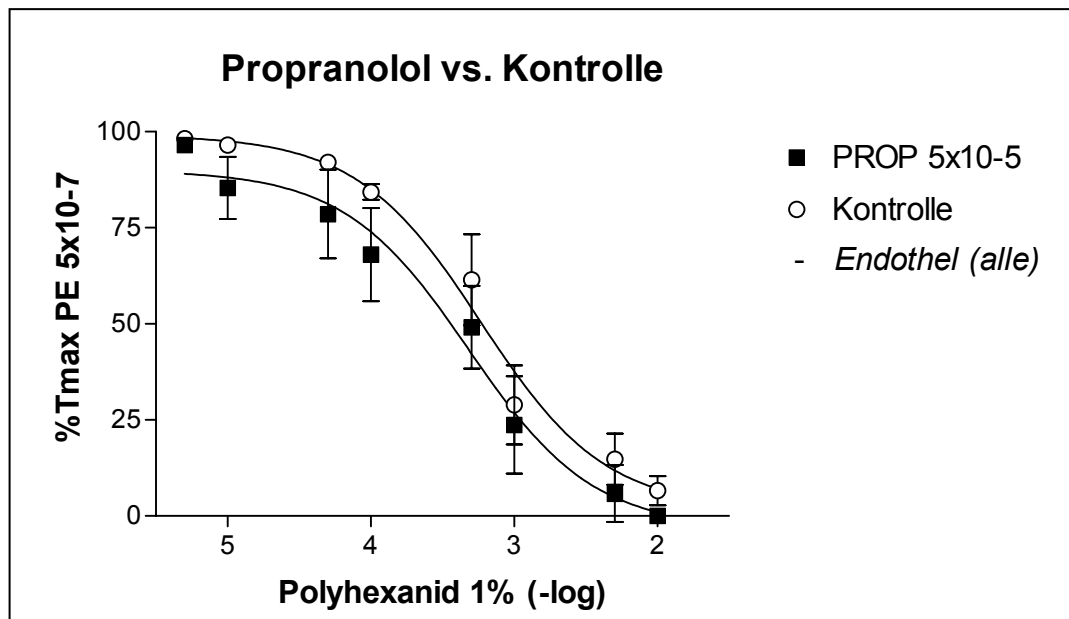
**Abbildung 3.11:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid. Vergleich zwischen nicht vorbehandelten Präparationen mit und ohne Endothel und Präparationen mit Endothel, die mit ODQ  $4 \times 10^{-4}$  oder SQ  $5 \times 10^{-5}$  inkubiert wurden. PE-kontrahierte Aortenringe.  $n=4$

Verglichen mit Kontrollen zeigte sich ein signifikanter Unterschied zwischen den Präparationen +End mit bzw. ohne vorheriger Inkubation:  $EC_{50}$ :  $3,08 \pm 0,1$  (+End +L-NAME) vs.  $3,66 \pm 0,1$  (Kontrolle)  $n=4$ ;  $P < 0,05$ . Dabei fiel auf, daß sich die Dosis-Wirkungskurve der Präparationen +End +L-NAME derjenigen der Kontroll-Präparationen –End annäherte (s. Abbildung 3.9).

### 3.3.4 Inkubation mit ODQ / SQ

Nach Herbeiführung einer Kontraktion mittels PE  $5 \times 10^{-7} M$  und Inkubation mit ODQ  $10^{-4} M$  (ODQ) oder mit SQ  $5 \times 10^{-5} M$  (SQ) führten aufsteigende Konzentrationen von Polyhexanid von 5,2 bis 2,0 (-log g%) zur vollständigen Relaxation der Aortenringe –End:  $EC_{50}$ :  $3,89 \pm 0,3$  (ODQ);  $3,43 \pm 0,1$  (SQ). Dafür genügten geringere Konzentrationen als in nicht vorbehandelten Präparationen (-End):  $EC_{50}$ :  $2,97 \pm 0,1$ . Die erzielbaren relaxierenden Effekte von Polyhexanid unterschieden sich signifikant zwischen Präparationen –End +ODQ und Kontrollen ( $P < 0,05$ ) sowie –End +SQ und Kontrollen ( $P < 0,05$ ), nicht aber zwischen Präparationen –End +ODQ und –End +SQ ( $P = 0,25$ ) (s. Abbildung 3.10).

In Präparationen +End relaxierten aufsteigende Konzentrationen von Polyhexanid von 5,2 bis 3,0 (-log g%) die PE-induzierte Kontraktion bis auf  $42,2 \pm 16$  % (ODQ) bzw.  $8,2 \pm 19,4$  % (SQ) verglichen mit  $10,7 \pm 2,3$  % (Kontrolle):  $EC_{50}$ :

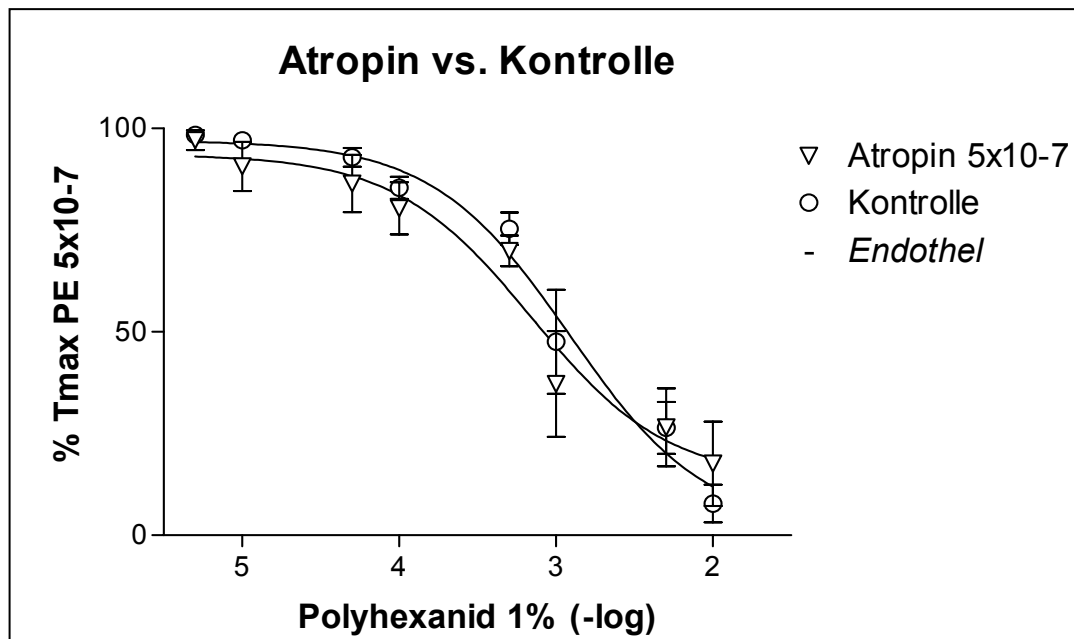


**Abbildung 3.12:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid. Vergleich zwischen nicht vorbehandelten Präparationen und Präparationen, die mit Propranolol  $5 \times 10^{-5}$  inkubiert wurden. PE-induzierte Kontraktion; Aortenringe ohne Endothel.  $n=5$ ,  $P < 0,05$ ; Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse

3,45±0,7 (ODQ); 3,60±0,3 (SQ) 3,67±0,3 (Kontrolle). Höhere Konzentrationen von Polyhexanid (2,3 bis 2,0 -log g%) führten zu einer neuerlichen Kontraktion der Aortenringe unterschiedlich starken Ausmaßes: 108,9±62,1% (ODQ) bzw. 100,6±68,4 % (SQ) der maximalen unter PE erreichten Spannung. Dieser Effekt war inkonsistent und trat in 75% (ODQ) bzw. 50% (SQ) der Fälle auf (s. Abbildung 3.11). Die erzielbaren relaxierenden Effekte von Polyhexanid waren im Konzentrationsbereich von 5,3 bis 3,0 (-log g%) zwischen Präparationen +End +ODQ und Kontrollen signifikant verschieden ( $P < 0,001$ ), nicht jedoch zwischen Kontrollen und +End +SQ ( $P = 0,31$ ). Signifikante Unterschiede ergaben sich über dem gleichen Konzentrationsbereich zwischen Kontrollen -End und Präparationen +End +ODQ ( $P < 0,05$ ) sowie Kontrollen -End und Präparationen +End +SQ ( $P < 0,05$ ). Präparationen +End +ODQ und +End +SQ unterschieden sich in den erzielbaren Effekten des Polyhexanid über einen Konzentrationsbereich von 5,3 bis 2,0 (-log g%) ebenfalls signifikant ( $P < 0,05$ ).

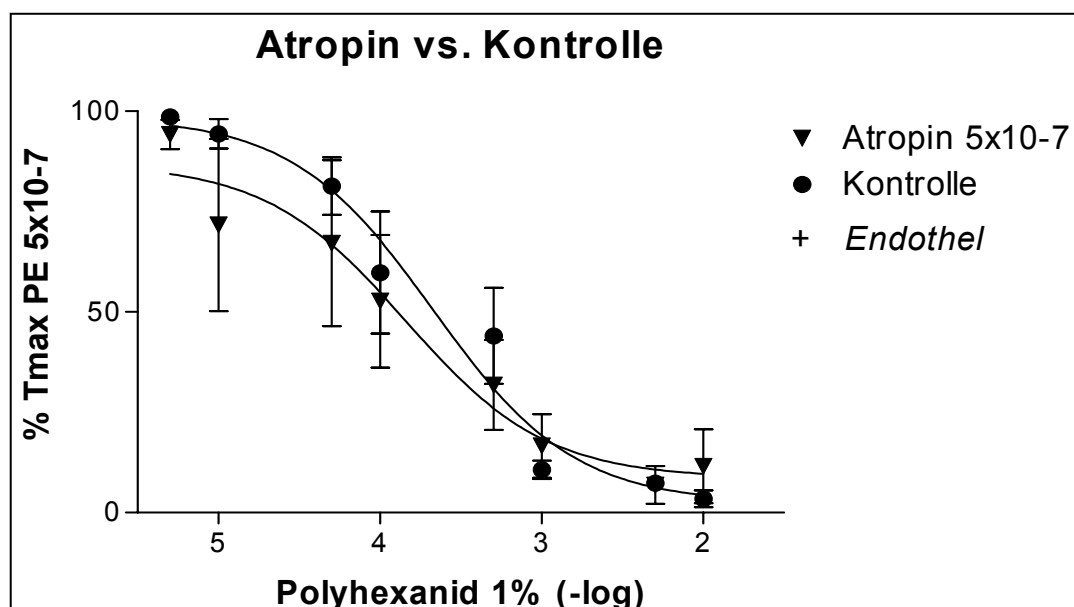
### 3.3.5 Inkubation mit $\beta$ -Adrenozeptorantagonist: Propranolol

Nach Induktion einer Kontraktion mit PE  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  und Inkubation mit Propranolol  $5 \times 10^{-5}$  (PROP) führten aufsteigende Konzentrationen von Polyhexanid von 5,2 bis 2,0 (-log g%) zur vollständigen Relaxation der Aortenringe -End. Dafür

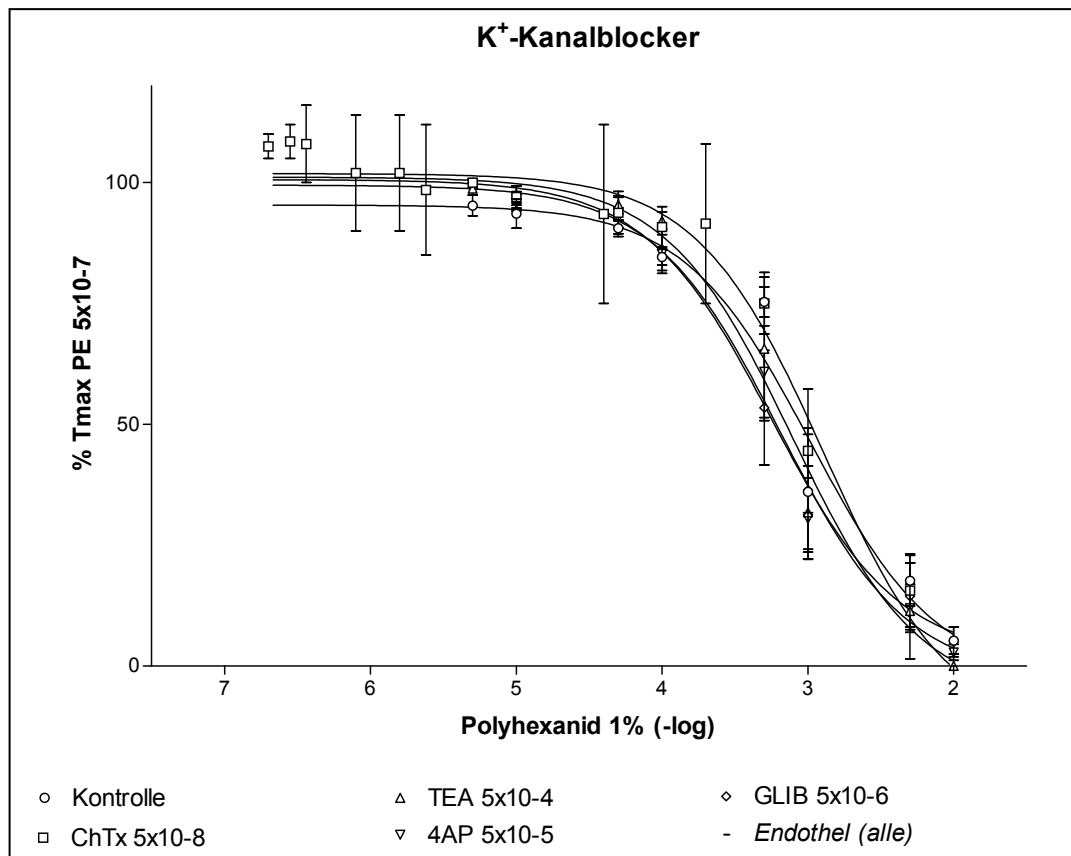


**Abbildung 3.13:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid. Vergleich zwischen nicht vorbehandelten Präparationen und Präparationen, die mit Atropin  $5 \times 10^{-7}$  inkubiert wurden. PE-kontrahierte Aortenringe ohne Endothel.  $n=4$ ,  $P = 0,20$ ; Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse

genügte geringere Konzentrationen als in nicht vorbehandelten Präparationen:  $EC_{50}$ :  $3,32 \pm 0,2$  (-End +PROP) vs.  $3,2 \pm 0,1$  (Kontrolle). Die erzielbaren relaxierenden Effekte von Polyhexanid unterschieden sich signifikant zwischen Präparationen -End +PROP und Kontrollen ( $P < 0,05$ ) (s. Abbildung 3.12).



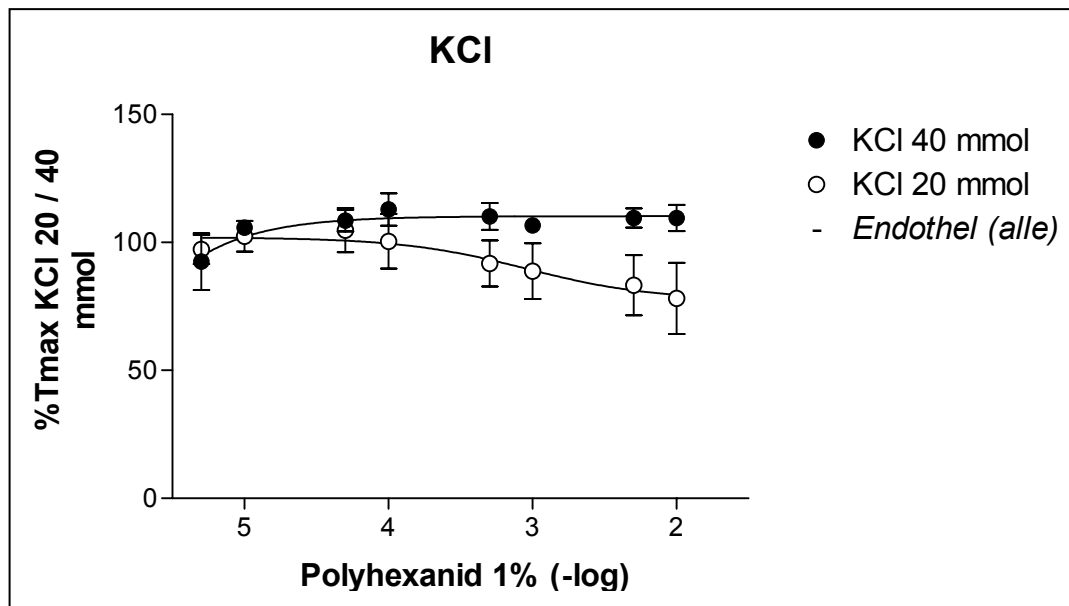
**Abbildung 3.14:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid. Vergleich zwischen nicht vorbehandelten Präparationen und Präparationen, die mit Atropin  $5 \times 10^{-7}$  inkubiert wurden. PE-induzierte Kontraktion; Aortenringe mit Endothel.  $n=4$ ,  $P=0,20$ ; Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse



**Abbildung 3.15:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid. Vergleich zwischen nicht vorbehandelten Präparationen und Präparationen, die mit 4-Aminopyrrolidin 5x10<sup>-4</sup>M (4-AP), Tetraethylammonium 5x10<sup>-5</sup>M (TEA), Glibenclamid 5x10<sup>-6</sup>M (GLIB) oder Charybdotoxin 5x10<sup>-8</sup>M inkubiert wurden. PE-induzierte Kontraktion; Aortenringe ohne Endothel. Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse.

### 3.3.6 Inkubation mit M-Cholinrezeptorantagonist: Atropin

Nach Induktion einer Kontraktion mittels PE 5x10<sup>-7</sup>M und Inkubation mit Atropin 5x10<sup>-7</sup> (AT) führten aufsteigende Konzentrationen von Polyhexanid von 5,2 bis 2,0 (-log g%) zur vollständigen Relaxation der Aortenringe mit und ohne Endothel: EC<sub>50</sub>: 3,84±0,3 (+End +AT); 3,16±0,2 (-End +AT); n=4. Die erzielbaren relaxierenden Effekte von Polyhexanid unterschieden sich weder zwischen Präparationen +End +AT und Kontrollen +End (EC<sub>50</sub>: 3,67±0,2); (P=0,20) (s. Abbildung 3.14) noch zwischen Präparationen -End +AT und Kontrollen -End (EC<sub>50</sub>: 2,92±0,1(-End -AT)); (P=0,20) (s. Abbildung 3.13). Ein signifikanter Unterschied ergab sich aber zwischen Präparationen +End +AT und -End +AT (P<0,05).



**Abbildung 3.16:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid. Vergleich zwischen Präparationen ohne Endothel, die mit 20mM oder 40 mM KCl zur Kontraktion gebracht wurden. n = 6 (20mM KCl) bzw. n = 4 (40mM KCl) Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse

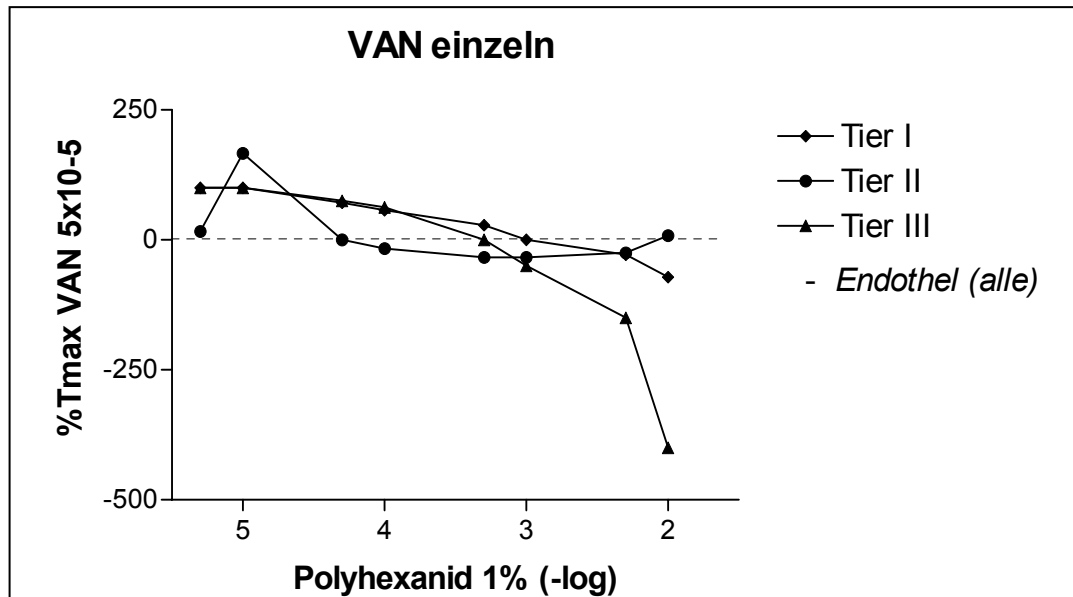
### 3.3.7 Inkubation mit K<sup>+</sup>-Kanalkblockern

Nach Herbeiführung einer Kontraktion mit PE  $5 \times 10^{-7} \text{M}$  und Inkubation mit den K<sup>+</sup>-Kanalkblockern 4-Aminopyridin  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  (4-AP), Tetraethylammoniumchlorid  $5 \times 10^{-4} \text{M}$  (TEA), Glibenclamid  $5 \times 10^{-6} \text{M}$  (GLIB) oder Charybdotoxin  $5 \times 10^{-8} \text{M}$  (ChTx) führten aufsteigende Konzentrationen von Polyhexanid von 5,2 bis 2,0 (-log g%) zur vollständigen Relaxation der Aortenringe ohne Endothel: EC<sub>50</sub>: 3,19±0,1 (4-AP); 3,10±0,1 (TEA); 3,25±0,1 (GLIB); 2,89±0,1 (ChTx); 2,98±0,1 (-End -Kontrolle)(s. Abbildung 3.15). Dabei wurden keine signifikanten Unterschiede bei der erzielbaren relaxierenden Wirkung von Polyhexanid gefunden: 4-AP vs.Kontrolle: P=0,46, n=4; TEA vs. Kontrolle: P=0,74, n=4; GLIB vs. Kontrolle: P=0,31, n=5; ChTx vs. Kontrolle: P=0,38, n=5. Allerdings zeigten sich signifikante Unterschiede zwischen ChTx und den anderen K<sup>+</sup>-Kanalkblockern (P<0,001 in allen drei Fällen).

### 3.3.8 KCl induzierte Kontraktion

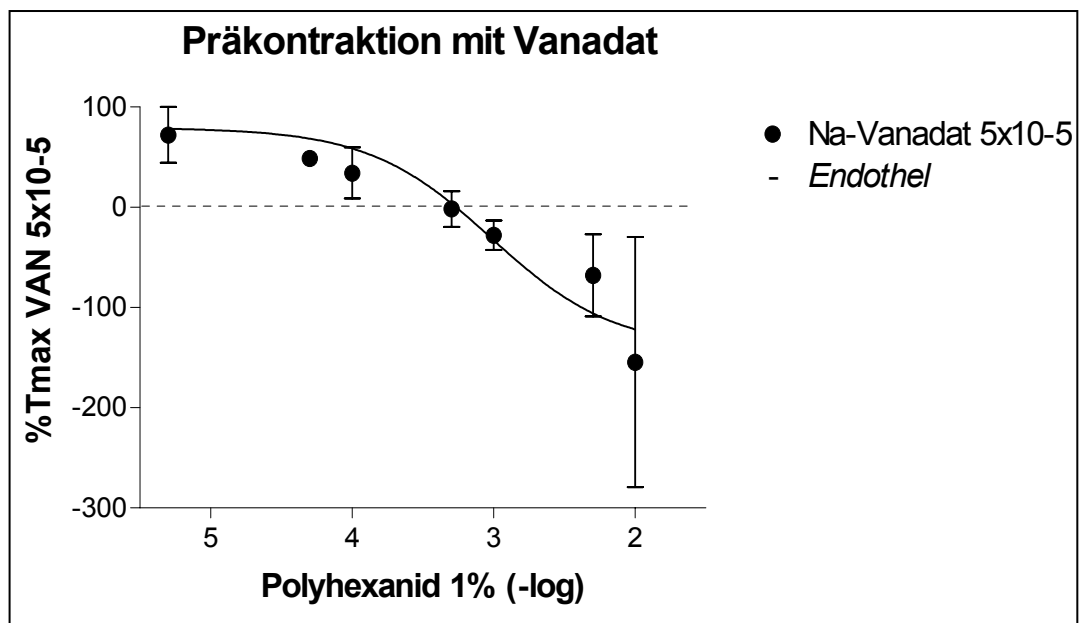
In Präparationen ohne Endothel, die mit 40mM KCl zur Kontraktion gebracht wurden, führten aufsteigende Konzentrationen von Polyhexanid von 5,3 bis 2,0 (-log g%) zu keiner Relaxation, sondern in geringem Umfang sogar zu einer





**Abbildung 3.17:** Verlauf der Spannung unter aufsteigender Konzentration von Polyhexanid. Vergleich der drei mit Na-Orthovanadat  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  zur Kontraktion gebrachten Präparationen. Aortenringe ohne Endothel;  $n=3$

Zunahme der Spannung auf  $109,5 \pm 5,2\%$  der mit  $40 \text{mM}$  KCl alleine erreichten maximalen Spannung. In mit  $20 \text{mM}$  KCl zur Kontraktion gebrachten Präparationen führte Polyhexanid zu einer teilweisen Relaxation auf  $78,1 \pm 14,0\%$  der mit  $20 \text{mM}$  KCl erreichten maximalen Spannung. Für diese partielle Relaxation wurde eine mittlere Wirkkonzentration ( $\text{EC}_{50}$ ) von  $3,05 \pm 0,8$  ermittelt (s. Abbildung 3.16).



**Abbildung 3.18:** Dosis-Wirkungsbeziehung der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid auf mit Na-Orthovanadat  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  zur Kontraktion gebrachten Aortenringe ohne Endothel.  $n = 3$ . Graphen entsprechen der nicht-linearen Regressionsanalyse

### 3.3.9 Na-Orthovanadat induzierte Kontraktion

In Präparationen ohne Endothel, die mit Na-Orthovanadat  $5 \times 10^{-5} \text{M}$  (VAN) zur Kontraktion gebracht wurden, führten aufsteigende Konzentrationen von Polyhexanid von 5,3 bis 2,0 (-log g%) nicht nur zu einer vollständigen Relaxation der mit VAN erreichten Spannung, sondern darüber hinaus noch zu einem weiteren deutlichen Tonusverlust in der Größenordnung von  $-154,4 \pm 125,0\%$ . Dieser überschießende Effekt war inkonsistent und wurde nur in 2 von 3 Präparationen beobachtet, mit erheblichem Unterschied im Ausmaß. In der dritten Präparation kam es bis zu einer kumulativen Polyhexanid-Konzentration von 3,0 (-log g%) zu einem Tonusverlust auf  $-33,0\%$ , bei den Konzentrationsschritten 2,3 und 2,0 jedoch zu einer partiellen Wiederherstellung der Spannung auf  $8,3\%$  der maximalen unter VAN erreichten Spannung (s. Abbildung 3.17) Es wurde eine mittlere Wirkkonzentration ( $EC_{50}$ ) von Polyhexanid von  $3,02 \pm 0,4$  ermittelt (s. Abbildung 3.18).

## 4. Diskussion

Störungen der Hämodynamik, vor allem aber der intestinalen Mikrozirkulation nach ausgedehnter Abdominalchirurgie oder im Rahmen von Peritonitis, Systemischem Inflammationssyndrom (SIRS) und Sepsis gelten als wesentlicher Faktor in der Entstehung von Multiorganversagen. Gerade bei Bauchhöhleneingriffen und in der Peritonitistherapie wird häufig die peritoneale Spülung unter Zusatz von lokalen Antiinfektiva wie Polyhexanid eingesetzt. In der klinischen Praxis zeigen sich regelmäßig starke Blutdruckabfälle während und anhaltende Hypotension nach dieser Behandlung.

Ziel dieser Arbeit war es daher, die Auswirkung einer Instillation von Polyhexanid in die Bauchhöhle auf makrohämodynamische Parameter im Tiermodell zu untersuchen. Es schloß sich die Untersuchung der Frage an, ob die beobachtete Hypotension Folge einer lokalen Polyhexanid bedingten Vasodilatation im Splanchnikusgebiet gewesen ist. Schließlich sollten an in vitro-Präparationen der thorakalen Rattenaorta mögliche Mechanismen dieser Polyhexanid bedingten Vasodilatation untersucht werden.

Im folgenden sollen die einzelnen Ergebnisse der drei Teilstudien der Arbeit vergleichend und im Zusammenhang im Literaturvergleich diskutiert werden.

### 4.1 Hämodynamik

Der Blutfluß in das Splanchnikusgebiet beträgt beim Menschen unter Normalbedingungen etwa 25-30% des Herzzeitvolumens, wobei die Perfusion des Dünndarms annähernd doppelt so hoch ist wie bei Magen und Kolon. Dabei bestimmt vor allem das Verhältnis der Widerstände in den zuführenden Blutgefäßen der einzelnen Versorgungsgebiete die Verteilung zwischen den Bauchorganen. Widerstandsveränderungen im Bereich des Splanchnikusgebiets haben daher einen hohen Einfluß auf die Makrohämodynamik. So kommt es z.B. unter Schockbedingungen zu einer starken Reduktion der Splanchnikusperfusion durch sympathoadrenerge Erhöhung des mesenterialen Gefäßwiderstandes einerseits, um den Blutfluß zu Herz und Gehirn aufrecht zu erhalten. Andererseits können lokale vasodilatierende Faktoren zu einer deutlichen Reduktion des systemischen

Blutdrucks führen (17). Dabei spielt neben der Steuerung des peripheren Widerstands auch die Veränderung der Volumenverteilung eine Rolle. Die intestinale Mikrozirkulation enthält ca. 50% des Blutvolumens des Splanchnikusgebiets. Schon geringe Änderungen der arteriölen und venölen Durchmesser können daher zu starken Volumenverschiebungen führen. Zur Mikrozirkulation zählen nach *Lee* alle Gefäße mit einem Durchmesser  $< 250\mu\text{m}$ , wobei dieser Festlegung der Fahraeus-Effekt zugrunde liegt (41).

Der in dieser Studie beschriebene Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks während der Instillation von Polyhexanid kann also durch eine Verminderung des Gefäßwiderstands im mesenterialen Gefäßbett sowie durch eine vermehrte Volumenspeicherung in der intestinalen Mikrozirkulation bedingt sein. Dabei spielt in beiden Fällen eine Vasodilatation die entscheidende Rolle.

Gängige Erklärungen für den Blutdruckabfall während der Peritoneallavage berufen sich zumeist auf eine durch die manuelle Irritation hervorgerufene Vagusaktivierung und / oder eine Freisetzung bakterieller Toxine, vor allem Endotoxine. Diese Erklärungsmöglichkeiten kommen für diese Studie nicht in Frage, da im gewählten Modell ausschließlich eine Instillation der untersuchten Substanz erfolgte, wobei eine möglichst geringe manuelle Irritation von Darm und Mesenterium angestrebt wurde. Da der beschriebene Blutdruckabfall ausschließlich in der Polyhexanidgruppe, nicht aber in der mit Kochsalzlösung gespülten Kontrollgruppe auftrat, ist von einem Effekt der Substanz auszugehen. Ebenfalls für einen Substanzeffekt spricht die Tatsache, daß der Blutdruck nach Beendigung der Behandlung nicht wieder anstieg. Dies könnte Ergebnis eines langanhaltenden vasodilatatorischen Effektes von Polyhexanid sein, es kommen aber auch systemische Substanzeffekte wie z.B. eine kardiodepressive Wirkung in Frage. Allerdings handelt es sich im gewählten Tiermodell um gesunde Tiere, so daß Ergebnisse nur in sehr bedingtem Umfang auf die Situation im Tier mit Peritonitis oder anderer systemischer Inflammation zu übertragen sind.

## 4.2 Mikrozirkulation

Während der Sepsis treten typische Veränderungen der Mikrozirkulation auf. Dazu gehören eine regionale Umverteilung des Blutvolumens, eine

Vasokonstriktion mit dem Verschluss von Kapillargebieten, die Erhöhung des Shuntvolumens, eine Veränderung des Durchblutungsmusters (flow-motion), eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten mit dadurch bedingtem Zell-clotting und eine Plasmaextravasation mit ödematöser Erweiterung der Diffusionstrecke (3; 15; 58; 60; 64). Eine wichtige Rolle scheint im zeitlichen Verlauf des septischen Geschehens auch der vaskulären Hyporeaktivität zuzukommen. Es wird vermutet, daß diese durch die Induktion der NOS-2 und der daraus resultierenden Überproduktion von NO bedingt wird (35). Ein wichtiges Therapieziel in der Behandlung der Sepsis ist daher die Verbesserung der Mikrozirkulation.

Die Effektivität von vasodilatorisch wirksamen Substanzen in der Behandlung von sepsistypischen Störungen der Mikrozirkulation wird in der Forschung kontrovers diskutiert. Da beim septischen Geschehen meistens auch eine vasopressorische Therapie notwendig ist, um den systemischen Blutdruck aufrecht zu erhalten, ist eine systemische Gabe von Vasodilatoren gemäß dem Leitsatz *flow prior to pressure* umstritten. Eine aktuelle Übersicht zu dieser Frage bieten *Buwalda* und *Ince* (13).

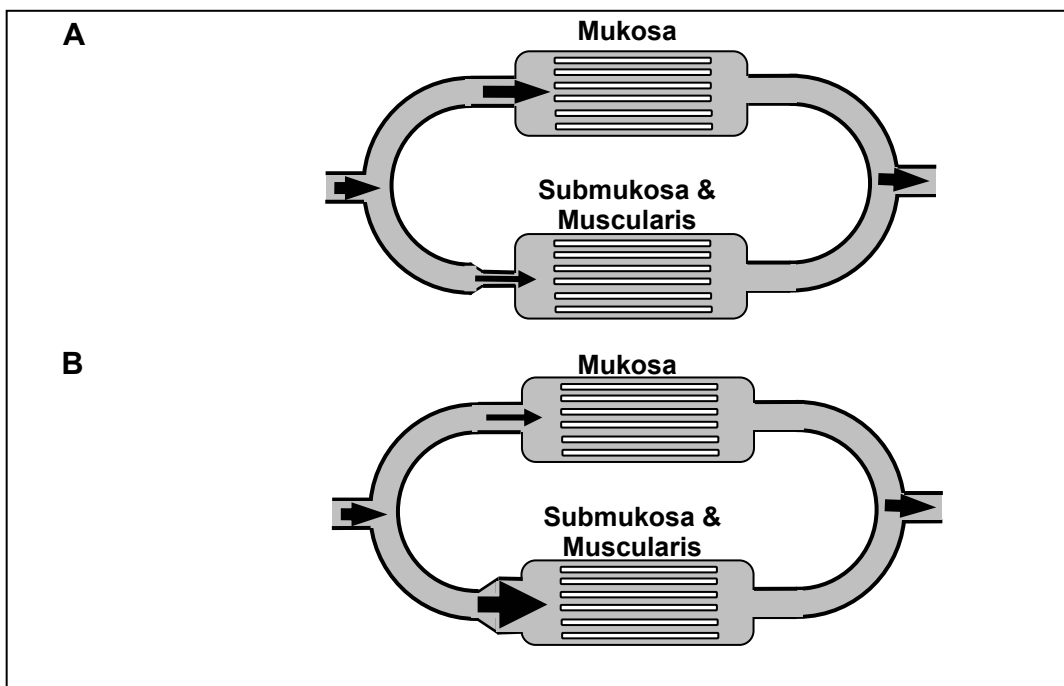
Um das Problem der konkurrierenden systemischen Gabe von Vasopressoren und -dilatoren zu umgehen, schlugen *Hersh et al.* die von ihnen als *selective gut microcirculation control (SGMC)* bezeichnete Vorgehensweise vor. Sie konnten intravitalmikroskopisch an Ratten zeigen, daß eine Applikation des stark vasodilatierend wirkenden NO-Spenders Na-Nitroprussid auf die Mukosa des terminalen Ileums in der Lage ist, sepsistypische Veränderungen der mukosalen Mikrozirkulation wie Verminderung der arteriolen Durchmesser oder Auftreten von flow-motion-pattern oder Durchblutungsstopps signifikant zu senken (26). Aus diesen Untersuchungen folgt, daß die lokale Anwendung von vasodilatorischen Substanzen einen positiven Effekt auf die intestinale Mikrozirkulation haben kann.

Neben der Blutverteilung zwischen den Organen ist jedoch auch die regionale Blutvolumenverteilung innerhalb der Darmwand zu beachten. Etwa 80% des Volumens durchströmen die Mukosa, während nur ca. 20% für Muscularis und Submukosa zur Verfügung stehen. Diese regionale Verteilung wird ebenfalls durch parallel geschaltete Widerstände bewirkt. Wahrscheinlich führt eine Öffnung der submukosalen Gefäße zu einer Umverteilung der Blutvolumina zu Lasten der Mukosa mit entsprechender Verschlechterung der Sauerstoff-

versorgung und subsequenter Störung der Mukosabarriere (s. Abbildung 4.1). Dieser Effekt ist schädlicher, wenn er in Situationen mit schlechter Perfusion der Mukosa, wie zum Beispiel unter septischen Konditionen, auftritt.

Daher sollte eine lokale Verwendung von Substanzen, die neben ihrer primären Wirkung auch vasodilatatorische Effekte erzielen, erst nach genauer Untersuchung der möglichen Auswirkungen auf die intestinale Mikrozirkulation erfolgen. Wie im zweiten Teil der vorliegenden Arbeit gezeigt werden konnte, führt die lokale Applikation von Polyhexanid auf die Serosa des terminalen Ileums zur Erweiterung der Durchmesser von submukösen Arterien und Venen. Ob dieser Effekt günstig im Sinne eines *serosal approach* der SGMC wirkt oder aber durch regionale Umverteilungsphänomene zu einer Verschlechterung der Perfusion der Mukosa führt, muß in weiteren experimentellen und klinischen Studien untersucht werden. Es ist aber nicht auszuschließen, daß die lokale Anwendung von Polyhexanid eine Mikrozirkulationsstörung verursachen oder aggravieren kann. Zumindest könnte die lokale Vasodilatation im intestinalen Gefäßbett den zuvor beschriebenen Blutdruckabfall erklären.

Polyhexanid zeichnet sich in der Behandlung von Wunden durch eine sehr hohe Gewebeverträglichkeit aus. Nach *Schmidt-Neuerburg et al.* scheint diese durch



**Abbildung 4.1:** Schema der Verteilung der Blutvolumina innerhalb der Darmwand. (A) Normalzustand: Hauptanteil durchströmt Kapillaren der Mukosa (B) Vasodilatation der präkapillären Gefäße im Bereich von Submukosa und Muscularis: Umverteilung innerhalb der Darmwand zu Lasten der Mukosa (nach *Frey & Kesel, 2000* (17))

eine Förderung der Granulation bedingt zu sein. Sie beobachteten keine Wundheilungsstörungen oder Gewebeschädigungen, wie sie bei der Anwendung anderer Antiseptika beschrieben werden (59). Es erscheint möglich, daß diese hohe Gewebeverträglichkeit sowie die wundheilungsfördernden Effekte des Polyhexanids auf einer Verbesserung der lokalen Durchblutung durch Dilatation der zuführenden Gefäße beruhen.

### **4.3 Mechanismen der Polyhexanid bedingten Vasodilatation**

Untersuchungen an isolierten Organen wie der thorakalen Aorta der Ratte haben den Nachteil, daß alle beobachtbaren Vorgänge aus dem Zusammenspiel des Organismus gerissen sind. Trotzdem sind diese Untersuchungen wertvoll, um einzelnen Mechanismen auf die Spur zu kommen. Gegenüber der Untersuchung in Zellkulturen besteht der Vorteil des immerhin intakten Zell-Zellnetzwerks innerhalb des Organs. Dieses ist unerlässlich bei Untersuchungen, für die das Zusammenspiel einzelner Organteile, wie zum Beispiel von Endothel und glatter Muskulatur bei Gefäßpräparaten, von Bedeutung ist. Im Modell der isometrischen Myotonometrie an Gefäßringen kann man diesen Endothel-Muskelzellzusammenhang durch Entfernen des Endothels gezielt aufheben. Dadurch lassen sich Endothel-vermittelte und direkte Pharmakonwirkungen an der glatten Muskelzelle differenzieren.

#### **4.3.1 Endothel vermittelter Effekt**

In der vorliegenden Arbeit wurde zunächst die Wirkung der gebrauchsfertigen Lösung von Polyhexanid 0,04% auf kontrahierte Gefäßringe mit und ohne Endothel untersucht. Dabei zeigte sich ein relaxierender Effekt, der beinahe vollständig vom Endothel abhängig war. Allerdings entsprach die maximal erreichte Konzentration der Lösung, also  $4 \times 10^{-3}$  der 0,04%igen Lösung, einer Konzentration von Polyhexanid von  $1,6 \times 10^{-4}$ %. Bei dieser Polyhexanidkonzentration wurde auch bei der Untersuchung des reinen Wirkstoffes nur eine leichte Relaxation der Präparationen ohne Endothel beobachtet. Bei den erreichten höheren Konzentrationen (bis maximal  $4 \times 10^{-3}$ % Polyhexanid) wurde eine vollständige Relaxation auch der Präparationen ohne Endothel beobachtet, jedoch erst bei einer 10fach stärkeren Konzentration als in Präparaten mit Endothel (s.

Abbildung 3.8). Diese Beobachtung und der typische Kurvenverlauf der Relaxation der Präparationen mit Endothel sprechen für eine starke Beteiligung des Endothels beim zustande Kommen des relaxierenden Effekts von Polyhexanid, aber auch für eine Endothel-unabhängige, direkt relaxierende Wirkung auf glatte Muskelzellen.

Bei der Erstbeschreibung der Rolle des Endothels an der Steuerung des Gefäßtonus zeigten *Furchgott et al.*, daß bei der Acetylcholin-induzierten Vasodilatation in vitro das Endothel vorhanden sein muß. Bei Präparationen ohne Endothel wurde sogar eine Kontraktion bei hohen Konzentrationen von Acetylcholin nachgewiesen (18). Insofern unterscheiden sich die Wirkungsweisen von Polyhexanid und Acetylcholin auf glatte Muskelzellen deutlich voneinander.

### 4.3.2 Rolle des NO

Zur näheren Untersuchung der Endothel vermittelten relaxierenden Polyhexanidwirkung wurde mit einer Blockade der NO-Synthetase durch L-NAME zunächst der wesentliche Mediator der Endothel-Muskelzellinteraktion, das NO, ausgeschaltet. Wie bereits dargestellt, ist die NO vermittelte relaxierende Wirkung (EDRF-Weg) über den cGMP-Weg eine der entscheidenden second-messenger-Kaskaden. Neben der cGMP/cGKI vermittelten Aktivierung von  $K_{Ca}$ -Kanälen kommt es zu einer cGMP/cAMP-Überkreuzaktivierung und der Aktivierung der PKA. Mögliche Zielstrukturen der cAMP/cGMP abhängigen Proteinkinasen sind neben den bereits erwähnten  $K_{Ca}$ -Kanälen, Rezeptoren, G-Proteine, Phospholipase C,  $IP_3$ -Rezeptor,  $Ca^{2+}$ -Pumpen, MLCK, MAP - und Rho-Kinase. NO scheint auch direkt Ca-Kanäle in der Membran glatter Muskelzellen inhibieren zu können. Eventuell kommt es auch zu einer Beeinflussung der  $Na^+/K^+$ -ATPase und von  $Na^+$ -Kanälen durch NO und dadurch zur Membranhyperpolarisierung (23; 24). Die relative Wertigkeit der einzelnen Wege wird kontrovers diskutiert und auch die Frage, ob es neben dem NO weitere wesentliche Mediatoren der Endothel vermittelten Vasodilatation gibt. Dabei könnte zum Beispiel dem *Endothel Derived Hyperpolarizing Factor* EDHF eine wichtige Rolle zukommen. Dieser scheint gerade in Arteriolen der wesentlichere Faktor als das NO für die Endothel abhängige Vasorelaxation zu sein, zumindest konnten *Miura et al.* dies für koronare Arteriolen (43) und *Brandes et al.* für murine Widerstandsgefäße



nachweisen (6). EDHF führt über die Aktivierung von  $K_{Ca}$ -Kanälen zur Hyperpolarisierung der Membran glatter Muskelzellen. Dabei ist noch nicht abschließend geklärt, ob es sich um eine chemische Substanz handelt. Es mehren sich die Hinweise auf eine über gap junctions vermittelte elektrische Signaltransduktion (66).

In der vorliegenden Arbeit wurden in Präparationen mit Endothel, die mit L-NAME inkubiert worden waren, höhere Polyhexanidkonzentrationen zur vollständige Relaxation benötigt als in nicht vorbehandelten Präparationen mit Endothel (s. Abbildung 3.8). Die benötigten Konzentrationen entsprachen den in Präparationen ohne Endothel notwendigen Konzentrationen.

Diese an der thorakalen Rattenaorta erzielten Ergebnisse sprechen für eine hauptsächlich Vermittlung des relaxierenden Effekts von Polyhexanid über den EDRF-Weg, also über die Generation von NO. Dabei scheint Polyhexanid nicht als NO-Donor wie andere potente Vasodilantien, z.B. Na-Nitroprussid, zu wirken, sondern über eine Aktivierung der NOS. Da sich die Dosis-Wirkungsbeziehung von Präparationen mit L-NAME und Endothel sowie von Präparationen ohne Endothel stark annähern, scheint anderen Endothel abhängigen relaxierenden Faktoren, wie EDHF, allenfalls eine untergeordnete Rolle bei dem Endothel-vermittelten Teil der relaxierenden Wirkung von Polyhexanid zuzukommen. Bei der Beurteilung dieser Ergebnisse sollte jedoch berücksichtigt werden, daß die *in vitro* - Versuche gerade nicht an Arteriolen, sondern an der Aorta durchgeführt wurden. Eine wesentliche Rolle von EDHF oder anderen NO-unabhängigen Mechanismen der Endothel abhängigen Relaxation durch Polyhexanid im zuvor untersuchten Bereich der Mikrozirkulation kann weder ausgeschlossen noch für unwahrscheinlich erklärt werden.

Neuere sensiblere Meßmethoden konnten eine NO-Produktion auch direkt in den glatten Muskelzellen nachweisen. Dabei wurden von *Brophy et al.* in der Rattenaorta für eine Relaxation ausreichende Konzentrationen von NO gemessen (7), obwohl *Buchwalow et al.* in Gefäßen vom elastischen Typ eine geringere NOS-Aktivität gefunden haben, als in Arterien vom muskulären Typ oder in Arteriolen (12). Es ist also von einer noch stärkeren Wirkung des muskulären NO in der Mikrozirkulation auszugehen.

Um zu überprüfen, ob es sich bei der beobachteten Relaxation von Aortenringen ohne Endothel durch Polyhexanid ebenfalls um einen NO-Effekt handelt, wurden

auch Präparationen ohne Endothel mit L-NAME inkubiert. Sie verhielten sich nicht anders als Aortenringe ohne Endothel ohne vorangegangene Inkubation mit einem NOS-Inhibitor.

Die Relaxation von Aortenringen ohne Endothel durch Polyhexanid geschieht also wahrscheinlich unabhängig von NO. Eventuell sind aber auch zur Blockade der muskulären NOS-Typen höhere Konzentrationen von L-NAME oder andere NOS-Inhibitoren notwendig.

Die vorliegenden Ergebnisse lassen den Rückschluß zu, daß Polyhexanid NO über eine Aktivierung der NOS generiert und nicht, wie zum Beispiel Nitrate, durch eine direkte Freisetzung von NO wirkt.

### 4.3.3 Zyklische Nukleotide

Wie im vorangegangenen Abschnitt dargestellt, haben die zyklischen Nukleotide cGMP und cAMP einen großen Anteil an der Steuerung des Gefäßtonus. Substanzen, die die intrazelluläre cGMP- oder cAMP-Konzentration erhöhen, wirken relaxierend auf glatte Muskelzellen. Dabei sind verschiedene Mechanismen beteiligt (s.o.). *Abdel-Latif* weist darüber hinaus noch auf mögliche Interdependenzen zwischen den zyklischen Nukleotiden und dem IP<sub>3</sub>-Signaltransduktionsweg hin, stellt aber auch fest, daß die genauen Mechanismen der cAMP-cGMP vermittelten Vasorelaxation noch nicht abschließend aufgeklärt sind (1).

Aufgrund der engen Verzahnung von NO und cGMP würde man keine wesentlichen Unterschiede in der Reaktion von Gefäßringen erwarten, die entweder mit L-NAME oder mit dem Guanylylcyclaseinhibitor ODQ inkubiert wurden. Tatsächlich erbrachten die durchgeführten Versuche jedoch, daß in Präparationen mit Endothel nach einer Inkubation mit ODQ höhere Polyhexanidkonzentrationen zur Relaxation benötigt wurden als ohne, wobei dieser Effekt statistisch signifikant war (s. Abbildung 3.11). Auffällig war eine in drei von vier Fällen aufgetretene Kontraktion bei hohen Polyhexanidkonzentrationen, ein Effekt, der auch nach einer Inkubation mit dem Adenylylcyclaseinhibitor SQ beobachtet wurde. Dabei war die in den niedrigeren Konzentrationsstufen erreichte Dosis-Wirkungsbeziehung des Polyhexanid ähnlich der von nicht inkubierten Präparationen mit Endothel. Dies könnte ein Hinweis auf eine konstringierende Wirkung hoher Polyhexanidkonzentrationen sein, die durch die cAMP bzw.

cGMP vermittelte Relaxation überdeckt werden könnte. Allerdings sprechen die Ergebnisse aus Präparationen ohne Endothel eher für einen zusätzlichen nicht cGMP/cAMP abhängigen Weg der Vasodilatation, da Blockade dieser Mediatoren dort das Ansprechen auf Polyhexanid verbesserte.

Die Ergebnisse der Untersuchungen mit ODQ und SQ sind insgesamt widersprüchlich und bedürfen einer weiteren Untersuchung. Dabei wäre auch eine Bestimmung der intrazellulären cAMP respektive cGMP-Konzentrationen wünschenswert, da *Gao und Raj* zeigen konnten, daß SQ unterschiedliche Wirkungen auf die cAMP-Konzentration und die relaxierende Effekt von Isoproterenol in pulmonalen Rinderven haben kann (19).

#### 4.3.4 Muskarinische Acetylcholinrezeptoren

Muskarinische Rezeptoren sind sowohl im Bereich des Endothels, als auch direkt an der glatten Muskelzelle in die Steuerung des Gefäßtonus involviert. G-Protein-gekoppelte muskarinische Rezeptoren wirken Endothel-vermittelt über NO, am glatten Muskel G-Protein gekoppelt über die IP<sub>3</sub>-Kaskade vasorelaxierend, wobei an der glatten Gefäßmuskulatur der Endothel-vermittelte Weg deutlich überwiegt. Um die Möglichkeit einer acetylcholinartigen Wirkung des Polyhexanids zu überprüfen, wurde eine Versuchsreihe mit Inkubation mit Atropin durchgeführt. Diese zeigte weder in Präparationen mit noch ohne Endothel eine Wirkung auf die Dosis-Wirkungsbeziehung der Polyhexanid-Relaxation (s. Abbildung 3.13).

Somit ist eine bloße Aktivierung von m-Cholinozeptoren als Wirkmechanismus als sehr unwahrscheinlich zu erachten.

#### 4.3.5 Weitere Mechanismen

Ergänzend zur Abklärung einer muskarin-artigen Wirkung des Polyhexanids sollte auch der Möglichkeit einer catecholaminartigen Wirkung über  $\beta$ -Rezeptoren nachgegangen werden, um den nicht Endothel-vermittelten Teil der relaxierenden Wirkung des Polyhexanids aufzuklären. In Propranolol-inkubierten Präparationen ohne Endothel reichten niedrigere Dosierungen von Polyhexanid aus, um eine Relaxation zu erreichen als in nicht vorbehandelten Präparationen ohne Endothel (s. Abbildung 3.12). Dieser Befund ähnelt den Ergebnissen der Inkubation

mit SQ. Dies ist schlüssig, da die  $\beta$ -adrenerge Wirkung hauptsächlich cAMP-vermittelt ist. Eine  $\beta$ -mimetische Wirkung des Polyhexanids ist somit unwahrscheinlich.

Eine weitere Möglichkeit der Endothel unabhängigen Vasodilatation stellt eine Hyperpolarisierung durch eine direkte Öffnung von Kaliumkanälen der glatten Muskelzelle dar. Die getesteten  $K^+$ -Kanalblocker zeigten keinerlei signifikante Wirkung auf die Dosis-Wirkungsbeziehung von Polyhexanid in Präparationen ohne Endothel. Da allerdings  $K^+$ -Kanäle in vielen Fällen auch mittelbar an der Relaxation beteiligt sind, ist die Möglichkeit in Betracht zu ziehen, daß eine Öffnung von  $K^+$ -Kanälen, die von den eingesetzten Substanzen nicht erfaßt werden, für den relaxierenden Effekt verantwortlich ist. Ebenso erscheint es als durchaus möglich, daß einer Blockade von  $Cl^-$ -Kanälen eine wichtige Rolle zukommt. Weitere Untersuchungen, eventuell unter Verwendung von single-ion-channel-patch-clamp-Methoden könnten hier zu einer Klärung beitragen.

Durch Zugabe von Kaliumchlorid zur Kontraktion gebrachte Präparationen ohne Endothel wurden von Polyhexanid allenfalls leicht relaxiert. Dies ist ebenfalls mit der Theorie einer direkten Beeinflussung von Ionenkanälen vereinbar und spricht gegen die Möglichkeit einer durch Zellschädigung herbeigeführten Vasodilatation, da Polyhexanid dann auch diese Präparationen relaxieren müßte. Dieser Befund macht aber auch eine  $\alpha$ -Adrenozeptoren blockierende Wirkung des Polyhexanids als Grundlage der Vasodilatation unwahrscheinlich. Läge eine bloße Konkurrenz mit dem  $\alpha$ -Mimetikum Phenylephryne am  $\alpha_1$ -Rezeptor vor, käme es nach Induktion einer Kontraktion durch KCl nicht zu einer Relaxation.

Die Ergebnisse der Untersuchung an mit Na-Orthovanadat zur Kontraktion gebrachten Präparationen zeigen eine hohe Streuung. Ableitungen auf der Grundlage dieser Datenbasis sollten nur äußerst zurückhaltend getroffen werden. Zumindest scheint die relaxierende Wirkung von Polyhexanid auch in diesen Präparationen gegeben zu sein. Dies deutet daraufhin, daß der beobachtete Effekt nicht ausschließlich auf einer Interaktion mit der  $Ca^{2+}$ -Homöostase beruht, da es trotz  $Ca^{2+}$ -Akkumulation in der glatten Muskelzelle zu einer Relaxation kommt.

#### 4.4 Vergleichende Bewertung der Teilstudien

Polyhexanid besitzt relaxierende Eigenschaften sowohl auf Gefäße der Makro- als

auch der Mikrozirkulation. Diese vasodilatierende Wirkung ist der wahrscheinlichste Grund für den klinisch beobachteten und tierexperimentell bestätigten Befund einer Hypotension während und nach dem Einsatz dieser Substanz zur intraabdominellen Spülung. Dabei kommt anscheinend dem relaxierenden Effekt auf intramurale Gefäße der intestinalen Mikrozirkulation eine entscheidende Bedeutung zu, da Veränderungen hier sowohl zu einer Verminderung des peripheren Widerstandes als auch zu einer Umverteilung des Blutvolumens zuungunsten der systemischen Zirkulation führen können. Allerdings erscheinen auch systemische Effekte, wie zum Beispiel eine kardiodepressive Wirkung nach Resorption des Wirkstoffes möglich. Daß die vermehrte Durchblutung der untersuchten submukösen Gefäße mit einer verbesserten Oxygenierung der Mukosa einhergeht, kann nicht zweifelsfrei geklärt werden. Vielmehr sind intramurale Shuntphänomene wahrscheinlich, die die Mukosadurchblutung reduzieren können. Eine differenzierte Untersuchung der Effekte auf muköse, submuköse und intramuskuläre Gefäße der Mikrozirkulation könnte hier weitere Klarheit schaffen. Ebenfalls erscheint eine genauere Betrachtung der Integrität der Mukosabarriere erfolgversprechend.

Verschiedene Anteile des Wirkungsmechanismus von Polyhexanid auf Gefäße der Makrozirkulation, genauer der thorakalen Aorta von Ratten, konnten charakterisiert werden. So ist eine Aktivierung der endothelialen NOS für einen Großteil der relaxierenden Wirkung verantwortlich. Verschiedene andere Signaltransduktionswege für die nicht Endothel abhängige Wirkkomponente können als unwahrscheinlich betrachtet werden (insbesondere eine  $\beta$ -mimetische Wirkung oder eine relaxierende Wirkung durch toxische Zellschädigung). Eine abschließende Aufklärung des Wirkmechanismus konnte nicht geleistet werden, insbesondere bleiben die Schritte, die zur NOS-Aktivierung führen, bis auf den Ausschluß einer einfachen muskarinartigen Wirkung ungeklärt. Dazu ist jedoch anzumerken, daß die genaue molekulare Wirkweise der Biguanide, zum Beispiel auch des Metformins, weitestgehend unbekannt ist. Wie bereits erwähnt wurde, ist die Übertragbarkeit der gefundenen Mechanismen aus der Makrozirkulation auf die Mikrozirkulation nur in begrenztem Umfang möglich, da sich physiologischerweise die Wertigkeit verschiedener Signaltransduktionswege zwischen den beiden Systemen unterscheidet.

Ebenfalls sollte die begrenzte Aussagekraft der beschriebenen Untersuchungen

hinsichtlich der Veränderungen im septischen Organismus herausgestellt werden. Gerade bei Patienten mit septischer Peritonitis findet die Peritoneallavage mit Polyhexanid Anwendung. Systemische Inflammation und Sepsis führen zu wesentlichen Veränderungen in der Mikrozirkulation, wobei Veränderungen der NO-Homöostase durch Induktion der NOS 2 eine große Bedeutung zukommt. Inwieweit also die NO-vermittelten relaxierenden Effekte des Polyhexanids unter septischen Kautelen auftreten, müßte in Untersuchungen im septischen Tiermodell kontrolliert werden. Neben der Betrachtung der rein hämodynamischen Effekte sollte auch der Frage nachgegangen werden, inwieweit andere pathophysiologisch bedeutsame Sepsisprozesse beeinflußt werden, wie zum Beispiel die Aktivierung von weißen Blutzellen.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Kombination verschiedener (tier-) experimenteller Verfahren, wie zum Beispiel der Intravital-Fluoreszenzmikroskopie, ein breites Spektrum an aufeinander abgestimmten Untersuchungen ermöglicht. Dabei wird eine enge Rückkopplung zwischen beobachteten klinischen Phänomenen, deren experimenteller Bestätigung und der Aufklärung zugrundeliegender Mechanismen erreicht. So wird eine Verzahnung von Grundlagenforschung und klinischer Erfahrung möglich.

## 5. Zusammenfassung

Sepsis und Multiorganversagen stellen lebensbedrohliche und häufig schwer therapierbare Krankheitsbilder dar, die oft auf eine Peritonitis zurückgehen. Ein Eckpfeiler der Behandlung der Peritonitis ist die Peritoneallavage, bei der häufig lokale Antiinfektiva wie das Biguanid Polyhexanid als Zugabe zur Spüllösung eingesetzt werden, um eine lokale antibakterielle Wirkung zu erzielen. In der Klinik treten häufig während und nach der Lavage mit Polyhexanid schwere und langanhaltende Blutdruckabfälle auf, deren Ursachen bislang nur unzureichend erforscht worden sind. In der vorliegenden Arbeit wurde deshalb in drei Versuchsteilen dieser Hypotension nachgegangen. Im ersten experimentellen Teil wurden die Auswirkungen einer peritonealen Applikation von Polyhexanid auf hämodynamische Parameter in gesunden Ratten untersucht. Im zweiten Teil wurde unter Verwendung der Intravitalmikroskopie die Reaktion von Gefäßen der intestinalen Mikrozirkulation gesunder Ratten auf eine lokale Superfusion mit Polyhexanid getestet. Im dritten Versuchsteil wurden die Wirkung von Polyhexanid auf Ringpräparationen der thorakalen Aorta von Ratten sowie die ihr zugrunde liegenden Mechanismen analysiert.

Die Untersuchungen haben gezeigt, daß peritoneale Instillation von Polyhexanid im Vergleich zu einer Instillation von Kochsalzlösung den Blutdruck signifikant senkte, die Herzfrequenz aber nicht beeinflusste. Die Superfusion eines ausgelagerten Ileumabschnittes mit Polyhexanid verursachte eine Dilatation von sowohl Venolen als auch Arteriolen in der Submukosa des terminalen Ileums. Polyhexanid relaxierte Aortenringe *in vitro*, die zuvor mit Phenylephrin zur Kontraktion gebracht worden waren. Dabei reagierten Präparationen mit intaktem Endothel signifikant empfindlicher auf Polyhexanid als Präparationen ohne Endothel. Einen ähnlichen Effekt zeigte die Inhibition der NO- und cGMP-Produktion. Für die beschriebene Relaxation waren weder eine Aktivierung von Muskarinrezeptoren, die Öffnung verschiedener Kalium-Kanäle noch die Generation von cAMP verantwortlich. Eine Inkubation mit dem  $\beta$ -Rezeptorenblocker Propranolol erhöhte die Sensitivität gegenüber Polyhexanid. Aortenringe, die mit 20mmol KCl zur Kontraktion gebracht worden waren, relaxierte Polyhexanid nur unvollständig, während Polyhexanid die mit 40mmol KCl herbeigeführte Kon-

traktion nicht beeinflusste. Die Präparationen, die sich nach Zugabe von Orthovanadat kontrahierten, reagierten uneinheitlich auf Polyhexanid.

Polyhexanid hat demnach relaxierende Effekte auf Blutgefäße der Mikro- und Makrozirkulation der Ratte. Diese Vasodilatation wird zum Teil durch das Endothel über den NO-cGMP-Weg vermittelt. Hypotensive Zustände während Peritoneallavage mit Lavasept könnten eine Folge dieser vasodilatierenden Wirkung sein.



## 6. Literaturverzeichnis

- (1) Abdel-Latif AA. Cross talk between cyclic nucleotides and polyphosphoinositide hydrolysis, protein kinases, and contraction in smooth muscle. *Exp Biol Med (Maywood)* 2001; 226 (3): 153-163.
- (2) Archer SL, Huang JM, Hampl V, Nelson DP, Shultz PJ, Weir EK. Nitric oxide and cGMP cause vasorelaxation by activation of a charybdotoxin-sensitive K channel by cGMP-dependent protein kinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1994; 91 (16): 7583-7587.
- (3) Bateman RM, Sharpe MD, Ellis CG. Bench-to-bedside review: microvascular dysfunction in sepsis--hemodynamics, oxygen transport, and nitric oxide. *Crit Care* 2003; 7 (5): 359-373.
- (4) Berger D, Buttenschoen K. Management of abdominal sepsis. *Langenbecks Arch Surg* 1998; 383 (1): 35-43.
- (5) Bienz R, Roth B. Lokale antiseptische Ulcus-cruris-Therapie mit Lavasept(R)-Lösung. In: Wassel P, Gerngroß H (Hrsg.). *Moderne Wundbehandlung*. Berlin et al: Springer-Verlag, 2001: 55-62.
- (6) Brandes RP, Schmitz-Winnenthal FH, Feletou M, Godecke A, Huang PL, Vanhoutte PM, Fleming I, Busse R. An endothelium-derived hyperpolarizing factor distinct from NO and prostacyclin is a major endothelium-dependent vasodilator in resistance vessels of wild-type and endothelial NO synthase knockout mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97 (17): 9747-9752.
- (7) Brophy CM, Knoepp L, Xin J, Pollock JS. Functional expression of NOS 1 in vascular smooth muscle. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2000; 278 (3): H991-H997.
- (8) Broxton P, Woodcock PM, Gilbert P. Binding of some polyhexamethylene biguanides to the cell envelope of *Escherichia coli* ATCC 8739. *Microbios* 1984; 41(163):15-22.
- (9) Broxton P, Woodcock PM, Gilbert P. Injury and recovery of *Escherichia coli* ATCC 8739 from treatment with some polyhexamethylene biguanides. *Microbios* 1984; 40 (161-162): 187-193.
- (10) Broxton P, Woodcock PM, Heatley F, Gilbert P. Interaction of some polyhexamethylene biguanides and membrane phospholipids in *Escherichia coli*. *J Appl Bacteriol* 1984; 57 (1): 115-124.
- (11) Buchler MW, Baer HU, Brugger LE, Feodorovici MA, Uhl W, Seiler C. Chirurgische Therapie der diffusen Peritonitis: Herdsanierung und intraoperative extensive Lavage. *Chirurg* 1997; 68 (8): 811-815.

- (12) Buchwalow IB, Podzuweit T, Bocker W, SamoiloVA VE, Thomas S, Wellner M, Baba HA, Robenek H, Schnekenburger J, Lerch MM. Vascular smooth muscle and nitric oxide synthase. *FASEB J* 2002; 16 (6): 500-508.
- (13) Buwalda M, Ince C. Opening the microcirculation: can vasodilators be useful in sepsis? *Intensive Care Med* 2002; 28 (9): 1208-1217.
- (14) Chieveley-Williams S, Hamilton-Davies C. The role of the gut in major surgical postoperative morbidity. *Int Anesthesiol Clin* 1999; 37 (2): 81-110.
- (15) Farquhar I, Martin CM, Lam C, Potter R, Ellis CG, Sibbald WJ. Decreased capillary density in vivo in bowel mucosa of rats with normotensive sepsis. *J Surg Res* 1996; 61 (1): 190-196.
- (16) Fresenius. Fachinformation des Arzneimittels Lavasept (R). 2003.
- (17) Frey L, Kesel K. Bedeutung der Perfusion des Gastrointestinaltrakts im Schock. *Anaesthesist* 2000; 49 (5): 446-450.
- (18) Furchgott RF, Zawadzki JV. The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholine. *Nature* 1980; 288 (5789): 373-376.
- (19) Gao Y, Usha RJ. Effects of SQ 22536, an adenylyl cyclase inhibitor, on isoproterenol-induced cyclic AMP elevation and relaxation in newborn ovine pulmonary veins. *Eur J Pharmacol* 2002; 436 (3): 227-233.
- (20) Gerthoffer WT, Gunst SJ. Invited review: focal adhesion and small heat shock proteins in the regulation of actin remodeling and contractility in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001; 91 (2): 963-972.
- (21) Gilbert P, Pemberton D, Wilkinson DE. Barrier properties of the gram-negative cell envelope towards high molecular weight polyhexamethylene biguanides. *J Appl Bacteriol* 1990; 69 (4): 585-592.
- (22) Gilbert P, Pemberton D, Wilkinson DE. Synergism within polyhexamethylene biguanide biocide formulations. *J Appl Bacteriol* 1990; 69 (4): 593-598.
- (23) Gupta S, McArthur C, Grady C, Ruderman NB. Stimulation of vascular Na(+)-K(+)-ATPase activity by nitric oxide: a cGMP-independent effect. *Am J Physiol* 1994; 266 (5 Pt 2): H2146-H2151.
- (24) Gupta S, Phipps K, Ruderman NB. Differential stimulation of Na<sup>+</sup> pump activity by insulin and nitric oxide in rabbit aorta. *Am J Physiol* 1996; 270 (4 Pt 2): H1287-H1293.
- (25) Hachenberg T, Grundling M. Die akute Insuffizienz der intestinalen Barriere - Pathophysiologie, Diagnostik, Prophylaxe und Therapie. *Anaesthesiologie und Reanimation* 1999; 24 (1): 4-12.

- (26) Hersch M, Madorin WS, Sibbald WJ, Martin CM. Selective gut microcirculatory control (SGMC) in septic rats: a novel approach with a locally applied vasoactive drug. *Shock* 1998; 10 (4): 292-297.
- (27) Ignarro LJ, Buga GM, Wood KS, Byrns RE, Chaudhuri G. Endothelium-derived relaxing factor produced and released from artery and vein is nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1987; 84 (24): 9265-9269.
- (28) Ikeda T, Tazuke S, Watanabe M. Interaction of biologically active molecules with phospholipid membranes. I. Fluorescence depolarization studies on the effect of polymeric biocide bearing biguanide groups in the main chain. *Biochim Biophys Acta* 1983; 735 (3): 380-386.
- (29) Jackson WF. Ion channels and vascular tone. *Hypertension* 2000; 35 (1 Pt 2): 173-178.
- (30) Johnson ML, Billiar TR. Roles of nitric oxide in surgical infection and sepsis. *World J Surg* 1998; 22 (2): 187-196.
- (31) Junqueira LC, Carneiro J. *Histologie: Histologie und mikroskopische Anatomie des Menschen unter besonderer Berücksichtigung der Histophysiologie*. Schiebler TH (Hrsg.). 4., korrigierte und aktualisierte Auflage; Berlin et al.: Springer, 1996.
- (32) Karaki H, Ozaki H, Hori M, Mitsui-Saito M, Amano K, Harada K et al. Calcium movements, distribution, and functions in smooth muscle. *Pharmacol Rev* 1997; 49 (2): 157-230.
- (33) Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, Russell AD. The lethal effects of biguanides on cysts and trophozoites of *Acanthamoeba castellanii*. *J Appl Bacteriol* 1996; 81 (1): 73-77.
- (34) Khunkitti W, Lloyd D, Furr JR, Russell AD. Aspects of the mechanisms of action of biguanides on trophozoites and cysts of *Acanthamoeba castellanii*. *J Appl Microbiol* 1997; 82 (1): 107-114.
- (35) Kirkeboen KA, Strand OA. The role of nitric oxide in sepsis--an overview. *Acta Anaesthesiol Scand* 1999; 43 (3): 275-288.
- (36) Klinke R, Silbernagel S. *Lehrbuch der Physiologie*. 2., neugestaltete und überarbeitete Auflage; Stuttgart; New York: Thieme, 1996.
- (37) Korzinek K. War injuries of the extremities. *Unfallchirurg* 1993; 96 (5): 242-247.
- (38) Kramer A, Adrian V, Adam C. Comparison of the Toxicity of Lavasept(R) and Selected Antiseptic Agents. *Hyg Med* 1993; 18 (1): 9-16.
- (39) Kramer A, Adrian V, Rudolph P, Wurster S, Lippert H. Explantationstest mit Haut und Peritoneum der neonatalen Ratte als Voraussagetest zur Verträglichkeit lokaler Antinfektiva für Wunden und Körperhöhlen. *Chirurg* 1998; 69 (8): 840-845.

- (40) Kujath P, Rodloff A. Peritonitis. 1. Auflage; Bremen: UNI-MED, 2001.
- (41) Lee JS. 1998 Distinguished Lecture: biomechanics of the microcirculation, an integrative and therapeutic perspective. *Ann Biomed Eng* 2000; 28 (1): 1-13.
- (42) Lin JC, Ward TP, Belyea DA, McEvoy P, Kramer KK. Treatment of *Nocardia asteroides* keratitis with polyhexamethylene biguanide. *Ophthalmology* 1997; 104 (8): 1306-1311.
- (43) Miura H, Liu Y, Gutterman DD. Human coronary arteriolar dilation to bradykinin depends on membrane hyperpolarization: contribution of nitric oxide and Ca<sup>2+</sup>-activated K<sup>+</sup> channels. *Circulation* 1999; 99 (24): 3132-3138.
- (44) Nelson MT, Quayle JM. Physiological roles and properties of potassium channels in arterial smooth muscle. *Am J Physiol* 1995; 268 (4 Pt 1): C799-C822.
- (45) Olivieri J, Eigenmann PA, Hauser C. Severe anaphylaxis to a new disinfectant: polyhexanide, a chlorhexidine polymer. *Schweiz Med Wochenschr* 1998; 128 (40): 1508-1511.
- (46) Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature* 1988; 333 (6174): 664-666.
- (47) Panda A, Ahuja R, Biswas NR, Satpathy G, Khokhar S. Role of 0.02% polyhexamethylene biguanide and 1% povidone iodine in experimental *Aspergillus* keratitis. *Cornea* 2003; 22 (2): 138-141.
- (48) Pfister A, Ochsner PE. Erfahrungen mit geschlossenen Spül-Saug-Drainagen und gleichzeitiger Anwendung eines Antiseptikums. *Unfallchirurg* 1993; 96 (6): 332-340.
- (49) Pfitzer G. Invited review: regulation of myosin phosphorylation in smooth muscle. *J Appl Physiol* 2001; 91 (1): 497-503.
- (50) Putney JW, Jr. TRP, inositol 1,4,5-trisphosphate receptors, and capacitative calcium entry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999; 96 (26): 14669-14671.
- (51) Quayle JM, McCarron JG, Brayden JE, Nelson MT. Inward rectifier K<sup>+</sup> currents in smooth muscle cells from rat resistance-sized cerebral arteries. *Am J Physiol* 1993; 265 (5 Pt 1): C1363-C1370.
- (52) Quayle JM, Nelson MT, Standen NB. ATP-sensitive and inwardly rectifying potassium channels in smooth muscle. *Physiol Rev* 1997; 77 (4): 1165-1232.
- (53) Rama P, Matuska S, Viganò M, Spinelli A, Paganoni G, Brancato R. Bilateral *Acanthamoeba* keratitis with late recurrence of the infection in a corneal graft: a case report. *Eur J Ophthalmol* 2003; 13 (3): 311-314.

- (54) Roth B, Baltzer K. Prophylaktische intraoperative Spülung bei Wundversorgung mit Lavasept. *Z Unfallchir Versicherungsmed* 1990; 83 (4): 224-226.
- (55) Roth B, Muller J, Willenegger H. Intraoperative Wundspülung mit einem neuartigen Antisepticum. *Helv Chir Acta* 1985; 52 (1): 61-65.
- (56) Ruiz-Velasco V, Zhong J, Hume JR, Keef KD. Modulation of Ca<sup>2+</sup> channels by cyclic nucleotide cross activation of opposing protein kinases in rabbit portal vein. *Circ Res* 1998; 82 (5): 557-565.
- (57) Sanders KM. Invited review: mechanisms of calcium handling in smooth muscles. *J Appl Physiol* 2001; 91 (3): 1438-1449.
- (58) Schmidt H, Secchi A, Wellmann R, Bach A, Bohrer H, Gebhard MM et al. Effect of endotoxemia on intestinal villus microcirculation in rats. *J Surg Res* 1996; 61 (2): 521-526.
- (59) Schmit-Neuerburg KP, Bettag C, Schlickewei W, Fabry W, Hanke J, Renzing-Kohler K et al. Wirksamkeit eines neuartigen Antiseptikums in der Behandlung kontaminierter Weichteilwunden. *Chirurg* 2001; 72 (1): 61-71.
- (60) Sielenkamper AW, Meyer J, Kloppenburg H, Eicker K, Van Aken H. The effects of sepsis on gut mucosal blood flow in rats. *Eur J Anaesthesiol* 2001; 18 (10): 673-678.
- (61) Smith JB. Calcium homeostasis in smooth muscle cells. *New Horiz* 1996; 4 (1): 2-18.
- (62) Steinbauer M, Harris AG, Abels C, Messmer K. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 2000; 385 (4): 290-298.
- (63) Swank GM, Deitch EA. Role of the gut in multiple organ failure: bacterial translocation and permeability changes. *World J Surg* 1996; 20 (4): 411-417.
- (64) Theuer CJ, Wilson MA, Steeb GD, Garrison RN. Microvascular vasoconstriction and mucosal hypoperfusion of the rat small intestine during bacteremia. *Circ Shock* 1993; 40 (1): 61-68.
- (65) Thorneloe KS, Chen TT, Kerr PM, Grier EF, Horowitz B, Cole WC et al. Molecular composition of 4-aminopyridine-sensitive voltage-gated K(+) channels of vascular smooth muscle. *Circ Res* 2001; 89 (11): 1030-1037.
- (66) Triggle CR, Ding H. Endothelium-derived hyperpolarizing factor: is there a novel chemical mediator? *Clin Exp Pharmacol Physiol* 2002; 29 (3): 153-160.

- 
- (67) Valluri S, Fleming TP, Laycock KA, Tarle IS, Goldberg MA, Garcia-Ferrer FJ et al. In vitro and in vivo effects of polyhexamethylene biguanide against herpes simplex virus infection. *Cornea* 1997; 16 (5): 556-559.
- (68) Wagner H, Wagner M. Infizierte Hüftgelenkprothesen. Gesichtspunkte für den einzeitigen und zweizeitigen Prothesenwechsel. *Orthopade* 1995; 24 (4): 314-318.
- (69) Wagner M. Lokale Antisepsis bei infizierten Hüfttotalendoprothesen. *Orthopade* 1995; 24 (4): 319-325.
- (70) Walsh MP. Regulation of vascular smooth muscle tone. *Can J Physiol Pharmacol* 1994; 72 (8): 919-936.
- (71) White RE, Kryman JP, El Mowafy AM, Han G, Carrier GO. cAMP-dependent vasodilators cross-activate the cGMP-dependent protein kinase to stimulate BK(Ca) channel activity in coronary artery smooth muscle cells. *Circ Res* 2000; 86 (8): 897-905.
- (72) Willenegger H. Klinische Erfahrungen mit einem neuen Antiinfectivum. *Hyg Med* 1994; 19: 227-233.

## 7. Abkürzungsverzeichnis

+ / -End	mit / ohne Endothel
4-AP	4-Aminopyridine
AT	Atropin
ATP	Adenosintriphosphat
CaD	Caldesmon
CaM	Calmodulin
cAMP	zyklisches Adenosinmonophosphat
CaP	Calponin
C <sub>AV</sub> -Kanäle	spannungsabhängige Ca <sup>2+</sup> -Kanäle
cGKI	cGMP-abhängige Protein Kinase I
cGMP	zyklisches Guanosinmonophosphat
ChTx	Charybdotoxin
Cl <sub>Ca</sub> -kanäle	Kalzium-abhängige Chloridkanäle
Cl <sub>VR</sub> -Kanäle	Volumen regulierte Chloridkanäle
cNOS	konstitutionelle Form der NO-Synthetase (=NOS1+3)
DAG	Diacylglycerol
EC <sub>50</sub>	mittlere effektive Konzentration
EDHF	<i>endothelium derived hyperpolarizing factor</i>
EDRF	<i>endothelium derived relaxing factor</i>
FITC-Dextran	Fluorisothiocyanat-Dextran
GLIB	Glibenclamid
GTP	Guanosintriphosphat
HMM	Schwere Kette des Myosins
HR	Herzfrequenz ( <i>heart rate</i> )
IP <sub>3</sub>	Inositoltriphosphat
IP <sub>3</sub> R	Inositoltriphosphat-Rezeptor
K <sub>ATP</sub> -Kanäle	ATP-abhängige Kaliumkanäle
K <sub>Ca</sub> -Kanäle	Kalzium-gesteuerte Kaliumkanäle
KCl	Kaliumchlorid
K <sub>IR</sub> -Kanäle	<i>inward rectifier</i> Kaliumkanäle
K <sub>V</sub> -Kanäle	Spannungsabhängige Kaliumkanäle

---

LMM	Leichte Kette des Myosins
L-NAME	N(G)-nitro-L-argininmethylester (Inhibitor der NOS)
MAP	mittlerer arterieller Blutdruck ( <i>mean arterial pressure</i> )
MLCK	Myosinleichtkettenkinase
MLCP	Typ1-Myosin-Phosphatase
NaCl	Kochsalz(-lösung)
NCX	Na-Ca-Austauscher
NO	Stickstoffmonoxid
NOS 1 (nNOS)	neuronale NO-Synthetase
NOS 2 (iNOS)	induzierbare NO-Synthetase
NOS 3 (eNOS)	endotheliale NO-Synthetase
NOS	NO-Synthetase
ODQ	1H-(1,2,4)Oxodiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-one (Inhibitor der Guanylylcyclase)
PE	Phenylephrin
PIP <sub>2</sub>	Phosphatidylinositolbiphosphat
PKA	cAMP-abhängige Kinase A
PKA	Proteinkinase A
PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMCA	Plasmamembran Ca <sup>2+</sup> adenosintriphosphatase
POLY	Polyhexanid
PROP	Propranolol
rMLC	regulatorsische Leichtkette des Myosins
SEM	Standardfehler des Mittelwertes ( <i>standard error of mean</i> )
SERCA	sarkoplasmatische Ca <sup>2+</sup> -ATPase
SGMC	Selektive Mikrozirkulationskontrolle im Darm ( <i>selective gut microcirculatory control</i> )
SIRS	Systemisches Inflammations Syndrome ( <i>systemic inflammatory response syndrome</i> )
SQ	9-(Tetrahydro-2-furanyl)-9H-purin-6-amine (Inhibitor der Adenylylcyclase)
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TEA	Tetraethylammoniumchlorid



Tm	Tropomyosin
VAN	Natrium-Orthovanadat

## **8. Anhang**

## 8.1 Abstracts

### 8.1.1 Kongreß der Deutschen Interdisziplinären Vereinigung für Intensivmedizin (DIVI), Hamburg 2002

#### **Polihexanid relaxing effects in rat aorta are partially nitric oxide mediated**

H. Frieling, M. Gruending, M. Wendt, D. Pavlovic

Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Ernst-Moritz-Arndt-Universität, Greifswald, Germany

Intensive treatment of septic peritonitis often includes abdominal lavage with a local disinfectant 4x10<sup>-2</sup>% polihexanid ("Lavasept 0.2%). Its administration is frequently followed by hypotension that could be due to its yet unknown vasodilating effects. We tested polihexanid for its vasoactive properties in an in vitro isometric preparation of rat thoracic aortal rings with or without endothelium. We examined effects on basic tension and in preparations precontracted with with 5x10<sup>-7</sup> M phenylephryne or 20 or 40 mM KCl. Polihexanid did not affect basic tension but relaxed aortas precontracted with phenylephryne, the preparations with endothelium being more sensitive (polihexanid, EC50: 4x10<sup>-4</sup> vs. 6x10<sup>-3</sup>%; with vs. without endothelium;n=8; P=0.001). One hour after washout repeated application of 5x10<sup>-7</sup>M phenylephryne produced only 72% of the control response indicating a long lasting effect of polihexanid. The relaxing effects in aortas with endothelium were blocked or reversed by both, N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, nitric oxide generation inhibitor (L-NAME, 4x10<sup>-4</sup>), and 1H-(1,2,4)Oxodiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-one, an inhibitor of guanylyl cyclase, (ODQ, 4x10<sup>-5</sup>M). The relaxing effect of high concentrations of polihexanid in the preparations without endothelium could be blocked by preincubation with charibdotoxin (3x10<sup>-8</sup>M), a potassium channel blocking agent. In the preparations precontracted with 20mM KCl polihexanid produced only small transient relaxation, but no relaxation was observed in the preparations that were precontracted with 40 mM KCl. We conclude that polihexanid produces relaxation of rat aorta in vitro. That effect seems to be partially mediated by the liberation of nitric oxide from the endothelium and to be linked to the cGMP pathway. The relaxation induced by high concentrations of polihexanid could be a result of NO independent K(Ca) channel activation. These findings indicate that in the rat, administration of polihexanid could result in vasodilation and hypotension.

Frieling H, Gruending M, Wendt M, Pavlovic D. Polihexanid relaxing effects in rat aorta are partially nitric oxide mediated. Intensivmed 2002;Suppl 1:I/37-I/37

### 8.1.2 World Congress of Anesthesiology (WCA), Paris 2004

#### **Lavasept® Induced Hypotension During Peritoneal Lavage is Due to its Vasodilating Properties: in Vivo and in Vitro Study in the Rat**

Helge Frieling, Matthias Gruendling, Kai-Steffen Lauer, Michael Wendt, Christian Lehmann, and Dragan Pavlovic

Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany

Treatment of peritonitis often includes abdominal lavage (AbL) with a local disinfectant “Lavasept 0.2%®” (LS) (polyhexanide 0.04%) that is often accompanied by hypotension. We examined in healthy rats: the effects of peritoneal installation of LS on blood pressure (MAP), the response of the intestinal submucosal microcirculation to local LS superfusion, and the effects of LS on rat aortal rings in vitro. Lavage with 10ml LS or saline (NaCl) (n=5 each) was conducted for 10min. and MAP registered. In 7 animals, diameter of submucosal blood vessels in a 2cm long section of the terminal ileum was measured before and after LS superfusion using in vivo intravital microscopy. In vitro, isometric preparations of rat aorta with or without endothelium (+ and – End) were precontracted with  $5 \times 10^{-7}$ M phenylephrine (PE) and the effects of LS examined. AbL with LS decreased MAP ( $\Delta$ MAP:  $-68.3 \pm 17.9$  vs.  $2.7 \pm 11.9$ ; mmHg; mean  $\pm$ -SD; LS vs. NaCl;  $p < 0.05$ ). Superfusion of intestine with LS caused local vasodilatation of venules (diameter,  $\mu$ m, before vs. after:  $201.5 \pm 20.2$  vs.  $229.2 \pm 25.8$ ;  $p < 0.05$ ) and arterioles ( $121.5 \pm 22.3$  vs.  $153.9 \pm 24.1$ ;  $p < 0.05$ ). In vitro, LS relaxed aortas precontracted with PE, the preparations +End being more sensitive ( $EC_{50}$ :  $2.53 \pm 0.16$  vs.  $1.36 \pm 0.16$ ; + vs. - End; means  $\pm$ -SEM;  $-\log$  LS;  $n=4$ ;  $p < 0.05$ ). This indicates that LS has vasodilating effects in the rat blood vessels which are partially mediated by the endothelium. Hypotension observed during abdominal lavage with LS may be due to its vasodilating property.

### 8.1.3 World Congress of Anesthesiology (WCA), Paris 2004

#### **Polyhexanide Relaxing Effects in Rat Aorta are partially mediated by Nitric Oxide and cGMP**

Helge Frieling, Matthias Grundling, Kai-Steffen Lauer, Christian Lehmann, Michael Wendt, and Dragan Pavlovic

Department of Anaesthesiology and Intensive Care Medicine, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald, Germany

Peritoneal lavage with the local disinfectant polyhexanide that is frequently performed during abdominal surgery is often followed by hypotension that could be due to vasodilating effects of the agent. We tested polyhexanide for its vasoactive properties in an in vitro isometric preparation of rat thoracic aortal rings with and without endothelium (+ and – End). The effects of cumulative concentrations of polyhexanide in preparations precontracted with  $5 \times 10^{-7}$  M phenylephrine, or 20 and 40mM KCl were examined. Polyhexanide relaxed aortas precontracted with phenylephrine, the preparations (+End) being more sensitive than (-End) (polyhexanide, EC<sub>50</sub>:  $9.6 \times 10^{-5}$  vs.  $6.2 \times 10^{-4}$  g%; + vs. -End; n=12; P<0.01). The relaxing effects in aortas (+End) could be partially blocked by preincubation with both, N(G)-nitro-L-arginine methyl ester, nitric oxide (NO) generation inhibitor (L-NAME,  $5 \times 10^{-4}$  M), and 1H-(1,2,4)Oxodiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-one, an inhibitor of guanylyl cyclase (ODQ,  $4 \times 10^{-5}$  M). The relaxing effect of polyhexanide in preparations (-End) were not affected by preincubation with atropine ( $5 \times 10^{-7}$  M), or potassium channel blocking agents charibdotoxin ( $5 \times 10^{-8}$  M), tetraethylammoniumchloride ( $5 \times 10^{-4}$  M), glibenclamide ( $5 \times 10^{-6}$  M), or 4-aminopyridine ( $5 \times 10^{-6}$  M). Preincubation with propranolol ( $5 \times 10^{-5}$  M) augmented slightly the relaxing effect of polyhexanide in the preparations (-End). In the preparations precontracted with 20mM KCl polyhexanide produced only small relaxation or, following 40mM KCl, no relaxation. We found that polyhexanide induced relaxation of the rat aorta in vitro, an effect that may be partially mediated via the NO-cGMP pathway and some activation of K<sup>+</sup> channels insensitive to the inhibitors that were used. These findings indicate that in the rat, administration of polyhexanide could result in vasodilatation and hypotension.

### 8.1.4 Hauptstadtkongreß für Anästhesie und Intensivmedizin, Berlin 2004

#### **Mechanismen der Lavasept® (Polyhexanid) - bedingten Vasodilatation während Peritoneallavage: Ergebnisse von in vivo und in vitro Untersuchungen in Ratten**

Helge Frieling, Matthias Grundling, Kai-Steffen Lauer, Christian Lehmann, Michael Wendt, und Dragan Pavlovic

Klinik für Anästhesie und Intensivmedizin, Ernst Moritz Arndt University, Greifswald

**Hintergrund:** Die Peritoneallavage (AbL) ist ein Eckpfeiler der Peritonitistherapie. Häufig werden lokale Antiinfektiva wie Lavasept 0,2%® (LS), eine Lösung des Biguanids Polyhexanid (POLY), zur Spülung verwendet. Wir untersuchten in gesunden Ratten die Auswirkung von peritonealer Instillation von LS auf den Blutdruck (MAP); die Reaktion der intestinalen submukosalen Mikrozirkulation auf LS-Superfusion und die Auswirkungen von LS und POLY auf Ringpräparationen der thorakalen Rattenaorta in vitro.

**Methode:** Es wurde eine Peritoneallavage mit 10 ml LS oder NaCl (jeweils n=5) für 10 Minuten durchgeführt und MAP registriert. Bei 7 Tieren wurden die Durchmesser submukosaler Blutgefäße innerhalb einer 2 cm langen Ileumschlinge vor und nach LS-Superfusion mittels intravitaler Fluoreszenzmikroskopie bestimmt. In isometrischen Präparationen der thorakalen Rattenaorta mit und ohne Endothel (+ vs.-End), die mit Phenylephrin(PE) oder KCl 20 oder 40 mmol kontrahiert worden waren, wurden die Effekte von LS bzw. POLY bestimmt.

**Resultate:** AbL mit LS senkte den Blutdruck ( $\Delta$ MAP:  $-68.3 \pm 17.9$  vs.  $2.7 \pm 11.9$ ; mmHg; mean  $\pm$ SD; LS vs. NaCl;  $p < 0.05$ ). Intestinale Superfusion mit LS verursachte eine Dilatation sowohl von Venolen (Durchmesser,  $\mu$ m, vorher vs. nachher:  $201.5 \pm 20.2$  vs.  $229.2 \pm 25.8$ ;  $p < 0.05$ ) als auch von Arteriolen ( $121.5 \pm 22.3$  vs.  $153.9 \pm 24.1$ ;  $p < 0.05$ ). In vitro relaxierten sowohl LS als auch POLY Aortenringe, die mit PE kontrahiert worden waren, Präparationen +End reagierten empfindlicher (LS:  $EC_{50}$ :  $2.53 \pm 0.16$  vs.  $1.36 \pm 0.16$ ; + vs. - End; MW  $\pm$  SEM;  $-\log$  LS; n=4;  $p < 0.05$ ; POLY  $EC_{50}$ :  $9.6 \times 10^{-5}$  vs.  $6.2 \times 10^{-4}$ g%; + vs. -End; n=12;  $P < 0.01$ ). Inkubation mit dem NO-Synthetasehemmer N(G)-nitro-L-arginine methyl ester (L-NAME) oder dem Guanylylcyclasehemmer 1H-(1,2,4)Oxodiazolo-(4,3-a)quinoxalin-1-one (ODQ) führte jeweils zu einer partiellen Hemmung der relaxierenden Wirkung von POLY. In den mit KCl 20mmol kontrahierten Präparationen verursachte POLY nur eine leichte Relaxation, während mit KCL 40mmol kontrahierte Aortenringe nicht mit POLY relaxiert werden konnten.

**Schlussfolgerung:** Wir konnten zeigen, daß LS und POLY relaxierende Effekte auf die Blutgefäße der Ratte haben. Diese werden zum Teil durch das Endothel über den NO-cGMP-Weg vermittelt. Hypotensive Zustände während Peritoneallavage mit Lavasept könnten eine Folge dieser vasodilatierenden Wirkung sein.

Frieling H, Gruending M, Lauer KS, Lehmann C, Wendt M, Pavlovic D. Mechanismen der Lavasept® (Polyhexanid) - bedingten Vasodilatation während Peritoneallavage: Ergebnisse von in vivo und in vitro Untersuchungen in Ratten. JAI 2004[2], 161. 2004.

## **8.2 Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit erkläre ich, daß ich die vorliegende Dissertation selbständig verfaßt und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, daß ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und daß eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Erlangen, den 5. April 2005

**8.3 Lebenslauf**

Name:	Helge Frieling
Anschrift:	Bayreuther Straße 7 91054 Erlangen
Geburtsdatum:	26.03.1977
Geburtsort:	Langen (Hes.)
Verheiratet mit	Kirsten Oline Frieling, geb. Schwab, Doktorandin der Geschichtswissenschaft
Schulabschluß:	Abitur 1996
Studium:	Humanmedizin an der Universität Greifswald
Beginn:	WS 1997/98
Ärztliche Vorprüfung:	1999
Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung:	2000
Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung:	2002
Praktisches Jahr: Innere Medizin	Klinik für Innere Medizin B (Kardiologie, Pulmologie und Internistische Intensivmedizin), Greifswald; Direktor: Prof. Stefan Felix
Praktisches Jahr: Chirurgie	Universita degli Studi di Siena, U.O. di Chirurgia vascolare; Direktor: Prof. Carlo Setacci
Praktisches Jahr: Psychiatrie	Klinik und Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Stralsund; Direktor: Prof. Harald J. Freyberger
Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung:	2003
Berufliche Tätigkeit:	
Arzt im Praktikum	Klinik mit Poliklinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Friedrich-Alexander Universität Erlangen-Nürnberg; Direktor: Prof. Johannes Kornhuber
Approbation als Arzt	01.Oktober 2004

Erlangen, den 5. April 2005



## 8.4 Danksagung

Am Zustandekommen einer Doktorarbeit sind stets mehr Menschen beteiligt als „nur“ der Doktorand. Daher gilt mein Dank Prof. Dr. Michael Wendt, ohne den als Direktor der Klinik eine Promotion schlicht unmöglich wäre.

Durch Wechsel am Lehrstuhl kam ich in den Genuß von zwei Doktorvätern. Prof. Dr. Dr. Thomas Hachenberg möchte ich besonders dafür danken, daß er mich „an Bord holte“ und, obwohl er zwischenzeitlich Universität und Stadt gewechselt hat, immer als Ansprechpartner mit Rat und Tat zur Verfügung stand.

Seinem Nachfolger, Prof. Dr. Christian Lehmann, gilt mein besonderer Dank für die intensive Förderung und Unterstützung. Beide waren für das Zustandekommen dieser Arbeit unverzichtbar.

Als Laborleiter war Dr. Dragan Pavlovic Dreh- und Angelpunkt aller durchgeführten Untersuchungen. Dank seines kritischen Nachfragens, seiner Diskussionsfreude und seiner Kreativität konnten viele Probleme gelöst oder rechtzeitig umgangen werden.

Besonderer Dank gebührt Kai-Steffen Lauer. Gemeinsam gelang es uns, die Intra-vitalmikroskopie in Greifswald „zum Laufen“ zu bringen. Durch wechselseitige Krisen während der letzten 4 Jahre konnten wir uns gegenseitig hindurchhelfen. Es ist eine Ehre für mich, ihn als meinen Freund bezeichnen zu dürfen.

Recht herzlich danken möchte Dr. Matthias Gründling, auf dessen klinischer Beobachtung diese Arbeit beruht und der immer wieder Zeit fand, den Verlauf der Arbeit zu unterstützen. Ebenfalls herzlich danken möchte Dr. Christof Strang, der in der Anfangsphase unverzichtbar für das Projekt war, sowie Dr. Konrad Meißner und Dr. Taras Usichenko für Diskussion und Anregung.

Dank gilt auch dem Team des Tierhauses Karlsburg und der Firma Fresenius.

Danken möchte ich auch meinen Eltern, die die Grundlage für Studium und Promotion in vielerlei Hinsicht gelegt haben.

Meine tief empfundene Dankbarkeit gilt meiner Frau Kirsten Oline, die mich allzu oft mit den „Ratten“ teilen mußte. Ohne ihre Unterstützung hätte mir der Durchhaltewillen in den letzten vier Jahren ein ums andere Mal gefehlt. Ihr widme ich diese Arbeit.