

1. Einführung

Von der Makro- zur Mikrozirkulation: Das Interesse am Monitoring der Mikrozirkulation in tierexperimentellen (175) und klinischen Studien (159) steigt beständig. Dies ist darauf zurückzuführen, daß die Mikrozirkulationsstörung immer bewußter als ein wesentlicher pathophysiologischer Bestandteil im Krankheitsprozeß angesehen wird.

Die Blutfluidität, d.h. der aktuelle Blutfluss in einem bestimmten Kreislaufabschnitt, ist abhängig von den Fließbedingungen und den Fließeigenschaften des Blutes. Determinanten *der Fließbedingungen* sind der Perfusionsdruck und die Gefäßgeometrie, *der Fließeigenschaften* dagegen der Hämatokrit, Viskosität, Erythrozytenverformbarkeit und in bestimmten Situationen die Leukozytenrheologie.

Die anatomische Charakterisierung der Mikrozirkulation beschreibt ein Netzwerk der Endstrombahn, welches aus Arteriolen, Kapillaren und Venolen mit einem Einzeldurchmesser von Weniger als 30-50µm besteht. Die wichtigere Definition der Mikrozirkulation bezieht sich allerdings auf den funktionellen Aspekt, daß nämlich die kapilläre Endstrombahn den Stoffaustausch überhaupt ermöglicht. Somit ist eine intakte Mikrozirkulation essentiell für die nutritive Perfusion der Gewebe und damit entscheidend für die Organfunktion.

Die Schwierigkeit der Mikrozirkulationsanalyse am Menschen besteht darin, dass direkte Messmethoden, die eine Visualisierung der Mikrozirkulation ermöglichen, nicht zur Verfügung stehen. Lediglich kann die Nagelfalzkapillaroskopie erwähnt werden, die allerdings auf die Akren beschränkt bleibt. So stützen sich die bisherigen Untersuchungen an soliden und/oder schlecht zugänglichen Organen im Wesentlichen auf indirekte Verfahren.

In Tierexperimenten steht mit der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie das Standardverfahren zur Mikrozirkulationsanalyse zur Verfügung. Beim Menschen kann diese Methode aufgrund der Notwendigkeit der Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen, die selbst direkt toxisch sind oder phototoxische Reaktionen hervorrufen, nicht angewendet werden. Mit der orthogonalen Polarisations-Spektrophotometrie - orthogonal polarization spectral (OPS)-

imaging (50) – ergibt sich nun die Möglichkeit einer direkten Visualisierung und Quantifizierung der humanen Mikrozirkulation. Ähnlich der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie (IFM) erfolgt die Darstellung der Mikrozirkulation durch Epi-Illumination, kann daher auch an soliden Organen angewendet werden. Bei völligem Verzicht auf die Anwendung von Fluoreszenzfarbstoffen zur Kontrastierung ist zudem die Anwendung am Menschen unbedenklich. Wie in tierexperimentellen kompetitiven Studien gezeigt werden konnte, sind sich die beiden Methoden bezüglich der Bildqualität und der Dimension der gemessenen Parameter gleichwertig (13, 14, 50, 55, 56, 79, 80, 179).

Die vorliegende Arbeit evaluiert die OPS Imaging Technik in Bezug auf deren Anwendbarkeit am Menschen. Dabei wurde das System zum Monitoring der konjunktivalen Mikrozirkulation während der Rekonstruktion der Arteria carotis interna, während der kombinierten Pankreas-, Nierentransplantation, sowie während der Leber-Lebendtransplantation des rechten oder linkslateralen Leberlappens und der Transplantation einer ganzen Leber nach Leichenspende, eingesetzt.

1.1. Bedeutung der Mikrozirkulationsmessung in der Transplantationschirurgie

Die Qualität von soliden Organen nach Transplantation wird durch spender- und empfängerabhängige, sowie konservierungsbedingte Faktoren beeinflusst. Eine qualitative Einschätzung des Transplantates ist neben klinischen und laborchemischen Kriterien durch Bestimmung von hämodynamischen und mikrozirkulatorischen Parametern möglich.

In der Transplantationschirurgie ist die Unterbrechung der Blutzufuhr und Freispülen der zu transplantierenden Organe mit Konservierungslösung untrennbar mit einer kalten Ischämie verbunden. Die Gesamtschämie beinhaltet neben der kalten Ischämie zusätzlich die gemischte warme Ischämie, die während der langsamen Transplantatabkühlung zu Beginn der Konservierung bis zur eigentlichen Organentnahme im Organspender, sowie der langsamen Wiedererwärmung während der Anastomosierung bis zur Reperfusion im Empfänger, entsteht. Der durch die sich ändernden Perfusions- und damit Versorgungsverhältnisse entstehende Schaden wird

unter dem Begriff des Ischämie/ Reperfusion (I/R) Schadens zusammengefasst und geht immer mit einer erheblichen Störung der Mikrozirkulation einher.

Die Mikrozirkulation steht damit im direkten Zusammenhang mit der Pathogenese der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion. Damit nimmt die Erfassung der Mikrozirkulation einen besonderen wissenschaftlichen und zunehmend auch klinischen Stellenwert ein, da mögliche therapeutische Angriffspunkte aufgedeckt und der Einfluss verschiedener Therapien überwacht werden können.

1.2. Mechanismen der Schädigung durch Ischämie und Reperfusion

Der Verlust der Sauerstoffversorgung nach der Unterbrechung der Blutzufuhr bei Organentnahme zwingt zur Umstellung von aerober auf anaerobe Energiebereitstellung. Diese wird durch Glykolyse sichergestellt, welche im Gegensatz zur aeroben Energiegewinnung jedoch nur noch 2 mol ATP pro mol Glukose liefert. Das aus Pyruvat anfallende Lactat kann in Abwesenheit von Sauerstoff nicht weiter verstoffwechselt werden, so dass eine Gewebe-Acidose resultiert. Mit Verschiebung des Säure-Basen-Haushaltes aus dem optimalen in den sauren pH-Bereich, kommt es zur Abnahme der Aktivitäten der Glykolyseenzyme und schließlich zum Ausfall der Glykolyse (67) Der daraus resultierende Zusammenbruch der Energieversorgung durch Adenosin-Triphosphat (ATP) führt zum Ausfall ATP-abhängiger Prozesse (63). Dies führt unter anderem zum Stillstand der ATP-abhängigen Zellmembranpumpen, wie z.B. die Natrium-Kalium-ATPase (20), in deren Folge die transmembranären Gradienten von Natrium, Kalium, Magnesium und Calcium verloren gehen (39). Mit dem Einstrom von extrazellulärem Natrium in die Zelle und ansteigendem intrazellulären osmotischen Druck folgt Wasser in die Zelle mit konsekutiver Zellschwellung (21, 57). Des Weiteren werden Protein- und Zytoskelettintegrität durch Proteasen und Phospholipasen gestört, die im Rahmen des passiv intrazellulär ansteigenden Calciums aktiviert werden (7, 15, 24, 31). Die Oxidation von Proteinen der Zellmembran endet in Membranintegritätsstörungen, die mit gesteigerter Permeabilität und Funktionsverlust einhergehen (25, 32) und einen besonders kritischen Punkt in der Ischämiephase darstellen (36, 46). Wird

eine spezifische Ischämietoleranz überschritten, so folgt nach Zusammenbruch des Zellstoffwechsels das Absterben der hypoxischen Zelle. Bis zu einem bestimmten Zeitpunkt sind jedoch die auftretenden Schäden durch einsetzende Reperfusion reversibel (152).

Während der kalten Ischämie laufen diese Prozesse durch die durch Abkühlung bedingte herabgesetzte Enzymaktivität langsamer ab, so dass sich die Ischämietoleranz des einzelnen Organs während kalter und warmer Ischämie erheblich unterscheidet. Je nach Organ zeigt sich ein Ischämietoleranzintervall bei der kalten Ischämie von bis zu 16 Stunden ohne daß erkennbare Spätfolgen auftreten (130). Hingegen treten bei der warmen Ischämie schon nach wenigen Minuten >30 Minuten nachhaltige Schäden auf (58, 146).

Durch die Reperfusion wird der Blutfluss wiederhergestellt, das Gewebe somit wieder mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt. Angefallene toxische Metabolite werden abtransportiert und es stellt sich wieder ein normaler pH-Bereich ein. Die Wiederaufnahme von Enzym- und Zellfunktionen setzt ein. Somit ist die Reperfusion essentiell für die Erholung und Funktionsaufnahme des Lebergewebes. Andererseits triggert die Reperfusion jedoch eine Vielzahl weiterer Schädigungsmechanismen. So werden durch die Reoxygenierung freie toxische Sauerstoffradikale gebildet (97). Membranschäden mit veränderten Permeabilitäten führen zu Elektrolytverschiebungen, die zu Veränderungen der elektrischen Potentiale über der Zell- sowie Mitochondrienmembran führen, wodurch zelluläre Enzymaktivitäten beeinträchtigt werden (84). Die Aktivierung von Endothel und Leukozyten setzt eine Kaskade in Gang, an deren Anfang die Freisetzung proinflammatorischer Zytokine wie Tumornekrosefaktor (α -TNF), Interleukin-1 (IL-1) und Interleukin-6 (IL-6) steht (182). Diese führen zu einer Leukozytenakkumulation und zu deren Aktivierung, welche wiederum eine vermehrte Freisetzung von Proteasen, Zytokinen und Sauerstoffradikalen zur Folge hat. Diese schädigen schließlich die Parenchym- und Nicht-Parenchymzellen (1, 48, 160).

1.2.1. Einfluß der I/R Schädigung auf die Mikrozirkulation

Ischämie- und Reperfusionenmechanismen induzieren im Wesentlichen zwei Phänomene, welche die Mikrozirkulation beeinflussen. Menger et al. untersuchten diese Phänomene an quergestreifter Muskulatur und bezeichneten diese als „no-reflow“ und „reflow-paradox“ (101, 102, 103). Das initiale Reperusionsversagen von Kapillaren im postischämischen Gewebe wird durch folgende Pathomechanismen hervorgerufen: Im Vordergrund steht eine Schwellung von Parenchym- und Endothelzellen (44, 83, 143), welche durch intrazellulären Natrium- und Wassereinstrom hervorgerufen wird (111). Die Verkleinerung des Kapillarquerschnittes führt nach dem Hagen-Poiseuille-Gesetz zu einem stark erhöhten Reperusionswiderstand (44). Ein erhöhter Hämatokrit in den Kapillaren, hervorgerufen durch vermehrte Extravasion von Elektrolyten und Wasser, führt ebenfalls zu einer Beeinträchtigung der Fließeigenschaften und damit zu einem erhöhten Widerstand (99).

Auch ein erhöhter Widerstand in den postkapillären Venolen, hervorgerufen durch Leukozytenadhäsionen, führt zur Beeinträchtigung der kapillären Perfusion (102).

Dem gegenüber stehen die Pathomechanismen des sogenannten „reflow-paradox“, der beeinträchtigten Mikrozirkulation bereits erfolgreich reperfundierter Kapillaren (103). Während der Reperfusion gebildete reaktive Sauerstoffradikale besitzen eine Schlüsselstellung in der Initiierung von Leukozyten-Endothelzell-Interaktionen und gesteigerter mikrovaskulärer Permeabilität (48, 49, 178). Die gebildeten Sauerstoffradikale induzieren die Expression von Adhäsionsproteinen an der Oberfläche kapillärer Endothelzellen (Selektine, ICAM's) (125), sowie an den Leukozytenzellmembranen (Selektine, Integrine, LFA-1 und Mac-1) (62, 90, 127). Über diese Adhäsionsproteine kommt es zur Leukozyten- und Endothelzellinteraktion (178), die in einer Sequenz von Margination, Leukozytenrollen („rolling“) und vollständiger Adhäsion („sticking“) ablaufen (141). Durch anschließende transendotheliale Migration (178) kommt es zu einer massiven Leukozyteninfiltration in das postischämische Gewebe mit Steigerung der Kapillarpermeabilität (103, 105) und konsekutiver Gewebeschädigung (61).

Nicht nur die zellulären Komponenten der kapillären Endstrombahn sind für die Modulation der Mikrozirkulation von Bedeutung, sondern auch einige vasoaktive Substanzen, die entweder im Sinne der Mikrozirkulationsregulation oder als Antwort auf endogene Stimuli freigesetzt werden (2, 4, 47).

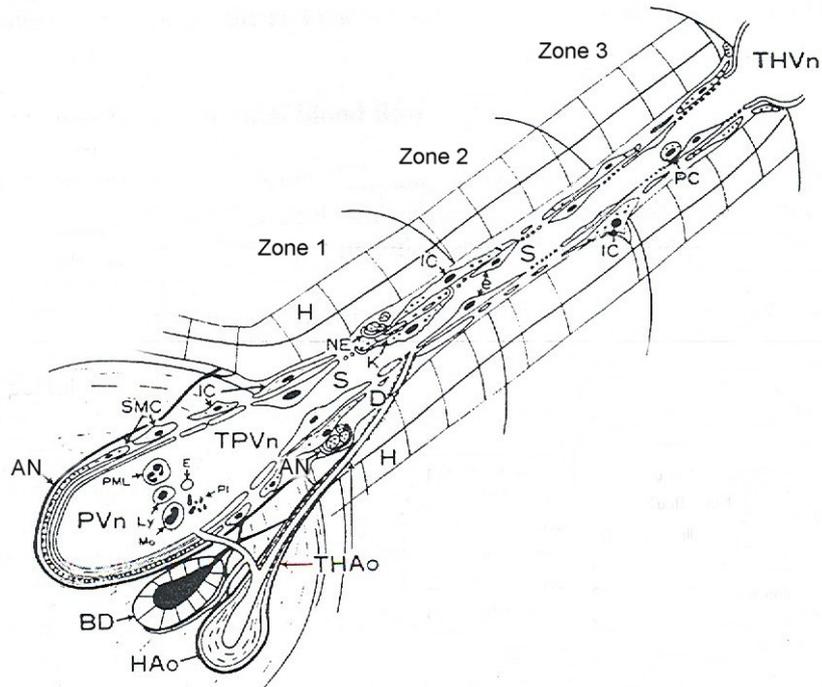
An der Regulierung sind vasokonstriktive Endotheline (ET) (6, 116, 118, 186) und das vasorelaxierende Stickstoffmonoxid NO (11, 118, 124) beteiligt. Das in Endothelzellen lokal gebildete Endothelin bindet an die Rezeptoren und führt über ein intrazelluläres Ca^{2+} -Kalmodulin-Actomyosin-System zur Tonuserhöhung der zur Kontraktion fähigen Zellen (ITO- und Sinusendothelzellen), sowie am Sinusendothel zu einer Veränderung der Zahl und Durchmesser der Fenestrae (116, 117, 120, 121). Die Endotheline scheinen im Rahmen der Transplantationschirurgie deshalb von Bedeutung zu sein, als dass erhöhte Plasmalevel nach Lebertransplantationen beim Menschen (85) und auch im Rattenmodell (165) nachgewiesen werden konnten. Der Einfluss von ET und deren Blockade durch ET Rezeptorantagonisten Bosentan wurde in weiteren Organmodellen von Herz (88, 123), Niere (59), Pankreas (35, 37) und Leber (47, 145) dargestellt.

1.2.2. Besondere Aspekte bei der Lebertransplantation

Aus tierexperimentellen Arbeiten ist bekannt, dass das Ausmaß der Mikrozirkulationsstörung direkt mit der Funktionsstörung des Transplantates korreliert (132, 133, 136). Als Hauptkomponenten findet man eine Störung der Leukozyten-Endothelzellinteraktion, Desintegration des Endothels sowie mikrozirkulatorische Flußstörungen (171, 172). Vollmar et al. (172) konnten zeigen, daß Leukozyten- Endothelinteraktionen und Leukozytenextravasation insbesondere aus den postsinusoidalen Venolen heraus erfolgt, deren Ausmass direkt mit der Leberzellschädigung, gemessen an den freigesetzten Transaminasen, korreliert.

Für das Verständnis der Mikrozirkulationsstörung an der Leber ist die Kenntnis der besonderen mikrovaskulären Anatomie der Leber von Bedeutung. Die mikrovaskuläre Architektur der Leber besteht aus zwei afferenten Gefäßen, der terminalen portalen Venole und der terminalen

hepatischen Arteriole, die in den Lebersinusoid münden. Die Sinusoide stellen den Ort der „kapillären“ Perfusion dar und drainieren schließlich in die efferenten terminalen hepatischen Venolen (140). Die Sinusoide zeichnen sich durch das fenestrierte Endothel aus, wodurch Blutplasma ungehindert in den perisinusoidalen Disse-Raum zirkulieren kann (183). Die folgende Abbildung nach Oda et al. (119) zeigt schematisch eine mikrovaskuläre Einheit mit ihrer zellulären Architektur.



Schematische Darstellung einer mikrovaskulären Einheit mit ihrer zellulären Architektur nach Oda et al. (119) S=Sinusoid, PVn=portale Venole, TPVn=terminale portale Venole, HAo=hepatische Arteriole, THAo=terminale hepatische Arteriole, THVn=terminale hepatische Venole, BD=Gallengang, AN=autonome Nervenenden, PML=polymorphe Leukozyten, Ly=Lymphozyt, Mo=Monozyt, E=Erythrozyt, Pl=Thrombozyt, E=sinusoidales Endothel, IC=Ito-Zelle, K=Kupffer'sche Sternzelle, PC=Pit-Zelle, H=Hepatozyt, SMC=glatte Muskelzellen.

Auffallend am spezialisierten mikrovaskulären System der Leber ist ein hoher Druckgradient zwischen präsinusoidalen portalen Venolen und Arteriolen einerseits und Sinusoiden andererseits (110).

Die Regulation des Blutzuflusses in die Sinusoide erfolgt durch einen Sphinkterapparat (98, 144), der aus Aktin- und Myosinfilamenten tragendem Endothel (40), sowie ITO Zellen (119) besteht. Dies ist Voraussetzung für die

Regulierung sowohl der sinusoidalen Durchmesser, als auch der Durchmesser und der Anzahl der Fenestrae, wodurch eine Steuerung des Plasmaflusses in den Disse-Raum ermöglicht wird (120, 187).

Neben den durch Ischämie und Reperfusion entstehenden Schaden ist der direkte Einfluss der Reperfusion bei der Lebertransplantation besonders hervorzuheben. Die initiale Reperfusion bei der Lebertransplantation kann entweder portalvenös (sequentiell) oder simultan nach Fertigstellung der portalen und arteriellen Anastomose erfolgen. Die Diskussion über die Überlegenheit der einen oder anderen Methode wird zwar grundsätzlich geführt, kann für die klinische Transplantation jedoch nicht mit quantitativen Daten belegt werden. Experimentelle Daten deuten auf der Ebene der Mikrozirkulation auf eine Überlegenheit der simultanen Reperfusion (131, 135, 136). Klinisch wird bei simultaner Reperfusion unter Ausnutzung des von Beginn an hohen Perfusionsdruckes sofort von einer homogeneren Perfusion berichtet, gemessen an dem makroskopischen Eindruck auf der Leberoberfläche (113). Des Weiteren zeigt sich eine niedrigere Inzidenz an Gallenwegskomplikationen (einer rein arteriellen Endstrombahn in der Leber) (150). Einige Autoren postulieren zur Ausnutzung des hohen arteriellen Perfusionsdruckes von Beginn der Perfusion an sogar eine initiale Arterialisierung (168). Dem gegenüber steht die Verlängerung der anhepatischen Zeit und der gemischten warmen Ischämiezeit.

1.2.3. Besondere Aspekte bei der Pankreastransplantation

Postischämische Minderdurchblutung und Störung der Mikrozirkulation stellen die entscheidenden pathogenetischen Faktoren in der Entstehung der Pankreatitis und des akuten Organversagens nach Pankreastransplantation dar (10, 52, 176). Experimentelle Untersuchungen zeigen, daß die in der Ischämie/ Reperfusionsphase induzierte Minderperfusion zu endothelialer Dysfunktion, Leukozytenadhärenz und Hypoxie des Transplantates mit postischämischer Pancreatitis und Beeinträchtigung der exokrinen Organfunktion führt (8, 10, 177). Es muss davon ausgegangen werden, dass die Mikrozirkulationsveränderungen sekundär entstehen. Neben der allgemeinen Schädigung durch Ischämie und Reperfusion scheinen am

Pankreas zusätzlich pankreas-eigene Faktoren eine besondere Rolle zu spielen, die die Schädigungskaskade in Gang bringen (66). Bei der Transplantation des humanen Pankreas beschränken sich bisherige quantitative Verfahren zur intraoperativen Erfassung der Transplantatreperfusion auf indirekte Verfahren und erlauben keine direkte Visualisierung der acinären Mikrozirkulation.

1.2.4. Mikrozirkulationsmonitoring in der Transplantationschirurgie

Zur Messung der hepatischen Mikrozirkulation wurden verschiedene Verfahren klinisch eingesetzt. Ein invasives Verfahren ist die Thermomodiffusion, bei der während der Transplantationsoperation ein Messsonde in das Transplantat eingebracht und über die folgenden postoperativen Tage die Perfusion quantitativ aufgezeichnet wird. Nach Abschluss der Überwachung erfolgt die transkutane Entfernung. Klar et al. (69) ermittelten bei normaler Transplantatfunktion Perfusionswerte zwischen 85 - 93 ml/100g Leberparenchym/min. Laser Doppler Flowmetry als nicht-invasive Messmethode wurde sowohl im Tiermodell (3, 122, 161, 181) als auch klinisch zur hepatischen Mikrozirkulationsmessung während der Transplantation (154, 155) eingesetzt. Mit der Inert Gas Clearance Methode, bei der die Perfusionsmessung durch Berechnung der hepatischen Clearance des Isotops ^{133}Xe erfolgt, wurden beim Hund und Menschen normale Perfusionswerte zwischen 100 – 130 ml/100g Leberparenchym / min gemessen (93). Bildgebende Verfahren, deren Anwendung am Menschen möglich ist, beschränken sich auf die Kapillaroskopie (33, 184) und Laser-scanning confocal imaging (138). Diese Techniken lassen sich jedoch nur an leicht zugänglichen Orten, wie Haut, Nagelfalz und Konjunktiva anwenden, wobei nur die Kapillaroskopie eine mikroskopische Darstellung erlaubt. Andere direkt bildgebenden Messverfahren, wie beispielsweise die IFM, sind zur Darstellung und Quantifizierung der hepatischen Mikrozirkulation weit überlegen. Die bildgebenden Verfahren erlauben eine direkte Beurteilung der Perfusion in den einzelnen Sinusoiden, Observierung von Leukozyteninteraktionen und Quantifizierung einzelner mikrozirkulatorischer Parameter wie die Erythrozytenflussgeschwindigkeit (RBCV = red blood cell

velocity), funktionelle sinusoidale/ kapilläre Dichte (FSD = functional sinusoidal density, FCD = functional capillary density), der sinusoidale/kapilläre Durchmesser (D) sowie der intersinusoidale/ -kapilläre Abstand (ISD = intersinusoidal distance/ ICD = intercapillary distance). Die IFM ermöglicht im Tiermodell, insbesondere im Rattenmodell, eine intensive Erforschung der hepatischen Mikrozirkulation und deren Beeinflußung unter I/R-Bedingungen und dem Transplantationsprozeß (27, 89, 91, 100, 132, 167, 172, 175). Der Einsatz phototoxischer Fluoreszenzfarbstoffe sowie die apparativen Eigenschaften beschränken jedoch die Anwendung der IFM auf das Tiermodell (175).

1.3. Carotis interna Stenose und Apoplexrisiko

Voraussetzung für eine effektive operative Apoplexprophylaxe ist die Gewährleistung einer niedrigen perioperativen Apoplexrate. Ziel des intraoperativen Monitoring während Rekonstruktionen der A. carotis int. (ACI) ist die frühe Erfassung einer zerebralen Minderdurchblutung.

In Deutschland wird mit einer Prävalenz von ca 800.000 Patienten mit interventionsbedürftigen Carotisstenosen gerechnet. Das Risiko eines Carotis-bedingten ipsilateralen Hirninfarktes korreliert signifikant mit dem Grad der Stenose und liegt bei höhergradigen Stenosen bei ca 2-5% pro Jahr. Dieses Risiko steigt auf 20% an, wenn es zu einem kompletten Verschluss einer bisher asymptomatischen Carotisstenose kommt, jeder dritte Patient erleidet ein reversibles neurologisches Defizit.

Große Multicenterstudien mit jeweils mehr als 3.000 Patienten (ECST, NASCET) konnten ebenfalls den prädiktiven Wert des Stenosegrades für das Apoplexrisiko und nachfolgend die signifikante Überlegenheit der Carotis-TEA gegenüber der alleinigen medikamentösen Therapie für höhergradige Stenosen aufzeigen (108, 114, 115). Das Risiko eines ipsilateralen Apoplex (einschließlich der perioperativen Apoplex-/ Letalitätsrate) betrug bei der alleinigen medikamentösen Gruppe nach 3 Jahren 20,6%, in der Operationsgruppe nur 6,8% (ECST: European Carotid Surgery Trial) und 22,2% versus 15,7% zugunsten der Operationsgruppe im NASCET (North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial). Diese Unterschiede nehmen mit zunehmenden Stenosegrad exponentiell an Deutlichkeit zu. Wenn auch deutlich geringer, so jedoch immer noch mit signifikantem Unterschied, gilt dies auch für höhergradige asymptomatische Carotisstenosen (ACAS; Asymptomatic Carotid Atherosclerosis Study): 5,1% in Operationsgruppe versus 11% in der medikamentösen Gruppe). Auch hier scheint der Stenosegrad prädiktiv für das Apoplexrisiko zu sein.

Ein Großteil der peri- und intraoperativen ischämischen Komplikationen entstehen auf dem Boden eines hämodynamischen Defizits während der Klemmphase oder aber durch Thrombembolien von Plaquematerial, welches während der Präparation oder durch die Freigabe des Blutstromes freigesetzt wird (149).

1.3.1. Monitoring während der Rekonstruktion der hirnversorgenden Arterien

Um das intra- und perioperative Apoplexrisiko zu erfassen, wurden daher verschiedene Monitoringverfahren eingesetzt. Das primäre Ziel des intraoperativen Monitorings während Rekonstruktionen der Arteria carotis interna ist die frühe und sichere Erkennung einer drohenden zerebralen Ischämie. Durch dieses Monitoring und das frühe Wahrnehmen solcher zerebralen Ischämieereignisse soll es ermöglicht werden, umgehend therapeutisch reagieren zu können (z.B. Einlage oder Korrektur eines intraluminalen Shuntes), um somit das postoperative Auftreten transienter und permanenter neurologischer Defizite verhindern zu können. Mit dieser Zielstellung kamen bisher völlig verschiedene Verfahren zum Einsatz, die jedoch unterschiedliche und zum Teil unzureichende Sensitivität und Spezifität bezüglich der Erkennung operationsbedingter Ischämieereignisse aufweisen. Im Einzelnen handelte es sich dabei um folgende Verfahren:

- intraoperative EEG-Untersuchungen
- Aufzeichnung somatosensorisch-evozierter Potentiale
- Bestimmung des Carotis-Stumpfdruckes
- transkranielle Doppler-Untersuchungen
- intraoperative Duplex-Sonographie und Angiographie
- Analyse des zerebral-venösen Sauerstoffgehaltes
- Durchführung der Carotisoperation in Lokalanästhesie
- Transkonjunktiviale Sauerstoffpartialdruckmessungen

Allen den o.a. Verfahren ist jedoch gemeinsam, daß eine direkte Visualisierung und quantitative Analyse der mikrovaskulären ischämie-/reperusionsbedingten Perfusionsveränderungen nicht möglich ist. Sie erfassen auf jeweils unterschiedliche Weise entweder makrohämodynamische, metabolische oder elektrophysiologische Veränderungen, die jedoch immer erst Folge eines mikrovaskulären

Perfusionsversagens sind und somit bereits nachfolgende Effekte einer präexistenten zerebralen Ischämie darstellen.

Das initiale Auftreten einer thrombembolisch- oder hypoperfusionsbedingten Mikrozirkulationsstörung (Ischämie), in Form kapillärer Stase, Vasokonstriktion und Sistieren der nutritiven Perfusion läßt sich jedoch mit keinem der bisherigen Verfahren darstellen.

Grundlage für die Messung der konjunktivalen Mikrozirkulation ist Kenntnis der arterielle Perfusion der Konjunktiva. Diese erfolgt aus den Aa. Conjunctivales über palpebrale Äste der Aa. nasales et lacrimales, sowie die Aa. ciliares anterior et posterior, die jeweils der Arteria ophtalmica entspringen. Somit stellt die Konjunktiva ein terminales Stromgebiet der Arteria carotis interna dar (29).

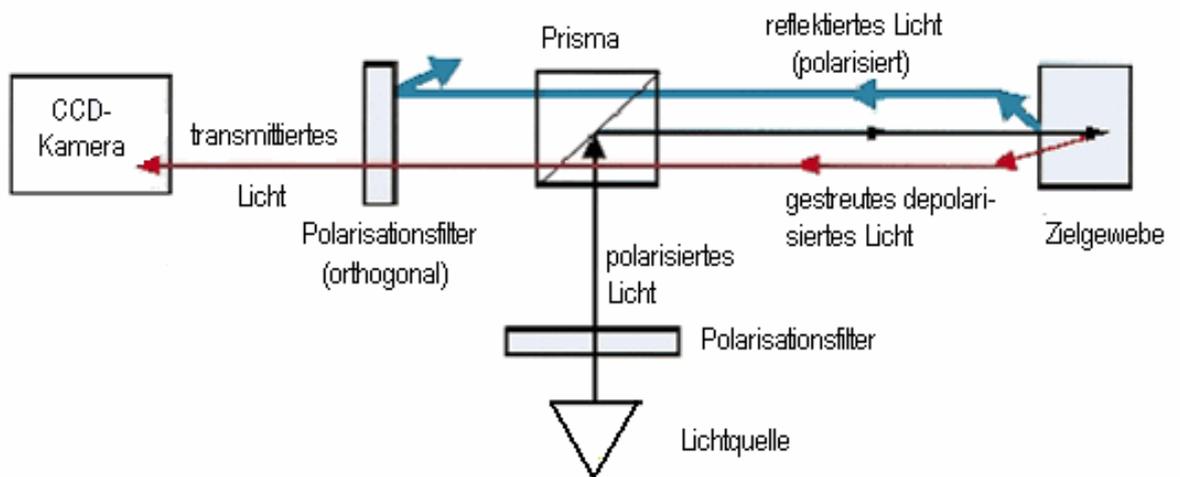
In Analogie zu den bislang unbekanntem ischämie-induzierten Veränderungen im Arteria carotis interna-Stromgebiet während Endarterektomie der Arteria carotis interna, gibt es bislang auch keine direkten mikrovaskulären Daten über die Mikrozirkulationsänderungen während der Reperfusionphase. Inwieweit reperfusionsbedingt im Arteria carotis interna-Stromgebiet eine reaktive Hyperämie oder ein „no reflow“-Phänomen (postischämische kapilläre Perfusionsversagen mit Stase, Konstriktion und erhöhter Leukozyten-Endothelzell-Interaktion) einsetzt und ob sich letztlich die Effektivität der Shuntperfusion anhand einer Restitution der während der Ischämie gestörten Mikrohämodynamik beurteilen läßt, ist bisher unklar.

Aufgrund der derzeitigen diagnostischen Möglichkeiten kann die Entstehung einer thrombembolisch oder hämodynamisch bedingten Ischämie nur in größeren zerebralen Gefäßen nachgewiesen werden. Diesen makrohämodynamischen Veränderungen gehen jedoch Veränderungen auf mikrozirkulatorischer Ebene voraus. Diese können bisher nicht oder nur unzureichend beurteilt werden (43).

1.4. Die Technik der orthogonalen Polarisations Spektrophotometrie

Die Erstbeschreibung dieser Technik erfolgte durch Groner et al. (50) im Oktober 1999. Durch die orthogonale Polarisations Spektrophotometrie (OPS Imaging) ist es erstmals möglich, in vivo Untersuchungen der Mikrozirkulation durchzuführen, ohne daß für die Bildkontrastierung toxische oder phototoxische Fluoreszenzfarbstoffe notwendig sind. Dies ermöglicht grundsätzlich die Anwendung einer intravitalmikroskopischen Methode am Menschen.

Die Bildgebung der Mikrozirkulation erfolgt durch ein exaktes Abbild des Hämoglobins in einer fokussierten Ebene 200 bis 500 μm unter der Organoberfläche. Dabei wird von einer in dem Messkopf integrierten Lichtquelle erzeugtes Licht auf einen Spektralfilter gelenkt. Dieser Filter isoliert Licht mit der Wellenlänge von 548 nm. Die Wellenlänge von 548 nm entspricht dabei exakt dem isobesten Punkt von Hämoglobin. Dies ist die Wellenlänge, bei der Hämoglobin sowohl in oxygenierter als auch in desoxygenierter Form zu gleichen Anteilen das auftreffende Licht absorbiert. Anschließend wird das Licht in einem Polarisationsfilter linear polarisiert. Dadurch werden die dreidimensionalen Schwingungen der Photonen auf zwei Dimensionen, also in einer Ebene, eingegrenzt. Dieses linear polarisierte Licht wird nun über ein Prisma um 90° abgelenkt und schließlich durch eine konvexe Linse auf eine Region von ca. 1 mm Durchmesser und 200 bis 500 μm tief im Gewebe fokussiert.



Optische Schemazeichnung eines OPS IMAGING Messkopfes modifiziert nach Groner et al (50)



Orthogonal polarization spectral imaging Messkopf nach Groner et al.(50)

Beim Auftreffen des polarisierten Lichtes auf das Parenchym wird ein Teil des Lichtes bereits an der Organoberfläche reflektiert, wobei es die polarisierten Eigenschaften beibehält. Ein weiterer Anteil des Lichtes wird beim Eindringen in das Gewebe gestreut. Das Streulicht verliert dabei seine Polarisation, so dass die Photonen wieder frei in allen drei Dimensionen schwingen. Ein Teil dieses Streulichtes wird vom Hämoglobin darüberliegender Gefäße absorbiert, während das hämoglobinfreie Gewebe weitgehend ungehindert passiert werden kann. Das vom Messkopf erfasste Licht durchläuft einen zweiten Polarisationsfilter, der dem ersten Filter orthogonal hintereinander geschaltet ist. Dieser filtert polarisiertes und Streulicht. Durch die orthogonale Ausrichtung der beiden Polarisationsfilter zueinander das bereits polarisierte reflektierte Licht beim Durchlaufen des Analysators vollständig herausgefiltert. Somit bleibt nur noch der depolarisierte Streulichtanteil zurück, welcher nach Durchlaufen des Analysators mit Hilfe einer charge-couple device (CCD) Videocamera in ein Bild gewandelt und auf einem Monitor dargestellt wird. Da ein großer Anteil des zurückkehrenden Streulichtes beim Durchlaufen von Hämoglobin absorbiert wird, bilden sich die hämoglobingefüllten Gefäße im negativen Kontrast zum umliegenden Parenchymgewebe ab.

1.4.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie versus OPS Imaging

Die OPS Imaging Technik ermöglicht damit die direkte Visualisierung der Mikrozirkulation mittels Epi-Illumination, kommt aber im Gegensatz zur IFM ohne Applikation toxischer oder phototoxischer Fluoreszenzfarbstoffe aus. Die Erythrozyten zeigen sich schwarz gefärbt und treten in deutlichem

Kontrast zu dem nahezu farblosen Hintergrund deutlich hervor. Als nachteilig im Vergleich zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie muss allerdings die Tatsache genannt werden, dass sich die Untersuchung der Mikrozirkulation auf die vaskulären Parameter stützt, die mittels durchfließender Erythrozyten erhoben werden können. Eine Beurteilung von Leukozyten-Endothelinteraktionen, die ebenfalls eine herausragende Stellung in der Pathogenese und Beurteilung einer Mikrozirkulationsstörung einnehmen, ist durch diese Technik nicht möglich. Mit dieser Technik kann die Mikrozirkulation ähnlich wie bei der Epiillumination der Intravitalmikroskopie visualisiert werden (50). Die in einem kleinen, mobilen Messkopf untergebrachte Messeinheit erlaubt den klinischen Einsatz am Menschen (16, 17, 28, 40, 41, 73, 78, 86, 95, 106, 126, 158, 159, 163, 164). Mathura et al. (94) verglichen mikrozirkulatorische Parameter des humanen Nagelfalzgewebes, aufgenommen mit OPS Imaging mit der konventionellen Kapillarmikroskopie. Es wurden bei beiden Messmethoden vergleichbare Messwerte bei signifikant besserem Kontrast bei der OPS Imaging- Methode ermittelt. In vergleichenden Studien zwischen der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie und OPS Imaging zeigten sich ähnliche Ergebnisse bei Messungen der Mikrozirkulationsparameter am Muskel im Rückenhautkammermodell am Hamster (55, 56). Langer et al. (79) validierten OPS Imaging gegen die IFM zur Messung hepatischer Mikrozirkulationsparameter am Rattenmodell. Die mit beiden Methoden gemessenen Parameter RBCV, D, und FSD korrelierten signifikant und zeigten eine gute Übereinstimmung nach der Bland-Altman-Analyse. Die Messungen wurden sowohl für physiologische Normalwerte als auch unter Reperusionsbedingungen nach 20 Minuten warmer Ischämie durchgeführt. Weitere Validierungsstudien wurden von Biberthaler et al. (12, 14) an Colonmukosa in Mäusen durchgeführt, die ebenfalls eine signifikante Übereinstimmung der Meßparameter zeigten.

Zur klinischen Analyse der humanen Mikrozirkulation wurde OPS Imaging zur Messung von Colon- und Rektummukosa (95), Gehirn (95, 126, 163, 164), oro-pharyngealer Tumore (86), Nagelfalzhaut (94), transkutan an Neugeborenen (26, 41, 42), kutan zum Überwachen der Wundheilung (73),

bei Verbrennungswunden (78, 106) und in zahlreichen Studien sublingual an Intensivpatienten (16, 17, 28, 158, 159) eingesetzt.

Dabei zeigten insbesondere die bisherigen Sepsis Studien (16, 17, 158, 159) sowie der Einsatz während neurochirurgischer Operationen (126) den außerordentlichen Wert der Untersuchungsmethode im Hinblick auf die Pathophysiologie der jeweiligen Erkrankung sowie der Möglichkeit der Therapieüberwachung auf der Ebene der Mikrozirkulation.

1.4.2. Prinzip der intraoperativen Messung

Die Kamera wird in einen sterilen Kamerabezug verpackt und am OP Tisch eingesetzt. Die Kamera wird auf das zu untersuchende Organ unter Kochsalzimmersion aufgesetzt und von Hand geführt. Dabei muss auf das drucklose Aufsetzen der Kamera auf das entsprechende Gewebe geachtet werden, welches unter Sichtkontrolle der Mikrozirkulation am Monitor wenig problematisch ist und sofort bemerkt wird, da eine kleine Druckerhöhung in der sofortigen Stagnation der Mikrozirkulation bis hin zum völligen Wegdrücken der korpuskulären Blutbestandteile aus dem Gewebe resultiert. Die einzelnen Messepisoden werden mit einem S-VHS Videorekorder aufgezeichnet.

1.4.3. Prinzip der Auswertung

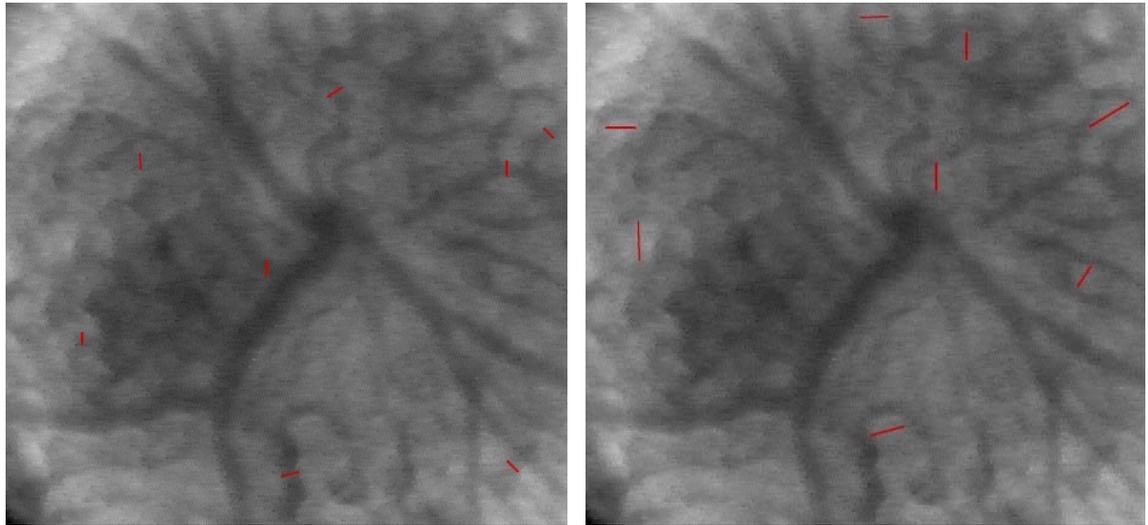
Die quantitative Auswertung der mikrozirkulatorischer Parameter aus den videoaufgezeichneten Messesequenzen erfolgt mit einem speziellen computerassistierten Analysesystem (CapImageTM, Zeintl, Heidelberg, Germany) (Zeintl 149). Der für das Abspielen der Videobänder (S-VHS TDK 30 min) benutzte Videorecorder (Panasonic AG-7350) wird mit Hilfe des CapImageTM – Rechners gesteuert. Somit ist es möglich, einzelne Standbilder auf den CapImageTM – Rechner zu überspielen und zu vermessen.

Es werden die Parameter kapillärer (Konjunktiva und Pankreas) bzw. sinusoidaler (Leber) Durchmesser, interkapilläre (Konjunktiva und Pankreas) bzw. intersinusoidale (Leber) Abstand, funktionelle kapilläre (Konjunktiva und Pankreas) bzw. sinusoidale (Leber) Dichte und die

Erythrozytenflussgeschwindigkeit quantitativ gemessen. Zusätzlich werden die Parameter volumetrischer Blutfluss innerhalb der Kapillaren bzw. Sinusoide (VBF = volumetric blood flow) und der Homogenitätsindex (HI = homogeneous index) der FCD/ FSD rechnerisch ermittelt.

Das Prinzip der Auswertung wird anhand der Leber-Videomikroskopie erläutert. Die Auswertungen der Pankreas und Konjunktiva Aufnahmen folgen demselben Prinzip.

Es werden aus den Aufnahmesequenzen eines Messzeitpunktes wahlweise 10 ± 5 Standbilder erzeugt und mit Hilfe der CapImage™ Software analysiert. Dabei erfolgt die Vermessung von acht Sinusoiden innerhalb eines Standbildes, indem mit einer Computermouse Messlinien zwischen den Wänden der Sinusoide eingezeichnet werden. Aufgrund der durch die OPS Imaging - Technik dargestellten Hämoglobin- und somit Erythrozytenabbildes entsprechen die sichtbaren und vermessenen Randlinien der Sinusoide dem Innendurchmesser der Gefäße. Aus diesen Messlinien berechnet die verwendete Software unter Berücksichtigung des Vergrößerungsfaktors von 465 jeweils die Messzahl. Aus diesen acht Messzahlen wird der Mittelwert gebildet, so dass pro Standbild ein Durchschnittswert der Sinusoiddurchmesser erhoben wird. Diese Durchschnittswerte wiederum werden mit Hilfe von Microsoft Excel™ gespeichert und später im Rahmen der Statistikberechnungen weiterverarbeitet. Folglich werden pro Aufnahmezeitpunkt zwischen 40 und 120 einzelne Sinusoide vermessen, aus denen schließlich ein Mittelwert pro Untersuchungszeitraum gebildet werden kann.



Vermessung der sinusoidalen Durchmesser (links) und der inter-sinusoidalen Abstände ISD (rechts) im Messbild

1.4.3.1. Messung des inter-sinusoidalen Abstandes

Die Ausmessung des inter-sinusoidalen Abstandes erfolgt analog zu der Diametermessung. In denselben 10 ± 5 Standbildern werden direkt nach der Messung der sinusoidalen Diameter die inter-sinusoidalen Abstände gemessen, indem Messlinien zwischen den Sinusoiden eingezeichnet werden und mit Hilfe der CapImage™ Software deren Längen errechnet werden. Es werden auch hier wieder acht Messwerte pro Standbild erhoben und gemittelt. Die Speicherung erfolgt in Microsoft Excel™ zur späteren statistischen Auswertung.

1.4.3.2. Messung der funktionellen sinusoidalen Dichte

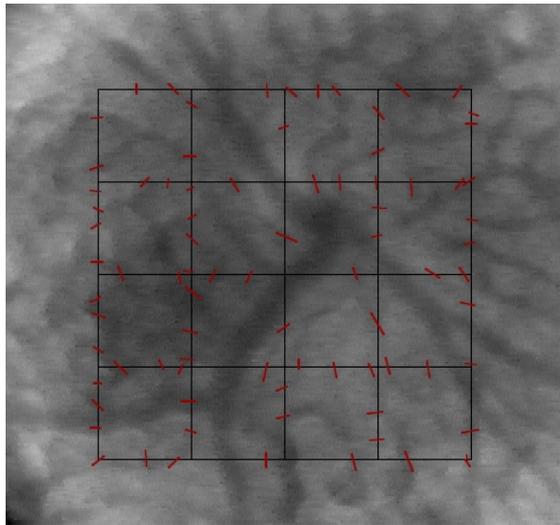
Die funktionelle sinusoidale Dichte ist definiert als die Gesamtlänge aller perfundierten Sinusoide pro Fläche. Entsprechend der Erstbeschreibung durch Schmid-Schönbein et al. [150] wird jeweils die Fläche von $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ ausgemessen und der Messwert in der Einheit cm/cm^2 ausgedrückt. Bei dieser Methode kommt ein Gitternetz zur Anwendung, welches ein in-vivo Beobachtungsfeld von $200 \mu\text{m} \times 200 \mu\text{m}$ eingrenzt. Der Rasterabstand beträgt $50 \mu\text{m}$. Dieses Gitternetz wird entsprechend dem Vergrößerungsfaktor und dem Abszissen – Ordinaten - Verhältnis des Videobildes auf eine Folie aufgezeichnet und zur Messung an der Oberfläche des Monitors befestigt. An den selben 10 ± 5 Standbildern wird nun die Anzahl N von Kreuzungen perfundierter Sinusoide und Gitternetzlinien

gezählt, in Microsoft Excel™ gespeichert und nach folgender Formel[150] die FSD berechnet:

$$FSD = \frac{\pi}{2} \times \frac{N}{L} \quad \left[\frac{cm}{cm^2} \right]$$

N = Anzahl der Kreuzungen perfundierter Sinusoide mit Gitternetzlinien

L = Gesamtlänge des Gitternetzsystems, hier L= 200 µm = 0,2 cm



Ermittlung der funktionellen sinusoidalen Dichte FSD im Messbild

Bei der späteren statistischen Auswertung werden die FSD Messwerte der einzelnen Standbilder gemittelt, so dass bei 10 ± 5 Standbildern ein aussagekräftiger Mittelwert pro Messsequenz vorhanden ist. Die Erstbeschreibung zur Erhebung der funktionellen kapillären Dichte FCD erfolgt wie bereits erwähnt, durch Schmid-Schönbein et al., an exokrinem Pankreasgewebe (151), sowie am Skelettmuskel (162). Alternativ kann die Methode nach Clemens et al. angewendet werden, bei der die Anzahl der Kreuzungen perfundierter Sinusoide mit einer 200 µm langen horizontalen Meßlinie ermittelt und hieraus entsprechend die FCD berechnet wird (27). Dabei ist der zu ermittelnde Wert entscheidend davon abhängig, wo der Beginn der Linie angesetzt wird und unterliegt damit einem Untersucher abhängigen Fehler, der in der Flächenmethode von Schmid-Schönbein et al. ausgeschlossen wird. Wir haben uns wegen der genaueren Messung daher für die Schmid-Schönbein et al. - Methode entschieden und diese für die funktionelle sinusoidale Dichte FSD angewendet.

1.4.3.3. Messung der Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit

Die Erfassung der Erythrozyten-Fließgeschwindigkeit (RBCV= red blood cell velocity) stellt eine dynamische Messung dar. Dabei wird auf einem Monitor (Grundig BG 661) der zurückgelegte Weg s einer Erythrozytensäule in einem bestimmten Zeitintervall Δt gemessen. Die Wegstrecke wird mit einem Meßschieber am Monitor ermittelt. Dabei wird darauf geachtet, dass der Anfang der Messstrecke an einer Gefäßaufzweigung liegt, um im Verlauf der Einzelbildweilerschaltung nicht die Orientierung zum Wegstreckenanzangspunkt zu verlieren. Nach drei bis sieben Einzelbildweilerschaltungen wird die zurückgelegte Wegstrecke der Erythrozytensäule pro Zeiteinheit gemessen. Dabei beträgt das Zeitintervall einer Einzelbildweilerschaltung exakt 20 ms. Dieser Wert läßt sich aus den technischen Angaben des Videorecorders (Panasonic AG-7350) entnehmen. Des Weiteren wird diese Angabe überprüft, in dem eine Videouhr (FOR-A VTG -33) bei einigen Videobändern mit aufgespielt und entsprechende Zeitintervalle ausgemessen werden.

Bei dem benutzten Monitor entspricht, nach Berechnung des Vergrößerungsfaktors, eine Distanz von 11,3 cm 200 μm realer Länge im Gewebe. Dies wird auch mit einer aufgezeichneten Maßskala verifiziert. Die reale Wegstrecke s der Erythrozyten in den Sinusoiden wird mit der resultierenden Verhältnisgleichung errechnet.

$$s = \frac{200 \mu\text{m} \times s_M}{11,3 \text{ cm}} \quad \begin{array}{l} s = \text{wahre Weglänge im Sinusoid} \\ s_M = \text{gemessene Wegstrecke am Monitor in cm} \end{array}$$

Die RBCV wird dann schließlich nach den Gesetzen der geradlinig gleichmäßigen Bewegung $v = s/t$ berechnet. Es wird darauf geachtet, dass in geradlinigen Sinusoidabschnitten gemessen wird, um Beschleunigungen auszuschließen, welche die Anwendung der gleichförmigen, geradlinigen Bewegungsgesetze verbieten würden.

Die Maßeinheit der RBCV wird in $\mu\text{m/s}$ angegeben (60). Es werden pro Perfusionszeitraum zwischen 5 und 12 Messungen durchgeführt und diese zu einem Mittelwert zusammengefasst.

1.4.3.4. Messung des volumetrischen Blutflusses

Der volumetrische Blutfluss in den Sinusoiden wird aus dem Durchmesser D und der Erythrozytenflussgeschwindigkeit RBCV bei Annahme einer zylindrischen Geometrie der Sinusoide/ Kapillaren berechnet (51).

Die Maßeinheit ist $\mu\text{m}^3/\text{s} = \text{fl}/\text{s}$. Die Berechnung erfolgt in Microsoft Excel™.

$$\text{VBF} = \left(\frac{\pi}{4}\right) \times D^2 \times \text{RBCV}$$

D = Durchmesser der Sinusoide

RBCV = red blood cell velocity