

3 Eigene Untersuchungen

3.1 Zielsetzung

Das Ziel der vorliegenden Studie ist die Etablierung eines „two-hit“ Modells beim Schwein, mit einem hämorrhagischen Schock als „first-hit“ und einer *Pseudomonas aeruginosa*-Sepsis als „second-hit“.

Insbesondere sollten die Effekte der *Pseudomonas aeruginosa*-Sepsis mit und ohne vorausgegangenen hämorrhagischen Schock auf klinische und hämodynamische Parameter vergleichend untersucht werden.

3.2 Material und Methoden

Die vorliegende Studie wurde gemäß § 8 des Tierschutzgesetzes von der zuständigen Kommission des Regierungspräsidiums Freiburg i. Br. unter dem Aktenzeichen 37/9185.81/1/128 genehmigt. Der tierexperimentelle Teil der vorliegenden Arbeit wurde von Juni 1998 bis Dezember 1999 in den Räumen der Chirurgischen Forschung der Chirurgischen Universitätsklinik Freiburg i. Br. durchgeführt.

3.2.1 Versuchstiere

In die Studie wurden 12 juvenile Schweine der Deutschen Landrasse aufgenommen. Sie waren beiderlei Geschlechts und stammten von einem ausgewählten Zuchtbetrieb im Freiburger Umland.

Die Tiere waren klinisch gesund und wurden randomisiert zwei Untersuchungsgruppen zugeordnet. Das Körpergewicht betrug in der Kontrollgruppe (n=6), Sepsis ohne vorherigen Schock, 31 ± 2 kg und in der Schockgruppe (n=6), hämorrhagischer Schock und Sepsis, 28 ± 5 kg.

3.2.2 Haltungsbedingungen

Die Tiere wurden in der Chirurgischen Forschung in einem für die intensivmedizinische Überwachung ausgerüsteten, gekachelten Raum gehalten. Die Bodenfläche (Spaltenboden) betrug 1,8 m x 3,1 m und die Raumhöhe 2,7 m. Als gepolsterte Liegefläche diente eine ca. 1,2 m² große Gummimatte. Der Raum war klimatisiert (Lufttemperatur 22 bis 26 °C, relative Luftfeuchtigkeit 60 % bis 70 %).

Die künstliche Beleuchtung (200 Lux) erfolgte im 12-Stunden-Rhythmus. Für die Dauer der Versuchsphase wurde zusätzlich eine Rotlichtlampe als Wärmequelle installiert. Wasser und Futter erhielten die Tiere ad libitum.

3.2.3 Versuchsprotokoll: Hämorrhagischer Schock

3.2.3.1 Präoperative Phase

Sieben Tage vor Versuchsbeginn wurden die Schweine angeliefert und im Tierstall der Chirurgischen Forschung eingestallt. Sie standen ab diesem Zeitpunkt unter ständiger Aufsicht und wurden einer klinischen Untersuchung ihres Gesundheitszustandes unterzogen. Durch zweimaliges Training pro Tag wurden die Tiere an das ruhige Verharren in einem Hängemattengestell mit Futter konditioniert. In dieser Hängematte erfolgten dann später gemäß dem Versuchsprotokoll die hämodynamischen Messungen und die Blutentnahmen. 24 Stunden vor der Katheterimplantation wurde bei weiterhin freiem Zugang zum Wasser das Futter entzogen.

3.2.3.2 Anästhesie und präoperative Vorbereitung

Prämedikation und Narkoseeinleitung

Zur Prämedikation erhielten die Tieren im Stall 0,5 mg/kg KGW Flunitrazepam (Rohypnol , Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen, BRD) und 20 mg/kg KGW Ketaminhydrochlorid (Ketavet , Fa. Pharmacia & Upjohn, Erlangen, BRD) mit einer 21G Kanüle (Sterican , Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) und einer Original Perfusor Leitung (Luerlock, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) als Verlängerung intramuskulär.

Nach dem Niederlegen wurden sie auf der Rollbahre in den Vorbereitungsraum geschoben und zur Bestimmung des aktuellen Körpergewichts gewogen.

Nach Legen eines periphervenösen Zuganges mit Hilfe einer Braunüle (Vasofix , Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) in eine Ohrtrandvene und mindestens 3-minütiger Präoxygenierung, erfolgte die Einleitung der Anästhesie mit 2 bis 3 mg/kg KGW Propofol (Disoprivan , Fa. Zeneca GmbH, Plankstadt, BRD) intravenös. Die Tiere wurden anschließend in Rückenlage unter laryngoskopischer Kontrolle orotracheal mit einem Endotrachealtubus (Super safety clear, ID 6-7 mit Niederdruckcuff, Fa. Rüsch, Waiblingen, BRD) intubiert. Nach Blocken des Cuffs wurde mit einem Beatmungsbeutel (Fa. Dräger, Lübeck, BRD) die Lage des Tubus auskultatorisch verifiziert und der Tubus dann am Oberkiefer mit Pflaster (Leukoplast , Fa. Beiersdorf AG, Hamburg, BRD) fixiert.

Zur Muskelrelaxierung wurden 0,4 mg/kg KGW Vecuroniumbromid (Norcuron , Fa. Organon Teknika, Eppelheim, BRD) intravenös gegeben. Zur Prävention einer Magensekretaspiration in der späteren Aufwachphase wurde eine Magensonde (Fa. Rüsch, Waiblingen, BRD) peroral in den Magen vorgeschoben und distal mit einem Sekretauffangbeutel konnektiert.

Für den operativen Eingriff scherte man das Schwein großzügig im ventralen Halsbereich und reinigte es mit Wasser. Die Klauen wurden mit Einmalhandschuhen (Ansell Medica, Ansell GmbH, München, BRD) versehen und das so vorbereitete Schwein in den Operationssaal verbracht.

Man fixierte die Tiere in Rückenlage auf dem OP-Tisch auf einer Wasserthermomatte mit untergelegter Vakuummatratze. Danach erfolgte das Anbringen der Klebeelektroden für das EKG (2. Ableitung nach Einthoven) und der Neutralelektrode für das Hochfrequenz-Chirurgiegerät (Elektrochirurgiegerät ME 401, Martin Medizintechnik, Tuttlingen, BRD). Der Sensor des Pulsoxymeters wurde an der Schwanzwurzel mit Pflaster fixiert.

Aufrechterhaltung und Anästhesie

Für die operative Phase wurde die Narkose als kombinierte Injektions- und Inhalationsnarkose aufrecht erhalten. Hierzu erhielten die Tiere über Injektionspumpen (Perfusor F , Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) 0,1 bis 0,2 mg/kg KGW/h Flunitrazepam, 2 bis 3 mg/kg KGW/h Propofol, 0,2 bis 0,3 mg/kg KGW/h Vecuroniumbromid und 3 bis 5 µg/kg KGW/h Fentanyl (Fentanyl , Fa. Janssen, Neuss, BRD) intravenös. Die Beatmung erfolgte mit O₂/NO₂ (FiO₂ 0,3) mittels eines Narkosebeatmungsgerätes (Cato , Fa. Dräger, Lübeck, BRD) im IPPV Modus und einer Grundeinstellung des Atemzugsvolumen von 10 ml/kg KGW und

der Atemfrequenz von 15 Zügen/min. Die Beatmungsparameter wurden zur Aufrechterhaltung physiologischer Verhältnisse individuell adjustiert.

Zur Basisvolumenssubstitution und als Trägerlösung wurden 15 ml/kg KGW/h Ringer-Lösung (Fa. Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, BRD) i.v. infundiert.

3.2.3.3 Katheterimplantation

Die Katheterimplantation erfolgte ebenso wie die nachfolgende Induktion des hämorrhagischen Schocks und seiner Therapie unter sterilen Bedingungen. Die Haut im Bereich der ventralen Halsseite wurde mit einer jodhaltigen Lösung (Jodobac, Bode Chemie, Hamburg, BRD) über 5 Minuten desinfiziert und das Tier bis auf das OP-Feld mit sterilen OP-Tüchern abgedeckt.

Als zusätzliche Maßnahme zur Infektionsvermeidung wurde 1 g Cefotiam (Spizef 1,0 g, Fa. Takeda-Pharma GmbH, Aachen, BRD) intravenös verabreicht.

Mit dem Skapell (Disposable, Fa. Pfm GmbH, Köln, BRD) eröffnete man die Haut in der Mitte einer gedachten Strecke zwischen dem Manubrium sterni und dem Kieferwinkel linksseitig paramedian auf einer Länge von 10 cm. Das Platysma wurde mit dem Elektromesser durchtrennt und die A. carotis communis bzw. die V. jugularis externa durch weitgehend stumpfe Präparation dargestellt.

Die Gefäße wurden mit Vesseloops (Super Maxi, Fa. Henley International, Sugarland, Texas, USA) angezügelt und diese mit feinen Arterienklemmen fixiert. Nach kranial band man die Gefäße mittels nichtresorbierbarem Fadenmaterial (Novavil, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) ab. Anschließend wurde ein Abbocath -T (Fa. Deutsche Abbott GmbH, Wiesbaden, BRD) herzwärts in das entsprechende Gefäß eingeführt. Über diesen wurden der Cavafix -Katheter (Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) in die Arteria carotis communis bzw. das Schleusensystem für den Swan-Ganz Thermodilutionskatheter (Fa. Baxter, Unterschleißheim, BRD) in die Vena jugularis eingeführt und mit einem nichtresorbierbaren Faden im Gefäß fixiert. Durch Entfernen des Führungsdrahtes konnten nach Aufsetzen eines Dreiwegehahns die Katheter mit steriler Ringer-Lösung gespült werden. Direkt nach der Implantation des arteriellen Katheters und der Bestimmung der aktivierten Gerinnungszeit (ACT) mittels eines ACT Tester (Hemochron 801, New York, USA) wurden abhängig von dem Ergebnis 2000 bis 5000 IE Heparin (Liquemin N, Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen, BRD)

intravenös verabreicht. Zusätzlich wurden noch 4 ml Blut für die Blutkulturen (TSB, 70 ml, Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen, BRD) entnommen.

Danach wurden die Wundränder mit einer fortlaufenden Naht mit resorbierbarem Nahtmaterial (Dexon II 2/0, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) adaptiert. Unter Monitorkontrolle erfolgte die Einführung des Swan-Ganz-Thermodilutionskatheters. Dafür nahm man sich den Wedge-Ballon zur Hilfe, der sich unmittelbar an der Katheterspitze befindet. Er wurde entfaltet, und man schob den Katheter unter fortlaufender Druckkontrolle via Vena cava cranialis und rechten Vorhof in den rechten Ventrikel und dann weiter in die Arteria pulmonalis vor. Die korrekte Lage wurde durch die typische Wedge-Kurve auf dem Monitor angezeigt. Nun zog man den Plastikschutz über den Katheter und fixierte ihn an der Schleuse.

3.2.3.4 Schockphasen

Äquilibration

Das Lachgas wurde ausgestellt, das Tier initial mit 100 % Sauerstoff und danach mit Raumluft beatmet, sodass die inspiratorische Sauerstofffraktion zwischen 21 % und 22 % lag. Als Kriterium für den Schockbeginn setzte man sich folgende Zielwerte:

- PaCO₂: 35-41 mmHg
- Zentral venöser Druck (ZVD): 3-4 mmHg
- Pulmonal kapillärer Verschlussdruck (PCWP): 4-6 mmHg

Die Trägerlösung betrug nun 2 ml/kg KGW/h.

Die S_O-Messung wurde durchgeführt.

Hämorrhagischer Schock

In sterile Blutkonservenbeutel (COMPOFLEX, CPDA-1, 500 ml, NPBJ, Emmer-Compascuum, Niederlande) wurde mit Hilfe einer sterilen Spritze (Original Perfusor - Spritze, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) über den Dreiwegehahn („Discofix“, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) und Transfusionsschläuche (Transfusionsset für Blut und Blutkomponenten, unbelüftet, Filter 200µm, drehbarer Luer-Lock, Fa. Baxter S.A., Lessings, Belgien) über 30 bis 40 min 37 ± 7 ml Blut/kg KGW bzw. 990 ± 103 ml pro Schwein entzogen. Es galt folgende Zielgrößen zu erreichen:

- Mittlerer arterieller Druck (MAP): 40-45 mmHg oder
- Abfall des Herzindex (CI) um mehr als 50 %

Die Phase des hämorrhagischen Schocks wurde für 45 min aufrechterhalten. Gegebenenfalls, bei starkem Anstieg des MAP, entnahm man erneut Blut. Das Atemminutenvolumen (AMV) wurde wie bei der Äquilibration konstant gehalten.

Die S0a – Messung schloss sich an.

Volumensubstitution

Entsprechend des 2-fachen Volumens der entzogenen Blutmenge wurde Vollelektrolyt-Lösung (Jonosteril[®], Fa. Fresenius, Bad Homburg, BRD) und isotone Elektrolytlösung mit Hydroxyethylstärke (HAES-steril[®] 6 %, Fa. Fresenius Kabi, Bad Homburg, BRD) im Verhältnis 2 : 1 verteilt über eine Stunde infundiert. Als Ziel setzte man sich die schnelle Stabilisierung des MAP auf Prä-Schockniveau.

Folgende Zielgrößen wurden zusätzlich festgesetzt :

- Mittlerer pulmonalarterielle Druck (MPAP): < 45 mmHg
- Kohlendioxidpartialdruck (PaCO₂): 35-41 mmHg
- Inspiratorische Sauerstofffraktion (FiO₂) bei der Beatmung: 60 %

Es folgte der Mess-Status S0b.

Retransfusion

Hier erfolgte die Rückgabe des entzogenen Blutes über den Zeitraum von einer Stunde.

Der FiO₂ wurde auf 0,3 eingestellt. Die Sauerstoffsättigung sollte mindestens bei 95 % und der Kohlendioxidpartialdruck bei 35 bis 41 mmHg liegen.

Anschließend wurde die Messung S0c durchgeführt.

3.2.3.5 Ausleitung

Die Schweine erhielten reinen Sauerstoff. Die Perfusoren wurden ausgestellt. Man legte einen Verband (Rudavlies , NOBA-Verbandmittel, Danz GmbH & CoKG, Wetter-Wengen, BRD) an. Die Beatmungsfrequenz wurde stufenweise herabgesetzt bis das Schwein regelmäßige Spontanatmung zeigte und sämtliche Reflexe wieder vollständig vorhanden waren. Zuerst zog man die Magensonde. Anschließend wurde der Tubus entblockt und unter Absaugen entfernt.

3.2.3.6 Postoperative Phase

Die Schweine wurden in einen intensivmedizinischen Stallbereich verbracht. Um die Durchgängigkeit der implantierten Katheter bzw. der Katheterzugänge zu gewährleisten, wurden sie an ein Spülsystem (Perfusor F , Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) angeschlossen. Insgesamt benötigte man hierfür drei Perfusorpumpen: Eine zur Spülung des arteriellen Katheters, eine für den pulmonalarteriellen Zugang und eine für den venösen Zugang am Swan-Ganz Thermodilutionskatheter. Alle Pumpen wurden mit Hilfe von hintereinander geschalteten Perfusorschläuchen (Original Perfusor -Leitungen, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) über einen Dreiwegehahn (Discofix , Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) mit dem entsprechenden Katheterzugang verbunden. Man spülte jeden Zugang kontinuierlich bei einem Flow von 6 bis 8 ml/h, wobei der venösen und der gemischt-venösen Spüllösung Heparin (Liquemin N, Fa. Roche, Grenzach-Wyhlen, BRD) in einer Konzentration von 100 I.E./ml zugesetzt wurde. Beim arteriellen Spülsystem verzichtete man auf diesen Zusatz, um weiterhin unverfälschte ACT („activated clotting time“)-Werte zu gewinnen. Während des Versuchablaufs wurde die stündlich verabreichte Heparinkonzentration durch die Perfusorpumpen immer so modifiziert, dass bei den Messungen die gewonnenen ACT-Werte über 150 Sekunden lagen.

Um den Swan-Ganz[®] Thermodilutionskatheter und das Spülsystem vor Schmutz auf dem Boden und auch vor der Zerstörung durch das Tier zu schützen, wurden sie durch ein flexibles Trägersystem, welches zwischen Tier und Decke angebracht wurde, unter Spannung gehalten.

3.2.3.7 Ernährung

Die parenterale Ernährung, die ab dem S1-Stadium begann und während des ganzen Versuches aufrechterhalten wurde, erfolgte über den Seitenschenkel der Venenschleuse. Die Versuchstiere erhielten intravenös Aminosäurelösung (Aminomel 8 E salvia Fa. Clintec GmbH & Co. OHG, Weinheim, BRD), Glukoselösung (Glukose-Lösung 50 %, Fa. Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, BRD) und Ringer-Lösung, wobei letztere schon direkt nach der Operation verabreicht wurde.

Der tägliche Energiebedarf des Schweines wurde entsprechend seinem Körpergewicht errechnet:

- Kohlenhydratbedarf: $2 \times 97 \times (\text{kg KGW})^{0,655}$ kcal/Tag
- Proteinbedarf: 4 g/kg KGW/Tag

- Volumenbedarf: 90 ml/kg KGW/Tag

Bei Fieber wurde das Flüssigkeitsvolumen erhöht. Alle 12 Stunden wurde mit Hilfe der Glukosebestimmung des arteriellen Blutes kontrolliert, ob die Energiezufuhr ausreichte.

3.2.4 Versuchsprotokoll: Sepsisphase

3.2.4.1 Bakterienvorbereitung

Drei Tage vor Sepsisinduktion wurden die Bakterien vom Typ *Pseudomonas aeruginosa* (Stamm 1) von der Glycerin-Dauerkultur auf eine Luria Butani (LB)-Agarplatte ausgestrichen. Am folgenden Tag kontrollierte man (Form, Farbe, Größe, Geruch), ob es sich bei den gewachsenen Kolonien wirklich um *Pseudomonas aeruginosa* handelte. Danach wurden unter sterilen Bedingungen 2 Kolonien dieses Bakterienstammes in ein Reagenzglas mit 5 ml LB-Medium überimpft und über ca. 16 Stunden, bei 37 °C und 160 Umdrehungen pro Minute inkubiert. Anschließend wurde soviel an nun getrübtetem LB-Medium aus dem Reagenzglas in einen sterilen Kolben mit sterilem 200 ml LB-Medium überimpft, dass die OD-Messung bei 600 nm Wellenlänge $OD_{600nm} = 0,1$ ergab.

Man inkubierte den Kolben bei 37 °C und 160 Umdrehungen pro Minute bis die OD_{600nm} -Messung bei $OD_{600nm} = 3,0$ lag. Nun wurde die Bakteriensuspension in ein Zentrifugegefäß, welches vorher mit Alkohol desinfiziert worden war, gefüllt. Man bestimmte das Gewicht des Gefäßes, um das entsprechende Gegengewicht für die Zentrifuge („Rotixa IRP“, Fa. Hettich, Tuttlingen, BRD) zu ermitteln. Die Bakteriensuspension wurde bei 6000 U/min („GSA“-Rotor) und 4 °C für 20 min zentrifugiert. Danach dekantierte man vorsichtig den Überstand. Das Zentrifugenröhrchen wurde unter sterilen Bedingungen mit ca. 4 °C kalter PBS-Lösung (PBS-Dulbecco[®], Fa. Biochrom KG, Berlin, BRD) aufgefüllt. Man schüttelte die gewonnene Suspension so lange, bis sich der Bakterienklumpen vollständig aufgelöst hatte. Nun wurde diese Flüssigkeit unter gleichen Bedingungen wie zuvor (6000 U/min, „GSA“-Rotor, 4 °C, 20 min) wieder abzentrifugiert. Anschließend dekantierte man erneut den Überstand und füllte das Zentrifugenröhrchen diesmal mit ca. 4 °C kalter Kochsalz-Lösung (NaCl 0,95 %, Fa. Lichtenstein, Lahnstein/Rhein, BRD) auf. Durch Schütteln bewirkte man das Auflösen des Bakterienpellets in der Flüssigkeit. Diese wurde dann bis zur Sepsisinduktion bei 4 °C aufbewahrt. Zur weiteren Kontrolle, wodurch anhand einer bestimmten optischen Dichte auf

eine entsprechende Bakterienzahl geschlossen werden konnte, wurde die Bakteriensuspension fortlaufend verdünnt und die Verdünnungsstufen 10^{-8} bis 10^{-6} auf LB-Agar-Platten ausgestrichen. Am nächsten Tag zählte man die entstandenen Kolonien und konnte so anhand der Verdünnung die Keimzahl in der Suspension ermitteln.

Mit Hilfe der Bestimmung der optischen Dichte der Bakteriensuspension und des Gewichtes des Versuchstieres errechnete man die zu verabreichende Bakterienmenge pro kg KGW und Stunde. Die entsprechende Anzahl an Bakterien wurde dann mit kalter, physiologischer NaCl-Lösung verdünnt und unmittelbar im Anschluss an das Mess-Stadium S1 über eine weitere Perfusorspritze mit entsprechenden Perfusorleitungen und einem Dreiwegehahn über die proximale Öffnung des Pulmonalarterienkatheters verabreicht.

3.2.4.2 Sepsisinduktion und Keimgabe

Im Anschluss an das Stadium S1 wurde dem Versuchstier $1,6 \times 10^7$ CFU/kg KGW/h für 24h verabreicht. Während der anschließenden 24h reduzierte man die Keimzahl auf $1,6 \times 10^6$ CFU/kg KGW/h. Die Bakterieninfusion endete nach 48 Stunden.

3.2.4.3 Versuchsablauf

Messzeitraum

24 Stunden vor Keimgabebeginn wurden die Versuchstiere operiert. Nach der Äquilibration fand die erste Messung (S0) statt. Nach Durchführung des hämorrhagischen Schocks folgte die zweite Messung (S0a). Nach der Volumensubstitution schloss sich die dritte (S0b) an. Nach der Blutretransfusion fand die Messung S0c statt.

Am folgendem Tag wurde vor Keimgabebeginn die Messung S1 durchgeführt. Die anschließenden Messungen fanden nach 2 (S2), 3 (S2a), 6 (S3) und 12 (S4) Stunden statt. Während den folgenden 4 Tagen wurden alle 12 Stunden (S5, S5a, S6, S6a, S7, S7a) Messungen durchgeführt. Die letzte Messung (S8) erfolgte am Morgen des 6. Tages nach der Operation kurz vor der Euthanasie.

Die Abb. 3.2 gibt den Versuchsablauf schematisch wieder.

Messgrößen

Bei jeder Messung wurden folgende Werte bestimmt:

- Mittlerer arterieller Druck (MAP)
- Mittlerer pulmonalarterieller Druck (MPAP)
- Pulmonalarterieller Verschlussdruck (PCWP)
- Zentraler Venendruck (ZVD)
- Herz-Zeit-Volumen (HZV)
- Herzfrequenz (HF)
- Atemfrequenz (AF)
- Körpertemperatur
- Blutglukose
- Activated clotting time (ACT)
- Blutbild
- Differentialblutbild
- Blutgase
- Elektrolyte
- TNF- α

Proben für die Blutkulturen wurden bei den Messungen S0, S4, S5, S6, S7 und S8 entnommen. Die Körpertemperatur wurde im postoperativen Verlauf alle zwei Stunden bestimmt.

Messverfahren

Zur Ruhigstellung verabreichte man dem Tier kurz vor Messbeginn 0,5 mg/kg KGW Midazolam (Dormicum, Fa. Hoffmann-La Roche, Grenzach-Wyhlen, BRD). Danach wurde es in die Hängematte getragen. Nun sprühte man die noch verschlossenen Enden der Katheter und der Messschläuche mit einer alkoholischen Desinfektionslösung (Softasept N, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) ein. Zur Sicherung hygienischer Bedingungen und zum Schutz des Verbandes wurden Mullkompressen (Mullkompressen steril 10x10, Fa. Fergen GmbH, Dormagen, BRD) unter die Dreiwegehähne gelegt. Nun spülte man die drei Schläuche (Druckmessleitung, 90 cm, Fa. Medex medical GmbH, Ratingen, BRD) der Drucksysteme (Druckaufnehmer Druckmonitoring Kit, Fa. Viggo-Spetramed, Erlangen, BRD, und Druckmessturm, Fa. Hellige, Freiburg, BRD, und Druckmanschette, Fa. Biotest Pharma, Frankfurt, BRD) vor und schloss sie an die entsprechenden Katheter an. Nach Adjustierung

der Druckaufnehmer auf die Höhe der Herzvorhöfe, wurde vor jeder Messung der Nullabgleich gegenüber den atmosphärischen Drücken durchgeführt. Anschließend wurden die Druckwerte von AP, PAP und ZVD festgehalten. Nun wurde der pulmonalarterielle Verschlussdruck erfasst, indem man den sich am Swan-Ganz Thermodilutionskatheter befindlichen Ballon mit 1 bis 1,5 ml Luft füllte, in einen der Pulmonalarterienäste einschwenkte und so nachfolgend verschloss. Nach Ermittlung des pulmonalarteriellen Verschlussdrucks entfernte man wieder die Luft aus dem Ballon.

Das Herzminutenvolumen wurde nach der Thermodilutionsmethode mittels eines Herzzeitvolumenmessgerätes (Sirecust 960 , Fa. Siemens, München, BRD) bestimmt. Dazu wurden pro Messung 5 ml, ca. 4 °C kalte, physiologische NaCl-Lösung in den Inline-Sensor am distalen Ende des ZVD-Schenkels des Swan-Ganz Thermodilutionskatheters injiziert. Nach 5 Messungen wurde der Mittelwert berechnet. Nun verschloss man nach nochmaliger Desinfektion den ZVD-Schenkel mit einem sterilen Verschlusskonus.

Anschließend erfolgte die Blutabnahme am pulmonalarteriellen Schenkel des Swan-Ganz[®] Thermodilutionskatheters. Dafür wurde zunächst der entsprechende Druckmessschlauch entfernt, ca. 2 ml Blut vorgezogen und verworfen. Mit Hilfe einer Blutgasspritze (Arterieller Blutprobennehmer PICO[™], Fa. Radiometer Medical A/S, Kopenhagen, Dänemark) gewann man ca. 1 ml Blut, welches unmittelbar durch das Blutgasmessgerät (Blutgasanalysegerät ABL 500 , Fa. Radiometer Kopenhagen, Kopenhagen, Dänemark) analysiert wurde. Befand sich nach der Blutgewinnung Luft in der Spritze, war diese sofort zu entfernen. Auch diesen Katheterzugang verschloss man nach Durchspülung mit steriler, physiologischer NaCl-Lösung und anschließender Desinfektion mit einem sterilen Verschlusskonus (Combi , Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD). Zur arteriellen Blutgewinnung wurde zunächst wie beim pulmonalarteriellen Katheter verfahren. Auch hier gewann man nach Verwerfen der ersten Tropfen 1 ml Blut für die Blutgasanalyse. Zu bestimmten Messzeitpunkten wurden danach je 2 ml Blut für die anaeroben und aeroben Blutkulturen gewonnen. Für die ACT-Messung entnahm man 0,7 ml Blut, welches für die sofortige Gerinnungsbestimmung in Tubes (ACT-Test Blood Collection Tubes 72x14 mm, Fa. Boehringer Ingelheim, Ingelheim, BRD) und diese in den ACT-Tester (ACT-Tester Hemochron 801, New York, USA) gegeben wurden. Ein Tropfen Blut verwendete man für die Kontrolle des Glukosespiegels (Glukose-Teststreifen Haemo-Glukosetest 20-800 R , Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD, und Glukose-Tester Reflolux II M , Fa. Boehringer Mannheim, Mannheim, BRD). Es wurde noch Blut für zwei EDTA-Röhrchen zur Leukozytenzählung und für die Blutausstriche auf den LB-Agar-Platten entnommen. Zum Schluss erfolgte noch eine Blutentnahme mit einer

Serum-Monovette (Monovette Z, Serum, 4 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, BRD) und einer Heparin-Monovette (Monovette AH, NH₄-Heparin, 4 ml, Fa. Sarstedt, Nümbrecht, BRD), die bis zur weiteren Verarbeitung auf Eis gelegt wurden.

Vor dem Katheterverschluss mit einem sterilen Konus wurde der Zugang mit steriler NaCl-Lösung durchgespült. Nach Abschluss der Messung wurde das Tier in der Matte in den Stall zurückgetragen.

Die Serummonovette wurde bei 4 °C und 4000 U/min für 10 Minuten und die Heparinmonovette bei 4 °C und 2000 U/min 10 Minuten lang zentrifugiert. Den Überstand pipettierte man in die dafür vorgesehenen Gefäße und verbrachte sie bis zur weiteren Auswertung in den Gefrierschrank (- 80 °C).

3.2.4.4 Euthanasie und Sektion

Am Versuchsende wurden die Tiere durch die intravenöse Gabe von 50 mg/kg KGW Thiopental (Trapanal[®], Fa. Byk Gulden, Konstanz, BRD) und 1 ml/kg KGW Kaliumchloridlösung (Kaliumchloridlösung 7,45 %, Fa. Braun Melsungen, Melsungen, BRD) euthanasiert.

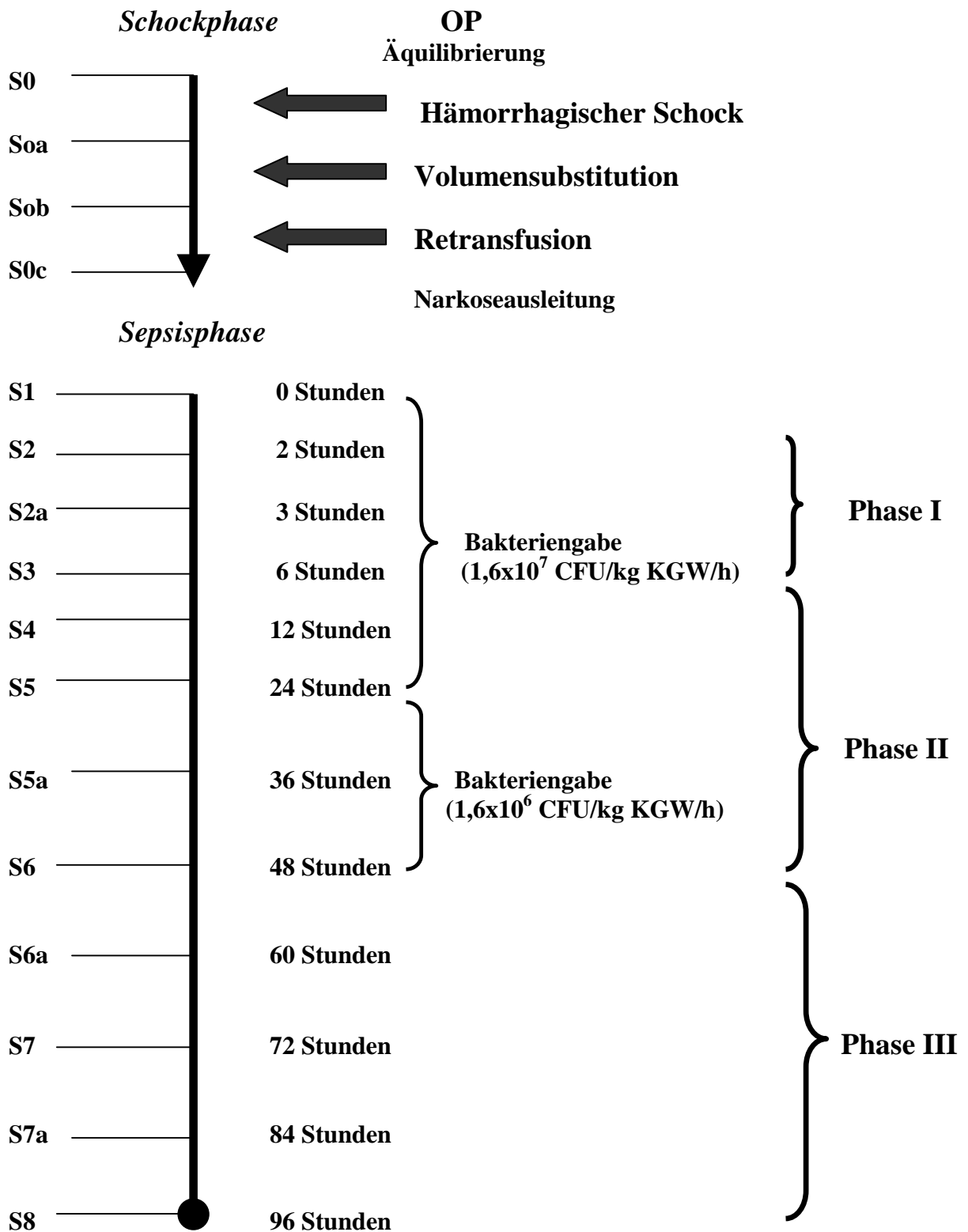
Die Sektion schloss sich unmittelbar an. Unter sterilen Bedingungen wurden jeweils 3 Proben von Nieren, Leber, Darmlymphknoten, Milz, Herz, Lunge und Lungenlymphknoten entnommen. Ein Teil der Proben wurden in 4 %iger Formalinlösung fixiert und in Paraffin eingebettet. Nach dem Aushärten erfolgte die Anfertigung von Organschnitten und ihre Färbung zur histologischen Bewertung.

Ein weiterer Teil der Gewebeproben wurde in Stickstoff gefroren. Der letzte Teil der Organproben wurde gewogen, unter sterilen Bedingungen mit 1 ml physiologischer NaCl-Lösung homogenisiert, auf LB-Agar-Platten ausgestrichen und nach 24 Stunden die Art und Anzahl der vorgefundenen Bakterien bestimmt.

Nach der sterilen Probenentnahme wurden die Organe makroskopisch beurteilt. Bei pathologischen Befunden entnahm man weitere Proben.

Abb. 3.2. Schema des Versuchsablaufs

Mess-Stadien



3.3 Kalkulierte hämodynamische Parameter

Der Herzindex (CI) ist definiert als das durchschnittliche Herzzeitvolumen dividiert durch das Körpergewicht. So ist eine bessere Vergleichbarkeit der einzelnen Werte gegeben, da diese aufgrund unterschiedlicher Körpergewichte Schwankungen ausgesetzt sind.

Herzindex (CI): $\text{HZV/kg KGW [l/min/kg]}$

Aus den gemessenen hämodynamischen Parametern werden der systemisch-vaskuläre und der pulmonal-vaskulärer Widerstand errechnet und auf das Körpergewicht (KGW) bezogen.

Der systemisch-vaskulärer Widerstandsindex (SVRI) ist der gesamten vaskuläre Widerstand im großen Kreislauf.

Systemisch-vaskulärer Widerstandsindex (SVRI):

$$(\text{MAP-ZVD}) \times 80/\text{CI} \text{ [dyn x sec/cm}^5\text{/kg]}$$

Der pulmonal-vaskuläre Widerstandsindex (PVRI) stellt den Gefäßwiderstand der Lunge von der Pulmonalarterie zum linken Vorhof dar. Er errechnet sich aus der Druckdifferenz im Lungenkreislauf (PAP-PCWP) und dem Herzindex (CI).

Pulmonal-vaskulärer Widerstandsindex (PVRI):

$$(\text{MPAP-PCWP}) \times 80/\text{CI} \text{ [dyn x sec/cm}^5\text{/kg]}$$

3.4 Modifizierung des APACHE II-Klassifizierungssystems

Als Grundlage für die Etablierung eines modifizierten APACHE II-Klassifizierungssystems (APACHE: „Acute Physiology And Chronic Health Evaluation“) wurde das Klassifizierungssystem von *Knaus et al. (1985)* zur Hilfe genommen. Ziel der Erstellung des modifizierten Systems war die Beurteilung des klinischen Status der Schweine zu den jeweiligen Untersuchungszeitpunkten.

Folgende Messwerte wurden berücksichtigt:

- Körpertemperatur
- Mittlerer arterieller Druck
- Herzfrequenz
- Atemfrequenz
- PaO₂
- pH-Wert
- Natriumgehalt
- Kaliumgehalt
- Hämatokrit
- HCO₃⁻
- Leukozytenzahl im peripheren Blut

Die Parameter wurden an die Normwertbereiche des Schweines angepasst, sodass sich folgendes Klassifizierungsschema (Tabelle 3.4) ergab :

Tab. 3.4 **Modifiziertes APACHE II-Klassifizierungssystem**

Punkte	+ 4	+3	+2	+1	0	+1	+2	+3	+4
Temperatur (°C)	≤36,4	36,5-36,9	37,0-37,4	37,5-37,9	38-40	40,1-40,5	40,6-41,0	41,1-41,5	≥41,6
MAP (mmHg)	≤88	89-93	94-99	100-104	105-127	128-133	134-138	139-144	≥145
Herzfrequenz (Schläge/min)	≤77	78-84	85-92	93-99	100-130	131-138	139-145	146-153	≥154
Atemfrequenz (Züge/min)	≤7	8-9	10-12	13-14	15-25	26-28	29-30	31-33	≥34
pO ₂ (mmHg)	≤59	60-64	65-69	70-74	>75				
pH-Wert	≤7,28	7,29-7,31	7,32-7,34	7,35-7,37	7,38-7,50	7,51-7,53	7,54-7,56	7,57-7,59	≥7,6
Natriumgehalt (mmol/l)	≤117	118-122	123-127	128-132	133-153	154-158	159-163	164-168	≥169
Kaliumgehalt (mmol/l)	≤2,6	2,7-3,1	3,2-3,4	3,5-3,8	3,9-5,5	5,6-5,9	6,0-6,7	6,8-7,2	≥7,3
Hämatokrit (%)	≤23	24-26	27-29	30-32	33-45	46-48	49-51	52-54	≥55
HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	≤15	15-17,9	18-21,9		22-31,9	32-40,9		41-51,9	≥52
Leukozyten (10 ⁹ /l)	≤2,4	2,5-5,4	5,5-7,7	7,8-10,4	10,5-21,5	21,6-24,3	24,4-27	27,1-29,3	≥29,4

Die Punkteskala beläuft sich von 0 bis 4 Punkte. Je weiter der gewonnene Messwert vom physiologischen Wert entfernt lag, desto mehr Punkte wurden vergeben. Zu jedem Mess-Status wurden die Parameter bestimmt, die entsprechenden Punkte vergeben und der Mittelwert aus den Ergebnissen berechnet.

Klinischer Zustand

Der klinischen Zustand des Tieres wurde zusätzlich mit Punkten in das Bewertungsschema einbezogen. Folgende klinische Symptome wurden mit den angegebenen Punktzahlen bewertet:

2 Punkte: Inappetenz, permanentes Liegen, apathisch

3 Punkte: Husten, Niesen, röchelnde Atmung

4 Punkte: Krämpfe, Schüttelfrost, Maulatmung, Paddelbewegungen, Vomitus

Ab dem Mess-Status S1 wurde dann das einzelne Tier aufgrund von Beobachtungen bewertet und die entsprechende Punktzahl vergeben.

Chronische Vorerkrankungen

Knaus et al. (1985) berücksichtigten bei ihrer Klassifizierung chronische Vorerkrankungen der Patienten mit entsprechenden Punkten, die wir in der vorliegenden Studie nicht berücksichtigen mussten, da nur klinisch gesunde Tiere in die Studie gelangten.

Hämorrhagischer Schock

Ein vorausgegangener hämorrhagischer Schock wurde zum Zeitpunkt S1 mit 2 Punkten berücksichtigt.

3.5 Datenverarbeitung und Statistik

Alle gemessenen und indirekt kalkulierten Parameter wurden auf einem Personalcomputer mit dem Daten- und Tabellenkalkulationsprogramm Excel 97 (Mikrosoft Corp. Central Europe, Unterschleißheim) erfasst und bearbeitet.

Die seriellen Daten wurden für jedes Tier zunächst nach der Methode der „summary measures“ durch Berechnung der Flächen unter der Verlaufskurve jeder Untersuchungsphase aufbereitet (Matthews, 1990). Mittels eines Statistik- Programmsystems (Graph Pad Prism™ 2.0, Graph Pad Software Inc., San Diego, CA, USA) wurden Unterschiede gegenüber dem Ausgangswert innerhalb einer Untersuchungsgruppe mittels Varianzanalyse für wiederholte Messungen (Repeated Measures ANOVA) mit nachfolgendem Dunnett's Test für multiple Vergleiche (Dunnett's Multiple Comparison Test) geprüft. Unterschiede zwischen den beiden Versuchsgruppen wurden mit dem Mann-Whitney Test für unabhängige Stichproben getestet. Alle statistischen Tests wurden im Sinne einer deskriptiven Datenanalyse verwendet. Die Irrtumswahrscheinlichkeit (P) wurde zweiseitig bei 5 % festgelegt. Ein Testergebnis mit $p < 0,05$ wurde als signifikant angesehen.

Alle Daten sind tabellarisch oder graphisch dargestellt. Die gemessenen oder errechneten Variablen sind als Mittelwert (MW) mit der Standardabweichung (SD) angegeben.

Für die statistische Auswertung wurden die gewonnen Ergebnisse der einzelnen Messzeitpunkte des gesamten Versuchablaufes in einem Basalwert und 3 unterschiedliche Phasen zusammengefasst. Der Basalwert gibt das Messergebnis vor Beginn der Infusion von *Pseudomonas aeruginosa* wieder. Die Phase I erfasst den Zeitraum von 2 Stunden bis 6 Stunden nach Keimgabebeginn und die Phase II die 6 Stunden bis 48 Stunden nach Sepsisinduktion. Die Phase III beläuft sich von der Beendigung der Bakterieninfusion bis zum Versuchsende.

Folgende Symbole wurde zur Kennzeichnung von signifikanten und hoch signifikanten Unterschieden verwendet:

- * : Signifikanter Unterschied der Phase im Vergleich zum Basalwert innerhalb der Kontrollgruppe
- ** : Hoch signifikanter Unterschied der Phase im Vergleich zum Basalwert innerhalb der Kontrollgruppe

- # : Signifikanter Unterschied der Phase im Vergleich zum Basalwert innerhalb der Schockgruppe
- ## : Hoch signifikanter Unterschied der Phase im Vergleich zum Basalwert innerhalb der Schockgruppe
- § : Signifikanter Unterschied der Basalwerte bzw. der entsprechenden Phasen im Gruppenvergleich
- §§ : Hoch signifikanter Unterschied der Basalwerte bzw. der entsprechenden Phasen im Gruppenvergleich