Aus dem Forschungszentrum für experimentelle Medizin (FEM) des Fachbereichs Medizin
der Universität Berlin-Charité

und dem

Institut für Veterinär-Pathologie
des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Einfluss einer gemischten Azidämie auf die Lebermorphologie und- physiologie unter Berücksichtigung multimodaler Therapiebestandteile in der Intensivmedizin- Untersuchungen bei Schweinen als Modelltiere

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Veterinärmedizin
an der
Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Merle Weiland geb. Wagner
Tierärztin
aus Henstedt-Ulzburg

Berlin 2020
Journal-Nr.: 4065

Gedruckt mit Genehmigung
des Fachbereiches Veterinärmedizin
der Freien Universität Berlin

Dekan:	Univ.-Prof. Dr. Jürgen Zentek
1. Gutachter:	Univ.-Prof. Dr. Robert Klopfleisch
2. Gutachter(in):	PD Dr. Juliane Unger
3. Gutachter(in):	Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold

Deskriptoren (nach CAB-Thesaurus):

pigs, animal models, liver, liver function, acidosis, therapy, anatomy, physiology

Tag der Promotion: 18.12.2020

Meiner lieben Familie

Abkürzungsverzeichnis

ACT	activated clotting time
AKI	acute kidney injury (akutes Nierenversagen)
ARDS	acute respiratory distress syndrome
AST	Aspartat-Aminotransferase
ALT	Alanin-Aminotransferase
AP	Alkalische Phosphatase
BGA	Blutgasanalyse
BSE	Bovine Spongiforme Enzephalopathie
BSnat	Native Baseline
BSsys	System Baseline
CO_2	Kohlenstoffdioxid
CVVH	continuous venovenous hemofiltration
EMA	European Medicine Agency
FiO_2	inspiratorische Sauerstoffkonzentration
GEL	Gelatine
H^+	Wasserstoffproton
HCL	Salzsäure
HES	Hydroxyethylstärke
HF	Hämofiltration
kDa	Kilodalton
kg KM	Kilogramm Körpermasse
KOD	kolloidosmotischer Druck
kPa	Kilopascal
KT	Kontrolltier(e)
Lac	Laktat
LDH	Laktat-Dehydrogenase
MW	Mittelwert
NaCl	Natriumchlorid
O_2	Sauerstoff
PaO_2	arterieller Sauerstoffpartialdruck in mmHg
Pv	venöser Druck
PRAC	Pharmacovigilance Risk Assessment Committee
RES	Retikuloendotheliales System
RRT	renal replacement therapy (Nierenersatzverfahren)
SID	strong ion difference

SpO_2	periphere Sauerstoffsättigung des Hämoglobins
STAW	Standardabweichung
THAM	Tris-Hydroxyethyl-Aminomethan
VE	Versuchsende
VT	Versuchstier(e)
ZM	Zwischenmessung

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung 1
2. Literaturübersicht 3
2.1 Die Leber 3
2.1.1 Das Leberläppchen 3
2.1.2 Der periportale Bereich der Leberläppchen 4
2.1.3 Der intralobuläre Bereich der Leberläppchen 4
2.1.4 Der zentrolobuläre Bereich der Leberläppchen 4
2.1.5 Der Dissé-Raum 5
2.2 Kolloidale Lösungen und ihre Einsatzgebiete 5
2.2.1 Jüngste historische Präferenzen in der medizinischen Forschung zu Kolloiden 6
2.2.2 Hydroxyethylstärke und deren Stellung in der Intensivmedizin 7
2.2.3 Gelatine und deren Stellung in der Intensivmedizin 8
2.2.4 Pathophysiologische Gegenüberstellung von Hydroxyethylstärke und Gelatine 9
2.3 Die venovenöse Hämofiltration 11
2.3.1 Grundlagen der Hämofiltration 11
2.4 Das Beatmungsmanagement in der Intensivmedizin 12
2.5 Das Puffersystem der Leber 13
2.5.1 Die Rolle der Leber im Säuren-Basen-Haushalt 14
2.6 Azidämie in der Intensivmedizin 14
2.7 Das aktuelle parenterale Ernährungsregime in der Intensivmedizin 16
2.8 Zielsetzung/Fragestellung und Hypothesen 17
3. Studiendesign, Versuchstiere, Materialien und Methodik 20
3.1 Studiendesign, Versuchstiere, Tierversuchsgruppen 20
3.1.1 Studiendesign 20
3.1.2 Versuchstiere 25
3.1.3 Tierversuchsgruppen 25
3.2 Materialien 26
3.2.1 Infusionen 26
3.2.2 Pharmakologische Stoffe 26
3.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 27
3.2.4 Technische Gerätschaften 28
3.3 Methodik 30
3.3.1 Anästhesie 30
3.3.1.1 Narkoseüberwachung 30

3.3.1.2 Hämodynamisches Monitoring 30
3.3.1.3 Kontrolle der Körperkerntemperatur 31
3.3.2 Arterielle und venöse Zugänge, Katheterisierung 31
3.3.3 Beatmung und Induktion einer Azidämie 32
3.3.4 Infusionsmanagement und die Anwendung einer kontinuierlichen venovenösen Hämofiltration 33
3.3.5 Messzeitpunke und Parameter 35
3.3.6 Versuchsende 37
3.3.7 Organentnahme und Fixierung 38
3.3.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung 38
3.3.8.1 Das Prinzip der Hämatoxylin-Eosin-Färbung 38
3.3.8.2 Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung 39
3.3.8.3 Histopathologische Untersuchung der Hämatoxylin-Eosin-Schnitte 39
3.3.9 Biochemische Analyse von Blutserum 40
3.3.10 Histopathologischer Score und Scoreparameter 42
3.3.10.1 Histopathologischer Score 42
3.3.10.2 Scoreparameter 42
3.3.11 Mathematisch-statistische Auswertung 48
4. Ergebnisse 49
4.1 Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der Analyse ausgewählter serumchemischer Parameter 49
4.1.1 Interventionskombination Azidämie und Kolloidtyp (Hydroxyethylstärke versus Gelatine) 49
4.1.2 Interventionskombination Hämofiltration und Azidämie (pH-Wert 7,2 versus pH-Wert 7,4) 52
4.1.3 Interventionskombination alleinige Azidämie, pH-Wert 7,2 (mit versus ohne Hämofiltration) 54
4.1.4 Interventionskombination Azidämie mit versus ohne Hypoxämie 57
4.1.5 Zusammenfassung der histopathologischen und serumspezifischen Ergebnisse 59
5. Diskussion 62
5.1 Wahl der Versuchstiere 62
5.2 Hauptergebnisse Morphologie 63
5.2.1 Arbeitshypothese Schädigungsmarker 64
5.2.2 Arbeitshypothese Kolloideinspeicherung 69
5.2.3 Arbeitshypothese Energieverarmung 71
5.3 Extrapolativer Ausblick auf die potentielle Bedeutung der tolerierten Azidose auf die Ernährung des kritisch Kranken 73
5.4 Modelldiskussion 74

5.5 Validität des Tiermodells 74
6. Zusammenfassung 77
7. Summary 79
8. Literaturverzeichnis 81
9. Anhang 92
10. Danksagung 99
11. Selbstständigkeitserklärung 100

1. Einleitung

Die metabolische Azidose ist eine häufige anzutreffende Begleiterscheinung in der Intensivmedizin (Kaplan & Frangos, 2005). Diese wird in der Klinik noch weitestgehend toleriert, obwohl eine Störung des Säuren-Basen-Haushaltes mit Azidämie als wichtiger prognostischer Marker für eine erhöhte Mortalität gilt (Schaffartzik, 2007).

Neben einer negativen Beeinflussung der Mortalitätsrate, stehen derzeit weitere negative prognostische Eigenschaften assoziiert durch Azidämie in der Kritik. So kann eine Azidämie zu einem akuten Nierenversagen beitragen (Raj, Scott, Nguyen, Sachs & Kraut, 2013) oder auch mit einer reduzierten kardialen Kontraktilität (Arieff, Gertz, Park, Leach & Lazarowitz, 1983), pulmonalarterieller Vasokonstriktion und systemischer Vasodilatation assoziiert werden (Kraut & Madias, 2010). Ferner können sowohl zerebrale Krämpfe und Ödeme, als auch eine diaphragmatische Dysfunktion mit einer Beeinflussung einer Azidose in Zusammenhang gebracht werden (Jaber et al., 2008).

Häufig verwendete Therapiebestandteile des kritisch Kranken (v.a. bei Sepsis und Multiorganversagen) sind der Einsatz einer kontinuierlichen venovenösen Hämofiltration (continuous venovenous hemofiltration; CVVH) (Bellomo, Honore, Matson, Ronco & Winchester, 2005; Joannidis, 2009) und eine die Mortalität des ARDS (acute respiratory distress syndrome) senkende lungenprotektive Beatmung mittels geringem Tidalvolumen („low tidal volume ventilation“) (Network, 2000). Dieses lungenprotektive Beatmungsmanagement mit geringem Tidalvolumen führt häufig zu einer tolerierten Azidämie (permissive Hyperkapnie). Die permissive Hyperkapnie wird oft begleitet und interagiert konsekutiv mit weiteren pathophysiologischen Reaktionen und Behandlungsmodulen wie einer metabolischen Azidose, einem Nierenersatzverfahren (CVVH), einer Hypoxämie und einer maschinellen Beatmung.

Die enorme Vielfalt der intensivmedizinischen Krankheitsbilder, inklusive vielfältiger Begleiterscheinungen, machen klinische Studien für eine standardisierte Vergleichbarkeit untereinander sehr schwer bis unmöglich bezüglich einer Standardisierung. Zudem existieren derzeit, nach unserem Stand der Literatursuche, leider keine Studien an Großtiermodellen, die hinsichtlich dieser multifaktoriellen intensivmedizinischer Behandlungsregime den Einfluss der Azidämie auf die lebenswichtigen Organe, hier insbesondere auf die Leber, diskutieren. So ist bei all dem auch zu betonen, dass der Stand der Forschung überwiegend auf *in vitro* Versuchen und auf Kurzzeitversuchen im Kleintiermodell basiert oder aber nur eines der unterschiedlichen intensivmedizinischen Therapiebestandteile im Fokus der Untersuchung steht. Eine Vergleichbarkeit zu der intensivmedizinischen Situation eines kritisch kranken Menschen wird dadurch erheblich erschwert.

Ziel dieser Arbeit war es den Einfluss einer gemischten Azidämie, unter Berücksichtigung der Interaktionen multimodaler Behandlungsregime, auf die Lebermorphologie zu untersuchen. Mittels eines Schweinemodells sollte unter Ausschluss multifaktorieller intensivmedizinischer Krankheitsverläufe so beides, sowohl die wissenschaftliche Standardisierung, als auch die Vergleichbarkeit zu der individuellen Situation eines kritisch Kranken, ermöglicht werden.
Hauptfrage dieser Arbeit war, ob eine Azidämie tatsächlich nur ein tolerables Parallelereignis darstellt, oder aber ob sie allein für sich bereits Kausalität einer Zustandsverschlechterung und damit gesteigerten Mortalität sein kann.
Bei der Auswahl der bezüglich einer pathophysiologischen Interaktion beteiligten Therapiebestandteile fiel die Wahl auf drei häufige Komponenten. Es wurde die induzierte Azidämie im Kontext mit Beatmungsregime, Nierenersatzverfahren und kolloidalen Infusionslösungen (6% Hydroxyethylstärke (HES) 130 kDa/0,4 und 4% Gelatine (GEL)) untersucht. Die hier vorgestellte Studie fokussiert mittels serumchemischer Parameter und finaler histomorphologischer Auswertung der Organproben (Leber), die mögliche Interaktion, die eine Azidämie mit den angeführten Therapiebausteinen aufzeigen könnte.

2. Literaturübersicht

2.1 Die Leber

Die Leber ist das größte Verdauungsorgan des menschlichen Körpers und als das zentrale Stoffwechselorgan zwischen Pfortader (*Vena portae*) und unterer Hohlvene (*Vena cava caudalis*) in den Blutkreislauf eingeschaltet. Über das zuführende Blut der *Vena hepatica* enthält die Leber die meisten resorbierten Nährstoffe, Vitamine und Xenobiotika, die sie kontrollieren und verarbeiten kann. Außerdem verfügt die Leber über eine bedeutungsvolle Filterfunktion, die durch den hohen Gehalt an Makrophagen und deren Erkennung und gegebenenfalls auch Vernichtung und Abtransport von pathogenen Keimen und Endotoxinen gekennzeichnet ist.

In den Leberzellen, den Hepatozyten, werden eine Vielzahl von Substanzen synthetisiert, biotransformiert, degradiert, gespeichert und ausgeschieden. Hier findet auch der Kohlenhydrat- und Fettstoffwechsel, sowie die Synthese verschiedener Plasmaproteine statt, wie Albumin und der meisten Gerinnungsfaktoren, die dann direkt im Anschluss an das Blut abgegeben werden. Über den Dissé-Raum werden hämatogen transportierte Metabolite und Stoffwechselendprodukte ausgetauscht.

Die in der Leber gebildete Galle enthält ausscheidungspflichtige Substanzen und solche, die im enterohepatischen Kreislauf erneut resorbiert werden können (Dienes et al., 2000).

2.1.1 Das Leberläppchen

Im histologischen Querschnitt befindet sich eine Zentralvene im Zentrum. An den Grenzstellen, an denen je drei Leberläppchen aneinanderstoßen, liegen die Lebertrias, bestehend aus *Vena* und *Arteria hepatica* und dem *Ductus choledochus*. Diese ziehen interlobulär als kleinere *Venae* und *Arteriae interlobulares* und verzweigen sich schließlich als Venulen und Arteriolen, welche die Sinusoide mit ihrem Blut versorgen.

Das Blut der Sinusoide ist ein Mischblut, welches zu 75% aus der *Vena portae* und zu 25% aus der *Arteria hepatica* stammt. Die Sinusoide vereinigen sich endlich zu der zentralen Vene des Leberläppchens. So wird das Blut im Leberläppchen also von der Peripherie zum Zentrum (entgegen des Gallenganges) geleitet und gelangt folgend über die *Vena cava caudalis* zum Herzen (Dienes et al., 2000).

2.1.2 Der periportale Bereich der Leberläppchen

Im periportalen Bereich der Leberläppchen verlaufen die Endäste der *Vena portae* und *Arteria hepatica* als kleine Venulen und Arteriolen. Die Hepatozyten enthalten in diesem Bereich relativ viel Sauerstoff und eine hohe Konzentration an resorbierten Stoffen aus dem Darm. So liegt es nahe, dass hier vor allem oxidative und energieverbrauchende Reaktionen ablaufen. Hier sind also der Abbau von Aminosäuren, Fettsäuren (ß-Oxidation), die Glukoneogenese, sowie die Gallensäuresynthese als auch deren Exkretion und der Harnstoffzyklus der Leber lokalisiert.

Für die Glukoneogenese ist ein hoher Bedarf an ATP notwendig, das wiederum Sauerstoff benötigt und die ß-Oxidation mit Bereitstellung von ATP und NADH/H+ voraussetzt.

Ähnlich energieaufwändig gestaltet sich die Cholesterin-Biosynthese, so dass die Gallensäureproduktion ebenfalls im periportalen Leberabschnitt ihren Beginn findet (Horn, 2009).

Im periportalen Bereich sind also Stoffwechselprozesse vertreten, die einen hohen Sauerstoffbedarf, inklusive einer adäquaten Durchblutung mit einer guten Sauerstoffbereitstellung benötigen, was unter komplexen pathophysiologischen Bedingungen im kritisch kranken Patienten häufig nicht gegeben ist (Ostergaard et al., 2015).

2.1.3 Der intralobuläre Bereich der Leberläppchen

Der intralobuläre Bereich der Leberläppchen wird auch als Übergangszone beschrieben. Hier findet, wie bereits in dem periportalen Bereich der Leberläppchen, die Synthese und Exkretion der Gallensäure statt (Horn, 2009).

2.1.4 Der zentrolobuläre Bereich der Leberläppchen

In dem zentrolobulären Bereich der Leberläppchen ist eine geringe Konzentration der aus dem Darm resorbierten Stoffe vorhanden und es sind Stoffwechselvorgänge mit einem niedrigen Sauerstoffverbrauch lokalisiert. Zu diesen Stoffwechselvorgängen zählen die Entgiftungsvorgänge im Rahmen der Biotransformation, die Glykolyse und die Lipogenese, wobei die Lipogenese NADPH/H+ aus dem Pentosephosphatweg benötigt und dieser somit gemeinsam mit der Lipogenese auftritt (Horn, 2009).

2.1.5 Der Dissé-Raum

Der sogenannte Dissé-Raum liegt zwischen den Lebersinusoiden und den Hepathozyten. Die in diesem Raum enthaltene Flüssigkeit ist charakteristisch mit der Lymphe zu vergleichen. In diesem perisinusoiden Raum werden Plasmaproteine freigesetzt, Chylomikronen und Hormone zu den Hepathozyten geleitet und es liegen die Vitamin-A-speichernden Ito-Zellen und ein Teil der lymphatischen Pit-Zellen vor. Die Hepathozyten besitzen Mikrovilli, die in den Dissé-Raum hineinragen, und mit denen sie vermögen Stoffe aus diesem bzw. den vorgeschalteten Sinusoiden aufzunehmen (Horn, 2009).

2.2 Kolloidale Lösungen und ihre Einsatzgebiete

Kolloidale Infusionslösungen finden aktuell ihren Einsatz als Plasmaersatz, Plasmaexpander oder als Lösung zur Hämodilution und sind durch einen hohen Gehalt an Makromolekülen, wie beispielsweise Kohlenhydrate (Hydroxyethylstärke, Dextrane) oder Proteine (Gelatin, Albumin), charakterisiert.

Unter Kolloidinfusion zeigt sich eine Verbesserung des Sauerstofftransportes, somit der Gewebeoxigenierung und der Herzleistung (Verbesserung der myokardialen Kontraktilität) (Base et al., 2011). Im Gegensatz zu den kristalloiden Lösungen verbleiben die Kolloide mit künstlichen oder natürlichen onkotisch wirksamen Makromolekülen länger im Intravasalraum und dienen so dem Volumenersatz (Adams, 2007; Vincent, De Backer & Wiedermann, 2016). Kristalloide verteilen sich hingegen zu gleichen Teilen in das Intravasallumen und das Interstitium und dienen somit als Volumen- und Flüssigkeitsersatz (Adams, 2007). Kolloide haben ferner eine positive Auswirkung auf die Hämodynamik (und damit auf die Mikrozirkulation) und können so die Gewebeperfusion in gewisser Weise verbessern (Adams, 2007).

Vor allem bei Krankheitsbildern wie hypovolämischer Schock und Sepsis wird dem Infusionsmanagement mit Kolloiden eine besondere Bedeutung zugeschrieben. Hier zählen zu den charakteristischen Folgen dieser Krankheitsbilder steigende Retentionswerte und akutes Nierenversagen. Der standardisierte Einsatz von Kolloiden hat in den vergangenen Jahren diesbezüglich zunehmend Nebenwirkungen (Koagulopathie, Nierentoxizität, akuter Juckreiz, erhöhte Mortalität und Morbidität) aufgezeigt. Es wurde zudem untersucht, dass sich die Nebenwirkungen der kolloidalen Infusionslösungen mit steigender Infusionsmenge kumulieren (Hartog, Bauer & Reinhart, 2011). Histopathologisch wird eine osmotische Nephrose mit Vakuolisierung der Tubulusepithelien in Verbindung mit Kolloiden beschrieben (Adams, 2007), wobei die vakuoläre Einspeicherung vor allem für HES als gesichert gilt.

2.2.1 Jüngste historische Präferenzen in der medizinischen Forschung zu Kolloiden

In den vergangenen Jahren wurde der Einsatz kolloidaler Infusionslösungen äußerst kontrovers diskutiert. Kurz vor der BSE-Krise (Bovine Spongiforme Enzephalopathie) wurde das Kolloid Gelatine, trotz des Risikos, noch hoch frequentiert verabreicht. Da die Gelatinelösung allerdings damals aus bovinem Kollagen gewonnen wurde, stand dieses Kolloid bezüglich der Sicherheit zu diesem Zeitpunkt stark in der Kritik. Seit der BSE-Krise werden die Gelatinemoleküle überwiegend aus porcinem Kollagen gewonnen (Boldt & Suttner, 2005). Dennoch wurde das Kolloid wegen seiner potentiell allergischen Wirkung kritisiert (Whitfield, 2006), so dass das natürliche Kolloid Albumin daraufhin in den Vordergrund gelangte. Aber auch bei Albumin wurden schnell negative Wirkungen, insbesondere beim Einsatz in der Intensivmedizin, gefunden. Beispielsweise konnte Albumin kein positiver Effekt auf die Mortalität bei kritisch Kranken mit Verbrennungen, Hypovolämie oder auch Hypoalbuminämie zugesprochen werden; es wurde vielmehr der Verdacht geäußert, dass durch Albumin die Mortalität gesteigert werden könne. Aus diesen Gründen wurde dringend von der Cochrane Group vom Einsatz des Kolloids Albumin beim kritisch Kranken abgeraten (Group, 1998). Es folgte der Fokus auf das Kolloid HES. In den vergangenen Jahren sind insbesondere die HES-Präparate der ersten und zweiten Generation als nachteilig beschrieben worden. Die European Medicine Agency (EMA) sprach im Juni 2013 die Empfehlung aus, HES nicht mehr zu verwenden. Auch der Ausschuss für Risikobewertung im Bereich der Pharmakovigilanz (PRAC) sprach sich für einen Entzug der Zulassung für dieses Kolloid aus, nachdem das Nutzen-Risiko-Verhältnis eine negative Bilanz ergab. Vier Monate später zog die EMA dann das Verbot teilweise zurück und begrenzte dieses auf die Anwendung bei septischen Patienten oder Patienten mit akuten Verbrennungen (Ghijselings & Rex, 2014; Mayor, 2013). Daraufhin wurde wieder vermehrt das Kolloid Gelatine eingesetzt (Moeller et al., 2016). Moeller et al. (2016) warnen jedoch vor den vielen Nebenwirkungen der Gelatinelösung (höheres Risiko für ein akutes Nierenversagen als Kristalloide und natürliches Kolloid Albumin) und vor dem signifikant erhöhten Risiko einer Anaphylaxie gegenüber Kristalloiden und Albumin und empfehlen aus diesen Gründen den Einsatz von Kristalloiden, da diese als kostengünstigere und sichere Alternative dem Markt zur Verfügung stehen (Moeller et al., 2016). Unterstützend dazu schreiben Karakala, Raghunathan & Shaw (2013), dass die Substitution von Kristalloiden bei Patienten mit septischen Schock unbedingt die erste Wahl sein sollte. Aber auch Albumin wird aktuell bei einigen Krankheitsbildern wieder empfohlen. So ist durch eine Hypoalbuminämie, insbesondere beim mangelernährten kritisch Kranken, bei Lebererkrankungen wie einer Leberzirrhose, bei oxidativem Stress und septischem Schock, einer Infusion mit Albumin ein positiver Benefit zuzusprechen (Artigas, Wernerman, Arroyo, Vincent & Levy, 2006). Die Geschichte der kolloidalen Infusionstherapie ist also geprägt von divergenten Studienergebnissen und Interpretationen. Wovon gestern

noch abgeraten wurde liegen heute wieder positive Studien und Empfehlungen vor. Es bleibt aktuell die Diskussion offen, ob überhaupt und bei welchen Krankheitsbildern Kolloide oder Kristalloide eingesetzt werden sollten.

2.2.2 Hydroxyethylstärke und deren Stellung in der Intensivmedizin

Bei der Hydroxyethylstärke (HES) handelt es sich um ein Polysaccharid, welches aus natürlicher Mais- oder Kartoffelstärke hergestellt wird und aus multiplen Glukose-Einheiten aufgebaut ist (Adams, 2007). Durch den Einbau von Hydroxyethyl-Gruppen in das Molekül wird die Substanz vor dem raschen Abbau durch die α-Amylase des Serums geschützt.

Derzeit existieren HES-Präparate der dritten und vierten Generation, die beide eine durchschnittliche Molekulargröße von 130 kDa und einen Substitutionsgrad von 0,4 (dritte Generation mit 0,9% NaCl) oder 0,42 (vierte Generation mit balancierter Elektrolytlösung) aufweisen.

Vorangegangene *in vitro* und *in vivo* Studien unserer Arbeitsgruppe (Unger et al., 2005; Unger et al., 2006) zeigten, dass die Wahl der Volumenersatzmittel maßgeblich die Biokompatibilität extrakorporaler Organunterstützungssysteme wie der kontinuierlichen venovenösen Hämofiltration (CVVH) beeinflussen kann. Hierbei ergab sich für HES 130 kDa/0,4 ein gewisser Vorteil in Bezug auf eine verbesserte Hämo- und Plasmafilterfunktion einschließlich einer Verbesserung der Biokompatibilität der CVVH, wohingegen Gelatine-Infusionen (GEL) nachteilige Effekte mit sich führten.

Es existieren diverse unterschiedliche Studien und Diskussionen über die Nebenwirkungen von HES-Präparaten. Die häufigsten zu beobachteten Nebenwirkungen sind Nierenerkrankungen, Gerinnungsstörungen, erhöhte Mortalität und Morbidität. So beschreiben beispielsweise Hartog et al. (2011) für den Einsatz von HES ein signifikant erhöhtes Risiko für Nierenerkrankungen bei septischen, nierentransplantierten und kardiologischen Patienten.

Durch eine Blockade der Glykoprotein IIb- und IIIa-Fibrinogen-Rezeptoren reduziert HES die Thrombozytenfunktion und die Aktivität des von Willebrand-Faktors und des Faktors VII, so dass eine verlängerte PTT resultiert (Adams, 2007; Hartog & Reinholt, 2009). Unterstützend zu diesen Studien wurde ein erhöhtes Blutungsrisiko bei Patienten festgestellt, die intraoperativ eine HES-Infusion erhielten (Hartog & Reinhart, 2009; Hartog et al., 2011). Aktuelle Zahlen zeigen jedoch, dass HES der dritten Generation (6% HES 130 kDa/0,4) keine klinisch relevanten Nebenwirkungen bei einem perioperativen Einsatz in Bezug auf die Blutgerinnung und Nierenfunktion zugesprochen werden können (Hessler, Arnemann & Ertmer, 2015). Hessler et al. (2015) schreiben sogar, dass die Überinfusion mit HES wahrscheinlich harmloser sei als die Überinfusion mit Kristalloiden. Unterstützend fand er in

Patienten, die aus unterschiedlichen Gründen operiert wurden, heraus, dass der Einsatz von 6% HES 130 kDa/0,4 mit einer verminderten Flüssigkeitsansammlung assoziiert war.
Kolloidale Infusionslösungen zeigen insgesamt eine unvollständige Harnausscheidung, so dass sich das Erfassungsdefizit bei GEL auf 25-30% und bei HES auf 35-60% bezieht und somit eine vorübergehende Speicherung im RES mit dortigem lysosomalen Abbau angenommen wird (Adams, 2007). Da bei GEL die Proteine lediglich eine kurze Verweildauer im RES besitzen wird die Einspeicherung in Vakuolen bei diesem Kolloid vernachlässigt (Adams, 2007). Bezugnehmend auf die Vakuolisierung existieren diverse Studien, die eine Einspeicherung der HES-Moleküle, unter anderem in den Hepatozyten, in Form von Vakuolen aufweisen (Wiedermann & Joannidis, 2014).
Bezüglich der unterschiedlichen pharmakokinetischen Eigenschaften wird für 6% HES 130 kDa/0,4 gegenüber älteren HES-Lösungen, explizit bezüglich seines Einflusses auf das Gerinnungssystem, von einem geringeren Ausmaß an Nebenwirkungen berichtet (Hartog & Reinhart, 2009; Jin & Yu, 2010; Reinhart et al., 2012). Das Ausmaß der intrazellulären Einspeicherung hängt neben dem Molekül als solches auch von dem Ausmaß und dem Tempo der Elimination ab. Diesbezüglich ist wesentlich, dass 6% HES 130 kDa/0,4 schneller als früher gebräuchliche HES-Lösungen metabolisiert werden; die renale Ausscheidung ist über 23-mal höher als bei der ersten HES-Generation und auch 5-mal höher als bei der zweiten HES-Generation (Base et al., 2011).
Es existieren weitere Forschungsergebnisse, die signifikante Unterschiede aufweisen und belegen, dass der postoperative Blutverlust bei 6% HES 130 kDa/0,4 geringer ist als bei HES 200 kDa/0,5 und dass die renalen Nebenwirkungen von der alten HES- Generation auf die 3. HES-Generation gesunken sind (Hartog & Reinhart, 2009; Reinhart et al., 2012).
Grundsätzlich wird der Einsatz von HES als Volumenersatz in der Intensivmedizin seit Jahren kontrovers diskutiert. Durch eine mangelhafte forschungsbasierte Klärung der Nebenwirkungen dieser Infusionslösungen (6% HES 130 kDa/0,4) wird trotz einer verringerten Nebenwirkungsliste der neuen HES-Generationen eine erhöhte Mortalität kritisch kranker Patienten mit dieser assoziiert bzw. durch diese verstärkt (Witt et al., 2012; Wong et al., 2015), so dass die European Medicine Agency (EMA) den Einsatz von HES seit 2013 streng limitiert.

2.2.3 Gelatine und deren Stellung in der Intensivmedizin

Gelatine-Lösungen (GEL) sind Gemische verschiedener Polypeptide mit einem Molekulargewicht von wenigen bis mehreren 100 kDa und einer helikalen Grundstruktur, die Wassermoleküle bindet und damit zur Gel-Bildung führt (Adams, 2007). Gelatine wurde vor

der BSE-Krise durch Hydrolyse aus Kollagen von Rinderhaut und Rinderknochen gewonnen. Heute wird Gelatine überwiegend aus porcinem Kollagen hergestellt (siehe 2.2.1).
Für GEL ist ein positiver Effekt auf den Erhalt der Erythrozyten beschrieben. GEL weist eine elektrische Ladung auf, durch die die Erythrozyten aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen beschichtet werden, so dass GEL bereits in niedriger Konzentration die Erythrozyten vor mechanischer Belastung zu schützen vermag. Allerdings führt dies auch zu einer gesteigerten Zellagglomeration, was wiederum mikrozirkulatorisch weniger vorteilhaft ist (Suempelmann & Zander, 2001).
Die Elimination von Gelatine geschieht zu etwa 80% renal (Adams, 2007). Nephrologische Epithelschädigungen konnten bei Infusionen mit GEL laut Adams (2007) nicht bestätigt werden, so dass GEL als nephrologisch unbedenklich gelten kann. Eine andere Studie behauptet hingegen, dass eine GEL-Infusion das Risiko einer beeinträchtigten Nierenfunktion in gleichem Maße wie eine HES-Infusion erhöht und gegenüber HES signifikant höhere Kreatinin und Harnstoffwerte ermittelt werden konnten (Hartog et al., 2011).
Eine Forschungsarbeit von Reinhart et al. (2012) stellte eine identische Inzidenz einer akuten Niereninsuffizienz für 6% HES 130 kDa/0,4 und 4% GEL fest.
Die Nebenwirkung von GEL auf das Gerinnungssystem werden in der Summe als gering und als klinisch nicht relevant beschrieben (Adams, 2007). Es existieren allerdings auch gegenteilige Untersuchungen, die besagen, dass GEL die Plättchenfunktion beeinträchtigt, PT und aPTT erniedrigt und zu einer Reduzierung des von Willebrand-Faktors und des Faktors VIII:C führt (Hartog et al., 2011; Jin &Yu, 2010).

2.2.4 Pathophysiologische Gegenüberstellung von Hydroxyethylstärke und Gelatine

Die in den Abschnitten 2.2.1-2.2.3 vorgestellten Kolloide (HES und GEL) bewirken sowohl unterschiedliche- als auch gemeinsame pathophysiologische Reaktionen. In der folgenden Tabelle (Tab. 2.1) sind die wichtigsten Unterschiede der pathophysiologischen Reaktionen aufgeführt. Zusammenfassend gibt es für beide Kolloide pro und contra Ergebnisse aus Studien, die auf sehr unterschiedlichen Studiendesigns, Patientenkollektiven und begleitenden Therapieverfahren oder auf sehr punktuell durchgeführten *in vitro*- und Tierstudien basieren.

Tab. 2.1 Pathophysiologische Reaktion unterschiedlicher Kolloide im Überblick

Pathophysiologische Reaktion	HES	GEL	Referenzen
Gerinnung	6% HES 130 kDa/0,4 geringe, nicht-relevante Nebenwirkungen	geringe, nicht-relevante Nebenwirkungen	(Adams, 2007) (Hartog & Reinhart, 2009) (Jin & Yu, 2010) (Reinhart et al., 2012) (Hessler et al., 2015)
		Beeinflussung der Plättchenfunktion	(Hartog et al., 2011)
	verlängerte PTT bei 6% HES 130 kDa/0,4	Reduzierung von PT, aPTT, Faktor VIII:C und von Willebrand- Faktor	(Hartog et al., 2011)) (Jin & Yu, 2010)
	erhöhtes Blutungsrisiko für HES 450 kDa/07 und 10% HES 200 kDa/0,5		(Hartog & Reinhart, 2009) (Hartog et al., 2011)
Nierenfunktion	6% HES 130 kDa/0,4 nephrologisch unbedenklich	nephrologisch unbedenklich	(Adams, 2007) (Hessler et al., 2015)
	6% HES 130 kDa/0,4 beeinträchtigte Nierenfunktion ver-gleichbar mit 4% GEL	beeinträchtigte Nierenfunktion vergleichbar mit 6% HES 130 kDa/0,4	(Hartog et al., 2011)
		höhere Kreatinin- und Harnstoffwerte	(Hartog et al., 2011)
	6% HES 130 kDa/0,4 Risiko für AKI vergleichbar mit 4% GEL	Risiko für AKI vergleichbar mit 6% HES 130 kDa/0,4	(Hartog et al., 2011)
	erhöhtes Risiko für Nierenerkrankungen in septischen Patienten bei HES 200 kDa/0,5 und HES 200 kDa/0,6		(Hartog et al., 2011)

Leber	6% HES 130 kDa/0,4 Vakuolen in den Hepatozyten gesichert	Vakuolen in den Hepatozyten vernachlässigbar	(Adams, 2007) (Wiedermann & Joannidis, 2014)
CVVH	verbesserte Hämo- und Plasmafilterfunktion für 6% HES 130 kDa/0,4	schlechtere Biokompatibilität der CVVH für 4% GEL	(Unger et al., 2005) (Unger et al., 2006)

Der Einfluss zweier Kolloide (Hydroxyethylstärke (unter Berücksichtigung unterschiedlicher Generationen) und 4% Gelatine), auf den Organismus und extrakorporale Systeme, vergleichend. AKI: acute kidney injury (akutes Nierenversagen), CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine, HES: Hydroxyethylstärke

2.3 Die venovenöse Hämofiltration

Bekannt ist das Prinzip einer Hämofiltration bereits seit Beginn der 1920er Jahre (Twardowski, 2008). Die erste Hämofiltration wurde 1952 am Kaninchen angewendet (Alwall, Lindgren & Lunderquist, 1952) und wurde in der Humanmedizin im Jahre 1974 etabliert (Henderson, 1982; Quellhorst, Schuenemann & Borghardt, 1978). Die arteriovenöse Hämofiltration wurde in der Humanmedizin erstmals 1977 als dauerhafte (24 Stunden am Tag) Hämofiltration (zum Flüssigkeitsentzug bei diuretikaresistenten Patienten mit akutem Nierenversagen) durchgeführt. Aktuell werden nahezu lückenlos pumpengesteuerte venovenöse Hämofiltrationssysteme angewendet. Dieses Verfahren wird standardmäßig in der Intensivmedizin bei Krankheitsbildern wie Intoxikationen, Hypervolämie, akutes Nierenversagen, systemic inflammatory response syndrome (SIRS), Sepsis oder Multiorganversagen angewendet und gilt als kreislaufschonend und hocheffektive zur Entgiftung (Grootendorst & Van Bommel, 1993).

2.3.1 Grundlagen der Hämofiltration

In Analogie zur Nierenfunktion wird kontinuierlich, also 24 Stunden pro Tag, durch ein Druckgefälle ein Ultrafiltrat aus dem venös abgepumpten Blut entzogen. Dieses Ultrafiltrat wird je nach Anwendungsindikation teilweise oder vollständig durch eine geeignete Infusionslösung ersetzt und über den blutrückführenden Schenkel des extrakorporalen Kreislaufes zurück in den Körperkreislauf gegeben. Das Ultrafiltrat wird durch den physikalischen Mechanismus der Konvektion gewonnen. Die Ultrafiltrationsrate ist abhängig von der Blutflussrate, der hydraulischen Kapazität der Membraneigenschaft, der Membranoberfläche des Filters, der

membranspezifischen Siebkoeffizienten für die Plasmasubstrate (filterabhängig können Moleküle von 25-50 kDa die Membran passieren), der Blutzusammensetzung, sowie dem transmembranären Druck. Der Transmembrandruck wird von den verschiedenen Druckkompartimenten im Filter beeinflusst. So bilden der sogenannte venöse Druck, der auf den Strömungswiderständen hinter dem Filter beruht (Schläuche, Katheter, zentralvenöser Druck) sowie der arterielle Druck, der aus der Summe des venösen Druckes und blutflussratenabhängigen Strömungswiderstand des Filters entsteht, im Zusammenspiel mit dem im Filtratkompartiment aufgebautem Druck, ein Verhältnis, dass als transmembranärer Druck bezeichnet wird. Entsprechend ist es entscheidend, dass die Strömungsbedingungen im Filter und die Hämorheologie geeignet sind, die kontinuierliche, Änderung von Hämatokrit und Plasmazusammensetzung in den Filterkapillaren zu erlauben (Russ et al., 2013).
Die kleinen Moleküle, welche die Filtermembran passieren können, sind vorwiegend nieder- und mittelmolekulare Stoffe wie Elektrolyte, H^+ und Stoffwechselprodukte wie Kreatinin und Harnstoff. Auch Moleküle von mittlerer Größe wie Peptide und kleine Proteine können in geringem Umfang die Filtermembran passieren und sind somit im Ultrafiltrat wiederzufinden. Hochmolekulare Stoffe wie Albumin und Globulin sowie die meisten Gerinnungsfaktoren, können die Filtermembran nur geringfügig passieren und bleiben somit, genau wie die Blutzellen, im Körperkreislauf zurück.
Durch den Oberflächenkontakt des Blutes mit der Filtermembran, kann es zu einer Aktivierung der Gerinnungskaskade und einem daraus resultierenden erhöhten Koagulationsrisiko führen. Aus diesem Grunde werden bei der Anwendung einer CVVH routinemäßig Antikoagulantien eingesetzt (Oudemans-van Straaten, Wester, De Pont & Schetz, 2006).

2.4 Das Beatmungsmanagement in der Intensivmedizin

Die Mortalitätsrate von Patienten mit einer akuten Beeinträchtigung der Lunge und einem akuten respiratorischen distress syndrome (ARDS) liegt zwischen 40 und 50 Prozent (Sloane et al., 1992).
Es ist bekannt, dass ein reduziertes Tidalvolumen in der maschinellen Beatmung von 4-7 ml/kg KM zu einer Reduktion der Mortalität und Morbidität führt und somit von einer Beatmung mit hohem Tidalvolumen (high volume ventilation) abzusehen ist (Hickling, Walsh, Henderson & Jackson, 1994).
Durch eine „high volume“ Ventilation werden die Epithelien und Endothelien der Lunge geschädigt oder zerstört. Es kann zu Lungenentzündungen und in Folge dessen zu einem gestörten pulmonalen Gasaustausch mit Hypoxämie und Freisetzung von Entzündungsmediatoren führen (Network, 2000). Durch diese Freisetzung von Mediatoren und

die Aktivierung von Entzündungszellen ist das Risiko erhöht, dass auch andere Organe mit den Entzündungszellen und Mediatoren infiltriert werden und somit das Risiko eines Multiorganversagen entsteht (Hickling et al., 1990).
Wird eine Lunge mit positivem Druck maschinell beatmet, so werden mechanische Kräfte wie Druck (stress) und Spannung (strain) aktiviert, die wiederum zu einer Freisetzung von pro- und antiinflammatorischen Mediatoren führen können (Marini & Gattinoni, 2004). Hierbei ist dem jeweiligen Druck ein gewisser Einfluss auf das Outcome zuzuschreiben, das dann zeigt, ob eine Lungenschädigung reversibel und zu vernachlässigen ist, oder aber ein irreversibler Lungenschaden mit massiver Mediatorenfreisetzung verursacht wurde (Marini & Gattinoni, 2004).
Doch nicht nur pulmonal, sondern auch in Leber, Lunge und Herz konnten Mediatoren nach maschineller Beatmung gefunden werden (Gurkan, O´Donnell, Brower, Ruckdeschel & Becker, 2003). Es ist allerdings noch unzureichend erforscht, ob die maschinelle Beatmung diese Mediatorenanflutung (mit ihrem Beginn in der Lunge und hämatogen übertragen in die Organe) verursacht, oder aber eine durch die maschinelle Beatmung bedingte veränderte Organdurchblutung im Organ selbst die Mediatoren freisetzt (Dagar, Taneja & Nanchal, 2016).
Es existieren diverse Studien, die eine lungenprotektive Beatmung mit einem Tidalvolumen von 4-7 ml/kg KM und eine konventionelle Beatmung von 9-12 ml/kg KM miteinander vergleichen. In den meisten Studien ließen sich bereits nach kurzer Zeit signifikante Ergebnisse erzielen, die zeigten, dass die Mortalität durch eine Beatmung mit geringem Tidalvolumen (low tidal volume ventilation) vermindert werden kann (Determann et al., 2010; Villar, Kacmarek, Perez-Mendez & Aguirre-Jaime, 2006). Auch der Zusammenhang zwischen einer durch eine maschinelle Beatmung bedingten Apoptose in renalen Epithelien, und die daraus resultierenden Möglichkeit ein akutes Nierenversagen zu entwickeln, gilt als gesichert und unterstützt die Relevanz der Studien zu diesen Themen (Imai et al., 2003; Van den Akker, Egal & Groeneveld, 2013).

2.5 Das Puffersystem der Leber

Im menschlichen Körper finden Pufferfunktionen an unterschiedlichen Orten statt. Zum einen existieren Puffersysteme im Blut (Bicarbonat-, Proteinat- und Phosphatpuffersystem), zum anderen findet man diese über die Atmung in der Lunge, im Nieren- und auch im Leberstoffwechsel.
In der Leber werden überwiegend Aminosäuren oxidativ abgebaut und es entstehen CO_2 bzw. HCO_3^- und NH_3 bzw. NH_4^+. Diese Moleküle werden dann im Zuge der Harnstoffsynthese (ca. 70%) in den periportalen Hepatozyten verbraucht. Ist die Harnstoffsynthese gestört, so wird

NH_4^+ über die Glutaminsynthese (ca. 30%) eliminiert und das entstandene Glutamin gelangt dann über den Blutweg in die Niere und dient dort der tubulären H^+-Sekretion.
Ein zusätzlicher Weg der Pufferung bzw. H^+-Elimination ist der oxidative Abbau von Milch-, Essig- und Zitronensäure (Thews & Vaupel, 2005).

2.5.1 Die Rolle der Leber im Säuren-Basen-Haushalt

Der Lebermetabolismus stellt, wie in 2.5 bereits erwähnt, eine wichtige Rolle in der Regulation des Säuren-Basen-Haushaltes dar. So können auch beispielsweise akute oder chronische Lebererkrankungen zu Störungen des Säuren-Basen-Haushaltes führen (Oster & Perez, 1986).
Die Stoffwechselendprodukte der Leber sind CO_2 und H_2O. Bei dem Proteinabbau entsteht außerdem NH_3^+ und bei schwefelhaltigen Aminosäuren zusätzlich SO_3. Je nach Säuren-Basen-Haushalt werden diese Stoffwechselendprodukte durch Dissoziation (H^+-Abnahme) oder Assoziation (H^+-Aufnahme) und einer Hydratisierung weiter metabolisiert. In der Leber wird NH_3^+ und CO_2 zu Harnstoff synthetisiert. Der Harnstoff bzw. die gebundenen Stickstoffatome werden im stark konzentrierten Harn über die Niere ausgeschieden oder es wird der Niere zur Ausscheidung des Stickstoffes Glutamin (NH_4^+-Entsorgung) bereitgestellt.
Studien haben gezeigt, dass die Niere im Vergleich zur Leber lediglich 100 mmol HCO_3^- pro Stunde ausscheiden kann, während sie im Gegensatz dazu 1000 mmol Azetat in den Bicarbonat-Basenpool metabolisch überführen und im Zuge dessen 1000 mmol HCO_3^- freisetzten kann (Zander, 1995). Auch in Bezug auf die Milchsäureproduktion ist der Leber ein gewisser Vorteil zuzusprechen. In der Leber werden ungefähr 40 mmol Milchsäure pro Stunde metabolisiert, während in der Niere nur etwa 20 mmol Milchsäure pro Stunde abgebaut werden (Zander, 1995). So nimmt die Leber insbesondere in der schnellen Regulation des Säuren-Basen-Haushaltes (schnelle Elimination von H^+-Ionen) eine wichtige Rolle ein.

2.6 Azidämie in der Intensivmedizin

Zur Begriffserläuterung ist zunächst festzuhalten, dass unter einer Azidose ein primär pathophysiologischer bzw. endogen metabolischer Vorgang unterschiedlicher Ursache zu verstehen ist, der zu einer Absenkung des pH-Wertes führt. Unter einer Azidämie hingegen wird ein Blut-pH-Wert von ≤7,36 verstanden, der sowohl endogenen als auch exogenen Ursprungs sein kann (Martin, 1987). In dieser tierexperimentellen Arbeit wurde exogen durch ein Milchsäure-Salzsäure-Gemisch eine Azidämie induziert, die keinen primär pathophysiologischen Ursprung hatte und somit nicht als Azidose bezeichnet wird. Wird im

Folgenden entgegen der oben angeführten Definition von einer Azidose gesprochen, so hat dies zitatorische Gründe.

Es ist festzuhalten, dass die Azidose ein häufiges Problem bei Intensivpatienten darstellt. Sie kann ursächlich durch die individuelle Grunderkrankung des Intensivpatienten (metabolisch) oder auch iatrogen durch ein bestimmtes lungenprotektives Beatmungsregime (respiratorisch) auftreten.

Als häufiges Begleitsymptom einer Azidose treten neben intensivmedizinischen Symptomkomplexen eine gestörte Homöostase mit einhergehenden Veränderungen im Säuren-Basen-Haushalt bzw. Veränderungen des Wasser- und Elektrolythaushaltes auf (Kaplan & Frangos, 2005). Wird zudem in einem intensivmedizinischen Stadium durch eine falsche parenterale Substratzufuhr eine Hyperglykämie erreicht, so kann es zu einer überschießenden Kohlendioxidproduktion mit einhergehender Azidose oder aber zu einer Verstärkung einer Azidose kommen. Dieser Zustand kann im Extremfall in einem hyperosmolaren, hyperglykämischen, nonketotischen Koma enden.

Ergänzend konnte gezeigt werden, dass der Base Excess in Bezug auf eine metabolische Azidose ein zunehmend an Bedeutung gewinnender Parameter ist, der eine Aussage über das Mortalitätsrisiko bei Intensivpatienten treffen kann (Liao, Chen, Tsao, Shih & Wu, 2013; Schaffartzik, 2007). Dass die metabolische Azidose einen negativen Effekt auf das Gerinnungssystem hat, ist ein Problem, das zuerst in der Traumatologie aufgegriffen und untersucht wurde (Lier, Bottiger, Hinkelbein, Krep & Bernhard, 2011; Martini, 2009). Auch Bedarf et al. (2010) zeigten in azidämischen Schweinen eben jenen Einfluss auf das Gerinnungssystem.

Auch die maschinelle Beatmung eines Patienten stellt ein Risiko für ein Ungleichgewicht des Säuren-Basen-Haushalts dar. Bei Intensivpatienten mit akutem Lungenversagen oder einer Langzeitbeatmung werden lungenprotektive Beatmungsregime eingesetzt, bei denen aufgrund geringer Tidalvolumina zwar eine ausreichende Oxygenierung erzielt wird, jedoch die CO_2-Elimination nur mäßig ist und es infolgedessen zu einer respiratorischen Azidose kommen kann. Letzteres wird zugunsten der lungenprotektiven Beatmung toleriert (permissive Hyperkapnie) solange eine hämodynamische Stabilität vorliegt. So stellen pH-Werte bis 7,2 keine Seltenheit dar. Fällt der pH-Wert jedoch unter den Wert 7,2, wird eine Pufferung in aller Regel unabdingbar (Russ, Esche, Ott, Bedarf & Unger, 2011).

Trotz der hier teilweise aufgeführten und bekannten Folgen einer Azidose, ist eine Azidosekorrektur, inklusive der anzustrebenden Grenzwerte, aktuell nicht genau definiert und bietet daher stetig Diskussionsbedarf.

2.7 Das aktuelle parenterale Ernährungsregime in der Intensivmedizin

Kritisch Kranke zeigen je nach Krankheitsbild gegenüber Gesunden einen deutlich höheren Grundenergieumsatz, der von multiplen Variablen abhängig ist. Die DGEM veröffentlichte demnach eine Leitlinie für die parenterale Ernährung (aktueller Stand Mai 2007, überarbeitet 2013). Die zum Zeitpunkt der Erstellung der vorliegenden Arbeit aktuellste Leitlinie zur parenteralen Ernährung von kritisch Kranken, wurde im Jahre 2016 von der amerikanischen Gesellschaft für parenterale und enterale Ernährung (American Society for Parenteral and Enteral Nutrition; A.S.P.E.N.) und der Gesellschaft für Intensivmedizin (Society of Critical Care Medicine; SCCM) publiziert (McClave et al., 2016).

Lange Zeit galt die Ernährungstherapie eines kritisch kranken Patienten in Form einer Hyperalimentation als Standard, um eine positive Stickstoffbilanz zu erzielen und einem Proteinmangel und Muskelabbau entgegen zu wirken.

Nach den Leitlinien der DGEM ist eine Indikation für eine parenterale Ernährung nur dann zwangsläufig gegeben, wenn ein Intensivpatient mit einem guten Ernährungszustand voraussichtlich auch nach 5-7 Tagen nicht vollständig enteral oder oral ernährt werden kann.

Intensivpatienten, die nach Leitlinie der DGEM keiner parenteralen Ernährung bedürfen, sollten dennoch ab Beginn der intensivmedizinischen Versorgung präventiv einen Glukosebolus von 2-3 g/kg KM/Tag verabreicht bekommen. Weiter empfiehlt die DGEM, Intensivpatienten, die einen mangelhaften oder schlechten Ernährungszustand aufweisen, gesondert zu behandeln und diese entsprechend früher parenteral zu ernähren. Auch die aktuelle amerikanische Leitlinie der A.S.P.E.N. und SCCM empfiehlt eine initiale parenterale Ernährung unverzüglich nach Aufnahme auf die Intensivstation und während der ersten sieben Tage des Klinikaufenthaltes eines Intensivpatienten, sofern eine frühe enterale Ernährung nicht möglich ist. Im Unterschied zu einer initialen Flüssigkeitszufuhr mit Infusionslösungen, liefert die initiale parenterale Ernährung deutlich positivere Ergebnisse (signifikant geringere Komplikations-, Mortalitäts- und Infektionsraten) bei mangelernährten Intensivpatienten (McClave et al., 2016).

Eine unzureichende Zufuhr von Kalorien bzw. Substraten birgt die Gefahr einer katabolen Stoffwechsellage des Intensivpatienten. Demgegenüber werden von der DGEM bei einer zu hohen Substratzufuhr Substratverwertungsstörungen, Hyperglykämien und Hypertriglyceridämien als häufige Nachteile bzw. Risikofaktoren der parenteralen Ernährung aufgeführt.

Katabolie, Hypertriglyceridämie, sowie Hypo- und Hyperglykämie stellen eine hohe Belastung, insbesondere auf die Stoffwechselaktivität der Leber, dar.

Da die rein parenterale Ernährung eine Magen-Darm-Passage auslässt, hat dies Einfluss auf die Aktivität des gesamten Leberstoffwechsels und die natürliche Regulative des Gastrointestinaltraktes. Dass die Darmperistaltik einen hämodynamischen Einfluss auf den

Pfortaderdruck hat ist ein bekanntes Phänomen. Durch diese Peristaltik-Reize kann sich das Stromvolumen in der Pfortader verdreifachen und unterstützt damit die postprandiale Resorption von Nahrungsbestandteilen und Feedbackmechanismen. Genau diese Mechanismen fehlen bei einer intravenösen (parenteralen) Ernährungsform (Opitz & Schmid, 1965). Wichtig ist außerdem, dass bei der parenteralen Ernährung die freien Lipide (Triglyceride, Phospholipiden, Cholesterolester und fettlösliche Vitamine) als Emulsion direkt ins Blut gelangen und sich nicht, wie bei der enteralen Resorption, die Chylomikronen als physiologisches Vehikel in den Enterozyten bilden können. So entstehen also im Darm keine gemischten Mizellen aus Lipiden und Gallensäuremolekülen und die Pankreassekretion wird eingeschränkt, was wiederum einen Einfluss auf den enterohepatischen Kreislauf nimmt. Die Leber wird demnach mit einer erhöhten Lipidspeicherung belastet.
All diese Aspekte zeigen, dass die Leber durch eine parenterale Ernährung möglicherweise maßgeblich dauerhaft belastet wird und daher die Gesamtlast der von der Leber auszuführenden Stoffwechselvorgänge, wie Harnstoffsynthese und Glykolyse, nicht unnötig durch weitere Komponenten der Therapie erschwert werden sollten. Eine besondere Stellung nimmt damit die Azidose ein, da hierbei die Leber durch Laktatabbau und Pufferung eine erhöhte Stoffwechselleistung erbringen muss und katabole Stoffwechselwege forciert werden.

2.8 Zielsetzung/Fragestellung und Hypothesen

Auf Grund der vielen unterschiedlichen Behandlungsregime in der Intensivmedizin sowie der beim kritisch Kranken gemäß Konsens tolerierten Azidämie (Kaplan & Frangos, 2005), stellte sich die Frage, welche Wirkung eine Azidämie selbst auf die Organe und damit auf den Gesamtzustand des kritisch Kranken unter Berücksichtigung der gängigsten Therapiebestandteile haben kann.
Hierzu existieren nach unserem Wissensstand keine Studien an Großtiermodellen, die unter der Beeinflussung der gängigsten Therapiebestandteile (Nierenersatzverfahren, Beatmungs- und Infusionsmanagement) den Einfluss einer Azidämie vergleichen. Es galt zu untersuchen, ob die Azidämie lediglich ein tolerables Parallelereignis ist oder aber ob die Azidose selbst auch eine Ursache für die Zustandsverschlechterungen kritisch kranker Patienten sein kann. Um im standardisierten Vergleich den Azidämie-eigenen Einfluss erfassen zu können, wählten wir ein Großtiermodell an klinisch gesunden Schweinen. Der Erhalt der Leberfunktion als zentrales Stoffwechselorgan ist Voraussetzung für die Genesung der Patienten. Da die Leber wesentlich zur Homöostase des Säuren-Basen-Haushaltes beiträgt, muss unter kontinuierlicher Azidämie von einer durchgehend hohen Stoffwechselleistung ausgegangen werden. Diese kontinuierliche, korrektive Stoffwechselleistung stellt eine maßgebliche, unidirektionale Belastung mit einem entsprechenden Bedarf an Energiebereitstellung dar.

Kommt es unter dieser Belastung zu einer Beeinträchtigung des Sauerstoffangebotes, des Glukosestoffwechsels sowie weiteren Beanspruchungen durch immunologische Biokompatibilitätsreaktionen und Abbau oder Einlagerung kolloidaler Infusionslösungen, ist zu vermuten, dass es in Konsequenz zu zellulären Dekompensationen mit morphologischen Veränderungen kommen kann. Dieser Hypothese zur Folge stellten wir die Leber, als zentrales Stoffwechselorgan, in den Fokus.

Es sollte ein Studiendesign erstellt werden, bei dem die Azidämie und ihre Auswirkungen auf die Lebermorphologie und –physiologie unabhängig von den gängigen Therapiebestandteilen untersucht werden kann. Es stellten sich somit unter Berücksichtigung des aktuellen Kenntnisstandes vier Hauptfragen, die in der Abbildung 2.1 aufgeführt werden. Als Erstes stand die Frage, ob die Kolloide HES (6% HES 130 kDa/0,4) und 4% GEL auch unter Azidämie Unterschiede (Abschnitt 2.2) zeigen und die Klassifizierung bezüglich der pathophysiologischen Reaktion von Kolloiden nachvollziehbar ist. Als zweite Frage stellte sich, ob der derzeit tolerierte Blut-pH-Wert von 7,2 gegenüber einem Blut-pH-Wert von 7,4 (unter Hämofiltration) einen Einfluss auf die Lebermorphologie und –physiologie zeigt. Die dritte Frage sollte Aufschluss darüber geben, ob die Länge der Azidämie (variiert mit und ohne therapeutischer Hämofiltration) einen entscheidenden Einfluss auf die Lebern der Tiere haben kann. Als vierte Frage stellte sich letzlich, ob eine tolerierte Hypoxämie unter Azidämie Unterschiede auf die Zellmorphologie und –physiologie zeigt.

Aus den Fragestellungen heraus ergaben sich demnach fünf Tiergruppen und vier Interventionskombinationen (Abb.3.3), die in Abschnitt 3.1 näher erläutert werden.

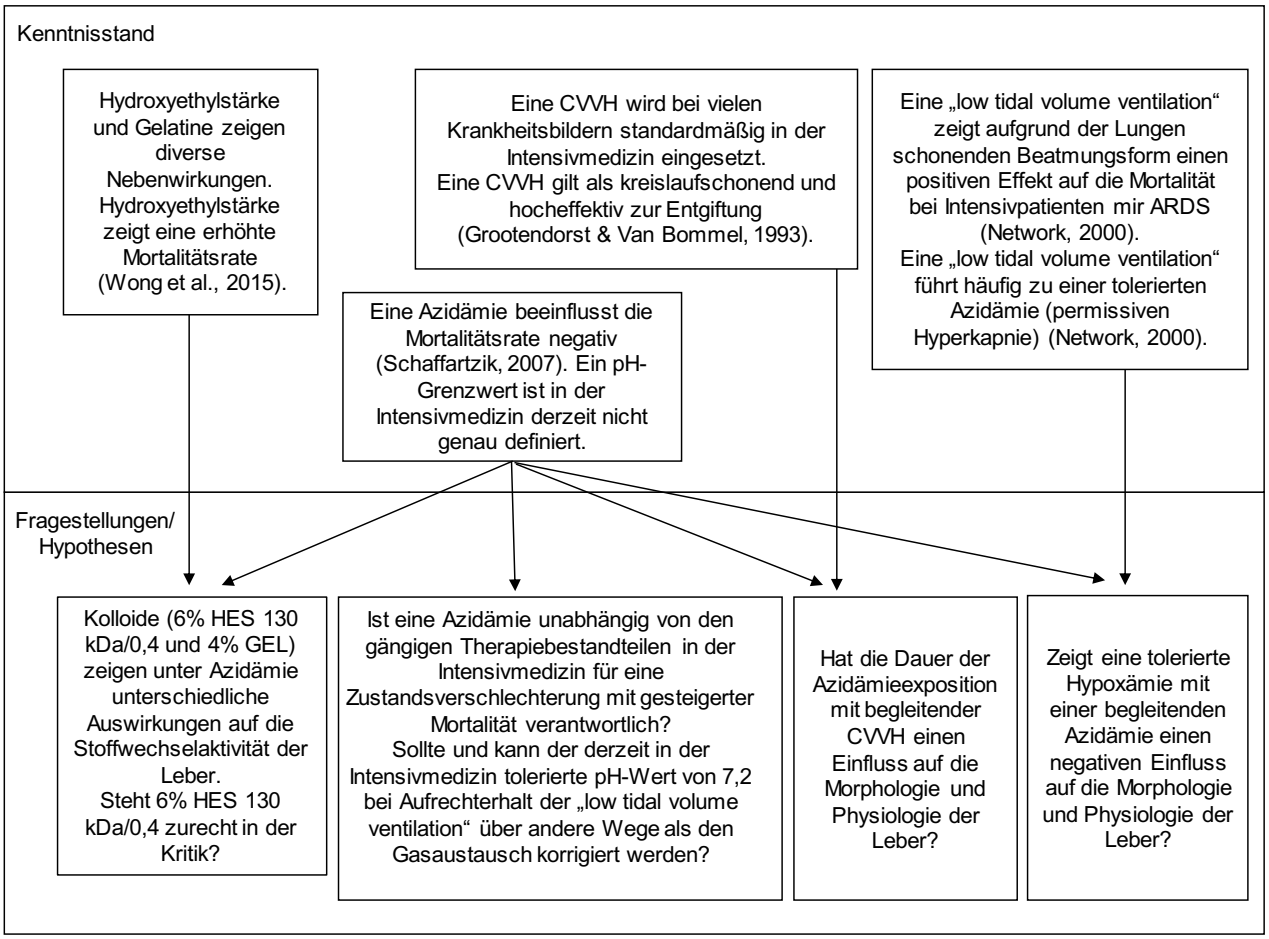


Abb. 2.1 Aktueller Kenntnisstand und daraus resultierende Fragestellungen/Hypothesen
ARDS: acute respiratory distress syndrome, CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: 4% Gelatine, HES: Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4)

3. Studiendesign, Versuchstiere, Materialien und Methodik

3.1 Studiendesign, Versuchstiere, Tierversuchsgruppen

3.1.1 Studiendesign

Um die Auswirkungen der Azidämie selbst in Interaktion mit den unterschiedlichen Therapiebestandteilen (Nierenersatzverfahren, Beatmungs- und Infusionsmanagement) untersuchen zu können erstellten wir ein Tiermodell-Studiendesign mit insgesamt 35 Schweinen als Versuchstiere. Es galt an diesen Tieren unterschiedliche Therapiemöglichkeiten aus der Intensivmedizin anzuwenden, so dass aus den in Abschnitt 2.8 entstandenen Fragestellungen (Abb. 2.1) vier Interventionskombinationen untersucht und verglichen werden konnten. Einen ergänzenden Überblick dazu sollen die Abbildungen 3.1 und 3.3 geben.

Die Versuchstiere teilten wir gemäß der zu untersuchenden Azidämie und ihrer potentiellen pathophysiologischen Interaktion mit anderen Therapiebestandteilen in fünf Gruppen ein. Es gab vier azidämische Tiergruppen mit einem pH-Wert von 7,2. Als notwendige Referenzgruppe fungierte eine fünfte Tiergruppe ohne Azidose (pH-Wert 7,4) mit den Therapiebestandteilen CVVH und maschineller Beatmung.

Alle Tiere, bis auf eine Gruppe der azidämischen Tiere, erhielten die neuste Variante des derzeit stark in der Kritik stehende (auf Stärke basierende) Kolloid HES (6% HES 130 kDa/0,4). Um dem kritisierten HES-Kolloid (6% HES 130 kDa/0,4) einen Vergleich gegenüberzustellen, erhielt eine azidämische Tiergruppe anstelle von 6% HES 130 kDa/0,4 eines der alternativ genutzten Kolloide basierend auf Gelatine (GEL). Die weiteren azidämischen Tierversuchsgruppen wurden genutzt, um entweder die Interaktion der Azidämie mit einer angeschlossenen CVVH zu untersuchen oder aber um die auch bei lungenprotektiv beatmeten Patienten (low tidal volume ventialtion) öfter vorliegende, pulmonal/zirkualatorisch bedingte Hypoxämie als hier gezielt induzierte Zusatznoxe in Interaktion mit der Azidämie zu untersuchen. Somit ergaben sich für das Studiendesign fünf experimentelle Tiergruppen, die in der Abbildung 3.2 aufgeführt sind. Ebenfalls in Abbildung 3.2 aufgeführt sind die unterschiedlichen gruppenspezifischen Substitutionen und Merkmale der Tiergruppen, die Anzahl der Tiere (inklusive die Anzahl der Tiere, die aus unterschiedlichen Gründen nicht für die Auswertung der Tierstudie einbezogen werden konnten), Nachmessungen/Versuchswiederholungen (inklusive Begründungen) und die Therapiebestandteile.

Mit Hilfe dieser fünf Tiergruppen wurden folgende vier Interventionskombinationen untersucht:
1. Interventionskombination Azidämie und Kolloidtyp (HES versus GEL)
2. Interventionskombination Hämofiltration und Azidämie (pH-Wert 7,2 versus pH-Wert 7,4)
3. Interventionskombination alleinige Azidämie, pH-Wert 7,2 (mit versus ohne CVVH)
4. Interventionskombination Azidämie mit versus ohne Hypoxämie

In dieser Studie wurden nicht nur die gängigsten Therapiebestandteile unter der Beeinflussung einer gemischten Azidämie untersucht und verglichen, sondern auch die Länge der Azidämieexposition wurde variiert. So liegt in der 3. Interventionskombination auch eine 2 Stunden längere Azidämieexposition vor, da hier die Korrektur der Azidämie nicht so suffizient und schnell durchgeführt werden konnte wie bei dem THAM-gepufferten CVVH Verfahren. In der Abbildung 3.6 sind der Versuchsablauf sowie die Messzeitpunkte grafisch dargestellt.
Die aus den verschiedenen Belastungen resultierenden Lebermorphologien wurden histologisch untersucht und mittels eines Scores (Tab. 3.6-3.7) bezüglich verschiedener Marker analysiert.
Als Marker wurden die hepatozytäre Ödematisierung, Vakuolisierung, leukozytäre Infiltration sowie sinusoidale Blutstauung, erweiterte Dissé-Räume und der Durchmesser der Zentralvenen aufgeführt und verglichen. Unterstützend wurden biochemische Analysen des Blutserums herangezogen, die Hinweise auf eine gesteigerte metabolische Aktivität der Leber und mögliche Zellschädigungen geben können. Entsprechend wurden Gesamtprotein, Albumin, Kreatinin, Harnstoff, ALT, AST, LDH und AP zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (BSnat, BSsys, ZM, VE) gemessen und ihr Verlauf zur Interpretation der histopathologischen Ergebnisse hinzugezogen.

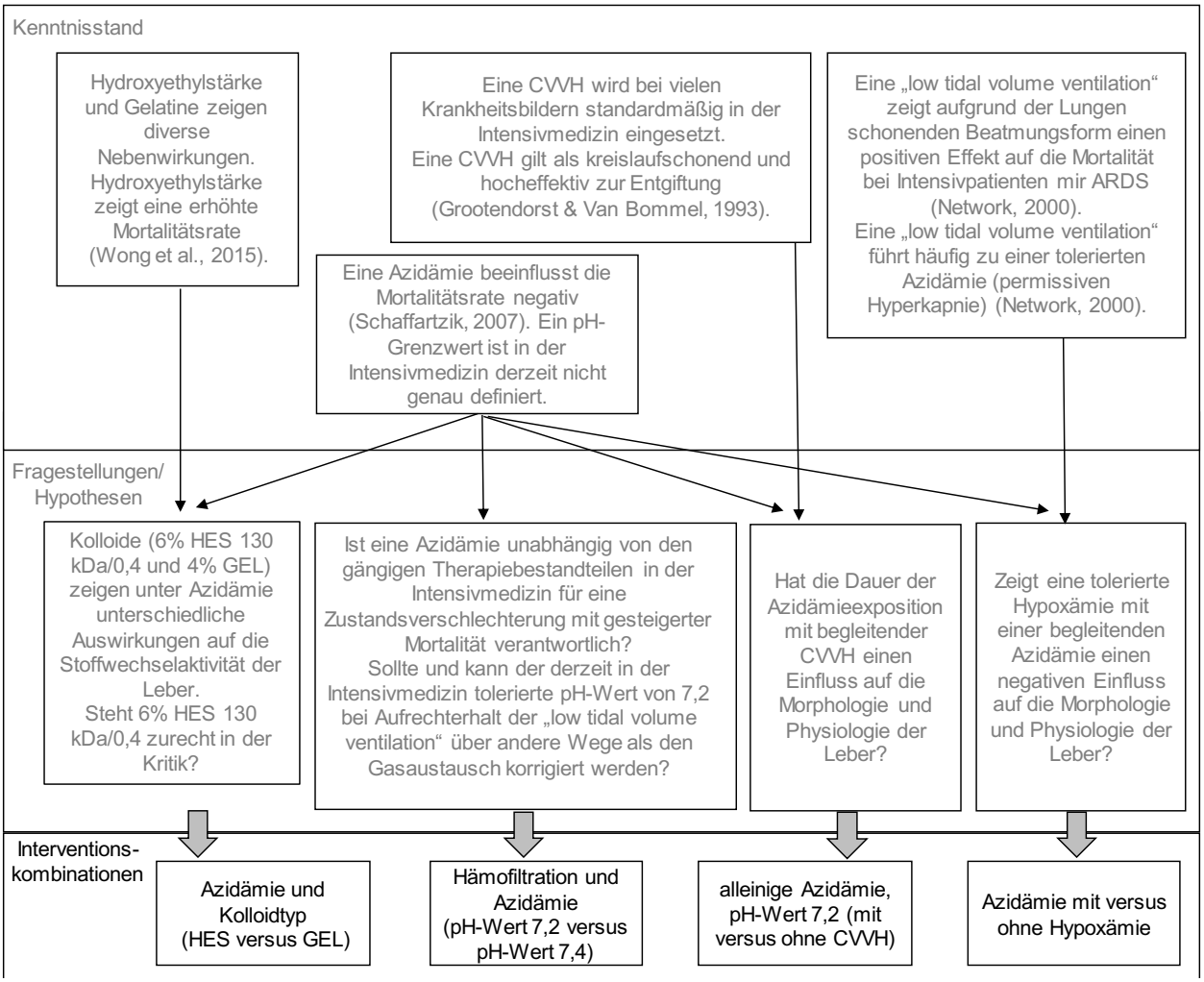


Abb. 3.1 Aktueller Kenntnisstand, Fragestellungen/Hypothesen und daraus resultierende Interventionskombinationen
ARDS: acute respiratory distress syndrome, CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine (4% GEL), HES: Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4)

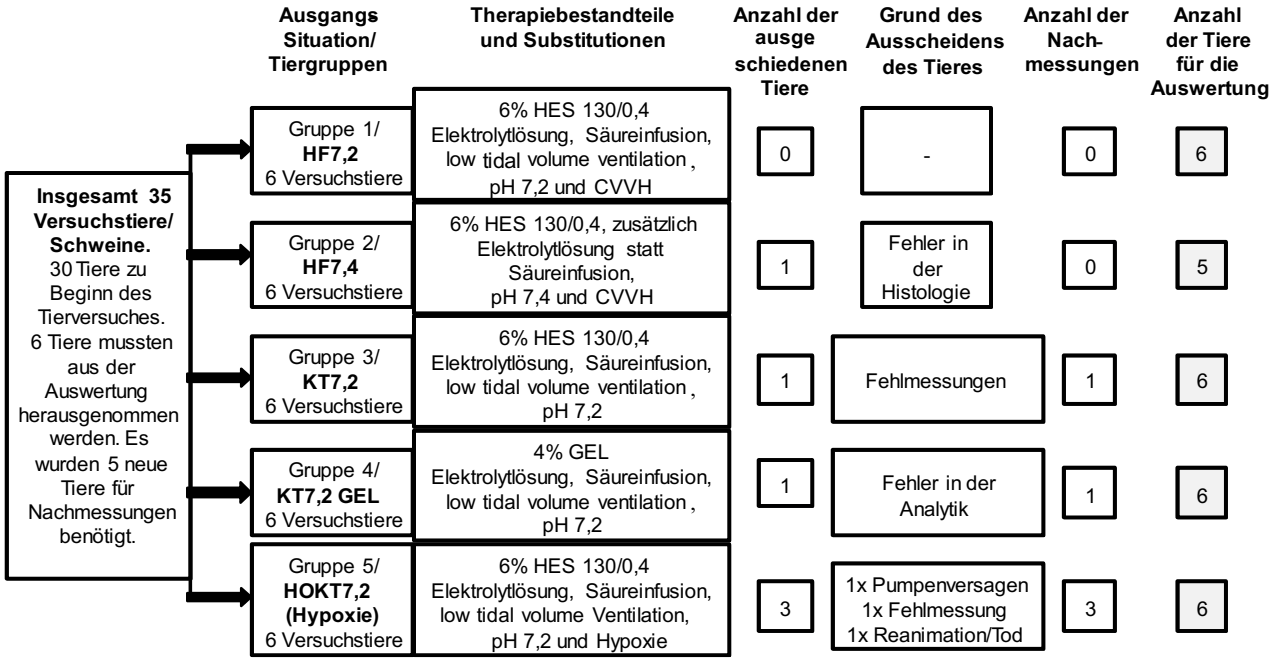


Abb. 3.2 Verlauf der Tierstudie mit Eingruppierung, inklusive die Anzahl der für die Auswertungen/Messungen benötigten und ausgeschiedenen Versuchstiere/Schweine
CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine (4% GEL), HES: Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4)

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH)
- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie)
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)

Fehler in der Histologie: unzureichende Qualität der histologischen Präparate
Fehlmessungen: technische Fehler, unplauslible Messwerte
Fehler in der Analytik: technische Fehler des Analysegerätes
Pumpversagen: technische Fehler der Infusionspumpe/Analytik und Herzversagen

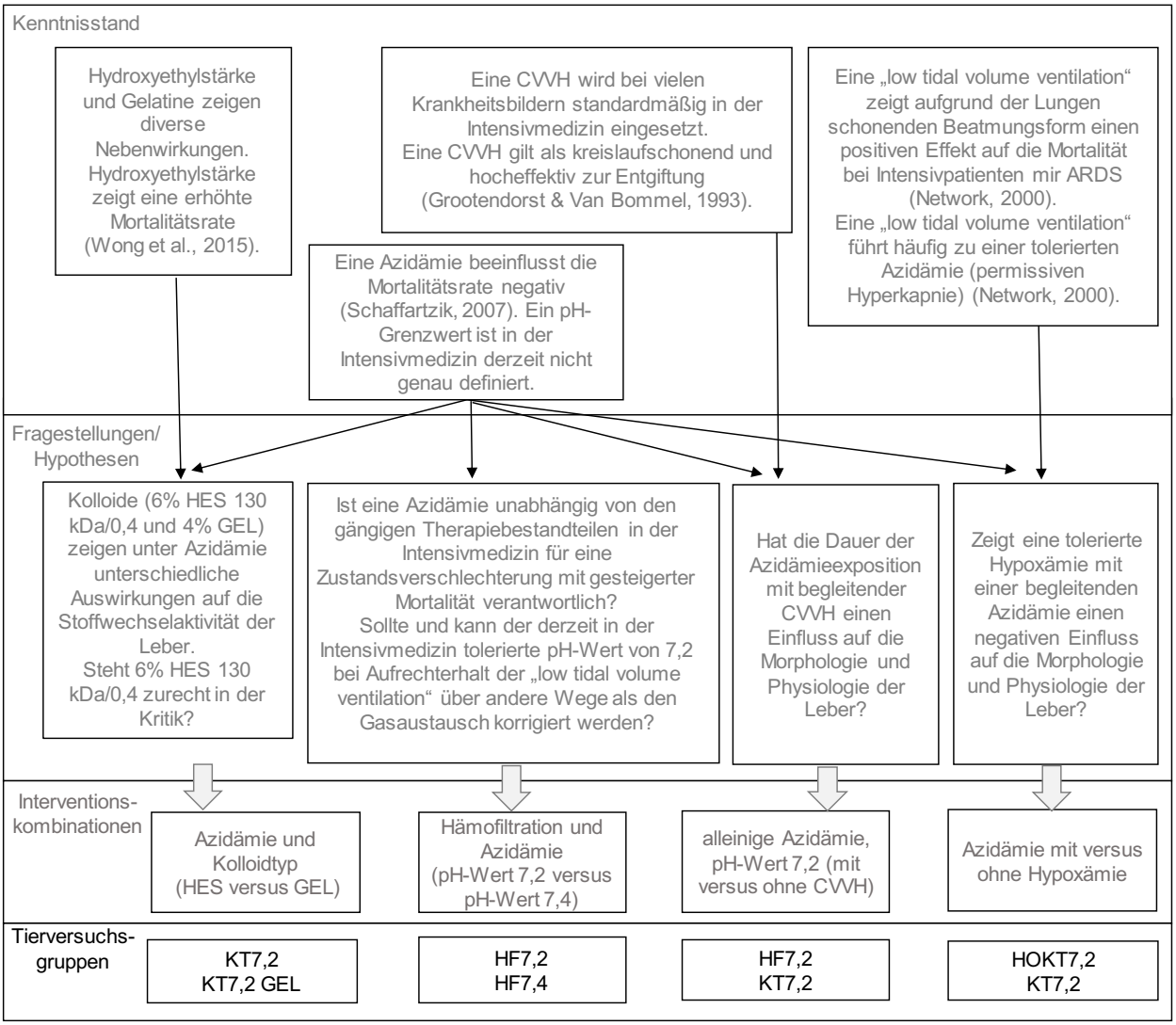


Abb. 3.3 Aktueller Kenntnisstand, Fragestellungen/Hypothesen, Interventionskombinationen und Eingruppierung der fünf Tierversuchsgruppen
ARDS: acute respiratory distress syndrome, CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine (4% GEL), HES: Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4)

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH)
- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie)
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)

3.1.2 Versuchstiere

Für diesen Tierversuch wurden insgesamt 35 männlich kastrierte Schweine der Rasse „Deutsche Landrasse“ im Alter von 14-15 Wochen mit einem Körpergewicht von 40 kg KM (± 1,7 kg KM) verwendet.

Die Tiere erhielten am Nachmittag des Vortages vor Versuchsbeginn zum letzten Mal Futter. Wasser stand ihnen bis zur Prämedikation uneingeschränkt zur freien Verfügung.

Die Tierversuche fanden in der Tierhaltung und den Tier-Operationssälen der Einrichtung für Experimentelle Medizin (FEM) der Charité–Universitätsmedizin Berlin statt (zertifiziert nach Iso 9001:2000) und wurden nach den Richtlinien der Europäischen und der Deutschen Gesellschaft für Versuchstierkunde (GV-SOLAS) und der Tierärztlichen Vereinigung für Tierschutz (TVT) durchgeführt.

Die Genehmigung dieses Tierversuches wurde von dem Landesamt für Gesundheit und Soziales Berlin (Versuchsnummer: G 0380/05) am 19.12.2005 ausgesprochen.

3.1.3 Tierversuchsgruppen

Nach Etablierung des Modells für den *In-vivo*-Versuch wurden 6 Tiere je Gruppe nach dem Zufallsprinzip in zwei CVVH- und drei Kontroll-Gruppen gegliedert. Durch unerwartete Ereignisse während des Versuches (Akutes Pumpversagen) oder Fehler bei der Messung/Analytik/Histologie mussten zusätzlich Versuche wiederholt werden. Am Ende wurden für die hier untersuchten Gruppen von insgesamt 35 Tieren 6 Versuchstiere aus der statistischen Auswertung herausgenommen. Insgesamt konnten 29 Tieren unter den angestrebten standardisierten Versuchsdurchläufen und vollständigen Analytik-Datensätzen ausgewertet werden. Eine Grafik des Studiendesigns ist in Abbildung 3.2 aufgeführt.

Die nicht azidämische Tiergruppe (HF7,4) stellt bereits eine Gruppenwiederholung zu einer vergleichbaren Gruppe aus der vorangegangenen Studie zu Infusionseinflüssen auf die Biokompatibilität einer Hämofiltration (Unger et al., 2006) dar. Da hier bei anderen Parametern keine signifikanten Unterschiede zur aktuellen Gruppe gefunden wurden, wurde aus Tierschutzgründen beschlossen, den Ausfall zu akzeptieren und mit n=5 auszuwerten (Abb. 3.2).

3.2 Materialien

3.2.1 Infusionen

Da der Ausgleich der Flüssigkeitsbilanz sowie die infusionsbasierte Unterstützung des Kreislaufes beim Intensivpatienten häufig den Einsatz kolloidaler Lösungen mit einbezieht, wurden bei diesem Tierversuch zwei in der Intensivmedizin vielfach verwendete Infusionslösungen gewählt. Bei diesen kolloidalen Lösungen handelt es sich um 6% HES 130 kDa/0,4 und 4% GEL. In Abschnitt 2.2 (Kolloidale Lösungen und ihre Einsatzgebiete) wird näher auf die hier verwendeten Infusionslösungen eingegangen.

3.2.2 Pharmakologische Stoffe

Unterschiedliche pharmakologische Stoffe wurden für die Prämedikation, die Narkose, als Antikoagulanz, als Volumenersatzmittel und endlich für die Euthanasie am Versuchsende verwendet und sind in folgender Tabelle (Tab. 3.1) aufgeführt.

Tab. 3.1 Pharmakologische Stoffe

Wirkstoff	**Hersteller**
Azaperon	Stresnil® Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland
Atropinsulfat	Atropinsulfat® B.Braun, Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Fentanyl	Fentanyl® Janssen-Cilag, Neuss, Deutschland
Gelatine 4%	Gelafundin 4%® B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Heparin (unfraktioniert)	Liquemin® Hoffamnn-La Roche AG, Grenzach-Whylen, Deutschland)
Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4)	Voluven® Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Kaliumchlorid	Kaliumchlorid® Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Ketamin	Ursotamin® Serumwerk, Bernberg, Deutschland
Propofol 1%	MCT® Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland
Balancierte Elektrolyt-Lösung mit Acetat	Jonosteril acetate®; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland

Thiopental	Trapanal®; ATLANTA Pharma, Konstanz, Deutschland
THAM (Tris-Hydroxyethyl-Aminomethan)	Tris 36,34% Braun®, B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland
Xylazinhydrochlorid	Rompun®; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland

3.2.3 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die deskriptive Histologie wurde eine Hamatoxylin-Eosin-Färbung (HE-Färbung) gewählt und die gefärbten histologischen Schnitte anhand ausgewählter pathologischer sowie physiologischer Scoreparameter (Abschnitt 3.3.10) beurteilt. In Tabelle 3.2 sind die Materialien der gewählten HE-Färbung und deren Hersteller aufgeführt. In Abschnitt 3.3.8 wird näher auf das Verfahren der HE-Färbung eingegangen und in Abschnitt 3.3.10 die pathologischen sowie physiologischen Scoreparameter genauer definiert.

Tab. 3.2 Materialien einer HE-Färbung und deren Hersteller

Materialien	**Hersteller**
Xylol I	J.T. Baker Deventer Niederlande
Xylol II	J.T. Baker Deventer Niederlande
Alkohole 100-, 96-, 80-, 70 %ig	Herbeta Berlin, Deutschland
Hämatoxylin nach Harris	Merck, Darmstadt, Deutschland
0,25 % HCL-Alkohol	Herbeta Berlin, Deutschland
Eosin	Waldeck GmbH Fa Chroma Münster, Deutschland
Objektträger	Marienfeld Histobond VWR International GmbH
Deckgläschen	VWR International GmbH
Formalin 4 %	Herbeta Berlin, Deutschland
Paraplast (Paraffin)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Vitroclud (Eindeckmedium)	Langenbrinck, Emmendingen, Deutschland

3.2.4 Technische Gerätschaften

Die Methodik des Tierversuches ist in Abschnitt 3.3 detailliert beschrieben. Für die Durchführung dieses Tierversuches wurden folgende technische Gerätschaften benötigt, die in Tab. 3.3 gemeinsam mit deren Herstellern aufgeführt sind.

Tab. 3.3 Technische Gerätschaften und ihre Hersteller

Gerätschaft	**Hersteller**
1.Beatmung	
Ventilator 711	711®; Siemens, Erlangen, Deutschland
Trachealtubus ID 7,0- 8,0 mm	HI-Lo LanzTMs®, Mallinckrodt, Ireland
2. Monitoring und Analytik	
Hämodynamik Körpertemperatur, periphere Sättigung	HP SS6®, Hewlett Packard GmbH, Bad Homburg, Deutschland
Monitoring der Antikoagulation/Heparinisierung mittels activated clotting time	Hämochrom 400®, AD Krauth, Kardiovaskuläre Vertriebsgesellschaft Hamburg, Deutschland
Serumchemie	Zentralinstitut für Laboratoriumsmedizin und Pathobiochemie Universitätsklinikum Charité
Blutgasanalyse	ABL 700® Radiometer, Copenhagen, Dänemark
Häm-Oxymeter	OSM3® Radiometer, Copenhagen, Dänemark
3. CVVH und Hämodynamik	
CVVH-Blutpumpe	AK10® Gambro, Hechingen, Deutschland
Schlauchsystem	„medical-grade“ PVC, Gambro, Hechingen, Deutschland
Hämofilter	(Polyamid ST Filtermembran: Polyflux 140H®) Gambro, Hechingen, Deutschland
Zentraler 4-Fr-Venenkatheter	Arrow, Erdingen, Germany
Zentraler 8,5-Fr-Schleusenkatheter	Arrow, Erdingen, Germany
Pulmonalarterieller Katheter/ „Swan-Ganz-Katheter“	CritiCath™, SP5127 S-TIP TD, Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Arterienkatheter	Combidyn, B.Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland

Doppellumenkatheter	13F, 20 cm lang; Gambro, Hechingen, Deutschland
Blasenkatheter	Wiruthan, CH 12; Rüsch, Kernen, Deutschland
4. Statistik	
Sigma STAT 3.1 für Windows®	Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland
5. Sonstiges	
Warmtouch®	Tyco Healthcare, Neustadt, Deutschland

3.3 Methodik

3.3.1 Anästhesie

Die Anästhesie wurde mit einer intramuskulären Prämedikation eingeleitet um eine Verminderung des Angstverhaltens, eine Dämpfung unerwünschter Reflexreaktionen und eine ausreichende Sedierung der Versuchstiere zu schaffen. Zu diesem Zweck wurde jedem Tier 3 mg/kg KM Azaperon (Tab. 3.1), 0,03 mg/kg KM Atropinsulfat (Tab. 3.2), 25 mg/kg KM Ketamin (Tab. 3.1) und 3,5 mg/kg KM Xylazinhydrochlorid (Tab. 3.1) intramuskulär injiziert.
Unter dieser Analgosedierung wurde die Anästhesie über einen venösen Zugang der Ohrvene (*Vena auricularis*), über den 5-10 mg/kg KM Propofol ins Blut gelangten, eingeleitet.
Die Schweine wurden endotracheal in Bauchlage intubiert (Tubusgröße ID 7,0 – 8,0 mm). Die Tiere wurden an ein Beatmungsgerät „Ventilator 711“ (Tab. 3.3) angeschlossen und in Rückenlage auf dem Operationstisch positioniert. Die Narkoseführung basierte auf einer nach Wirkung dosierten total intravenösen Anästhesie und lag durchschnittlich bei stündlich 19±4 mg/kg KM Thiopental und 7±1 µg/kg KM Fentanyl (Tab. 3.1). Mit dieser Dosierung wurde sowohl die notwendige chirurgische Toleranz für die Instrumentierung erzielt als auch das Atemzentrum ausreichend gedämpft, um trotz Hyperkapnie in den azidotischen Tieren eine Zwischenatmung am Respirator zu verhindern.

3.3.1.1 Narkoseüberwachung

Über das Standardmonitoring zur Narkoseüberwachung (SpO_2, exspiratorischer CO_2-Partialdruck, Herzfrequenz, Temperatur und nicht invasive Blutdruckmessung) wurde im Rahmen der Studie ein umfängliches Herz-Kreislauf-Monitoring durchgeführt (Abschnitt 3.3.1.2).

3.3.1.2 Hämodynamisches Monitoring

Mit Hilfe des Hewlett Packard Monitors (Tab. 3.3) konnten Herzfrequenz, zentralvenöser Druck, der arterielle und pulmonalerterielle Druck (mit pulmonalarteriellem Verschlussdruck), sowie die Sauerstoffsättigung im peripheren Blut (SpO_2) kontinuierlich online überwacht und alle 30 Minuten dokumentiert werden. Die Einstellung und Kontrolle von Tidalvolumen, Atemminutenvolumen und Atmungsfrequenz erfolgte mechanisch im Modus der intermittierenden Positiv-Druck-Beatmung durch entsprechende Einstellung des Ventilators.

Das Herzzeitvolumen (Thermodilutionsmethode mittels (pulmonalarteriellem) „Swan-Ganz-Katheter“), der pulmonalkapilläre Verschlussdruck, der pulmonale Gefäßwiderstand und der systemische Gefäßwiderstand wurden alle 60 Minuten gemessen und notiert.

3.3.1.3 Kontrolle der Körperkerntemperatur

Eine Unterkühlung während der Anästhesie wurde durch eine Warmluftdecke (Tab. 3.3) verhindert und infolgedessen die Körperkerntemperatur der Tiere im physiologischen Bereich von 38- 39°C aufrechterhalten. Die Körperkerntemperatur konnte über den „Swan-Ganz-Katheter“ (Tab. 3.3) online über die Ermittlung der zentralen Bluttemperatur bestimmt werden.

3.3.2 Arterielle und venöse Zugänge, Katheterisierung

Zentrale und arterielle Gefäßzugänge erfolgten mittels eines in Akutversuchen oft angewandten, kombinierten „cut down“-Seldinger Vorgehens, indem die Gefäße zunächst durch eine chirurgische Eröffnung sichtbar gemacht und anschließend die Katheter mit der Seldinger Technik eingeführt wurden. Die Instrumentierung ist graphisch in Abbildung 3.4 aufgeführt. Für die Katheterisierung der linken Jugularvene wurde ein zentraler 4-Fr-Venenkatheter und für die rechte Jugularvene ein zentraler 8,5-Fr-Schleusen-Katheter verwendet. Der Pulmonaliskatheter wurde durch die Schleuse über den rechten Ventrikel in die *Arteria pulmonalis* unter Kontrolle der Druckkurve eingeschwemmt (Tab. 3.3). In die Femoralarterie wurde ein Standardarterienkatheter zur invasiven Druckmessung eingeführt (Tab. 3.3), in die rechte Femoralvene ein Doppellumenkatheter (Tab. 3.3) und in die linke Femoralvene ein einlumiger Venenzugang (Tab. 3.3) um einen zusätzlichen Zugang für die Substitution von Flüssigkeiten zu schaffen. Es folgte eine ausreichende Katheterspülung mit steriler Kochsalzlösung.

Auch das Legen der Blasenkatheter erfolgte chirurgisch. Es wurde der Bauch in Höhe des letzen Zitzenpaares paramedian über eine Länge von ca. 5 cm eröffnet und der Blasendauerkatheter (Tab. 3.3) nach Stichinzision in die Blase eingeführt, geblockt, mit einer Tabaksbeutelnaht fixiert und die Blasenwand abgedichtet. Anschließend wurde das Abdomen mit fortlaufenden Nähten in 3 Schichten um den Katheter herum verschlossen.

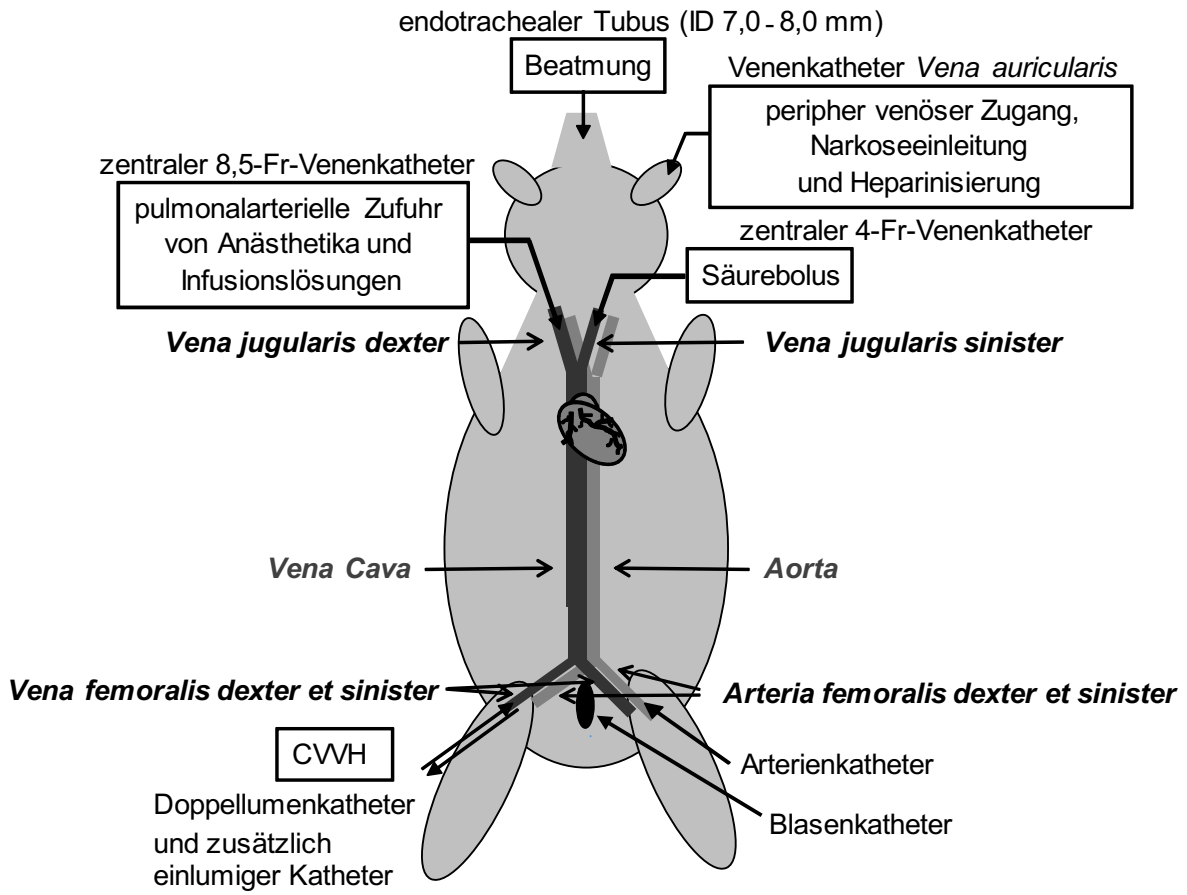


Abb. 3.4 Instrumentierung (modifiziert nach Russ et al., 2010)
CVVH: continuous venovenous hemofiltration

3.3.3 Beatmung und Induktion einer Azidämie

Während der Instrumentierung erfolgte standardgemäß eine Normoventilation mit Aufrechterhaltung des endexspiratorischen CO_2-Partialdruckes von 4,7-5,3 kPa (35-40 mmHg), die periphere Sauerstoffsättigung lag bei SpO_2 >95% und der Sauerstoffpartialdruck PaO_2 zwischen 13,3 und 20 kPa (100-150 mmHg). Der endexspiratorische Druck wurde auf 5 mmHg gesetzt, die inspiratorische Sauerstofffraktion lag initial bei 1,0 und das Zeitverhältnis von Inspiration zu Exspirationlag bei 1:2.

Nach Instrumentierung erfolgte die auf die Azidose ausgerichtete Umstellung der Beatmung. Bei den drei azidämischen Tierversuchsgruppen (HF7,2, KT7,2, KT7,2 GEL) wurde das Tidalvolumen von 10 ml/kg KM (initial) auf 6-8 ml/kg KM gesenkt („low tidal volume ventilation“).

Um eine gemischte respiratorisch/metabolische Azidämie zu induzieren, erfolgte die Anpassung der Atmungsfrequenz, so dass ein $PaCO_2$ von 10,7-11,3 kPa (80-85 mmHg) erreicht wurde. Zusätzlich erfolgte die Infusion von einer insgesamt 0,4 molaren Säurelösung

(0,2M Milchsäurelösung + 0,2M Salzsäurelösung, gelöst in NaCl 0,9%), um in Kombination mit der low tidal volume ventilation einen pH-Wert von 7,19-7,24 im Blut zu erzielen. Unter Berücksichtigung der Atmungsfrequenz, der Säurelösung und des Zielbereiches des pH-Wertes für die azidämischen Tierversuchsgruppen, wurde die inspiratorische Sauerstoffraktion (FiO_2) von initial 0,9-1,0 auf 0,3 FiO_2 herabgesetzt.

In einer Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) wurde zusätzlich eine Hypoxämie induziert. Die Hypoxämie konnte in Kombination mit einer reduzierten Atmungsfrequenz, einer Reduzierung der Sauerstofffraktion auf mindestens 0,25 FiO_2 und einem PaO_2 <9,3 kPa (<70 mmHg) ausgelöst werden.

Bei der nicht azidämischen, normoventilierten Hämofiltrationsgruppe wurde die inspiratorische Sauerstoffraktion (FiO_2) an die azidämischen Tiere (FiO_2 0,3) angeglichen.

Alle 30 Minuten wurden der maximale inspiratorische Druck, der Plateaudruck, das Tidalvolumen, der positive endexspiratorische Druck und der Endtidal CO_2-Gehalt dokumentiert.

3.3.4 Infusionsmanagement und die Anwendung einer kontinuierlichen venovenösen Hämofiltration

Es lagen interindividuell unterschiedlichen Hydrierungszustände (teils leichte Dehydratation durch geringere Wasseraufnahme über Nacht) vor. Um dies auszugleichen und ein stabiles Herz-Kreislaufsystem zu gewährleisten wurde den Tieren bis zu Beginn der kontinuierlichen venovenösen Hämofiltration (CVVH) Ringer-Acetat-Lösung (Tab. 3.1) intravenös verabreicht. Nach Instrumentierung erfolgte die erste Messung (BSnat). Nach dieser ersten Messung wurde den Versuchstieren ein Bolus von 15 ml/kg KM 6% HES 130 kDa/0,4 (pH-Wert 4,5-5,5, Chloridgehalt 140 mmol/l) bzw. 4% GEL (pH-Wert 7,1-7,7, Chloridgehalt 120 mmol/l) verabreicht. Je nach Körpergewicht und dem darauf basierenden individuell errechneten Infusionsvolumen ergab sich für das einzelne Versuchstier eine Infusionszeit von 60-90 Minuten.

Die Antikoagulation für die Hämofiltration erfolgte mittels Bolusgabe von 60 I.E./kg KM Heparin, fortgesetzt durch Dauerinfusion von initial 60 I.E./kg KM/h Heparin. Die initiale Bolusgabe ermöglichte den antikoagulatorischen Zielwert der activated clotting time (ACT) von 150-200 s. (Tab. 3.1). Danach wurde das CVVH-System angeschlossen, wobei das Filtrat unmittelbar in den venösen Rückgabeschenkel zurück infundiert wurde („geschlossenes“ System) und nach einer Äquilibrierungszeit von 15 Minuten die zweite Messung, „System-Baseline Messung“ (BSsys) durchgeführt. Ferner wurden die Versuchstiere auch während der CVVH mit 2,5 ml/kg KM/h Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4) oder 4% GEL infundiert.

Sie erhielten zusätzlich eine Heparininfusion, die an den stündlich gemessenen ACT-Wert mittels eines Hämochroms 400 (Tab. 3.3) individuell angepasst wurde. Die Abbildung 3.5 zeigt das System der offenen und geschlossenen Hämofiltration.

Während des geschlossenen Systems wurde das venöse über eine Blutpumpe zum Filter gelangte Blut filtriert und das Filtrat folgend in den venösen Schenkel zurück in den Kreislauf gegeben. Die Rückführung des Filtrates war notwendig, um nicht von Anfang an einen therapeutischen Nutzen zu haben und die Aktivierungsparameter im Tier zu akkumulieren. Damit konnte die Biokompatibilitätsreaktion beschleunigt oder verstärkt werden, um so im kurzen Versuchsprotokoll die längere Exposition in der Klinik ansatzweise nachzustellen. Nachdem das geschlossene System der CVVH drei Stunden an das jeweilige Versuchstier angeschlossen war, fand die Zwischenmessung (ZM) statt. Nach dieser dritten Messung wurde das Filtrat isovolämisch gegen eine Elektrolytlösung ausgetauscht und somit das offene Hämofiltrationssystem in Analogie zum therapeutischen Einsatz einer CVVH zusammen mit einer Pufferinfusion gestartet. Die azidämischen Tierversuchsgruppen (KT7,2, KT7,2 GEL, HF7,2 und HOKT7,2) erhielten einen Säurebolus (ein Gemisch aus Salzsäure und Milchsäure) um einen pH-Wert von 7,2 zu erreichen und aufrecht zu erhalten. Den nicht azidämischen Tieren (HF7,4) wurde ersatzweise NaCl (Trägerlösung der Säureinfusion) statt des Säurebolus verabreicht. In der Therapiephase am Ende des Versuches erhielten die hämofiltrierten Tiere prädilutorisch 8 mmol/kg KM/h THAM (Tris-Hydroxymethyl-Aminomethan) bzw. Ringer-Acetat-Lösung (neutrale balancierte Lösung) statt THAM-Puffer in der pH7,4-Referenzgruppe. In den azidämischen Versuchstiergruppen ohne CVVH (KT7,2, KT7,2 GEL) erfolgte die zentralvenöse Applikation von 2 mmol/kg KM/h THAM-Puffer sowie die Beendigung des reduzierten Sauerstoffangebotes in der hypoxämischen Tierversuchsgruppe.

Die offene, therapeutische Hämofiltration wurde nach zwei Stunden und abschließender Versuchs-Ende-Messung (VE) beendet.

Die Messzeitpunkte der unterschiedlichen Tierversuchsgruppen waren identisch.

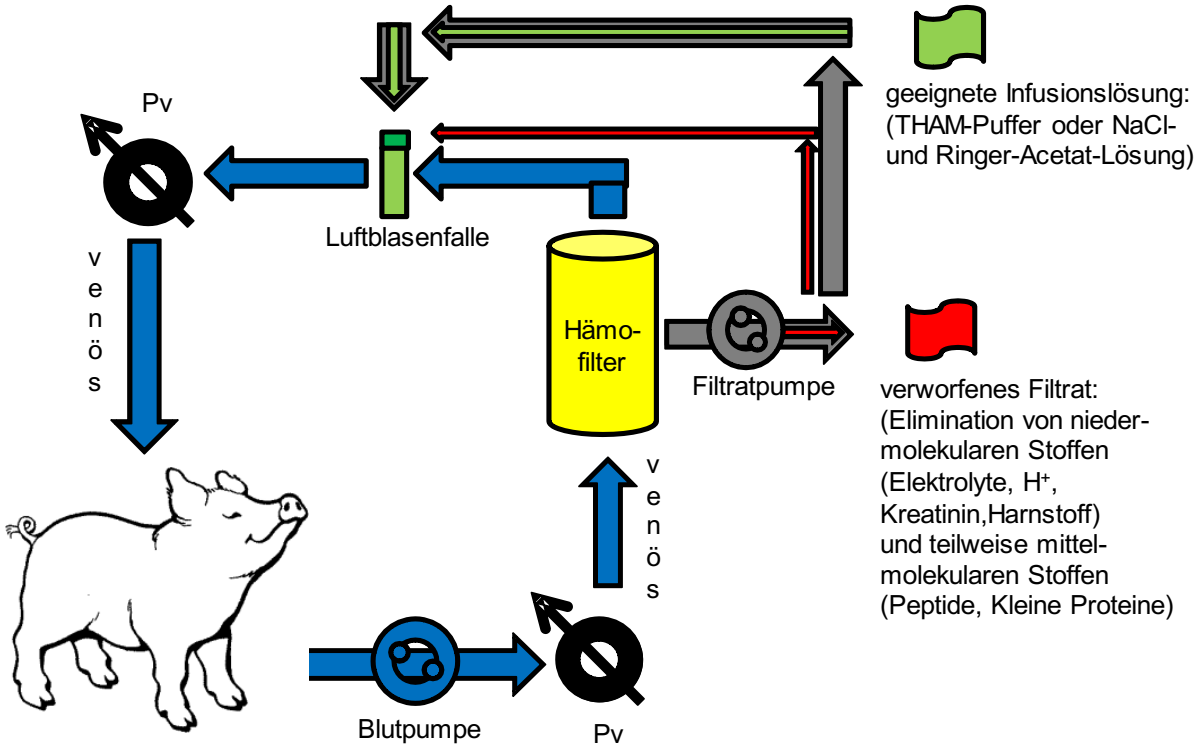


Abb. 3.5 System der offenen und geschlossenen Hämofiltration

und und = geschlossener Kreislauf
und und = offener Kreislauf

H^+: Wasserstoffproton, NaCl: Natriumchlorid, Pv: venöser Druck, THAM: Tris-Hydroxyethyl-Aminomethan

3.3.5 Messzeitpunke und Parameter

Gemessen wurde an vier unterschiedlichen Zeitpunkten des Versuches (Tab. 3.4). Über den zentralen Venenkatheter wurde aus der linken Femoralvene Blut zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten entnommen und folgend biochemische Analysen des Blutserums der Parameter durchgeführt, die Hinweise auf eine mögliche Zellschädigung oder eine gesteigerte metabolische Aktivität der Leber geben können. Die Parameter für die biochemische Analyse sind in der Tabelle 3.5 aufgeführt.

Die Proben für die Blutgasanalyse wurden von venösen, pulmonalen und arteriellen Kathetern entnommen und die Ergebnisse mit Hilfe einer ABL 700® und einer OSM3® (Tab. 3.3) aufgezeichnet. Die Hämoximetrie erfolgte im OSM3® Radiometer mit dem Tierblutmodus Schwein. Mit Anwendung der Blutgasanalyse erfolgte eine Korrektur der Blutgase und des pH-Wertes auf die aktuelle Körpertemperatur des jeweiligen Versuchstieres. Alle Parameter wurden mittels Standardmethoden des Institutes für klinische Chemie der Universitätsmedizin Berlin-Charité ermittelt. Die ACT wurde, wie bereits beschrieben, stündlich mittels eines

Vollblutkoagulometers (Hämochron®, Tab. 3.3) gemessen. Eine grafische Darstellung des Versuchsablaufes inklusive der unterschiedlichen Messzeitpunkte ist in der Abbildung 3.6 aufgeführt.

Tab. 3.4 Messzeitpunkte und Versuchsablauf im Überblick tabellarisch

	Narkoseeinleitung, Instrumentierung mit parallel erfolgender basaler Hydrierung für standardisierte Verhältnisse
Native Baseline (BSnat)	Messung der tierindividuellen Ausganswerte unter Narkose in Rückenlage
	Start der Kolloidinfusion mit 6% HES 130 kDa/0,4 oder 4% GEL nach ca. 90 Min. Bolusinfusion der Säure und Äquilibrierung stabiler Azidose-Sollwerte, Heparinisierung und CVVH-Systemanschluss
System Baseline (BSsys)	Messung nach Stabilisierung der Werte an der rezirkulierenden CVVH
	3 Stunden CVVH im geschlossenen Modus mit Azidose
Zwischenmessung (ZM)	Status quo, Messung nach Exposition mit Interaktion von allen Therapiebestandteilen
	2 Stunden Therapiemodus CVVH mit isovolämischen Austausch von Filtrat gegen Elektrolytlösung und Puffergabe
Versuchsende (VE)	nach 2 Stunden offenem Therapiemodus der CVVH und Puffergabe
	Euthanasie der Versuchstiere und Sektion mit Materialgewinnung für die Histologie

BSnat: Native Baseline, BSsys: System Baseline, CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine (4% GEL), HES: Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4), VE: Versuchsende, ZM: Zwischenmessung

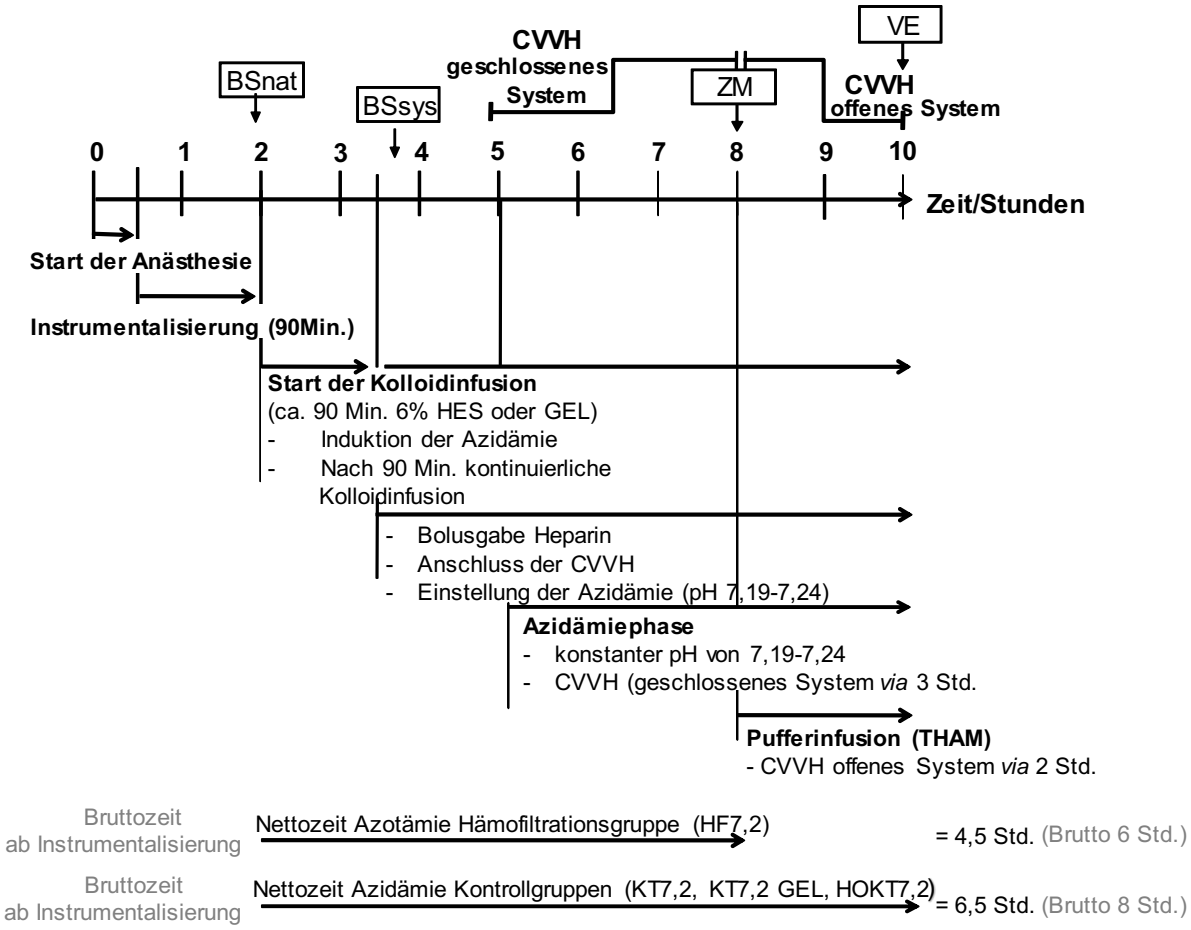


Abb. 3.6 Messzeitpunkte und Versuchsablauf im Überblick grafisch (modifiziert nach Russ et al., 2011)
BSnat: Native Baseline, BSsys: System Baseline, CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine (4% GEL), HES: Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4),

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH)
- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2

3.3.6 Versuchsende

Nachdem der Tierversuch beendet war, wurden alle Tiere euthanasiert. Dies geschah mittels einer zusätzlich zur Narkose intravenös applizierten Überdosis von Thiopental, sowie von peripherem Muskelrelaxanz (Pancuronium®) zur Vermeidung von finaler Schnappatmung und Kaliumchlorid zur Induktion von Kammerflimmern (Tab. 3.1).

Der Tod wurde mit dem Verlust der Herzaktivität (Nulllinie EKG, auskultatorisch keine Herztöne) und der Apnoe bestätigt und dokumentiert.

3.3.7 Organentnahme und Fixierung

Post mortem wurde das Abdomen an der *Linea alba* eröffnet und ein Zugang zu den inneren Organen geschaffen. Entnommen wurden Teile der rechten und linken Niere, der Lunge, der Leber und der unterschiedlichen Darmabschnitte.

In dieser Arbeit wurde der Fokus gesondert auf die Leber gelegt.

Da die Größe der Probe entscheidend ist, um eine schnelle Fixation zu ermöglichen und eine Autolyse zu verhindern, wurde zunächst aus der Gesamtprobe (Leber gesamt) eine ca. 1 cm dicke Scheibe herausgeschnitten und soweit verkleinert, dass ein Leberteilstück von ca. 1 cm Kantenlänge aus der Gesamtleber resultierte. Das Teilstück der Leber wurde zunächst in Formalin zwischengelagert, um eine Haltbarkeit zu gewährleisten und eine Veränderung des Lebergewebes *post mortem* zu verhindern. Um dünne Schnitte herstellen zu können, musste das Gewebe in einen festen Zustand gebracht werden. Hierfür wurde das Gewebe zunächst in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und anschließend nochmals zerkleinert und in eine Einbettungskapsel gelegt. Diese Kapsel gelangte folgend in einen Einbettungsautomaten und wurde in diesem von der wässrigen Phase in geschmolzenes Paraffin überführt. Die Probe wurde ausgegossen und anschließend, in einer kleinen Edelstahlwanne liegend, mit flüssigem Paraffin übergossen und die ehemalige Einbettungskapsel aufgelegt. Es schloss sich ein ausreichender Kühlvorgang an, damit das Paraffin erstarren konnte. Der Paraffinblock konnte nun mittels Mikrotom in 2-4 µm dünne Scheiben geschnitten und auf einen Objektträger gezogen werden. Nach 24 h bei 37 °C in der Wärmekammer konnte die gewünschte Färbung vorgenommen werden.

3.3.8 Hämatoxylin-Eosin-Färbung

3.3.8.1 Das Prinzip der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Für die deskriptive Histologie wurden mit der Hämatoxylin-Eosin-Methode (HE-Färbung) gefärbt. Die HE-Färbung ist eine Succedanfärbung, das heißt es wird nacheinander gefärbt. Aus Hämatoxylin wird über Oxidation und Zugabe von Alaunen der Farbstoff Hämalaun hergestellt. Der positiv geladene Farbstoff färbt die basophilen Zellbestandteile wie die DNA des Kernchromatins. Dabei lagern sich die positiv geladenen Komplexverbindungen des

Hämalaun an die negativ geladenen Phosphatgruppen der Nukleinsäuren. Das tiefblaue Färbeergebnis der Kerne wird durch Einstellen des pH-Wertes auf >3 mit Hilfe des Leitungswassers erreicht. An diesen Teil schließt sich die Eosin-Färbung an. Das negativ geladene Eosin gehört der Fluoreszin-Gruppe an und bindet sich über elektrostatische Adsorption an die positiv geladenen Gewebsbestandteile, womit die rötliche Plasmafärbung zustande kommt.

3.3.8.2 Durchführung der Hämatoxylin-Eosin-Färbung

Die mit den Organschnitten versehenen Objektträger wurden in Färbeküvetten gelegt und von Hand gefärbt. Um das Paraffin herauszulösen wurde zunächst in Xylol I und Xylol II für je 10 Minuten entparaffiniert. Es folgte die jeweils zweiminütige absteigende Alkoholreihe (2x 100 %, je 1x 96 %, 80 %, 70 %) und die anschließende Ruhe in *Aqua dest.* für zwei weitere Minuten. Die Kernfärbung wurde mit Hämatoxylin nach Harris für 7 Minuten vorgenommen. Anschließend wurde in *Aqua dest.* 3x gespült, die Objektträger folgend für kurze Zeit in HCL-Alkohol (0,25 %) getaucht und 10 Minuten mit Leitungswasser gewässert. Es folgte die Gegenfärbung durch das 3- bis 4-malige Eintauchen in Eosin. Abschließend wurde je zweimal für zwei Minuten mit 96 % und folgend 100 % Alkohol entwässert und die Objektträger wieder in Xylol II und endlich in Xylol I für jeweils 5 Minuten verbracht.

Der Vorgang wurde mit dem Eindeckeln mittels des Eindeckmediums Vitroclud (Tab. 3.2) beendet.

Histologisch ist nun das Chromatin des Kerns (DNA) durch das Hämalaun in Blautönen und das Eiweiß der extrazellulären Matrix und des Zytoplasmas durch das Eosin in Rottönen dargestellt.

3.3.8.3 Histopathologische Untersuchung der Hämatoxylin-Eosin-Schnitte

Für die histopathologische Beurteilung der HE-Schnitte wurde zunächst ein Score erstellt, der pathologische Veränderungen, wie die Vakuolisierung, Ödematisierung, Blutstauung, Erweiterung der Dissé-Räume und die Infiltration (Tab. 3.6 und Tab. 3.7) in Grade erfasst und die Leber in funktionell differenzierte Gebiete unterteilt (Abb. 3.7).

Es wurden drei Leberläppchen pro Versuchstier gescort und die geringsten Durchmesser in µm von fünf Zentralvenen pro HE-Schnitt und Versuchstier vermessen. Des Weiteren wurde jedes Leberläppchen in vier Quadranten unterteilt, so dass pro Quadrant drei (A, B, C) Untersuchungsabschnitte (Abb. 3.7) und somit pro gesamtes Leberläppchen 12 Untersuchungsabschnitte mikroskopisch untersucht und gescort wurden.

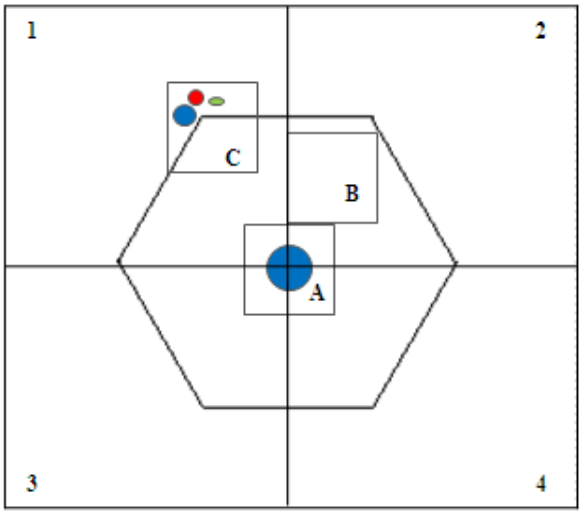


Abb. 3.7 Score/Schema für die Einteilung des Leberläppchens in funktionelle Einheiten und Quadranten
A= zentrolobulär (Zentralvene), B= intralobulär, C= periportal (Lebertrias) und 1,2,3,4 = Quadrante

3.3.9 Biochemische Analyse von Blutserum

Zu den jeweiligen Messzeitpunkten (wie in Tab. 3.4 und Abb. 3.6 beschrieben), wurden die in Tab. 3.5 gelisteten Parameter im zentralvenös entnommenen Blut (Blutserum) analysiert, die als wichtige Marker für die Aussage über die Leberfunktion fungieren.

Aus allen Messwerten der Einzeltiere wurde der Mittelwert für jeden Parameter (Tab. 3.5) einer Tierversuchsgruppe ermittelt.

Da aufgrund der Kolloid- und Säureinfusion eine Dilution wahrscheinlich ist, wurde mit Hilfe des gemessenen Gesamtproteins ein Dilutionswert von jedem serumspezifischen Parameter (Tab. 3.5) errechnet. Folgend wurde dann der Verlauf der unterschiedlichen Parameter zu den vier unterschiedlichen Messzeitpunkten während des Versuches errechnet. Das Ergebnis der Berechnung erfolgte in Prozent und ist in der Formel 3.1 notiert.

Formel für die Berechnung des Dilutionswertes ausgewählter Parameter (AST, ALT, AP, LDH, Harnstoff, Kreatinin, Albumin, Protein) und des prozentuellen Verlaufes zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten

$$\frac{\boldsymbol{BSnat}}{\boldsymbol{BSsys\ oder\ ZM\ oder\ VE}} = \frac{\mathbf{100}\ \%}{\boldsymbol{X}}$$

[Formel 3.1]

BSnat (erste Messung als Ausgangswert): Native Baseline, BSsys (zweite Messung): System Baseline, ZM (dritte Messung): Zwischenmessung, VE (vierte Messung): Versuchsende, X: Errechneter Wert in Prozent

Im Gegensatz zum Gesamtprotein könnte bei Albumin, im Kontext der Kolloidinfusion sowie des Säuren-Basen-Haushaltes (im Stewart-Modell fließt Albumin wesentlich mit ein), auch potentiell eine aktive Veränderung der Plasmawerte als Reaktion auf die Azidose und Dilution vorliegen. Daher wurde ausschließlich das Gesamtprotein für die Berechnung der Dilutionswerte verwendet.

Tab. 3.5 Biochemische Analyse des Blutserums ausgewählter Parameter, die Hinweise auf eine mögliche Zellschädigung oder eine gesteigerte metabolische Aktivität der Leber geben

Parameter	**Beteiligung der Parameter an biochemischen und physiologischen Prozessen**
AST	Stickstoff für Harnstoffzyklus und Purinstoffwechsel, Proteinbiosynthese
ALT	„leberspezifisch“, Glukoneogenese, Zitratzyklus, Glykolyse, Proteinbiosynthese, Stickstoff für Harnstoffsynthese
LDH	Glykolyse, Glukoneogenese, Zitratzyklus
AP	Dephosphorylierung
Kreatinin	Muskelstoffwechsel, Proteinbiosynthese
Harnstoff	Proteinbiosynthese, Harnstoffzyklus, Säuren-Basen-Haushalt (Elimination von HCO_3^- und NH_4^+)
Albumin	Wichtiges Protein für die Flüssigkeitsverteilung im IZR und EZR und wichtiges Transportprotein im Blutkreislauf
Protein	Plasmaprotein, passiver Marker für Berechnung des Dilutionseffektes

ALT: Alanin-Aminotransferase, AP: Alkalische Phosphatase, AST: Aspartat-Aminotransferase, EZR: Extrazellularraum, $HCO3^-$: Bikarbonat, IZR: Intrazellularraum, LDH: Laktat-Dehydrogenase, $NH4^+$: Ammonium

3.3.10 Histopathologischer Score und Scoreparameter

3.3.10.1 Histopathologischer Score

Wie in Abschnitt 3.3.8.3 aufgeführt, wurden pro Versuchstier 5 Zentralvenendurchmesser an dem geringsten Durchmesser der jeweiligen Zentralvene ausgemessen und 3 Leberläppchen nach dem Schema in Abbildung 3.7 gescort.

Folglich entstanden 12 HE-Gesichtsfelder pro Leberläppchen, zusätzlich fünf HE-Gesichtsfelder der vermessenen Zentralvenen und somit eine Summe von 41 HE-Gesichtsfeldern, die für den histopathologischen Score pro Versuchstier verwendet werden konnten.

Es ergaben sich bei sechs Versuchstieren pro Versuchsgruppe eine Anzahl von 246 HE-Gesichtsfeldern bei fünf Versuchstieren pro Versuchsgruppe 205 HE-Gesichtsfelder, so dass eine repräsentative Gesamtanzahl von 1189 HE-Gesichtsfelder resultierte und der histopathologische Score somit eine sichere Einordnung der einzelnen Scoreparameter versprechen ließ.

Wichtig zu erwähnen ist, dass alle HE-Schnitte „verblindet“ gescort wurden. „Blind“ bedeutet hierbei, dass weder Versuchstier noch Infusionslösung, pH-Status, Nierenersatzregime oder Hypoxämiestatus zum Zeitpunkt der mikroskopischen Untersuchung und Scorebewertung bekannt waren.

3.3.10.2 Scoreparameter

Es wurden folgende sechs Parameter definiert: die Vakuolisierung, die Ödematisierung, die Beurteilung der Dissé-Räume, die Blutstauung, die Infiltration von Leukozyten/Leukozyten pro Gesichtsfeld und der Zentralvenendurchmesser. Im Nachfolgenden werden diese Parameter genauer definiert und deren graduierte Beurteilung in der entsprechenden Scoretabelle erläutert. Die Abbildungen 3.8-3.10 zeigen eine exemplare Darstellung von den Scoreparametern in den HE-Schnitten. Die Auswahl und Beurteilung der Scoreparameter erfolgte modifiziert nach Wever (2002).

<u>Vakuolisierung</u>

Unter einer Vakuolisierung der Hepatozyten sind kleine rundliche, optisch leere zytoplasmatische Gebilde zu verstehen, die entweder als Speichervakuolen (mit Flüssigkeit gefüllte Vakuolen) oder aber als Schwellungen von Organellen (wie Mitochondrium, Golgiapparat, Endoplasmatische Retikulum u.a.) vorliegen. Eine solche Schwellung der Organellen steht für eine Störung der Leberzellen und ist als vakuoläre Leberzelldegeneration beschrieben (Baumgärtner & Gruber, 2015).

In der Abbildung 3.8 sind wenige kleine Vakuolen, die in 5-25 % (Score Grad 1) des Gesichtsfeldes auftreten, aufgezeigt. In Abbildung 3.9 hingegen sind 75-100 % des Gesichtsfeldes des Leberbereiches vakuolisiert. Hier ist Grad 4 der Scoreeinteilung erreicht.
In der Abbildung 3.10 sind keine Vakuolen nachweisbar (Grad 0).

Ödematisierung

Unter einer Ödematisierung wird ein Flüssigkeitsaustritt aus dem Gefäßsystem in den interstitiellen Raum verstanden. Beispielsweise kann ein gestörter Ionentransport kausal zu einer Entstehung eines Ödems führen, aber auch ein mangelnder Lymphabfluss oder aber gestörte Druckverhältnisse in oder außerhalb der Gefäße (erhöhter hydrostatischer Druck in den Kapillaren, erniedrigter oder erhöhter onkotischer Druck außerhalb der Kapillaren) können ursächlich für eine Ödembildung sein. In ödematisierten Hepatozyten füllen sich die hepatozellulären Mitochondrien mit Wasser und werden demnach histologisch als feinkörnige, aufgeschwemmte Organellen sichtbar, die eine parenchymatöse Degeneration der Leber zeigen (Baumgärtner & Gruber, 2015).
In den Abbildungen 3.8-3.10 ist zu sehen, dass die ödematisierten Hapatozyten in allen Versuchsgruppen einen hohen Scoregrad erreichten, so dass eine bildgebende Gegenüberstellung von Grad 4 zu Grad 0 oder Grad 1 für diesen Scoreparameter nicht möglich war.

Blutstauung

Wie in den Abbildungen 3.8 bis 3.10 erkennbar, war in den HE-Schnitten der Versuchstiere, mit wenigen Ausnahmen keine Blutstauung feststellbar (Grad 0).

Dissé-Räume

Die Gradeinteilung der erweiterten Dissé-Räume ist in Abbildung 3.8 mit Grad 1, in Abbildung 3.10 mit Grad 2 und in Abbildung 3.9 mit Grad 3 nachzuvollziehen.

Infiltration von Leukozyten/Leukozyten pro Gesichtsfeld

Die Leukozyten wurden pro 20fach vergrößertes Gesichtsfeld einzeln ausgezählt und im Leukozyten-Score durch Gradzahlen ersetzt. Abbildung 3.8 und 3.10 wurden mit Grad 1 und Abbildung 3.9 mit Grad 2 gescort.

Zentralvenendurchmesser

Hier wurde der Durchmesser mit der geringsten Länge (um Irritationen bezüglich Quer- und Längsschnitt zu vermeiden) einer 20fachen Vergrößerung gemessen und in µm angegeben (Abb. 3.8 und Abb. 3.10)

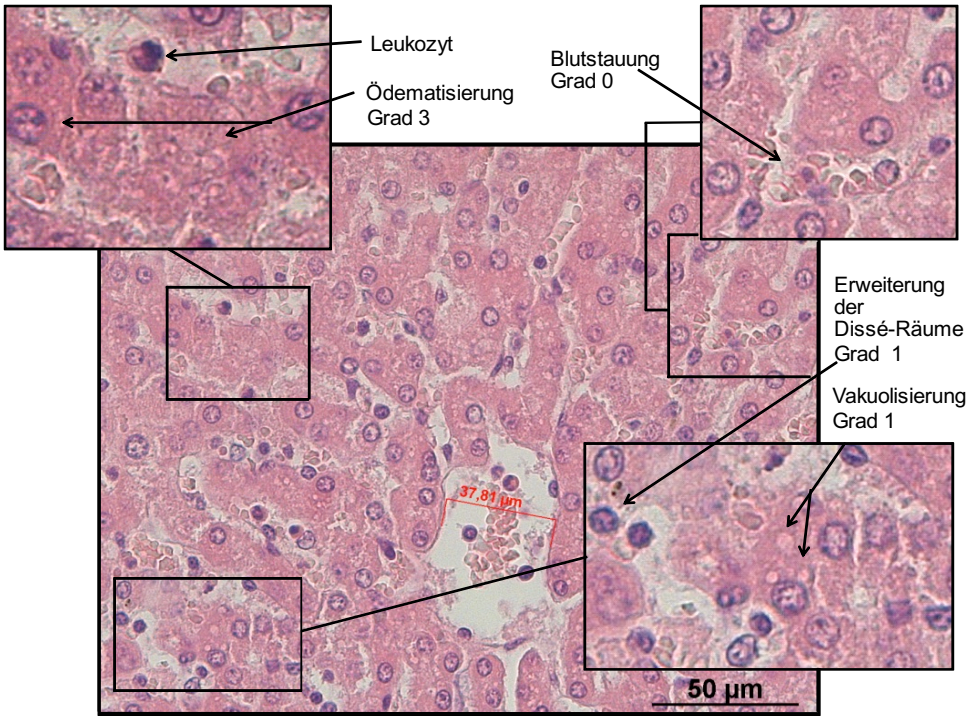


Abb. 3.8 Histologisches Bild/Gesichtsfeld eines HE-Schnittes einer Schweineleber (Tiergruppe: HF7,2; Tier: HF7,2-13) in 20facher Vergrößerung eines Binokularmikroskopes
HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH), HE: Hämatoxylin-Eosin-Methode, Zentralvenendurchmesser: 37,81 µm

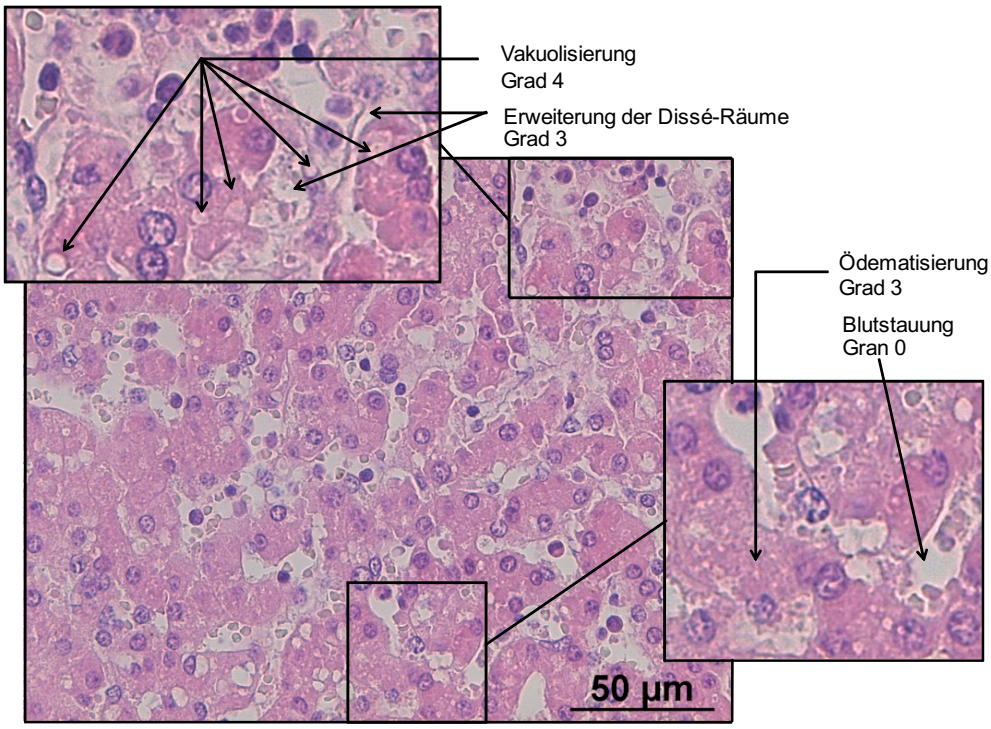


Abb. 3.9 Histologisches Bild/Gesichtsfeld eines HE-Schnittes einer Schweineleber (Tiergruppe: HOKT7,2; Tier; HOKT7,2-8) in 20facher Vergrößerung eines Binokularmikroskopes
HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie), HE: Hämatoxylin-Eosin-Methode

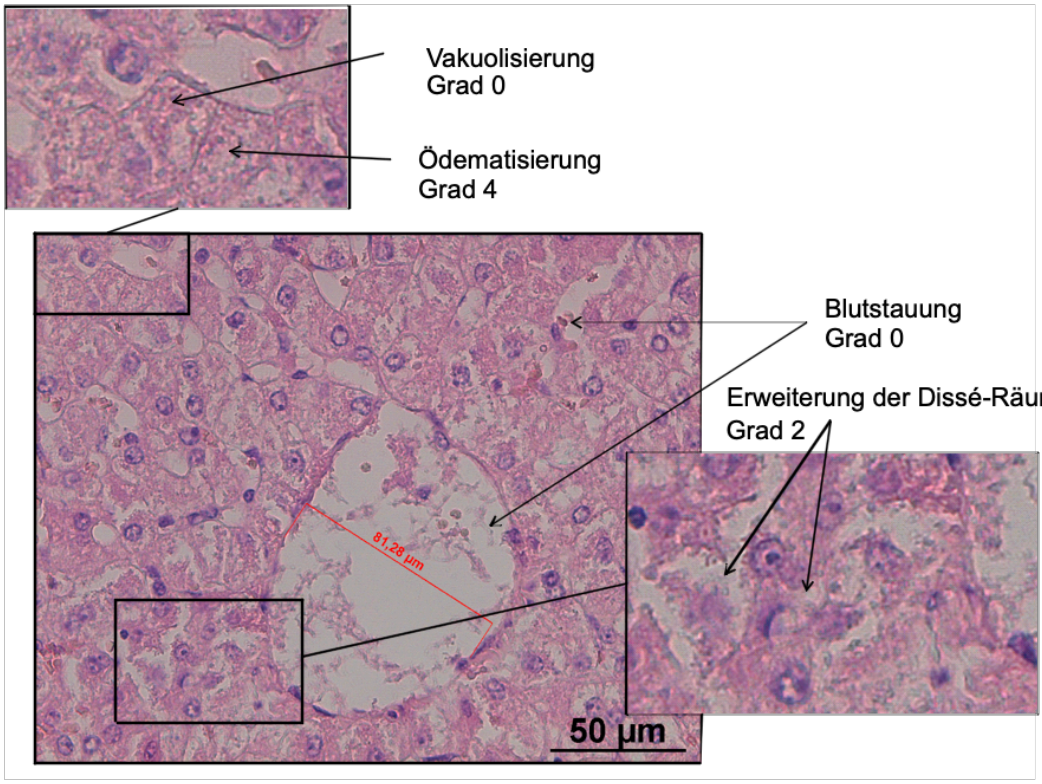


Abb. 3.10 Histologisches Bild/Gesichtsfeld eines HE-Schnittes einer Schweineleber (Tiergruppe: HOKT7,2; Tier: HOKT7,2-5) in 20facher Vergrößerung eines Binokularmikroskopes
HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie), HE: Hämatoxylin-Eosin-Methode, Zentralvenendurchmesser: 81,28 µm

Tab. 3.6 Score für die histologische Befundung von den Parametern Vakuolisierung, Ödematisierung und Blutstauung (modifiziert nach Wever (2002))

Score	**Vakuolisierung/ Ödematisierung**	**Score**	**Blutstauung**
periportal		periportal	
0	0-5 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	0	keine Stauung der *Vv.Interlobulares*
1	5-25 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	1	geringfügige Stauung der *Vv.Interlobulares*
2	25-50 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	2	mittelgradige Stauung der *Vv.Interlobulares*
3	50-75 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	3	hochgradige Stauung der *Vv.Interlobulares*
4	75-100 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)		
intralobulär		intralobulär	
0	0-5 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	0	Sinuskapillaren kaum Darstellbar
1	5-25 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	1	Sinuskapillaren deutlich Darstellbar
2	25-50 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	2	Sinuskapillaren mittelgradig Beschädigt
3	50-75 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	3	Sinuskapillaren hochgradig Beschädigt
4	75-100 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)		
zentrolobulär		zentrolobulär	
0	0-5 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	0	keine Stauung der *V.Centralis*
1	5-25 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	1	geringgradige Stauung der *V.Centralis*
2	25-50 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	2	mittelgradige Stauung der *V.Centralis*
3	50-75 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)	3	hochgradige Stauung der *V.Centralis*
4	75-100 % des Gesichtsfeldes (20fache Vergrößerung)		

Tab. 3.7 Scoreparameter Dissé-Räume und Leukozyten (modifiziert nach Wever (2002))

Score	Dissé-Räume	Score	Leukozyten pro Gesichtsfeld
periportal		periportal	
0	kein Spalt zwischen Sinus-endothel und Hepatozyt	0	<10 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
1	geringgradiger Spalt zwischen Sinusendothel und Hepatozyt	1	10-20 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
2	mittelgradiger Spalt zwischen Sinusendothel und Hepatozyt	2	20-30 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
3	hochgradiger Spalt zwischen Sinusendothel und Hepatozyt	3	30-50 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
		4	> 50 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
intralobulär		intralobulär	
0	kein Spalt zwischen Sinus-endothel und Hepatozyt	0	<10 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
1	geringgradiger Spalt zwischen Sinusendothel und Hepatozyt	1	10-20 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
2	mittelgradiger Spalt zwischen Sinusendothel und Hepatozyt	2	20-30 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
3	hochgradiger Spalt zwischen Sinusendothel und Hepatozyt	3	30-50 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
		4	>50 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
zentrolobulär		zentrolobulär	
0	kein Spalt zwischen Sinus-endothel und Hepatozyt	0	<10 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
1	geringgradiger Spalt zwischen Sinusendothel und Hepatozyt	1	10-20 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
2	mittelgradiger Spalt zwischen Sinusendothel und Hepatozyt	2	20-30 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
3	hochgradiger Spalt zwischen Sinusendothel und Hepatozyt	3	30-50 Leukozyten (20fache Vergrößerung)
		4	>50 Leukozyten (20fache Vergrößerung)

3.3.11 Mathematisch-statistische Auswertung

Die mathematisch-statistische Auswertung erfolgte mit der Statistik-Software für Windows SigmaStat 3.1s (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) und die Abbildungen wurden mit der Graphik-Software SigmaPlot 9.0 (Systat Software GmbH, Erkrath, Deutschland) erstellt.

Da es sich bei dieser Datenanalyse um nicht-normalverteilte Daten handelte, wurden nicht-parametrische Tests für den Inter- und Intragruppenvergleich angewendet. Hierfür wurden folgende Test angewendet: für den Vergleich von zwei Gruppen wurde der Mann-Whitney Rank Sum Test und für den Vergleich von ≥ 3 Gruppen der Kruskall-Wallis ANOVA (Analysis of Variance) on Ranks Test durchgeführt. An den Kruskall-Wallis ANOVA (Analysis of Variance) on Ranks Test wurde als post-hoc Test ein Tukey Test für Gruppen gleicher Größe ergänzt. Bei Korrelationstests wurde der Spearman Rank Order Correlation Test und für Intragruppenvergleiche der Friedman Repeated Measures ANOVA (Analysis of Variance) on Ranks Test angewendet.

Die P-Werte wurden ab einem Wert von kleiner als 0,05 als statistisch signifikant betrachtet.

4. Ergebnisse

4.1 Ergebnisse der histopathologischen Untersuchung und der Analyse ausgewählter serumchemischer Parameter

Folgende vier Interventionskombinationen (Abschnitt 3.1.1) werden in diesem Kapitel gegliedert und die Ergebnisse der Histopathologischen Untersuchung sowie der Analyse serumchemischer Parameter nachstehend aufgeführt.

1. Interventionskombination Azidämie und Kolloidtyp (HES versus GEL)
2. Interventionskombination Hämofiltration und Azidämie (pH-Wert 7,2 versus pH-Wert 7,4)
3. Interventionskombination alleinige Azidämie, pH-Wert 7,2 (mit versus ohne CVVH)
4. Interventionskombination Azidämie mit versus ohne Hypoxämie

4.1.1 Interventionskombination Azidämie und Kolloidtyp (Hydroxyethylstärke versus Gelatine)

In der ersten Interventionskombination wurden mögliche Unterschiede oder Gemeinsamkeiten der Kolloide HES und GEL bei den Tierversuchsgruppen KT7,2 und KT7,2 GEL untersucht und verglichen. Es zeigten sich in den Tierversuchgruppen KT7,2 und KT7,2 GEL unterschiedliche Verteilungsmuster einer histopathologisch gescorten Vakuolisierung innerhalb der Leberläppchen. In der HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) konnten im zentrolobulären Bereich signifikant mehr Vakuolen gescort werden als bei den mit 4% GEL infundierten Tieren (KT7,2 GEL). In dem zentrolobulären Bereich der Leber, der einen geringen Sauerstoffpartialdruck aufweist und in dem unter anderem die Stoffwechselvorgänge Glykolyse, Lipogenese und die Biotransformation exogener Substanzen stattfinden, wurde bei der HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) histopathologisch, verglichen mit der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL), eine zwei- bis 20-fach so hohe Vakuolisierung (mit Signifikanz) gescort (Abb. 4.1 A). Wie unterschiedlich die Ausprägung von Vakuolen entlang der hepatischen Zonierung sein kann, zeigten tendenziell die (nicht signifikanten) Ergebnisse im periportalen und intralobulären Bereich der Leberläppchen. In diesen Bereichen der Leberläppchen wurden auch unter 4% GEL-Infusion viele Vakuolen gescort. Im intralobulären Bereich konnte bei der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL) gegenüber der HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) sogar eine stärkere Vakuolisierung gescort werden (Abb. 4.1 A). Im Unterschied zu den uneinheitlichen Ergebnissen (entlang der Zonierung) im Scoreparameter Vakuolisierung, lag in der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL) in allen Zonen eine signifikant stärkere Ödematisierung vor. Durchschnittlich fanden wir bei der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL), eine im Vergleich zur HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) 1,3 bis 2-fach so starke Ödematisierung (Abb. 4.1 C-D).

Der gemessene Zentralvenendurchmesser ergab in dieser Interventionskombination für die beiden Kolloide einen signifikanten Unterschied. Die HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) zeigte einen durchschnittlichen Zentralvenendurchmesser von 50,5 µm (Mittelwert) und war somit zu dem Zentralvenendurchmesser der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL), von durchschnittlich 68,47 µm (Mittelwert), signifikant geringer (Abb. 4.1 B).
Für die Scoreparameter Dissé-Räume, Blutstauung und Leukozyteninfiltration/Leukozyten pro Gesichtsfeld ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Die Mittelwerte lagen bei den Dissé-Räumen und bei der Blutstauung bei dem Wert ±0 (Anhänge 3-6; Tab. 9.3-9.6). Eine geringe, jedoch nicht signifikant zueinanderstehende Leukozyteninfiltration mit Mittelwerten von ±1 wurde sowohl in der HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) als auch in der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL) gemessen (Anhänge 3-6; Tab 9.3-9.6).
Zusammenfassend lässt sich für die Interventionskombination Azidämie und Kolloidtyp (6% HES 130 kDa/0,4 versus 4% GEL) festhalten, dass unter Azidämie gegenüber der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL), in der HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) insgesamt weniger Hepatozyten ödematisierten und insbesondere im sauerstoffarmen Gebiet der Leber (zentrolobulär) eine deutlich stärkere Vakuolisierung stattgefunden hat. Unter Azidämie zeigten sich bei der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL) im Vergleich zu der HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2), sowohl ein größerer Zentralvenendurchmesser als auch eine tendenziell stärkere Vakuolisierung im intralobulären Bereich des Leberläppchens.
Die Analyse der biochemischen Parameter (Abschnitt 3.3.9) zeigte in dieser Interventionskombination vom ersten (BSnat) bis zum dritten (ZM) Messzeitpunkt (Abb. 3.6), also nach 4,5-stündiger Azidämiephase, lediglich geringfügige Unterschiede. Die Werte der serumspezifischen Parameter wurden bezüglich des Dilutionseffektes in Verhältnis zum Gesamtprotein (Abschnitt 3.3.9) gesetzt und sind in Tab. 4.1 und Tab. 4.2 in Prozent angegeben. In dem Zeitintervall Zwischenmessung bis Versuchsende, also nach begonnener Azidämiekorrektur, wurde ein Anstieg von Kreatinin um ungefähr 10% in der HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) und ein Anstieg von Harnstoff, ebenfalls um ca. 10%, in der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL) beobachtet. Der Parameter AST als leberunspezifisches Enzym, der nicht nur in der Leber, sondern auch in der Muskulatur (v.a. Herzmuskel) vorkommt, stieg im Laufe des Tierversuches in beiden Gruppen (KT7,2 und KT7,2 GEL) an, wobei die HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) im Vergleich zu der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL) einen stärkeren Anstieg aufwies (Tab. 4.1-4.2). Der serumchemische Parameter ALT als leberspezifisches Enzym zeigte im gesamten Verlauf des Tierversuches zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (BSnat, BSsys, ZM, VE) in der Interventionskombination Azidämie und Kolloiddyp (6% HES 130 kDa/0,4 versus 4% GEL) nahezu konstant bleibende Werte (Tab. 4.1.- 4.2).

Grafische Darstellung der Ergebnisse unterschiedlicher Scoreparameter in der Interventionskombination Azidämie und Kolloidtyp (6% Hydroxyethylstärke 130 kDa/0,4 versus 4% Gelatine)

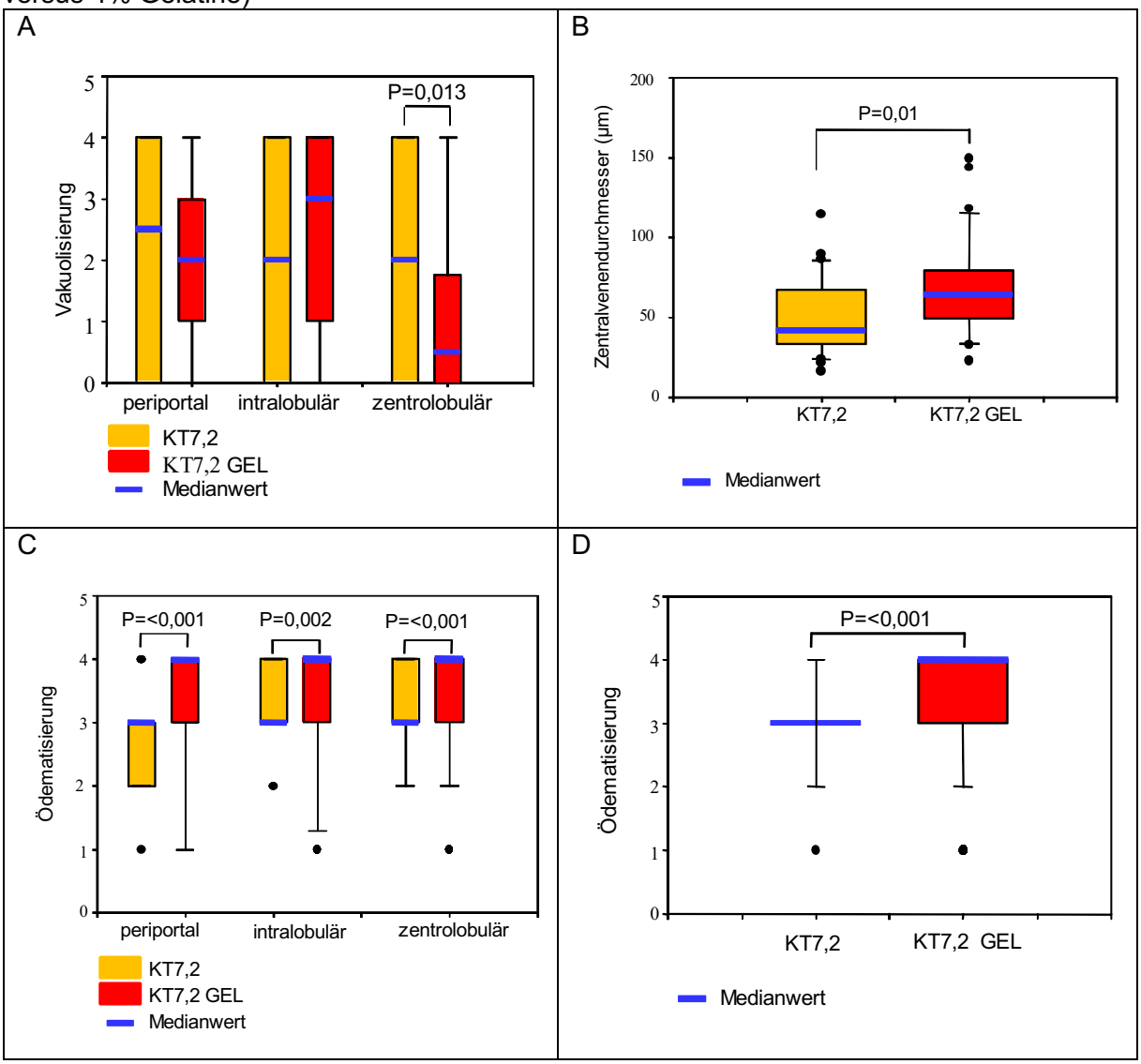


Abb. 4.1 Signifikante Unterschiede der histopathologischen Analyse der Tierversuchsgruppen KT7,2 und KT7,2 GEL bei den Scoreparametern Vakuolisierung, Zentralvenendurchmesser und Ödematisierung

Die Boxplots zeigen den Medianwert (-), Minimal (⊥)- und Maximalwerte (⊤), eine Box mit Quartilwerten von 25% und 75% (□) sowie einige Ausreißer (•) an.

A=Vakuolisierung in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, B=durchschnittliche Zentralvenendurchmesser (gemessen in µm), C=Ödematisierung in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, D=Ödematisierung, unabhängig von der hepatischen Zonierung, KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, KT7,2 GEL: Kontrolltiere mit 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, P: P-Wert (Signifikanzwert)

4.1.2 Interventionskombination Hämofiltration und Azidämie (pH-Wert 7,2 versus pH-Wert 7,4)
In der zweiten Interventionskombination wurde der mögliche Einfluss einer Azidämie bei den Tierversuchsgruppen HF7,2 und HF7,4 untersucht und verglichen. Es zeigte sich in den Hepatozyten der azidämischen Tierversuchsgruppe (HF7,2), dass bereits bei einer kurzen Azidämieexposition sowohl eine deutliche und signifikant geringere Ödematisierung als auch eine gleichzeitig tendenziell stärkere (nicht signifikante) Vakuolisierung gegenüber der Tierversuchsgruppe ohne Azidämie (HF7,4) stattgefunden hatte. Dies war unabhängig von der hepatischen Zonierung (Abb. 4.2 A-B). Da es sich bei der Vakuolisierung um keinen signifikanten Unterschied handelte, wurde auf eine graphische Abbildung verzichtet. Die Werte sind in den Anhängen 3-6 aufgeführt (Tab. 9.3-9.6).
Zusätzlich wurden in der azidämischen Tierversuchsgruppe (HF7,2) gegenüber der Tierversuchsgruppe ohne Azidämie (HF7,4) überwiegend im intralobulären sowie zentrolobulären Bereich deutlich erweiterte Dissé-Räume gefunden (Abb. 4.2 C-D).
Keine signifikanten Unterschiede konnten in den Scoreparametern Blutstauung (Mittelwert: ±0), Leukozyten (Mittelwert ±1) und Zentralvenendurchmessern (Mittelwerte beider Tierversuchsgruppen: zwischen 48,15 µm und 51,07 µm) festgestellt werden (Anhänge 3-6; Tab. 9.3-9.6).
Die Analyse der serumspezifischen Parameter ergab in der azidämischen Tierversuchsgruppe (HF7,2) ein Absinken der ALT-, LDH- und AP-Werte im Vergleich zum Gesamtprotein, während die Werte in der nicht azidämischen Tierversuchsgruppe (HF7,4) weitestgehend konstant blieben (Tab. 4.1-4.2). Allein der AST-Wert stieg in beiden Tierversuchsgruppen im Verlaufe des Versuches (also von BSnat bis VE) an.
Die Harnstoff- und Kreatininwerte werden zugunsten der Verständlichkeit in dieser Interventionskombination kausal mit den Tierversuchsgruppen ohne Hämofiltration aufgeführt. Die Kreatinin- und insbesondere die Harnstoffwerte dieser Interventionskombination (HF7,2 und HT7,4) wiesen gegenüber den anderen Tierversuchsgruppen mit Azidämie und ohne Hämofiltration (KT7,2, KT7,2 GEL und HOKT7,2) einen geringeren Anstieg auf. Somit zeigte sich, dass unter Azidämie und ohne Hämofiltration, die Kreatin- und insbesondere die Harnstoffwerte zum VE hin anstiegen. Unter der offen geführten Hämofiltration der Tierversuchsgruppen HF7,2 und HF7,4 hingegen, also zwischen den Messzeitpunkten ZM und VE (HF7,2 und HF7,4), sanken die angestiegenen Kreatinin- und Harnstoffwerte wieder ab und erreichten zum Zeitpunkt VE wieder nahezu ihre Ausgangswerte. Die nicht azidämische Tierversuchsgruppe (HF7,4) zeigte insbesondere bei den Harnstoffwerten am VE die stärkste Annäherung an ihre Ausgangswerte (Tab. 4.1-4.2).

Grafische Darstellung der Ergebnisse unterschiedlicher Scoreparameter in der Interventionskombination Hämofiltration und Azidämie (pH-Wert 7,2 versus pH-Wert 7,4)

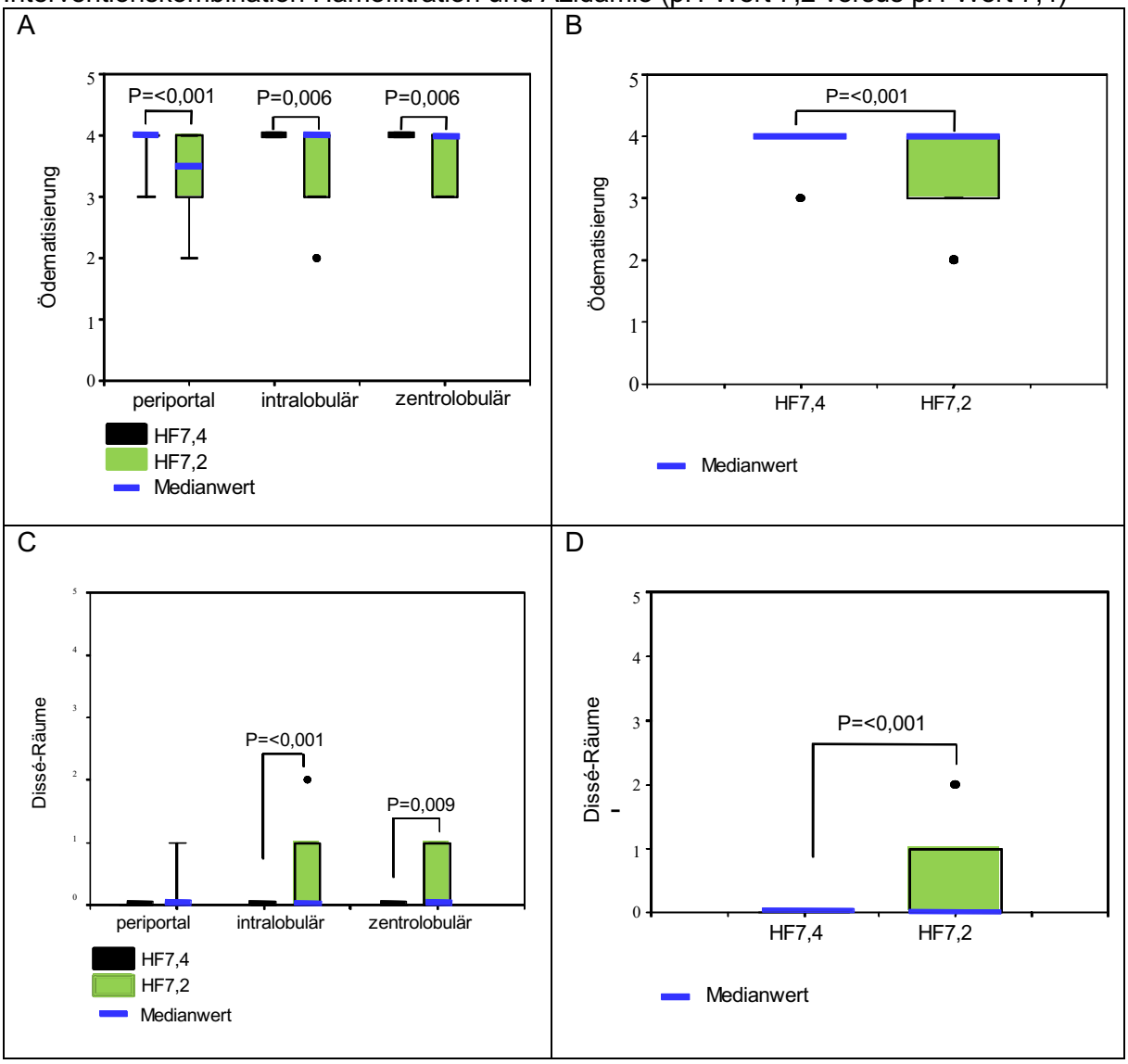


Abb. 4.2 Signifikante Unterschiede der histopathologischen Analyse der Tierversuchsgruppen HF7,4 und HF7,2 bei den Scoreparametern Ödematisierung und Dissé-Räume
Die Boxplots zeigen den Medianwert (-), Minimal- (⊥) und Maximalwerte (⊤), eine Box mit Quartilwerten von 25% und 75% ( ) sowie einige Ausreißer (•) an.
A=Ödematisierung in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, B=Ödematisierung, unabhängig von der hepatischen Zonierung, C=Erweiterung der Dissé-Räume in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, D=Erweiterung der Dissé-Räume, unabhängig von der hepatischen Zonierung, HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH, HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH, P: P-Wert (Signifikanzwert)

4.1.3 Interventionskombination alleinige Azidämie, pH-Wert 7,2 (mit versus ohne Hämofiltration)

Mit Hilfe der dritten Interventionskombination wurde sowohl ein möglicher Einfluss einer Hämofiltration (CVVH) als auch die Länge der Azidämieexposition mit den Tierversuchsgruppen KT7,2 und HF7,2 untersucht und verglichen.

Die histopathologischen Ergebnisse zeigten für die Scoreparameter Vakuolisierung, Ödematisierung und Leukozyteninfiltration (periportal, intralobulär, zentrolobulär sowie in der Gesamtsumme (unabhängig von der hepathischen Zonierung)) signifikante Unterschiede zwischen der azidämischen Tierversuchsgruppe mit Anwendung einer CVVH (HF7,2) und der Tierversuchsgruppe ohne Anwendung eines Nierenersatzverfahrens (KT7,2). Beide Tierversuchsgruppen erhielten eine identische Infusionslösung (6% HES 130 kDa/0,4) und wiesen eine mehrstündigen Azidämie mit einem konstanten pH-Wert von 7,2 auf. Der Unterschied beider Tierversuchsgruppen bestand nicht nur in der Anwendung oder dem Fehlen der Hämofiltration (CVVH) mit den zugehörigen Membraneigenschaften. Ursächlich war die Variation der Dauer der Azidämieexposition. Während die Tiere ohne Hämofiltration (KT7,2) bis zum Versuchende eine Azidämie mit einem pH-Wert von 7,2 zeigten, wurde in der Tierversuchsgruppe HF7,2 mit dem Anschluss an das offenen Hämofiltrationssystems (ab dem Messzeitpunkt ZM) die Azidämieexposition durch CVVH mit THAM auf ca. 5 Stunden verkürzt. Nach 4,5 Stunden Azidämie hatte die Therapiephase begonnen und nach ca. 30 Minuten waren die Tiere in physiologischen pH-Bereichen. Die Dauer der Azidämieexposition wurde somit in dieser Tierversuchsgruppe (HF7,2) von 6,5 auf 4,5 Stunden deutlich reduziert (Abb. 3.6).

Es zeigte sich unter längerer Azidämie nicht nur eine signifikant stärkere Vakuolisierung, sondern ebenfalls eine signifikant stärkere Blutstauung und Leukozyteninfiltration in den Hepatozyten (Abb. 4.3 A-B, E-H). Gleichzeitig zeigte sich gegenüber der Tierversuchsgruppe ohne Hämofiltration und mit längerer (6,5-stündiger) Azidämieexposition (KT7,2) bei einer reduzierten (4,5-stündigen) Azidämieexposition und Hämofiltration (HF7,2) eine deutlich geringere Ödematisierung in den Hepatozyten (Abb. 4.3 C-D).

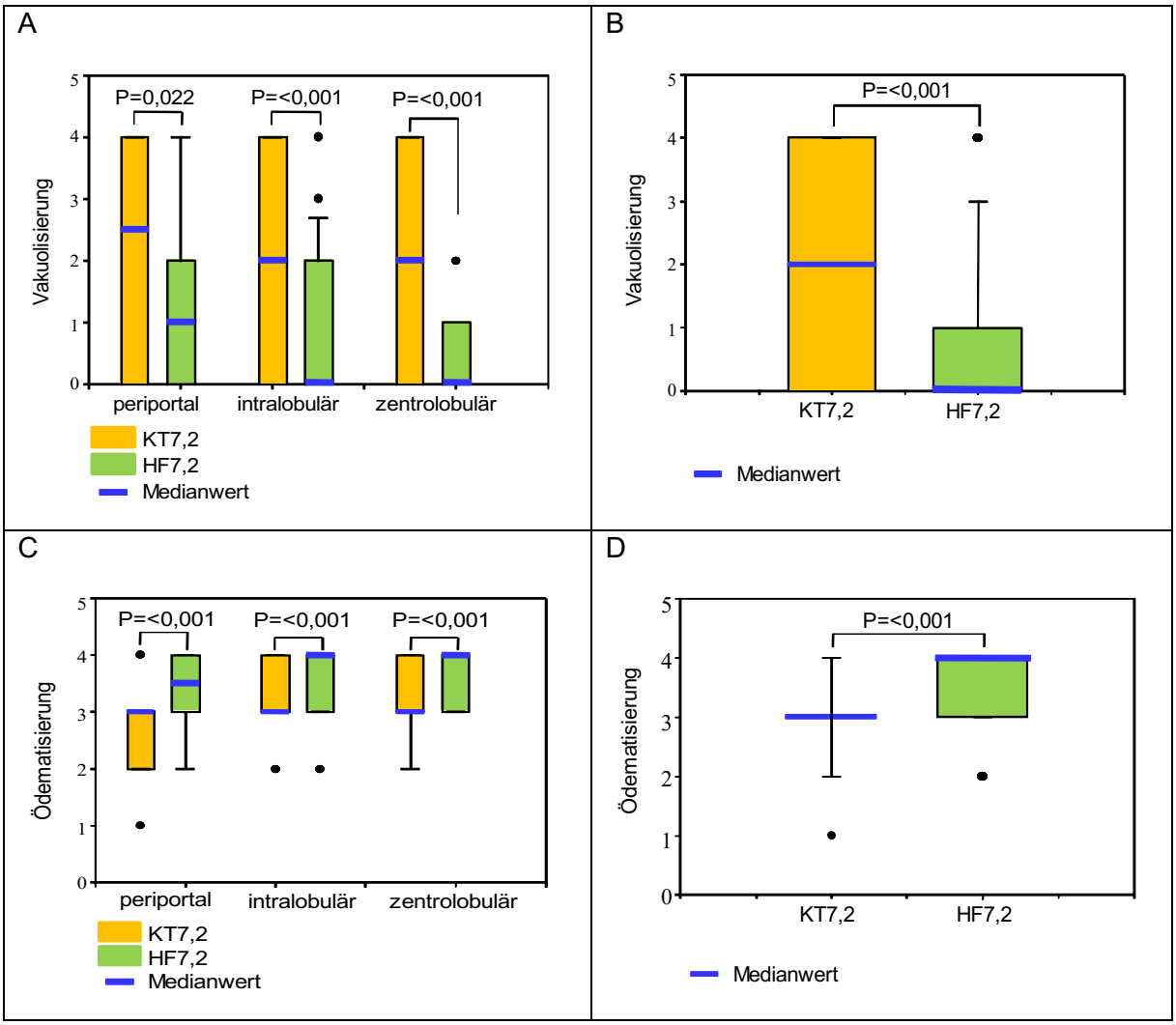
Die Untersuchung der erweiterten Dissé-Räume ergab in dieser Interventionskombination keine signifikanten Unterschiede (Anhänge 3-6; Tab. 9.3-9.6). Die gemessenen Zentralvenendurchmesser der Tierversuchsgruppen KT7,2 und HF7,2 lagen zwischen 48,15 µm und 50,50 µm (Mittelwerte) und zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Anhänge 3-6; Tab. 9.3-9.6).

Zum Zeitpunkt der Zwischenmessung (also bei gleicher Azidämieexpositionsdauer und Unterschiede in der Hämofiltration) konnte bei den serumspezifischen Parametern in dieser Interventionskombination ein ähnlicher Verlauf gemessen werden (Tab. 4.1). Unterschiedliche Tendenzen konnten bei den AST-Werten beobachtet werden. Diese stiegen bis zum Zeitpunkt

ZM bei der Tierversuchsgruppe mit Hämofiltration (HF7,2) fast doppelt so stark an, als bei der Tierversuchsgruppe ohne Hämofiltration (KT7,2). Zum Versuchsende näherten sich die AST-Werte in beiden Tierversuchsgruppen dieser Interventionskombination wieder an (Tab. 4.1-4.2). Bis zum Zeitpunkt ZM war die Dauer der Azidämieexposition in beiden Tierversuchsgruppen (KT7,2 und HF7,2) identisch und der Unterschied lag ausschließlich in der Anwendung oder der fehlenden Anwendung einer Hämofiltration (CVVH).

Deutliche Unterschiede in dieser Interventionskombination zeigten die Harnstoff- und Kreatininwerte zum Messzeitpunkt Versuchsende In der Tierversuchsgruppe ohne Hämofiltration und längerer (6,5-stündiger) Azidämieexposition (KT7,2) wurde eine deutliche Steigerung der Harnstoff- (36% höher) und Kreatininwerte (40% höher) gegenüber der Tierversuchsgruppe mit einer reduzierten (4,5-stündiger) Azidämieexposition und der Anwendung einer CVVH (HF7,2) gemessen (Tab. 4.1-4.2).

Grafische Darstellung der Ergebnisse unterschiedlicher Scoreparameter in der Interventionskombination alleinige Azidämie, pH-Wert 7,2 (mit versus ohne Hämofiltration)



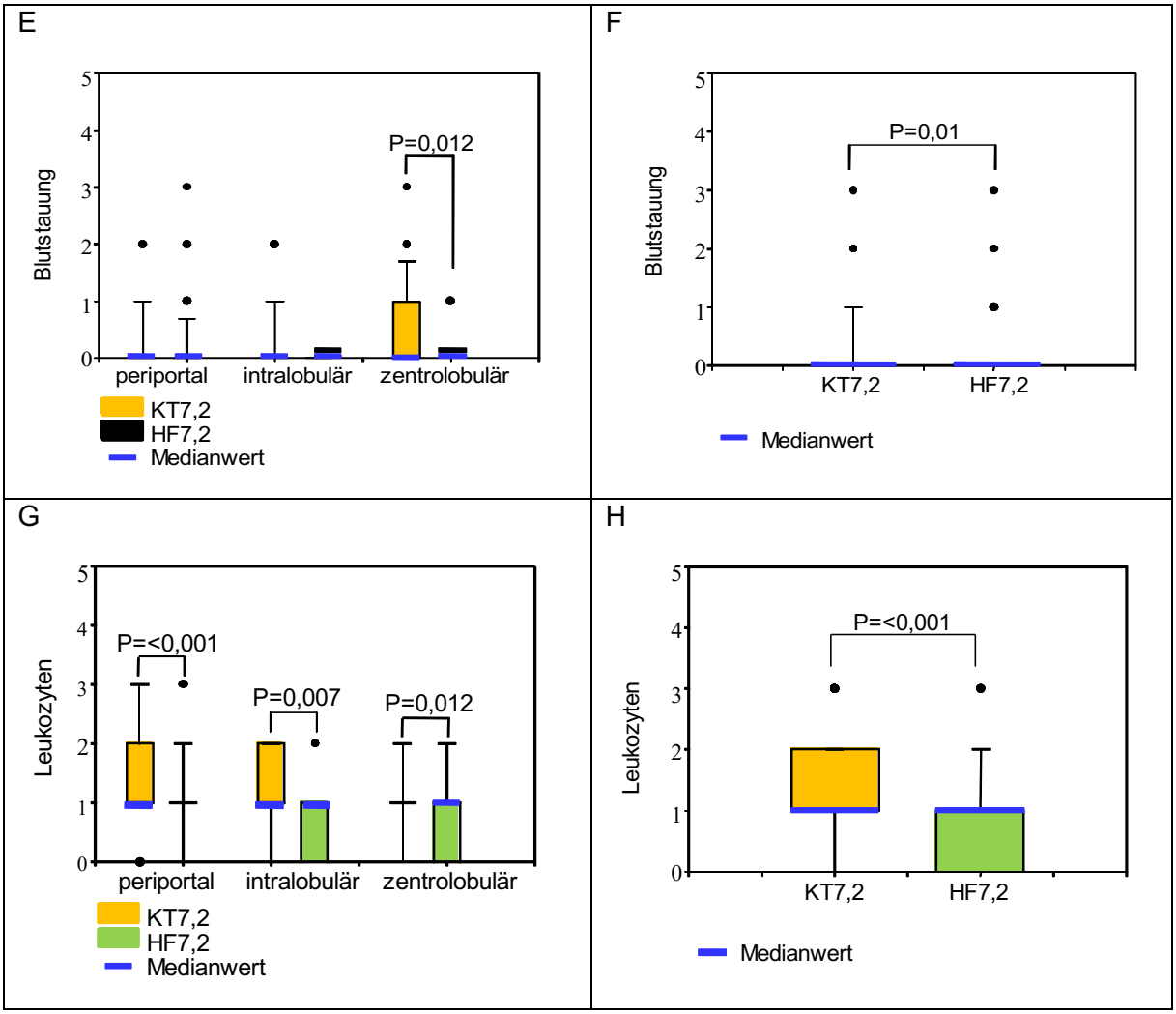


Abb. 4.3 Signifikante Unterschiede der histopathologischen Analyse der Tierversuchsgruppen KT7,2 und HF7,2 bei den Scoreparametern Vakuolisierung, Ödematisierung, Blutstauung, Dissé-Räume und Leukozyten

Die Boxplots zeigen den Medianwert (-), Minimal- (⊥) und Maximalwerte (⊤), eine Box mit Quartilwerten von 25% und 75% ( ) sowie einige Ausreißer (•) an.

A=Vakuolisierung in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, B=Vakuolisierung, unabhängig von der hepatischen Zonierung, C=Ödematisierung in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, D=Ödematisierung, unabhängig von der hepatischen Zonierung, E=Erweiterung der Dissé-Räume in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, F=Erweiterung der Dissé-Räume, unabhängig von der hepatischen Zonierung, G=Leukozyten in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, H=Leukozyten, unabhängig von der hepatischen Zonierung, HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH, KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, P: P-Wert (Signifikanzwert)

4.1.4 Interventionskombination Azidämie mit versus ohne Hypoxämie

In dieser vierten Interventionskombination wurde der mögliche Unterschied einer Hypoxämie mit den Tierversuchsgruppen KT7,2 und HOKT7,2 untersucht und verglichen.

In dieser Interventionskombination ergaben sich deutliche histopathologische Unterschiede zwischen der hier im Vergleich stehenden Tierversuchsgruppe (HOKT7,2 und KT7,2). Es zeigte sich unabhängig von der hepatischen Zonierung in der hypoxämischen Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) gegenüber der normoxämischen Tierversuchsgruppe (KT7,2) eine deutliche und signifikant stärkere Ödematisierung (Abb. 4.4 C-D). Auch eine signifikant stärkere Erweiterung der Dissé-Räume trat unabhängig von der hepatischen Zonierung in den Hepatozyten der hypoxämischen Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) auf (Abb. 4.4 E-F).

Im Unterschied dazu wurden unter Azidämie in der Tierversuchsgruppe mit normoxämischen Sauerstoffbedingungen (KT7,2) deutlich mehr Vakuolen gescort als in der hypoxämischen Tierversuchsgruppe (Abb. 4.4 A-B).

Die Blutstauung sowie die Leukozyteninfiltration konnten in dieser Interventionskombination keine signifikanten Unterschiede zeigen (Anhänge 3-6; Tab. 9.3-9.6). Der durchschnittliche Zentralvenendurchmesser lag bei den Tierversuchsgruppen dieser Interventionskombination zwischen 50,50 µm und 55,31 µm (Mittelwerte) und zeigten ebenfalls keine signifikanten Unterschiede (Anhänge 3-6; Tab. 9.3-9.6).

Die Analyse der serumspezifischen Parameter ergab folgende Ergebnisse: die Kreatininwerte in dieser Interventionskombination stiegen in der normoxämischen Tierversuchsgruppe (KT7,2) im Verlaufe des Versuches stetig an, während die Kreatininwerte in der hypoxämischen Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) bereits zum Zeitpunkt der Zwischenmessung hohe Werte aufwiesen und bis zum VE konstant hoch blieben (Tab. 4.1-4.2). Nach der Zwischenmessung begann auch in dieser Interventionskombination eine intravenöse Azidämiekorrektur mittels THAM-Puffer. Mit der Azidämiekorrektur einhergehend stand den Tierversuchsgruppen wieder ein höheres Angebot an Sauerstoff zur Verfügung (Abschnitt 3.3.4). Somit lagen zwischen den Messzeitpunkten ZM und VE in den Tierversuchsgruppen dieser Interventionskombination (HOKT7,2 und KT7,2) vergleichbare Sauerstoffbedingungen im Blut vor. Der Kreatininwert zeigte zwischen diesen Messzeitpunkten (ZM und VE) in der hypoxämischen Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) nahezu konstante Werte, während sich die Kreatininwerte der normoxämischen Tierversuchsgruppe (KT7,2) verdoppelten (Tab. 4.1-4.2). Harnstoff hingegen stieg in beiden Gruppen bis zum Versuchsende deutlich an und auch die AST-Werte zeigten im Verlauf des Versuches einen deutlichen Anstieg. Diese Ergebnisse deuten auf eine primär pH-assoziierte Entwicklung der Harnstoffsysntheserate hin und werden im anschließenden Kapitel (Abschnitt 5.) diskutiert.

Grafische Darstellung der Ergebnisse unterschiedlicher Scoreparameter in der Interventionskombination Azidämie mit versus ohne Hypoxämie

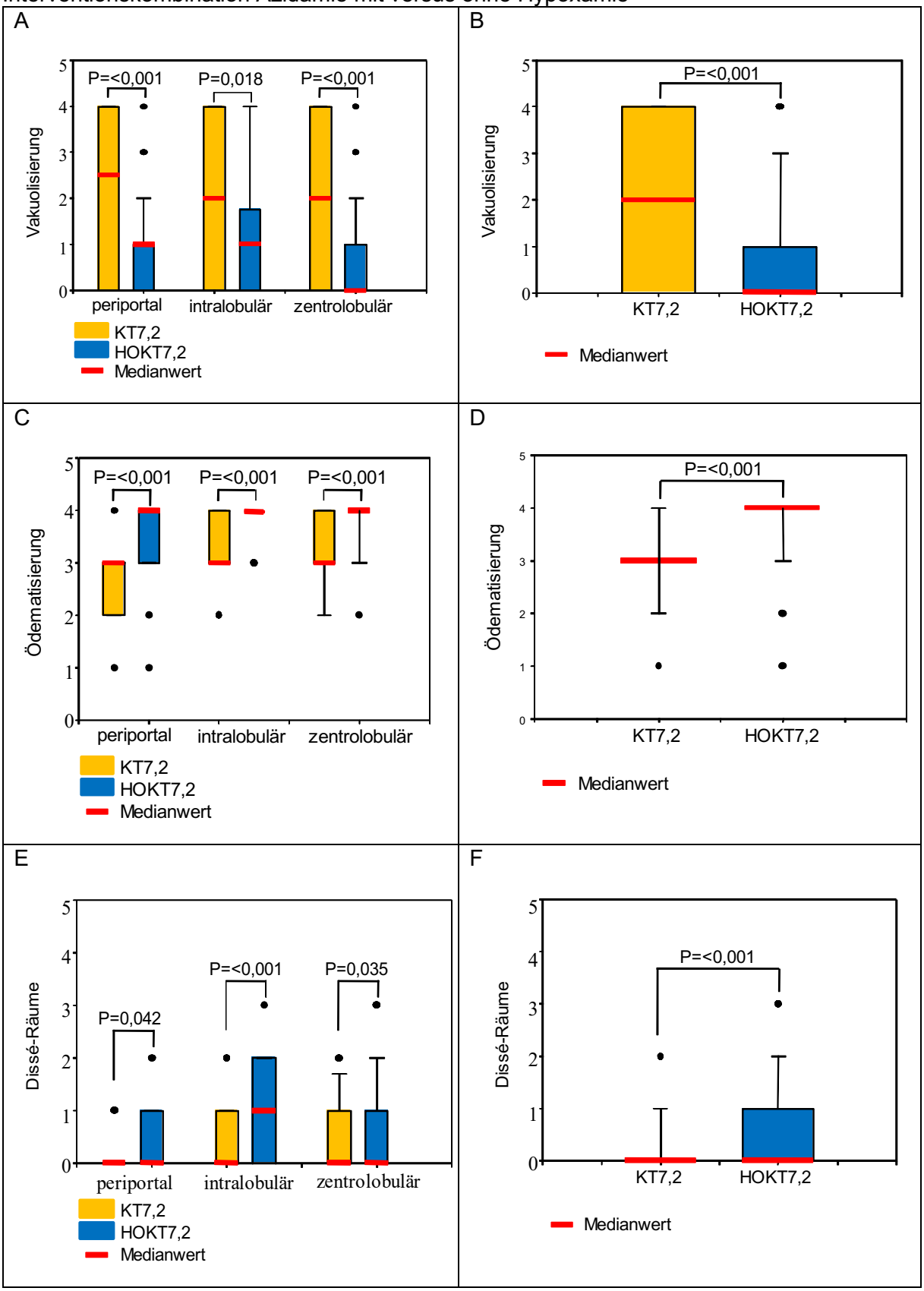


Abb. 4.4 Signifikante Unterschiede der histopathologischen Analyse der Tierversuchsgruppen KT7,2 und HOKT7,2 bei den Scoreparametern Vakuolisierung, Ödematisierung und Dissé-Räume
Die Boxplots zeigen den Medianwert (-), Minimal- (⊥) und Maximalwerte (⊤), eine Box mit Quartilwerten von 25% und 75% ( ) sowie einige Ausreißer (•) an.
A=Vakuolisierung in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, B=Vakuolisierung, unabhängig von der hepatischen Zonierung, C=Ödematisierung in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, D=Ödematisierung, unabhängig von der hepatischen Zonierung, E=Erweiterung der Dissé-Räume in unterschiedlicher hepatischer Zonierung, F=Erweiterung der Dissé-Räume, unabhängig von der hepatischen Zonierung, HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie), KT7,2: Kontrolltiere, 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, P: P-Wert (Signifikanzwert)

4.1.5 Zusammenfassung der histopathologischen und serumspezifischen Ergebnisse

Insgesamt war in allen Tierversuchsgruppen auffallend, dass in den Bereichen in denen eine starke Vakuolisierung stattgefunden hatte, der Grad der Ödematisierung entsprechend geringer ausfiel (Abb. 4.1-4.4).

Eine signifikant vermehrte Vakuolenbildung trat in Zusammenhang mit einer HES-Infusion (6% HES 130 kDa/0,4) in dieser Arbeit nur in dem sauerstoffarmen Bereich des Leberläppchens (zentrolobulär) auf. Zwar zeigten sich in der HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) im Gegensatz zu der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL) auch im periportalen Bereich des Leberläppchens eine tendenziell stärkere Vakuolisierung, allerdings konnten im intralobulären Bereich sogar für die GEL-Tierversuchsgruppe tendenziell mehr Vakuolen gescort werden als bei der HES-Tierversuchsgruppe (Abb. 4.1 A).

Auch die Länge einer Azidämieexposition schien einen entscheidenden Einfluss auf die Lebermorphologie zu haben. So zeigte sich bei keiner (HF7,4) und kurzer (4,5 Stunden) Azidämie (HF7,2) eine geringe Vakuolenbildung und bei längerer Azidämieexposition (6,5 Stunden) folglich eine signifikant stärkere Vakuolenbildung. Im Gegenzug dazu sank der Grad der Ödematisierung mit zunehmender Länge der Azidämieexposition deutlich (Abb. 4.2-4.3).

Auch die Harnstoff- und Kreatininwerte ergaben je nach Länge der Azidämieexposition unterschiedliche Ergebnisse. Es zeigte sich bei einer Azidämieexpositionslänge von mehr als 4,5 Stunden (KT7,2, KT7,2 GEL, HOKT7,2) bis zum VE sowohl für Kreatinin (geringgradig) als auch für Harnstoff (deutlich) ein Anstieg im Serum. Hingegen sanken die Harnstoff- und Kreatininwerte in den Tierversuchsgruppen mit keiner (HF7,4) oder einer kurzen (HF7,2) Azidämieexposition (≤4,5 Stunden) und mit Anwendung einer Hämofiltration (CVVH) zum VE.

Tab. 4.1 Die prozentuale Darstellung der serumspezifischen Parameter zum Messzeitpunkt Zwischenmessung

Messzeitpunkt: Zwischenmessung					
Serum-chemische Parameter	**KT7,2 (Azidämie, 6% HES 130 kDa/0,4)**	**KT7,2 GEL (Azidämie, 4% GEL)**	**HOKT7,2 (Azidämie, 6% HES 130 kDa/0,4, Hypoxämie)**	**HF7,2 Azidämie, 6% HES 130 kDa/0,4, CVVH)**	**HF7,4 (Normoxämie, 6% HES 130 kDa/0,4, CVVH)**
Gesamtprotein inklusive Albumin prozentual im Vergleich zum Ausgangswert (BSnat=100%)					
Gesamtprotein	75% 80% 81%	81% 86% 91%	73% 83% 87%	76% 78% 81%	67% 75% 80%
Albumin	74% 81% 83%	72% 78% 79%	74% 84% 86%	73% 78% 80%	68% 77% 80%
Anstieg (+) oder Abfall (-) in Relation zum Gesamtprotein					
Kreatinin	+22 +27 +28	+25 +25 +33	+34 +34 +39	+22 +28 +37	+34 +30 +42
Harnstoff	+5 +19 +25	+21 +34 +68	+21 +33 +56	+21 +20 +21	+29 +25 +29
ALT	-34 -32 -28	-36 -37 -36	-22 -18 -21	-28 -29 -30	-2 -2 -2
AST	+23 +24 +33	-13 +10 +23	+58 +77 +87	+39 +47 +70	+21 +67 +88
LDH	-40 -40 -40	-48 -49 -48	-25 -26 -28	-45 -44 -39	+3 -1 -1
AP	-32 -28 -23	-30 -30 -27	-5 -10 -3	-31 -30 -30	+6 +8 +7

Aufgrund einer diuresebedingten möglichen Veränderung der serumchemischen Parameter, wurden die Medianwerte in Relation zu der Veränderung des Gesamtproteins im Blutserum gesetzt und in Prozent umgerechnet

Medianwert 25% Quartil 75% Quartil

ALT: Alanin-Aminotransferase, AP: Alkalische Phosphatase, AST: Aspartat-Aminotransferase, CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine (4% GEL), HES: Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4), LDH: Laktat-Dehydrogenase

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH
- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2

Tab. 4.2 Die prozentuale Darstellung der serumspezifischen Parameter zum Messzeitpunkt Versuchsende

Messzeitpunkt: Versuchsende					
Serum-chemische Parameter	**KT7,2 (Azidämie, 6% HES 130 kDa/0,4)**	**KT7,2 GEL (Azidämie, 4% GEL)**	**HOKT7,2 (Azidämie, 6% HES 130 kDa/0,4, Hypoxämie)**	**HF7,2 Azidämie, 6% HES 130 kDa/0,4, CVVH)**	**HF7,4 (Normoxämie, 6% HES 130 kDa/0,4, CVVH)**
Gesamtprotein inklusive Albumin prozentual im Vergleich zum Ausgangswert (BSnat=100%)					
Gesamtprotein	77% 78% 81%	77% 78% 86%	69% 82% 89%	58% 77% 79%	69% 72% 79%
Albumin	74% 81% 82%	68% 73% 75%	68% 79% 86%	60% 73% 78%	68% 74% 78%
Anstieg (+) oder Abfall (-) in Relation zum Gesamtprotein					
Kreatinin	+34 +48 +53	+31 +36 +50	+34 +33 +52	+20 +12 +12	+6 +13 +7
Harnstoff	+34 +54 +58	+42 +66 +106	+34 +55 +68	+19 +14 +21	+2 +4 +6
ALT	-32 -30 -28	-34 -33 -36	-11 -21 -25	-15 -30 -31	-14 +2 +1
AST	+54 +69 +90	-15 +52 +129	+79 +98 +115	+59 +86 +94	+60 +90 +136
LDH	-35 -33 -27	-37 -36 -42	-21 -26 -21	-21 -35 -25	+5 -7 -3
AP	-23 -22 -13	-27 -24 -29	+2 -7 -10	-18 -29 -20	+6 +12 +8

Aufgrund einer diuresebedingten möglichen Veränderung der serumchemischen Parameter, wurden die Medianwerte in Relation zu der Veränderung des Gesamtproteins im Blutserum gesetzt und in Prozent umgerechnet

ALT: Alanin-Aminotransferase, AP: Alkalische Phosphatase, AST: Aspartat-Aminotransferase, CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine (4% GEL), HES: Hydroxyethylstärke (6% HES 130 kDa/0,4), LDH: Laktat-Dehydrogenase

Medianwert 25% Quartil 75% Quartil

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH
- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)

5. Diskussion

Im Kontext einer Nutzen/Risiko- sowie Kosten/Nutzen-Abwägung wurden diverse Studien zu Therapieerfolgen und adversen Effekten einzelner Therapiebestandteile in der Intensivmedizin durchgeführt. In der Vergangenheit lag allerdings unserer Auffassung nach die Interaktion der unterschiedlichen intensivmedizinischen Therapiebestandteile nur unzureichend im Fokus. So wurde bis heute der Schwerpunkt der Untersuchungen häufig angewendeter intensivmedizinischer Therapiebestandteile auf die Mortalitätsreduktion, insbesondere durch verbesserte Beatmungsstrategien mit tolerierter Azidose und deren potentiell positiver akuter Einzeleffekt auf die Lunge, gelegt. Unberücksichtigt blieb allerdings bislang die Frage danach, ob und/oder welche Auswirkungen eine tolerierte Azidose im Intensivpatienten auf den Gesamtorganismus haben kann. Auch mögliche Interaktionen mit anderen therapeutischen Interventionen wie beispielsweise kolloidosmotische Infusionslösungen oder eine venovenösen Hämofiltration (CVVH) wurden unserer Ansicht nach noch nicht ausreichend untersucht und werden im Folgenden diskutiert.
In dieser Arbeit wurden die Biokompatibilitätsreaktionen und Interaktionen häufig angewendeter intensivmedizinischer Therapiebestandteile im Hinblick auf die pathophysiologische und –morphologische Reaktion der Leber untersucht und im Kontext des aktuellen Forschungsstandes diskutiert. Ziel war es, mögliche Erklärungen für divergente Studienergebnisse zu einzelnen Therapieverfahren zu erkennen und Hinweise dafür zu erhalten, welche Einzelaspekte bei klinischen Studien noch berücksichtigt werden sollten.

5.1 Wahl der Versuchstiere

Gewählt wurden für diese tierexperimentelle Studie Schweine mit einem durchschnittlichen Körpergewicht von ca. 40 kg. Die Größe und das Körpergewicht wurden exakt so gewählt, da so ermöglicht werden konnte ein kommerziell erhältliches Hämofiltrationssystem sowie Beatmungsgeräte an die Versuchstiere anzuschließen, um zu dem Menschen vergleichbare hämodynamische Flussraten sowie Beatmungsmodi zu erzielen (Russ et al., 2010; Russ et al., 2011). Die zu dem Menschen vergleichbaren Blutfluss- und Filtrationsraten der CVVH haben für die bestimmten Druck- und Strömungsverhältnisse in den jeweiligen Hämofiltern eine äußerst große Relevanz und konnten beispielsweise in vergleichbaren Rattenversuchen nicht erzielt werden (Kellum & Dishart, 2002). Aufgrund dessen sind derartige Rattenversuche nicht zu einem adäquaten Vergleich zu der humanen Intensivmedizin heranzuziehen. Zusätzlich war die Versuchstiergröße für die Notwendigkeit der Anwendung vergleichbarer Beatmungsregime mit klinisch genutzter Beatmungstechnik aus der Humanmedizin von

Bedeutung. Des Weiteren fiel die Wahl auf ein Großtiermodell, um umfängliche intraindividuelle Datensätze zu den großen Organen und Funktionskreisen zu ermöglichen. Basierend auf tierexperimentell kleinen Studiengruppen spielen intraindividuelle Untersuchungen zu Kausalitäten in den pathophysiologischen Reaktionen eine wichtige Rolle bezüglich der Verlässlichkeit der gewonnenen Information.
Ein direkter genereller Vergleich zu der Humanmedizin bzw. zu der realistischen Situation eines Intensivpatienten kann jedoch nicht generalisiert aus dieser tierexperimentellen Studie gezogen werden. Diese tierexperimentelle Studie zielt darauf ab, die möglichen negativen und positiven Effekte der häufig angewendeten Therapiebestandteile in der Intensivmedizin als solche sowie deren Interaktion und gegebenenfalls Symptomursächlichkeiten zu identifizieren. Dies dient vielmehr dazu, eine Art native Referenzgruppe für klinische Studien zu generieren, da es naturgemäß in klinischen Studien keine Vergleichsstudien mit „gesunden Patienten“ geben kann.

5.2 Hauptergebnisse Morphologie

Die morphologischen Ergebnisse wurden in dieser tierexperimentellen Studie mit Hilfe einer histologischen Untersuchung *post mortem* analysiert. Zusätzlich zur Morphologie wurden auch serumspezifische *intra vitam* erhobene Marker zur Funktionsleistung und Schädigung gemäß physiologischer/pathophysiologischer Plausibilität interpretiert.
Bei der histologischen Untersuchung stellte eine Einschränkung in der Methodik die fehlende Möglichkeit dar, die Gewebeschnitte mit einem direkten Nachweis auf intrazellulär eingelagerte HES- und GEL-Moleküle zu untersuchen. Allgemein zeigte sich im Vergleich der Infusionslösungen 6% HES 130 kDa/0,4 und 4% GEL (Interventionskombination Azidämie und Kolloidtyp (HES versus GEL)) für die mit 6% HES 130 kDa/0,4 infundierten Versuchstiere zentrolobulär eine signifikant vermehrte Vakuolenbildung. Die Tierversuchsgruppe, die das Kolloid 4% GEL erhielt (KT7,2 GEL), wies insgesamt gegenüber den mit 6% HES 130 kDa/0,4 (KT7,2) infundierten Tierversuchsgruppen einen vergrößerten Zentralvenendurchmesser und eine vermehrte hepatozelluläre Ödematisierung auf.
Im Vergleich der differenten Längen einer Azidämieexposition zeigte sich, dass ohne Azidämie (HF7,4) und bei kürzerer (4,5-stündiger) Azidämieexposition (HF7,2) lediglich wenige Vakuolen gescort werden konnten, während sich bei längerer (6,5-stündiger) Azidemäeexposition (KT7,2) signifikant mehr Vakuolen in den Hepatozyten bildeten. Umgekehrt dazu fiel mit zunehmender Zeit der Azidämieeinwirkung auch der Grad der Ödematisierung in den Hepatozyten geringer aus, wobei sich paradoxerweise die Scorewerte dieses Parameters (mit Zellschäden assoziierter Parameter) in der hypoxämischen (HOKT7,2) und der nicht azidämischen (HF7,4) Tierversuchsgruppe kaum unterschieden.

Grundlegend waren in allen Tierversuchsgruppen inverse Ausprägungsverhältnisse von Ödematisierung und Vakuolisierung zu finden. Aufgrund dessen wurde in dieser tierexperimentellen Studie davon ausgegangen, dass sich, abgesehen von einer vakuolären Einspeicherung (2. Arbeitshypothese Kolloideinspeicherung), die Hepatozyten bei einer geringen Vakuolisierung und starker Ödematisierung in einem besseren Zustand befanden. Dieser verbesserte Zellzustand konnte entweder durch weniger Arbeit (1. Arbeitshypothese Schädigungsmarker) oder aber durch bessere Arbeitsbedingungen (Sauerstoffgehalt/Azidämieexpositionsdauer) entstanden sein (3. Arbeitshypothese Energieverarmung). Dieser Überlegung zur Folge entstanden drei Arbeitshypothesen, die im Folgenden diskutiert werden.

1. Arbeitshypothese Schädigungsmarker
2. Arbeitshypothese Kolloideinspeicherung
3. Arbeitshypothese Energieverarmung

Hinweis auf eine vorangegangene Arbeit zu dieser Tierstudie:
Die serumspezifischen Parameter werden in diesem Abschnitt unter der Berücksichtigung einer gesteigerten Diurese diskutiert. So zeigte sich in einer vorangegangenen Arbeit zu dieser tierexperimentellen Studie in den azidämischen Tierversuchsgruppen ohne CVVH (KT7,2 und KT7,2 GEL) gegenüber der nicht azidämischen Tierversuchsgruppe mit CVVH (HF7,4) eine gesteigerte Diurese (Anhänge 1-2; Tab. 9.1-9.2). Zusätzlich wurde im direkten Vergleich der Kolloide (6% HES 130 kDa/0,4) und 4% GEL) für die HES-Tierversuchsgruppen eine stärkere Diurese ermittelt als für die GEL-Tierversuchsgruppe. Unter Hypoxämie verringerte sich zunächst die Diurese zum Zeitpunkt der Zwischenmessung und stieg zum Zeitpunkt Versuchsende (nach Wiederherstellung der Normoxämie) wieder an (Ott, 2017).

5.2.1 Arbeitshypothese Schädigungsmarker

Um eine mögliche degenerative Leberzellschädigung zu diagnostizieren und Schädigungsmarker diesbezüglich zu bestimmen, wird in diesem Teil der Arbeit zunächst 1. eine trübe Schwellung (Ödematisierung), 2. eine vakuoläre Degeneration und 3. in eine hydropische Degeneration der Lebern der Versuchstiere differenziert. Ersteres ist dadurch charakterisiert, dass überwiegend Mitochondrien betroffen sind, oftmals eine Vergrößerung der Hepatozyten vorliegt und das Zytoplasma der Hepatozyten eine feinkörnige Beschaffenheit aufweist (Baumgärtner & Gruber, 2015). Die Ödematisierung von Hepatozyten

kann entweder durch ein Energiedefizit mit einhergehendem gestörten transmembranösen Elektrolyttransport (und in Konsequenz ein folgender Wassereinstrom in die Zellen) sowie aufgrund einer Schädigung der Zellmembran entstehen und stellt den frühesten noch reversible Zustand der hydropischen Zelldegeneration dar (Baumgärtner & Gruber, 2015). Die vakuolären Degeneration weist zusätzlich zu den von einer Ödematisierung betroffenen Mitochondrien weitere betroffene Zellorganellen wie das endoplasmatische Retikulum oder den Golgi-Apparat auf (Baumgärtner & Gruber, 2015). Der dritte Grad der Degeneration (hydropische Degeneration) hingegen ist dadurch gekennzeichnet, dass die Vakuolen das Zytoplasma ausfüllen und es zu einem Kernuntergang und somit zu einem irreversiblen Zustand der Zelle kommen kann (Baumgärtner & Gruber, 2015). Eine hydrophische Degeneration kann außerdem in ein irreversibles Stadium mit Zellnekrose führen (Eder & Gedigk, 1990).

In der hier vorgestellten tierexperimentellen Studie wird der erste Grad der Degeneration (Degenerationsgrad 1) anhand des morphologischen Erscheinungsbildes als Ödematisierung (trübe Schwellung) und der zweite Grad der Degeneration (Degenerationsgrad 2) als Vakuolisierung (vakuoläre Degeneration) definiert. Eine hydropische Degeneration (Degenerationsgrad 3) der Hepatozyten wurde infolge der histopathologischen Untersuchung in dieser tierexperimentellen Studie nicht festgestellt. Es sind also für die Diskussion der ersten Arbeitshypothese (Arbeitshypothese Schädigungsmarker) die Ödematisierung als erster sowie die Vakuolisierung als fortgeschrittener Schädigungsmarker festgelegt.

Schädigungsmarker Ödematisierung (Degenerationsgrad 1)

In dieser tierexperimentellen Studie wurde histologisch in allen Tierversuchsgruppen eine deutliche Ödematisierung in den Hepatozyten der Versuchstiere nachgewiesen (Scorewert (Median) 4: HF7,4, KT7,2 GEL, HOKT7,2, Scorewert (Median) 3,8: HF7,2, Scorewert 3 (Median): KT7,2). Führt eine solche deutliche trübe Schwellung zu einer gestörten Funktion der Mitochondrien in den Hepatozyten, so ist ein Mangel an Regulationsmechanismen und demnach eine Steigerung des Degenerationsgrades (Degenerationsgrad 2) als wahrscheinlich anzunehmen.

Es zeigte sich in dieser tierexperimentellen Studie außerdem, dass mit zunehmender Dauer der Azidämieexposition, bei gleicher Beatmung und gleicher Infusionslösung, die Ödematisierung (Degenerationsgrad 1) signifikant geringer und gegensätzlich dazu die Vakuolisierung (Degenerationsgrad 2) höher ausfiel. Je langsamer also die pH-Neutralisation erfolgte, umso mehr Hepatozyten erreichten den höheren Degenerationsgrad.

Ob die Ödematisierung mit einer erhöhten Mortalität einhergeht, wie es Wong et al. (2015) in einer Studie zu HES 130 kDa/0,4 erfasste (Studie ohne den Einfluss einer Azidämie), stand

nicht im Fokus dieser tierexperimentellen Studie und müsste daher gesondert untersucht werden. Es ist anhand der Ergebnisse der hier vorgestellten Arbeit lediglich festzustellen, dass es zu Wassereinlagerung in den Mitochondrien in Form einer Ödematisierung kam und somit eine Funktionsbeeinträchtigung der Mitochondrien mit ersten Anzeichen einer Degeneration wahrscheinlich ist.

Schädigungsmarker Vakuolisierung (Degenerationsgrad 2)

Eine hepatozelluläre Vakuolisierung fand in der Tierversuchsgruppe (HF7,4) mit einem physiologischem pH-Wert im Blut (pH-Wert: 7,4) und in der Tierversuchsgruppe (HF7,2) mit einer kurzen (4,5-stündigen) Azidämieexposition nur in geringem Maße statt, während in der Tierversuchsgruppe (KT7,2) mit längerer (6,5-stündiger) Azidämieexposition vergleichsweise deutlich und signifikant mehr Vakuolen gescort werden konnten. Es zeigte sich also in den Tierversuchsgruppen, in denen eine Ödematisierung (Degenerationsgrad 2) hoch ausfiel, eine vergleichsweise geringe Vakuolisierung. Umgekehrt (bei einer starken Vakuolisierung wurde eine vergleichsweise geringe Ödematisierung in den Hepatozyten gescort) war es ähnlich. Dies gibt Anlass zur Interpretation, dass bei keiner und kurzer Azidämieexposition die Degeneration der Hepatozyten zu Beginn (trübe Schwellung) und bei längerer Azidämieexposition bereits fortgeschritten (vakuoläre Degeneration) war. Wesentlich für diese Interpretation spricht vor allem das angeführte inverse Verhältnis im Score der beiden Degradierungsgrade Ödematisierung (Degenerationsgrad 1) und Vakuolisierung (Degenerationsgrad 2). Dieses inverse Verhältnis deutet eher auf ein voranschreitendes pathophysiologisches (degeneratives) Ereignis hin als auf zwei voneinander unabhängige pathophysiologische Phänomene wie beispielsweise eine Energieverarmung oder eine reine fremdsubstanzspezifische Substrateinspeicherung (GEL- oder HES-Vakuolen). Im Vergleich der serumspezifischen Parameter (Protein, Albumin, Harnstoff, Kreatinin, ALT, AST, LDH AP) zeigten sich, im Widerspruch zu einer azidämie-assoziierten Leberzellschädigung, zwar in der nicht azidämischen Tierversuchsgruppe (HF7,4) signifikant geringere ALT- und AP-Werte, jedoch in den Tierversuchsgruppen mit kurzer (4,5-stündiger) und längerer (6,5-stündiger) Azidämieexposition (HF7,2, KT7,2, KT7,2 GEL) signifikant höhere Harnstoff- und Kreatininwerte. Harnstoff ist ein Endprodukt des Proteinabbaues. Durch seine Elimination von Bikarbonat (HCO3-) und Ammonium (NH4+) ist es an der Regulation des Säuren-Basen-Haushaltes beteiligt (Häussinger 1990). Die geringeren Harnstoff- und Kreatininwerte in den Tierversuchsgruppen, die an ein Hämofiltrationssystem (CVVH) angeschlossen wurden (HF7,2 und HF7,4), traten in der Phase der offenen Hämofiltration auf. Sie lassen sich demnach auf die therapeutische Elimination harnpflichtiger Substanzen über die CVVH regulär

erklären. Daraus resultierend kann die Hämofiltration als primärer und die Länge der Azidämieexposition als sekundärer mutmaßlicher Auslöser für die gesunkenen Kreatinin- und Harnstoffwerte der Tierversuchsgruppen HF7,2 und HF7,4 herangezogen werden.

Bei den normoxisch azidämischen Kontrollgruppen (KT7,2 und KT7,2 GEL) stiegen unabhängig von dem kolloidalen Infusionstyp sowohl Harnstoff (Transaminierungen und Säurne-Basen-Haushalt) als auch Kreatinin (als Zeichen für einen Proteinturnover/Transaminierungen) bis zum Versuchsende kontinuierlich an. In diesen Tierversuchsgruppen lag die längere (6,5-stündige) Azidämieexposition und kein unterstützendes Filtrationsverfahren für die Elimination von Molekülen vor. Bei der hypoxämisch-azidämischen Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) lagen ebenfalls zum Versuchsende geringfügig erhöhte Harnstoffwerte vor, wobei die Kreatininwerte während des gesamten Versuch trotz geringerer Diureserate (Anhänge 1-2; Tab. 9.1-9.2) weitestgehend konstant blieben. Dies könnte plausibel (im Kontext des reduzierten O_2-Angebotes in den Hepatozyten) mit einem reduzierten Proteinstoffwechsel der Lebern stehen. Da die Niere auch als Organ ausgeprägter vakuolärer Einspeicherung von HES beschreiben wurde (Wiedermann & Joannidis, 2014), wird in dieser Diskussion eine vorangegangene Arbeit zu dieser tierexperimentellen Studie ergänzend herangezogen, die sich mit der renalen Funktion und der Nierenmorphologie unter Azidämie beschäftigte (Ott, 2017). In den Nieren einer mit HES-infundierten, nicht azidämischen Tierversuchsgruppe, wurde gegenüber einer mit 4% GEL-infundierten, nicht azidämischen Tierversuchsgruppe keine signifikant höhere Vakuolisierung der Tubuluszellen gefunden (Ott, 2017). Unterstützend zu der These, dass die Azidämie mit einer Organschädigung assoziiert sei, zeigten sich in den Tierversuchsgruppen mit keiner (HF7,4) und kurzer (4,5-stündiger) Azidämieexposition (HF7,2) zum Versuchsende tendenziell sinkende Harnstoff- und Kreatininwerte (Tab. 4.2), während in den azidämischen normoxischen Versuchsgruppen mit längerer (6,5-stündiger) Azidämieexposition (KT7,2 und KT7,2 GEL) diese Werte zum Versuchsende anstiegen. Im Unterschied dazu zeigten sich in der hypoxämisch-azidämischen Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) ebenfalls zum Versuchsende geringfügig erhöhte Harnstoffwerte, wobei die Kreatininwerte über den gesamten Versuch hinweg weitestgehend konstant blieben.

Damit ist zusätzlich durch den umfänglichen intraindividuellen Datensatz die Auswertung stärker und unterstützt die Hypothese, dass es sich bei den Vakuolen eher nicht um Speichervakuolen handelt. Auch in dem direkten Vergleich der kolloidalen Lösungen (KT7,2 und KT7,2 GEL) zeigten sich lediglich für den zentrolobulären Bereich in Zusammenhang mit einer HES-Infusion (6% HES 130 kDa/0,4) signifikant mehr Vakuolen. Ergänzend dazu zeigte sich gegenüber der mit HES (6% HES 130 kDa/0,4) infundierten Tierversuchsgruppe in der mit 4% GEL infundierten Tierversuchsgruppe im intralobulären Bereich des Leberläppchens sogar eine deutliche Tendenz einer stärkeren Vakuolisierung. Angesichts dieser Aspekte wird

folglich am ehesten vermutet, dass unter einer Azidämie eine hepatozelluläre Degeneration fortgeschritten ist. Auch die innerhalb der hepatischen Zonierung anders lokalisierte Hauptzone für eine Vakuolisierung bei den mit 4% GEL infundierten Versuchstieren unterstützt die Hypothese, dass in diesem Kontext Ödematisierung und Vakuolenbildung eher Phasen der Degeneration zeigen.

Entsprechend unserer Interpretation der Ergebnisse im Score Vakuolisierung steht auch die These von Funk et al. (2007). Diese Autoren zeigten in einer prospektiven Kohortenstudie an Intensivpatienten, dass eine Lactatazidose, Azidämie sowie eine akute Niereninsuffizienz, bedingt durch schwerwiegende Organschädigungen, mit einer erhöhten Mortalität assoziiert sind (Funk et al., 2007). Wenn die Organschäden der in dieser tierexperimentellen Studie untersuchten Schweinelebern mit einer vakuolären Degeneration und nicht mit einer Substrateinspeicherung assoziiert werden können, könnte die These durch die hier vorgestellten Ergebnisse bestätigt werden. Gegebenenfalls liegt unter Azidämie aber auch ein beschleunigter Abbau von 6% HES 130 kDa/0,4 vor (Russ et al., 2009) und damit auch eine geringere Menge die potentiell eingelagert werden kann (Abschnitt 5.5).

Auch im Hinblick auf mikrozirkulatorische Aspekte wie beispielsweise die Erweiterung des Dissé-Raumes mit Einengung der sinusoidalen Strombahn, zeigten sich in der azidämischen Tierversuchsgruppe mit CVVH (HF7,2) signifikant höher Scorewerte als für die nicht azidämische Tierversuchsgruppe mit CVVH (HF7,4). Die Ergebnisse geben Anlass zur Interpretation, dass hier ebenfalls Hinweise auf eine gestörte Zellphysiologie der Lebern, in Form einer beeinträchtigten Mikrozirkulation, in der azidämischen Tierversuchsgruppe vorliegen. Dass mit einer Azidose eine Sympathikusaktivierung assoziiert wird ist ein bekanntes Phänomen (Brofman, Leff, Munoz, Kirchhoff & White, 1990). Die mit einer Sympathikusaktivierung einhergehende portale Hypertension hat eine gesteigerte Lymphproduktion zur Folge. Dies kann zu einem Missverhältnis zwischen der Lymphproduktion und dem Lymphabfluss in der Leber führen (Sandhu & Sanyal, 2005). Die erweiterten Dissé-Räume der azidämischen Tierversuchsgruppe (KT7,2) können ursächlich durch eine vermehrte Lymphproduktion oder einen gestörten Lymphabfluss entstanden sein und unterstützten demnach die These, dass eine azidämische Stoffwechsellage einen negativen Einfluss auf die Organfunktion der Leber hat und als weiterer Schädigungsmarker zu der Ödematisierung und Vakuolisierung herangezogen werden kann.

Welche Bedeutung dem Säuren-Basen-Haushalt eines Intensivpatienten zugeschrieben werden kann, ist auch anhand der Beschreibung des Base Excess von Schaffartzik (2007) zu erahnen. Er gibt an, dass der Base Excess (beispielsweise für Traumapatienten) zur Identifikation von Patienten mit einer hohen Sterbewahrscheinlichkeit als wesentlicher Indikator definiert werden kann (Schaffartzik, 2007). Zudem konnte er zeigen, dass bei einem geringen Base Excess durch Alkalisierung mittels einer entsprechend geeigneten

Infusionslösung die Mortalität gesenkt werden kann (Schaffartzik, 2007). Unterstützend dazu zeigt sich in der hier vorgestellten tierexperimentellen Studie in der Tierversuchsgruppe mit der längeren (6,5-stündiger) Azidämieexposition (KT7,2) im Vergleich zu der azidämischen Tierversuchsgruppe mit Hämofiltration/CVVH und demnach kürzerer (4,5-stündiger) Azidämieexposition sowohl eine deutlich vermehrte Leukozyteninfiltration, als auch eine stärkere Blutstauung in den Lebern. Beide Parameter sind, wie auch die Vakuolisierung, ebenfalls als beteiligte Marker einer Organschädigung (in diesem Fall der Lebern) definiert (Huang et al., 2015; Tsubokura et al., 2010).
Die Arbeitshypothese der Schädigungsmarker zeigt also deutlich, dass der pH-Wert im Blut maßgeblich an dem Erhalt oder Zerfall der Zellmorphologie in den Lebern verantwortlich ist, da alle anderen Versuchsbedingungen identisch zueinander gewählt waren.
Die hypoxämische Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) zeigte in der hier vorgestellten Arbeit bei den Schädigungsparametern Ödematisierung und Vakuolisierung in Bezug auf eine azidämische Stoffwechsellage zu allen anderen Tierversuchsgruppen differente Ergebnisse und wird in Abschnitt 5.2.3 (Arbeitshypothese Energieverarmung) gesondert diskutiert.

5.2.2 Arbeitshypothese Kolloideinspeicherung

In dieser Arbeit ist neben der vakuolären Degeneration und dem vermuteten zellulären Energiemangel eine weitere mögliche pathopyhsiologische Reaktion für eine Vakuolisierung in Betracht zu ziehen. Hierbei handelt es sich um die Einlagerung von kolloidalen Lösungen in Form von Speichervakuolen. Während die vorübergehende vakuoläre Einspeicherung von HES-Kolloiden als gesichert gilt, wird diese bei GEL-Kolloiden, durch die kurze Verweildauer der Proteine im RES und eine gegenüber HES-Kolloiden zurückliegende Studienlage, bislang vernachlässigt (Adams, 2007). Bezugnehmend auf die Vakuolisierung existieren diverse Studien, die eine Einspeicherung der HES-Moleküle, unter anderem in den Hepatozyten, in Form von Vakuolen aufweisen (Wiedermann & Joannidis, 2014). Für die kolloidale Infusionslösung 4% GEL besteht diesbezüglich dringender Forschungsbedarf. In dieser tierexperimentellen Studie konnte gezeigt werden, dass auch in der GEL-Tierversuchsgruppe Vakuolen in den Hepatozyten auftraten (Abschnitt 4.1.1). Eine nachweisliche Abgrenzung der Vakuolen über eine Spezialfärbung erfolgte hingegen nicht (Abschnitt 5.5).
Das Kolloid 6% HES 130 kDa/0,4 wurde für diese tierexperimentelle Studie verwendet, da es das in der Intensivmedizin am stärksten frequentierte Kolloid (Reinhart et al., 2012) war und bezüglich unterschiedlicher Gründe gegenwärtig in der Kritik steht (Abschnitte 2.2.1 und 2.2.2). Das Kolloid 4% GEL wurde gewählt, da es derzeit wieder eine häufig genutzte Alternative zu dem kritisch betrachteten Kolloid HES darstellt. Außerdem haben vorangegangene Arbeiten zur Modelletablierung dieser tierexperimentellen Studie gezeigt, dass die Kolloide 6% HES

130 kDa/0,4 und 4% GEL keinen messbaren Unterschied auf den Säuren-Basen-Haushalt aufweisen (Esche et al., 2008), wohl aber einen unterschiedlichen Einfluss auf die Biokompatibilitätsreaktionen auf eine CVVH zeigen (Unger et al., 2006).

Im direkten Vergleich von 6% HES 130 kDa/0,4 und 4% GEL (1. Interventionskombination Azidämie und Kolloidtyp (KT7,2 versus KT7,2 GEL)) wurden in beiden Tierversuchsgruppen periportal und zentrolobulär hohe Scorewerte für die Vakuolisierung detektiert. Intralobulär konnten jedoch, entgegen der anzunehmenden Vernachlässigung der vakuolären Kolloideinspeicherung von GEL-Molekülen, in der GEL-Tierversuchsgruppe tendenziell mehr Vakuolen gescort werden (Abschnitt 4.1.1). Ein signifikanter Unterschied wurde allerdings nur im zentrolobulären Bereich des Leberläppchens gemessen und zeigte in der HES-Tierversuchsgruppe (KT7,2) gegenüber der GEL-Tierversuchsgruppe (KT7,2 GEL) eine stärkere Vakuolisierung. Ursächlich für die substratspezifische Lokalisation der Einspeicherung innerhalb des Leberläppchens könnte die hepatische Zonierung des Molekülabbaus sein. Zentrolobulär finden die Stoffwechselprozesse statt, die einen niedrigen Sauerstoffbedarf benötigen, wie es beispielsweise bei der Glykolyse der Fall ist. Da es sich bei 6% HES 130 kDa/0,4 um Stärke, also ein Kohlenhydrat handelt, wird hier der Abbau durch eine Glykolyse vermutet und folgend diskutiert. Der genaue Abbau der HES-Moleküle ist allerdings noch gänzlich unbekannt. So schreiben Jungheinrich et al. (2002), dass HES bereits plasmatisch durch die α-Amylase im Blut abgebaut werde. Wiedermann & Joannidis (2014) konstatieren hingegen, dass die Metabolisierung von Stärke auch lysosomal durch die α-Glukosidase vollzogen werde, es aber noch unerforscht sei, in welchem Umfang HES auf diesem Wege abgebaut werde. Die lange Verweildauer von HES sei in den Zellen jedoch ein Indiz dafür, dass ein Abbau der HES-Moleküle (sofern er auch intrazellulär vorkommt) eher uneffektiv von statten gehen würde (Jungheinrich et al., 2002; Wiedermann &Joannidis, 2014). In der Leber gilt die lysosomale, vakuoläre Einspeicherung von HES-Molekülen in die Kupfferschen Sternzellen und Hepatozyten als gesichert (Christidis et al., 2001). Bei einer wiederholten Infusion mit einem HES-Kolloid konnte dies bei Patienten mit chronischen Leberschädigungen sogar zu einer Verschlechterung der Organfunktion bis hin zu einem Leberversagen führen (Christidis et al., 2001). In den Kupfferschen Sternzellen/sinusoidalen Zellen konnten in dieser tierexperimentellen Studie jedoch keine vakuolären Morphologien erkannt werden. Es konnte in dieser tierexperimentellen Studie ausschließlich bestätigt werden, dass das Kolloid 6% HES 130 kDa/0,4 gegenüber dem Kolloid 4% GEL nur für den zentrolobulären Bereich der Leberläppchen eine signifikant stärkere hepatozelluläre Vakuolisierung zeigte. Insgesamt deutet also das Ergebnismuster darauf hin, dass die Vakuolenbildung eher im Rahmen einer zellulären Schädigung erfolgte und es sich bei den Vakuolen wahrscheinlich nicht um Kolloid-Speichervakuolen handelte.

5.2.3 Arbeitshypothese Energieverarmung

Die dritte Arbeitshypothese unterstützt die These, dass genau dort, wo eine hohe Stoffwechselaktivität in den Zellen stattgefunden hat, auch eine vermehrte Vakuolenbildung zu finden war und dementsprechend an Orten mit weniger Vakuolen und sehr starker Ödematisierung eine Form der Energieverarmung vorlag. So zeigten sich in den Hepatozyten der hypoxämischen azidämischen Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) im Vergleich zu denen der normoxämischen azidämischen Tierversuchsgruppe (KT7,2), bei gleichem Tidalvolumen („low tidal volume ventilation“) und gleicher kolloidaler Infusionslösung (6% HES 130 kDa/0,4), eine signifikant stärkere Ödematisierung und gleichzeitig signifikant geringere Vakuolisierung. Es konnte also gezeigt werden, dass eine Hypoxämie, also eine Reduzierung des PaO2 unter 70 mmHg (inklusive einer Reduzierung der Atmungsfrequenz) zu weniger Vakuolen (in dieser Arbeitshypothese voraussichtlich weniger Stoffwechselaktivität), allerdings zu einer vermehrten Ödematisierung (Mitochondrienschwellung) und zusätzlich zu einer Erweiterung der Dissé-Räumen in den Lebern der Versuchstiere geführt hatte.

Aufgrund einer starken Ödematisierung (trübe Schwellung) in dieser tierexperimentellen Studie wird angenommen, dass die mitochondriale Stoffwechselleistung in den Hepatozyten beeinträchtigt war. So war der aerobe Mechanismus der Atmungskette/oxidativen Phosphorilierung unter Umständen gestört und es fiel demzufolge weniger ATP in den Zellen an. Auch die in den Mitochondrien stattgefundene ß-Oxidation und der Citratzyklus unterlagen mit großer Wahrscheinlichkeit einer entsprechenden Reduzierung.

Nicht nur ein absoluter Sauerstoffmangel in den Hepatozyten der hypoxämischen azidämischen Tierversuchsgruppe (HOKT7,2), sondern auch ein in Relation zur erbrachten Stoffwechselleistung angenommener relativer Sauerstoffmangel in der normoxämischen azidämischen Tierversuchsgruppe (KT7,2), wird angenommen. Die einzelne Leberzelle konnte also entweder mit Reduktion der Stoffwechselleistung reagieren, um eine zelluläre Degeneration zu verlangsamen, oder aber die Leistung der Energiebereitstellung und die Einstellung der Plasmahomöostase weiter erbringen und als Folge schrittweise schneller degenerieren. Ergänzend wurde in der Literatur für die Einlagerung kolloidaler Infusionsmoleküle, entgegen der Arbeitshypothese Kolloideinspeicherung, bislang nur eine Vakuolisierung und nicht eine Ödematisierungen von Hepatozyten beschrieben. Daher wird neben den Arbeitshypothesen Kolloideinspeicherung und Schädigungsmarker hier in Bezug auf eine hepatozelluläre Ödematisierung die Hypothese eines beginnenden Energiemangels gestellt und es entstanden dazu folgende Überlegungen:

Der durch die Ödematisierung induzierende ATP-Mangel in den Mitochondrien sorgt dafür, dass der Hepatozyt vermehrt Glukose verstoffwechselt. Für die Bedienung seines ATP-Bedarfs steht dem Hepatozyten daraufhin ausreichend Glukose zur Verfügung (Glykogenolyse) und durch eine Aktivierung des Enzyms 6-Phosohofruktokinase wird in Folge

die Glykolyse, im Sinne einer auseichenden heaptozytären Energieversorung, gesteigert. Es entstehen also vermehrt Pyruvat und über ein Einschleusen in den Citrat- Zyklus bzw. die Atmungskette kann erneut Energie (ATP) bereitgestellt werden. Durch die gesteigerte Glykolyse fällt als regulative Maßnahme der Zelle über Folgeschritte wieder Energie in Form von ATP an. Da in einer azidämischen Stoffwechsellage der Glukoseumsatz ohnehin insgesamt im Rahmen der anaeroben Energiegewinnung steigt, wird zum einen HES voraussichtlich bei seiner Degradation zum protrahierten Glukoselieferant (Russ et al., 2009) und zum anderen fallen vermehrt Endprodukte der Glykolyse, wie Pyruvat und Laktat, an. In allen normoxämischen Tierversuchsgruppen blieben die Laktatwerte im physiologischen Bereich (Anhänge 7-8; Tab. 9.7-9.8). Da sowohl Milchsäure infundiert wurde als auch aufgrund der Azidämie vermehrt endogen Laktat anfiel, deutet der durchgehende Normbereich der Laktatkonzentration darauf hin, dass die hepatische Kapazität für den Laktatabbau nicht überschritten wurde und stets ausreichend O_2 zur Verfügung stand. Im Umkehrschluss ist eine generalisierte Energieverarmung der Hepatozyten in den normoxämischen Tierversuchsgruppen eher unwahrscheinlich. Umgekehrt sinkt bekanntermaßen die Laktatclearance bei einem unzureichenden Sauerstoffangebot in der Leber. In Übereinstimmung dazu zeigte die hypoxämisch azidämische Tierversuchsgruppe (HOKT7,2) bis zum Zeitpunkt der Zwischenmessung Laktatwerte oberhalb der physiologischen Grenze.
An dieser Stelle der Argumentationskette stellt sich die Frage, warum die Hepatozyten der hypoxämischen azidämischen Tierversuchsgruppe dann nicht zusätzlich zur Ödematisierung auch eine ausgeprägte Vakuolenbildung als Zeichen der stärkeren, vorangeschrittenen Degeneration aufwiesen. Dies lässt sich damit erklären, dass die Zellen im Falle eines absoluten Sauerstoff– und Energiemangels die Stoffwechselaktivität reduzieren, wie es das kumulierende Laktat und der stagnierende Kreatiningehalt im Blut (reduzierter Proteinstoffwechsel) in dieser tierexperimentellen Studie bereits indizierten. Im Umkehrschluss würde dies bedeuten, dass bei ausreichender Energieversorgung die Stoffwechselleistung der Leber zum Erhalt des physiologischen Säuren-Basen-Gleichgewichts und der Plasmahomöostase aufrechterhalten wird. Dabei wird die Degeneration durch eine kontinuierlich hohe Stoffwechselleistung und damit einhergehenden überlasteten Hepatozyten in gewissem Umfang toleriert. Die morphologischen und *intra vitam* Ergebnisse dieser tierexperimentellen Studie stehen im Einklang mit dem Prinzip einer Funktionspriorisierung im Rahmen pathophysiologischer Kompensation mit dem Ziel, den Organismus und die Organfunktion so lange wie möglich zu erhalten. Dafür spricht auch, dass keine Degenrationen dritten (irreversiblen) Grades gefunden wurden, sondern mit zunehmender Dauer der Azidämieexposition sich nur die Anzahl der vakuolisierten oder der ödematisierten Hepatozyten änderte und sich damit immer noch und in allen

Tierversuchsgruppen dieser tierexperimentellen Studie reversible Grade einer Degeneration zeigten.

Zusätzlich zu der mit einer Energieverarmung in Zusammenhang gebrachten starken Ödematisierung und geringen Vakuolisierung zeigten sich im Vergleich zu der normoxämischen azidämischen Tierversuchsgruppe sowohl eine Erweiterung der Dissé-Räume als auch höhere Enzymwerte (AST, ALT, LDH, AP) in der hypoxämischen azidämischen Tierversuchsgruppe (HOKT7,2). Die Erweiterung der Dissé-Räume kann zu einem Ungleichgewicht der Lymphproduktion und somit zu einer gestörten Mikrozirkulation in den Lebern führen (Sandhu & Sanyal, 2005). Die mit einer Hypoxämie einhergehenden steigenden Enzymwerte geben also Anlass zur Interpretation, dass unter Hypoxämie eine Energieverarmung mit selbstregulierenden Stoffwechselprozessen, einhergehend mit erhöhter Enzymausschüttung, insbesondere zum Versuchsende vorlag (Tab. 4.1 und Tab. 4.2).

Eine durch die Hypoxämie Fverstärkte Infiltration mit einer verspäteten Apoptose von Leukozyten, wie es Hannah et al. (1995) beschreiben, konnte in unserem Versuch nicht festgestellt werden.

5.3 Extrapolativer Ausblick auf die potentielle Bedeutung der tolerierten Azidose auf die Ernährung des kritisch Kranken

Die Ernährung kritisch kranker Patienten stellt nach wie vor eine umfängliche Problematik dar. Eine Schwierigkeit der enteralen Ernährung ist eine mögliche unzureichende Magen-Darm-Funktion des Intensivpatienten, während eine Schwierigkeit in der parenteralen Ernährung eines Intensivpatienten eher in einer unphysiologischen Zusammensetzung der Nahrungsbestandteile und der Substratroute begründet ist. Bei der parenteralen Ernährung kollidiert das klinisch nötige hämodynamische Infusionsvolumen häufig mit der möglichen Kaloriendichte und der Substratwahl. Bezüglich der enteralen Ernährung wird wiederholt davon berichtet, dass bei kritisch Kranken davon auszugehen ist, dass durch gastrointestinale Komplikationen oder aber durch eine Unterbrechung der enteralen Ernährung nur ca. 50 % der verordneten Kalorien effizient enteral zugeführt werden (Leitlinie parenterale Ernährung der DGEM; aktueller Stand Mai 2007, überarbeitet 2013).

Die hier vorgestellten Ergebnisse belegen in allen Versuchstieren mehr oder minder ausgeprägte pathologische Auffälligkeiten in den Lebern. Eine Azidose induziert eine katabole Stoffwechsellage welche von Patienten mit einem chronischen Nierenversagen hinreichend bekannt ist (Wang & Mitch, 2014). Unter Berücksichtigung des enterohepatischen Kreislaufes und der möglichen multifaktoriellen hepatozellulären Pathologien ist die Diskussion über eine

Korrektur des Säuren-Basen-Haushaltes für eine verbesserte parenterale Ernährung mit bestenfalls positiver Beeinflussung der Beschaffenheit der Hepatozyten, und somit mit einem verbesserten physiologischen Gesundheitsstatus des Intensivpatienten, äußerst wichtig.

5.4 Modelldiskussion

Die Lebern der Versuchstiere wiesen nach histopathologischer Untersuchung in dieser tierexperimentellen Studie aufgrund der Unterschiede in der Hämodynamik, der pH-Homöostase, der O_2-Versorgung und im Energiebedarf unterschiedliche Schädigungsgrade auf. Nicht nur die Wahl der Infusionslösung (Abschnitt 4.1.1) wie oftmals in der Literatur beschrieben (Abschnitt 2.2), sondern auch die Länge der Azidämieexposition (Abschnitte 4.1.2 und 4.1.3) und das Beatmungsregime (Abschnitt 4.1.4) zeigten einen entscheidenden Einfluss auf die Lebermorphologie. Die Gesamtdatenlage (*intra vitam* Parameter und histopathologische Untersuchung der Lebern) weist auf hochgradig stoffwechselaktive Leberzellen hin, die mit der Regulation der Plasmahomöostase (kolloidosmotischer Druck, Substratkonzentrationen, pH-Homöostase, Energiehaushalt) anteilig schnell geringe Grade einer Degeneration zeigten. Die Gegenüberstellungen der verschiedenen Tierversuchsgruppen (Interventionskombinationen) lassen vermuten, dass dort, wo die Hepatozyten selbst ausreichend mit Energie versorgt wurden, auch die größte Aktivität für den Gesamtstoffwechsel und damit auch für den gesamten Organismus vorlag. Diese hohe Stoffwechselaktivität mündete in einer vergleichsweise größeren Rate an vakuolären Hepatozyten und damit stärker degenerierten Zellen als bei den Tieren, deren Leber weniger O_2 und/oder Glucose (Hxpoxämie- und GEL-Tierversuchsgruppe) für den eigenen Energiebedarf zur Verfügung gestellt bekamen. Es wird somit angenommen, dass ein offensichtlich reduzierter Stoffwechsel die hepatozytäre Schädigung verlangsamte. Auf Basis der erhobenen Daten bleibt offen, ob eine höhere Stoffwechselaktivität in der Leber mit einem häufiger vorkommenden Leberschaden/-versagen assoziiert werden kann oder ob die gedrosselte Stoffwechselaktivität mit einer langsameren Leberzelldegenration über eine unzureichende allgemeine Stoffwechselleistung des Gesamtorganismus letztlich den größeren Schaden mit einem möglichen finalen Multiorganschaden darstellt. Die Klärung dieser Fragestellung sollte Gegenstand zukünftiger Studien sein.

5.5 Validität des Tiermodells

Junge Schweine besitzen im Kontext mit ihrer Schnellwüchsigkeit (ca. 100 kg KM in 6 Monaten) und dem hohen Muskelmasseanteil eine Stoffwechselrate, die im Vergleich zum

Menschen sehr hoch ist. Somit liegt bei dieser Spezies unter Nahrungskarenz, wie hier vom Vorabend bis zum Abend des Versuchstages (insgesamt 24 Stunden), eine ohnehin stärkere katabole Stoffwechsellage vor, als es beim Menschen der Fall wäre. Es ist also bei den Versuchstieren davon auszugehen, dass sich die katabolen Effekte der Azidämie voraussichtlich etwas schneller auf den Organismus auswirkten als dies beim Menschen der Fall wäre. Daher sollten die proteinstoffwechselrelevanten Parameter wie Kreatinin (Tab.4.1 und Tab. 4.2) hinsichtlich ihrer Absolutwerte nicht direkt mit denen des Menschen verglichen werden. Dennoch ist das junge Schwein gerade aufgrund dieser physiologischen Eigenschaft geeignet, um in (vergleichsweise kurzen) tierexperimentellen Studien prognostisch relevante Informationen für die längeren Zeitspannen beim kritisch kranken Patienten zu erhalten.

Der Einsatz eines rezirkulierenden Nierenersatzverfahren mit Rückführung aller eliminationspflichtigen Substanzen und (im Rahmen der Biokompatibilitätsreaktion) aktivierten Parameter stellt seinerseits eine beschleunigte Entwicklung pathophysiologischer Reaktionen dar.

Eine Schwäche der Arbeit weist die fehlende Untersuchung der Inhalte der Vakuolen auf, durch die eine Differenzierung zwischen Speichervakuolen und einer vakuolären Degeneration möglich gewesen wäre. Verschiedene Indizien sprechen dafür, dass die in der porcinen Leber beobachteten Vakuolen in dieser Arbeit am wahrscheinlichsten mit einer vakuolären Degeneration assoziiert waren. Zum einen zeigen Anhaltspunkte dafür, dass auch in der GEL-Tierversuchsgruppe (intralobulär sogar gegenüber 6% HES 130 kDa/0,4 vermehrt) Vakuolen gescort werden konnten und zum anderen, dass mit zunehmender Zeit der Azidämieexposition, auch mehr Vakuolen mit gleichzeitig wenig Ödematisierung nachgewiesen werden konnten (Abschnitte 5.2.1-5.2.2).

Die Organproben für die histologische Untersuchung wurden nach Beendigung des Tierversuches entnommen und sind somit nur für den Zustand *post mortem* bzw. nach insgesamt 10 Stunden Tierversuch (ab Beginn der Anästhesie bis Versuchsende (Abb. 3.6)) unter Beeinflussung der unterschiedlichen Behandlungsregime zu bewerten. In welcher Phase des Tierversuches die hepatozelluläre Degeneration begonnen hat oder ob sich diese gegebenenfalls im Laufe des Tierversuches wieder regulierte, ist ein wichtiger zweiter kritisch zu bewertender Diskussionspunkt, der durch diese Arbeit nicht beantwortet werden kann. Es wäre demnach zielführend, in einem Folgeversuch in wiederholten Abständen während des Versuches Biopsien der entsprechenden Organe zu entnehmen, histopathologisch zu untersuchen und miteinander zu vergleichen. Dagegen spricht allerdings, dass eine Laparoskopie ein weiterer Einflussparameter auf den Gesamtorganismus ist und eine Vergleichbarkeit für den individuellen Intensivpatienten so geschmälert werden würde.

Ein dritter diskussionswürdiger Aspekt der Modellbewertung ist die Dauer der Azidämieexposition bzw. die Tierversuchslänge. So stellt sich die Frage, wenn von einer

hepatozellulären Degeneration auszugehen ist, ob mit einer verlängerten Azidämieexposition auch der dritte Grad der Degeneration, also die ballonierende Zelldegeneration, eingetreten wäre und demnach eine Azidämie assoziierte Organschädigung, wie Funk et. al (2007) es publizierten, vorläge bzw. bestätigt werden würde. In diesem Modell war es nicht möglich die Versuchsdauer zu verlängern, da bereits in der Modelletablierung gezeigt werden konnte, dass mit zunehmender Zeit immer mehr Tiere eine erhöhte Sterbewahrscheinlichkeit mit verschlechterter Kreislaufstabilität und notwendige Reanimierung aufwiesen (Russ et al., 2011). Da die (erfolgreichen) Reanimierungen jedoch die standardisierte Situation eines Intensivpatienten, wie wir sie in dieser tierexperimentellen Studie zeigen wollen, verfälscht hätten, musste der Einzelversuch je Tier auf insgesamt 10 Stunden (Abb. 3.6) limitiert werden. Es ist aufgrund der Kürze der Versuchsdauer umso erstaunlicher, dass bereits extrem kurze Zeitspannen einer Azidämieexposition von 4,5 und 6,5 Stunden zu ersten Degenerationserscheinungen in der Leber führten.

6. Zusammenfassung

Eine forschungsrelevante Schwierigkeit hinsichtlich der objektivierten Vergleichbarkeit von klinischen Studien stellen die multimodalen Therapien in der Intensivmedizin dar. Die Variabilität von einzelnen Therapiebestandteilen wie Beatmungsmanagement, Nierenersatzverfahren und Infusionsmanagement ist sowohl im eingeschlossenen Patientengut als auch generell zwischen Kliniken sehr hoch. Bislang wurde darauf jedoch nicht näher eingegangen. Auch die Azidämie im klinisch tolerierten Bereich (bis zu einem arteriellen pH-Wert von 7,2) stellt, als ein potentiell maßgeblich einflussnehmender Parameter für Organversagen und Mortalität, einen noch unzureichend erforschten Aspekt dar. In der hier vorgestellten tierexperimentellen Studie an Schweinen (n=29) zeigten sich in allen Tieren bereits nach wenigen Expositionsstunden prägnante Auffälligkeiten der Lebern mit Leberzellschädigungen in Form histologischer Pathologien und veränderter serumspezifischer Werte.

Durch die Unterteilung der möglichen, verschiedenen Interventionskombinationen konnte folgendes untersucht werden:

1. der unter Azidäme potentiell unterschiedliche Einfluss von 6% Hydroxyethylstärke 130 kDa/0,4 (HES) und 4% Gelatine (GEL),
2. die durch die Azidämie potentiell veränderte Biokompatibilitätsreaktion auf eine venovenöse Hämofiltration
3. der Einfluss einer bisweilen zusätzlich zur Azidämie tolerierten Hypoxämie im Rahmen der lungenprotektiven Beatmung

Es zeigte sich, dass die Wahl der Infusionslösung einen relevanten Einfluss auf die Lebermorphologie hat. So ließen sich bei der ersten Interventionskombination (Interventionskombination Azidämie und Kolloidtyp HES versus GEL) in der HES-Tierversuchsgruppe zentrolobulär vermehrt Vakuolen und in der GEL-Tierversuchsgruppe, unabhängig von der hepatischen Zonierung, eine signifikant stärkere Ödematisierung feststellen. Die bei mit Gelatine infundierten Tieren auffallende, signifikant stärkere Ödematisierung als 1. Grad der hydrophischen Degeneration, lenkt bei der GEL-Tierversuchsgruppe die Interpretation der Gesamtdaten eher in Richtung einer unzureichenden O_2-Versorgung für die unter Azidämie benötigte gesteigerte Stoffwechselleistung um den Erhalt der Säuren-Basen-Homöostase zu ermöglichen. Diese Interpretation wäre deckend mit dem Befund des signifikant geringeren Sauerstoffangebotes mit der Anwendung einer GEL-Infusion (Esche et al., 2008).

Die 4. Interventionskombination (Azidämie mit versus ohne Hypoxämie) zeigte ergänzend zu der ersten Interventionskombination, dass mit einem geringeren Energieumsatz (absolut weniger Glucose bei der GEL-Tierversuchsgruppe und/oder absolut weniger O_2 bei der Hypoxämie-Tierversuchsgruppe) ein reduzierter Stoffwechsel der Leberzelle einhergeht und

somit zu vermuten ist, dass eine hepatozelluläre Schädigung durch die reduzierte Stoffwechsellage verlangsamt wurde.

Im Vergleich zwischen keiner, kurzer (4,5-stündiger) und längerer (6,5-stündiger) Azidämieexposition [2. Interventionskombination (Hämofiltration und Azidämie (pH 7,2 versus pH 7,4)) und 3. Interventionskombination (alleinige Azidämie, pH-Wert 7,2 (mit versus ohne continuous venovenous hemofiltration))] zeigten die Tierversuchsgruppen ohne und mit kurzer (4,5-stündiger) Azidämieexposition nur wenig Vakuolen bei gleichzeitig starker Ödematisierung. Die Tierversuchsgruppe, die der längsten (6,5-stündigen) Azidämieexposition ausgesetzt wurde, wies hingegen eine signifikant stärkere Vakuolisierung bei gleichzeitig geringerer Ödematisierung auf. Unter Berücksichtigung der histologischen sowie der serumspezifischen Ergebnisse (insbesondere der zum Versuchende fallenden Kreatinin- und Harnstoffwerte in den hämofiltrierten Tierversuchsgruppen), zeigten die Ergebnisse dieser tierexperimentellen Studie, dass allein die Azidämie zu ersten hepatozellulären Degenerationserscheinungen führen kann. Es zeichnet sich damit ab, dass die Azidämie nicht nur Konsequenz komplexer pathophysiologischer Reaktionen und damit Parallelereignis ist, sondern dass sie selbst Kausalität einer Zustandsverschlechterung und gesteigerten Mortalität sein kann. Den aufgeführten Gefahren einer Organschädigung steht gegenüber, dass bei einer multimodalen Therapie mit lungenprotektiver Beatmungssituation die Notwendigkeit der permissiven Hyperkapnie und tolerierte Azidämie akzeptiert werden, solange die hämodynamische Situation des Patienten stabil ist. Um die nachweislich die Mortalitätsrate senkende, lungenprotektive Beatmung (Network, 2000) nicht aufgeben zu müssen, wären alternative Methoden zur risikoarmen Wiederherstellung der pH-Homöostase erstrebenswert.

Bei der Interpretation der Ergebnisse dieser Arbeit ist zu berücksichtigen, dass Schweine im Vergleich zum Menschen eine deutlich höhere Stoffwechselrate aufweisen. Die Veränderungen der stoffwechselrelevanten Parameter in dieser tierexperimentellen Studie sind daher vom Schwein nicht direkt auf den Menschen übertragbar. Es zeigten sich beim Schwein allerdings bereits nach 4,5 Stunden Azidämieexposition erste hepatozelluläre Degenerationserscheinungen, die darauf schließen lassen, dass auch bei einem Menschen bereits nach kurzer Zeit diese Art von Degenerationserscheinungen zu erwarten sind. Unsere tierexperimentellen Befunde und Schlussfolgerungen decken sich mit der neusten Studienlage. In letzter Zeit häufen sich retrospektive Studien und Metaanalysen, die belegen, dass eine Azidämie mit einer erhöhten Rate an Organversagen und Mortalität einhergeht (Curley & Laffey, 2014; Nin et al., 2017). In diesem Sinne erscheint es sinnvoll, zukünftig Studien zum Einfluss eines frühzeitig einsteigenden Regimes zur Korrektur der Azidämie unter dem Aspekt der Organprotektion durchzuführen.

7. Summary

Influence of mixed acidaemia on liver morphology and liver physiology with regard to multimodal therapy modules in the intensive care. Investigated in a porcine model.

In order to compare clinical studies, objective criteria are necessary. Multimodal therapy in intensive care is a widely discussed issue. Therapy modules such as ventilation management, renal replacement therapy and infusion management differ between clinics as well as among patient population. Yet scientific knowledge about interactions between therapy modules is rare. Under clinical circumstances, physicians tolerate acidaemia in their patients usually to pH-values of 7.2 or simply as long as haemodynamics are still stable. Unfortunately, the impact of acidaemia on organ failure and mortality is random subject focused on this still undefined pathophysiology.

In the present thesis all pigs (n=29) show significant hepatocyte impairment as shown by the pathohistological scores and some altered serum markers.

Due to the subdivision of the possible opportunities for intervention, subsequent aspects could be investigated:

1. the potentially varying effect of 6% hydroxyethyl starch (HES) 130 kDa/0,4 and 4% gelatin (GEL) under acidaemia
2. the potentially varying biocompatibility reaction on venovenous hemofiltration due to acidaemia
3. the influence of an occasional - additionally to the acidaemia - tolerated hypoxaemia within the framework of lung protective ventilation

First, the choice of infusion solution has a relevant influence on the morphology of the liver. In the first intervention combination (acidaemia and colloid type HES vs. GEL) for HES we found, that centrolobular have an increased score for vacuoles. For GEL - regardless of the hepatic zoning - a significantly higher oedematisation occurred. In the overall context of the results presented here as well as found and cited from further investigations out of this experiment the rather generalized oedematisation of hepatocyte was assumed and discussed in detail to be related to a first degree of degeneration. In contrast, the higher score for vacuolization of HES treated animals seems to be more likely to be a sum of partly HES storage and ongoing degenerative progress in consequence of metabolically more active hepatocytes under acidaemia. This interpretation would be consistent with the finding of the significantly lower oxygen supply under GEL infusion (Esche et al., 2008).

In addition to the first intervention combination the fourth intervention combination (acidaemia with vs. without additional tolerated hypoxia) shows, that less energy turnover (less total

glucose in the GEL group and/or less total O_2 in the hypoxia group) is accompanied by a reduced metabolism of the liver cell. Therefore, it can be assumed that a hepatocellular impairment has been delayed by this.

In the comparison of no treatment, short (4.5 hours) and longer (6.5 hours) acidaemia exposition [second intervention combination (hemofiltration and acidaemia (pH 7.2 vs. pH 7.4)) and third intervention combination (influence of acidaemia per se (pH 7.2 vs. with continuous venovenous hemofiltration))], the animal groups with no treatment and short (4.5 hours) acidaemia exposition showed only few vacuoles with concurrent strong odematisation. The animal group with the longest acidaemia exposition (6.5 hours) showed a significantly stronger vacuolisation with concurrent low oedematisation. Taking the histological and serum specific results into account our research shows that solely acidaemia may lead to first hepatocellular signs of degeneration especially regarding the decreasing creatinine and urea values in the hemofiltration groups. Acidaemia is thus not only the consequence of complex pathophysiologies and therefore a collateral process but furthermore causality of a deterioration and even mortality. Despite the outlined risk of organ damage, it is nevertheless acceptable in multimodal therapy with a lung protective ventilatory situation, where permissive hypercapnia and tolerated acidaemia are a necessity. However, this is only valid as long as the hemodynamic situation of the patient is steady. Declining mortality rate is verifiably linked to lung protective ventilation (Network, 2000). In order to maintain this artificial respiration, alternative low risk methods to recover pH- homeostasis are desirable.

Concerning the findings in this thesis, it has to be considered that pigs have a significantly higher metabolic rate compared to humans. The parameters with an impact of metabolic rate can not directely be compared between humans and pigs. In pigs however, first hepatocellular degeneration after 4.5 hours of acidaemia exposition becomes evident. It has to be assumed that this degeneration also applies to humans with acidaemia exposition with a similar timescale.

Our experimental veterinary findings and conclusions meet the results of recent scientific publications and findings: retrospective studies and meta- analysis showed that acidaemia is linked to a higher rate of organ failure and even mortality (Curley & Laffey, 2014; Nin et al., 2017). Considering this, future research focusing on early influence of regime to correct acidaemia considering organ protection is necessary.

8. Literaturverzeichnis

Adams H. A. (2007): *Volume and fluid replacement-Physiology, pathology, pharmacology and clinical use (part 1-2).* Anästhesiologie & Intensivmedizin, 448-540.

Alwall N. ; Lindgren P. ; Lunderquist A. (1952): *On the artificial kidney. XX. Treatment of severe phenobarbital poisoning in rabbits, by means of forced polyuria, exchange ultrafiltration and dialysis, and a preliminary report on dialytic treatment of barbiturate poisoning in patients.* Acta medica Scandinavica. 143(4), 299-306.

Arieff A. I. ; Gertz E. W. ; Park R. ; Leach W. ; Lazarowitz V. C. (1983): *Lactic acidosis and the cardiovascular system in the dog.* Clinical science (London, England: 1979). 64 (6), 573-80.

Artigas A. ; Wernerman J. ; Arroyo V. ; Vincent J. L. ; Levy M. (2016): *Role of albumin in diseases associated with severe systemic inflammation: Pathophysiologic and clinical evidence in sepsis and in decompensated cirrhosis.* Journal of critical care. 33, 62-70.

Base E. M. ; Standl T. ; Lassnigg A. ; Skhirtladze K. ; Jungheinrich C. ; Gayko D. ; Hiesmayr M. (2011): *Efficacy and safety of hydroxyethyl starch 6% 130/0.4 in a balanced electrolyte solution (Volulyte) during cardiac surgery.* Journal of cardiothoracic and vascular anesthesia. 25(3), 407-14.

Baumgärtner W. (Hrsg.) ; Gruber A. D. (Hrsg.) (2015): *Spezielle Pathologie für die Tiermedizin*. 1. Auflage. Stuttgart. 472. Enke-Verlag.

Bedarf J. R. ; Russ M. ; Ott S. ; Keckel T. ; Kirschfink M. ; Unger J. K. (2010): *Influence of acidaemia and hypoxaemia on CVVH haemocompatibility in a porcine model.* Nephrology, dialysis, transplantation: official publication of the European Dialysis and Transplant Association-European Renal Association. 25(9), 2960-9.

Bellomo R. ; Honore P. M. ; Matson J. ; Ronco C. ; Winchester J. (2005): *Extracorporeal blood treatment (EBT) methods in SIRS/Sepsis.* The International journal of artificial organs. 28(5), 450-8.

Boldt J. ; Suttner S. (2005): *Plasma substitutes.* Minerva anestesiologica. 71(12), 741-58.

Brofman J. D.; Leff A. R.; Munoz N. M.; Kirchhoff C.; White S. R. (1990): *Sympathetic secretory response to hypercapnic acidosis in swine.* Journal of applied physiology (Bethesda, Md. : 1985). 69(2), 710-7.

Christidis C. ; Mal F. ; Ramos J. ; Senejoux A. ; Callard P. ; Navarro R. ; Trinchet J. C. ; Larrey D. ; Beaugrand M. ; Guettier C. (2001): *Worsening of hepatic dysfunction as a consequence of repeated hydroxyethylstarch infusions.* Journal of hepatology. 35(6), 726-32.

Curley G. F. ; Laffey J. G. (2014): *Acidosis in the critically ill - balancing risks and benefits to optimize outcome.* Critical care (London, England). 18(2), 129.

Dagar G. ; Taneja A. ; Nanchal R. S. (2016): *Abdominal Circulatory Interactions.* Critical care clinics. 32(2), 265-77.

Determann R. M. ; Royakkers A. ; Wolthuis E. K. ; Vlaar A. P. ; Choi G. ; Paulus F. ; Hofstra J. J. ; de Graaff M. J. ; Korevaar J. C. ; Schultz M. J. (2010): *Ventilation with lower tidal volumes as compared with conventional tidal volumes for patients without acute lung injury: a preventive randomized controlled trial.* Critical care (London, England). 14(1), R1.

Deutsche Gesellschaft für Ernährungsmedizin e.V. (DGEM): *Leitlinien parenterale Ernährung.* In: www.dgem.de (2014). http://www.dgem.de/parenteral.html

Dienes H.P. ; Düllmann J. ; Fischer H.-P. ; Klinge O. ; Lierse W. ; Meyer zum Büschenfelde K.-H. ; Pfeifer U. ; Preisegger K. H. ; Ramadori G. ; Tannapfel A. ; Wittekind C. ; Wulfhekel U. ; Zhou H. (2000): *Pathologie der Leber und Gallenwege.* 1. Auflage. Berlin Heidelberg. 1282. Springer-Verlag.

Eder M. (Hrsg.) ; Gedigk P. (Hrsg.) (1990): *Allgemeine Pathologie und Pathologische Anatomie.* 33. Auflage. Berlin Heidelberg. 913. Springer-Verlag.

Esche V. ; Russ M. ; Melzer S. ; Grossmann B. ; Boemke W. ; Unger J. K. (2008): *Buffer capacity of 4% succinylated gelatin does not provide any advantages over acidic 6% hydroxyethyl starch 130/0.4 for acid-base balance during experimental mixed acidaemia in a porcine model.* European journal of anaesthesiology. 25(11), 905-16.

Funk G. C. ; Doberer D. ; Kneidinger N. ; Lindner G. ; Holzinger U. ; Schneeweiss B. (2007): *Acid-base disturbances in critically ill patients with cirrhosis.* Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver. 27(7), 901-9.

Ghijselings I. ; Rex S. (2014): *Hydroxyethyl starches in the perioperative period. A review on the efficacy and safety of starch solutions.* Acta anaesthesiologica Belgica. 65(1), 9-22.

Grootendorst A. F. ; Van Bommel E. F. (1993): *The role of hemofiltration in the critically-ill intensive care unit patient: present and future.* Blood purification. 11(4), 209-23.

Group C. I. (1998): *Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomised controlled trials.* BMJ (Clinical research ed.). 317(7153), 235-40.

Gurkan O. U. ; O'Donnell C. ; Brower R. ; Ruckdeschel E. ; Becker P. M. (2003): *Differential effects of mechanical ventilatory strategy on lung injury and systemic organ inflammation in mice.* American journal of physiology. Lung cellular and molecular physiology. 285(3), L710-8.

Hannah S. ; Mecklenburg K. ; Rahman I. ; Bellingan G. J. ; Greening A. ; Haslett C. ; Chilvers E. R. (1995): *Hypoxia prolongs neutrophil survival in vitro.* FEBS Letters. 372(2-3), 233-7.

Hartog C. S. ; Reinhart K. (2009): *CONTRA: Hydroxyethyl starch solutions are unsafe in critically ill patients.* Intensive care medicine. 35(8), 1337-42.

Hartog C. S. ; Bauer M. ; Reinhart K. (2011): *The efficacy and safety of colloid resuscitation in the critically ill.* Anesthesia and analgesia. 112(1), 156-64.

Häussinger D. ; Steeb R. ; Gerok W. (1990): *Ammonium and bicarbonate homeostasis in chronic liver disease.* Klinische Wochenschrift. 68(3), 175-82.

Henderson L. W. (1982): *The beginning of hemofiltration.* Contributions to nephrology. 32, 1-19.

Hessler M. ; Arnemann P. H. ; Ertmer C. (2015): *To use or not to use hydroxyethyl starch in intraoperative care: are we ready to answer the 'Gretchen question'?* Current opinion in anaesthesiology. 28(3), 370-7.

Hickling K. G. ; Henderson S. J. ; Jackson R. (1990): *Low mortality associated with low volume pressure limited ventilation with permissive hypercapnia in severe adult respiratory distress syndrome.* Intensive care medicine. 16(6), 372-7.

Hickling K. G. ; Walsh J. ; Henderson S. ; Jackson R. (1994): *Low mortality rate in adult respiratory distress syndrome using low-volume, pressure-limited ventilation with permissive hypercapnia: a prospective study.* Critical care medicine. 22(10), 1568-78.

Horn F. (Hrsg.) (2009): *Biochemie des Menschen.* 4. Auflage. Stuttgart. 664. Georg Thieme Verlag KG.

Huang H. ; Tohme S. ; Al-Khafaji A. B. ; Tai S. ; Loughran P. ; Chen L. ; Wang S. ; Kim J. ; Billiar T. ; Wang Y. ; Tsung A. (2015): *Damage-associated molecular pattern-activated neutrophil extracellular trap exacerbates sterile inflammatory liver injury.* Hepatology (Baltimore, Md.). 62(2), 600-14.

Imai Y. ; Parodo J. ; Kajikawa O. ; de Perrot M. ; Fischer S. ; Edwards V. ; Cutz E. ; Liu M. ; Keshavjee S. ; Martin T. R. ; Marshall J. C. ; Ranieri V. M. ; Slutsky A. S. (2003): *Injurious mechanical ventilation and end-organ epithelial cell apoptosis and organ dysfunction in an experimental model of acute respiratory distress syndrome.* Jama. 289(16), 2104-12.

Jaber S. ; Jung B. ; Sebbane M. ; Ramonatxo M. ; Capdevila X. ; Mercier J. ; Eledjam J. J. ; Matecki S. (2008): *Alteration of the piglet diaphragm contractility in vivo and its recovery after acute hypercapnia.* Anesthesiology. 108(4), 651-8.

Jin S. L. ; Yu B. W. (2010): *Effects of acute hypervolemic fluid infusion of hydroxyethyl starch and gelatin on hemostasis and possible mechanisms.* Clinical and applied thrombosis/hemostasis: official journal of the International Academy of Clinical and Applied Thrombosis/Hemostasis. 16(1), 91-8.

Joannidis M. (2009): *Continuous renal replacement therapy in sepsis and multisystem organ failure.* Seminars in dialysis. 22(2), 160-4.

Jungheinrich C. ; Scharpf R. ; Wargenau M. ; Bepperling F. ; Baron J. F. (2002): *The pharmacokinetics and tolerability of an intravenous infusion of the new hydroxyethyl starch 130/0.4 (6%, 500 mL) in mild-to-severe renal impairment.* Anesthesia and analgesia. 95(3), 544-51, table of contents.

Kaplan L. J. ; Frangos S. (2005): *Clinical review: Acid-base abnormalities in the intensive care unit -- part II.* Critical care (London, England). 9(2), 198-203.

Karakala N. ; Raghunathan K. ; Shaw A. D. (2013): *Intravenous fluids in sepsis: what to use and what to avoid.* Current opinion in critical care. 19(6), 537-43.

Kellum J. A. ; Dishart M. K. (2002): *Effect of hemofiltration filter adsorption on circulating IL-6 levels in septic rats.* Critical care (London, England). 6(5), 429-33.

Kraut J. A. ; Madias N. E. (2010): *Metabolic acidosis: pathophysiology, diagnosis and management.* Nature reviews. Nephrology. 6(5), 274-85.

Liao M. H. ; Chen S. J. ; Tsao C. M. ; Shih C. C. ; Wu C. C. (2013): *Possible biomarkers of early mortality in peritonitis-induced sepsis rats.* The Journal of surgical research. 183(1), 362-70.

Lier H. ; Bottiger B. W. ; Hinkelbein J. ; Krep H. ; Bernhard M. (2011): *Coagulation management in multiple trauma: a systematic review.* Intensive care medicine. 37(4), 572-82.

Marini J. J. ; Gattinoni L. (2004): *Ventilatory management of acute respiratory distress syndrome: a consensus of two.* Critical care medicine. 32(1), 250-5.

Martin L. (1987): *Pulmonary Physiology in Clinical Practice:* The Essentials for Patient Care and Evaluation.

Martini W. Z. (2009): *Coagulopathy by hypothermia and acidosis: mechanisms of thrombin generation and fibrinogen availability*. The Journal of trauma. 67(1), 202-8; discussion 208-9.

Mayor S. (2013): *EMA confirms that hydroxyethyl starch solutions should not be used in critically ill, sepsis, or burns patients.* BMJ (Clinical research ed.). 347, f6197.

McClave S. A. ; Taylor B. E. ; Martindale R. G. ; Warren M. M. ; Johnson D. R. ; Braunschweig C. ; McCarthy M. S. ; Davanos E. ; Rice T. W. ; Cresci G. A. ; Gervasio J. M. ; Sacks G. S. ; Roberts P. R. ; Compher C. (2016): *Guidelines for the Provision and Assessment of Nutrition Support Therapy in the Adult Critically Ill Patient: Society of Critical Care Medicine (SCCM) and American Society for Parenteral and Enteral Nutrition (A.S.P.E.N.).* JPEN. Journal of parenteral and enteral nutrition. 40(2), 159-211.

Moeller C. ; Fleischmann C. ; Thomas-Rueddel D. ; Vlasakov V. ; Rochwerg B. ; Theurer P. ; Gattinoni L. ; Reinhart K. ; Hartog C. S. (2016): *How safe is gelatin? A systematic review and meta-analysis of gelatin-containing plasma expanders vs crystalloids and albumin.* Journal of critical care. 35, 75-83.

Network T. A. R. D. S. (2000): *Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome.* The New England Journal of Medicine, 1301-1308.

Nin N. ; Muriel A. ; Penuelas O. ; Brochard L. ; Lorente J. A. ; Ferguson N. D. ; Raymondos K. ; Rios F. ; Violi D. A. ; Thille A. W. ; Gonzalez M. ; Villagomez A. J. ; Hurtado J. ; Davies A. R. ; Du B. ; Maggiore S. M. ; Soto L. ; D'Empaire G. ; Matamis D. ; Abroug F. ; Moreno R. P. ; Soares M. A. ; Arabi Y. ; Sandi F. ; Jibaja M. ; Amin P. ; Koh Y. ; Kuiper M. A. ; Bulow H. H. ; Zeggwagh A. A. ; Anzueto A. ; Sznajder J. I. ; Esteban A. (2017): *Severe hypercapnia and outcome of mechanically ventilated patients with moderate or severe acute respiratory distress syndrome.* Intensive care medicine. 43(2), 200-208.

Opitz H. (Hrsg.); Schmid F. (Hrsg.) (1965): *Stoffwechsel, Ernährung, Verdauung:* Handbuch der Kinderheilkunde. 1. Auflage. Berlin Heidelberg. 1244. Springer-Verlag.

Oster J. R. ; Perez G. O. (1986): *Acid-base disturbances in liver disease.* Journal of hepatology. 2(2), 299-306.

Ostergaard L. ; Granfeldt A. ; Secher N. ; Tietze A. ; Iversen N. K. ; Jensen M. S. ; Andersen K. K. ; Nagenthiraja K. ; Gutierrez-Lizardi P. ; Mouridsen K. ; Jespersen S. N. ; Tonnesen E. K. (2015): *Microcirculatory dysfunction and tissue oxygenation in critical illness.* Acta anaesthesiologica Scandinavica. 59(10), 1246-59.

Ott S. (2017): *Einfluss einer gemischten respiratorisch-metbolischen Azidämie auf die Nierenphysiologie und -morphologie.* Berlin, Freie Universität Berlin, Dissertation. 90.

Oudemans-van Straaten H. M. ; Wester J. P. ; de Pont A. C. ; Schetz M. R. (2006): *Anticoagulation strategies in continuous renal replacement therapy: can the choice be evidence based?* Intensive care medicine. 32(2), 188-202.

Quellhorst E. ; Schuenemann B. ; Borghardt J. (1978): *Clinical and technical aspects of hemofiltration.* Artificial organs. 2(4), 334-8.

Raj S. ; Scott D. R. ; Nguyen T. ; Sachs G. ; Kraut J. A. (2013): *Acid stress increases gene expression of proinflammatory cytokines in Madin-Darby canine kidney cells.* American journal of physiology. Renal physiology. 304(1), F41-8.

Reinhart K. ; Perner A. ; Sprung C. L. ; Jaeschke R. ; Schortgen F. ; Johan Groeneveld A. B. ; Beale R. ; Hartog C. S. ; European Society of Intensive Care M. (2012): *Consensus statement of the ESICM task force on colloid volume therapy in critically ill patients.* Intensive care medicine. 38(3), 368-83.

Russ M. ; Bedarf J. R. ; Grosch-Ott S. ; Haltern C. ; Rossaint R. ; Unger J. K. (2013): *First level prevention instead of third level intervention-review of research to improve biocompatibility and*

performance of capillary membrane apheresis in critically ill patients. Artificial organs. 37(6), 501-12.

Russ M. ; Esche V. ; Ott S. ; Bedarf J. ; Unger J. K. (2011): *Stable mixed acidemia in anesthetized pigs--a model for research on biocompatibility of hemofilters under a deteriorated acid-base balance.* Artificial organs. 35(2), 192-6.

Russ M.; Ott S. ; Bedarf J. R. ; Haacke N. ; Keckel T. ; Unger J. K. (2010): *Prolonged hypoxemia and acidemia in anesthetized pigs: a model for research on extracorporeal organ support in an intensive care setting.* The International journal of artificial organs. 33(8), 544-52.

Russ M. ; Koch V. ; Keckel T. ; Boemke W. ; Hiebl B. ; Unger J. K. (2009): *Six percent hydroxyethyl starch 130/0.4 impacts differently on blood glucose than 4% gelatine in a swine model of mixed acidaemia.* European journal of anaesthesiology. 26(12), 1026-31.

Sandhu B. S. ; Sanyal A. J. (2005): *Management of ascites in cirrhosis.* Clinics in liver disease. 9(4), 715-32, viii.

Schaffartzik W. (2007): *Base excess. Parameter with exceptional clinical significance.* Der Anaesthesist. 56(5), 478-81.

Sloane P. J. ; Gee M. H. ; Gottlieb J. E. ; Albertine K. H. ; Peters S. P. ; Burns J. R. ; Machiedo G. ; Fish J. E. (1992): *A multicenter registry of patients with acute respiratory distress syndrome. Physiology and outcome.* The American review of respiratory disease. 146(2), 419-26.

Suempelmann R. ; Zander R. (2001): *Gelatin protects erythrocytes in vivo and in vitro against mechanical stress.* Anasthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS. 36 Suppl 1, S62-8.

Thews G. (Hrsg.); Vaupel P. (Hrsg.) (2005): *Vegetative Physiologie.* 5. Auflage. Berlin Heidelberg. 619. Springer-Verlag.

Tsubokura M. ; Miura Y. ; Itokawa T. ; Takei N. ; Higaki T. ; Amaki T. ; Ishida Y. ; Kusama M. ; Ono S. ; Narimatsu H. ; Kami M. ; Komatsu T. (2010): *Failure of liver function tests in predicting drug clearance of chemotherapeutic agents in a patient who had recovered from hepatic congestion.* British journal of clinical pharmacology. 70(2), 277-9.

Twardowski Z. J. (2008): *History of hemodialyzers' designs.* Hemodialysis international. International Symposium on Home Hemodialysis. 12(2), 173-210.

Unger J. K. ; Haltern C. ; Kobela J. B. ; Francis R. ; Rossaint R. ; Grosse-Siestrup C. (2006): *Hydroxyethyl starch 130 kd/0.4 and albumin improve CVVH biocompatibility whereas gelatin and hydroxyethyl starch 200 kd/0.5 lead to adverse side effects of CVVH in anesthetized pigs.* Shock (Augusta, Ga.). 25(5), 533-45.

Unger J. K. ; Haltern C. ; Dohmen B. ; Gressner A. ; Grosse-Siestrup C. ; Groneberg D. A. ; Rossaint R. (2005): *Albumin and hydroxyethyl starch 130 kDa/0.4 improve filter clearance and haemocompatibility in haemo- and plasmafiltration--an in vitro study.* Nephrology, dialysis, transplantation : official publication of the European Dialysis and Transplant Association - European Renal Association. 20(9), 1922-31.

Van den Akker J. P. ; Egal M. ; Groeneveld A. B. (2013): *Invasive mechanical ventilation as a risk factor for acute kidney injury in the critically ill: a systematic review and meta-analysis.* Critical care (London, England). 17(3), R98.

Villar J. ; Kacmarek R. M. ; Perez-Mendez L. ; Aguirre-Jaime A. (2006): *A high positive end-expiratory pressure, low tidal volume ventilatory strategy improves outcome in persistent acute respiratory distress syndrome: a randomized, controlled trial.* Critical care medicine. 34(5), 1311-8.

Vincent J. L. ; De Backer D. ; Wiedermann C. J. (2016): *Fluid management in sepsis: The potential beneficial effects of albumin.* Journal of critical care. 35, 161-7.

Wang X. H. ; Mitch W. E. (2014): *Mechanisms of muscle wasting in chronic kidney disease.* Nature reviews. Nephrology. 10(9), 504-16.

Wevers P. (2001): *Der Einfluss von Polidocanol und Diclonfenac auf die Histologie der isoiert autolog hämoperfundierten Schweineleber.* Inaugural Dissertation, Freie Universität Berlin, Journal Nr. 2565.

Whitfield C. (2006): *Gelatin colloids in the resuscitation of trauma.* Journal of the Royal Army Medical Corps. 152(4), 197-201.

Wiedermann C. J. ; Joannidis M. (2014): *Accumulation of hydroxyethyl starch in human and animal tissues: a systematic review.* Intensive care medicine. 40(2), 160-70.

Witt L. ; Osthaus W. A. ; Jahn W. ; Rahe-Meyer N. ; Hanke A. ; Schmidt F. ; Boehne M. ; Sumpelmann R. (2012): *Isovolaemic hemodilution with gelatin and hydroxyethylstarch 130/0.42: effects on hemostasis in piglets.* Paediatric anaesthesia. 22(4), 379-85.

Wong Y. L. ; Lautenschlager I. ; Dombrowsky H. ; Zitta K. ; Bein B. ; Krause T. ; Goldmann T. ; Frerichs I. ; Steinfath M. ; Weiler N. ; Albrecht M. (2015): *Hydroxyethyl Starch (HES 130/0.4) Impairs Intestinal Barrier Integrity and Metabolic Function: Findings from a Mouse Model of the Isolated Perfused Small Intestine.* PLoS One. 10(3), e0127136.

Zander R. (1995): *Liver metabolism and acid-base balance.* Anasthesiologie, Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie : AINS. 30 Suppl 1, S48-51.

9. Anhang

Anhang 1

Tab. 9.1 Diuresedaten vorangegangener Arbeiten zu dieser tierexperimentellen Studie (Ott, 2017)

	KT7,2 Urin ml./min.				KT7,2 GEL Urin ml./min.				HOKT7,2 Urin ml./min.			
	Bsnat	Bssys	ZM	VE	Bsnat	Bssys	ZM	VE	Bsnat	Bssys	ZM	VE
	5,00	10,40	9,33	5,00	3,17	14,67	6,00	5,33	0,55	1,33	3,33	3,33
	1,80	5,70	3,33	5,33	3,77	6,67	2,67	2,00	1,18	3,00	3,67	7,00
	5,63	8,87	3,00	2,67	5,20	3,33	4,00	4,67	4,16	4,00	4,33	6,00
	3,43	5,33	6,00	6,67	7,60	3,66	5,67	5,67	7,33	0,67	2,33	2,33
	6,22	13,00	7,33	8,33	5,48	8,00	9,00	9,33	6,20	5,67	2,67	7,33
	3,75	9,00	8,00	9,00	10,15	4,00	6,67	11,33	22,67	1,33	1,33	3,83
Mittelwert:	4,30	8,72	6,17	6,17	5,89	6,72	5,67	6,39	7,02	2,67	2,94	4,97
Median:	4,38	8,93	6,67	6,00	5,34	5,33	5,83	5,50	5,18	2,17	3,00	4,92

Diuresedaten in ml/min. der einzelnen Tierversuchsgruppen ohne Hämofiltrtion

- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie)
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- GEL: Gelatine, HES: Hydroxyethylstärke

Anhang 2

Tab. 9.2 Diuresedaten vorangegangener Arbeiten zu dieser tierexperimentellen Studie (Ott, 2017)

	HF7,2 Urin ml./min.				HF7,4 Urin ml./min.			
	Bsnat	Bssys	ZM	VE	Bsnat	Bssys	ZM	VE
	3,22	14,67	6,67	8,33	4,50	9,33	3,67	2,33
	3,73	7,00	5,53	9,20	3,12	12,67	4,67	5,00
	8,37	8,87	5,67	5,33	1,96	10,20	5,00	4,00
	4,40	7,30	6,67	11,67	19,00	9,17	3,67	0,33
	5,50	12,33	10,00	16,00	12,00	16,33	13,00	5,00
	9,93	10,23	7,67	3,67				
Mittelwert:	5,86	10,07	7,03	9,03	8,11	11,54	6,00	3,33
Median:	4,95	9,55	6,67	8,77	4,50	10,20	4,67	4,00

Diuresedaten in ml/min. der einzelnen Tierversuchsgruppen mit Hämofiltration

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH)
- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine, HES: Hydroxyethylstärke

Anhang 3

Tab. 9.3 Gruppenspezifische Mittelwerte ausgewählter Scoreparameter (periportal)

Gruppenspezifische Mittelwerte der Scoreparameter (periportal)						
Tier-versuchs-gruppen	Vakuolisierung	Ödematisierung	Blutstauung	Dissé-Räume	Leukozyten pro Gesichtsfeld	Zentralvenen-durchmesser
HF7,2	0,39	3,34	0,19	0,18	0,98	-
HF7,4	0,9	0,85	0,02	0	1,05	-
KT7,2	2,13	2,76	0,17	0,07	1,47	-
KT7,2 GEL	2,04	3,19	0,14	0,08	1,28	-
HOKT 7,2GEL	0,74	3,65	0,21	0,29	1,71	-

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH)
- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie)
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine, HES: Hydroxyethylstärke

Anhang 4

Tab. 9.4 Gruppenspezifische Mittelwerte ausgewählter Scoreparameter (intralobulär)

Gruppenspezifische Mittelwerte der Scoreparameter (intralobulär)						
Tier-versuchs-Gruppen	Vakuolisierung	Ödematisierung	Blutstauung	Dissé-Räume	Leukozyten pro Gesichtsfeld	Zentralvenen-durchmesser
HF7,2	0,92	3,67	0	0,43	0,71	-
HF7,4	0,77	4	0	0	0,87	-
KT7,2	1,88	3,28	0,21	0,32	0,99	-
KT7,2 GEL	2,21	3,47	0,03	0,35	0,79	-
HOKT 7,2	1,11	3,92	0,03	0,89	1,31	-

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH)

- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie)
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine, HES: Hydroxyethylstärke

Anhang 5

Tab. 9.5 Gruppenspezifische Mittelwerte ausgewählter Scoreparameter (zentrolobulär)

Gruppenspezifische Mittelwerte der Scoreparameter (zentrolobulär)						
Tier-versuchs-Gruppen	Vakuolisierung	Ödematisierung	Blutstauung	Dissé-Räume	Leukozyten pro Gesichtsfeld	Zentralvenen-durchmesser
HF7,2	1,37	3,72	0,1	0,26	0,63	-
HF7,4	0,55	4	0,03	0	0,83	-
KT7,2	1,82	3,13	0,43	0,39	0,94	-
KT7,2 GEL	1,08	3,47	0,29	0,56	0,9	-
HOKT 7,2	0,67	3,82	0,4	0,74	1,34	-

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH)
- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie)
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine, HES: Hydroxyethylstärke

Anhang 6

Tab. 9.6 Gruppenspezifische Mittelwerte ausgewählter Scoreparameter

Gruppenspezifische Mittelwerte der Scoreparameter (unabhängig von der hepatischen Zonierung)						
Tier-versuchs-Gruppen	Vakuoli-sierung	Ödemati-sierung	Blutstauung	Dissé-Räume	Leukozyten pro Gesichtsfeld	Zentralvenen-durchmesser
HF7,2	0,89	3,58	0,1	0,29	0,77	48,15 µm
HF7,4	0,55	2,95	0,02	0	0,92	51,07 µm
KT7,2	1,94	3,06	0,27	0,26	1,13	50,5 µm
KT7,2 GEL	1,78	3,38	0,16	0,33	0,99	68,47 µm
HOKT 7,2	0,84	3,8	0,21	0,64	1,45	55,31 µm

- HF7,2: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, CVVH)
- HF7,4: Hämofiltrationstiere mit 6% HES 130 kDa, zusätzlich Elektrolytlösung statt Säureinfusion, pH 7,4, CVVH
- HOKT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2, Hypoxämie)
- KT7,2: Kontrolltiere mit 6% HES 130 kDa/0,4, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- KT7,2 GEL: Kontrolltiere, 4% Gelatineinfusionslösung, Elektrolytlösung, Säureinfusion, low tidal volume ventilation, pH 7,2)
- CVVH: continuous venovenous hemofiltration, GEL: Gelatine, HES: Hydroxyethylstärke

Anhang 7

Tab. 9.7 Arterielle Laktatwerte/ vorangegangene Arbeiten dieser Arbeitsgruppe

Tiergruppe	**Mittelwert arteriell Laktat mmol/l**			
	BSnat	**BSsys**	**ZM**	**VE**
KT7,2	1,05	0,68	1,00	0,90
KT7,2 GEL	0,82	0,75	0,60	0,50
HOKT7,2	0,93	1,85	1,63	0,72
HF7,2	0,68	0,72	0,78	0,60
HF7,4	0,80	0,44	0,42	0,76

Laktatwerte (arteriell) in mmol/l der Versuchstiergruppen KT7,2, KT7,2 GEL, HOKT7,2, HF7,2und HF7,4

Anhang 8

Tab. 9.8 Venöse Laktatwerte/ vorangegangene Arbeiten dieser Arbeitsgruppe

Tiergruppe	Mittelwert venös Laktat mmol/l			
	BSnat	BSsys	ZM	VE
KT7,2	0,98	0,72	0,93	1,00
KT7,2 GEL	0,83	0,70	0,63	0,62
HOKT7,2	0,93	1,68	1,65	0,77
HF7,2	0,68	0,72	0,78	0,60
HF7,4	0,74	0,46	0,46	0,84

Laktatwerte (venös) in mmol/l der Versuchstiergruppen KT7,2, KT7,2 GEL, HOKT7,2, HF7,2und HF7,4

Anhang 9

Tabellenverzeichnis:

Tab. 2.1 Pathophysiologische Reaktion unterschiedlicher Kolloide im Überblick (Seite 10)

Tab. 3.1 Pharmakologische Stoffe (Seite 26)

Tab. 3.2 Materialien einer HE-Färbung und deren Hersteller (Seite 27)

Tab. 3.3 Technische Gerätschaften und ihre Hersteller (Seite 28)

Tab. 3.4 Messzeitpunkte und Versuchsablauf im Überblick tabellarisch (Seite 36)

Tab. 3.5 Biochemische Analyse des Blutserums ausgewählter Parameter, die Hinweise auf eine mögliche Zellschädigung oder eine gesteigerte metabolische Aktivität der Leber geben (Seite 41)

Tab. 3.6 Score für die histologische Befundung von den Parametern Vakuolisierung, Ödematisierung und Blutstauung (modifiziert nach Wever (2002)) (Seite 46)

Tab. 3.7 Scoreparameter Dissé-Räume und Leukozyten (modifiziert nach Wever (2002)) (Seite 47)

Tab. 4.1 Die prozentuale Darstellung der serumspezifischen Parameter zum Messzeitpunkt Zwischenmessung (Seite 60)

Tab. 4.2 Die prozentuale Darstellung der serumspezifischen Parameter zum Messzeitpunkt Versuchsende (Seite 61)

Anhang 10

Abbildungsverzeichnis:

Abb. 2.1 Aktueller Kenntnisstand und daraus resultierende Fragestellungen/Hypothesen (Seite 19)

Abb. 3.1 Aktueller Kenntnisstand, Fragestellungen/Hypothesen und daraus resultierende Interventionskombinationen (Seite 22)

Abb. 3.2 Verlauf der Tierstudie mit Eingruppierung, inklusive die Anzahl der für die Auswertungen/Messungen benötigten und ausgeschiedene Versuchstiere/ Schweine (Seite 23)

Abb. 3.3 Aktueller Kenntnisstand, Fragestellungen/Hypothesen, Interventionskombinationen und Eingruppierung der fünf Tierversuchsgruppen (Seite 24)

Abb. 3.4 Instrumentierung (modifiziert nach Russ et al., 2010) (Seite 32)

Abb. 3.5 System der offenen und geschlossenen Hämofiltration (Seite 35)

Abb. 3.6 Messzeitpunkte und Versuchsablauf im Überblick grafisch (modifiziert nach Russ et al., 2011) (Seite 37)

Abb. 3.7 Score/Schema für die Einteilung des Leberläppchens in funktionelle Einheiten und Quadranten (Seite 40)

Abb. 3.8 Histologisches Bild/Gesichtsfeld eines HE-Schnittes einer Schweineleber (Tiergruppe: HF7,2; Tier: HF7,2-13) in 20facher Vergrößerung eines Binokularmikroskopes (Seite 44)

Abb. 3.9 Histologisches Bild/Gesichtsfeld eines HE-Schnittes einer Schweineleber (Tiergruppe: HOKT7,2; Tier: HOKT7,2-8) in 20facher Vergrößerung eines Binokularmikroskopes (Seite 44)

Abb. 3.10 Histologisches Bild/Gesichtsfeld eines HE-Schnittes einer Schweineleber (Tiergruppe: HOKT7,2; Tier: HOKT7,2-5) in 20facher Vergrößerung eines Binokularmikroskopes (Seite 45)

Abb. 4.1 Signifikante Unterschiede der histopathologischen Analyse der Tierversuchsgruppen KT7,2 und KT7,2 GEL bei den Scoreparametern Vakuolisierung, Zentralvenendurchmesser und Ödematisierung (Seite 51)

Abb. 4.2 Signifikante Unterschiede der histopathologischen Analyse der Tierversuchsgruppen HF7,4 und HF7,2 bei den Scoreparametern Ödematisierung und Dissé-Räume (Seite 53)

Abb. 4.3 Signifikante Unterschiede der histopathologischen Analyse der Tierversuchsgruppen KT7,2 und HF7,2 bei den Scoreparametern Vakuolisierung, Ödematisierung, Blutstauung, Dissé-Räume und Leukozyten (Seite 55)

Abb. 4.4 Signifikante Unterschiede der histopathologischen Analyse der Tierversuchsgruppen KT7,2 und HOKT7,2 bei den Scorparametern Vakuolisierung, Ödematisierung und Dissé-Räume (Seite 58)

Anhang 11

Formelverzeichnis:

Formel 3.1 Formel für die Berechnung des Dilutionswertes ausgewählter Parameter (AST, ALT, AP, LDH, Harnstoff, Kreatinin, Albumin, Protein) und des prozentuellen Verlaufes zu den unterschiedlichen Messzeitpunkten (Seite 41)

10. Danksagung

Als erstes möchte ich meiner Betreuerin und dem Herzstück dieses ganzen Projektes PD Dr. Juliane Unger danken. Du hast mich von Beginn an mit Deiner Leidenschaft für die Forschung fasziniert. Du hast mir gezeigt wissenschaftlich zu denken, hast mich unterstützt und mit einer kreativen Ausdauer begleitet. Für all die produktiven Diskussionen, Deine Zeit, Dein Vertrauen, Deine Inspiration und Unterstützung zu jeder Zeit, danke ich Dir von Herzen.
Herzlich danken möchte ich auch Herrn Univ.-Prof. Dr. Robert Klopfleisch, der sich nicht nur unheimlich wissbegierig und offen für dieses Projekt interessierte, sondern dieses auch strategisch und unter histopathologischen Hintergründen bereicherte.
Einen großen Dank möchte ich auch Frau Prof. Dr. Dr. Petra Reinhold aussprechen, die mir den nötigen Feinschliff für diese Arbeit nahegebracht hat und durch die diese Arbeit stilistisch optimiert werden konnte.
Auch meiner Arbeitsgruppe, der Unger AG danke ich. Dr. Sascha Ott, der mich als Erster in alles einwies, Dr. Johanna-Josophina Wagner, mit der ich viele schöne Stunden im Labor verbrachte, Sabrina Brunk für viele nette Momente in der Bildanalyse, Dr. Martin Russ, der mich in die Statistik einführte und Dr. Janis Bedarf für viele Emails und fachlichen Gespräche.
Ein großer Dank gebührt Prof. Dr. Georg Duda des Julius Wolff Institutes für die Erlaubnis der Nutzung der Histologielabore und der Bildanalyse und Herrn Dr. Bernhard Hiebl und Prof. Dr. Michael Kirschfink für die wissenschaftliche Unterstützung und Kooperation der Arbeitsgruppe.
Doch all diesen Menschen könnte ich nicht danken, wenn ich die wichtigsten Menschen um mich herum nicht hätte - meine Familie. Ich danke meinem lieben Mann, der mich wirklich immer unterstützt hat. Mit seiner Liebe, indem er Texte las, mir zuhörte und mich bestärkte. Danke auch, dass Du mir nicht nur Zeit zum Schreiben, sondern auch ab und zu den nötigen Druck gegeben hast. Danke für Dich und Deine Liebe und dafür, dass Du mir die wundervollsten Kinder geschenkt hast. Ich liebe Euch von ganzem Herzen - Ihr alle gebt mir so viel Kraft.
Ich danke auch meinen lieben Eltern, die mir das Studium und damit auch diese Dissertation ermöglicht haben und einfach immer für mich da sind. Ich liebe Euch.

11. Selbstständigkeitserklärung

Hiermit bestätige ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt habe. Ich versichere, dass ich ausschließlich die angegebenen Quellen und Hilfen in Anspruch genommen habe.

Merle Weiland
Berlin, 18.12.2020