

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung  
der Ludwig-Maximilians-Universität München  
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer

**Effekte von Diaspirin cross-linked Hemoglobin (DCLHb<sup>TM</sup>) auf die  
Mikrozirkulation und den Gewebe-pO<sub>2</sub> im Vergleich zu unterschiedlich  
lang gelagerten Erythrozytenkonzentraten im validierten  
Rückenhautkammermodel am Syrischen Goldhamster**

Dissertation  
zum Erwerb des Doktorgrades der Medizin  
an der Medizinischen Fakultät der  
Ludwig-Maximilians-Universität zu München

Vorgelegt  
von  
Constanze Wagner  
aus  
Mainz  
2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät  
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. J. M. Davis  
Prof. Dr. H. D. Rupprecht  
Priv. Doz. Dr. Cor de Wit

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. I. Sinitsina

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. K. Peter

Tag der mündlichen Prüfung: 11.07.2002

<b><u>1 Einleitung</u></b> .....	<b>7</b>
<b><u>1.1 Fremdblut-Transfusion</u></b> .....	<b>7</b>
<u>1.1.1 Gründe für eine Fremdblut-Transfusion</u> .....	7
<u>1.1.2 Risiken einer Fremdblut-Transfusion</u> .....	8
<u>1.1.3 Kosten einer Fremdblut-Transfusion</u> .....	10
<u>1.1.4 Verfügbarkeit von Fremdblut</u> .....	10
<u>1.1.5 Möglichkeiten zur Reduktion von Fremdblut-Transfusionen</u> .....	11
<b><u>1.2 Einfluß der Lagerungsdauer auf Erythrozytenkonzentrate</u></b> .....	<b>12</b>
<b><u>1.3 Sauerstofftransport</u></b> .....	<b>13</b>
<b><u>1.4 Künstliche Sauerstoffträger</u></b> .....	<b>15</b>
<b><u>1.5 Isovolumische Akute Hämodilution</u></b> .....	<b>19</b>
<u>1.5.1 Fragestellung</u> .....	20
<b><u>2 Material und Methoden</u></b> .....	<b>21</b>
<b><u>2.1 Versuchstiere</u></b> .....	<b>21</b>
<b><u>2.2 Versuchsmodell</u></b> .....	<b>21</b>
<u>2.2.1 Mikrozirkulationsmodell der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster</u> .....	21
<u>2.2.2 Implantation der Rückenhautkammer</u> .....	23
<u>2.2.3 Implantation der Dauerkatheter</u> .....	25
<u>2.2.4 Gefäßversorgung und Gefäßstruktur des Rückenhautmuskels</u> .....	27
<u>2.2.5 Kriterien der Präparation und Mikrozirkulation</u> .....	29
<b><u>2.3 Untersuchungsmethoden</u></b> .....	<b>29</b>
<u>2.3.1 Makrohämodynamik</u> .....	29
<u>2.3.2 Mikrohämodynamik</u> .....	29
<u>2.3.3 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie</u> .....	30
<u>2.3.4 Auswerteeinheit</u> .....	32
<u>2.3.5 Mikrohämodynamische Parameter</u> .....	33
<u>2.3.5.1 Kontrastverbessernde Maßnahmen</u> .....	33
<u>2.3.5.2 Bestimmung des Gefäßdurchmessers</u> .....	34

2.3.5.3 Bestimmung der Blutfließgeschwindigkeit .....	34
2.3.5.4 Bestimmung der Funktionellen Kapillardichte .....	36
2.3.5.5 Bestimmung der Leukozyten/Endothel-Interaktion .....	37
2.3.5.6 Bestimmung der Extravasation .....	38
2.3.5.7 Bestimmung der Scherrate .....	39
2.3.6 Der Gewebe-Sauerstoffpartialdruck .....	40
2.3.6.1 Meßprinzip der Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode .....	40
2.3.6.2 Aufbau der MDO-Elektrode .....	41
2.3.6.3 Vorbereitung und Eichung der Elektrode .....	42
2.3.6.4 Messung des Gewebe $pO_2$ in der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters .....	43
2.3.6.5 Datenverarbeitung und Darstellung der Gewebe $pO_2$ -Messung .....	43
2.3.7 Experimentelles Protokoll .....	45
2.3.7.1 Durchführung der Isovolumischen Austauschtransfusion .....	47
2.3.8 Versuchsgruppen .....	49
2.3.8.1 Beschreibung der verwendeten Transfusionslösungen .....	49
2.3.8.1.1 Diaspirin Crosslinked Hemoglobin (DCLHB <sup>TM</sup> ) .....	50
2.3.8.1.2 Syngenes Vollblut .....	51
2.3.8.1.3 Syngene Erythrozytenkonzentrate .....	52
2.3.9 Laborparameter .....	52
<b><u>2.4 Statistische Prüfung der Ergebnisse</u> .....</b>	<b>55</b>
2.4.1 Statistische Prüfung der Intravitalmikroskopischen Ergebnisse .....	55
2.4.2 Statistische Prüfung der Gewebe- $pO_2$ Meßergebnisse .....	55
<b><u>3 Ergebnisse</u> .....</b>	<b>56</b>
<b><u>3.1 Intravitalmikroskopie</u> .....</b>	<b>56</b>
3.1.1 Mikrohämodynamik .....	56
3.1.1.1 Arteriöler Gefäßdurchmesser .....	56
3.1.1.2 Postkapillärer venöler Gefäßdurchmesser .....	58
3.1.1.3 Blutfließgeschwindigkeit .....	59
3.1.2 Leukozyten/Endothel Interaktion .....	60
3.1.2.1 Nicht-adhärente Leukozyten .....	60
3.1.2.2 Rollende Leukozyten .....	61
3.1.2.3 Adhärente Leukozyten .....	62

3.1.3 Endotheliale Integrität.....	63
3.1.3.1 Arteriöläre Extravasation.....	63
3.1.3.2 Postkapilläre venöläre Extravasation.....	64
3.1.3.3 Funktionelle Kapillardichte.....	65
3.1.3.4 Scherrate.....	66
3.1.4 Makrohämodynamik.....	67
3.1.4.1 Mittlerer arterieller Blutdruck.....	67
3.1.4.2 Herzfrequenz.....	68
<b>3.2 Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode.....</b>	<b>69</b>
3.2.1 DCLHb-Histogramm.....	70
3.2.2 „Syngenes Vollblut“-Histogramm.....	71
3.2.3 „Syngene Erythrozytenkonzentrate 1 Tag lang gelagert“-Histogramm.....	72
3.2.4 „Syngene Erythrozytenkonzentrate 24-28 Tage lang gelagert“-Histogramm.....	73
<b><u>4 Diskussion</u>.....</b>	<b>74</b>
<b><u>4.1 Diskussion von: Material und Methoden</u>.....</b>	<b>74</b>
4.1.1 Zur Geschichte der Mikrozirkulation.....	74
4.1.2 Das Rückenhautkammermodell am Syrischen Goldhamster.....	74
4.1.3 Diskussion der Untersuchungstechniken.....	76
4.1.3.1 Intravitalfluoreszenzmikroskopie.....	76
4.1.3.2 Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode.....	78
4.1.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter.....	79
4.1.3.4 Isovolumische Austauschtransfusion.....	79
4.1.3.5 Versuchsgruppen.....	80
<b><u>4.2 Diskussion der Ergebnisse</u>.....</b>	<b>81</b>
4.2.1 Intravitalfluoreszenzmikroskopie.....	81
4.2.2 Gewebesauerstoffpartialdruck.....	84
<b><u>5 Zusammenfassung</u>.....</b>	<b>87</b>
<b><u>6 Literaturnachweis</u>.....</b>	<b>90</b>
<b><u>7 Lebenslauf</u>.....</b>	<b>113</b>

8 Danksagung .....114

# 1 Einleitung

## 1.1 Fremdblut-Transfusion

Schon zur Zeit der Entdeckung des Blutkreislaufes durch William Havery im Jahre 1616 gab es erste Überlegungen und experimentelle Versuche zu Fremdblut-Transfusionen (171). Damals glaubte man, daß „schlechtes Blut“ Krankheiten verursache und bemühte sich daher, „schlechtes Blut“ durch verschiedene andere Stoffe zu ersetzen. Diese ersten Versuche führten aber zwangsweise zu Mißerfolgen und wurden später vom französischen Gerichtshof „Le Châtelet“ am 17.4.1668 durch einen Urteilsspruch eingeschränkt. Die so erwartungsvolle Ära der Fremdblut-Transfusion kam somit erst einmal zum Erliegen. Die Wiederaufnahme der Versuche zur Bluttransfusion erfolgte gegen Ende des 18. Jahrhunderts. Nicht erst die vielen Experimente von Amberson brachten einen neuen Aufschwung in die Ära der Fremdblut-Transfusion. (4, 5, 6). Am 14.11.1901 entdeckte Landsteiner die menschlichen Blutgruppen. Mit dieser Entdeckung war das entscheidende Hindernis für eine gefahrenlose Anwendung der Bluttransfusion von Mensch zu Mensch überwunden (12).

### 1.1.1 Gründe für eine Fremdblut-Transfusion

Obwohl heutzutage der Einsatz von Fremdblut-Transfusionen so weit wie möglich reduziert wird, ist ein vollkommener Verzicht nicht möglich. Akuter Volumenmangel und Blutverlust, seien sie traumatisch oder aber operationstechnisch bedingt, werden entweder mit Volumen-Expandern oder mit gelagerten Erythrozytenkonzentraten therapiert. Die kristalloiden und kolloidalen Volumen-Expander (z.B. Ringer-Lösung, HAES 6 %) sind jedoch nicht in der Lage Sauerstoff zu transportieren. Sie dienen daher nur zur Beseitigung des bestehenden Volumenmangels, d.h. zur Kreislaufstabilisierung (153). Heute ist der Einsatz von gelagerten Erythrozytenkonzentraten ein standardisiertes und routinemäßig durchgeführtes Verfahren zur Erythrozytensubstitution bei Blutverlust. Es beinhaltet aber nicht zu vernachlässigende Risiken.

### 1.1.2 Risiken einer Fremdblut-Transfusion

Trotz der sich ständig weiter entwickelnden Qualitätssicherung bei der Gewinnung, Lagerung und Transfusion von allogenen Blut (z.B. spezielle Antikörper-Screening-Tests im Spenderblut, Durchführung von Kreuzproben mit den zu verabreichenden Erythrozytenkonzentraten) ist jede durchgeführte Fremdblut-Transfusion für den Empfänger mit einem nicht vermeidbaren Restrisiko verbunden (117). Hierzu zählen:

- Transfusionsbedingte Infektionen (47, 148, 167)
- Hämolysereaktionen: Blutgruppeninkompatibilität (137)
- Allergische Transfusionsreaktionen (173)
- Immunsuppression (15, 22, 173)
- Transfusionsbedingtes Lungenversagen (32, 107)

Bei den transfusionsbedingten Infektionen handelt es sich insbesondere um die Übertragung von viralen (Hepatitis A, B, C; Epstein-Barr; Cytomegalie und HIV) und bakteriellen (*Yersinia enterocolitica*, *Serratia marcescens*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Enterobacter*) Erkrankungen (61).

In der Literatur finden sich für die USA und Deutschland folgende Zahlen: (Tabelle 1)

Infektion	USA	BRD
-----		
Viren		
Hepatitis B	1 : 63 000	1 : 97 000
Hepatitis C	1 : 103 000	1 : 113 075
HIV	1 : 493 000	1 : 1 889 512
Bakterien	1 : 2 500 – 1 : 500 000	nicht bekannt

*Tabelle 1: Transfusionsbedingte Risiken viraler und bakterieller Infektionen im Vergleich zwischen den USA und Deutschland (47, 92, 146, 148)*

Transfusionsrisiken wie allergische Reaktionen, Hämolysereaktionen oder transfusionsbedingtes Lungenversagen nehmen keinen so hohen Stellenwert ein; sie können

jedoch als fatale Folge für den Patienten bei einem Transfusionszwischenfall auftreten. Auch Fehltransfusionen durch Verwechslung von Blutkonserven oder durch fehlerhafte Identifizierung der Patienten zählen zu nicht ausschließbaren Restrisiken einer Fremdblut-Transfusion. (Tabelle 2)

	USA	Deutschland
Akute hämolytische Reaktion	1 : 250 000 – 1 : 1 000 000	
Verzögerte hämolytische Reaktion	1 : 1 000	1 : 25 000
Akuter Lungenschaden	1 : 5 000	

*Tabelle 2: Nichtinfektiöse Risiken der Fremdtransfusion (103, 115, 135, 146)*

Die eventuelle Möglichkeit einer durch allogene Bluttransfusion entstehende Immunsuppression ist derzeit noch nicht voll geklärt. Schriemer et al. berichten von einer Korrelation zwischen der Rezidivrate von malignen Tumoren und der Anzahl perioperativ gegebener Erythrozytenkonzentrate (149). Diese Aussage wird durch eine erhöhte Inzidenz von Infektionskrankheiten nach homologer Transfusion unterstrichen (68). Auch das Risiko postoperativer Wundinfektionen scheint positiv mit der Anzahl perioperativ transfundierter Fremdblutkonserven zu korrelieren (164).

Eine Minderung der genannten Risiken führt jedoch zu einer enormen Kostenentwicklung. So schätzt man, daß eine vollständige Leukozytendepletion den Preis einer Blutkonserve um mehr als das Doppelte erhöhen würde (136).

### 1.1.3 *Kosten einer Fremdblut-Transfusion*

Am Beispiel des Klinikums Großhadern der Ludwig-Maximilians-Universität in München/Deutschland läßt sich folgende Kostenbilanz errechnen:

Pro Jahr werden von der Blutbank in Großhadern etwa 32 000 Erythrozytenkonzentrate angefordert, von denen etwa 27 000 Erythrozytenkonzentrate verbraucht werden. Die restlichen 5 000 Erythrozytenkonzentrate müssen verworfen werden, da sie z.B. zu lange gelagert wurden oder die erforderliche Kühlkette unterbrochen worden ist. Bei einem durchschnittlichem Preis von 160 DM pro angeforderter Blutkonserve fallen hier Kosten von über 4,3 Mio. DM an. Zusätzlich fordern die heutigen Sicherheitsbestimmungen in der Transfusionsmedizin, daß für jeden Patienten, der für eine Bluttransfusion peri- oder postoperativ in Frage kommt, ein Kreuztest und eine Blutgruppenbestimmung durchzuführen ist. Bei einem Preis von ca. 100 DM pro Test und 60 000 Bestimmungen pro Jahr ergibt dies ca. 6 Mio. DM. Summa summarum errechnen sich jährlich anfallende Kosten von über 10,3 Mio. DM allein für Bluttransfusionen im Klinikum Großhadern der LMU München.

### 1.1.4 *Verfügbarkeit von Fremdblut*

In den USA ist ein stetig steigender Verbrauch an Erythrozytenkonzentraten bei gleichzeitigem Rückgang der Spenderbereitschaft zu beobachten (153). Die Hälfte der jährlich etwa 12 Mio. in den USA transfundierten Blutkonserven fällt auf die Bevölkerungsgruppe „älter als 65 Jahre“ (166). Diese Bevölkerungsgruppe repräsentiert derzeit 12,5 % der Gesamtbevölkerung. Durch die allgemeine Verbesserung des Gesundheitswesens ist ein Anstieg der Lebenserwartung der Bevölkerung zu beobachten (166). Auch die sich weiterentwickelnden operativen Möglichkeiten in der Humanmedizin erhöhen die Zahl chirurgischer Eingriffe mit zum Teil hohen Blutverlusten. Vamvakas und Tasvell berechneten für das Jahr 2030, daß der Bevölkerungsanteil „über 65 Jahre“ 22 % der Gesamtbevölkerung ausmachen wird. Bei einem konstanten Blutkonservenverbrauch fallen folglich 12-13 Mio. Blutkonserven allein auf die Bevölkerungsgruppe „älter als 65 Jahre“. Bei gleichbleibender Blut-Spendebereitschaft der Bevölkerung wird in den USA ein Engpaß in der Transfusionsmedizin nicht zu vermeiden sein (31). Für Deutschland liegen vergleichbare

Berechnungen derzeit nicht vor. Sie dürften jedoch nicht wesentlich von den Berechnungen in den USA abweichen (61).

#### 1.1.5 Möglichkeiten zur Reduktion von Fremdblut-Transfusionen

Die nicht vermeidbaren Risiken einer Möglichkeiten zur Reduktion von Fremdblut-Transfusion, die stetig steigenden Kosten im Transfusionswesen sowie die zu befürchtende eingeschränkte Verfügbarkeit von Blutkonserven erfordern neue Maßnahmen mit dem Ziel, Fremdblut-Transfusionen einzusparen (148). Hierzu werden z.Zt. folgende, prä-, intra- und postoperative Möglichkeiten diskutiert:

- Präoperativ: Strenge Indikationsstellung zur Operation (51, 62, 138)  
Strenge Indikationsstellung zur Transfusion (51, 62, 138)  
Eigenblutspende (2, 9, 30, 165)
- Intraoperativ: blutungsarme chirurgische Präparation  
Akute normovolämische Hämodilution (ANH) (94, 95, 112, 114)  
Kontrollierte Hypotension (99)  
Maschinelle Autotransfusion (MAT) mittels Cell-saver (1, 30)  
Antifibrinolytika (Aprotinin) (64)
- Postoperativ: Fremdblutgabe  
Künstliche Hämoglobin-Lösungen

## 1.2 Einfluß der Lagerungsdauer auf Erythrozytenkonzentrate

Transfundierte Erythrozyten sollten eine Reihe von Eigenschaften besitzen, um ihre Aufgabe als Transporteur für Sauerstoff zur Versorgung von Gewebe erfüllen zu können. Als solche sind zu nennen:

- I. ausreichende Kapazität der Sauerstoffbindung bei erhaltener Fähigkeit, diesen wieder abzugeben,
- II. eine angemessene Lebensdauer nach Transfusion,
- III. günstige rheologische Eigenschaften, um insbesondere auch in der Mikrozirkulation ihre Funktionen zu erfüllen. Bekanntermaßen werden die eben genannten Faktoren stark von der Lagerungsdauer sowie dem verwendeten Stabilisator beeinflusst.

Die mit der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten in „additiver“ Lösung auftretenden metabolischen Veränderungen gehen mit einer Verschlechterung zahlreicher rheologischer Parameter einher, wie z.B. Verformbarkeit und Aggregabilität der Blutzellen (163). Dabei kommt es unabhängig vom Stabilisator wie z.B. ACD [Adenin-Citrat-Dextrose] oder CPD [Citrat-Phosphat-Dextrose] bei 4° C innerhalb von Wochen zu einer Abnahme von ATP, zu einer Formveränderung der Erythrozyten, wie z.B. Echinozyten und/oder Sphärozyten und zu einer Zunahme der Viskosität (63). Das ATP dient dabei als Energieträger für die Aufrechterhaltung der erythrozytären Funktion und ist, genauso wie die Redoxäquivalente (z.B. NADH/NAD) obligat für die Sauerstoffträgerfunktion des Erythrozyten. Für die Affinität des Sauerstoffs am Hämoglobin ist der Gehalt von 2,3-DPG (2,3-Diphosphoglycerat) wesentlich. Mit zunehmender Lagerungsdauer der Blutkonserven kommt es zu einem Abfall der 2,3-DPG-Konzentration. Dies führt zu einer Verstärkung der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, so daß Sauerstoff zwar leichter aufgenommen, dafür aber schwerer abgegeben wird (66). Fitzgerald et al. belegten dies anhand eines Tiermodells. Im Tierversuch konnten Erythrozytenkonzentrate, die länger als 28 Tage gelagert waren, die Gewebeoxygenierung nicht verbessern, obwohl sich die Tiere in einem Sauerstoffangebot (DO<sub>2</sub>) abhängigen Zustand befanden. Bei der Transfusion von frischen Erythrozytenkonzentraten hingegen erfolgte ein Anstieg der DO<sub>2</sub> (39). Dies belegt, daß die Sauerstofftransportfähigkeit auch von der Lagerungsdauer abhängig ist.

Die Lagerungsdauer von Erythrozytenkonzentraten beeinträchtigt ebenso die Zelldeformabilität. Diese ermöglicht die Passage von Erythrozyten durch Kapillaren, welche einen geringeren Durchmesser haben als der Erythrozyt selbst. Da sich die Fähigkeit zur Formveränderung während der Lebensdauer des Erythrozyten (~120 Tage) verringert, wird die Fähigkeit zur Formveränderung zum Selektionsmerkmal für die Elimination der Erythrozyten aus der Zirkulation (14, 127).

Der Zusatz von verschiedenen „additiven“ Lösungen bei der Lagerung von Erythrozytenkonzentraten hat nicht nur einen Einfluß auf die Veränderung der Gesamtzellverformbarkeit sondern auch auf das Fließverhalten der Erythrozyten. Die Gesamtzelldeformierbarkeit der Erythrozyten wird durch die Membranverformbarkeit und die Viskosität des Zellinhaltes bestimmt (104). Nachdem in der hier vorgestellten Studie gleiche additive Lösungen angewandt wurden, wird auf eine detaillierte Beschreibung unterschiedlicher Stabilisatoren verzichtet.

### 1.3 Sauerstofftransport

Um eine adäquate Organfunktion gewährleisten zu können, benötigt der Körper ausreichend Sauerstoff. Dabei spielt der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ) eine wesentliche Rolle. Nachdem der Sauerstoff ( $O_2$ ) in der Lunge die alveolär/kapilläre Membran passiert hat, gelangt er in das Blut. Dort wird  $O_2$  zum größten Teil chemisch an das Hämoglobin gebunden; ein kleinerer Anteil ist im Plasma physikalisch gelöst. Beide Transportmöglichkeiten zusammen beeinflussen den arteriellen Sauerstoffgehalt ( $CaO_2$ ) des Blutes. Dieser ergibt sich aus der/dem:

- Hämoglobinkonzentration (Hb) im Blut
- arteriellen Sauerstoffsättigung des Hämoglobins ( $S_aO_2$ )
- Sauerstoffbindungskapazität des Hämoglobins (Hüfner'sche Zahl 1,34)
- arteriellen  $O_2$ -Partialdruck ( $p_aO_2$ )
- physikalischen Löslichkeit von  $O_2$  im Plasma  
( $0,0029 \text{ ml } O_2 \text{ dl Plasma}^{-1} \text{ mmHg}^{-1}$ )

Es gilt folgende Formel:

$$\text{CaO}_2 = ([\text{Hb}] \cdot \text{S}_a\text{O}_2 \cdot 1.34) + (\text{p}_a\text{O}_2 \cdot 0,0029)$$

Das Sauerstoffangebot ( $\text{DO}_2$ ) an den Körper setzt sich zusammen aus dem Produkt von Herzzeitvolumen (HZV) und arteriellem Sauerstoffgehalt ( $\text{CaO}_2$ ).

$$\text{DO}_2 = \text{HZV} \cdot \text{CaO}_2$$

Der Sauerstoffverbrauch ( $\text{VO}_2$ ) des Körpers definiert sich als das Produkt von HZV und der arterio-venösen Sauerstoffgehaltsdifferenz ( $\text{CvO}_2 = \text{Venöser Sauerstoffgehalt}$ ).

$$\text{VO}_2 = \text{HZV} \cdot (\text{CaO}_2 - \text{CvO}_2)$$

Sielenkämper et al. untersuchten die Auswirkungen von frischem Vollblut (Hkt 30 %), frischen Erythrozytenkonzentraten (Hkt 70 %), 4-5 Wochen lang gelagerten Erythrozytenkonzentraten (Hkt 70 %) und dem künstlichen Sauerstoffträger DCLHb<sup>TM</sup> auf das systemische Sauerstoffangebot und den Sauerstoffverbrauch (157). Sie stellten fest, daß septische Ratten in einem durch Hämodilution induzierten  $\text{DO}_2$  abhängigen Status je nach Gabe von verschiedenen Hämoglobin-Konzentraten unterschiedlich mit der  $\text{VO}_2$  reagierten. Nur vier von zwölf Tieren überlebten den vorgegeben Zeitraum nach Infusion von 4-5 Wochen gelagerten Erythrozytenkonzentraten. In den restlichen Versuchsgruppen kam es nach Versuchsbeginn bei allen Tieren zu einem  $\text{VO}_2$ -Anstieg im Vergleich zu den Ausgangswerten. Erstaunlicherweise wurde dieser  $\text{VO}_2$ -Anstieg nur in den Gruppen mit frischem Blut (Hkt 30 %) und frischen Erythrozytenkonzentraten (Hkt 70 %) mit einem Anstieg der  $\text{DO}_2$ -Werte beobachtet. Die „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ zeigte diesen  $\text{DO}_2$ -Anstieg nicht; es kam jedoch im Vergleich zu den Ausgangswerten und zu den Gruppen mit frischem Blut (Hkt 30 %) und frischen Erythrozytenkonzentraten (Hkt 70 %) zu einer Erhöhung der Sauerstoffextraktionsrate.

Auch Marik et al. beschäftigten sich mit der Frage, ob unterschiedlich lang gelagerte Erythrozytenkonzentrate einen unterschiedlichen Sauerstofftransport aufweisen. An 23 septischen Patienten wurde sowohl das systemische  $\text{DO}_2$ , der systemische  $\text{VO}_2$  als auch der gastrale intramukosale pH-Wert ( $\text{pH}_i$ ) gemessen. Bekanntermaßen stehen Abweichungen des  $\text{pH}_i$ -Wertes in direktem Zusammenhang mit einer Änderung der Sauerstoffversorgung des

Gastrointestinaltraktes (7, 67, 98). Marik et al. stellten fest, daß die Gabe von insgesamt 750 ml Erythrozytenkonzentrate, die länger als 15 Tage gelagert waren, bei diesen Patienten den systemischen Sauerstoffverbrauch nicht verbesserten. Darüber hinaus kam es sogar zu einem signifikanten Abfall des pHi's (113). (Abb. 1)

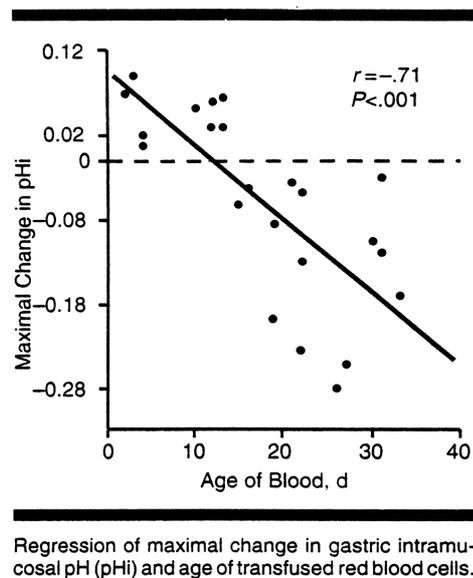


Abb. 1: nach Marik und Sibbald, 1993 (113)

#### 1.4 Künstliche Sauerstoffträger

Künstliche Sauerstoffträger bieten eine andere Möglichkeit entstehende Engpässe und Risiken in der Transfusionsmedizin zu minimieren. Aufgrund der oben aufgeführten medizinischen Risiken, der enormen Kostenentwicklung und der rückläufigen Spenderbereitschaft bei zunehmenden Bedarf, stellt ein „künstlicher Blutersatz“ eine wünschenswerte Option für die heilende Medizin dar; im zivilen Gesundheitswesen als auch im militärischen Bereich.

Die Verbreitung von HIV regte im Jahr 1986 ein intensives Forschen zum Einsatz von „künstlichen Sauerstoffträgern“ an. Heute kennt man zwei Hauptgruppen von Sauerstoffträgern; die Gruppe der Perfluorocarbone und die der Hämoglobinlösungen.

Bei den Perfluorocarbonen handelt es sich um synthetische Flüssigkeiten, welche die Löslichkeit von physikalisch gelöstem Sauerstoff erhöhen. Sie können in großen Mengen

unter absoluter Sterilität produziert werden. Ein Nachteil der Perfluorocarbone liegt in ihrer geringen Sauerstofftransport-Kapazität. Dem kann durch Beatmung mit 100 % igem Sauerstoff entgegengewirkt werden. Diese Gruppe der künstlichen Sauerstoffträger ist allerdings nicht Ziel der hier präsentierten Studie. Auf eine detaillierte Erläuterung wird daher verzichtet.

Die Alternative stellen Hämoglobinlösungen dar. Hier handelt es sich um Blutersatz-Lösungen, die Hämoglobinmoleküle enthalten, welche aus humanem oder bovinem Blut extrahiert wurden.

Das menschliche „adulte“ Hämoglobin besteht aus vier Proteinketten (zwei  $\alpha$ -Ketten und zwei  $\beta$ -Ketten). Jede dieser Ketten enthält eine Häm-Gruppe, welche aus einem Protoporphyrinring mit Eisenanteil ( $\text{Fe}^{2+}$ ) besteht. Ein mol Hämoglobin kann vier mol Sauerstoff binden. Somit kann ein Gramm Hämoglobin  $1,34\text{ml} \cdot \text{g}^{-1}$  Sauerstoff binden. Dies wird als die Hüfner'sche Zahl bezeichnet (77).

Bekanntermaßen finden sich Blutgruppen-Antigene auf der Erythrozytenmembran. Dementsprechend beinhalten reine modifizierte Hämoglobinlösungen keine Blutgruppen-Antigene. Somit entfallen eine Blutgruppenbestimmung und der Kreuztest beim Einsatz von Hämoglobinlösungen, was auch deren sofortigen Einsatz im Notfallwesen ermöglicht; insgesamt würden damit wertvolle Zeitreserven eingespart (84).

Ein weiterer Vorteil der künstlichen Sauerstoffträger im Vergleich zu den Erythrozytenkonzentraten ist die lange Haltbarkeit von Hämoglobinlösungen. Sie können entweder als Trockenpulver (19) oder als fertige Substanz tief gefroren bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  länger als ein halbes Jahr gelagert werden. Kurz vor dem Gebrauch können sie zur fertigen Injektionslösung aufgeschüttelt werden.

Bereits im Jahre 1898 veröffentlichte von Starck einen Bericht über Versuche mit Hämoglobinlösungen an Hunden (160). Im Jahre 1949 berichteten Amberson et al. über eine 22-jährige Frau mit schwerer, postpartal aufgetretener uterinen Blutung. Die Patientin war hypoton und nicht ansprechbar; sie befand sich im Zustand des schweren hämorrhagischen Schocks. Der bestehende Hämoglobinwert lag bei  $2,7\text{ g/dl}$ . Da Fremdblutkonserven nicht vorhanden waren und der Zustand der Patientin sehr kritisch war, wurde entschieden, eine selbst hergestellte, stromafreie Hämoglobinlösung (SFH) einzusetzen. Nach der Injektion von  $2300\text{ ml NaCl}$  mit  $250\text{ g Hämoglobin}$  stabilisierten sich die Kreislaufverhältnisse; die Patientin wurde wieder ansprechbar. Damit wurde zum ersten Mal am Menschen die Effektivität von stromafreien Hämoglobinlösungen belegt (5). Aufgrund der Nebenwirkungen

von freiem Hämoglobin verstarb jedoch die Patientin am 9. postpartalen Tag an Nierenversagen. Diese und andere Nebenwirkungen von Hämoglobinlösungen basieren darauf, daß es in den Anfangsjahren der experimentellen Forschung über SFH nicht gelungen ist, die Stroma- und Membranreste ausreichend aus den Hämoglobinlösungen zu extrahieren. Tatsächlich führen verunreinigende Stroma- und Membranreste zu nephrotoxischen Nebenwirkungen (40, 49). Eine zusätzliche Erklärung liegt in der Instabilität des Hämoglobinmoleküls. Unmodifizierte Hämoglobinmoleküle mit einem Molekulargewicht von 64,5 kD tendieren dazu, in Dimere zu zerfallen. Aufgrund der verringerten Molekulargröße können diese leicht im Glomerulus der Niere filtriert werden. Folglich kommt es zu einer massiven Anhäufung von Proteinen im Tubulus. Dies kann zum Nierenversagen führen (56). Brandt et al stellte dies bereits 1951 fest. In einer Studie mit 14 Probanden und Patienten kam es nach Infusion von 8-30 g SFH zu einem Rückgang des renalen Plasmaflusses, der Diurese und Natriurese (17). Als weitere Nebenwirkungen sind die Aktivierung des Gerinnungssystems und Komplementsystems beschrieben (38, 126). Schließlich können SFH-Verunreinigungen mit z.B. Endotoxin zu Fieber, Schüttelfrost und abdominellen Beschwerden mit Erbrechen führen (28, 159). Ein weiterer Punkt muß beachtet werden: Durch die Abwesenheit des normalerweise intrazellulär lokalisierten reduzierten Nikotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NADH, Reduktion von Methämoglobin zu Hämoglobin) wird bei SFH zusätzlich eine vermehrte Methämoglobinbildung festgestellt (28).

Wie bei jedem Fremdstoff, muß an eine mögliche Immunisierung gedacht werden. Tierstudien belegen jedoch, daß sowohl eine einmalige als auch eine repetitive Injektion homologer Hämoglobinlösungen zu keiner Immunisierung des Empfängers führt. Dagegen induziert die Applikation heterologer Hämoglobinpräparate eine Immunreaktion, z.B. in Form erhöhter IgG-Titern (20, 27, 70).

Insgesamt führt die hohe Komplikationsrate bei der Infusion von vermeintlich stromafreien Hämoglobinlösungen zu der Schlußfolgerung, daß diese Hämoglobinlösungen biochemisch noch weiter vorbehandelt werden müßten, um komplikationsfrei Infusionen zu ermöglichen.

Durch biotechnologische Methoden wie z.B. dem Cross-linking, der rekombinanten Modifikation, der Mikroenkapsulation und der Ultrafiltration des Hämoglobins ist es gelungen, die Nebenwirkungen von unmodifizierten Hämoglobinlösungen weitestgehend aufzuheben. Zusätzlich konnte das Infektionsrisiko mit HIV, HBV HCV etc. durch Pasteurisierung und Sterilisation auf annähernd Null gesenkt werden (52).

Ursprünglich als Nachteil bewertet wurde die mit Hämoglobin einhergehende Vasokonstriktion. Sie erklärt sich durch das (Weg)-Binden von NO, einem starken Vasodilatator, durch das Hämoglobinmolekül. Dieser Vorgang wird als „NO-scavenging“ bezeichnet. NO, welches in Endothelzellen der Gefäße gebildet wird, kontrolliert den Tonus der glatten Gefäßmuskulatur. Ein Anstieg von NO führt zu einer Relaxation der Gefäßmuskulatur, wodurch der Blutdruck gesenkt wird. Kommt es aufgrund von freien Hämoglobinmolekülen zu einem Abfall der NO-Konzentration, steigt der Gefäßmuskeltonus an. Dies äußert sich in einer Vasokonstriktion und führt zu einem Blutdruckanstieg (46, 86, 106, 151, 156). Andere Hypothesen, zur Erklärung der Vasokonstriktion, schließen ein: die Endothelin-Freisetzung (59, 151) sowie das Zusammenwirken von adrenergen Reflexreaktionen (57, 59).

Stellt man den Zusammenhang der Sauerstoffsättigung des Hämoglobins ( $\text{SO}_2$ ) mit dem jeweils gegebenen Sauerstoffpartialdruck ( $\text{pO}_2$ ) graphisch dar, so erhält man eine sigmoidal verlaufende Sauerstoffbindungskurve. Betrachtet man die Sauerstoffbindungskurve einer reinen SFH, so ist ein deutlicher Unterschied des  $\text{p}_{50}$ -Wertes im Vergleich zu „frisch gelagertem Blut“, oder zu „14-Tage lang gelagertem Blut“, oder zu einer modifizierten Hämoglobinlösung zu erkennen. Der  $\text{p}_{50}$ -Wert wird in mmHg angegeben und gibt den Sauerstoffpartialdruck an, bei dem eine 50 % Sättigung des Hämoglobins mit Sauerstoff vorliegt. Durch die Abwesenheit von 2,3-DPG beim reinen Hämoglobin ist die Affinität zu Sauerstoff sehr hoch. Der  $\text{p}_{50}$ -Wert liegt hier bei 10 mmHg. Daher sind SFH zum Einsatz der Gewebeoxygenierung ungeeignet (87). Bei der modifizierten Hämoglobinlösung handelt es sich in diesem Fall um das „Diaspirin cross-linked hemoglobin“ (DCLHb<sup>TM</sup>). Es ist eine leichte Rechtsverschiebung der Kurve im Vergleich zu frischem Blut (Halbsättigungsdruck=26 mmHg) zu erkennen. Diese Rechtsverschiebung führt zwar zu einer erschwerten Sauerstoffaufnahme bei relativ niedrigen Sauerstoffpartialdrücken, hat aber den positiven Effekt, Sauerstoff im Gewebe leichter abzugeben (Halbsättigungsdruck=32 mmHg).

Im Vergleich dazu ist eine Sauerstoffbindungskurve für Erythrozyten mit einer Lagerungszeit von 14 Tagen abgebildet. Deutlich ist eine „links“ - Verlagerung der Kurve zu erkennen mit den eben erwähnten, gegenteiligen Effekten (Halbsättigungsdruck=16 mm). (Abb. 2)

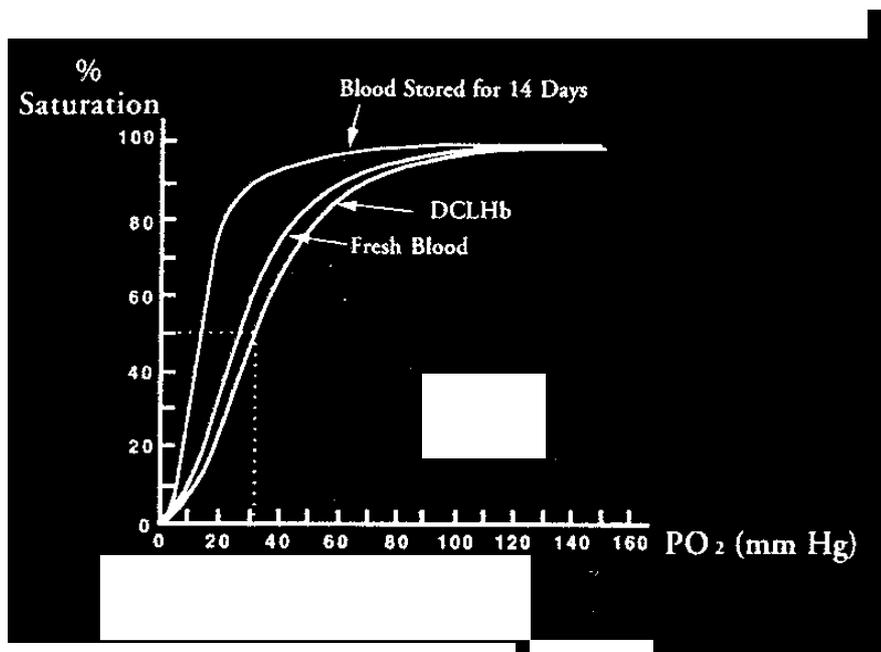


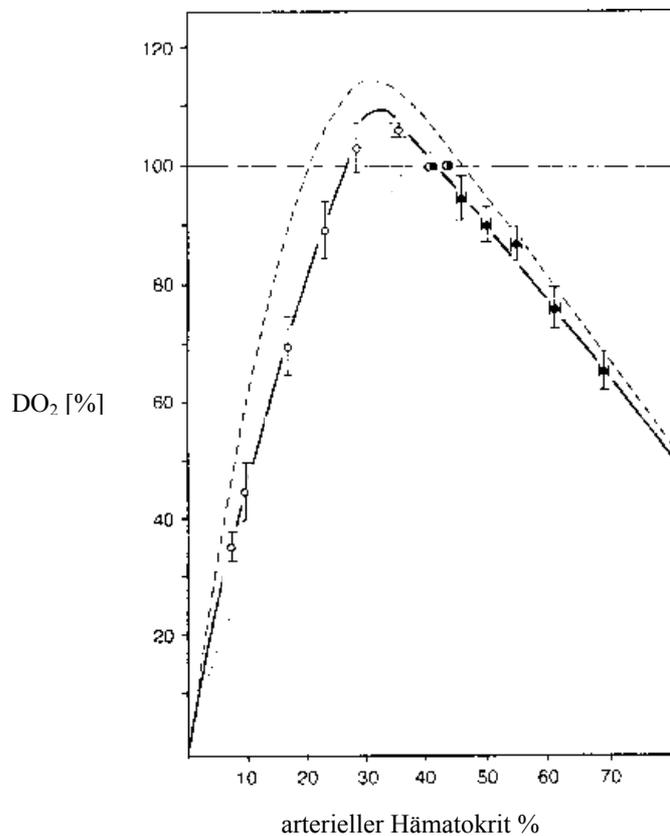
Abb. 2: nach Farmer et al. 1995 (37)

In einer in-vitro Studie von Goldman et al. aus dem Jahr 1998 wird auf eine weitere Problematik azellulärer Hämoglobinlösungen hingewiesen. Goldman et al. belegen die Hypothese, daß chemisch modifizierte Hämoglobinlösungen zytotoxisch auf die Endothelzellen wirken; sie weisen im Vergleich zu unbehandelten reinen Erythrozyten, eine veränderte Redox-Reaktions-Aktivität auf. Durch die Abwesenheit der intrazellulären erythrozytären Enzyme (z.B. die Deferoxaminase, Superoxiddismutase oder Katalase), kommt es zu einem Anstieg z.B. von freiem Eisen und Sauerstoffradikalen. Diese wirken zytotoxisch auf die Endothelzellen und führen letztendlich zum Zelltod (50).

### 1.5 Isovolumische Akute Hämodilution

Die isovolämische Akute Hämodilution ist definiert als der Austausch von Eigenblut mit einer kristalloiden (Verhältnis 1:4) oder kolloiden (Verhältnis 1:1) Lösung (94). Diese führt zu einer Reduktion des Hämatokritwertes und folglich der Viskosität. Zu beachten ist, daß das Blut bei einem Hämatokrit von 30 %, gemessen an der schergradabhängigen Viskositätsänderung, ein rheologisches Optimum besitzt (161). Aufgrund der Viskositätsabnahme kommt es zu einer Senkung der Nachlast. Diese führt durch den verringerten Widerstand zu einer Erhöhung des HZV. Der HZV-Anstieg führt im Zustand der Hämodilution initial zu einer Erhöhung der DO<sub>2</sub>, da das HZV im Verhältnis zum CaO<sub>2</sub>

überproportional stark ansteigt. Sein Maximum findet der  $DO_2$ -Anstieg bei einem Hämatokrit von etwa 30 % und fällt dann bei weiterer Hämodilution zunehmend ab. Die Isovolumische Austauschtransfusion bis zu einem Hämatokrit von 30 % führt also zu einem erhöhten Sauerstoffangebot an das Gewebe (123). (Abb. 3)



Sauerstoffangebot in Prozent in Abhängigkeit des Hämatokrits. Zu beachten ist das verbesserte Sauerstoffangebot bei einem Hämatokrit von 30 % durch isovolämische Austauschtransfusion.

Abb. 3: modifiziert nach Sunder-Plassmann et al., 1971 (161)

### 1.5.1 Fragestellung

Anhand der bisher aufgeführten Aspekte der Transfusionsmedizin stellte sich die Frage, welche Einflüsse die Lagerungsdauer von Erythrozytenkonzentraten im Vergleich zu frischem syngenen Vollblut und einer künstlichen Hämoglobinlösung auf die Mikrozirkulation im Hamster hat. Zur Abklärung dieser Fragestellung soll das im folgenden beschriebene Modell und Protokoll dienen.

## **2 Material und Methoden**

### **2.1 Versuchstiere**

Zur Durchführung der Versuche wurden Syrische Goldhamster im Alter von 6-8 Wochen und einem Körpergewicht von 45-60 g gewählt. Die Tiere stammten aus der Zucht der Firma Charles-River-Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland). Im Tierstall herrschte eine Raumtemperatur von 24°C bei einer Luftfeuchtigkeit von circa 50 %. Die Tiere wurden bei einem 12 Stunden hell-dunkel Rhythmus mit handelsüblichem Futter für Nagetiere (Altromin® Standarddiät Ratten/Mäuse, Altromin GmbH & Co KG, Lage, Deutschland) und Leitungswasser ad libidum gehalten. Als Einstreu wurde Sägespäne verwendet. Nach chirurgischem Eingriff wurden die Tiere in Einzelkäfigen gehalten. In die Versuche wurden nur Tiere aufgenommen, die keine Anzeichen von Erkrankungen aufwiesen sowie normales Fress-, Putz- und Spielverhalten zeigten.

### **2.2 Versuchsmodell**

#### *2.2.1 Mikrozirkulationsmodell der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster*

Als Modell wurde die Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster gewählt. Endrich et al. (1980) beschrieben erstmals die Möglichkeit der Rückenhautpräparation mit dem Ziel eine intravitale mikroskopische Untersuchung am wachen Tier durchzuführen (33). Im Bereich der Mikrozirkulation hat sich dieses Modell zu einer wichtigen und anerkannten Methode bei der Beurteilung der Mikrozirkulation unter physiologischen und pathophysiologischen Bedingungen entwickelt (78, 101, 119).

Die aus Titan bestehende Rückenhautkammer mit einem Gewicht von ca. 4,5 g (Institut für Chirurgische Forschung, München, Deutschland) besteht aus zwei Kammerhälften und einer im Zentrum liegenden Öffnung von ca. 11 mm Durchmesser. In dieser Öffnung befindet sich ein 0,1 mm dickes Deckglas, welches mittels eines Kupfersprenglings fixiert wird. Um die Rückenhaut des Hamsters an der Kammer fixieren zu können wurden kleine Löcher für Haltefäden am oberen Ende der Kammer gebohrt. Wie auf Abbildung 4 erkennbar, dienen drei Verbindungsschrauben der definitiven Fixierung der beiden Kammerhälften an die Rückenhaut. Um eine Kompression der Kammerpräparation zu verhindern, wird zwischen

den beiden Kammerhälften eine Distanzmutter befestigt, die für einen Abstand von ca. 0,45 mm der beiden Kammerhälften sorgt. Durch das in der Mitte der Kammer liegende Deckglas können mit Hilfe der Durchlicht- und Fluoreszenzmikroskopie sämtliche Gefäßabschnitte des darin enthaltenen quergestreiften Rückenhautmuskels beobachtet werden. Es handelt sich hierbei um Arteriolen, präkapilläre Arteriolen, dem nutritiven Kapillarnetz, postkapilläre Venolen und die Sammelvenolen. (Abb. 4, 5)

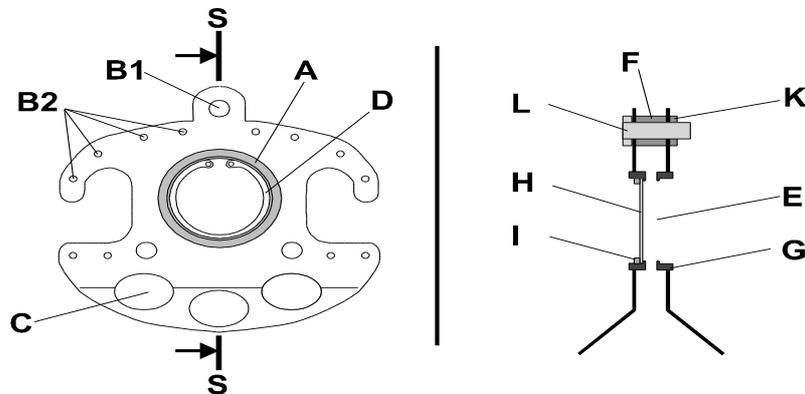
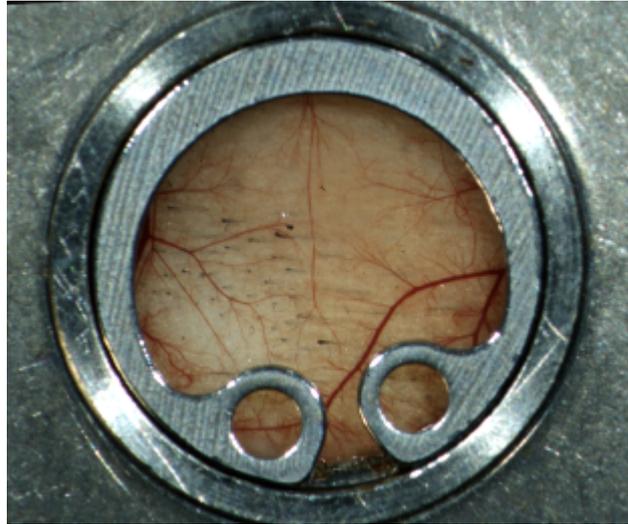


Abb. 4: Konstruktionsskizze einer Rückenhautkammer. Links: Seitenansicht der Rückenhautkammer bestehend aus zwei spiegelbildlich durch Schrauben miteinander verbundenen Kammerhälften. A = Öffnung zur intravitalmikroskopischen Untersuchung; B1 = Bohrung für Schrauben zur Fixierung der Distanzmutter und Adaptierung der beiden Kammerhälften; B2 = Bohrung für Haltefäden; C = Öffnungen im Bereich des Sattels zur Reduktion des Kammergewichts; D = Sprengring aus Kupfer zur Fixation des Deckglases. Rechts: Frontalschnitt (S-S) mit E = optischem Ausschnitt, F = Abstandshalter, G = Kammerring, H = Deckglas, I = Sprengring, K = Mutter und L = Schraube; nach Nolte 1995 (131)



*Abb. 5: Ausblick auf das Sichtfenster einer implantierten Rückenhautkammer. Deutlich ist die Gefäßstruktur in der Rückenhautmuskulatur zu erkennen.*

### *2.2.2 Implantation der Rückenhautkammer*

Zwei bis vier Tage vor dem eigentlichen Versuchsbeginn erfolgte die Implantation der Rückenhautkammer. Hierfür nutzten wir die von Endrich et al (33) beschriebene Methode. Zur Implantation wurden sterilisierte chirurgische Instrumente sowie sterilisierte Rückenhautkammern mit den dazugehörigen Sprengringen, Schrauben, Distanzmuttern und Deckgläschen verwendet. Nach erfolgreicher intraperitonealer Narkose der Versuchstiere mit einer Kombinationsanästhesie aus Ketamin/Xylazin (0,07 ml Kochsalzlösung, 125 mg/kg/KG) Ketaminhydrochlorid (Ketanest<sup>®</sup>, Parke-Davis, Berlin, Deutschland) und 15 mg/kg/KG Xylazin (Rompun<sup>®</sup> med, Fa. Hans Schwarzkopf GmbH, Hamburg, Deutschland) wurde die Rückenhaut der Tiere großflächig durch eine Elektrorasur (Electra GH 204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und anschließender Epilation (Plica med., Olivia, Hamburg, Deutschland) enthaart und mit Kodanspray (Kodan, Schulte-Mayr, Norderstedt, Deutschland) desinfiziert. Der nun folgende operative Eingriff wurde auf einem auf 37 °C vorgeheizten Kleintieroperationstisch (Fa. IFB, Hiddenhausen, Deutschland) durchgeführt. Während sich das Versuchstier in Bauchlage befand, wurde mit Hilfe einer Gegenlichtlampe die Rückenhaut von kranial nach kaudal verlaufend so gefaltet, daß der Gefäßverlauf der extendierten Rückenhaut zu sehen war. Mittels eines kranialen und eines kaudalen Haltefadens (Ethibond<sup>®</sup>, grün geflochten, 5-0, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) wurde die Rückenhautfalte in extendierter Position an einem Stativ fixiert. Dabei war darauf zu achten, daß sich die Gefäße der rechten und der linken Körperhälfte möglichst überlagerten

und nicht im Operationsbereich lagen, um bei der anschließenden Präparation der Rückenhaut so wenig Blutungen wie möglich zu verursachen. An der dem Operateur abgewandten Hautfalte wurde der Teil der Rückenhautkammer, der die Distanzmutter und die zwei Schrauben enthielt, mit Hilfe von zwei Haltefäden fixiert. Die beiden sich basisnah befindenden Schrauben wurden unter zu Hilfenahme einer kleinen Hautinzision durch die zwei Hautschichten hindurchgestochen und mit einer chirurgischen Moskitoklemme befestigt. Im zukünftigen Areal des Sichtfensters der Rückenhautkammer wurde die Haut zirkulär in einem Durchmesser von ca. 15 mm mit einer mikrochirurgischen Schere entfernt. Anschließend wurde der Hamster auf die Seite gelagert, so daß unter einem Operationsmikroskop (Fa. Wild, Typ M650, Heeresbrugg, Schweiz) die nächsten Operationsschritte durchgeführt werden konnten. Bei zehnfacher Vergrößerung wurde die Subcutis, der Hautmuskel, das subcutane Fettgewebe und der Musculus retractor unter zu Hilfenahme von chirurgischem Operationsbesteck entfernt. Nachfolgend wurde das subcutane Fettgewebe und der Musculus retractor der anliegenden Hautschicht freipräpariert. Somit war in dem zuvor als Untersuchungsareal definiertem Gebiet nur noch die Cutis, Subcutis und der quergestreifte Hautmuskel vorhanden. (Abb. 6).

Diese Hautschicht ist die optimale Ausgangssituation zur Durchführung der Intravitalmikroskopie (101).

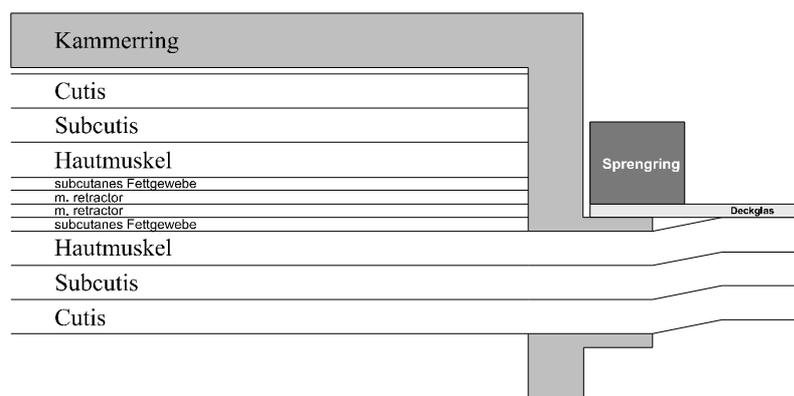
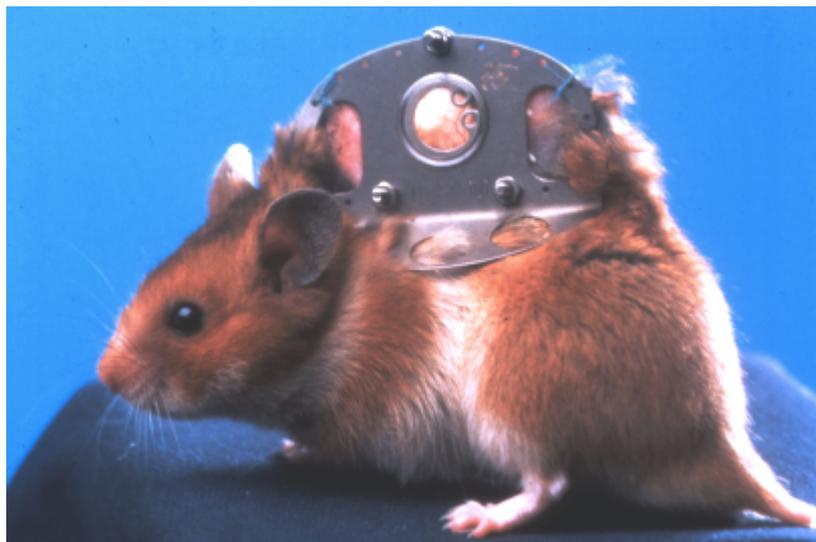


Abb. 6: Hautschichten im Bereich des Kammerrings und Fixierung des Deckglases mit Hilfe des Sprengrings; nach Nolte, 1998 (128)

Während des gesamten chirurgischen Eingriffs mußte darauf geachtet werden, daß die Gewebsschichten stets mit physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten wurden. Die oft nicht vermeidbaren Blutungen wurden mit kleinen saugfähigen Tupfern (Sugi®, Eschenburg, Deutschland) gestillt. Nach abgeschlossener Präparation wurde das Gegenstück der Rückenhautkammer, die das Deckglas enthielt, auf der präparierten Hautseite befestigt. Das Deckglas wurde mit physiologischer Kochsalzlösung benetzt um während der Fixation eine Blasenbildung unter diesem Sichtfenster zu verhindern. Das freipräparierte Gewebsareal wurde somit vor Austrocknung, Infektion und Trauma geschützt. Zur Fixation der Rückenhautkammer dienten die Basis nah liegenden Halteschrauben, wobei die zwei chirurgischen Moskitoklemmen wieder entfernt werden mußten. Bei der Fixierung der Rückenhautkammern war es wichtig, daß es zu keiner Druck-Kompression der Gefäße kam. Als letzten Schritt der Implantation wurde die Rückenhautkammer an den dafür vorgesehenen Bohrlöchern am Kammerrand mit Haltefäden vollständig fixiert. (Abb. 7)



*Abb. 7: Syrischer Goldhamster mit implantierter Rückenhautkammer. Deutlich sind die 3 Schrauben zu erkennen, welche die Kammer transdermal auf dem Rücken fixieren.*

### *2.2.3 Implantation der Dauerkatheter*

24-48 Stunden nach Implantation der Rückenhautkammer erfolgte die Insertion der Verweilkatheter im Bereich der rechten A. carotis interna und der rechten V. jugularis externa. Die dabei verwendete Narkose wurde oben beschrieben. Als erster Schritt mußte die

Halsregion der Hamster mit der bereits erwähnten Creme enthaart und mit Kodanspray desinfiziert werden. Als nächstes wurden die Verweilkatheter richtig plaziert. Hierbei verwendeten wir einen großlumiger Abbocath (Abbocath<sup>®</sup>, 18G • 51mm, Fa. Abbott, Ingelheim, Deutschland). Der Abbocath wurde am kranialen Ende der Rückenhautkammer unter die Haut eingeführt, subcutan unter der rechten Halsregion bis in den Bereich der Zielgefäße A. carotis interna und V. jugularis externa vorgeschoben und transcutan wieder nach außen geführt. Über den Abbocath war es nun möglich zwei ca. 25 cm lange mit Heparin benetzte Polyethylenkatheter (PE-10, 800-110-100-100, Innendurchmesser 0,28 mm, Außendurchmesser 0,56 mm, Portex Ltd. Lythe, Kent, Großbritannien) im Operationsfeld zu plazieren. Anschließend wurde der Abbocath wieder entfernt, und an die beiden Katheterenden wurden jeweils eine mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllte Insulinspritze (1 ml Spritze Plastipatz<sup>□</sup>, Decton, Dickinson, USA) angeschlossen. Der Hamster lagerte nun in Rückenlage auf zwei ca. 20 • 10 • 5 cm großen Plexiglasblöcken zwischen welchen sich die Rückenhautkammer befand. Um sich eine bestmögliche Ausgangssituation für den anschließenden operativen Eingriff zu schaffen wurde der Kopf des Hamsters in leicht überstreckter Haltung positioniert. Dies erfolge mit Hilfe eines Katheterschlauches der um die Nagezähne des Oberkiefers gelegt wurde und zusätzlich einer als Gewicht dienenden Tuchklemme. Im Bereich der Medioclavicularlinie erfolgte nun paratracheal mit Hilfe des bereits oben erwähnten Operationsmikroskops eine ca. 2 cm lange Längsinzision der Haut. Nach Freilegung und Mobilisierung des Fettkörpers mit Hilfe von mikrochirurgischen Pinzetten wurden die im Trigonum caroticum liegenden Gefäße von Fettgewebe befreit und dargestellt. Nun galt es die V. jugularis externa zu finden. Es wurden drei Ligaturen (Perma-Hand<sup>®</sup> Seide, schwarz geflochten, 6-0, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) in Form von Schlingen um die V. jugularis externa gelegt. Die kranial gelegene Schlinge wurde sofort zugezogen und verknotet. Mit Hilfe einer mikrochirurgischen spitzen Pinzette war es möglich die Vene etwas anzuheben und mit einer kleinen mikrochirurgischen Schere zu inzidieren. Über diese kleine Öffnung der Vene wurde nun einer der beiden Katheter eingeführt und über die V. subclavia in die V. cava superior vorgeschoben. Um diesen venösen Katheter zu fixieren, wurden die zwei anderen Schlingen so festgezogen und verknotet, daß sich die Schlingen sowohl um das Gefäß als auch um den Katheter zuzogen. Um den Katheter nicht nur intravasal sondern auch extravasal zu fixieren, wurde der Katheter zusätzlich mit der kranial liegenden Ligatur befestigt. Nun war es möglich, durch leichte Aspiration der Insulinspritze, die sich am Ende des Katheters befand, die korrekte intravasale Lage des Katheters zu beurteilen. Die Insertion des arteriellen Katheters erfolgte nach der

gleichen Methode. Zusätzlich wurde die A. carotis interna mit einer mikrochirurgischen Klemme abgeklemmt um bei der Inzision des Gefäßes größere Blutverluste zu vermeiden und um einen stetigen Einblick in das Operationsfeld zu ermöglichen. Beim Verschieben des Katheters in das Gefäßlumen wurde die Klemme wieder entfernt. Fixierung und Überprüfung der Lage des Katheters erfolgte nach dem oben geschilderten Verfahren. Nach erfolgreicher Implantation der Verweilkatheter wurde das zuvor ausgelagerte Fettgewebe wieder an seinen Platz zurückgelegt und die Haut mit einigen Einzelknopfnähten (Ethibond® 5-0, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) verschlossen. Die Katheterenden wurden unter Verwendung eines Feuerzeuges verschlossen und um die kranialen und kaudalen Enden der Rückenhautkammer aufgewickelt. Einige 0,5 cm breite Leukosilstreifen (Fa. Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) dienten der endgültigen Fixierung der Katheter an der Rückenhautkammer.

#### *2.2.4 Gefäßversorgung und Gefäßstruktur des Rückenhautmuskels*

Die von Zweifach und Metz 1955 vorgeschlagene Nomenklatur (177) der mikrozirkulatorischen Gefäßstruktur der Rückenhautkammer des Hamsters wurde von Funk und Meßmer überarbeitet und neu definiert (42, 43). Sie beschreiben die Versorgung der Rückenhaut durch zwei Gefäßhauptstämme (A0) welche in einem Abstand von 2-3 cm den dorsalen Interkostalarterien entspringen und in Höhe der Scapularlinie in die Haut eindringen. Über Gefäßarkaden (A1) zweigen sich die Gefäßhauptstämme auf, welche dann durch den Hautmuskel in das subcutane Gewebe eintreten und mit Gefäßen aus dem Kopf und Schwanzbereich in Verbindung stehen. Aus Standardisierungsgründen zur Präparation der Rückenhautkammer befindet sich das Sichtfenster immer im Bereich des kranialen A0-Gefäßes. Dadurch kommt nur ein etwa 3-5 mm langes Teilstück der A1-Arkade im Sichtbereich der Kammer zum Vorschein.

Aus den Arkadengefäßen zweigen 2-3 vertikale Arterien (A2) ab, welche im subcutanen Fettgewebe verlaufen. Diese stehen am unteren Kammerrand mit einem aus der A. brachialis entstammenden Hautgefäßsystem in Verbindung. Die A2-Gefäße werden von den kranialen und ventralen A1-Gefäßen perfundiert. Eine weitere Aufzweigung in A3-Arteriolen erfolgt getrennt für das subcutane Fettgewebe und den Hautmuskel. Etwa 15-18 der oberflächlich liegenden A3-Gefäße sind im Fenster der Rückenhautkammer sichtbar. Von den A3-Arteriolen zweigen etwa je 3-8 A4-Arteriolen ab die sich wiederum in je 4-10 Kapillaren aufteilen. Die Kapillaren des Hautmuskels verlaufen parallel zu den Muskelfasern bei einer

Länge von 200-1000  $\mu\text{m}$  und stehen mit kleinen quer verlaufenden Verbindungskapillaren in Kontakt. Der venöse Abfluß erfolgt über Sammelvenolen, welche im Verhältnis zu den A4-Arteriolen etwa 2 mal häufiger vorkommen. Aus 5-10 der genannten Sammelvenolen bildet sich eine Venole. Diese verläuft parallel zu den A1-A2-Arterien im subcutanem Gewebe und mündet in die Venen ein. (Tabelle 3, Abb. 8)

	A2	A3	A4	Kapillaren
Anzahl der sichtbaren Gefäße	2-3/A1	5-7/A2	3-8/A3	4-10/A4
Durchmesser ( $\mu\text{m}$ )	30-70	12-25	6-15	4-6
Länge (mm)	3-8	0,1-0,5	0,03-0,1	0,05-0,1

Tabelle 3: nach Funk und Meßmer, 1986 (42)

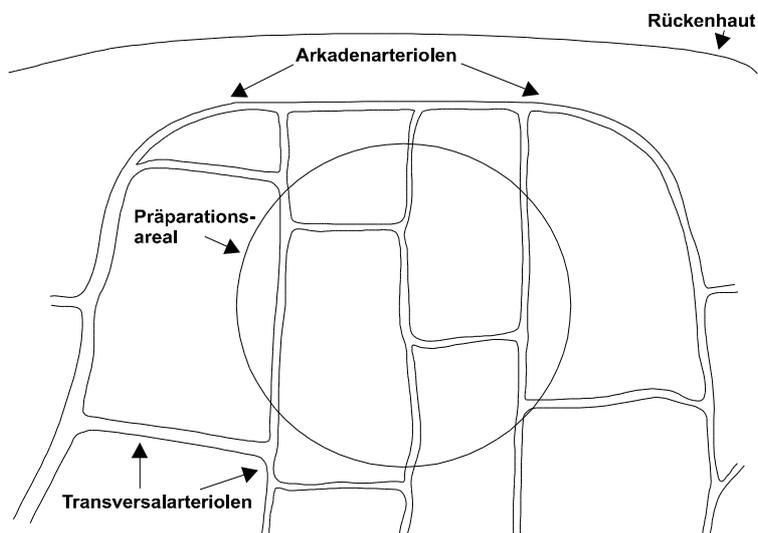


Abb. 8: Arterielle Gefäßversorgung des Rückenhautkammergewebes und Lage des Präparationsareals; nach Nolte, 1998 (128).

### 2.2.5 Kriterien der Präparation und Mikrozirkulation

Mindestens 24 Stunden mußten zwischen dem letzten Eingriff am Versuchstier und dem geplanten Versuchsbeginn liegen. Nur Tiere, die ein normales Schlaf- und Eßverhalten zeigten, wurden in die eigentlichen Versuche miteinbezogen. Des weiteren mußte das Gewebe der Rückenhaut sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch die allgemein akzeptierten Bedingungen einer intakten Mikrozirkulation erfüllen (154). Dabei war darauf zu achten, daß folgende Kriterien nicht auftraten:

- petechiale Blutungen, Hämorrhagien oder Eiter im Kammerbereich
- Dilatation und Kinking von Kammergefäßen
- Neovaskularisation am Kammerrand
- Ödembildung
- Abflußbehinderung im Bereich postkapillärer Venolen (venoläre Blutzellgeschwindigkeit  $> 0,3$  mm/s)

## 2.3 Untersuchungsmethoden

### 2.3.1 Makrohämodynamik

Als makrohämodynamische Parameter wurden der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) sowie die Herzfrequenz (HF) über einen arteriellen Verweilkatheter kontinuierlich aufgezeichnet. Die HF wurde anhand der arteriellen Druckamplitude fortlaufend registriert und ermittelt. Der mittlere arterielle Blutdruck wurde mittels eines Statham<sup>□</sup>-P23DB Druckwandler (Viggo-Spectramed, Oxnard, Kalifornien, USA) gemessen und kontinuierlich aufgezeichnet.

### 2.3.2 Mikrohämodynamik

Um die Mikrozirkulation der quergestreiften Rückenhautmuskulatur untersuchen und analysieren zu können wurde die intravitale Fluoreszenzmikroskopie als Untersuchungsverfahren gewählt. Mit diesem Verfahren ist es möglich, am lebenden, wachen

Tier, ohne Einsatz von Anästhetika verschiedene mikrohämodynamische Parameter zu ermitteln und zu bewerten (33).

### *2.3.3 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie*

Um die intravitale Fluoreszenzmikroskopie am wachen Tier durchführen zu können, mußten die Tiere immobilisiert werden. Hierzu bediente man sich einer Plexiglasröhre mit einem Durchmesser von ca. 3,5 cm. Diese Röhre enthielt einen schmalen Schlitz, durch den beim Einführen des Tieres die Rückenhautkammer samt der Hautfalte herausragte. Damit das Tier während seines Aufenthaltes in der Plexiglasröhre genug Luft zum Atmen bekommt, wurde die Röhre mit vielen kleinen Bohrlöchern versehen. Um die Plexiglasröhre für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen ausreichend zu fixieren, wurde eine Plexiglasplatte mit einer Haltevorrichtung für die Rückenhautkammer konzipiert. Somit war während der folgenden Beobachtungszeit die Rückenhautkammer stets gut gesichert. Die Plexiglasplatte wurde auf einer Untersuchungsplattform befestigt, welche, auf zwei Bolzen stehend, auf dem Mikroskopiertisch festgeschraubt war. Die Ausgangsposition der Plexiglasplatte war somit zu Beginn eines Versuchs stets identisch. Da der Nullpunkt als Bezugspunkt für alle Veränderungen bei allen Versuchen einheitlich war, gelang es über diese Fixierung, die Untersuchungsplattform (mit Plexiglasröhre und Versuchstier) vom Mikroskopiertisch zu entfernen und die korrekte Ausgangspositionen später wieder zu finden. Der Mikroskopiertisch war über einen computergesteuerten Schrittmotor in X-Y-Achsen-Richtung beweglich und konnte ebenfalls zentriert werden. Somit war es auch hier möglich, alle Ausgangspositionen exakt wieder zu finden. Schlußendlich bot diese Vorrichtung die Möglichkeit innerhalb der Präparation einer Rückenhautkammer verschiedene Beobachtungsfelder exakt zu reproduzieren.

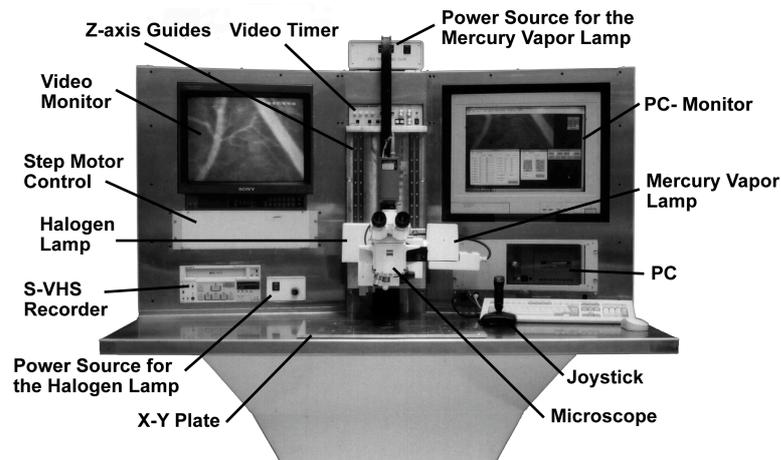


Abb. 9: Intravitalmikroskopische Aufnahmeeinheit bestehend aus Intravitalmikroskop, Kamera, Videogerät, Video- und Computer-Monitor, Joystick, Mikroskopiertisch mit computergesteuertem Schrittmotor; nach Harris et al., 1997 (65).

Das Mikroskop Axiotech vario ist mit einem Projektionsokular mit 1,25 fachem Vergrößerungsfaktor (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ausgestattet. Die intravitalmikroskopischen Übersichtsaufnahmen wurden mit einem Immersionsobjektiv Archoplan 10 x /0,3 W und einem Immersionsobjektiv 2,5 x /0,075 W plan-Neofluran durchgeführt. Zur Analyse der intravitalen mikrozirkulatorischen Aufnahmebilder wurde ein 20 x /0,5 W Archoplan Immersionsobjektiv (Zeiss) verwendet. Auf einer CCD-Kamera (charge cobbled device) FK 6990 IQ-S (Lichtempfindlichkeit 0,02 Lux, 699 x 581 Bildpunkte, Fa. Pieper, Schwerte, Deutschland) konnten unter Verwendung eines FSA-Tubus-GW die intravitalmikroskopischen Bilder aufgezeichnet werden. Das gesamte Mikroskop war an einem Mikro-Makrotrieb aufgehängt, welches zur Feinfokussierung diente. Als Lichtquellen dienten eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe HBO 100 W (Zeiss) für die Aufnahmen mit Rhodamin 6G (Mr 472, 02 D, Fa. Sigma Chemicals Comp., Deisenhofen, Deutschland) und eine stufenlos regulierbare Halogenlampe 12 V, 100 W (Zeiss) für die Aufnahmen mit FITC-Dextran (Mr 150 000 D, Sigma Chemicals Comp., Deisenhofen, Deutschland). Die entsprechenden Bandpaßfilter 09 BP 450-490, FT 510 (FITC-Dextran, Anregungsbereich blau) und 15 BP 546/12, FT 580 (Rhodamin 6G, Anregungsbereich grün) wurden mittels eines Fluoreszenzfilterschiebers für den jeweiligen Fluoreszenzmarker

eingesetzt. Zusätzlich zum Auflicht ließ sich mittels einer unter dem Mikroskopiertisch angebrachten Kaltlichtquelle (Kaltlichtfontaine 485, Fa. Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) eine Durchlichtbetrachtung der Präparation durchführen. Ein Wechsel des Filters und des Anregungslichtes ermöglichte das Aufnehmen von Videosequenzen der zuvor definierten Gefäßabschnitte. Um eine Auswertung der folgenden Parameter durchzuführen, wurden die Extravasation von FITC-Dextran, der Gefäßdurchmesser, die Blutfließgeschwindigkeit sowie die funktionelle Kapillardichte (FKD) in FITC-Dextran-Kontrastierung aufgenommen, die Leukozyten/Endothel-Interaktion in Rhodamin 6G Kontrastierung. Über einen Videozeitgenerator (VT 633; Fora Company Ltd., Tokyo, Japan) wurden Datum und Uhrzeit in das Bild eingeblendet und dem Videorecorder (SvO-9500 MDP, Sony GmbH, Köln, Deutschland) zugeführt. Mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde wurden die Videobilder aufgezeichnet und während der Versuche zur Beobachtung und Kontrolle online auf einem Videobildschirm (PVM-2043 MD Sony GmbH) projiziert. (Abb. 9)

#### *2.3.4 Auswerteeinheit*

Im offline Verfahren, also nach Beendigung der Versuche, wurden die Videobänder mittels computerunterstützten Mikrozirkulations-Analyse-Systems (Cap-Image) ausgewertet (65, 93). Kernstück dieses Systems bildet die „eigentliche“ Bildverarbeitungseinheit, IP-512 (Imaging Technologie Inc., Woburn, USA) die zusammen mit einem Computer (M380 XPI, Olivetti, Italien), dem Videomonitor (PVM-1442QM, Sony GmbH) und dem Farbbildschirm ein einheitliches System darstellt. (Abb. 10)

*Abb. 10: Technischer Aufbau (Hardware) des Cap-Image-Bildanalyse-Systems; aus Klyszcz et al., 1997 (93).*

### 2.3.5 *Mikrohämodynamische Parameter*

Als mikrohämodynamische Parameter wurden die folgenden intravitalmikroskopischen Parameter quantitativ erfaßt:

1. Gefäßdurchmesser
2. postkapilläre venoläre Blutfließgeschwindigkeit
3. Funktionelle Kapillardichte
4. Leukozyten/Endothel-Interaktion
5. Extravasation
6. Scherrate

#### 2.3.5.1 Kontrastverbessernde Maßnahmen

Zur Kontrastverbesserung bei Durchlicht wurde ein 443 nm Filter verwendet. Er ist vornehmlich für Licht mit einer Wellenlänge im Absorptionsbereich von Hämoglobin durchlässig. Der Einsatz dieses Filters beschränkte sich auf die Auswahl geeigneter Gefäßabschnitte für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen. Ziel war es, so wenig Licht wie möglich auf das mit Fluoreszenzmarker behandelte Gewebe zu bringen, um phototoxische Reaktionen gering zu halten (44, 124).

Für die Bearbeitung und Auswertung der intravitalmikroskopischen Parameter wurden zwei verschiedene Fluoreszenzmarker eingesetzt: Rhodamin 6G und FITC-Dextran (150 000 D).

- Rhodamin 6G (Mr 472.02 D, Fa. Sigma Chemicals Comp., Deisenhofen, Deutschland) dient der intravitalen Markierung von Leukozyten. Es wurde in einer Dosis von 0,15 mg/kg/KG intravenös verabreicht. Diese Dosierung schließt eine Hemmung der oxidativen Phosphorylierung durch Rhodamin 6G sicher aus (45).
- FITC-Dextran (Mr 150 000 D., Fa. Sigma Chemicals Comp., Deisenhofen, Deutschland), Fluoreszeinisothiocyanat gekoppelt an Dextran, ist ein hochmolekularer Plasmamarker. Wird dieser Plasmamarker mit einer Wellenlänge

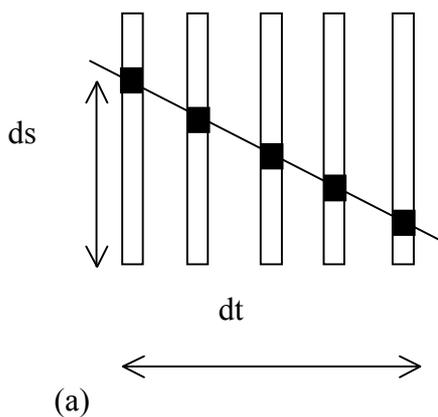
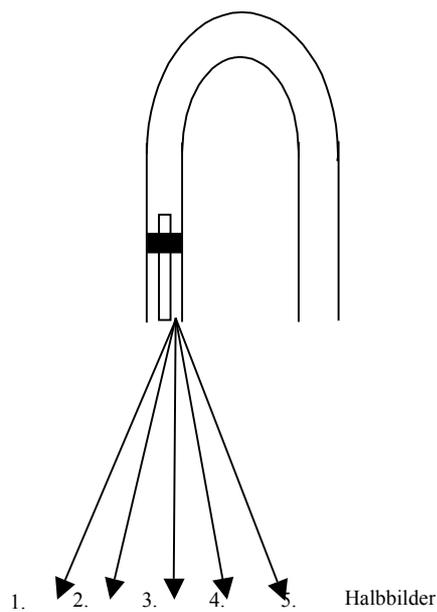
von unter 500 nm (Exzitationsmaximum 490 nm) angeregt, so emittiert er ein weißgelbliches Licht mit einer Wellenlänge von 525 nm. Dies bewirkt einen deutlichen Kontrastunterschied der durch Plasma angefärbten hellen Gefäße und des restlichen dunkel erscheinenden Gewebes. FITC-Dextran dient somit der Bestimmung des Gefäßdurchmessers, der Blutfließgeschwindigkeit, der Extravasation und der funktionellen Kapillardichte. Die Dosierung betrug intravenös 0,06 mg/kg/KG.

#### 2.3.5.2 Bestimmung des Gefäßdurchmessers

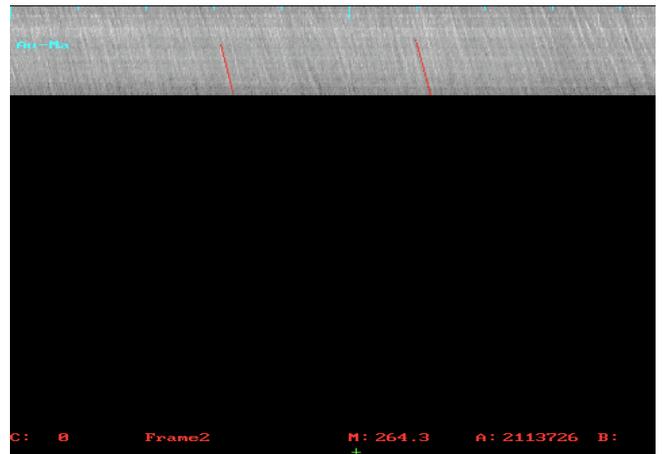
Zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers wurde die automatische Methode der Gefäßdurchmesserbestimmung des Cap-Image-Systems benutzt (175). Bei dieser Methode wird zunächst durch "Anklicken" von zwei Punkten eine Strecke innerhalb des Blutgefäßes entlang des Gefäßverlaufes gelegt. Von dieser Linie aus wird in beide Richtungen eine Senkrechte bis über die Gefäßränder hinaus gezogen. Dadurch wird die Meßlinie festgelegt, von deren Mitte die Gefäßränder am Ort der maximalen Steigerung der Grauwertkurve automatisch ermittelt werden. Nach 30 Einzelmessungen wird ein Mittelwert ermittelt.

#### 2.3.5.3 Bestimmung der postkapillären venolären Blutfließgeschwindigkeit

Zur Bestimmung der postkapillären venolären Blutfließgeschwindigkeit wurde die Line-Shift-Diagramm-Methode des Cap-Image-Systems verwendet (94). Während der Blutfließgeschwindigkeitsmessung werden für jedes Halbbild die Grauwertdaten entlang einer Meßlinie gelesen und in einem Bildspeicher als vertikale Linien nebeneinander geschrieben. Nach Ablauf der definierten Messequenz wird der Bildspeicher mit den aneinandergereihten Meßlinien angezeigt. Durch „Anklicken“ dieser schrägen Linien im Line-Shift-Diagramm wird automatisch deren Steigung ermittelt und daraus die Geschwindigkeit berechnet  $v = ds/dt$  [mm/s]. (Abb. 11)



(a)



(b)

$$V = \frac{ds}{dt} \text{ (mm / s)}$$

Abb. 11: Schematische Darstellung der Line-Shift-Diagramm-Methode: Während der Messung werden für jedes Halbbild die Grauwertdaten entlang der Meßlinie erfaßt (a) und in einem Bildspeicher als vertikale Linien nebeneinander geschrieben. Nach Ablauf der Messequenz wird der Bildspeicher mit den aneinandergereihten Meßlinien angezeigt (b). Wenn sich z.B. während einer Messequenz eine helle Plasmalücke entlang der Meßlinie fortbewegt, wird diese Fortbewegung im Diagramm der nebeneinander gezeichneten Grauwertlinien als helle, schräg verlaufende Linie sichtbar, da die helle Plasmalücke auf der Meßlinie von Halbbild zu Halbbild je nach Flußrichtung jeweils etwas nach unten bzw. nach oben wandert; nach Klyszcz et al., 1997 (93).

### 2.3.5.4 Bestimmung der Funktionellen Kapillardichte

Die Funktionelle Kapillardichte (FKD) ist definiert als die Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfenster ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ). Sie stellt ein Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes dar (131). Dabei berücksichtigt sie lediglich jene Kapillaren, die mit roten Blutkörperchen perfundiert sind. Unberücksichtigt bleiben alle Kapillaren, welche nur mit Blutplasma perfundiert werden, bzw. Kapillaren mit fehlender Perfusion. Zur Bestimmung der FKD werden auf dem Monitor im offline Modus die abgebildeten perfundierten Kapillaren nachgezeichnet (174). Mit Hilfe von Cap-Image wird die Länge der nachgezeichneten Kapillaren als Quotient des untersuchten Gewebeareals berechnet ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ). (Abb. 12)

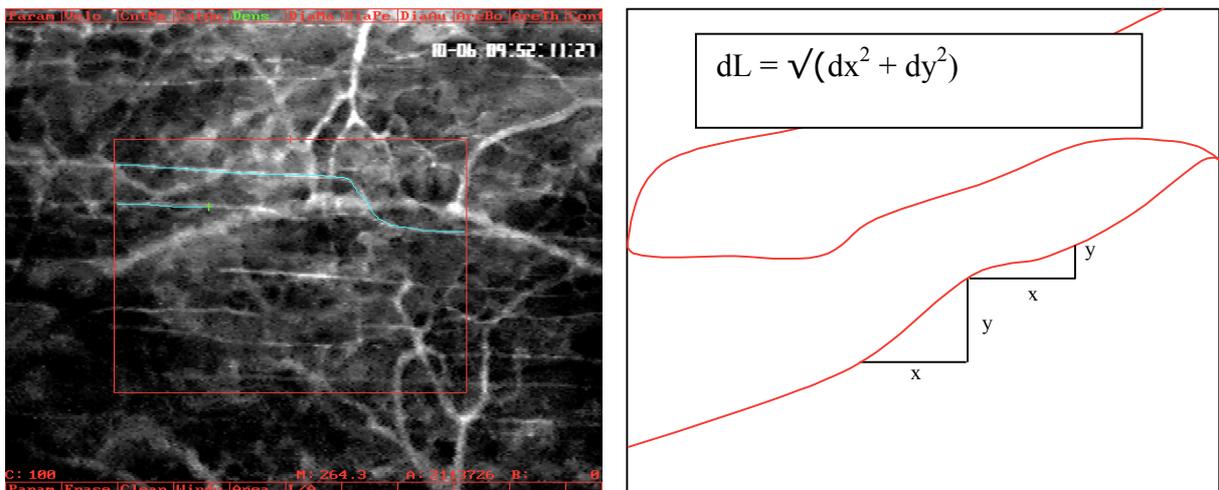


Abb. 12: Prinzip der pythagoräischen Kapillarlängenbestimmung; modifiziert nach F-U Sack et al., 1987; F-U Sack, 1992 (140, 141).

### 2.3.5.5 Bestimmung der Leukozyten/Endothel-Interaktion

Um die Leukozyten innerhalb eines Gefäßsegmentes zu zählen wurde der betreffende Abschnitt 30 sek. lang online auf Videoband aufgenommen. Bei der Auswertung wurden je nach Leukozyten/Endothel-Interaktion die Leukozyten in drei verschiedene Klassen eingeteilt:

- Nicht-adhärenente Leukozyten sind Zellen, die im zentralen Blutstrom ohne Kontakt mit dem mikrovaskulären Endothel die auf dem Monitor gezogene Linie überqueren. Sie sind definiert als Zellen, die pro Minute Beobachtungszeit ein Gefäßsegment passieren (Zellen/min.).
- Rollende Leukozyten sind im Randstrom fließende Zellen, die sich am mikrovaskulären Endothel mit deutlich geringerer Geschwindigkeit bewegen als der zentrale Blutstrom. Sie werden angegeben als Zellen, die pro Minute ein Gefäßsegment passieren (Zellen/min.). (Abb. 13)
- Adhärenente Leukozyten sind definiert als die Zellen, die sich während der Beobachtungszeit von 30 sek. in dem zuvor gekennzeichneten 200 µm langen Gefäßabschnitt nicht vom Gefäßendothel lösen. Sie werden als Zellen pro mm<sup>2</sup> Endothelfläche angegeben (Zellen/mm<sup>2</sup>). (Abb. 14)

Die Anzahl der adhärenenten Leukozyten pro mm<sup>2</sup> Endothelfläche (AL) kann aus dem Gefäßdurchmesser, der Länge des untersuchten Gefäßabschnittes (200 µm), der Anzahl adhärenenter Leukozyten und der Kreiskonstante  $\pi$  wie folgt berechnet werden:

$$AL = (N \cdot 10^6) / (D \cdot \pi \cdot L)$$

D= Gefäßdurchmesser in µm

N= Anzahl adhärenenter Leukozyten

L= Länge des Gefäßabschnittes (200 µm)

$\pi$  = Kreiskonstante

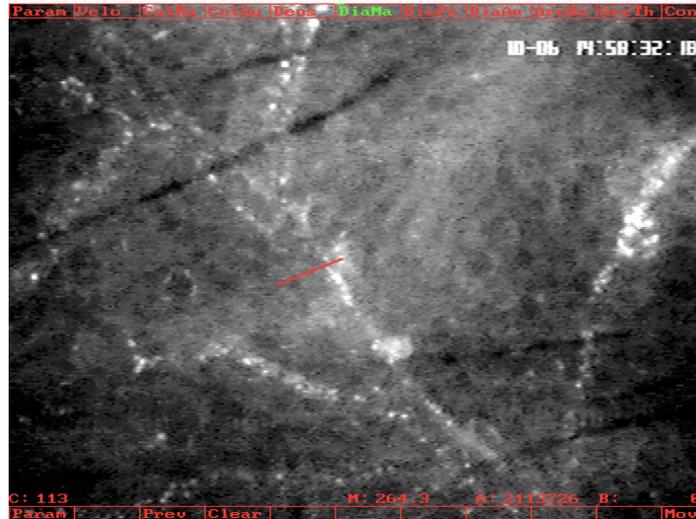


Abb. 13: Rollende Leukozyten bzw. Nicht-adhärenente Leukozyten. Es werden die Leukozyten gezählt, die während einer Beobachtungszeit von 60 sek. die rote Markierungslinie passieren.

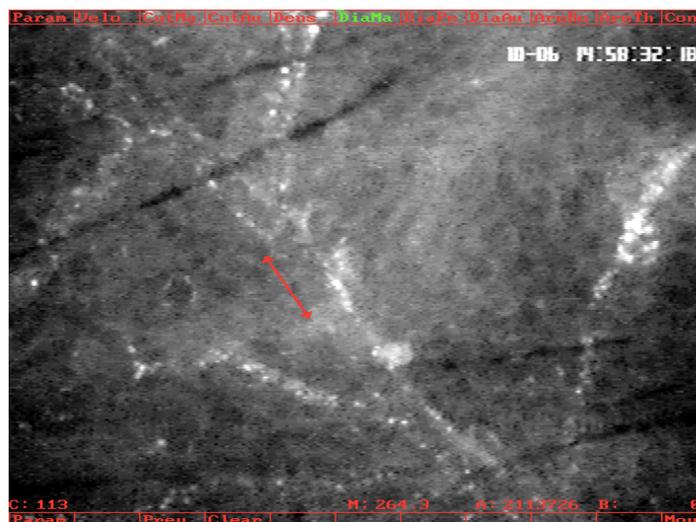


Abb. 14: Adhärenente Leukozyten. Es werden die Leukozyten gezählt, die während einer Beobachtungszeit von 30 sek. sich von dem gekennzeichneten Gefäßabschnitt mit einer definierten Länge nicht lösen.

### 2.3.5.6 Bestimmung der Extravasation

Schröder et al. beschrieben 1976, daß unter physiologischen Bedingungen das mikrovaskuläre Endothel für FITC-Dextran 150 000 D nur geringfügig permeabel ist (150). Kommt es jedoch zu einer Störung der Endothelschrankenfunktion, führt dies zu einer Extravasation des Fluoreszenzmarkers in das perivaskuläre Gewebe. Dieser Austritt des hochmolekularen Plasmamarkers in das Interstitium führt zu einer Kontrastveränderung zwischen Gefäß und

Gewebe und wird als Parameter für die Permeabilitätsänderung densitometrisch gemessen und berechnet. Im offline Modus wurde mit Hilfe von Cap-Image der entsprechende Fluoreszenzintensitätsquotient ( $I_a/I_i$ ) berechnet.  $I_a$  beinhaltet die Fluoreszenzintensität außerhalb,  $I_i$  repräsentiert die Fluoreszenzintensität innerhalb des definierten Gefäßsegmentes. Die Werte wurden als dimensionslose Zahlen angegeben. (Abb. 15)

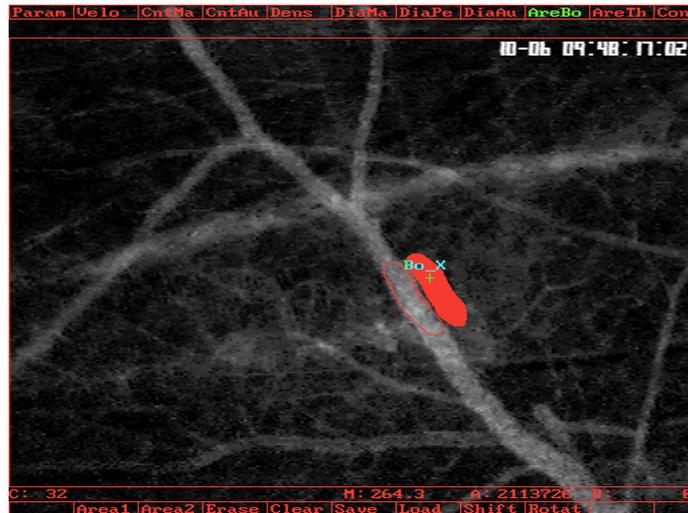


Abb. 15: Extravasation von FITC-Dextran. Mit Hilfe von Cap-Image wird der Kontrastunterschied zwischen dem mit FITC-Dextran markiertem Plasma des Gefäßes und dem Gewebe densitometrisch ermittelt (hier rot dargestellt). Eine Kontrastveränderung zwischen Gefäß und Plasma dient als Parameter für die Permeabilitätsänderung. Aus den beiden unterschiedlichen Fluoreszenzintensitäten wird die Extravasation berechnet.

### 2.3.5.7 Bestimmung der Scherrate

Das Zusammenwirken von Blutfließgeschwindigkeit und Gefäßdurchmesser hat physiologischer Weise Auswirkungen auf die auf zelluläre Bestandteile wirkenden Scherkräfte (76, 105). Diese Änderungen lassen sich mit der folgenden Formel berechnen:

$$\tau = 8 ( V_{\text{mean}} / D_v )$$

$\tau$  = Scherrate

D = Durchmesser des Einzelgefäßes,

V = Fließgeschwindigkeit

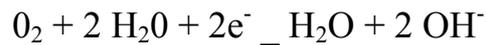
### 2.3.6 *Der Gewebe-Sauerstoffpartialdruck*

Das Sauerstoffangebot an den Körper setzt sich aus der arteriellen Durchblutung, dem Sauerstoffgehalt des Blutes und der nutritiven Perfusion des Gewebes zusammen. Bei konstantem Sauerstoffangebot bestimmen die Verteilung des mikrovaskulären Erythrozytenflusses und die Unterschiede im Sauerstoffverbrauch die regionale Gewebeoxygenierung. Als ein Maß für die regionale Gewebeoxygenierung wurde der Gewebe-Sauerstoffpartialdruck mit Hilfe eines bereits etablierten Verfahrens bestimmt (88). Unter physiologischen Bedingungen ist die Durchblutung des Gewebes im Bereich der Mikrozirkulation heterogen. Dies führt zu einer inhomogenen Sauerstoffversorgung und kann in unterschiedlichen Ergebnissen der Gewebe-Sauerstoffpartialdruckmessung resultieren. Um dennoch eine adäquate Messung der regionalen Oxygenierung zu gewährleisten und um den Sauerstoffdruck im Gewebe messen zu können, muß diese Problematik beachtet und mit entsprechenden Meßmethoden gelöst werden.

Eine von Kessler und Lübbers 1966 beschriebene Meßtechnik, den Gewebe-Sauerstoffpartialdruck mit Hilfe einer Mehrdraht-Oberflächen-sonde zu bestimmen (91), basiert auf einer Redox-Reaktion, auf die im Folgenden näher eingegangen wird.

#### 2.3.6.1 Meßprinzip der Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode

Die Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode (MDO-Elektrode, Eschweiler, Kiel) ist nach dem Clark-Prinzip aufgebaut (24) und basiert auf einem von Heyrovski entwickelten polarographischen Meßprinzip (72). Eine Meßeinheit setzt sich dabei aus einer Referenz-(Ag/AgCl) und einer Meßelektrode (Platin) zusammen. Beide Elektroden sind in einer Elektrolyt-Lösung (0,2 molares KCl) eingebracht und durch eine aufgebrauchte Teflonmembran von dem eigentlich zu messenden Medium getrennt. Die für Gase permeable Teflonmembran dient zur elektrischen Isolation der Elektrode von dem zu messenden Medium (55). Wird mit Hilfe eines Voltmeters eine negative Spannung an der Platinelektrode angelegt, kommt es zur Reduktion von Sauerstoff zu Wasserstoffperoxyd an der Elektrodenoberfläche:



Nach Aufnahme von zwei weiteren Elektronen entstehen zwei Hydroxylionen:



Dieser im Stromkreis fließende Diffusionsstrom steigt abhängig von der anliegenden Spannung so lange an, bis alle an der Elektroden-Oberfläche vorhandenen Sauerstoffmoleküle reduziert sind. Ist eine konstante Polarisationsspannung erreicht, so ist der über die Elektrode fließende gemessene Strom direkt von der im Medium gemessenen Sauerstoffkonzentration abhängig. Dieser Stromfluß ist somit dem Sauerstofftransport an die Meßelektrode direkt proportional und bildet dadurch die Grundlage einer genauen und kontinuierlichen Messung des lokalen Sauerstoffpartialdruckes.

#### 2.3.6.2 Aufbau der MDO-Elektrode

Aufgrund der im Gewebe vorhandenen Durchblutungsheterogenität und der unterschiedlichen regionalen Verteilung von Kapillaren variiert die regionale Oxygenierung stark. Um diese Heterogenität der regionalen Oxygenierung mit der bereits beschriebenen Methodik zusätzlich erfassen zu können, wurde im Jahre 1966 von Kessler und Lübbers die Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode (MDO) basierend auf der dem Clark-Prinzip aufgebauten Sonde entwickelt (91). Die MDO mißt nicht nur valide Gewebesauerstoffpartialdrücke, sondern ermöglicht zusätzliche Aussagen über die Heterogenität deren Verteilung (88).

Diese MDO besteht aus acht Platinelektroden (Meßelektrode) mit einem jeweiligen Durchmesser von 15 µm, welche annähernd in einer Spirale angeordnet sind. Diese Elektrodenspirale ist von einem chlorierten Silberring (Ag/AgCl-Referenzelektrode) umgeben. Jede der acht Elektroden ist über isolierte Drähte mit dem entsprechenden Kanal eines Verstärkers verbunden. (Abb. 16)

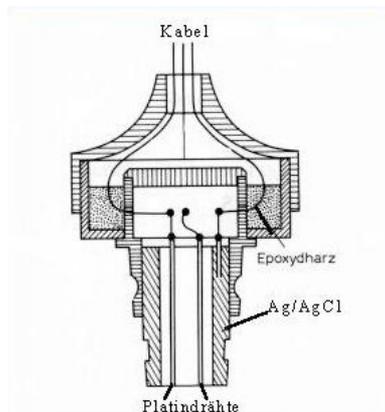


Abb. 16: MDO-Sonde im Querschnitt. Die Meßfläche hat einen Durchmesser von 5mm. Die Elektrode wiegt etwa 1,7 g.

### 2.3.6.3 Vorbereitung und Eichung der Elektrode

Um Verunreinigungen von der Platinelektrode zu entfernen wird vor Meßbeginn die Elektrode unter mehrmaligem Drehen auf einem Holzblock mit einem in destilliertem Wasser vermischten Silizium-Carbid-Puder poliert. Im Anschluß wird eine in 0,2 M KCl-Lösung getränkte, 12 µm dünne Cuprophan-Membran über die Auflagefläche der MDO gezogen, welche in Kontakt mit der Referenzelektrode steht. Die 0,2 M KCl-Lösung wird mit Hilfe von zweifach destilliertem Wasser hergestellt, um eine zusätzliche Verunreinigung mit anderen Ionen zu verhindern. Die Abdeckung der Elektrode wird mit einer 12 µm dünnen Teflonmembran abgeschlossen, welche die Elektroden von dem zu messenden Medium isoliert.

Vor Versuchsbeginn wird die vorbereitete MDO für mindestens zwei Stunden einem O<sub>2</sub>-haltigem Gasgemisch ausgesetzt. Unter diesen Bedingungen kommt es zur Ausbildung einer Polarisationschicht an der Platinoberfläche, welche zu einem Drift des Meßsignals führt. Dieser Vorgang stabilisiert sich nach zwei Stunden und der Drift erreicht einen Wert von weniger als 10 %, welcher im weiteren Verlauf noch weiter (< 2 %) abnimmt (48). Nach dieser Stabilisierungsphase erfolgt die eigentliche Eichung: diese erfolgt in destilliertem Wasser bei bekannten Sauerstoffpartialdrücken (N<sub>2</sub> mit 0,5 % und 21 % O<sub>2</sub>). Die Temperatur der Eichgase entspricht der jeweiligen Gewebetemperatur, in der Regel ca. 32 °C.

#### 2.3.6.4 Messung des Gewebe $pO_2$ in der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters

Um eine Messung des Gewebe-Sauerstoffpartialdruckes zu ermöglichen, wurde das Tier in die bereits beschriebene Plexiglasröhre eingeführt und auf der oben erwähnten Plexiglasplatte fixiert. Im Anschluß wurde das Deckglas der Rückenhautkammer entfernt und die MDO mit Hilfe eines speziellen Fixiersystem auf das freiliegende Gewebe bei konstantem Auflagedruck in Kontakt gebracht. Die Drehung der MDO in der vertikalen Achse ermöglicht das Prinzip der Vielpunkt-Meßtechnik. Für die Erhebung valider Gewebe- $pO_2$ -Werte ist aus den unter 2.3.6.2 erwähnten Gründen eine Vielzahl von Messungen erforderlich (89, 110, 132). Aufgrund der acht nach dem Zufallsprinzip angeordneten Meßelektroden können gleichzeitig acht Meßwerte aufgezeichnet werden. Nachdem man die Sonde dreht und sich die neuen  $pO_2$ -Werte innerhalb einiger Sekunden stabilisiert haben, werden diese erneut aufgezeichnet. Wird die Sonde 15 mal gedreht, können innerhalb kurzer Zeit 120 Meßwerte erhoben werden.

#### 2.3.6.5 Datenverarbeitung und Darstellung der Gewebe $pO_2$ -Messung

Die MDO entsendet ein analoges Signal im Pimcomeßbereich, welches verstärkt wird und mittels einer A/D-Wandlerkarte (p OV1<sup>□</sup>, MIB, Steindorf, Deutschland) in ein digitales Signal umgewandelt wird. Mit Hilfe einer dafür geeigneten Software (Dasy-Lab<sup>□</sup> Datalog, Mönchengladbach, Deutschland) können alle 8 Kanäle der Meßelektroden aufgezeichnet und kontinuierlich dargestellt werden. Die bei einer Messung erhaltenen  $pO_2$ -Werte werden in gleich große Gruppen aufgeteilt und auf der Abszisse aufgetragen. Der prozentuale Anteil der erhaltenen Meßwerte wird auf der Ordinate angegeben. (Abb. 17)

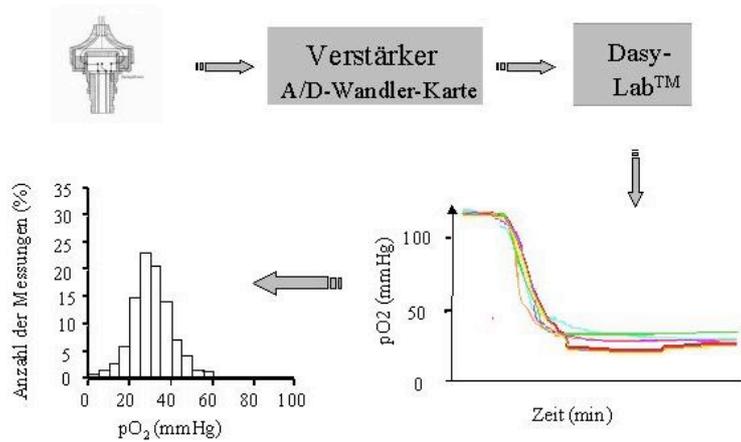


Abb. 17: Schematische Darstellung der Datenverarbeitung

Trotz der großen Variabilität der Kapillarstruktur, der Größe des Blutflusses und des zellulären Sauerstoffverbrauchs zeigen  $pO_2$ -Histogramme verschiedenster Organe eine überraschend große Ähnlichkeit. Dies läßt erkennen, daß die Sauerstoffversorgung durch ein hocheffizientes System präzise geregelt wird. Die größte Dichte der  $pO_2$ -Werte der Histogramme findet man in einem Bereich von etwa 15-30 mmHg. Ausnahmen davon sind die Nierenrinde, ein Gewebe mit hoher funktioneller Durchblutung, wie auch der Herzmuskel. In diesen Organen finden sich die höchsten  $pO_2$ -Werte. Unter normalen Bedingungen ist das  $pO_2$ -Histogramm links schief-glockenförmig. Seine Form und Lage sind ziemlich konstant. (Abb. 18)

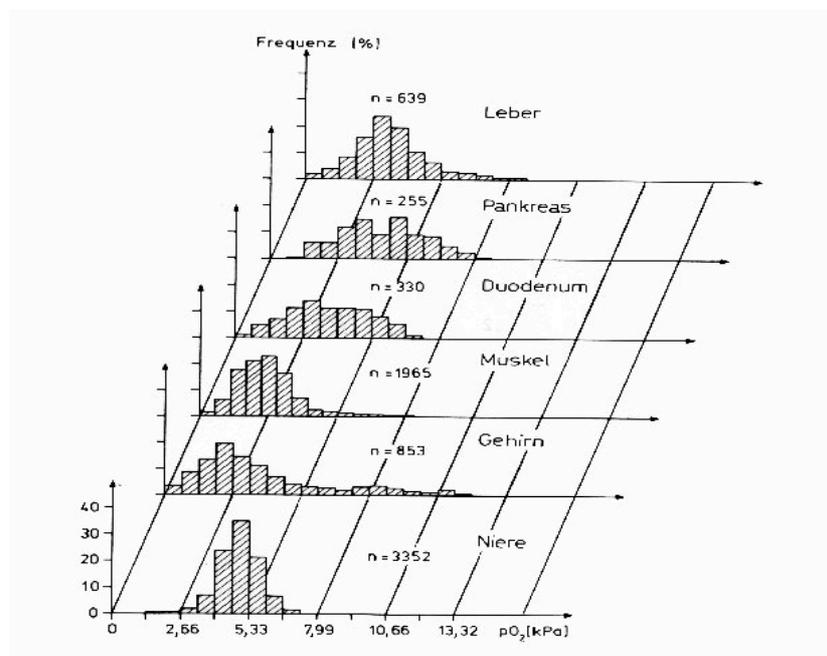


Abb. 18: nach Kessler, M et al.;1981 (90)

Am Beispiel eines narkotisierten Hundes im hämorrhagischen Schock soll hier nochmals die Auswirkung von hypoxischen  $pO_2$ -Werten auf die graphische Darstellung eines  $pO_2$ -Histogramms verdeutlicht werden. Im Vordergrund der Abbildung ist ein Histogramm unter physiologischen Bedingungen zu sehen, im Hintergrund ein unter pathophysiologischen Bedingungen. Hier haben die hypoxischen und anoxischen Werte den höchsten prozentualen Anteil, so daß sich das Histogramm ganz nach links verschiebt. (Abb. 19)

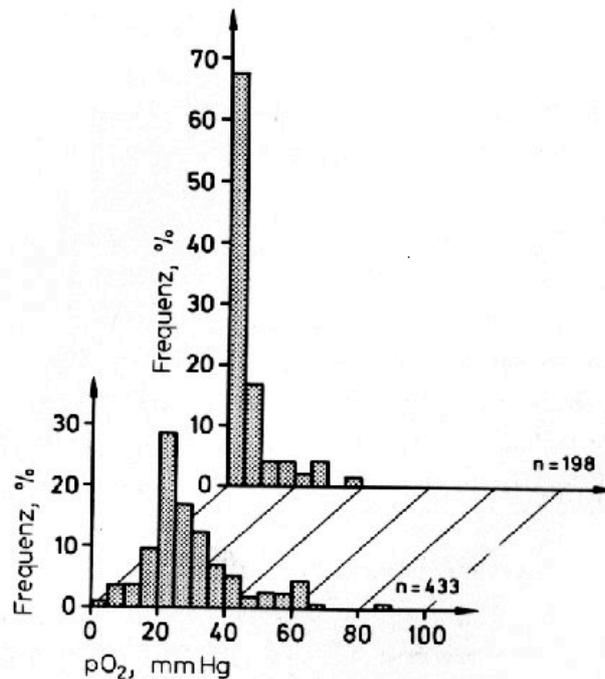


Abb. 19: nach Kessler, M et al.;1981 (90)

### 2.3.7 Experimentelles Protokoll

Nach Implantation der Rückenhautkammer und Insertion eines arteriellen und venösen Katheters wurde den Tieren vor Versuchsbeginn eine Erholungszeit von mindestens 24 Stunden gewährt, um Veränderungen durch die während der Kammerpräparation verursachten chirurgischen Traumata und/oder ein Einwirken der Narkose auf die Mikrozirkulation auszuschließen. Hierbei diente der venöse Katheter zur Applikation von Fluoreszenzmarkern und der Volumensubstitution. An den arteriellen Katheter ist eine Blutdrucksonde angeschlossen, so daß der mittlere arterielle Druck und die Herzfrequenz

kontinuierlich gemessen und aufgezeichnet werden konnten. Außerdem diente der Katheter der Blutentnahme zur Kontrolle und Bestimmung von Laborparameter (Blutbild, Blutgase, Laktat). Für die Untersuchungen (intravitale Mikroskopie, Messung des Gewebe-Sauerstoffpartialdrucks) wurden die Tiere wie unter Punkt 2.3.3 beschrieben immobilisiert und für den Versuch in der Plexiglasröhre auf der Plexiglasplatte fixiert. Je nach Versuchsanordnung wurde den Tieren DCLHb<sup>TM</sup> (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, Illinois, USA), Syngenes Vollblut oder Erythrozytenkonzentrate durch eine Isovolumische Austauschtransfusion verabreicht.

Zur Durchführung der Intravitalmikroskopie wurden im Durchlicht die zu beobachtenden Areale in der Rückenhautkammerpräparation aufgesucht und mittels des Computersystems als „sites of interest“ definiert. Diese „sites of interest“ wurden über den Schrittmotor des computergesteuerten Mikroskoptisches angesteuert und im PC-System abgespeichert, so daß zu jedem beliebigen Zeitpunkt die identischen Untersuchungsareale erneut angesteuert werden konnten. Dabei wurden pro Tier 4-6 Arteriolen (Durchmesser 10-40 µm), 2-4 postkapillären Venolen (Durchmesser 15-45 µm) und 2-4 Kapillaren zur Bestimmung der mikrozirkulatorischen Parameter als „sites of interest“ abgespeichert. Nach intravenöser Applikation der Fluoreszenzfarbstoffe FITC-Dextran 0,06 mg/kg/KG (Mr 150 000 D, Sigma Chemicals Comp., Deisenhofen, Deutschland) und Rodamin 6G 0,15 mg/kg/KG (Mr 472, 02 D, Fa. Sigma Chemicals Comp., Deisenhofen, Deutschland) erfolgte vor Durchführung der Hämodilution bei jedem Versuchstier die Grundaufzeichnung der makro- und mikrozirkulatorischen Ausgangsparameter. Die Bestimmung der mikrozirkulatorischen Parameter wurden auf einem Videoband zur späteren Auswertung aufgezeichnet.

Das Versuchsprotokoll forderte zu den Zeitpunkten 0', 15', 30', 60', und 120 min. eine erneute Bestimmung der Parameter.

An separaten Versuchstieren wurde der lokale Gewebe-Sauerstoffpartialdruck des Rückenhautmuskels gemessen. Auch hier wurden nach Ermittlung der Ausgangswerte zu den Meßzeitpunkten 0', 15', 30', 60', und 120 min. die Änderungen des Gewebe-pO<sub>2</sub> mit Hilfe der MDO-Sonde bestimmt und aufgezeichnet. (Abb. 20)

## Experimentelles Protokoll:

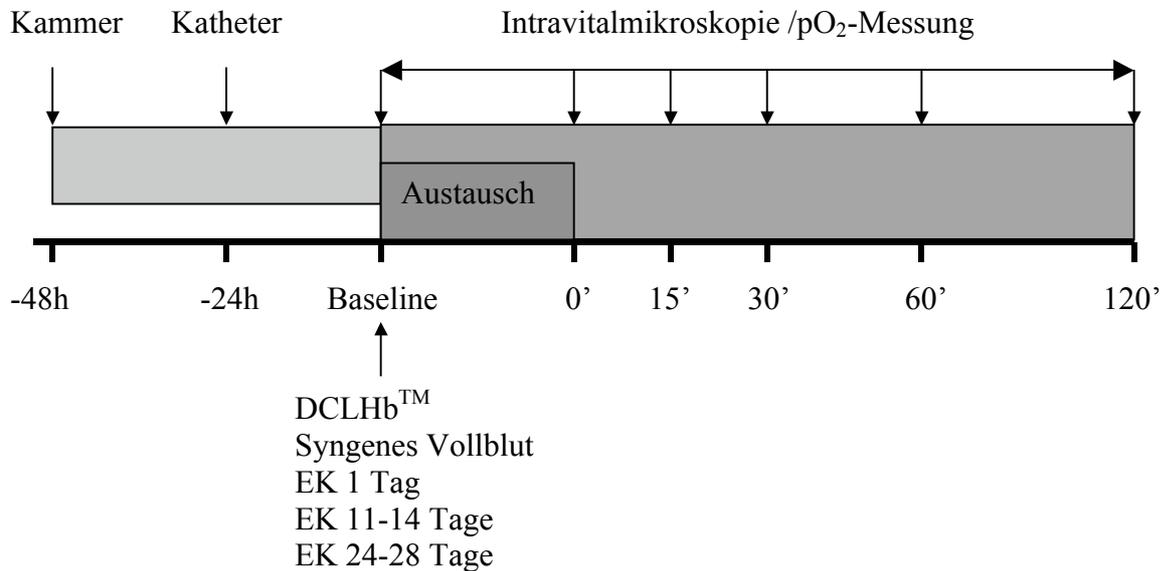


Abb. 20: Experimentelles Protokoll

### 2.3.7.1 Durchführung der Isovolämischen Austauschtransfusion

Zur Berechnung des auszutauschenden Transfusionsvolumens wurde die Formel von Bourke und Smith verwendet (16). Dabei wurde je 1000 g Körpergewicht des Hamsters einem Blutvolumen von 60 ml gleichgesetzt.

$$AV = BV \cdot \ln \left[ \frac{\text{Hkt}_{\text{Start}}}{\text{Hkt}_{\text{Ziel}}} \right]$$

AV = Austauschvolumen

BV = Blutvolumen

Als Ausgangsgruppe diente die „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“, welche auf einen Zielhämatokrit von 30 % (+/- 3 %) diluiert wurde, um eine optimale Oxygenierung des Blutes zu gewährleisten. Für die anderen Gruppen wurde das Austauschvolumen auf die gleiche Art berechnet. Zur Durchführung der Hämodilution wurden dem Hamster über den arteriellen Katheter ca. 3 ml Blut abgenommen und am Coulter-counter (Fa. Coulter<sup>®</sup> AC<sup>®</sup>T8, Deutschland) der

Ausgangshämatokrit bestimmt. Anschließend wurden die beiden Dauerkatheter an eine Harvard-Pumpe (Harvard Apparatus ,33‘ Syringe Pump FMI GmbH, Seeheim, Ober-Beerbach, Deutschland) angeschlossen mit dem Ziel, einen zeitlich und volumenmäßig konstanten Austausch durchzuführen. Nach abgeschlossener Hämodilution wurde das Experiment nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll durchgeführt. Zu jedem Aufnahmezeitpunkt wurden die Laborparameter Blutgase, Laktat und Hämatokrit mitbestimmt. Zur Bestimmung der Blutgase und des Laktatspiegels wurde ein Gascheck (Fa. Chiron Diagnostiks GmbH, Fernwald, Deutschland) eingesetzt. Dieser enthält einen Laktat-Biosensor als elektrochemische Zelle, die mit Hilfe der Amperometrie die Konzentration von Laktat aus den Proben bestimmt. Dieser Biosensor enthält 4 Elektroden:

- Die Platin-Meßelektrode, auf die das Enzym Laktat Oxydase aufgebracht ist
- Die Ag/Ag/Cl Referenzelektrode
- Die Platin-Counter Elektrode zur Stabilisierung eines konstanten Potentials
- Eine weitere Platin-Meßelektrode ohne Enzym bestimmt Störungssubstanzen, die den enzymatischen Ablauf stören können.

Eine mikroporöse Membran trennt die Elektrode vom Meßgut. Während der Messung liegt eine konstante polarisierte Spannung an. Milchsäure aus der Probe wird mit Hilfe der Laktat-Oxydase in Brenztraubensäure und Wasserstoffperoxyd umgewandelt.



Durch die Polarisierungsspannung oxidiert Wasserstoffperoxyd zu Sauerstoff.



Die durch die Oxydation freigegebenen Elektronen verändern den Stromfluß proportional zur Laktat-Konzentration.

### 2.3.8 Versuchsgruppen

Zur Beantwortung der dieser Arbeit zugrundeliegenden Fragestellung wurden zwei verschiedene Untersuchungsverfahren eingesetzt: Zum einen die intravitalmikroskopische Untersuchungstechnik, zum anderen die Messung des Gewebe-pO<sub>2</sub>. Aus versuchstechnischen Gründen war es nicht möglich, an einem Tier beide Untersuchungstechniken durchzuführen. Während die intravitalmikroskopische Untersuchung mit fünf verschiedenen Gruppen durchgeführt wurde, beinhaltete die Messung des Gewebe-pO<sub>2</sub> vier verschiedene Gruppen.

Bei der Intravitalmikroskopie wurde in der ersten Gruppe eine Isovolumische Austauschtransfusion mit „DCLHb<sup>TM</sup>“ (3,3 mg/kg/KG i.v.) (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, Illinois, USA) durchgeführt. In der zweiten Gruppe erhielten die Versuchstiere „Syngenes Vollblut“. Die dritte Gruppe erhielt „1 Tag gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ (EK 1 Tag), die vierte Gruppe erhielt „11-14 Tage gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ (EK 11-14 Tage) und die letzte Gruppe „syngene Erythrozytenkonzentrate, die 24-28 Tage lang gelagert“ (EK 24-28 Tage) wurden.

Die Gewebe-pO<sub>2</sub> Messung wurden mit der gleichen Gruppeneinteilung durchgeführt, jedoch unter Ausschluß der Gruppe mit „11-14 Tage gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrat“.

#### Intravitale Mikroskopie:

DCLHb <sup>TM</sup>	n = 8 je Gruppe
Syngenes Vollblut	n = 8 je Gruppe
EK 1 Tag	n = 8 je Gruppe
EK 11-14 Tage	n = 8 je Gruppe
EK 24-28 Tage	n = 8 je Gruppe

#### Gewebe pO<sub>2</sub>-Messung:

DCLHb <sup>TM</sup>	n = 8 je Gruppe
Syngenes Vollblut	n = 8 je Gruppe
EK 1 Tag	n = 7 je Gruppe
EK 24-28 Tage	n = 7 je Gruppe

#### 2.3.8.1 Beschreibung der verwendeten Transfusionslösungen

Als Transfusionsaustausch wurde zum einen der auf Hämoglobin basierende künstliche Sauerstoffträger DCLHb<sup>TM</sup> verwendet zum anderen Syngenes Vollblut und verschieden lang gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate.

### 2.3.8.1.1 Diaspirin cross-linked Hemoglobin (DCLHb<sup>TM</sup>)

DCLHb<sup>TM</sup> (Baxter Healthcare Corp., Deerfield, Illinois, USA) ist eine klare, rote, sterile, nicht-pyrogene aus menschlichen Erythrozyten gewonnene flüssige 10%ige Hämoglobinlösung zur intravenösen Infusion und dient als künstlicher Sauerstoffträger (Baxter Healthcare Corp., Boulder, Colorado, USA). Zur Herstellung von DCLHb<sup>TM</sup> dienen menschliche Erythrozyten aus „verfallenem“ Spenderblut, das auf Krankheitserregern getestet worden war. Nach osmotischer Lyse und Ultrafiltration wird dem Hämoglobin ein bifunktionaler cross-linker, das 3,5-Dibromosalicylfumarat (DBBF) zugesetzt, um die Stabilität des Moleküls zu erhöhen. Die Anwesenheit von organischem Phosphat in dieser Reaktion vermeidet die Bindung des DBBF an die  $\beta$ -Ketten des Hämoglobins. Anschließend reagiert das DBBF selektiv mit dem Lysin der  $\alpha$ -Ketten, wodurch ein intramolekulares „cross-linked“ Tetramer entsteht (21). Der nachfolgende Prozeß der Pasteurisierung ermöglicht die Entfernung von nicht modifiziertem Hämoglobin, präzipitierten Erythrozytenproteinen und die endgültige Inaktivierung von möglichen Viren. Nach Hinzufügen von Elektrolyten ist der Herstellungsprozeß von DCLHb<sup>TM</sup> abgeschlossen (37). Nach Herstellerangaben liegt die Hämoglobin-Konzentration bei 10 g/dl mit einem durchschnittlichen Met-Hämoglobin-Gehalt von 6,0 %. Bei einer Temperatur von 37 °C liegt der pH-Wert im physiologischen Bereich von 7,4. Das Ausmaß des cross-linkings beträgt mehr als 99 %. Die Sauerstoffbindungsaffinität p50 beträgt 32 mmHg und der onkotische Druck 42 mmHg.

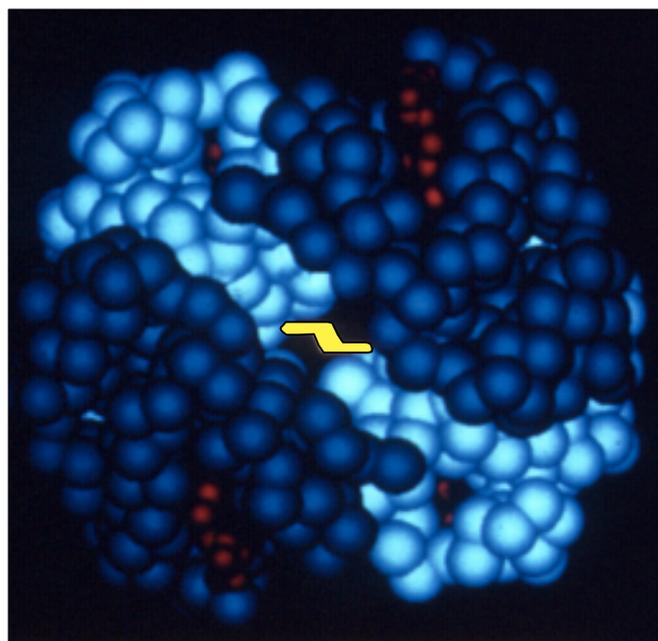


Abb. 21: Molekülform des DCLHb<sup>TM</sup>

## Herstellungsprozeß von DCLHb<sup>TM</sup>

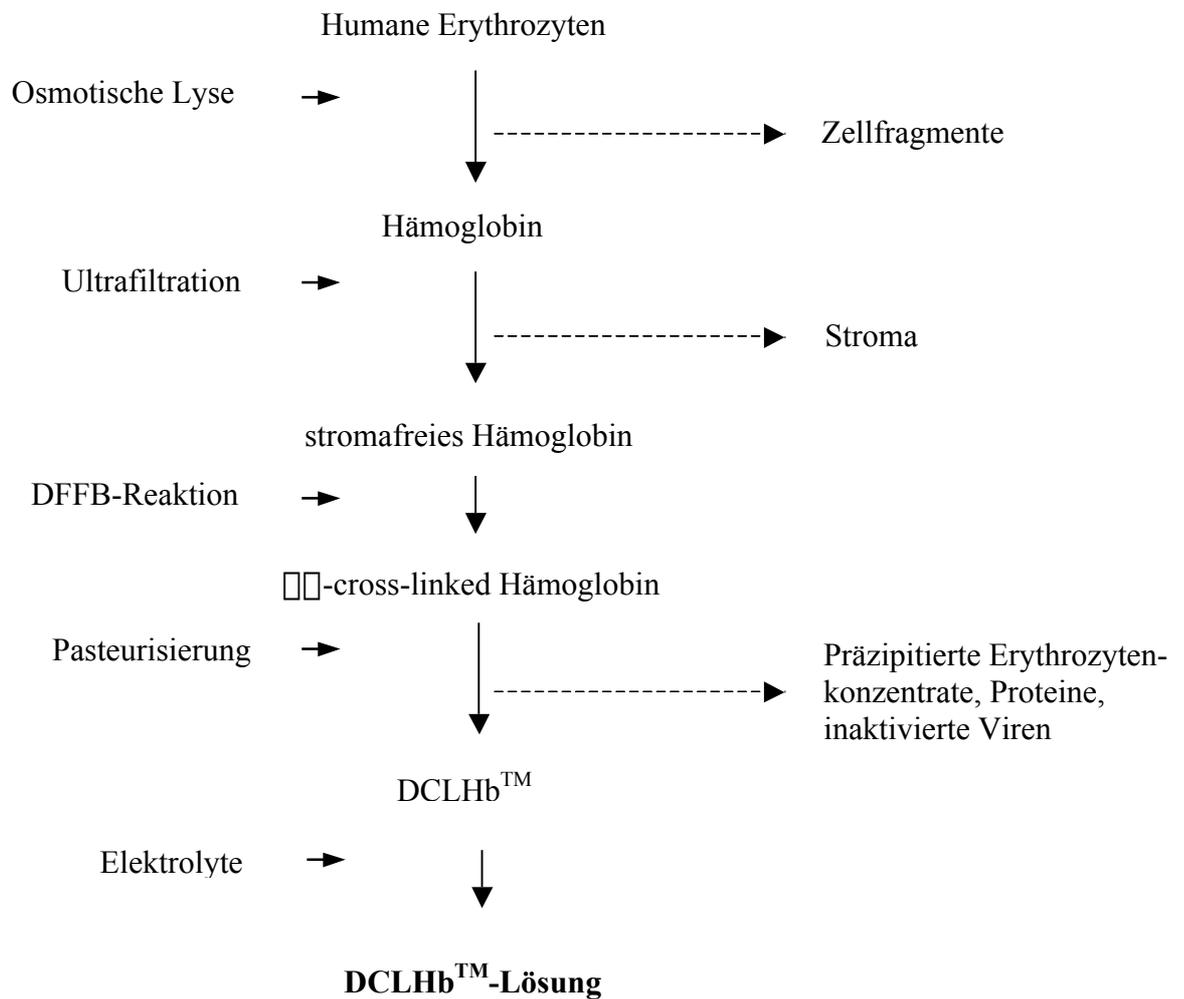


Abb. 22: nach Azari et al (10)

### 2.3.8.1.2 Syngenes Vollblut

Nach Äther-Anästhesie eines Hamsters wurde Syngenes Blut durch intrakardiale Punktion gewonnen. Um ein möglichst großes Blutvolumen zu erhalten wurden hierzu ausgewachsene Hamster mit einem Gewicht von 140-160 g verwendet (Spritze mit CPDA-1).

### 2.3.8.1.3 Syngene Erythrozytenkonzentrate

Aufgrund des geringen Blutvolumens eines Hamsters (3,0-5,5 ml pro Tier) wurde die intrakardiale Punktion angewandt. Diese Technik erlaubt die Gewinnung eines maximalen Blutvolumens. Die Blutentnahme erfolgte in Anästhesie durch Äther. Äther ist ein sehr schnell abflutendes Narkosemittel und minimiert daher den Einfluß des Anästhetikums auf die Blutkonserve. Mit einer mit CPDA-1 gefüllten Spritze wurde das Herz punktiert, das Blut mit dem Stabilisator gut vermischt und 15-20 min. bei Raumtemperatur zur Äquilibration abgestellt. CPDA-1 ist ein weit verbreitetes, sicheres und gut verträgliches Konservierungsmittel. Es besteht aus Citronensäure (0,3 g), Phosphat (Natriumdehydrogenphosphat-Dehydrat 251 mg), Dextrose (2,90 g), Adenin (27,5 mg), Natriumcitrat (2,63 g), Aqua bidest. (100 ml) bei einem pH-Wert von 5,6-5,8. Nach der geforderten Äquilibrationszeit wurde die Spritze bei 375 G für 10 min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Spritze eine große Kanüle aufgesetzt und die durch die Zentrifugation vom Plasma abgesetzten roten Blutkörperchen vorsichtig in einen 300 ml Blutbeutel abgefüllt. Der Inhalt eines Blutbeutels wurde aus mehreren Tieren gewonnen. Je nach Protokoll wurden diese Erythrozytenkonserven mit einem Hämatokrit [%] zwischen  $41 \pm 3$  und  $47 \pm 3$  bei 1-6 °C für einen Tag, 11-14 Tage oder 24-28 Tage lang gelagert.

### 2.3.9 Laborparameter

Im Verlauf der intravitalmikroskopischen Versuche wurden folgende Laborparameter bestimmt: Hämatokrit [%], Hämoglobin [g/dl], Anzahl roter Blutkörperchen [ $\mu\text{l} \cdot 10^6$ ], sowie der pH-Wert,  $\text{pO}_2$  [mmHg],  $\text{pCO}_2$  [mmHg],  $\text{K}^+$  [mmol / l] und die Laktatkonzentration [mmol / l] im Blut. (Tabelle 4, 5)

		DCLHb <sup>TM</sup>	SB	EK 1 Tag	EK 14 Tage	EK 28 Tage
<b>Hkt [%]</b>	<b>Base</b>	43 ± 3 n = 8	41 ± 3 n = 6	41 ± 3 n = 6	45 ± 3 n = 8	47 ± 3 n = 8
	<b>Austausch</b>	30 ± 2 n = 8				
	<b>120 min</b>	35 ± 2 n = 3	40 ± 2 n = 4	40 ± 2 n = 4	50 ± 3 n = 7	48 ± 1 n = 2
<b>Hb [g / dl]</b>	<b>Base</b>	14 ± 1 n = 8	13 ± 1 n = 6	13 ± 1 n = 6	15 ± 1 n = 8	15 ± 1 n = 8
	<b>Austausch</b>	11 ± 1 n = 8				
	<b>120 min</b>	12 ± 0 n = 3	13 ± 1 n = 4	13 ± 1 n = 4	16 ± 1 n = 7	15 ± 0 n = 2
<b>Erythrozyten [μl × 10<sup>6</sup>]</b>	<b>Base</b>	6,5 ± 0,6 n = 8	6,1 ± 0,4 n = 6	6,1 ± 0,4 n = 6	7,4 ± 0,6 n = 8	7,0 ± 0,5 n = 7
	<b>Austausch</b>	4,6 ± 0,4 n = 8				
	<b>120 min</b>	5,3 ± 0,1 n = 3	6,0 ± 0,4 n = 4	6,0 ± 0,4 n = 4	7,6 ± 0,2 n = 2	7,9 ± 0,0 n = 2

*Tabelle 4: Mittelwert ± Standardabweichung. Laborparameter: Hämatokrit [%], Hämoglobin [g/dl], Anzahl roter Blutkörperchen [μl • 10<sup>6</sup>] während des intravitalmikroskopischen Versuches gemessen zu den Zeitpunkten: Versuchsbeginn und Versuchsende.*

		<b>DCLHb<sup>TM</sup></b>	<b>SB</b>	<b>EK 1 Tag</b>	<b>EK 14 Tage</b>	<b>EK 28 Tage</b>
<b>pH</b>	<b>Base</b>	7,4± 0,0 n = 8	7,4± 0,0 n = 8	7,4± 0,0 n = 8	7,4± 0,0 n = 8	7,4± 0,0 n = 8
	<b>120 min</b>	7,4± 0,0 n = 7	7,4± 0,0 n = 8	7,4± 0,0 n = 8	7,4± 0,0 n = 8	7,4± 0,0 n = 4
<b>pO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>Base</b>	65± 6 n = 8	68± 9 n = 8	68± 9 n = 8	60± 16 n = 8	67± 8 n = 8
	<b>120 min</b>	73± 14 n = 7	76± 12 n = 8	76± 12 n = 8	61± 5 n = 8	65± 6 n = 4
<b>pCO<sub>2</sub> [mmHg]</b>	<b>Base</b>	49± 6 n = 8	47± 9 n = 8	47± 8 n = 8	44± 5 n = 8	46± 5 n = 8
	<b>120 min</b>	45± 5 n = 7	45± 6 n = 8	45± 6 n = 8	50± 4 n = 8	48± 3 n = 4
<b>K<sup>+</sup> [mmol / l]</b>	<b>Base</b>	4,7± 1,1 n = 8	4,8± 0,3 n = 8	4,8± 0,3 n = 8	4,8± 0,5 n = 8	5,0± 0,2 n = 7
	<b>120 min</b>	4,9± 0,5 n = 7	4,6± 0,4 n = 8	4,6± 0,4 n = 8	4,7± 0,3 n = 8	4,7± 0,5 n = 3
<b>Laktat [mmol / l]</b>	<b>Base</b>	1,6± 0,5 n = 8	1,6± 0,5 n = 7	2,1± 1,3 n = 8	1,7± 0,6 n = 7	2,3± 1,0 n = 7
	<b>120 min</b>	1,2± 0,3 n = 7	1,2± 0,4 n = 7	1,4± 0,8 n = 8	1,1± 0,2 n = 7	1,0± 0,2 n = 4

*Tabelle 5: Mittelwert ± Standardabweichung. Laborparameter: pH-Wert, pO<sub>2</sub> [mmHg], pCO<sub>2</sub> [mmHg], K<sup>+</sup> [mmol / l] und die Laktatkonzentration [mmol / l] im Blut während des intravitalmikroskopischen Versuches gemessen zu den Zeitpunkten: Versuchsbeginn und Versuchsende.*

## 2.4 Statistische Prüfung der Ergebnisse

Für die statistische Auswertung der Daten wurde das Tabellenkalkulations- und Statistikprogramm SAS<sup>®</sup> V6.1 (SAS Institute, Cary, North Carolina, USA) verwendet. Sämtliche Daten wurden zuerst mit dem Test nach Shapiro-Wilks auf Normalverteilung getestet.

### 2.4.1 Statistische Prüfung der Intravitalmikroskopischen Ergebnisse

Zur Untersuchung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen wurde aufgrund der Gruppengröße von 5 der Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test bestimmt. Der Vergleich innerhalb der Gruppen zu 6 verschiedenen Zeitpunkten wurde mit Hilfe des Friedman-Test und im Anschluß der Dunnett's Test als post hoc Test verwendet. Die Angaben sämtlicher Werte erfolgte als Mittelwert mit dem Standardfehler des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ). Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  angesetzt.

### 2.4.2 Statistische Prüfung der Gewebe- $pO_2$ Meßergebnisse

Zur Untersuchung statistisch signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen wurde aufgrund der Gruppengröße von 5 der Kruskal-Wallis-Test gefolgt vom Dunn's Test bestimmt. Auf Unterschiede innerhalb einer Gruppe wurden mit dem Friedman-Test getestet und post hoc mit dem Dunnett's Test auf Signifikanz überprüft. Die Angaben sämtlicher Werte erfolgte ebenfalls als Mittelwert mit Standardfehler des Mittelwertes ( $\bar{x} \pm \text{SEM}$ ). Das Signifikanzniveau wurde bei  $p < 0,05$  angesetzt.

## 3 Ergebnisse

### 3.1 Intravitalmikroskopie

Ziel der Studie war es, am Modell der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters die Effekte des künstlichen Sauerstoffträger DCLHb<sup>TM</sup> mit denen von Syngenen Vollblut und unterschiedlich lang gelagerten Syngenen Erythrozytenkonzentraten zu vergleichen. Als Methode wurden die Intravitalmikroskopie und die Messung des Sauerstoffpartialdrucks mittels der Mehrdrahtoberflächensonde angewendet. Dabei wurden intravitalmikroskopisch folgende mikrohämodynamische Parameter erfaßt:

- Arteriöler Gefäßdurchmesser
- Postkapillärer venöler Gefäßdurchmesser
- Postkapilläre venöse Blutfließgeschwindigkeit
- Leukozyten/Endothel Interaktion
- Endotheliale Integrität
- Funktionelle Kapillardichte
- Scherrate

Des weiteren wurden als makrohämodynamische Parameter der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz kontinuierlich aufgezeichnet.

#### 3.1.1 Mikrohämodynamik

##### 3.1.1.1 Arteriöler Gefäßdurchmesser

In allen fünf Versuchsgruppen (in der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“, der „Syngenen Vollblut-Gruppe“, der „Syngene Erythrozytenkonzentrate 1 Tag lang gelagert“, „11-14 Tage lang gelagert“ und der „Gruppe 24-28 Tage lang gelagert“) lagen die Ausgangsdurchmesser der Arteriolen des quergestreiften Rückenhautmuskels des Hamsters durchschnittlich bei 28 µm. Es kam über den Zeitraum des Versuchs von den Grundaufnahmen bis hin zum Ende des Versuchs nach 120 min. zu keinen nennenswerten Veränderungen des arteriölen Durchmessers in den Gruppen „DCLHb<sup>TM</sup>“, „Syngenes Blut“, „Syngene Erythrozytenkonzentrate 1 Tag lang gelagert“, und der „Gruppe 24-28 Tage lang gelagerte

Syngene Erythrozytenkonzentrate“. Bei der „11-14 Tage lang gelagerten Syngenen Erythrozytenkonzentrat-Gruppe“ fiel auf, daß schon zu dem Aufnahmezeitpunkt (0 min.) sich ein statistisch signifikanter Anstieg des Gefäßdurchmessers von ca. 6  $\mu\text{m}$  gegenüber den Ausgangswerten abzeichnete. Dieser Anstieg blieb über den gesamten Versuchszeitraum bestehen. (Abb. 23)

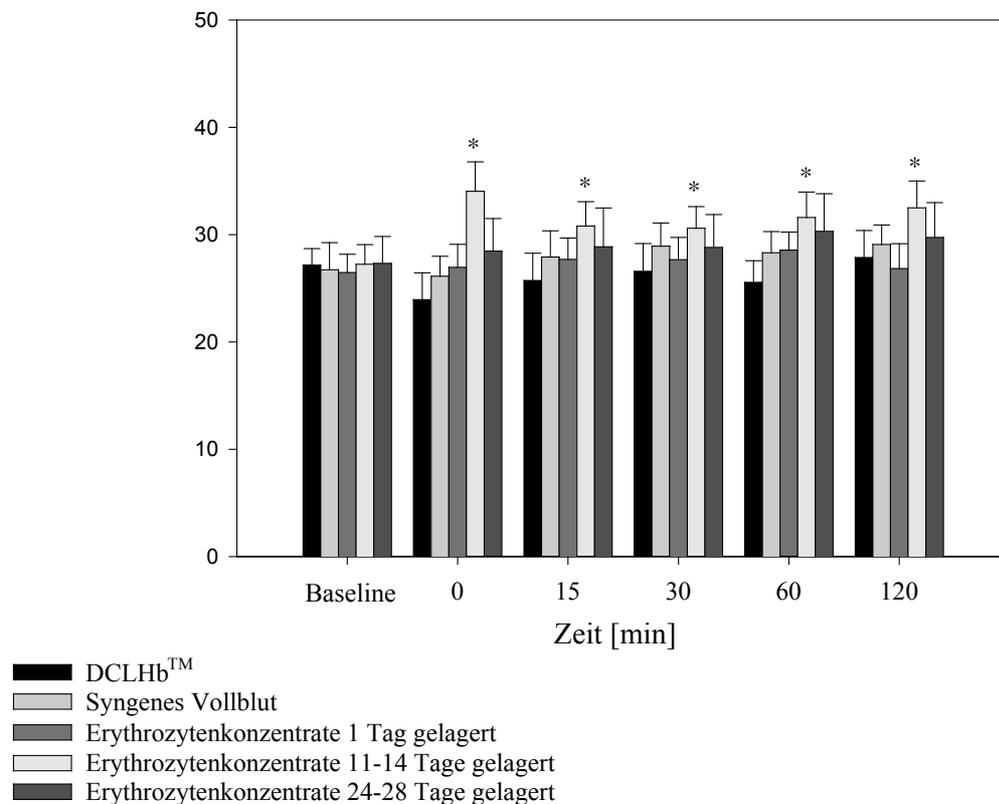


Abb. 23: mittlerer arteriolarer Gefäßdurchmesser in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion. Signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen sind mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### 3.1.1.2 Postkapillärer venolärer Gefäßdurchmesser

Die postkapillären Venolen hatten einen durchschnittlichen Gefäßdurchmesser von ca. 25  $\mu\text{m}$ . Ab dem Zeitpunkt von 15 min. nach Versuchsbeginn war in den Gruppen „Syngenes Vollblut“ und „Syngene Erythrozytenkonzentrate 1 Tag lang gelagert“ ein leichter Anstieg im Durchmesser zu erkennen, der aufgrund der geringen Standardabweichung der Werte statistisch signifikant war. In den übrigen Gruppen waren keine wesentlichen Unterschiede feststellbar. (Abb. 24)

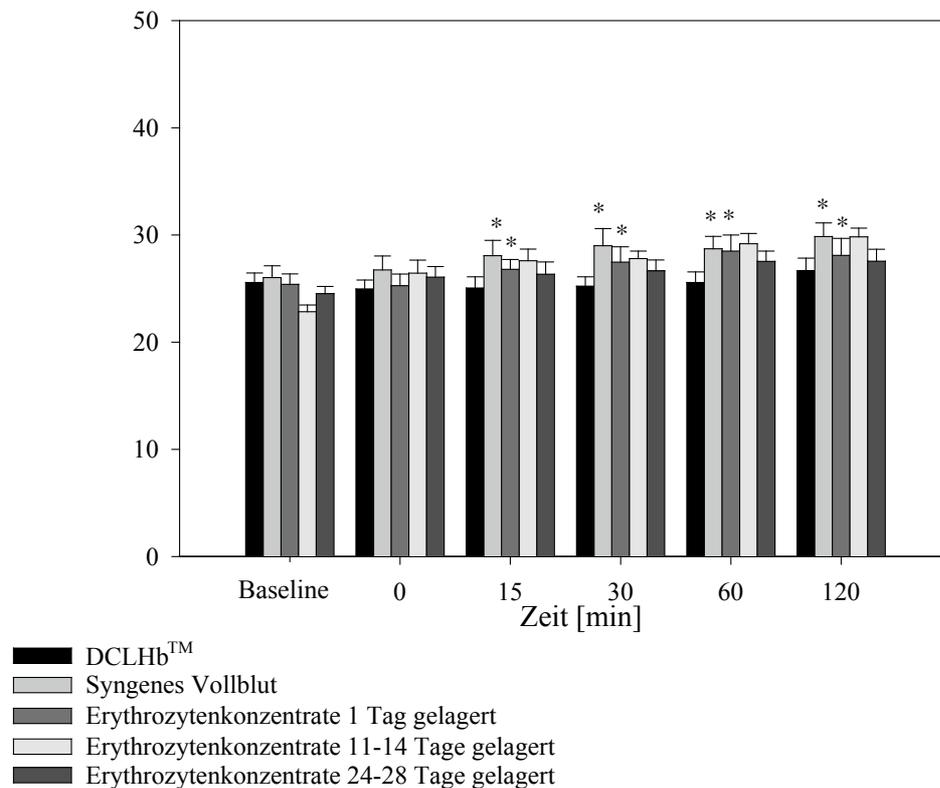


Abb. 24: mittlerer postkapillärer venolärer Gefäßdurchmesser in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion. Signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen sind mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### 3.1.1.3 Postkapilläre venoläre Blutfließgeschwindigkeit

Die mittlere Erythrozytenfließgeschwindigkeit lag in allen Gruppen zwischen 0,39 mm/s („DCLHb<sup>TM</sup>“) und 0,49 mm/s („Syngene Erythrozytenkonzentrate 11-14 Tagen lang gelagert“). Es kam in keiner der Gruppen zu einem signifikanten Unterschied des Blutflusses. In der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ war jedoch nach vergleichbarem Anstieg der Blutfließgeschwindigkeit in den anderen Gruppen gegen Ende des Versuches eine eher abfallende Tendenz der Werte zu erkennen. Die restlichen Gruppen zeigten hingegen eher die Tendenz zum Anstieg der Werte. (Abb. 25)

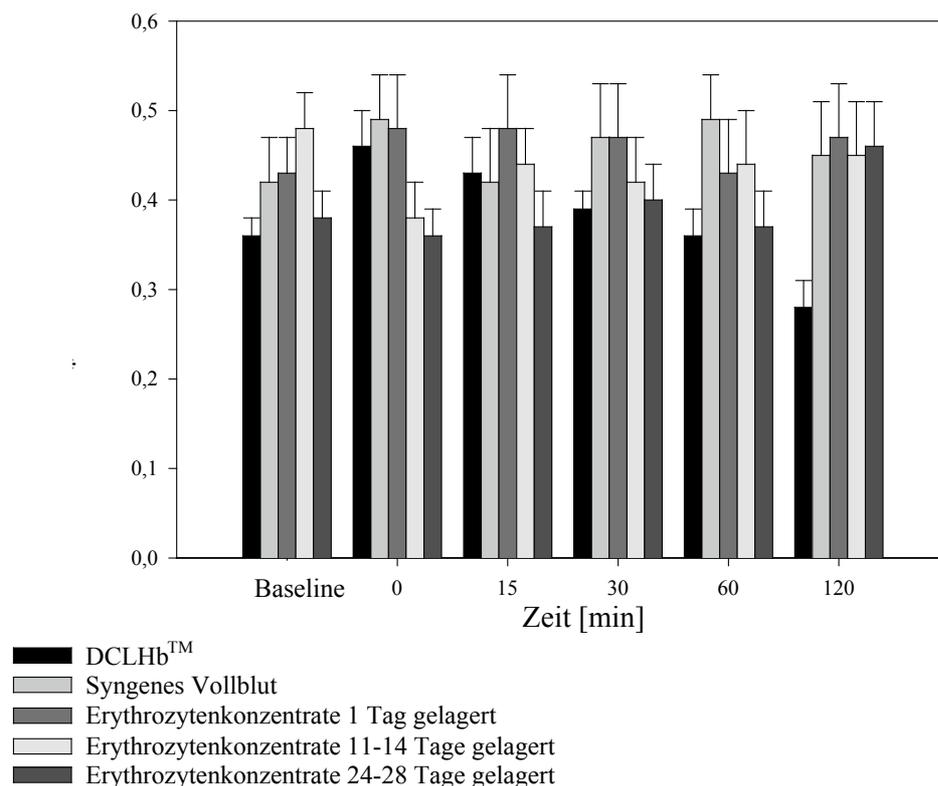


Abb. 25: Postkapilläre venoläre Blutfließgeschwindigkeit in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion.

### 3.1.2 Leukozyten/Endothel Interaktion

#### 3.1.2.1 Nicht-adhärenente Leukozyten

Die Anzahl nicht-adhärenenter Leukozyten war in den postkapillären Venolen mit einem Gefäßdurchmesser von 15µm–45 µm in keinem Zeitpunkt signifikant unterschiedlich. (Abb. 26)

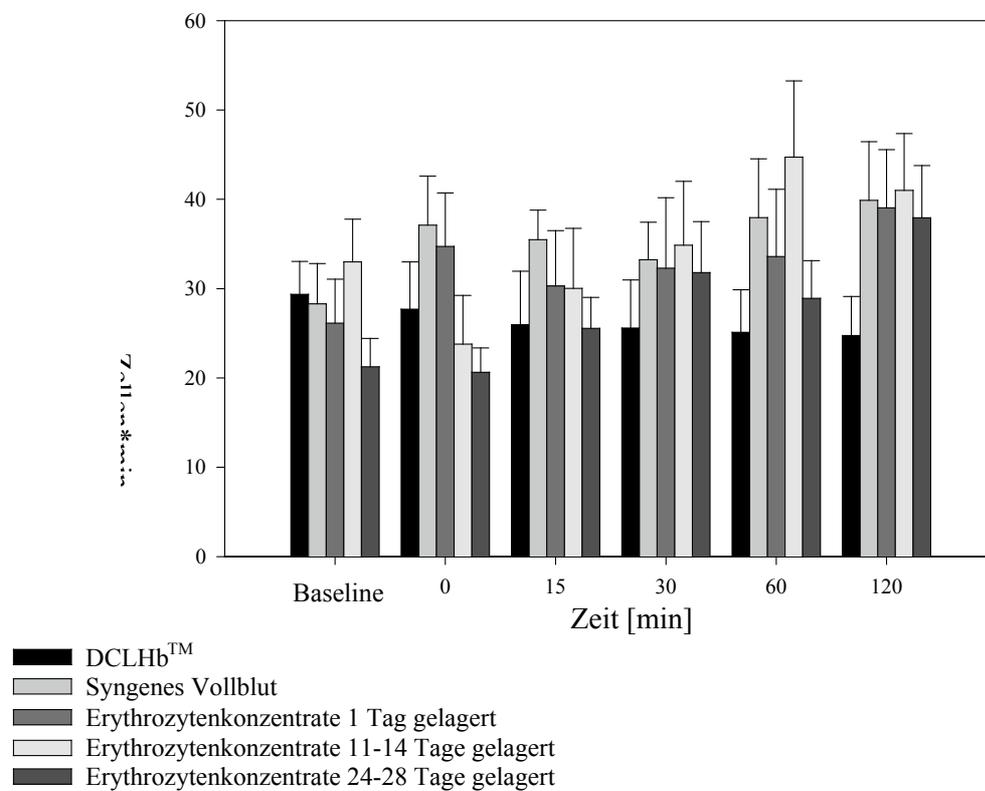


Abb. 26: Nicht-adhärenente Leukozyten. Die Graphik zeigt die Anzahl nicht-adhärenenter Leukozyten die pro Minute Beobachtungszeit ein zuvor definiertes Gefäßsegment passieren, in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion.

### 3.1.2.2 Rollende Leukozyten

In der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ war ein leichter Abfall der rollenden Leukozyten zu erkennen; er war jedoch nicht signifikant. In den übrigen Gruppen kam es zu einem Anstieg der Rollenden Leukozyten; allerdings war dieser ebenfalls nicht signifikant. (Abb. 27)

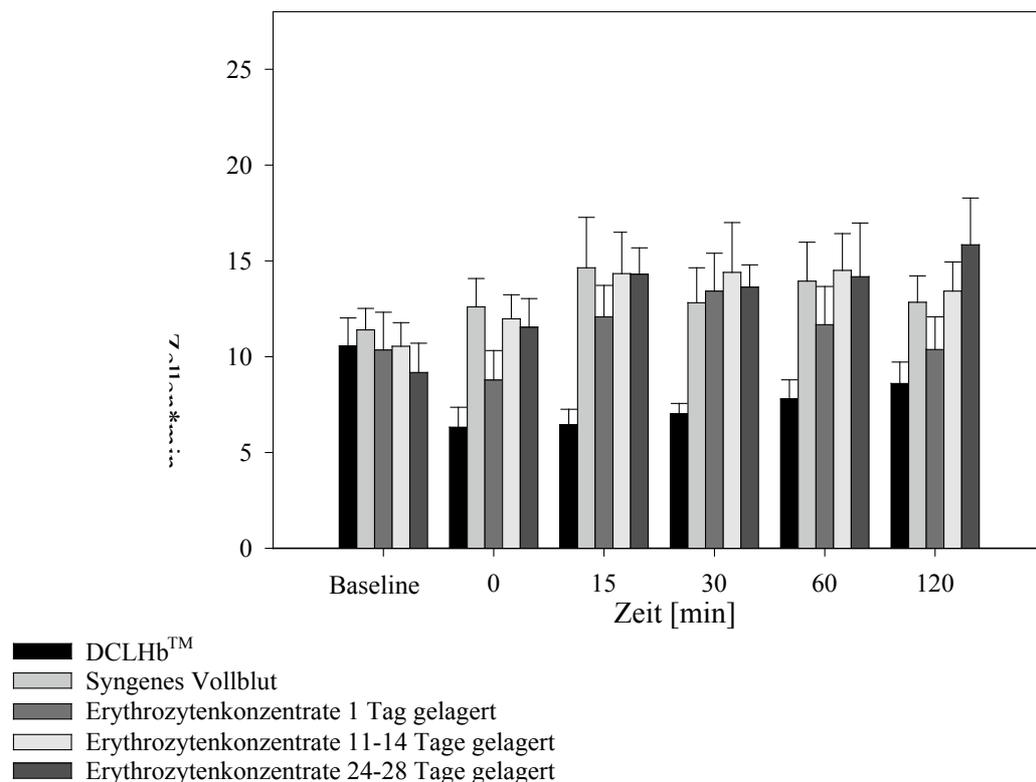


Abb. 27: Rollende Leukozyten. Die Graphik zeigt die Anzahl rollender Leukozyten die pro Minute Beobachtungszeit ein zuvor definiertes Gefäßsegment passieren, in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion.

### 3.1.2.3 Adhärenente Leukozyten

Abgesehen von der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ war in allen Gruppen ein deutlicher, jedoch nicht signifikanter Anstieg der adhärenenten Leukozytenzahl zu erkennen. In der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ war dieser Anstieg nicht zu beobachten. (Abb. 28)

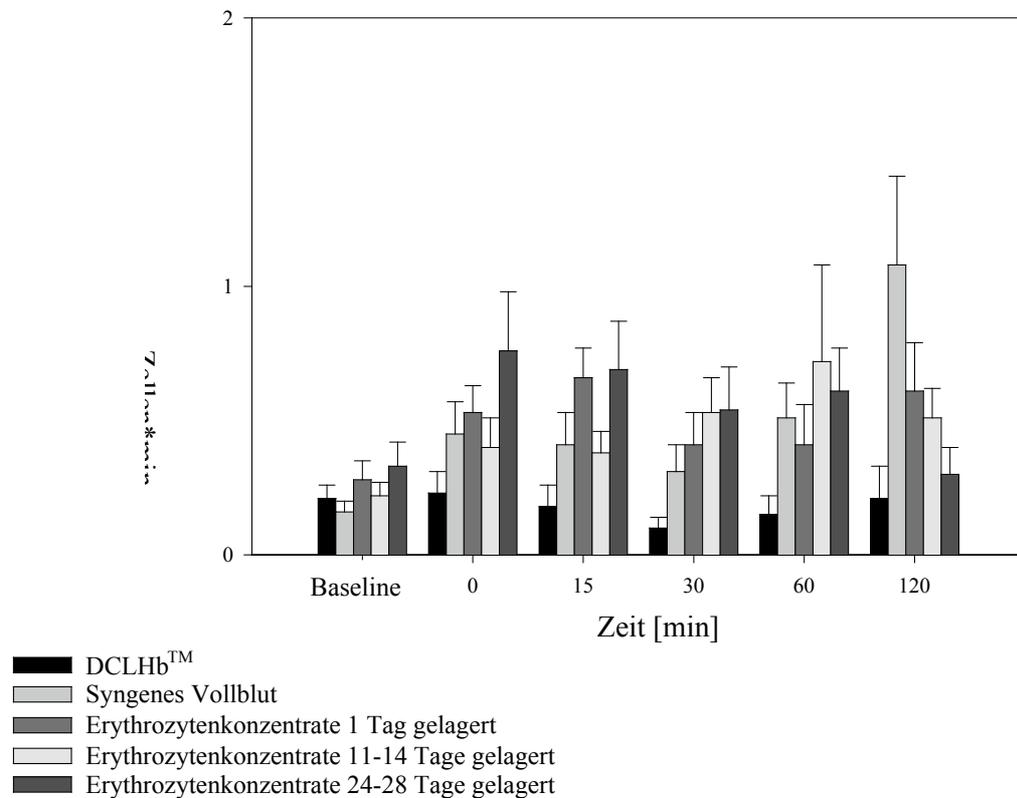


Abb. 28: Adhärenente Leukozyten. Die Graphik zeigt die Anzahl adhärenenter Leukozyten die sich pro 30 sek. Beobachtungszeit von einem zuvor definierten Gefäßabschnitt lösen, in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion.

### 3.1.3 Endotheliale Integrität

#### 3.1.3.1 Arteriöläre Extravasation

In dieser Abbildung sind die Mittelwerte der Fluoreszenzintensität „außerhalb“ versus „innerhalb“ der untersuchten Gefäßsegmente ( $I_a/I_i$ ) dargestellt. Dabei lagen die Ausgangswerte bei 0,45-0,55  $I_0/I_1$ . In allen Gruppen kam es während der gesamten Versuchsdauer zu einem geringen Extravasationsanstieg. Dieser war ab dem Zeitpunkt 0' in allein der „Gruppe mit Syngenen Vollblut“ signifikant. (Abb. 29)

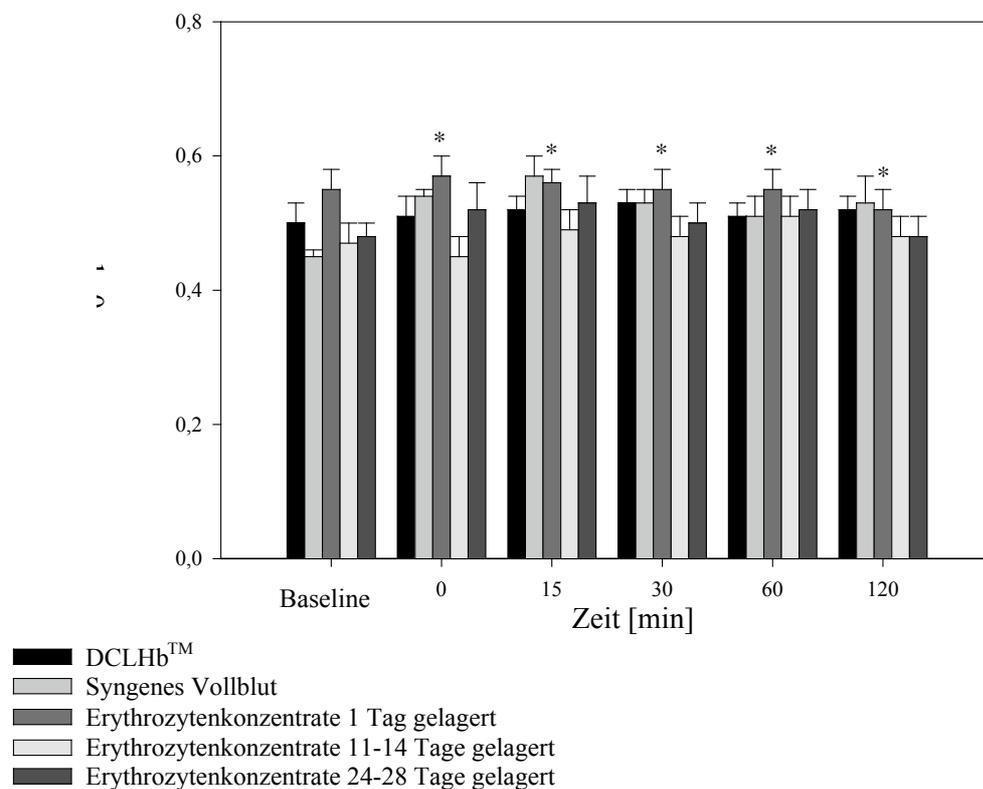


Abb. 29: Arteriöläre Extravasation. Die Graphik zeigt die Fluoreszenzintensität „außerhalb“ versus „innerhalb“ der untersuchten Gefäßsegmente ( $I_a/I_i$ ) in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion. Signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen sind mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### 3.1.3.2 Postkapillare venolärer Extravasation

So wie in bei der arteriolären Extravasation bereits beschrieben, lagen die Ausgangswerte innerhalb der untersuchten Gefäßsegmente bei 0,45-0,55  $I_0/I_1$ . Auch hier war nur ein leichter Anstieg der Extravasation der Fluoreszenzfarbstoffe über die Dauer des Versuches zu beobachten. Ab dem Zeitpunkt 0' erreichte in der Gruppe „Syngenes Vollblut“ die Extravasation signifikant höhere Werte. (Abb. 30)

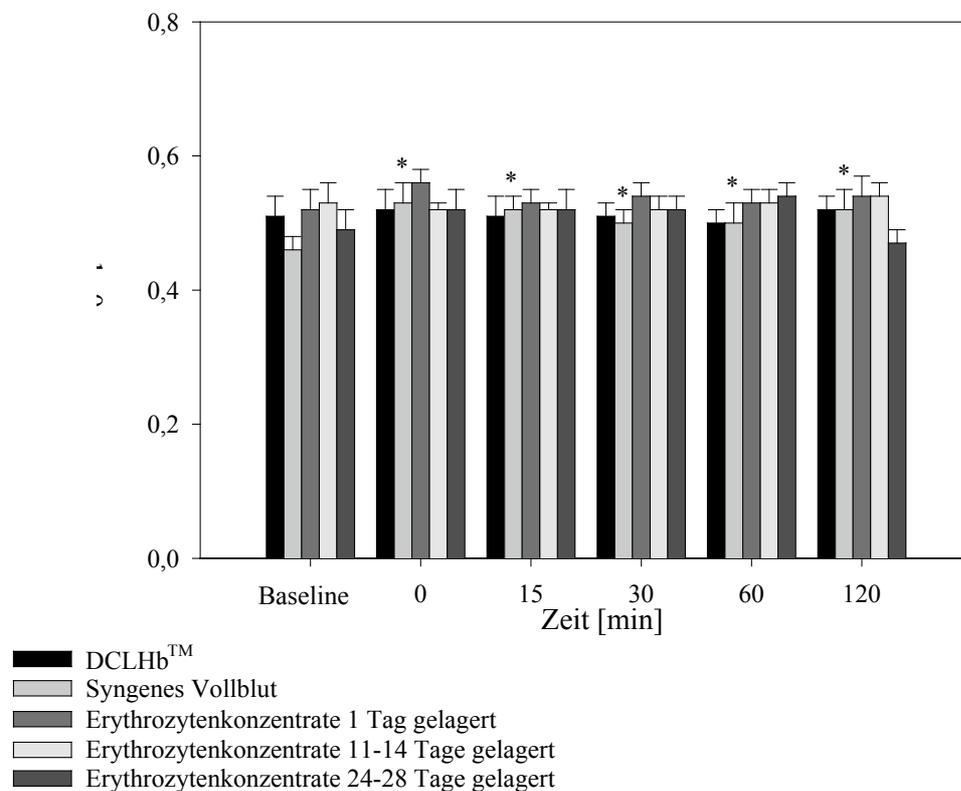


Abb. 30: Postkapilläre venoläre Extravasation. Die Graphik zeigt die Fluoreszenzintensität „außerhalb“ versus „innerhalb“ der untersuchten Gefäßsegmente ( $I_0/I_1$ ) in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion. Signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen sind mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### 3.1.3.3 Funktionelle Kapillardichte

Die Funktionelle Kapillardichte ergab unter den Ausgangsbedingungen Werte zwischen 190 und 220  $\text{cm}/\text{cm}^2$ . Schon zum Zeitpunkt 0' fielen diese Werte in der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ als statistisch signifikant niedriger auf. In den übrigen Gruppen kam es zu keinen nennenswerten Änderungen der Funktionellen Kapillardichte. (Abb. 31)

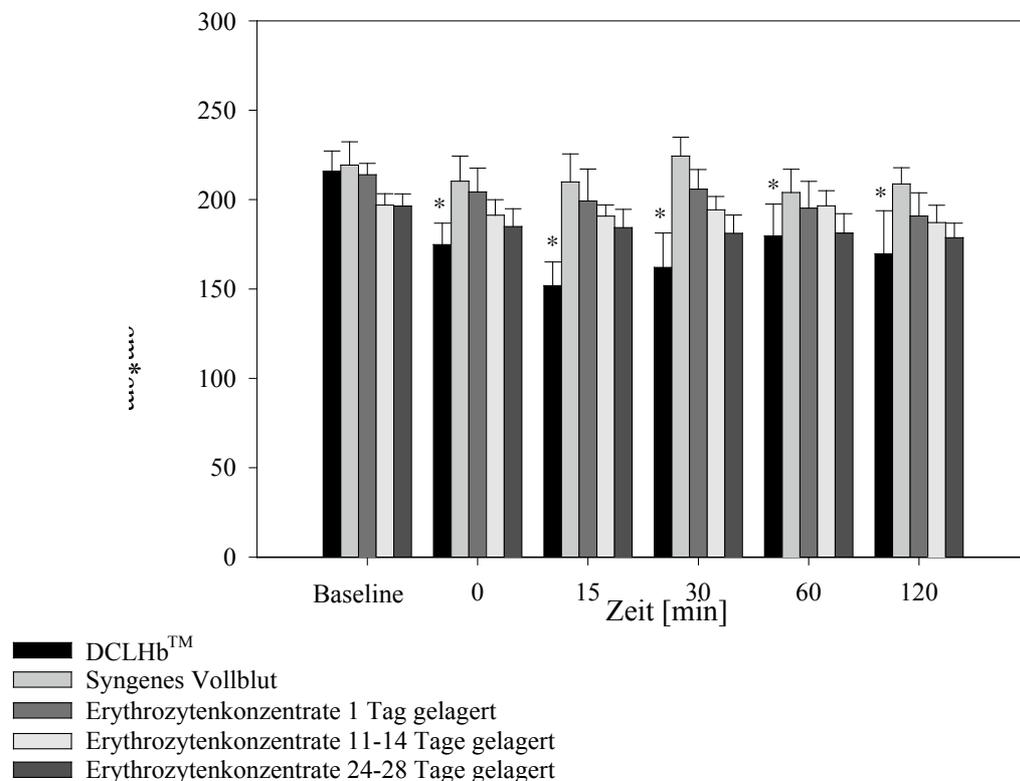


Abb. 31: Funktionelle Kapillardichte. Die Graphik zeigt die Funktionelle Kapillardichte gemessen in  $\text{cm}/\text{cm}^2$  in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion. Signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen sind mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### 3.1.3.4 Scherrate

Nur in der Gruppe „Syngene Erythrozytenkonzentrate 11-14 Tage lang gelagert“ erreichten die Änderungen der Scherrate bereits zum Zeitpunkt 0‘ statistisch signifikant niedrigere Werte als unter Kontrollbedingungen. Die anderen Versuchsgruppen zeigten keine signifikanten Wertänderungen. (Abb. 32)

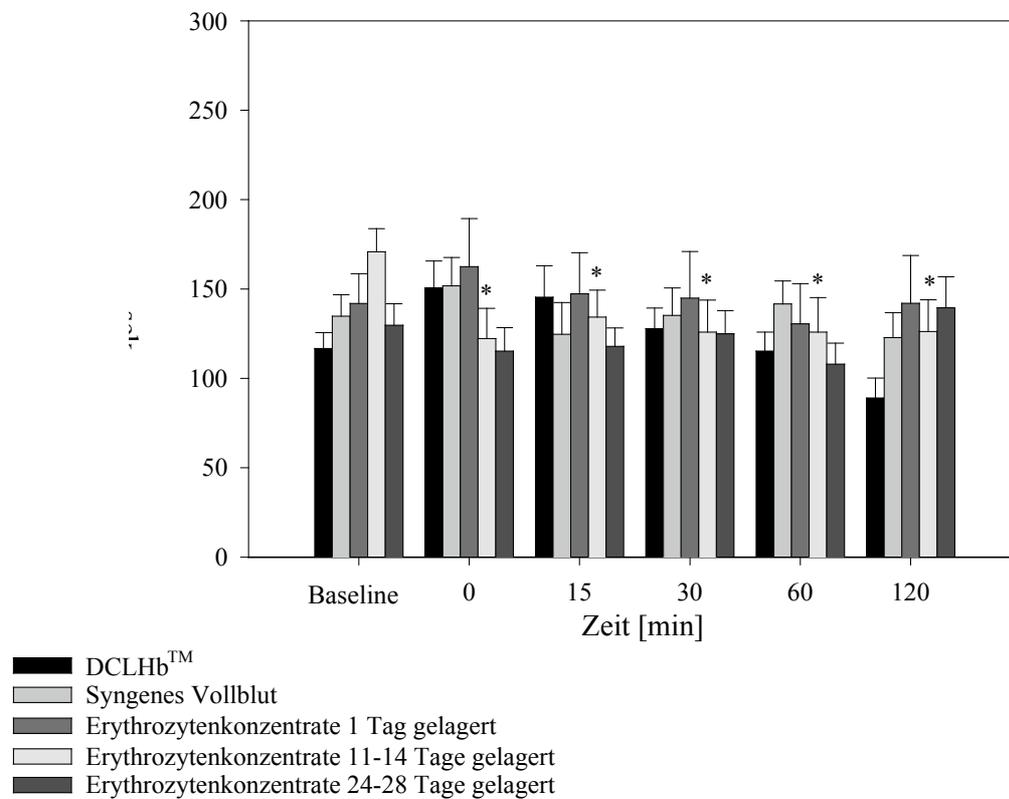


Abb. 32: Scherrate. Die Graphik zeigt die Scherrate gemessen in  $\text{sek.}^{-1}$  in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Zwischen dem Zeitpunkt Baseline und 0 min liegt die isovolämische Austauschtransfusion. Signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen sind mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### 3.1.4 Makrohämodynamik

#### 3.1.4.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Der mittlere arterielle Blutdruck lag zu Beginn der Versuche in allen Gruppen bei ~90 mmHg. Dieser blieb über den gesamten Versuchszeitraum bis auf die „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ konstant. Schon ab dem Zeitpunkt 0‘ kam es in der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ zu einem statistisch signifikanten Blutdruckanstieg auf über 100 mmHg. Dieser blieb bis zum Zeitpunkt 60‘ bestehen. (Abb. 33)

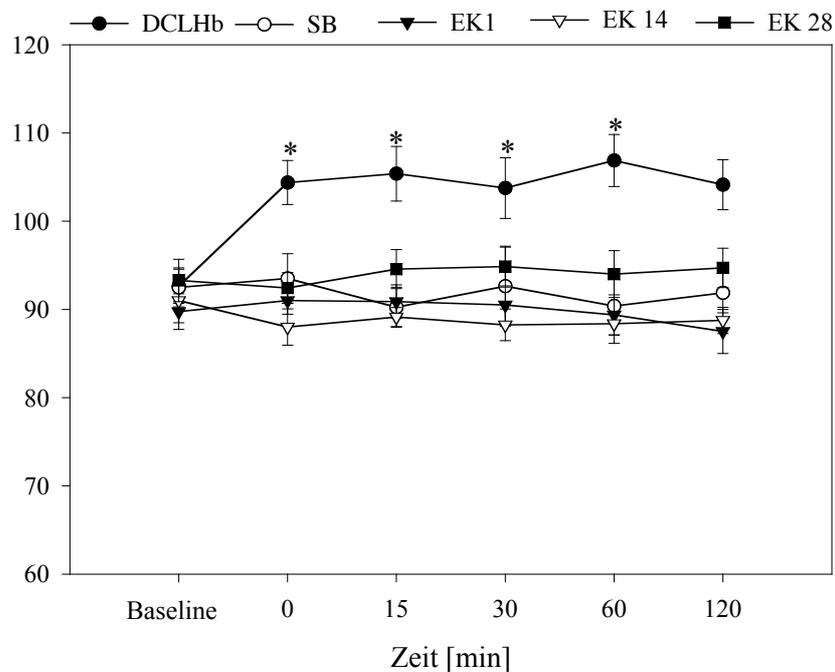


Abb. 33: Mittlerer arterieller Blutdruck, gemessen in mmHg in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen sind mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### 3.1.4.2 Herzfrequenz

Die Herzfrequenz lag zu Versuchsbeginn in allen Gruppen zwischen 360 und 410 Schlägen  $\text{min}^{-1}$ . Innerhalb der Gruppen kam es während des Versuches zu keinen statistisch signifikanten Frequenzänderungen. Zum Zeitpunkt 0' und 30' jedoch zeigten die Gruppen „DCLHb<sup>TM</sup>“, „Erythrozytenkonzentrate 11-14 Tage lang gelagert“ und „Erythrozytenkonzentrate 24-28 Tage lang gelagert“ verglichen zur Vergleichsgruppe „Syngenes Vollblut“ einen statistisch signifikanten Frequenzabfall. Am Ende des Versuches zum Zeitpunkt 120' war dieser Frequenzabfall nur noch in der „Gruppe 24-28 Tage lang gelagerte Erythrozytenkonzentrate“ zu vermerken (Abb. 34).

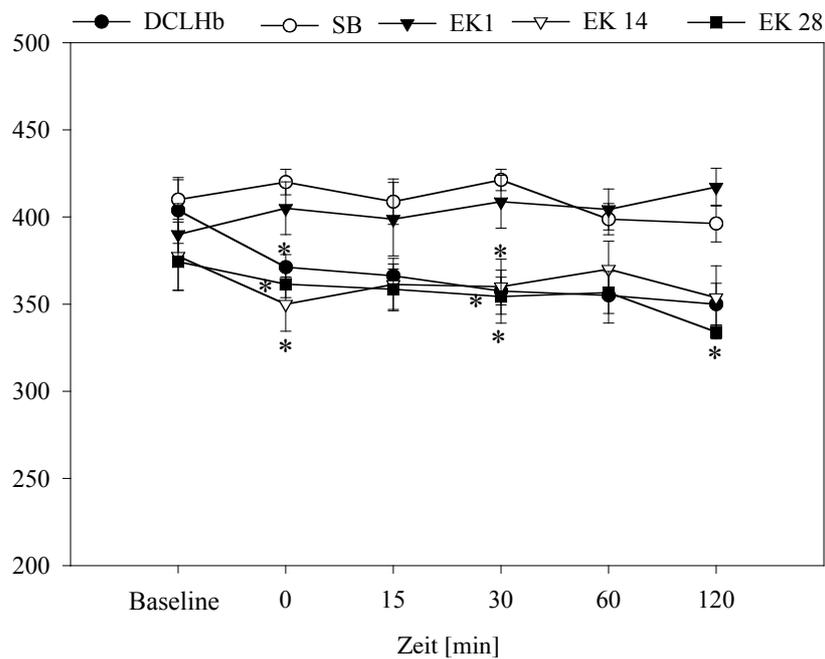


Abb. 34: Herzfrequenz gemessen in Schlägen pro min. in Abhängigkeit von der Zeit nach Austauschtransfusion. Signifikante Veränderungen zwischen den Gruppen sind mit einem „\*“ gekennzeichnet.

### **3.2 Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode**

Die MDO besteht aus 8 Elektroden. Im Protokoll wurden 6 Meßzeitpunkte festgelegt. Bei 15 verschiedenen Meßwerten pro Aufnahmezeitpunkt erhält man am Versuchsende pro Tier 120 Meßwerte. Diese Meßwerte sind hier in Form von Summenhistogrammen graphisch dargestellt.

Da es innerhalb der Versuchsgruppen zu keinen extremen Schwankungen der Gewebeoxygenierung und somit zu keiner nennenswerten Formänderung der Summenhistogramme kam, wurden in Hinblick auf die Überschaubarkeit der Histogramme jeweils nur die Ausgangswerte und die Werte zu Versuchsende nach 120 min. graphisch dargestellt. Zwischen den einzelnen Versuchsgruppen konnte keine statistisch signifikante Änderung der Gewebe-pO<sub>2</sub>-Werte festgestellt werden.

### 3.2.1 DCLHb-Histogramm

Die Zahl der Einzelmessungen betrug in der „DCLHb<sup>TM</sup>“-Gruppe  $n = 960$ , bei einer Tierzahl von  $n=8$ . Der Median lag zu Beginn des Versuches bei 19,1. (Abb. 35) Es kam im Verlauf des Versuches zu keiner statistisch signifikanten Änderung der Werte. Bei Beendigung des Versuches nach 120' lag der Median bei 22,1 (Abb. 36). Die Lage des Median ist in den folgenden Histogrammen mit einem Pfeil markiert.

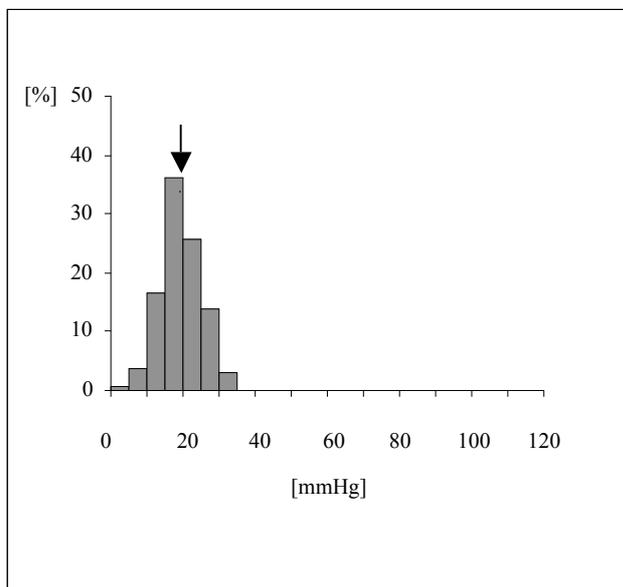


Abb. 35: DCLHb-Baseline-Histogramm. Dargestellt sind die Meßwerte auf der x-Achse, eingeteilt in Klassen zu je 5 mmHg, aufgetragen gegen die relative Häufigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Klassen auf der y-Achse.

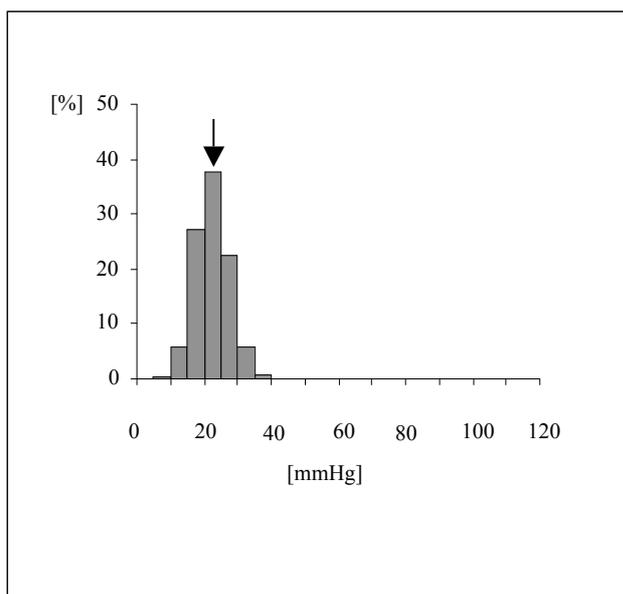


Abb. 36: DCLHb-120 min.-Histogramm. Dargestellt sind die Meßwerte auf der x-Achse, eingeteilt in Klassen zu je 5 mmHg, aufgetragen gegen die relative Häufigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Klassen auf der y-Achse.

### 3.2.2 „Syngenes Vollblut“-Histogramm

Um einen adäquaten Vergleich zwischen den verschiedenen Gruppen zu gewährleisten, betrug in der Gruppe „Syngenes Vollblut“ die Anzahl der Einzelmessungen ebenfalls bei  $n = 960$ , die Tierzahl bei  $n = 8$ . Zu Beginn des Versuches lag der Median der Versuchsergebnisse bei 20,0. (Abb. 37) Ab dem Zeitpunkt 0‘ war hier ein statistisch signifikanter Abfall auf 19,6 , zum Zeitpunkt 15‘ ein Anstieg der  $pO_2$ -Werte auf 21,7 zu erkennen. Dieser statistisch signifikante Anstieg der Werte blieb bis zum Versuchsende bestehen. (Abb. 38)

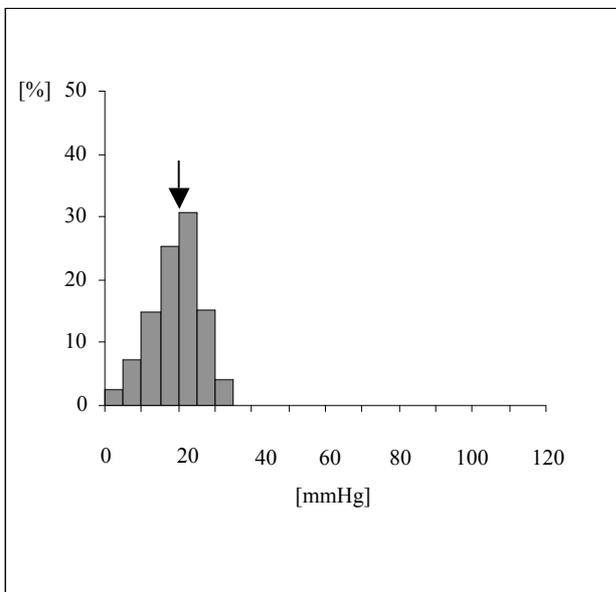


Abb. 37: Syngenes Vollblut-Baseline-Histogramm. Dargestellt sind die Meßwerte auf der x-Achse, eingeteilt in Klassen zu je 5 mmHg, aufgetragen gegen die relative Häufigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Klassen auf der y-Achse.

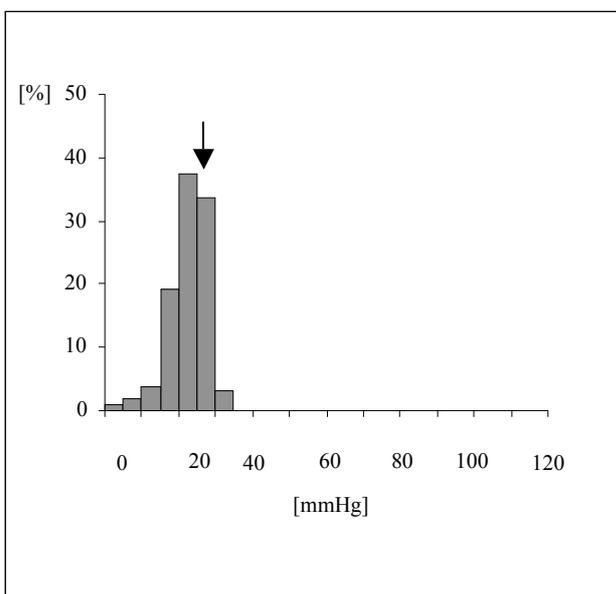


Abb. 38: Syngenes Vollblut-120 min.-Histogramm. Dargestellt sind die Meßwerte auf der x-Achse, eingeteilt in Klassen zu je 5 mmHg, aufgetragen gegen die relative Häufigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Klassen auf der y-Achse.

### 3.2.3 „Syngene Erythrozytenkonzentrate 1 Tag lang gelagert“-Histogramm

Die „Gruppe 1 Tag lang gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ bestand aus 7 Tieren; es wurden 840 Einzelmessungen durchgeführt. Hier lag der Median der Ausgangswerte bei 19,8. (Abb. 39) Ab dem Zeitpunkt 0‘ stiegen die  $pO_2$  auf statistisch signifikant höhere Werte von 20,0 an. Die statistische Signifikanz blieb bis zum Versuchsende bestehen. (Abb. 40)

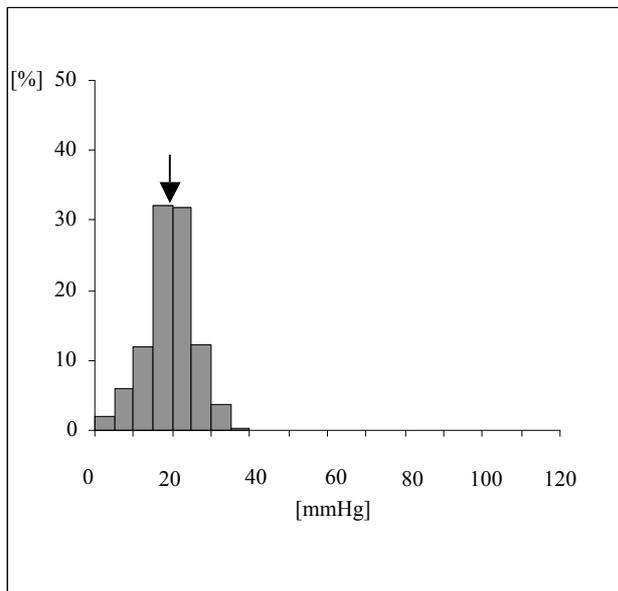


Abb. 39: EK 1 Tag-Baseline-Histogramm. Dargestellt sind die Meßwerte auf der x-Achse, eingeteilt in Klassen zu je 5 mmHg, aufgetragen gegen die relative Häufigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Klassen auf der y-Achse.

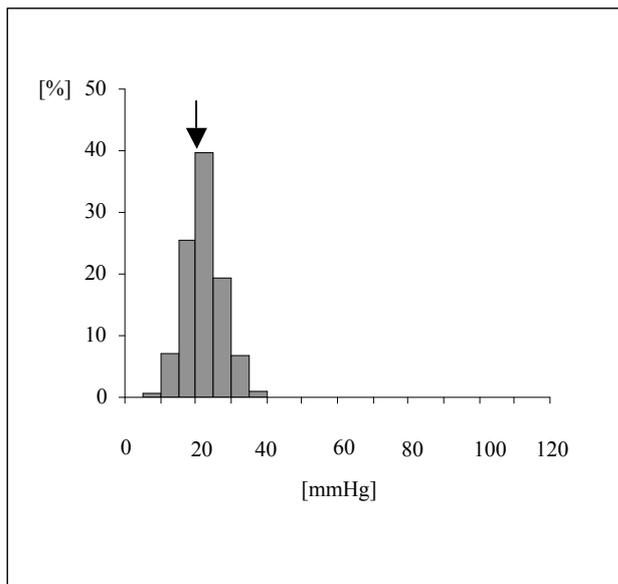


Abb. 40: EK 1 Tag-120 min.-Histogramm. Dargestellt sind die Meßwerte auf der x-Achse, eingeteilt in Klassen zu je 5 mmHg, aufgetragen gegen die relative Häufigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Klassen auf der y-Achse.

### 3.2.4 „Syngene Erythrozytenkonzentrate 24-28 Tage lang gelagert“-Histogramm

In der „Gruppe 24-28 Tage lang gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ waren 7 Tiere enthalten von denen 840 Einzelwerte erzielt wurden. Der Median der Ausgangswerte lag bei 19,1. (Abb. 41) Bis zum Versuchsende stieg die Gewebeoxygenierung in einem nicht signifikanten Maße auf einen Median von 22,2 an. (Abb. 42)

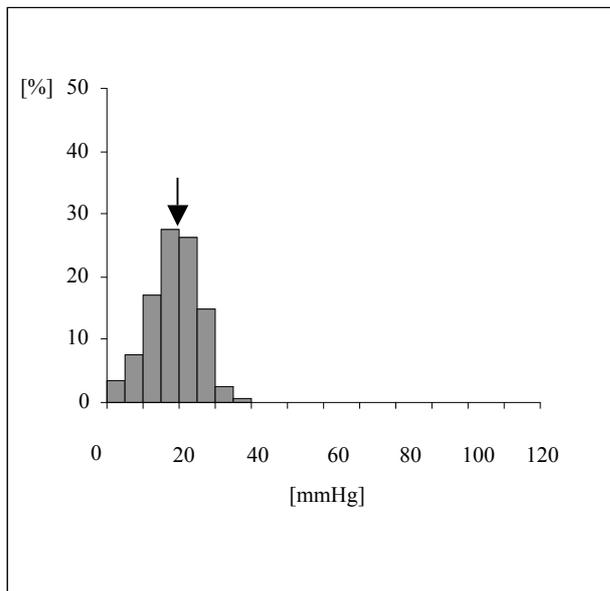


Abb. 41: EK 24-28 Tage-Baseline-Histogramm. Dargestellt sind die Meßwerte auf der x-Achse, eingeteilt in Klassen zu je 5 mmHg, aufgetragen gegen die relative Häufigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Klassen auf der y-Achse.

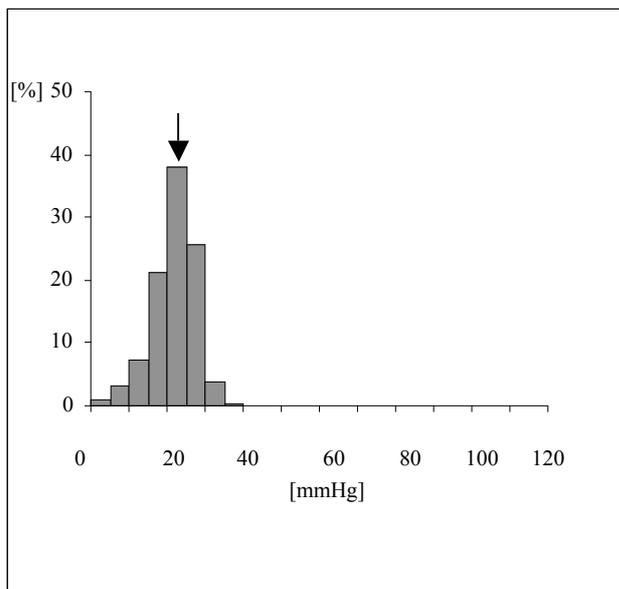


Abb. 42: EK 24-28 Tage 120 min.-Histogramm. Dargestellt sind die Meßwerte auf der x-Achse, eingeteilt in Klassen zu je 5 mmHg, aufgetragen gegen die relative Häufigkeit ihres Auftretens in den einzelnen Klassen auf der y-Achse.

## 4 Diskussion

### 4.1 Diskussion von: Material und Methoden

#### 4.1.1 *Zur Geschichte der Mikrozirkulation*

Das Erkennen pathophysiologischer Veränderungen setzt die Kenntnis der apathologischen Situation voraus. So erfordert das Forschen in der Mikrozirkulation detailliertes Wissen über die Mikrostrombahn. Seit der Entdeckung des Blutkreislaufes von William Harvey im Jahre 1616 beschäftigen sich Anatomen und Physiologen mit diesem Thema. Mit seiner Arbeit „Blutfluß in kleinen Gefäßen“ setzt Malphigi im Jahre 1661 einen Meilenstein in der Mikrozirkulationsforschung (111). Die ersten direkten Beobachtungen der kleinsten Blutgefäße konnte Jones im Jahre 1852 machen. Anhand der transparenten Flügel einer Fledermaus studierte er die Blutbahnen und ihre rhythmischen Kontraktionen (85). Wenige Jahre später gelangen Roy und Brown (1879) weitere Fortschritte durch die Erforschung der Mikrozirkulation in der Schwimnhaut des Frosches (139). Es vergingen Jahre bis 1924 Sandison ein „transparentes“ Kammermodell am Kaninchenohr entwickelte (143). Dieses Kammermodell wurde im Laufe der Jahre modifiziert und weiterentwickelt (23, 144, 145, 171, 172). Algire implantierte im Jahre 1943 erstmals eine Kammer in die Rückenhautfalte von Mäusen (3). Als 1948 von Zweifach das coecale Mesenterium der Ratte zu wissenschaftlichen Untersuchungen erschlossen wurde, gelangen der Mikrozirkulationsforschung weitere Fortschritte (176).

Der Syrische Goldhamster wurde erstmals von Lutz und Fulton für intravitalmikroskopische Zwecke eingesetzt. Sie entwickelten 1954 ein Kammermodell für die Backentasche des Hamsters (108). In den folgenden Jahren wurden die Versuchsmodelle immer weiter modifiziert und spezialisiert. Dabei bediente man sich je nach Aufbau und Ziel der Versuche verschiedener Versuchstiere (11, 12, 35, 54).

#### 4.1.2 *Das Rückenhautkammermodell am Syrischen Goldhamster*

Zur Beantwortung der unter 1.5.1 gestellten Fragestellung ist ein Versuchsmodell nötig, welches die folgenden Kriterien erfüllt:

- Durchführung der Untersuchung am quergestreiften Rückenmuskel des Hamsters
- Möglichkeit von wiederholten Messungen im selben Gewebeareal
- Anforderung an ein hohes optisches Auflösungsvermögen
- Quantitative offline Analyse
- Dauer des Versuchs über einen Zeitraum von 120 min.

Aufgrund dieser komplexen Anforderungen wurde für die vorliegenden Experimente das von Endrich et al. 1980 eingeführte Modell der Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster gewählt (33). Dieses Modell erlaubt die Beobachtung der Mikrozirkulation des quergestreiften Rückenmuskels am wachen Tier über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen (33).

Im Gegensatz zu Maus oder Ratte weist die Präparation am Hamster große Vorteile auf. Beim Hamster lassen sich die zu präparierenden Muskelschichten, insbesondere der Retractor-Muskel, leicht voneinander lösen, da hier nur eine geringe intermuskuläre Gefäßversorgung besteht. Weiterhin erweist sich die Hamsterpräparation deutlich transluzenter im Vergleich zu den Präparationen bei der Ratte und der Maus (116). Man erhält nach Durchführung einer schonenden Präparationstechnik eine etwa 200-400 µm dicke Gewebeschicht, welche ausgezeichnete optische Verhältnisse bietet (33). Durch ausgedehnte Untersuchungen an der Hamsterrückenhaut-Präparation konnte nachgewiesen werden, daß die mikrohämodynamischen Parameter vergleichbar sind zu anderen Skelettmuskel-Präparationen. Auch ultrastrukturelle Untersuchungen belegten eine intakte Skelettmuskulatur mit unauffälligem Gefäßendothel und Mastzellen (48, 33). Des weiteren konnte belegt werden, daß 48 Stunden nach der chirurgischen Präparation des Rückenhautmuskels die Anzahl der rollenden und fest adhärenen Leukozyten in den postkapillären Venolen des quergestreiften Hautmuskels vergleichbar ist mit dem Ausmaß der spontanen Leukozyten-Endothel-Interaktion in postkapillären Venolen im nicht-chirurgischen Modell am Ohr der haarlosen (130) und der BALB/c Maus (82).

Ein weiterer Vorteil dieses Modells liegt im Verzicht auf Anästhetika während des Versuchablaufs. Damit können potentielle Einflüsse bzw. Nebenwirkungen von Narkotika vermieden werden; durch Veränderung der physiologischen Verhältnisse stellen Narkotika, eine schlecht kontrollierbare Variable am Versuchstier dar (26, 34, 36, 41, 78).

Durch chirurgische Manipulationen des zu untersuchenden Gewebes bei der Implantation der Rückenhautkammer kann es zu Entzündungsreaktionen mit Gewebeödemen und anschließender Neovaskularisation kommen (18). Diese beeinflussen nicht nur die optischen

Bedingungen der Präparation, sondern auch die Reaktivität der Mikrogefäße. Lindbom et al. zeigten diesen Sachverhalt an einer Präparation des Tenuissimus-Muskels. Geringste Manipulationen des Muskels, wie z.B. Erzeugung einer Traktion, führten zu einer Zunahme der Gesamtdurchblutung um das 7-fache und zu einem Anstieg der kapillären Blutzellgeschwindigkeit um den Faktor 5 (102). Daher wird bei der Implantation der Rückenhautkammer eine möglichst atraumatische Präparation mit geringsten chirurgischen Manipulationen gefordert. Zudem erfolgt die Implantation der Rückenhautkammer 48 Stunden vor Versuchsbeginn um das chirurgische Trauma und dessen Folgen für das Gewebe und ihren Einfluß auf die Versuchsergebnisse so gering wie nur möglich zu halten.

#### 4.1.3 *Diskussion der Untersuchungstechniken*

##### 4.1.3.1 Intravitalfluoreszenzmikroskopie

In der vorliegenden Studie wurde die Technik der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation verwendet. Diese beinhaltet die Messung der Blutfließgeschwindigkeit, des lokalen mikrovaskulären Gefäßdurchmessers, die Messung der intravitalem Leukozyten-Endothel-Interaktion, der Funktionellen Kapillardichte sowie der Extravasation von FITC-Dextran 150 kD in den perivaskulären Raum. Insgesamt ermöglicht sie einen direkten Einblick in die Mikrozirkulation des Gewebes. Intravitale fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen wurden nur an Tieren durchgeführt, welche die Kriterien der Präparation und Mikrozirkulation (unter 2.2.5 beschrieben), voll erfüllten. Insbesondere wurden Tiere mit Ödemen und Entzündungszeichen in ihrer Rückenhautkammer vom Versuch ausgeschlossen.

Technisch benötigt werden für die Intravitalfluoreszenzmikroskopie eine leistungsfähige Lichtquelle, ein hochauflösendes Mikroskop mit der Möglichkeit zur Epi/oder Transillumination des zu untersuchenden Gewebes, und eine Videokamera mit Videorecorder. Als Lichtquelle für die Epiillumination diene eine Xenon- und eine Quecksilberlampe. Je nach angewandter Untersuchungstechnik und Wahl der Fluoreszenzfarbstoffe kann somit zwischen den beiden Lichtquellen und ihren unterschiedlichen Spektrumbereichen die gewünschte Wellenlänge des Lichtes gewählt werden. Eine Halogenlampe mit einer Kaltlichtfaseroptik wird beim Einsatz der Transillumination eingesetzt.

Das Auflösungsvermögen des Mikroskops wird neben der Beleuchtungsart im wesentlichen durch die numerische Apertur der verwendeten Linsen im Objektiv, der Aberration der einzelnen Linsen und der Kontrastierung der Präparation bestimmt.

Objektive mit höchstmöglicher numerischer Apertur gewährleisten die maximale Ausleuchtung der Präparation. Dies ermöglicht eine Reduktion der benötigten absoluten Lichtquantenmenge, was die Gefahr der Überblendung bzw. Überkontrastierung beim Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffe minimiert (69). Die chromatische und sphärische Aberration der Linsen ist durch die Wahl der Linsenanordnung weitestgehend eliminiert. Durch den Einsatz der Fluoreszenzfarbstoffen wird eine bestmögliche Kontrastierung der Präparation gewährleistet.

Auch die Vergrößerungswahl des Objektivs kann zur Verringerung der Lichtintensität beitragen. Je stärker die Vergrößerung des Objektivs, desto kleiner die zu bestrahlende Fläche. Die Folge ist eine Verstärkung der Lichtintensität pro Fläche (65).

Eine andere Möglichkeit, die für eine ausreichende Gewebekontrastierung nötige Lichtenergie zu reduzieren, liegt im Einsatz einer lichtintensitätsempfindlichen Kamera. Saetzler et al. stellten fest, daß durch Verwendung einer lichtintensitätsempfindlichen Kamera (Lichtsensitivität– $10^{-5}$  Lux) gegenüber der auch in unserem Labor eingesetzten weniger lichtempfindlicheren Kamera (Lichtsensitivität– $10^{-2}$  Lux) die erforderliche Lichtenergie für eine ausreichende Gewebekontrastierung um das 40 fache reduziert werden kann (142).

Die Einführung neuer, quantitativer intravitalmikroskopischer Methoden zur Analyse der Mikrozirkulation (8, 81, 83) und deren Kombination mit der Videotechnik (79, 80, 168, 169) legte Mitte der 50iger Jahre den Grundstein für eine detaillierte Analyse der Mikrozirkulation. Bis zu diesem Zeitpunkt war es mit den zur Verfügung stehenden Methoden meist nur möglich, Organe in ihrer Gesamtheit zu erfassen. Diese neuen Methoden waren den Methoden der integralen Durchblutungsmeßverfahren, wie z.B. die Mikrosphären-Technik (71, 74) klar überlegen. Im Gegensatz zu diesen integrierend messenden Verfahren ermöglicht die intravitale Fluoreszenzmikroskopie kontinuierlich die quantitative Analyse der Mikrozirkulation. Dabei erfolgt die Messung der Blutfließgeschwindigkeit mit Hilfe der Line-Shift-Diagramm-Methode, welche eine ideale Kombination aus automatischem und interaktivem Verfahren darstellt. Die Meßergebnisse werden zuverlässig, objektiv und schnell ermittelt, was eine gute Kontrolle und Bewertung der Güte der automatischen Messung ermöglicht (93). Des weiteren erlaubt die intravitale Fluoreszenzmikroskopie die Erfassung funktioneller Parameter wie z.B. die Funktionelle Kapillardichte (131, 147, 174), d.h. der Dichte von Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Fläche, sowie die quantitative Messung

der Extravasation von Makromolekülen in das perivaskuläre Interstitium (133, 162) als Parameter für die endotheliale Schrankenfunktion.

Unter Zuhilfenahme des unter Punkt 2.3.3. beschriebenen computergesteuerten Mikroskopiertisches kann eine wiederholte Messung der entsprechenden Parameter an identischen Arealen der zuvor definierten Gefäßabschnitte durchgeführt werden. Dies ermöglicht den exakten Vergleich der Gefäßsegmente im Laufe des Versuchs und bildet die Grundlage für Auswertung und Bearbeitung der Versuchsaufnahmen.

#### 4.1.3.2 Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode

Veränderungen des Gewebe- $pO_2$  spiegeln einen Nettoeffekt zwischen dem Sauerstoffangebot und dem Sauerstoffbedarf wider. Dieser hängt u.a. von der arteriellen Sauerstoffsättigung, der Gewebepfusion und vom Sauerstoffbedarf des Gewebes ab.

Zur Quantifizierung der Gewebeoxygenierung sind in der Literatur unterschiedlichste Verfahren beschrieben worden. Stainsby et Otis erwähnen 1964 erstmals die Erfassung der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz zur Bestimmung der Gewebeoxygenierung (75, 158). Andere Untersuchungsmöglichkeiten schließen die von Lamb beschriebenen Gewebekammern (97), die Stichelektrode (96, 170), bis hin zu intrazellulären Indikatoren ein (25). Diese Untersuchungsmethoden zur Bestimmung der Gewebeoxygenierung kommen jedoch für die hier durchgeführte Studie nicht in Betracht. Zum Beispiel kann bei der Erfassung der arterio-venösen Sauerstoffdifferenz zur Bestimmung des Gewebe- $pO_2$  das zu untersuchende Areal nicht exakt definiert und wiederholt erfaßt werden. Noch kann eine Verfälschung der Meßergebnisse durch eventuelle arterio-venöse Shunts ausgeschlossen werden. Die Verwendung einer Stichelektrode in der Rückenhautkammer des Syrischen Goldhamsters zur Beurteilung des Gewebe- $pO_2$  führt darüber hinaus zu traumatischen Schäden der Kammerpräparation, so daß keine Untersuchungen über einen längeren Zeitverlauf möglich sind. Intrazelluläre Indikatoren erlauben nur eine einmalige Messung (25) und kommen daher für diese Studie nicht in Betracht.

Zur Beurteilung des Sauerstoffpartialdrucks im Gewebe verwendeten wir in dieser Studie daher die Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode (91). Diese Methode stellt sich bei den zur Auswahl stehenden Möglichkeiten zur Bestimmung des Gewebe- $pO_2$  als die geeignetste dar. Der Vorteil der Elektrode gründet zum einen in der Möglichkeit des atraumatischen Arbeitens auf der Präparation. In dem weiten Gewebeareal, das mit jeweils 8

randomisierten Messungen zu einem Zeitpunkt untersucht werden kann, werden die dynamischen Veränderungen der Meßwerte quantitativ erfaßt und kontinuierlich aufgezeichnet. Zum anderen erlaubt diese Technik die Möglichkeit der repetitiven Anwendung über einen längeren Zeitraum. Bei der Messung des lokalen Sauerstoffpartialdrucks gehen mehrere vor Ort erfaßte Variable ein. So sind unter anderem die Kapillargeometrie, die dynamischen Veränderungen der Durchblutung und die Hämoglobin-O<sub>2</sub>-Dissotiationskurve in den Meßdaten mit einbezogen (90, 109, 110).

#### 4.1.3.3 Mikrozirkulatorische Parameter

Die quantitative offline Analyse der Meßdaten erfordert ein hohes Maß an Konzentration und Erfahrung des Untersuchers beim Umgang mit den Methoden und der technisch anspruchsvollen Auswerteeinheit. Eine Trainingsphase zum Erlernen der Methoden, der Auswertung der Ergebnisse und des Umgangs mit der Auswerteeinheit ist nötig um die zur Verfügung stehenden Methoden richtig anzuwenden.

Bei einer hausinternen Versuchsauswertung der gleichen Aufnahmen durch den gleichen Untersucher an verschiedenen Tagen wichen die erhobenen Daten um  $\pm 10\%$  voneinander ab (131). Daher sind sowohl interindividuelle als auch intraindividuelle Schwankungen beim Auswerten der Daten nicht zu verhindern. Um diese Problematik so weit wie möglich zu verringern, wurden die gesamten Versuchsaufnahmen immer nur von einer Person in einem so gering wie möglich gehaltenem Zeitraum ausgewertet.

#### 4.1.3.4 Isovolumische Austauschtransfusion

Eine Isovolumische Austauschtransfusion führt zu einer „Verdünnung“ aller Blutbestandteile durch die verwendeten zellfreien Substitutionslösungen (118). Bedingt durch den Abfall der korpuskulären Anteile und somit der Viskosität führt dies zu einer Verbesserung der Fließeigenschaften und Fließbedingungen des Blutes. Daraus resultiert unter Aufrechterhaltung der Normovolämie ein überproportionaler Anstieg des Herzminutenvolumens. Daher führt die limitierte Hämodilution trotz Senkung des Hämatokrits und der damit einhergehenden Verringerung der Kapazität an Sauerstoffträgern

im Blut zu keiner Beeinträchtigung der Gewebe-Sauerstoffversorgung (122). Bedingt durch den Anstieg der Gesamt-Fluß-Rate steigt bei einem Hämatokrit von 30 % die Sauerstoff-Träger-Kapazität sogar auf ihren Maximalwert an. Dieser Sachverhalt wurde erstmals von Hint (1968) in einer theoretischen Studie aufgezeigt (73). Anhand von experimentellen Arbeiten konnte diese Theorie bestätigt werden (29, 119, 121, 123, 125).

In der vorliegenden Studie wurde eine Isovolumische Austauschtransfusion durchgeführt. Unter Zuhilfenahme der Formel von Bourke und Smith (16) wurde das Austauschvolumen ermittelt, wobei ein Zielhämatokrit von 30 % vorgegeben wurde. Zu beachten ist jedoch, daß dieser Hämatokrit nur in der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ zu erreichen war. In den übrigen Gruppen diente der Zielhämatokrit von 30 % lediglich zur Berechnung des Austauschvolumens. Da in den übrigen Gruppen Syngenes Blut, bzw. Erythrozytenkonzentrate als korpuskuläre Lösungen zur Hämodilution eingesetzt wurden, führte dies nicht zu einer Hämatokrit-Senkung, vielmehr stieg der Hämatokrit von Ausgangswerten um  $41 \pm 3$  auf einen Hämatokrit von Werten bis zu  $50 \pm 3$  % an.

Ziel war es jedoch unter optimaler Ausgangssituation der Sauerstoff-Träger-Kapazität, also der Oxygenierung des Blutes in der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ die Versuche zu beginnen. Daher wurde der Zielhämatokrit von 30 % in dieser Studie als Ausgangssituation für DCLHb<sup>TM</sup> zu gewählt.

#### 4.1.3.5 Versuchsgruppen

Unter Verwendung der Intravitalmikroskopie und der Mehrdraht-Oberflächensonde zum Erfassen des Gewebe-Sauerstoffpartialdrucks, wurden in der vorliegenden Studie mikrozirkulatorische Parameter in fünf unterschiedlichen Versuchsgruppen vergleichend untersucht. Dabei wurde eine Isovolumische Austauschtransfusion durchgeführt. Die erste Versuchsgruppe wurde mit einem künstlichen Sauerstoffträger DCLHb<sup>TM</sup> hämodiluiert, die zweite Gruppe erhielt Syngenes Vollblut. In den übrigen drei Gruppen wurde den Versuchstieren je „1 Tag gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“, „11-14 Tage gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ und „24-28 Tage gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ transfundiert. Die Gruppe „Syngenes Vollblut“ diente als Kontrollgruppe.

Bei allen ermittelten mikrozirkulatorischen und makrozirkulatorischen Parametern der Intravitalmikroskopie, als auch jenen der Sauerstoffpartialdruckmessung fanden sich keine

statistisch signifikanten Unterschiede zwischen den Ausgangswerten. Dieser Befund bildet die Basis für den gegenseitigen Vergleich der verschiedenen Versuchsgruppen. Damit können Rückschlüsse auf die Wirkung der eingesetzten Transfusionsstoffes in den jeweiligen Gruppen gezogen werden.

## **4.2 Diskussion der Ergebnisse**

### *4.2.1 Intravitalfluoreszenzmikroskopie*

Die Parameter Herzfrequenz und mittlerer arterieller Blutdruck bestätigten im Kern die von uns auf der Basis der Literaturangaben erwarteten Ergebnisse (Abb. 33 und 34). Wie von mehreren Forschungsgruppen beschrieben, verursacht die Applikation von DCLHb<sup>TM</sup> eine durch NO- scavenging verursachte Vasokonstriktion (58). Diese machte sich bereits zum Beginn der Austauschtransfusion durch einen signifikanten Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks bemerkbar (59, 152, 155), die Herzfrequenz fiel dabei reflektorisch ab (129). Erwartungsgemäß veränderte sich der mittlere arterielle Blutdruck in den verbleibenden Gruppen im Verlauf des Versuches nicht wesentlich. Die Herzfrequenz zeigte während des Versuches einen statistisch signifikanten Abfall - sowohl in der „DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe“ als auch in den Gruppen „11-14 Tage gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ und „24-28 Tage gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“. Dieser Abfall der Herzfrequenz sollte aber auch vor dem Hintergrund diskutiert werden, daß sich die Tiere während des Versuches in einer abgedunkelten Plexiglasröhre befanden. In dieser dunklen Umgebung schliefen die Tiere gelegentlich ein, was sich möglicherweise in einer Reduktion der Herzfrequenz bemerkbar machen könnte.

Die durch DCLHb<sup>TM</sup> ausgelöste Vasokonstriktion führte zu einer Abnahme des arteriellen Gefäßdurchmessers. Im Gegensatz zu Daten anderer Forschungsgruppen (151) ist die Vasokonstriktion an Gefäßen mit mittlerem Durchmesser in dieser Studie zu den verschiedenen Zeitpunkten weniger stark ausgeprägt. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, daß die Wirkung von DCLHb<sup>TM</sup> nicht in das hier erfaßte Zeitfenster fällt. Wie Nolte et al. feststellten (129), induziert die Gabe von DCLHb<sup>TM</sup> primär eine kurzzeitige 0-2 Minuten andauernde arterielle Vasokonstriktion. Da in dieser Studie Messungen aber zum Zeitpunkt 0' und dann erst wieder nach 15 min. durchgeführt wurden, entgeht unserer Studie diese frühe Vasomotion.

Ab dem Zeitpunkt 0' zeichnet sich in der Gruppe „11-14 Tage gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ eine arterielle Vasodilatation ab, was sich in einer statistisch signifikanten Veränderung des Gefäßdurchmessers widerspiegelt. Diese Vasodilatation ist in den übrigen Versuchsgruppen, in denen unterschiedlich lang gelagerte Erythrozytenkonzentrate eingesetzt wurden, jedoch nicht zu finden. Vergleicht man die einzelnen Werte eines jeden Tieres, so fällt auf, daß speziell ein Tier in dieser Gruppe bereits zum Zeitpunkt 0' einen Anstieg des Gefäßdurchmessers im Vergleich zu den übrigen Tieren um 50 % aufwies. Diese atypischen Werte wären eine mögliche Erklärung für den statistisch signifikanten Anstieg des Gefäßdurchmessers. Der Durchmesser postkapillärer Venolen zeigte keine wesentlichen Veränderungen. In den Gruppen „Syngenes Blut“ und „syngene Erythrozytenkonzentrate 1 Tag gelagert“ zeichnen sich ab dem Zeitpunkt 15' bis zum Versuchsende statistisch signifikante Werte ab. Betrachtet man nun dazu die makrozirkulatorischen Parameter, so ist zu erkennen, daß sowohl der mittlere arterielle Blutdruck als auch die Herzfrequenz in diesen Gruppen zu den jeweiligen Zeitpunkten abfallen. Darüber hinaus ist in der Gruppe „syngene Erythrozytenkonzentrate 1 Tag gelagert“ ein Abfall der Blutfließgeschwindigkeit zu erkennen. Möglicherweise resultiert daraus eine Abnahme des Herzzeitvolumens, eine Zunahme der Vorlast und dadurch eine venoläre Gefäßdilatation. Diese Annahmen könnten die Zunahme des postkapillären venolären Durchmessers erklären.

Wie bereits Nolte et al. feststellten, führt eine Isovolumische Austauschtransfusion mit DCLHb<sup>TM</sup> bereits nach 60 min. zu einem signifikantem Abfall der Funktionellen Kapillardichte um 25 %. Diese Reduktion der Funktionellen Kapillardichte ist mit unseren Ergebnissen vergleichbar. Nolte et al. erklären diese Auswirkung mit der vasoaktiven Wirkung des künstlichen Sauerstoffträgers (129). Eine andere mögliche Erklärung begründet sich in der durchgeführten Hämodilution. Die Funktionelle Kapillardichte wird definiert als die Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfenster ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ). Sie stellt ein Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes dar. Da es sich bei DCLHb<sup>TM</sup> um eine azelluläre Hämoglobin-Lösung handelt und nicht um eine erythrozytenreiche Infusionslösung, führt eine Hämodilution automatisch zu einer Senkung des Hämatokrits. Alternativ findet, bedingt durch die Vasokonstriktion, eine reduzierte Perfusion der Kapillaren statt.

Innerhalb der übrigen Gruppen waren keine statistisch signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Funktionelle Kapillardichte feststellbar. Im Vergleich zwischen den Gruppen traten jedoch statistisch signifikante Unterschiede auf, z.B. in der Gruppe „Syngenes Blut“ zu den

Zeitpunkten 15' und 30'. Vergleicht man aber die Ausgangswerte der einzelnen Gruppen, so ist festzustellen, daß die Gruppe „Syngenes Blut“ bereits zu Versuchsbeginn die höchsten Werte aufweist. Im Verlauf des Versuches bleiben diese Werte konstant hoch, während es bezüglich der Funktionellen Kapillardichte der anderen Gruppen eher zu einer leichten Reduktion kommt.

Derzeit durchgeführte und veröffentlichte Studien mit DCLHb<sup>TM</sup> beschreiben in Bezug auf die Blutfließgeschwindigkeit einen Anstieg vor allem zu Beginn der Versuche innerhalb der ersten Minuten (2 min.). Dieser Anstieg konnte in der hier vorgestellten Studie - wenn auch statistisch nicht signifikant - nachvollzogen werden. Erklärt werden kann dies als Folge der vasokonstriktiven Wirkung von DCLHb<sup>TM</sup>. Die übrigen Gruppen zeigten Schwankungen der Blutfließgeschwindigkeit, welche statistisch nicht signifikant waren.

Wie Nolte et al. (129) bereits feststellten, ergab die Auswertung der adhärenenten Leukozyten in der DCLHb<sup>TM</sup>-Gruppe keine Werte mit statistisch signifikanter Relevanz. Auch in den übrigen Gruppen lagen keine statistisch signifikanten Veränderungen vor. Die ermittelten Ergebnisse der nicht adhärenenten Leukozyten ließen jedoch starke Schwankungen erkennen.

Die Untersuchung der rollenden Leukozyten ergaben bei Nolte et al. im Vergleich zu dieser vorliegenden Studie unterschiedliche Ergebnisse. Es war eine Reduktion der Anzahl rollender Leukozyten zu erkennen, jedoch nicht in statistisch relevanten Größen. Diese Reduktion unterstreicht die Tatsache, daß der künstliche Sauerstoffträger frei von möglichen Verunreinigungen ist und sich während einer Therapie mit DCLHb<sup>TM</sup> keine freien Radikale bilden, die möglicherweise einen abhängigen Anstieg der Leukozyten bewirken könnten (134).

Betrachtet man die Graphik der fest adhärierenden Leukozyten in der „DCLHb<sup>TM</sup>“-Gruppe, so ist ein deutlicher Abfall der Leukozytenzahl zu erkennen. Dieser Leukozytenabfall war in der Studie von Nolte et al. im Gegensatz zu der hier vorliegenden Studie statistisch signifikant. In den übrigen Gruppen zeichnete sich eher ein Anstieg der Zahl fest adhärrender Leukozyten ab. Dieser Anstieg war besonders in der Gruppe „Syngenes Vollblut“ zu erkennen. Dies legt die Vermutung nahe, daß in den Vollblutprodukten mehr Leukozyten-Endothel-Interaktion aktivierende Antigene enthalten sind als in den zentrifugierten Erythrozytenkonzentraten: bei der immer gleich durchgeführten Herstellung der unterschiedlichen Erythrozytenkonzentrate werden diese zentrifugiert und das Plasma mit den abgesetzten Zellfragmenten und Leukozyten abpipettiert und verworfen. Daher kann man annehmen, daß die reduzierte Anzahl der Antigene einen geringeren Anstieg der fest

adhärenten Leukozyten der Erythrozytenkonzentrat-Gruppen im Vergleich zu der Gruppe „Syngenes Vollblut“ verursacht.

Bei der Untersuchung der arteriellen und venösen Extravasation während der Isovolumischen Austauschtransfusion mit DCLHb<sup>TM</sup> zeichneten sich in der Studie von Nolte et al. (129) keine signifikanten Unterschiede ab. Diese Beobachtung kann hier nicht bestätigt werden. Aufgrund der sehr geringen Standardabweichung der hier dargestellten Daten ergeben bereits geringste Wertänderungen eine statistische Signifikanz. Da diese statistisch signifikante Änderung nur in der Gruppe „Syngenes Vollblut“ sowohl in Arteriolen als auch in postkapillären Venolen zu finden ist, liegt die Vermutung nahe, daß weitere Faktoren auf diese Mechanismen einwirken. Zu denken ist zum Beispiel an die Wirkung der Transfusion von Syngemem Vollblut auf die Endothelpermeabilität. Wie bereits erwähnt, enthält das Vollblut eine hohe Konzentration antigen-wirksamer Stoffe. Es kann häufiger zu allergischen und pyrogenen Reaktionen nach der Gabe von Vollblut als nach der Transfusion von Erythrozytenkonzentraten kommen. Zusätzlich führen hohe Elektrolytkonzentrationen der Vollblutkonserven zu einer unerwünschten Überladung des Kreislaufes bis hin zu Intoxikationen. Granger und Kubes (1994) sowie Lehr und Arfors (1994) beschreiben eine Leukozyten-induzierte Gewebeerstörung (53, 100). Bedingt durch den Anstieg der Leukozytenzahl kommt es zu einer Zunahme der Extravasation, besonders in den postkapillär venolären Gefäßen.

#### 4.2.2 Gewebesauerstoffpartialdruck

Bei der Interpretation der Gewebesauerstoffpartialdrücke ist nicht nur der Median der erhobenen Meßdaten von Bedeutung. Viel wichtiger sind die Form und Lage der Histogramme. Dabei erfordert die Klasse niedrigster pO<sub>2</sub>-Werte, also der hypoxische Bereich der Histogramme (< 5 mmHg) verstärkte Aufmerksamkeit. Unter physiologischen Bedingungen ist das pO<sub>2</sub>-Histogramm links-schief glockenförmig und es finden sich nur wenige pO<sub>2</sub>-Werte im hypoxischen Bereich. (Abb. 18) Die meisten Werte liegen in den Klassen 15-30 mmHg (110). Trotz einer Linksverschiebung und einer Zunahme der hypoxischen Werte im Histogramm ändert sich der Median auch bei einer Minderperfusion des untersuchten Gewebes nur unwesentlich. Aus diesen Gründen sollte der Median der erhobenen Daten immer in Kombination mit der Form der Histogramme betrachtet werden.

In dieser Studie wurde der Gewebesauerstoffpartialdruck der Gruppen „DCLHb<sup>TM</sup>“, „Syngenes Vollblut“, „1 Tag gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ und „24-28 Tage gelagert syngene Erythrozytenkonzentrate“ bestimmt. Zwischen den Gruppen wurden keine statistisch signifikant wirksame Wertänderungen des Gewebe-pO<sub>2</sub> ermittelt. Auch im Verlauf des gesamten Versuchsprotokoll wurde kein statistisch signifikanter Abfall der Werte innerhalb der Gruppen beobachtet. In den Gruppen „Syngenes Vollblut“ und „1 Tag gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ war ab dem Zeitpunkt 0‘ ein statistisch signifikanter Anstieg der gemessenen pO<sub>2</sub>-Werte zu erkennen. Dies zeichnet sich durch den Anstieg der ermittelten Median-Werte und der nach rechts verschobenen Form des Histogramms aus. Betrachtet man nun hierzu die intravitalfluoreszenzmikroskopischen Parameter, scheint die Gabe von Syngemem Vollblut, bzw. frischen Erythrozytenkonzentraten zu einer Verbesserung der Gewebeoxygenierung des Skelettmuskels zu führen. In der Gruppe „24-28 Tage gelagerte syngene Erythrozytenkonzentrate“ und der „DCLHb<sup>TM</sup>“-Gruppe kam es tendenziell zu einer Verbesserung der Gewebe-pO<sub>2</sub>-Partialdrücke. Diese waren aber nicht signifikant.

In einer Studie von Fitzgerald et al. (39) wurde die Frage der Auswirkung von 28 Tage lang gelagerten Erythrozytenkonzentraten auf den Sauerstoffverbrauch von Sauerstoffangebot-abhängigen septischen Ratten bearbeitet. Aus dieser Studie geht hervor, daß der Einsatz von 28 Tage lang gelagerten Erythrozytenkonzentraten bei septischen Ratten zu keiner Verbesserung der Gewebeoxygenierung führt. Zu beachten ist jedoch, daß in dieser Studie von Fitzgerald et al. (39) die Gewebeoxygenierung nicht mit einer Mehrdraht-Dortmund-Oberflächen-Elektrode gemessen, sondern anhand des Sauerstoffverbrauchs beurteilt wurde.

Marik und Sibbald (113) untersuchten die Auswirkung von gelagerten Erythrozytenkonzentraten auf die Sauerstoffsättigung des Gewebes bei septischen Patienten einer Intensivstation. Bei dieser Studie verschlechterte sich die Gewebeoxygenierung der septischen Patienten unter Verwendung von 28 Tage lang gelagerten Erythrozytenkonzentraten. Mittels eines Gastro-Tonometers wurde durch Messung des gastrointestinalen pH's die gastrointestinale Oxygenierung bestimmt. Änderungen des gastrointestinalen pH's stehen hier im direkten Zusammenhang mit der Sauerstoffversorgung des gastrointestinalen Gewebes (113). Es zeigte sich ein deutlicher gastrointestinaler pH-Abfall nach Transfusion von länger als 15 Tage lang gelagerten Erythrozytenkonzentraten. Die Ergebnisse der einzelnen Studien sind jedoch nicht direkt miteinander vergleichbar, da unterschiedliche Parameter und Meßverfahren eingesetzt wurden.

Eine Studie von Nolte et al. (129) befaßt sich mit den Auswirkungen des künstlichen Sauerstoffträgers DCLHb<sup>TM</sup> auf den Gewebe- pO<sub>2</sub> des Rückenhautmuskels des Syrischen Goldhamsters. Sowohl das Versuchsmodell als auch die Untersuchungsmethoden waren identisch mit der hier vorliegenden Studie. Nolte et al. (129) zeigten jedoch eine Abnahme der Gewebe-pO<sub>2</sub>-Parialdrücke bei DCLHb<sup>TM</sup> nach einer Stunde Beobachtungszeit. Allerdings wurde zeitgleich eine signifikant erhöhte venoläre Blutfließgeschwindigkeit beobachtet. Diese führt zu einer verminderten Passagedauer der Erythrozyten im Bereich der Kapillaren, was wiederum mit einer verminderten Diffusionszeit des Sauerstoffs verbunden ist. Eine mögliche Erklärung für die widersprüchlichen Ergebnisse bei gleichem Versuchsaufbau.

Insgesamt muß bei der Beurteilung der Gewebesauerstoffpartialdrücke im Bereich des quergestreiften Rückenhautmuskels berücksichtigt werden, daß es sich um lokale Veränderungen der Gewebeoxygenierung handelt. Daher können keine Aussagen über die systemische Oxygenierung gemacht werden.

## 5 Zusammenfassung

Zunehmende Kosten und eine steigende Nachfrage nach Fremdblut bei rückläufiger Spendebereitschaft weisen auf die Notwendigkeit von Blutersatzstoffen hin. Bei kritischen Hämoglobinwerten werden beim Einsatz von kristalloiden und/oder kolloidalen Infusionslösungen zur Wiederherstellung der Makrohämodynamik und des Sauerstofftransportes nur unbefriedigende Ergebnisse erzielt. Die in den letzten Jahren entwickelten künstlichen Hämoglobinlösungen weisen bisher positive Ergebnisse auf in Bezug auf die Makrozirkulation. Der Einfluß dieser Lösungen auf die Mikrozirkulation ist derzeit noch wenig untersucht worden. Aus diesem Grunde wurde am Institut für Chirurgische Forschung eine experimentelle Studie am validierten Rückenhautkammermodell am Syrischen Goldhamster durchgeführt.

In dieser Studie wurden die Auswirkungen des künstlichen Sauerstoffträgers DCLHb<sup>TM</sup> auf die Mikrozirkulation und die Gewebeoxygenierung mit unterschiedlich lang gelagerten Erythrozytenkonzentraten verglichen. Als Modell diente die Rückenhautkammer am Syrischen Goldhamster. Zur Untersuchung der Mikrozirkulation diente das Intravitalmikroskop. Insgesamt beinhaltet dieser Teil der Studie 5 verschiedene Gruppen mit je 8 Versuchstieren (DCLHb<sup>TM</sup> n=8; Syngenes Vollblut n=8; Syngene Erythrozytenkonzentrate 1 Tag gelagert n=8; Syngene Erythrozytenkonzentrate 11-14 Tage gelagert n=8; Syngene Erythrozytenkonzentrate 24-28 Tage gelagert n=8). Die Gewebeoxygenierung wurde unter Zuhilfenahme der Mehrdraht-Oberflächensonde analysiert. Diese Messung erfolgte in 4 weiteren Gruppen von 7 bzw. 8 Versuchstieren. (DCLHb<sup>TM</sup> n=8; Syngenes Vollblut n=8; Syngene Erythrozytenkonzentrate 1 Tag gelagert n=7; Syngene Erythrozytenkonzentrate 24-28 Tage gelagert n=7). Die Applikation der entsprechenden Blutkonzentrate erfolgte durch isovolämische Austauschtransfusion.

Die folgenden mikrozirkulatorischen Parameter wurden mit Hilfe der Intravitalmikroskopie quantitativ erfaßt: Gefäßdurchmesser, postkapilläre venoläre Blutfließgeschwindigkeit, Funktionelle Kapillardichte, Leukozyten/Endothel-Interaktion, Extravasation, Scherrate. Zur Beurteilung der Makrohämodynamik wurden kontinuierlich der mittlere arterielle Blutdruck und die Herzfrequenz aufgezeichnet.

Zur Beurteilung der lokalen Gewebe-Sauerstoffversorgung wurden für jede der 4 untersuchten Gruppen PO<sub>2</sub>-Summenhistogramme erstellt.

Im Bereich der mikrozirkulatorischen Parameter arteriolärer und postkapillärer venolärer Gefäßdurchmesser traten weder in der DCLHb<sup>TM</sup> - noch in der Gruppe der 24-28 Tage lang gelagerten Syngene Erythrozytenkonzentrate wesentliche Veränderungen auf. In den übrigen Versuchsgruppen nahm der Gefäßdurchmesser gering, jedoch statistisch signifikant zu.

In keiner der zu untersuchenden Gruppen kam es zu einem signifikanten Anstieg der postkapillären venolären Blutfließgeschwindigkeit. Die ermittelten Werte der rollenden, adhärenen sowie nicht adhärenen Leukozyten waren stark, jedoch statistisch nicht signifikant Schwankungen unterworfen.

In Bezug auf die endotheliale Integrität waren geringe Zunahmen der arteriolären als auch der postkapillären venolären Extravasation zu erkennen. Statistisch signifikante Unterschiede wurden innerhalb der Arteriolen nur in der Gruppe 11-14 Tage gelagerte Syngene Erythrozytenkonzentrate festgestellt. Die Extravasation aus postkapillären Venolen erreichte in der Gruppe Syngenes Vollblut statistisch signifikante Werte.

Die funktionelle Kapillardichte nahm statistisch signifikant ab in der Gruppe DCLHb<sup>TM</sup>. Diese Reduktion war in den anderen Versuchsgruppen nicht zu beobachten. Dagegen nahm die Scherrate lediglich in der Gruppe der 14 Tage lang gelagerten Syngenen Erythrozytenkonzentrate statistisch signifikant ab.

Der Einfluß von DCLHb<sup>TM</sup> auf die Makrohämodynamik bewirkte einen sofortigen signifikanten Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes bei konstanter Herzfrequenz. In den übrigen Versuchsgruppen kam es zu keinen wesentlichen Änderungen der Makrohämodynamik.

Nach Hämodilution mit DCLHb<sup>TM</sup> trat während des Versuches eine tendenzielle Verbesserung der Gewebeoxygenierung auf. Bei Blutersatz durch frisches Syngenes Vollblut bzw. 1 Tag lang gelagerte Syngene Erythrozytenkonzentrate verbesserte sich der Gewebesauerstoffpartialdruck signifikant. In der Gruppe der 24-28 Tage lang gelagerten Syngene Erythrozytenkonzentrate verbesserte sich die Gewebeoxygenierung nicht.

Faßt man die gesamten hier erhobenen Daten der Intravitalmikroskopie und der Gewebesauerstoff-Partialdrücke zusammen, so läßt sich folgende Aussage treffen: ohne wesentliche Beeinflussung und negative Auswirkung auf die Mikrozirkulation führt der Austausch von Syngemem Vollblut, bzw. frischen Erythrozytenkonzentrat zu einer Verbesserung der Gewebeoxygenierung des Skelettmuskels. Sowohl der Austausch von 24-28 Tage gelagerten Syngenen Erythrozytenkonzentrat und der von DCLHb<sup>TM</sup> bewirkt

tendenziell eine Verbesserung der Gewebe- $pO_2$ -Partialdrücke. Daraus läßt sich ableiten, daß die Transfusion von frischen Erythrozytenkonzentraten nach wie vor die optimale Versorgung der Gewebeoxygenierung darstellt. Dennoch beinhalten die künstlichen Hämoglobinlösungen eine wirksame Möglichkeit zur Aufrechterhaltung des Sauerstofftransportes. Speziell die von Blutgruppen unabhängige, quasi infektfreie künstliche Hämoglobin-Lösung wäre von großer Bedeutung für die Notfallmedizin.

## 6 Literaturnachweis

1. Perioperative Red Blood Cell Transfusion. 1988. *JAMA* 260:2700-3
2. Final Consensus Statement. 1996. *Transfusion* 36:667
3. Algire GH. 1943. An adaptation of the transparent-chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4:1-11
4. Amberson WR. 1937. Blood substitute. *Biol Rev* 12:48
5. Amberson WR, Jennings JJ, Rhode MR. 1949. Clinical Experience with Hemoglobin-Saline Solutions. *J Appl Phys* 1:469-89
6. Amberson WR, Mulder AG, Steggerda FR. 1933. Mammalian life without red blood corpuscles. *Science* 78:106-7
7. Antonsson JB, Boye CC, Kruithoff KL. 1990. Validation of tonometric measurement of gut intramural pH during endotoxemia and mesenteric occlusion in pigs. *Am J Physiol* 259:G519-G523
8. Arfors KE, Bergqvist D, Intaglietta M, Westergren B. 1975. Measurements of blood flow velocity in the microcirculation. *Ups J Med Sci* 80:27-33
9. AuBuchon JP, Birkmeyer JD. 1993. Controversies in transfusion medicine; Is autologous blood transfusion worth the cost? *Transfusion* 34:79-83

10. Azari M, Rohn K, Picken J. 1994. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb): characterization of the process and the product manufactured under GMP requirements for clinical studies. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22:701-8
11. Baez S. 1959. Microcirculation in the intramural vessels of the small intestine in the rat: 114-125. In: Reynolds SRM, Zweifach BW (Eds): *The microcirculation, University of Illinois Rees Urbana*
12. Baez S. 1973. An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 5:384-94
13. Benedum J. 1993. Geschichte der Bluttransfusion. *Beitr Infusionsther* 29:1-16
14. Berlin NJ, Berk PD. 1975. The biological life of the red cell: 1003-1019. In: Surgenor DM: *The red blood cell, Academic Pr 2. ed, New York*
15. Blajchman MA. 1998. Immunomodulatory effects of allogeneic blood transfusions: clinical manifestations and mechanisms. *Vox Sang* 74:315-9
16. Bourke DL, Smith TC. 1974. Estimating allowable hemodilution. *Anesthesiology* 41:609-12
17. Brandt JL, Frank NR, Lichtman HC. 1951. The effects of hemoglobin solutions on renal functions in man. *Blood* 6:1152-8

18. Bundit V, Wissig SL. 1986. Surgical Exposure Induces Formation of an Arteriovenous Permeability Gradient for Macromolecules in the Microcirculation of Muscle. *Microvasc Res* 31:235-49
19. Chang TM. 1997. In: Blood substitutes: Principles, Methodes, Products and Clinical Trials. *Tissue Engineering, Karger, Basel*
20. Chang TM, Varma R. 1988. Immunological and systemic effects of transfusions in rats using pyridoxalated hemoglobin and polyhemoglobin from homologous and heterogenous sources. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 16:205-15
21. Chatterjee R, Welty WV, Walder RY, Pruitt SL, Rogers PH, Armone A, Walder JA. 1986. Isolation and characterization of a new hemoglobin derivative cross-linked between the  $\alpha$  chains (Lysine 99 $\alpha$ 1-99 $\alpha$ 2). *J Biol Chem* 261:9929-37
22. Claas FH, Koster de HS, Lagaaz EL, Van Rood JJ. 1993. A molecular mechanism of T cell down regulation by blood transfusion. *Exp Nephrol* 1:134-8
23. Clark ER. 1930. Recent modifications in the method of studying living cells and tissues in transparent chambers inserted in the rabbit's ear. *Anat Rec* 47:187-211
24. Clark LCJ, Wolf R, Granger D, Taylor Z. 1953. Continuous recording of blood oxygen tension by polarography. *J Appl Physiol* 6:189-93
25. Coburn RF, Mayers LB. 1971. Myoglobin O<sub>2</sub> tension determined from measurements of carboxymyoglobin in skeletal muscle. *Am J Physiol* 220:66-74

26. Colantuoni A, Bertuglia S, Intaglietta M. 1984. The effects of  $\alpha$ - and  $\beta$ -adrenergic reception agonists and antagonists and calcium entry blockers on the spontaneous vasomotion. *Microvasc Res* 28:143-58
27. Cunnington PG, Jenkins SM, Tam SC, Wong JT. 1981. Oxygen-binding and immunological properties of complexes between dextran and animal hemoglobin. *Biochem J* 193:261-6
28. Deby-Dupont G, Pincemail J, Lamy M. 1994. Hemoglobin-based red cell substitutes: Preliminary human studies: 264-75. In: Vincent J (Ed): *Yearbook of Intensive Care and Emerg Med, Springer Verlag Berlin, Heidelberg, New York*
29. Deem S, McKinney S, Polissar NL, Hedges RG, Swenson ER. 1999. Hemodilution during venous gas embolization improves gas exchange, without altering V(A)/Q or pulmonary blood flow distributions. *Anesthesiology* 6:1861-72
30. Desmond MJ, Thomas MJG, Gillon J, Fox MA. 1996. Perioperative Red Cell Salvage. *Transfusion* 36:644-51
31. Dietz NM, Joyner MJ, Warner MA. 1996. Blood substitutes: fluids, drugs, or miracle solutions? *Anesth Analg* 82:390-405
32. Dry SM, Bechard KM, Milford EL, Churchill WH, Benjamin RJ. 1999. The pathology of transfusion-related acute lung injury. *Am J Clin Pathol* 112:216-21

33. Endrich B, Asaishi K, Götz A, Messmer K. 1980. Technical report-new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med* 177:125-34
34. Endrich B, Messmer K. 1984. Quantitative analysis of the microcirculation in the awake animal: 79-105. In: Olszewski, W (Eds): *Handbook of Microsurgery*, CRC Press, Miami
35. Eriksson E, Myrhage R. 1972. Microvascular dimensions and blood flow in skeletal muscle. *Acta Physiol Scand* 86:211-22
36. Faber JE, Harris PD, Wigmann DL. 1982. Anesthetic depression of microcirculation, central hemodynamics and respiration in decerebrate rats. *Am J Physiol* 243:H837-H843
37. Farmer M, Przybelski RJ, McKenzie JE, Burhop K. 1995. Preclinical Data and Clinical Trials with Diaspirin Cross-linked Hemoglobin. *Investigator Brochure*, Baxter Healthcare Corporation, Illinois pp. 177-185
38. Feola M, Simoni J, Dobke M, Canizaro PC. 1988. Complement activation and the toxicity of stroma-free hemoglobin solutions in primates. *Circ Shock* 25:275-90
39. Fitzgerald RD, Martin CM, Dietz GE, Doig GS, Potter RF, Sibbald WJ. 1997. Transfusing red blood cells stored in citrate phosphate dextrose adenine-1 for 28 days fails to improve tissue oxygenation in rats. *Crit Care Med* 25:726-32

40. Friedman HI, DeVenuto F, Zuck TF, Mellick P, Lollini L. 1977. Histologic and ultrastructural effects of stroma-free hemoglobin solutions on rat liver, kidney and brain. *Surg Forum* 28:3-5
41. Funk W, Intaglietta M. 1983. Spontaneous arteriolar vasomotion as a determinant of peripheral vascular resistance. *Int J Microcirc Clin Exp* 2:11-25
42. Funk W, Messmer K. 1986. Topography and morphometry of the microcirculation in the hamster skin fold. *Int J Microcirc Clin Exp* 5:89
43. Funk W, Messmer K. 1995. Topographische und Morphometrische Kenngrößen der Mikrozirkulation in der Rückenhautkammer des Hamsters. *Gesellschaft für Mikrozirkulation eV, 9. Jahrestagung, Kurzmanuskripte* 19-27
44. Gawlowski DM, Harding NR, Granger HJ. 1989. Leukocyte phagocytosis and alterations in microvascular integrity elicited by FITC-Dextran 150 and epillumination in the microcirculation of the hamster cheek pouch. *Microvasc Res* 37:1-15
45. Gear ARL. 1974. Rhodamine 6G: a potent inhibitor of mitochondrial oxidative phosphorylation. *J Biol Chem* 249:3628-37
46. Glanz J. 1996. Hemoglobin Reveals New Role As Blood Pressure Regulator. *Science* 271:1670

47. Glück D, Kubanek B, Maurer C, Petersen N. 1998. Seroconversion of HIV, HCV, and HBV in Blood Donors in 1996 - Risk of Virus Transmission by Blood Products in Germany. *Infusion Therapy and Transfusion Medicine* 25:82-4
48. Goetz A. 1988. Quantitative Mikrozirkulationsanalyse im amelanotischen Hamstermelanom A-Mel-3. *Med Dissertation, Universität München*
49. Goldberg M. 1962. Studies of the acute renal effects of hemolyzed red blood cells in dogs including estimations of renal blood flow with krypton. *J Clin Invest* 41:2112-22
50. Goldman DW, Breyer RJ, Yeh D, Brockner-Ryan BA, Alayash AI. 1998. Acellular hemoglobin-mediated oxidative stress toward endothelium: a role for ferryl iron. *Am J Physiol* 44:H1046-H1053
51. Gombotz H, Kulier A. 1995. Reduction in the use of donated blood in surgical medicine. *Anaesthesist* 44:191-218
52. Goodnough LT, Scott MG, Monk TG. 1998. Oxygen carriers as blood substitutes. Past, present, and future. *Clin Orthop* 357:89-100
53. Granger D, Kubes P. 1994. The microcirculation and inflammation: modulation of leukocyte-endothelial cell adhesion. *J Leukocyte Biol* 55:662-75
54. Grant RT. 1964. Direct observations of skeletal muscle blood vessels (rat cremaster). *J Physiol London* 172:123-37

55. Grunewald W. 1970. Diffusion error and specific consumption of the Pt electrode during pO<sub>2</sub> measurements in the steady state. *Pflügers Arch* 320:24-44
56. Gulati A, Barve A, Sen AP. 1999. Pharmacology of hemoglobin therapeutics. *J Lab Clin Med* 133:112-9
57. Gulati A, Sharma AC, Singh G. 1994. Regional circulatory effects of diaspirin crosslinked hemoglobin can be blocked by the endothelin (ET) antagonist. *FASEB J* 8:A625
58. Gulati A, Sharma AC, Singh G. 1996. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit Care Med* 24:137-47
59. Gulati A, Singh G, Rebello S, Sharma AC. 1995. Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci* 56:1433-42
60. Habler O, Kleen M, Messmer K. 1999. Künstliche Sauerstoffträger-Alternativen zur Fremdbluttransfusion? *Zentralbl Chir* 124:260-70
61. Habler O, Messmer K. 1997. Verfahren zur Reduktion von Fremdbluttransfusionen in der operativen Medizin. *Anaesthesist* 46:915-26
62. Hagemann A, Welte M, Habler O, Kleen M, Krödel A, Messmer K. 1997. Avoidance of homologous blood transfusion despite extreme blood loss. *Anaesthesist* 46:964-8

63. Haradin AR, Weed RI, Redd CF. 1969. Changes in physical properties of stored erythrocytes. Relationship to survival in vivo. *Transfusion* 9:229-37
64. Hardy JF, Belisle S. 1994. Natural and synthetic antifibrinolytics in adult cardiac surgery: efficacy, effectiveness, and efficiency. *Can J Anaesth* 41:1104-12
65. Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D, Messmer K. 1997. An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp* 17:322-7
66. Hasibeder W, Hönlinger M, Schobersberger W. 1988. Sauerstofftransportfunktion in Erythrozytenkonzentraten: ein Vergleich zwischen CPDA-1 und in PAGGS Sorbit gelagerten Erythrozyten. *Beitr Infusionsther* 21:49-52
67. Heard SO, Helmoortel CM, Kent JC. 1991. Gastric tonometry in health volunteers: effects of ranitidine on calculated intramural pH. *Crit Care Med* 19:271-4
68. Heiss MM, Mempel W, Jauch KW, Delanoff C, Mayer G, Mempel M, Eissner HJ, Schildberg FW. 1993. Beneficial effects of autologous blood transfusion on infectious complications after colorectal cancer surgery. *Lancet* 342:1328-33
69. Herrmann KS. 1983. Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc Res* 26:238-49
70. Hertzman CM, Keipert PE, Chang TM. 1986. Serum antibody titers in rats receiving repeated small subcutaneous injections of hemoglobin or polyhemoglobin: a preliminary report. *Int J Artif Organs* 9:179-82

71. Heymann MA, Payne BD, Hoffmann JI, Rudolph AM. 1977. Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* 20:55-79
72. Heyrovski J. 1923. Processes at mercury dropping cathode. *Trans Faraday Soc* 19:785-8
73. Hint H. 1968. The pharmacology of dextran and the physiological background for the clinical use of rheomacrodex and macrodex. *Acta Anaesthesiol Belg* 19:119-38
74. Hoffmann JI, Heymann MA, Rudolph AM, Payne BD. 1977. Uses and abuses of the radioactive microsphere method of measuring regional blood flow. *Bibl Anat* 15:20-3
75. Honig CR, Frierson JL, Nelson CN. 1971. O<sub>2</sub> transport and VO<sub>2</sub> in resting muscle: Significance for tissue-capillary exchange. *Am J Physiol* 220:357-63
76. House SD, Lipowsky HH. 1987. Leukocyte-endothelium adhesion: Microhemodynamics in mesentery of the cat. *Microvasc Res* 34:363-79
77. Hüfner G. 1894. Neue Versuche zur Bestimmung der Sauerstoffkapazität des Blutfarbstoffes. *Arch Anat Physiol* 30:176
78. Intaglietta M, Messmer K. 1983. Microangiodynamics, peripheral vascular resistance and the normal microcirculation. *Int J Microcirc Clin Exp* 2:3-10
79. Intaglietta M, Silverman NR, Tompkins WR. 1975. Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television methods. *Microvasc Res* 10:165-79

80. Intaglietta M, Tompkins WR. 1973. Microvascular measurements by video image shearing and splitting. *Microvasc Res* 5:309-12
81. Intaglietta M, Tompkins WR, Richardson D. 1970. Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by on-line method. *Microvasc Res* 34:363-79
82. Janssen GH, Tangelder WGJ, Oude Egbrink MAG, Reneman RS. 1994. Spontaneous leukocyte rolling in venules in untraumatized skin of conscious and anesthetized animals. *J Physiol* 267:H1199-H1204
83. Johnson PC. 1967. Measurement of microvascular dimensions in vivo. *J Appl Physiol* 23:593-6
84. Jones JA. 1995. Red blood cell substitutes: current status. *British J Anaesthesia* 74:697-703
85. Jones TW. 1852. Discovery that the veins of the bat's wing (which are furnished with valves) are endowed with rhythmical contractility and the onward flow of blood is accelerated by each contraction. *Philos Trans R Soc London* 142:131-6
86. Katsuyama SS, Cole DJ, Drummond JC, Bradley K. 1994. Nitric oxide mediates the hypertensive response to a modified hemoglobin solution (DCLHb<sup>TM</sup>) in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22:1-7
87. Keipert PE. 1992. Properties of chemically cross-linked hemoglobin solutions designed as temporary oxygen carriers. *Adv Exp Med Biol* 317:453-64

88. Kessler M, Harrison DK, Höper J. 1986. Tissue oxygenation measurement techniques. *Microcirculatory technology* 24:390-425
89. Kessler M, Hoeper J, Krumme BA. 1976. Monitoring of tissue perfusion and cellular function. *Anaesthesiology* 45:184-97
90. Kessler M, Hoeper J, Lübbers DW, Ji S. 1981. Local factors affecting regulation of microflow, O<sub>2</sub> uptake and energy metabolism. In: Lübbers DW, Acker H, Leniner-Follert E, Goldstick TK (Eds): *Oxygen transport to tissues, Adv Exp Med Biol, Vol 169, Plenum, New York*
91. Kessler M, Lübbers DW. 1966. Aufbau und Anwendungsmöglichkeiten verschiedener pO<sub>2</sub>-Elektroden. *Pflügers Arch* 291:R82
92. Klein HG. 1995. Allogeneic transfusion risks in the surgical patient. *Am J Surg* 170:21S-6S
93. Klyscz T, Jünger M, Jung F, Zeintl H. 1997. Cap Image-ein neuartiges computerunterstütztes Videobildanalyzesystem für die dynamische Kapillarmikroskopie. *Biomed Technik* 42:168-75
94. Kreimeier U, Messmer K. 1996. Hemodilution in clinical surgery: state of the art 1996. *World J Surg* 20:1208-17
95. Krüger G-A. 1976. Erfahrungen bei Anwendung der präoperativen isovolämischen Hämodilution an einem mittleren Krankenhaus. *Anaesthesist* 25:170-1

96. Kunze K. 1966. Die lokale, kontinuierliche Sauerstoffdruckmessung in der menschlichen Muskulatur. *Pflügers Arch* 292:151-61
97. Lamb TW. 1966. Tissue gas tensions during methemoglobinemia. *J Appl Physiol* 21:858-64
98. Landow L, Phillips DA, Heard SO, Prevost D, Vandersalm TJ, Fink MP. 1991. Gastric tonometry and venous oximetry in cardiac surgery patients. *Crit Care Med* 19:1226-33
99. Larsen R, Kleinschmidt S. 1995. Kontrollierte Hypotension. *Anaesthesist* 44:291-308
100. Lehr HA, Arfors KE. 1994. Mechanisms of tissue damage by leukocytes. *Curr Opin Hematol* 1:92-9
101. Lehr HA, Leunig M, Menger MD, Nolte D, Messmer K. 1993. Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am J Pathol* 143:1055-62
102. Lindbom L, Tuma RF, Arfors KE. 1982. Blood flow in the rabbit tenuissimus muscle. Influence of preparative procedures for intravital microscopic observations. *Acta Physiol Scand* 114:121-7
103. Linden JV, Tourault MA, Scribner CL. 1997. Decrease in frequency of transfusion fatalities. *Transfusion* 37:243-4
104. Linderkamp O, Guntner M, Hittl W, Vargas VM. 1986. Erythrocyte deformability in the fetus, preterm, and term neonate. *Pediatr Res* 20:93-6

105. Lipowsky HH, Zweifach BW. 1978. Application of the "two-slit" photometric technique to the measurement of microvascular volumetric flow rates. *Microvasc Res* 15:93-101
106. Loeb A, McIntosh LJ, Raj NR, Longnecker D. 1997. Regional Vascular Effects of rHb1 Hemoglobin-Based Oxygen Carrier. *J Cardiovasc Pharmacol* 30:703-10
107. Logan SW, Rogers SR, Richardson D, Vaughan ED, Brown R. 1998. Adult respiratory distress syndrome after mikrovascular free tissue reconstruction in head and neck malignancy. *Br J Oral Maxillofac Surg* 36:371-4
108. Lutz BR, Fulton GP. 1954. The use of the hamster cheek pouch for the study of vascular changes at the microscopic level. *Anat Rec* 120:293-307
109. Lübbers DW. 1973. Local tissue pO<sub>2</sub>: Its measurement and meaning. *Urban und Schwarzenberg, München* pp. 151-155
110. Lübbers DW. 1977. Die Bedeutung des lokalen Sauerstoffgewebedruckes und des pO<sub>2</sub>-Histogramms für die Beurteilung der Sauerstoffversorgung eines Organs. *Prakt Anaesth* 12:184-201
111. Malpighi M. 1661. De Pulmonibus Observationes Anatomicae: 61-67. In: Fulton JF., Wilson LG (Eds): *Selected readings in the History of Physiology* 2. ed 1966, Thomas, Illinois, Springfield
112. Maltzan R. 1976. Möglichkeiten und Grenzen der präoperativen isovolämischen Hämodilution in einem Kreiskrankenhaus. *Anaesthesist* 25:172-4

113. Marik PE, Sibbald WJ. 1993. Effect of stored-blood transfusion on oxygen delivery in patients with sepsis. *JAMA* 269:3024-9
114. Meissner F, Müller-Wiefel H, Drüge H, Uddin N, Wirtz HJ, Bernhard A. 1976. Klinische Erfahrung beim Einsatz der induzierten präoperativen Hämodilution in der Gefäßchirurgie. *Anaesthesist* 25:166-9
115. Mempel W. 1993. Current focus: blood transfusion. Risks and problems in blood transfusion. *Zentralbl Chir* 118:563-6
116. Menger MD. 1991. Die Mikrozirkulation des quergestreiften Skelettmuskels nach Ischämie und Reperfusion: Eine experimentelle in vivo Studie am Syrischen Goldhamster. *Habilitationsschrift, Med. Fakultät, Universität München*
117. Mercuriali F, Inghilleri G. 1999. Transfusion risks and limitations. *Minerva Anesthesiol* 65:286-92
118. Messmer K. 1988. Therapiebedürftige Grenzwerte akuter Änderungen der Hämoglobin-Konzentration: 165-177. In: Zander R, Mertzluft FO (Eds): *Der Sauerstoffstatus des arteriellen Blutes*, Karger, Basel
119. Messmer K, Kreimeier U, Intaglietta M. 1986. Present state of intentional hemodilution. *Eur Surg Res* 18:254-63
120. Messmer K, Krombach F. 1998. Microcirculation research in experimental surgery. *Chirurg* 69:333-8

121. Messmer K, Lewis DH, Sunder-Plassmann L, Klövekorn WP, Mendler N, Holper K. 1972. Acute normovolemic hemodilution. Changes of central hemodynamics and microcirculatory flow in skeletal muscle. *Eur Surg Res* 4:55-70
122. Messmer K, Sunder-Plassmann L, Jesch F, Görnandt L, Sinagowitz E, Kessler M. 1973. Oxygen supply to the tissue during limited normovolemic hemodilution. *Res Exp Med* 159:152-66
123. Messmer K, Sunder-Plassmann L, Klövekorn WP, Holper K. 1972. Circulatory significance of hemodilution: rheological changes and limitations. *Adv Microcirc* 4:1-77
124. Miller FN, Sims DE, Schuschke DA, Abney DL. 1992. Differentiation of light-dye effects in the microcirculation. *Microvasc Res* 44:166-84
125. Mirhashemi S, Messmer K, Intaglietta M. 1985. Tissue perfusion during normovolemic hemodilution investigated by a hydraulic model of cardiovascularity. *Microvasc Res* 6:123-6
126. Moss GS, DeWoskin R, Cochin A. 1973. Stroma-free hemoglobin. Preparation and observations on in vitro changes in coagulation. *Surgery* 74:198-203
127. Nash GB, Meiselman HJ. 1981. Red cell aging: changes in deformability and other possible determinants of in vivo survival. *Microcirculation* 1:255-84

128. Nolte D. 1998. Die biologische Bedeutung der Selektine für die Leukozyten/Endothel-Interaktion in vivo - eine intravitalmikroskopische Studie an der Maus. *Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät, Ludwig-Maximilians Universität München*
129. Nolte D, Botzlar A, Pickelmann S, Bouskela E, Messmer K. 1997. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med* 130:314-27
130. Nolte D, Schmid P, Jäger U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K, Vestweber D. 1994. Leucocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am J Physiol* 36:H1637-H1642
131. Nolte D, Zeintl H, Steinbauer M, Pickelmann S, Messmer K. 1995. Functional Capillary Density: An Indicator of Tissue Perfusion? *Int J Microcirc* 15:244-9
132. Nylander E, Lund N, Wranne B. 1983. Effect of increased blood oxygen affinity on skeletal muscle surface oxygen pressure fields. *J Appl Physiol* 54:99-104
133. Olsson Y, Svensjö E, Arfors KE, Hultstrom D. 1975. Fluorescein labeled dextran as tracers for vascular permeability studies in the nervous system. *Acta Neuropathol* 33:45-50
134. Pincemail J, Detry O, Philippart C. 1995. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb<sup>TM</sup>): absence of increased free radical generation following administration in a rabbit model of renal ischemia and reperfusion. *Free Radical Biol Med* 19:1-9

135. Popovsky MA, Moore SB. 1985. Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 25:573-7
136. Provan D. 1999. Better blood transfusion. *BMJ* 318:1435-6
137. Rakic S. 1999. New findings on the physiopathology of acute hemolytic transfusion reactions. *Med Pregl* 52:19-24
138. Rohling RG, Zimmermann AP, Biro P, Haers PE, Sailer HF. 1999. Alternative methods for reduction of blood loss during elective orthognathic surgery. *Int J Adult Orthodon Orthognath Surg* 14:77-82
139. Roy C, Brown G. 1879. The blood pressure and its variations in the arterioles, capillaries and small venules. *J Physiol London* 2:223-59
140. Sack FU. 1992. Mikrozirkulation und Ischämie: die Pathophysiologie der Reperfusion des quergestreiften Muskels unter besonderer Berücksichtigung der Leukozyten-Endothel Interaktion und therapeutische Interventionsmöglichkeiten. Eine Intravital-mikroskopische Analyse am Syrischen Goldhamster. *Dissertation, Medizinische Fakultät, Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*
141. Sack FU, Funk W, Hammersen F, Messmer K. 1987. Microvascular injury of skeletal muscle and skin after different periodes of pressure induced ischemia. *Prog Appl Microcirc* 12:282-8

142. Saetzler RK, Jallo J, Lehr HA, Philips CM, Vasthare U, Arfors KE, Tuma RF. 1997. Intravital fluorescence microscopy: impact of light-induced phototoxicity on adhesion of fluorescently labeled leukocytes. *J Histochem Cytochem* 45:505-13
143. Sandison JC. 1924. A new method for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat Rec* 28:281-7
144. Sandison JC. 1928. Observations on growth of blood vessels as seen in transparent chamber introduced into rabbit's ear. *Am J Anat* 41:475-96
145. Sandison JC. 1928. The transparent chamber of the rabbit's ear, giving a complete description of improved technique of construction and introduction, and general account of growth and behavior of living cells and tissues as seen with the microscope. *Am J Anat* 41:415-24
146. Sazama K. 1990. Reports of 355 transfusion-associated deaths: 1976 through 1985. *Transfusion* 30:583-90
147. Schmid-Schoenbein GW, Zweifach BW, Kovalchek S. 1977. The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues. *Microvasc Res* 14:303-317
148. Schreiber GB, Busch MP, Kleinmann SH, Korelitz JJ. 1996. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *New England J Med* 334:1685-90

149. Schriemer PA, Longnecker DE, Mintz PD. 1988. The possible immuno-suppressive effects of perioperative transfusion in cancer patients. *Anesthesiology* 68:422-8
150. Schröder U, Arfors KE, Tangen O. 1976. Stability of fluorescein labeled dextran in vivo and in vitro. *Microvasc Res* 11:33-9
151. Schultz SC, Grady B, Cole F, Hamilton I, Burhop K, Malcom DS. 1993. A role for endothelin and nitric oxide in the pressure response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 122:301-8
152. Schultz SC, Powell CC, Burris DG, Nguyen H, Jaffin JH, Malcolm DS. 1994. The efficacy of Diaspirin Crosslinked Hemoglobin solution resuscitation in a model of uncontrolled hemorrhage. *The Journal of Trauma* 37:408-12
153. Scott MG, Kucik DF, Goodnough LT, Monk TG. 1997. Blood substitutes: evolution and future applications. *Clinical Chemistry* 43:1724-31
154. Sewell IA. 1966. Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch. *J Anat* 100:839-56
155. Sharma AC, Rebello S, Gulati A. 1994. Regional circulatory and systemic hemodynamic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin in the rat. *Art Cells Blood Subs and Immob Biotech* 22:593-602
156. Sharma AC, Singh G, Gulati A. 1995. Role of NO mechanism in cardiovascular effects of diaspirin cross-linked hemoglobin in anesthetized rats. *Am J Physiol* 269:H1379-H1399

157. Sielenkämper AW, Chin-Yee IH, Martin CM, Sibbald WJ. 1997. Diaspirin Crosslinked Hemoglobin Improves Systemic Oxygen Uptake in Oxygen Supply-dependent Septic Rats. *Am J Respir Crit Care Med* 156:1066-72
158. Stainsby WN, Otis AB. 1964. Blood flow, blood oxygen tension, oxygen uptake and oxygen transport in skeletal muscle. *Am J Physiol* 206:858-66
159. Standl T. 1998. Hemoglobin solutions: volume replacement or oxygen therapy? *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 33:699-714
160. Starck v. 1898. über Hämoglobininjectionen. *Medizinische Wochenschrift* 3:69-72
161. Sunder-Plassmann L, Klövekorn WP, Holper K, Hase O, Messmer K. 1971. The physiological significance of acutely induced hemodilution: 23-28. In: Ditzel J, Lewis DH (Eds): *6<sup>th</sup> European Congress of Microcirculation, Aalborg 1970, Karger, Basel*
162. Svensjö E, Arfors KE, Arturson G, Rutili G. 1978. The hamster cheek pouch preparation as a model for studies of macromolecular permeability of the microvasculature. *Upsala J Med Sci* 83:71-9
163. Taleghani BM, Großmann R, Waltenberger G, Geise W, Langer R, Henrich HA, Wiebecke D. 1996. Lagerungsbedingte rheologische und biochemische Veränderungen von Erythrozytenkonzentraten in additiver Lösung und deren mögliche Zusammenhänge. *Beitr Infusionsther* 33:141-4
164. Tartter PI. 1988. Blood transfusion and infectious complications following colorectal cancer surgery. *Br J Surg* 75:789-92

165. Thomas MJG, Gillon J, Desmond MJ. 1996. Preoperative Autologous Donation. *Transfusion* 36:633-9
166. Vamvakas EC, Taswell HF. 1994. Epidemiology of blood transfusion. *Transfusion* 34:464-70
167. Vrieling H, Reesink HW. 1998. Transfusion-transmissible infections. *Curr Opin Hematol* 5:396-405
168. Wayland H, Johnson PC. 1967. Erythrocyte velocity measurements in microvessels by a correlation method. *Bibl Anat* 9:160-3
169. Wayland H, Johnson PC. 1967. Erythrocyte velocity measurements in microvessels by a two-slit photometric method. *J Appl Physiol* 22:337
170. Whalen WJ, Nair P, Buerk D, Thunning CA. 1974. Intracellular pO<sub>2</sub> and its regulation in resting muscle of the guinea pig. *Circ Res* 21:251-61
171. Williams RG. 1934. An adaptation of the transparent chamber technique to the skin of the body. *Anat Rec* 60:487-91
172. Williams RG. 1934. The transparent chamber adapted for cell culture and permitting access to the contained living tissue. *Anat Rec* 60:487-91
173. Winslow RM. 1995. Blood substitutes-a moving target. *Nature Medicine* 1:1212-5

174. Zeintl H. 1985. Computergestützte Kapillarerkennung und Kapillardichtebestimmung in der Intravitalmikroskopie. *Dissertation, Medizinische Fakultät Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg*
175. Zeintl H, Sack FU, Intaglietta M, Messmer K. 1989. Computer assisted leukocyte velocity measurement in intravital microscopy. *Int J Microcirc Clin Exp* 8:293-302
176. Zweifach BW. 1948. Microscopic observations of circulation in the rat mesoappendix and dog omentum. Use in the study of vasotropic substances. In: *Methods in Medical Research*. Year Book Publications, Chicago. *Potter VR (ED)* 1:131-189
177. Zweifach BW, Metz DB. 1955. Selective distribution of blood through the terminal vascular bed of mesenteric structure and skeletal muscle. *Angiology* 6:282-94

## 7 Lebenslauf

**Name:** Constanze Wagner

**Geboren:** 10. Dezember 1973, Mainz

**Eltern:** Prof. Dr. med. Dr. h.c. Hermann Wagner, PhD  
Dr. med. Gerhild Wagner

**Schule:** 1978-1988 Grundschule und Humanistisches Rhabanus-Maurus-Gymnasium in Mainz  
1989-1993 Landerziehungsheim Schondorf  
1993 Allgemeine Hochschulreife

**Studium:** 1994-2000 Studium der Humanmedizin LMU München

**Dissertation:** 1997-2001 Institut für Chirurgische Forschung München

**Praktisches Jahr:** 01.11.1999-06.02.2000 Chirurgische Klinik und Poliklinik der LMU München, Klinikum Großhadern  
07.02.2000-28.05.2000 University of California, San Diego School of Medicine; Department of Internal Medicine  
29.05.2000-17.09.2000 University of Utah Salt Lake City School of Medicine; Department of ENT  
05.12.2000 Abschluß des Studiums der Humanmedizin

**Arzt im Praktikum:** Beginn 01.02.2001 Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Klinik und Poliklinik für Chirurgie

## **8 Danksagung**

Zum Schluß möchte ich mich bei Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. Konrad Meßmer, Direktor des Institutes für Chirurgische Forschung, für die Betreuung während dieser Doktorarbeit bedanken.

Frau Dr. med. Inga Sinitsina danke ich für die allzeit vorhandene kompetente Beratung und ständige Hilfsbereitschaft bei der Durchführung der Versuche sowie bei der Auswertung der Ergebnisse.

Zusätzlich geht mein Dank an die Mitarbeiter des Institutes für Chirurgische Forschung, insbesondere Herrn Dr. med. Franz Meisner, für die Unterstützung bei der Ausarbeitung dieser Doktorarbeit.