

**Einfluss von Moderater Hämodilution mit  
Dextran-Konjugiertem Hämoglobin auf die  
Mikrozirkulation**

**[larsfilzen@hotmail.com](mailto:larsfilzen@hotmail.com)**

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung der  
Ludwig-Maximilians-Universität München  
Komm. Direktor: Prof. Dr. U. Pohl

Einfluss von Moderater Haemodilution mit  
Dextran-Konjugiertem Haemoglobin auf die  
Mikrozirkulation

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

Vorgelegt von  
Lars Filzen aus  
Lissabon/Portugal

2007

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

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Dr. h.c. mult. K. Meßmer,  
Em. Direktor

Mitberichterstatter: Prof. Dr. U. Kreimeier  
Priv. Doz. Dr. H. Adelsberger

Mitbetreuung durch den  
promovierten Mitarbeiter: Dr. med. J. Hutter

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 15.02.2007

## **1. Einleitung**

- 1.1. Bluttransfusion
  - 1.1.1. Problematik
  - 1.1.2. Alternativen
- 1.2. Hb-Dex-BTC (Dextran konjugiertes Hämoglobin)
- 1.3. Fragestellung

## **2. Material und Methodik**

- 2.1. Versuchstiere
- 2.2. Modell der Rückenhautkammer
  - 2.2.1. Gefäßversorgung und Angioarchitektur
  - 2.2.2. Implantation der Rückenhautkammer
  - 2.2.3. Implantation der Katheter
- 2.3. Apparative Ausstattung
  - 2.3.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie
    - 2.3.1.1. Mikroskopiertisch
    - 2.3.1.2. Auswerteeinheit
  - 2.3.2. Blutdruckmesssystem
  - 2.3.3. Blutgasanalyse
- 2.4. Analyse der intravitalmikroskopischen Parameter
  - 2.4.1. Gefäßdurchmesser
  - 2.4.2. Blutflußgeschwindigkeit
  - 2.4.3. Extravasation
  - 2.4.4. Funktionelle Kapillardichte (FKD)
  - 2.4.5. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion
- 2.5. Versuchsprotokoll
  - 2.5.1. Versuchsgruppen
  - 2.5.2. Moderate Hämodilution
- 2.6. Verwendete Lösungen für die Hämodilution
- 2.7. Statistische Auswertung

### **3. Ergebnisse**

- 3.1. Moderate Hämodilution
  - 3.1.1. Systemische Parameter
  - 3.1.2. Gefäßdurchmesser
  - 3.1.3. Blutflussgeschwindigkeit
  - 3.1.4. Extravasation
  - 3.1.5. Funktionelle Kapillardichte (FKD)
  - 3.1.6. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

### **4. Diskussion**

- 4.1. Enleitung
  - 4.1.1. Kompensationsmechanismen bei Hämodilution
  - 4.1.2. Hämodilution mit Hämoglobinlösungen
  - 4.1.3. Vasokonstriktorisches Effekt von Hämoglobinlösungen
- 4.2. Diskussion der Fragestellung
- 4.3. Diskussion von Material und Methodik
- 4.4. Diskussion der Ergebnisse
  - 4.4.1. Kontrollgruppe (Dextran 60)
  - 4.4.2.  $\alpha\alpha$ -Hb-Gruppe
  - 4.4.3. Hb-Dex-BTC-Gruppe

### **5. Zusammenfassung**

### **6. Literaturverzeichnis**

### **7. Lebenslauf**

### **8. Danksagung**

## **1. Einleitung**

### **1.1. Bluttransfusion**

#### **1.1.1. Problematik**

Bluttransfusionen sind für den Empfänger von homologem Blut stets mit signifikanten Risiken verbunden. Diese setzen sich aus den transfusionsassoziierten viralen und bakteriellen Infektionen, sowie aus nichtinfektiösen Ursachen zusammen.

Letztere sind meist die Folge einer falschen Zuordnung von zu administrierender Blutkonserve und Patient (132) (133). Dies führt zu den bekannten hämolytischen Reaktionen und zu akuten Lungenschäden, primär ausgelöst durch die ABO-Inkompatibilität. Andere Unverträglichkeitsreaktionen ergeben sich aus Immunisierungen gegen das Rhesus- und das KELL-Blutgruppensystem, sowie gegen HLA-Antigene (113) (140). In den letzten Jahren wurde zunehmend deutlicher, dass homologe Bluttransfusionen auch mit immunmodulatorischen Effekten einhergehen und die körpereigene Immunantwort negativ beeinflussen können. Auffällig sind in diesem Zusammenhang eine erhöhte Anfälligkeit für bakterielle Infektionen, ein immunsuppressiver Effekt bei Nierentransplantation (91) (109) (178), und eine deutlich erhöhte Rezidivrate von kolorektalen Tumoren nach Fremdbluttransfusionen (3) (19) (46) (82) (103) (119).

---



---

Risiken homologer Bluttransfusion

---

Risikofaktor	Deutschland	USA
Infektion viral		
Hepatitis A	-	1:1.000.000
Hepatitis B	1:232.000	1:63.000 - 1:250.000
Hepatitis C	1:113.000	1:103.000 - 1:1.935.000
HTLV	-	1:641.000
HIV	1:1.889.000	1:677.000 - 1:2.300.000
T-Zell Leukämie Virus I/II	-	1:2.993.000
Infektion bakteriell	-	1:500.000
Akute hämolytische Reaktion		1:600.000 - 1:800.000
Verzögerte hämolytische R.	} 1:25.000	1:1.000
Akuter Lungenschaden	-	1:5.000

---

*Tab.01: Infektiöse und Nichtinfektiöse Risiken homologer Bluttransfusionen in Deutschland und den USA (14) (20) (40) (60) (61) (62) (133) (184) (198) (200).*

Durch den heute hohen Sicherheitsstandard bei Spenderzulassung und -screening ist das virale Infektionsrisiko inzwischen relativ gering. Bakterielle Infektionen sind eher eine Ausnahme und von ihrer Häufigkeit her mit der akuten hämolytischen Reaktion gleichzusetzen (siehe Tab.01). Das Risiko einer Infektion mit einem bisher unbekanntem Virus bleibt trotz aller Vorsichtsmaßnahmen bestehen. Als Beispiele können in diesem Zusammenhang die vor zwanzig Jahren plötzlich eintretende HIV-Infektion oder die mögliche Übertragung einer neuartigen Creutzfeld-Jakob Variante genannt werden (53) (93) (135) (140) (187) (229).

Die mit einer homologen Bluttransfusion verbundenen Risiken müssen daher weiter minimiert werden. Vielversprechende Verfahren, wie die

photochemische Inaktivierung von Viren und Bakterien durch den Gebrauch von ultraviolettem Licht in Verbindung mit Pyrimidinen (127), oder die Leukoreduktion (170) werden jedoch die Kosten pro Blutkonserve erhöhen. Ökonomische Aspekte sollten aber in jede Überlegung mit einbezogen werden (62) (63). Hinzu kommen die abnehmenden Spenderzahlen, denen ein aufgrund der demographischen Entwicklung zunehmender Bedarf an Fremdblut gegenübersteht. Die Wahrscheinlichkeit einer Indikation zur Bluttransfusion ist bei einem 65 jährigen Patienten im Vergleich zu einem 40 jährigen Patienten 20-fach erhöht (228) (230).

Aus den oben erörterten Gründen gewinnen Alternativen zur Bluttransfusion immer mehr an Bedeutung und sind seit geraumer Zeit Gegenstand der Diskussion.

### **1.1.2. Alternativen**

Zu den Alternativen der Bluttransfusion zählen vor allem präoperative Maßnahmen, wie die Hämodilution, sowie intraoperative Maßnahmen, wie die maschinelle Autotransfusion.

Anwendung finden auch Strategien zur Reduktion des intraoperativen Blutverlustes, wie blutarme Operationstechniken, anästhesiologische und medikamentöse Maßnahmen. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang etablierte Verfahren, wie die kontrollierte Hypotension und die Gabe von Antifibrinolytika, oder die Regionalanästhesie, die wegen der geringeren Blutverluste der Allgemeinanästhesie, wenn möglich, vorzuziehen ist (73). Daneben sind im wesentlichen drei Verfahren im Einsatz, die geeignet erscheinen, den Fremdblutbedarf zu reduzieren: 1) Eigenbluttransfusion,



---

2) maschinelle Autotransfusion (MAT), 3) akute normovolämische Hämodilution (ANH).

1) Nicht völlig unproblematisch zeigt sich die präoperative Eigenblutspende deren Ziel es ist, durch das in den Wochen vor der Operation entnommene Vollblut einen großen Anteil intraoperativ transfundierten Fremdblutes zu ersetzen. Dieses Verfahren ist geeignet für Patienten mit präoperativen Hämatokritwerten höher als 40% und einer Transfusionswahrscheinlichkeit von mindestens 50% (213) (214). Nebenwirkungen bei autologer Blutentnahmen sind selten und selbst bei Patienten mit schweren Begleiterkrankungen kann die Eigenblutentnahme als sicheres Verfahren gelten (64) (125). Bei kardialen Risikopatienten wird die Eigenblutspende jedoch noch kontrovers diskutiert (73). Zudem sind die transfusionsassoziierten Risiken, wie die hämolytischen Reaktionen durch Verwechslung (32) (63) (161) (227), oder die Infektionen infolge viraler und bakterieller Kontamination der Eigenblutkonserven nicht ausgeschlossen (14) (131).

2) Durch die maschinelle Autotransfusion (MAT) besteht die Möglichkeit der Reinigung und Retransfusion des intraoperativ verlorenen Blutes (35) (37) (234). Das dadurch gereinigte Erythrozytenkonzentrat ist jedoch frei von Thrombozyten und Gerinnungsfaktoren. Das mit diesem Verfahren assoziierte Letalitätsrisiko infolge von Luftembolien ist mit einer Häufigkeit von 1:32.000 beschrieben (132). Als absolute Kontraindikation gilt die mögliche Aspiration embolisierender Substanzen, ein bakteriell kontaminiertes Operationsfeld wird als relative Kontraindikation angesehen. Bei tumorchirurgischen Eingriffen muss das gewonnene

Erythrozytenkonzentrat bestrahlt werden, kann dann aber reinfundiert werden (169) (234). Durch die MAT können signifikante Mengen an Eigenblut wiedergewonnen werden, eine direkte Kausalität zur Fremdbluteinsparung konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (59).

3) Die präoperative Hämodilution wird vor allem als akute normovolämische Hämodilution (ANH) durchgeführt, bei der dem Patienten autologes Vollblut entnommen und durch die entsprechende Menge einer kolloidalen Lösung ersetzt wird (156). Risiken durch die falsche Zuordnung von Konserve zu Empfänger bestehen aufgrund der patientennahen Aufbewahrung der Konserven nicht. Die ANH wäre in der Lage die perioperative Eigenblutspende zu ersetzen (171) und hat sich als ein kostengünstiges Verfahren erwiesen (162) (163) (164). Ziel der ANH ist es, durch eine möglichst starke Blutverdünnung eine möglichst große Menge an Eigenblut für die spätere Retransfusion zu gewinnen. Im Gegensatz zur moderaten Hämodilution, bis zu einem Hämatokrit von 30%, sollte die extreme Hämodilution bis zu einem Hämatokrit von 20% und weniger nur bei herzgesunden Patienten durchgeführt werden (169). Sinkt der Hämatokrit aufgrund eines intraoperativen Blutverlustes unter diesen Wert, wird obwohl Hämatokritwerte von 16% (120) (121) oder sogar 9% (76) toleriert werden können, mit der Retransfusion des durch ANH gewonnen Blutes begonnen. Nach Erschöpfung der autologen Blutkonserven müssen jedoch homologe Erythrozytenkonzentrate transfundiert werden. Dies hat zur Folge, dass sowohl die Risiken einer ANH, sowie die mit einer homologen Bluttransfusion assoziierten Risiken und Spätfolgen getragen werden müssen. Daher ist es von großer Bedeutung, gerade die extreme ANH in

Bezug auf die Effizienz und die Sicherheit dieses Verfahrens zu verbessern.

Eine Beatmung mit 100% Sauerstoff kann den kritischen Hämatokritwert erniedrigen und somit den Zeitpunkt der Transfusion hinauszögern (74) (77) (110) (139) (208). Eine andere Möglichkeit liegt in der Gabe hochvisköser Plasmaexpander, die durch die Erhöhung der Scherrate die Ausschüttung von Vasodilatoren anregen, und somit die funktionelle Kapillardichte und die Mikrozirkulation aufrecht erhalten, aber an der Sauerstoffversorgung nichts ändern (219) (222) (224).

Künstliche Sauerstoffträger könnten zusätzlich zur Volumensubstitution aufgrund ihrer Sauerstofftransportierenden Eigenschaften eine ausreichende Gewebeoxygenierung sicherstellen und somit eine erweiterte ANH weit unter den kritischen Hämatokritwert von 6,5 - 13% zulassen (76).

In diesem Zusammenhang sind die Hämoglobinlösungen wie Hb-Dex-BTC (Pasteur-Mérieux sérums & vaccins, Marcy l'Etoile, France), neben den Perfluorokarbonen, von großem allgemeinen Interesse und könnten in Zukunft die Resultate der extremen ANH grundlegend verbessern.

Hämoglobin basierte Sauerstoffträger (HbOC's) lassen sich in vier Gruppen aufteilen: 1) intramolekular quervernetztes Hämoglobin, 2) polymerisiertes Hämoglobin, 3) konjugiertes Hämoglobin und 4) in Liposomen verkapseltes Hämoglobin. Sie nutzen die Transportkapazität des Hb für Sauerstoff, besitzen aber nicht die die Erythrozyten umgebende Membran, die für die in 1.1.1 beschriebenen Unverträglichkeitsreaktionen verantwortlich ist. Die Erythrozytenmembran bestimmt auch die Überlebenszeit der Zelle und somit die Länge der Haltbarkeit einer

---

Blutkonserve, das Hämoglobinprotein bleibt jedoch intakt und behält außerhalb der Zelle nach entsprechender Modifikation seine Funktionalität (66).

Die HbOC's verbindet der Grundgedanke, das Hämoglobinmolekül zu stabilisieren und die toxischen Eigenschaften des freien Hb, die durch renale oder gastrointestinale Dysfunktion und systemische Vasokonstriktion charakterisiert sind, zu eliminieren. Das durch Dissoziation entstandene Dimer, sowie die ursprüngliche tetramerische Form des freien Hb extravasieren aus der Zirkulation und führen zu vasokonstriktorisches Effekten durch das Scavenging des endothelial synthetisierten Vasodilatators Stickoxid (NO), durch Freisetzung des Vasokonstriktors Endothelin und Stimulation des adrenergen Systems (69) (70) (71) (76) (183) (218) (222). Hinzu kommt das reduzierte molekulare Gewicht der Dimere und die damit verbundene Abnahme der Retentionszeit. Aufgrund seiner geringen Größe wird das Molekül in der Niere filtriert und kann durch Bildung von Präzipitaten in dem sauren ascendierenden Schenkel der Henleschen Schleife zu Nierenschäden führen (39). Erythrozytäre Membranbestandteile können als Folge inadäquater Aufbereitung zur Schädigung der Niere beitragen und wirken durch Aktivierung der Komplementkaskade systemisch toxisch (190). Ein weiterer störender Effekt ist die Entstehung des Methämoglobins (MetHb) durch spontane Oxidation des Hb Moleküls (5) (42) (79) (105) (168) (226).

Chemische Veränderung des Hb Moleküls oder dessen Konjugation mit einem Makromolekül zielen darauf ab, diese unerwünschten Effekte zu vermeiden (78). Die intramolekulare Stabilisierung des Hb Moleküls („Crosslinking“)

verhindert dessen Dissoziation und führt somit zu einer höheren Retentionszeit. Die chemische Modifikation äußert sich auch in einer geringeren O<sub>2</sub> Affinität (höherer P<sub>50</sub>) und dadurch erleichterten Sauerstoffabgabe an das Gewebe, sowie in einer verminderten Reaktionsbereitschaft des Hb Moleküls mit freien Sauerstoffradikalen und der damit verbundenen peroxidinduzierten Endothelzellnekrose (34) (102). Durch weitere Modifikation des Proteinanteils kann zusätzlich die selektive Inhibition der NO-Bindung erreicht und das unerwünschte NO Scavenging minimiert werden (1) (145).

Chemisch modifiziertes Hb ist aber auch zytotoxischer als nicht modifiziertes Hb und kann durch oxidativen Stress an Endothelzellen von der Störung der vaskulären Kontrolle der Koagulation bis zum Zelltod führen (2) (18) (165) (192) (207).

## **1.2. Hb-Dex-BTC (Dextran konjugiertes Hämoglobin)**

Hb-Dex-BTC (Pasteur-Mérieux sérums & vaccins, Frankreich) ist ein an Dextran-Benzen-Tetracarboxylat konjugiertes Hämoglobintetramer. Es ist ein hoch visköser Vertreter der auf Hämoglobin (Hb) basierenden Sauerstoffträger (HbOC's) und wurde als eine Hb-Lösung entwickelt, die aufgrund ihrer hohen Viskosität mit einer verminderten Vasokonstriktion einhergehen soll.

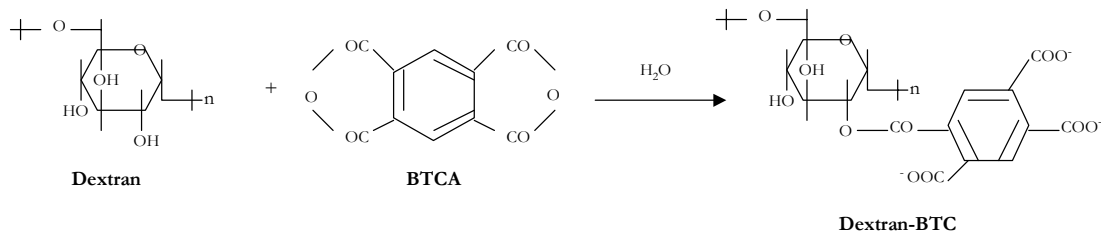
Das Dex-BTC konjugierte Hb Molekül wurde chemischen Veränderungen unterzogen um die O<sub>2</sub>-Affinität zu erhöhen und die Retentionszeit zu steigern. Die Konjugation von Hb mit einem Makromolekül soll zusätzlich

die Extravasation und die damit verbundene vasoaktive Reaktion verhindern.

Das Stromafreie Hb wurde durch Hämolyse aus Humanerythrozyten extrahiert, die zu dem Zeitpunkt über dem Verfallsdatum lagen. Nach Zentrifugation und Mikrofiltration wurde das gewonnene Hb chromatographisch auf Reinheit überprüft und anschließend pasteurisiert. Im ersten Schritt der Konjugation wurde Dextran unter Abspaltung von H<sub>2</sub>O an den Benzolring von BTC kovalent gebunden. In einem zweiten Schritt wurde das HbA Molekül an Dex-BTC gebunden und in einer NaCl-Saccharose Suspension (50 g/L) bei -20°C bis zur eigentlichen Anwendung eingefroren (188) (216). Die Eigenschaften der Lösung sind unter 2.2.6 aufgeführt.

Synthetisierung von Hb-Dex-BTC

**Erster Schritt :**



**Zweiter Schritt :**

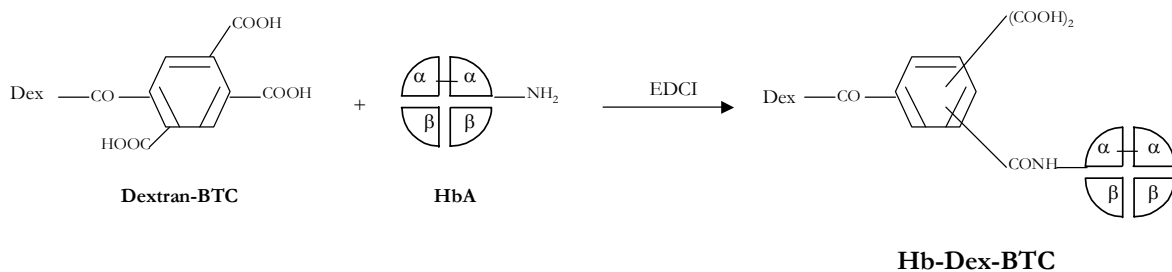


Abb. 01: Schematische Darstellung der Hb-Dex-BTC Synthetisierung (modifiziert nach Caron et al, 2001)

Durch den hohen onkotischen Druck von Hb-Dex-BTC kann eine hohe Volumenexpansion erreicht werden. Zudem ist die Sauerstoffabgabe aus dem Hb-Dex-BTC Molekül höher und somit die Gewebeoxygenierung im Vergleich zu anderen Hämoglobinlösungen erhöht (24) (145). Die Plasmahalbwertszeit beträgt zehn Stunden, die Extravasation ist gering und die Substanz zeigt keine toxischen Effekte (24) (145). Aufgrund der höheren Sauerstoffabgabe und der geringen Extravasation konnte am Darmmodell des Meerschweins das Jejunum sogar bei einem Hämatokrit von Null mit Hb-Dex-BTC vital erhalten

werden. Peristaltik und intestinale Mucosa als sensible Zeichen einer Minderversorgung blieben hierbei unverändert (50).

Im Gegensatz zu anderen Hämoglobinlösungen und Volumenexpandern zeigt Hb-Dex-BTC in vitro einen hyperaggregierenden Effekt und eine erhöhte Blutviskosität (143)(147). Die verstärkte Aggregation der Erythrozyten wird durch die Modifikation des Hämoglobinmoleküls in Hb-Dex-BTC induziert, wobei das hohe Molekulargewicht des Makromoleküls die entscheidende Rolle spielt (31)(72). In vivo ist die Aggregation der Erythrozyten sowie die Viskosität des Gesamtblutes etwas geringer als in vitro. Diese unterschiedlichen rheologischen Effekte lassen auf noch ungeklärte Kompensationsmechanismen schließen (143).

In der Mikrozirkulation kann diese Hyperaggregation mit einem gestörten Blutfluss (10)(12), einem prothrombotischen Effekt (116) und der erhöhten Adhäsion inflammatorischer Zellen einhergehen (67)(182). Während die Hyperaggregation unter physiologischen Bedingungen von Nachteil ist könnte dieser Effekt bei der extremen Hämodilution von Vorteil sein (143).

Bei hohen Scherraten bleibt bei Hb-Dex-BTC die Viskosität des Blutes unverändert, bei geringeren Scherraten, wie sie in der Mikrozirkulation zu finden sind, ist die Viskosität des Blutes deutlich erhöht (24)(146). Die als Folge der Viskosität erhöhte Scherkraft führt zur Freisetzung von endothelium-derived-relaxing-factor (EDRF) oder Stickoxid (NO) von Endothelzellen und geht mit einer Relaxation der glatten Muskelzellen einher (17)(38)(115). Die dadurch erreichte Vasodilatation führt zu einer verbesserten Blutzirkulation (146).



Die vasokonstriktiven Effekte des Hb-Dex-BTC scheinen aber einen größeren Einfluss zu haben als die hohe Viskosität der Lösung (24). Die Vasokonstriktion wird sowohl durch die Dosis der applizierten Substanz wie auch durch die Extravasation von zellfreiem Hb in das Endothel beeinflusst. Hb-Dex-BTC ist ein hochmolekulares HbOC und wird durch Endozytose oder transendotheliale Transportvesikel in die Endothelzellen aufgenommen, wo es die Verfügbarkeit der endothelialen Faktoren NO und Endothelin-1 beeinflusst und die Vasokonstriktion induziert (27).

Das zellfreie Hb bewirkt keine Aktivierung der neutrophilen Granulozyten, stimuliert aber Zellen des mononukleären Systems. Durch die Ausschüttung von IL-6, IL-8 und TNF- $\alpha$  kommt es zu einer Steigerung ihrer prokoagulativen Aktivität (216).

Hb-Dex-BTC ist autooxidativen Prozessen unterworfen. Diese haben die Entstehung freier Radikale und des metHb zur Folge. Die nicht-enzymatischen Systeme zur Reduktion von metHb können durch die gleichzeitige Gabe von Ascorbinsäure, die enzymatischen Systeme durch die Gabe von Riboflavin erfolgreich unterstützt werden (49).

### **1.3. Fragestellung**

Bei der vorliegenden tierexperimentellen Untersuchung wurde die Frage nach den Mechanismen vasokonstriktorischer Effekte von Hämoglobinlösungen aufgegriffen und mit besonderem Augenmerk auf die vasoaktiven Eigenschaften der Hämoglobinlösungen die mögliche Beseitigung limitierender Faktoren untersucht. Im Rahmen einer Hämodilution wurden folgende Fragen gestellt:

Können durch die höhere Viskosität bzw. das größere Molekulargewicht von Hb-Dex-BTC die üblicherweise beobachteten negativen Effekte bisheriger Hämoglobinlösungen auf die Mikrozirkulation nach moderater Hämodilution vermindert oder beseitigt werden?

## **2. Material und Methodik**

Die Versuche wurden in der Zeit von Januar bis August 2001 im Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München durchgeführt.

### **2.1. Versuchstiere**

Für die intravitalmikroskopische Untersuchung im quergestreiften Rückenhautmuskel wurden 6 bis 8 Wochen alte Hamster mit einem Körpergewicht von 60 bis 80 Gramm (Firma Charles-River-Wiga GmbH, Sulzfeld, Deutschland) verwendet. Die Tiere wurden bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus mit einem handelsüblichen Futter für Nagetiere (Ssniff H®-Standarddiät für Hamster, Vitamin E -Gehalt 60mg/kg Futter, Vitamin A -Gehalt 20.000 IE, Ssniff Versuchstier-Diäten GmbH, Soest, Deutschland) und frei zugänglichem Leitungswasser gehalten. Im Tierstall herrschten konstant eine Raumtemperatur von 22°C und eine relative Luftfeuchtigkeit von 40%. Als Einstreu wurden Sägespäne verwendet. Nach Implantation der Rückenhautkammer wurden die Versuchstiere in Einzelkäfigen umgesetzt. Die Versuche wurden nach Genehmigung durch die Regierung von Oberbayern gemäß den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (BGB1. Jg. 1998, Teil I, Nr. 30, S. 1105ff) und dem „Guide for the care and use of laboratory animals“ (National Research Council, National Academy Press, Washington, D.C., 1996) durchgeführt.

## 2.2. Das Modell der Rückenhautkammer

Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Mikrozirkulation des quergestreiften Rückenhautmuskel wurde das Rückenhautkammer Modell am wachen syrischen Goldhamster verwendet (47). Dieses Modell erlaubt neben der Bestimmung von makrohämodynamischen Parametern und Blutgaswerten insbesondere die Analyse der mikrohämodynamischen Parameter, wie den Gefäßdurchmesser von Arterien und Venolen, der Blutflussgeschwindigkeit in Venolen, der endothelialen Permeabilität, der funktionellen Kapillardichte, sowie der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Im Gegensatz zu anderen experimentellen Modellen lassen sich die intravitalmikroskopischen Untersuchungen ohne Verwendung von Narkose und in Abwesenheit eines akut zugefügten chirurgischen Traumas durchführen.

Aus Stabilitäts- und Gewichtsgründen wurde als Werkstoff für die Rückenhautkammern das biologisch inerte Titan ( $\rho_{\text{Titan}}=4,54\text{g/cm}^3$  bei  $20^\circ\text{C}$ ) gewählt. Die Kammern bestehen aus zwei je 3 g schweren und 0,64 mm dicken symmetrischen Hälften, in deren Zentrum eine im Durchmesser 11.8 mm messende kreisrunde Öffnung eingelassen ist. Der Rahmen dieser Öffnung ist so angelegt, dass ein Deckglas der selben Größe eingelegt und durch einen Sprengring fixiert werden kann. Sowohl die oberen als auch die unteren Kammerränder sind mit Bohrungen verschiedener Größen versehen, die der Fixierung der Rückenhaut durch Schrauben und Fäden an die Kammer dienen. An eine der Kammerhälften wird in die dafür vorgesehene Öffnung ein 0,1 cm dickes kreisrundes Deckglas mittels eines Sprengringes fixiert. An die andere Kammerhälfte werden vor der Implantation drei

Schrauben mit den dazugehörigen Distanzmuttern und Beilagscheiben befestigt. Dadurch wird beim späteren Verschrauben der beiden Hälften ein Abstand von ca. 0,45 mm zwischen beiden Kammerhälften gewährleistet. Dies entspricht der Dicke der Hautpräparation und vermeidet somit die Gewebekompression. Über das in die Titankammer eingelassene Sichtfenster kann mittels Durchlicht- bzw. Fluoreszenzauflichtmikroskopie die Mikrozirkulation des quergestreiften Rückenhautmuskels über einen Zeitraum von bis zu 4 Wochen beobachtet werden (172). Die sichtbaren Gefäßabschnitte setzen sich aus größeren Arteriolen, präkapillären Arteriolen, dem nutritiven Kapillarnetz, postkapillären Venolen sowie Sammelvenolen zusammen.

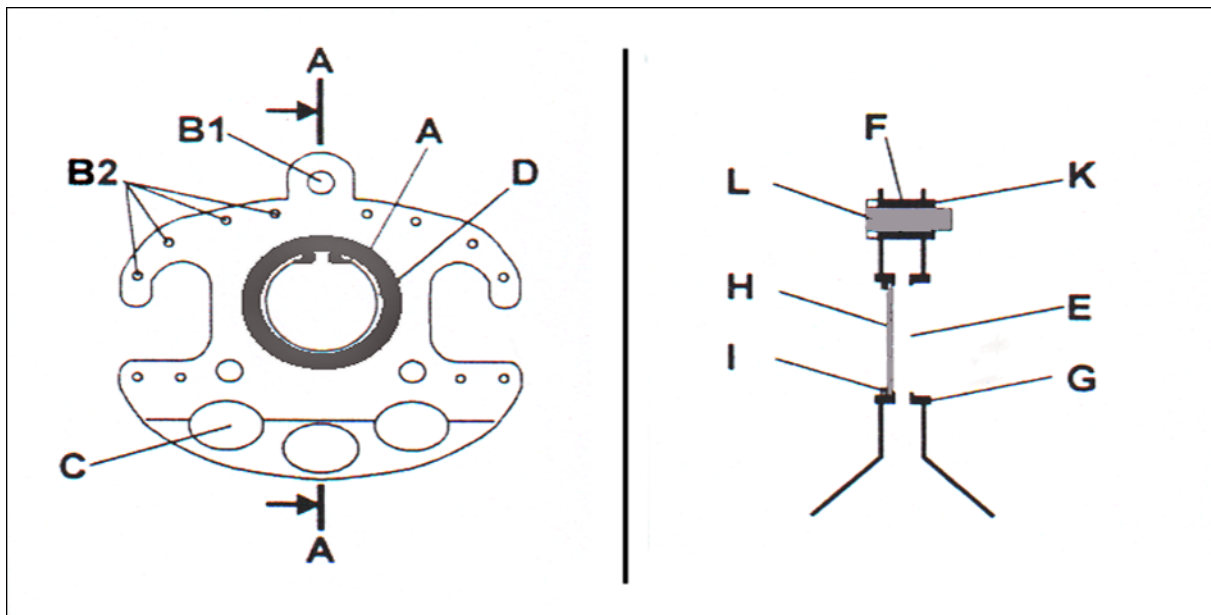


Abb. 02 : Konstruktionsskizze einer Rückenhautkammer. Links: Seitenansicht der Rückenhautkammer bestehend aus zwei spiegelbildlich durch Schrauben miteinander verbundenen Kammerhälften. A = Öffnung zur intravitalmikroskopischen Untersuchung; B1 = Bohrung für Schrauben zur Fixierung der Distanzmuttern 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 (A-A) mit E = optischem Ausschnitt, F = Abstandshalter, G = Kammering, H = Deckglas, I = Sprengring, K = Mutter, und L = Schraube (modifiziert nach Nolte et al, 1995) (172).

### **2.2.1. Gefäßversorgung und Angioarchitektur**

Die beiden Hauptgefäßstämme am Rande des Präparationsareals der Rückenhautkammer werden von den Rami cutanei der dorsalen Interkostalararterien gebildet, die in Verlängerung der Skapularlinie in die subkutan gelegenen Hautschichten eintreten. Der kraniale Ramus entspringt auf der Ebene der Schulterbasis, der andere etwa 3 cm kaudalwärts. Aus den Rami cutanei zweigen sich die Transversal- und Arkadenarteriolen ab, aus denen die terminalen Arteriolen entspringen. Diese teilen sich wiederum in 2-10 präkapilläre Gefäße, die ihrerseits 4-15 Kapillaren versorgen. Die Kapillaren gehen in postkapilläre Venolen über, die zum Teil ebenso wie die Kapillaren untereinander anastomosieren können. Diese münden dann in das reich verzweigte Netzwerk von Sammelvenolen.

### 2.2.2. Implantation der Rückenhautkammer

Die Titankammern, sowie die dazugehörigen Schrauben, Sprengringe, Distanzmuttern und Deckgläser wurden ebenso wie die für die Präparation benötigten Instrumente vor jedem Versuch gereinigt und 30 Minuten lang bei einer Temperatur von 134°C dampfsterilisiert.

Vor der Implantation der Rückenhautkammer wurde den Tieren eine Kombinationsanästhesie verabreicht. Es wurden 0,07 ml einer Kochsalzlösung, die 125 mg/kg/KG Ketaminhydrochlorid (Ketavet®, Parke Davis, Freiburg, Deutschland) und 15 mg/kg/KG Dihydroxyldinothiazinhydrochlorid (Rompun®, Bayer, Leverkusen, Deutschland) enthält, intraperitoneal injiziert. Anschließend wurde die Rückenhaut mit einem elektrischen Rasierer (Typ GT104/GH204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und mit keratolytischer Enthaarungscreme (Plica®med, Willy Rüscher Hospital Vertriebs GmbH, Deutschland) enthaart. Nach Entfernung der Haare und einer zweiminütigen Hautdesinfektion (Kodan® Tinktur-Forte Spray, Fa. Schülke & Mayr GmbH, Nordstedt, Deutschland) erfolgte die Kammerimplantation auf einem 37°C warmen Kleintier-Operationstisch (Fa. IFB, Hiddenhausen, Deutschland). Unter visueller Kontrolle mit Hilfe eines Gegenlichtes wurde die Rückenhaut des Goldhamsters angehoben und als Falte extendiert, so dass die Gefäße die auf der vorderen und hinteren Seite der Falte sichtbar wurden sich weitgehend überlagerten. Nach Fixierung der Rückenhautfalte mit zwei Fäden (Ethibond®, grün, geflochten, 5-0, Fa. Ethikon, Nordstedt, Deutschland) im kranialen und kaudalen Bereich wurde ein Titanrahmen auf

der dem Präparationsareal abgewandten hinteren Seite mittels zweier Nähte so befestigt, dass das Beobachtungsfenster zwischen den beiden Rami cutanei der dorsalen Interkostalarterien zu liegen kam. Die beiden unteren Schrauben dieses Rahmens wurden mittels Hautinzisionen auf die dem Präparationsareal zugewandten vorderen Hautseite vorgeschoben und mit Hilfe von zwei Bulldogklemmen so befestigt, dass die Haut plan am hinteren Rahmen zu liegen kam. Dabei war zu beachten, dass sich die beiden Rami cutanei nicht im Operationsbereich befanden, um größere Blutungen bei der späteren Präparation zu vermeiden. Auf der Vorderseite der Hautfalte wurde, im Bereich in dem später das Beobachtungsfenster zu liegen kommen sollte, die Cutis in einem zirkulären Areal von ca. 15 mm Durchmesser mit einer Schere vorsichtig entfernt. Anschließend wurde der Hamster in Rechtsseitenlage gebracht und unter das Operationsmikroskop (Fa. Wild, Typ M650, Heeresbrugg, Schweiz) gelegt.

Bei 25-facher Vergrößerung wurden die Subcutis, der Hautmuskel, sowie das subkutane Fettgewebe der vorderen und der Musculus retraktor beider Hautseiten abpräpariert. Das subkutane Fettgewebe und das dem hinteren Hautmuskel aufliegende Bindegewebe wurde mit Hilfe eines hohen Pegels an Kochsalzlösung sichtbar gemacht und ebenfalls vorsichtig abpräpariert. Während der gesamten Präparation wurden die entsprechenden Gewebeschichten zum Schutz vor Austrocknung mit physiologischer Kochsalzlösung gespült. Anschließend wurde der zweite Titanrahmen auf die frei präparierte Hautseite aufgesetzt und mit zwei Muttern an den Schrauben des gegenüberliegenden Rahmens befestigt. Die beiden Kammerhälften wurden druckfrei miteinander verschraubt, um die



Kompression des dazwischen liegenden Gewebes zu vermeiden. Die Kammer wurde dann an den dafür vorgesehenen Bohrungen mit zwei Fäden (Ethibond®, grün, geflochten, 5-0, Fa. Ethikon, Nordstedt, Deutschland) an der Haut zusätzlich fixiert.

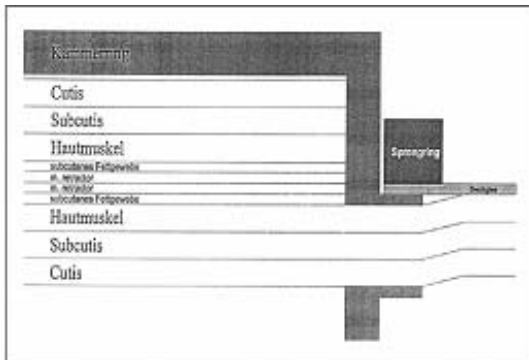


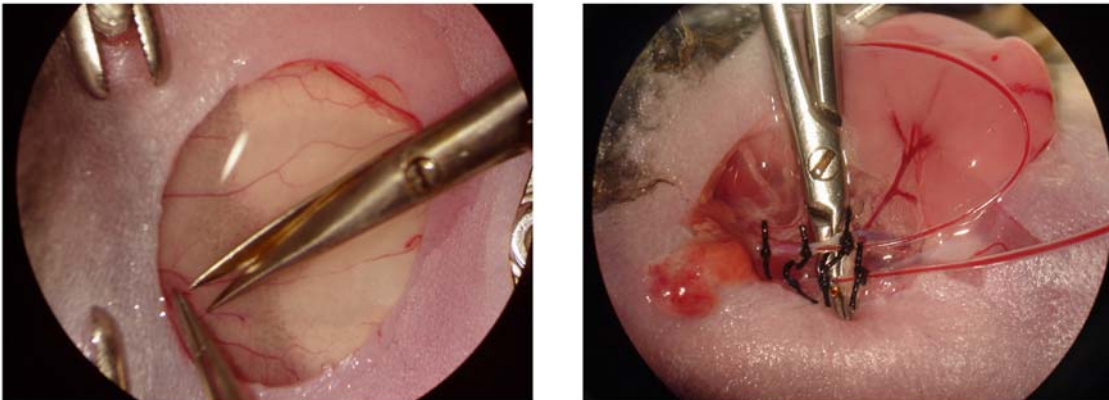
Abb 03 : Links: Hautschichten beim Goldhamster im Bereich des Kammerrings und Fixierung des Deckglases mit Hilfe des Sprenglings (nach Nolte et al.). Rechts: Goldhamster nach Implantation der Rückenhautkammer.

### 2.2.3. Implantation der Katheter

Die Implantation der Katheter wurde frühestens zwei Tage nach der Implantation der Titankammer unter sterilen Bedingungen und gleicher Anästhesie durchgeführt. Hierfür wurde die Halsregion enthaart (Plica®med, Willy Rüscher Hospital Vertriebs GmbH, Deutschland) und das Tier zwischen zwei ca. 20 x 10 x 5 cm großen Kunststoffblöcken so in Rückenlage gebracht, dass die Rückenhautkammer senkrecht zwischen den Blöcken zu liegen kam. Nach einer zweiminütigen Hautdesinfektion (Kodan® Tinktur-Forte Spray, Fa. Schülke & Mayr GmbH, Nordstedt, Deutschland) wurde die Haut paramedian mit einem ca. 1 cm langen Schnitt vom rechten

Unterkiefer bis zur rechten Clavikula eröffnet. In Linksseitenlage wurde eine Infusionskanüle (Abbokath®, 18Gx51mm, Fa. Abbott, Ingelheim, Deutschland), von der Hautinzision ausgehend, subkutan in Richtung des kranialen Randes der Kammer geführt. Nach Entfernung des Stahlmandrins wurden die beiden ca. 20 cm langen Polyäthylenkatheter (PE-10, Innendurchmesser 0,28mm, Außendurchmesser 0,56mm, Portex Ltd., Lythe, Kent, England) durch die Infusionskanüle vorgeschoben. Zum späteren Spülen der Katheter wurden diese mittels einer Kanüle (Mikrolane 0,4 x 18 mm) an eine 1,0 ml Insulinspritze angeschlossen. Nach Entfernung der Infusionskanüle wurde der Goldhamster in die ursprüngliche Lage gebracht. Anschließend wurden die Vena jugularis und die im Trigonum caroticum lokalisierte Arteria carotis communis von dem sie umgebenden Bindegewebe freipräpariert und dargestellt. Um die Arteria carotis communis wurden kaudal zwei und kranial eine Ligatur (Pearsalls Sutures, Seide, geflochten, 5-0, Somerset, England) zur Schlinge vorgelegt. Nach dem Zuziehen der kranialen Schlinge wurde vor den kaudalen Ligaturen eine Yarsagil-Klemme (Yarsagil®, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) angelegt. Die Arterie wurde dann mit einer spitzen Pinzette gefasst und mit einer Gefäßschere eröffnet. Nach Durchspülen des Katheters mit einer Heparin-Kochsalzlösung (Mischverhältnis 1:1000, Heparin-Natrium, 5.000 IE/ml, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) wurde dieser in dem Gefäß platziert und bis zur Yarsagil-Klemme vorgeschoben, sodass die den Katheter sichernden Ligaturen zugezogen werden konnten. Die Yarsagil-Klemme wurde anschließend entfernt und der Katheter um weitere ca. 15 mm

vorgeschoben. Wenn die Durchgängigkeit des Katheters und somit seine intravasale Lage gesichert war, wurden die Ligaturen entgültig chirurgisch verknotet und der Katheter an seinen freien Enden ebenfalls durch Knoten verschlossen. Der venöse Katheter wurde analog implantiert. Die Hautwunde wurde mit 4-5 Einzelkopfnähten (Ethibond®, geflochten, 5-0, Fa. Ethikon, Nordstedt, Deutschland) verschlossen. Die am kranialen Rand der Kammer transkutan austretenden Katheter wurden zuletzt mittels mehrerer Nähte an der Kammer fixiert und mit Leukosilk-Streifen (Fa. Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) an der Rückenhautkammer befestigt.



*Abb 04 : Links: Präparation der Rückenhaut bei Implantation der Rückenhautkammer. Rechts: Präparationsareal an der Halsregion mit bereits implantierten Kathetern.*

## 2.3. Apparative Ausstattung

### 2.3.1. Intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Das Mikroskop Axiotech (Zeiss, Oberkochen, Deutschland) ist mit einem Projektionsokular von 1,25-fachem Vergrößerungsfaktor ausgestattet. Für den Gesamtüberblick des Präparationsareals wurde ein 2,5 x / 0,075 W plan-Neofluran Objektiv verwendet. Die intravitale Aufnahme, die der späteren Analyse der mikrozirkulatorischen Parameter dienen, erfolgte mit einem 20 x / 0,5 W Achroplan Wasserimmersionsobjektiv. Am Bildschirm wurde eine 510-fache Gesamtvergrößerung erreicht. Mittels einer CCD-Kamera (charge coupled device) (FK 6990 IQ-S, Lichtempfindlichkeit 0,02 Lux, 699x581 Bildpunkte, Pieper, Schwerte, Deutschland) wurden die intravitalemikroskopischen Bilder aufgezeichnet. Für die spätere Auswertung wurden die Videobilder auf einem S-VHS Videorecorder (SVO-9500 MDP, Sony GmbH, Köln, Deutschland) aufgenommen und auf Videokassetten (H471S, SE-180 min., Fujifilm GmbH, Düsseldorf, Deutschland) gespeichert. Während der Versuche konnte das aktuelle Bild auf einem Bildschirm (PVM-2043 MD, Sony GmbH, Köln, Deutschland) verfolgt werden.

Als Lichtquelle für die Aufnahmen mit dem Fluoreszenzfarbstoff Rhodamin 6G (M 472 D, 0,2%, Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) diente eine Quecksilberdampf-Kurzbogenlampe (HBO 100 W, Zeiss). Um lediglich die Emission von Rhodamin 6G (roter Bereich, Maximum bei  $\lambda=555$  nm), ohne die für die Exzitation notwendigen störenden Strahlen (grüner Bereich, Maximum bei  $\lambda=525$  nm), aufzunehmen, wurde ein entsprechender Filterblock (Bandpass 530-560 nm, Teilerspiegel RKP 580, Langpass 580 nm) verwendet.

Bei den Beobachtungen mit FITC-Dextran (M 150.000 D, 5%, Fa. Sigma Chemicals Comp., Deisenhofen, Deutschland), mit einem Exzitationsspektrum im blauen Bereich (Maximum bei  $\lambda=490$  nm), kam der für ein Emissionsspektrum im grünen Bereich (Maximum bei  $\lambda=520$  nm) sinnvolle Filterblock (Bandpass 450-490 nm, Teilerspiegel RKP 510, Langpass 515 nm) zum Einsatz. Als Lichtquelle fand eine Xenonlampe (100 W, 12V, Zeiss) Anwendung.

### 2.3.1.1. Mikroskopiertisch

Die wachen Versuchstiere wurden in einer Plexiglasröhre mit einem für die Rückenhautkammer vorgesehenen Schlitz platziert und diese wiederum auf dem Mikroskopiertisch fixiert. Dadurch wurde einem Verrücken der Kammer vorgebeugt. Der Mikroskopiertisch war über zwei Schrittmotoren, die über einen Joystick (QJI Turbo, SV-121, China) angesteuert wurden, in zweidimensionaler Richtung (X-Y-Achse) beweglich. Die Software Optimas 5.2 (Optimas Corp., Boston, USA) ermöglichte die digitale Bildverarbeitung und die Speicherung ausgewählter Einstellungen. So konnten computergesteuert alle eingangs definierten Beobachtungsfelder zu unterschiedlich vorgegebenen Zeitpunkten wiederholt aufgerufen und erneut analysiert werden.

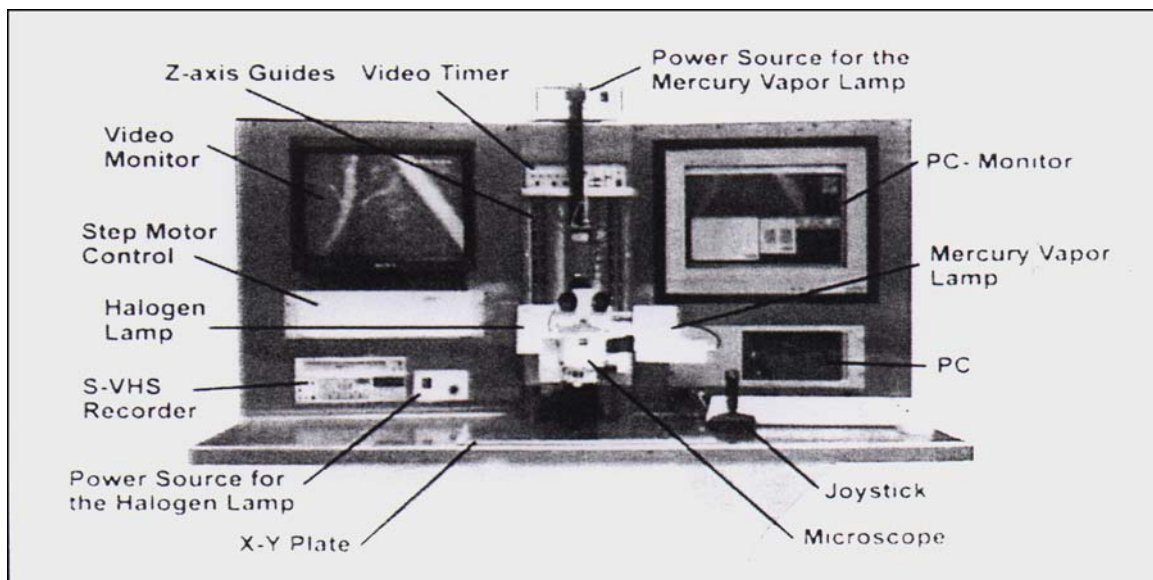


Abb 05: Intravitalmikroskopische Aufnahmeeinheit bestehend aus Intravitalmikroskop, Kamera, Videogerät, Video- und Computer-Monitor, Joystick, Mikroskopiertisch mit computergesteuertem Schrittmotor (entnommen aus Harris et al., 1997) (81).

### **2.3.1.2. Auswerteeinheit**

Die während der Versuche aufgenommenen Videosequenzen wurden, in Anlehnung an das "computer assisted microcirculation analysis system" (CAMAS) (242), mit dem Softwarepaket Cap-Image 6.01 (114) analysiert. Die für die digitale Bildverarbeitung notwendige Hardware bestand aus einem PC mit eingebauter Bildverarbeitungskarte (IP-8/AT, Matrox, Kanada), einem S-VHS Videorecorder (SVO-9500 MDP, Sony GmbH, Köln, Deutschland), einem Videobildschirm (PVM-1442QM, Sony GmbH, Köln, Deutschland), und einem Farbmonitor (200 GST 17", Sony GmbH, Köln, Deutschland).

### **2.3.2. Blutdruckmesssystem**

Die im Vorfeld implantierten Katheter wurden zum Zweck der arteriellen und venösen Blutdruckmessung an einen Druckwandler (Statham DTX+, Becton Dickenson GmbH, Heidelberg, Deutschland) angeschlossen. Über einen Signalwandler (Plugsys 603, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) wurde dieser mit einem PC verbunden. Mit Hilfe einer Messwerterfassungssoftware (DASYLab®32, Vers.4.03.30, Datalog GmbH, Mönchengladbach, Deutschland) konnten so während des gesamten Versuches die venösen und arteriellen Blutdruckwerte beobachtet und gespeichert werden. Aus der graphische Darstellung der Blutdruckkurve wurde die Pulsfrequenz ermittelt.

### **2.3.3. Blutanalyse**

Durch den arteriellen Katheter konnte zu vorgegebenen Zeitpunkten 0,1 ml Blut für die Analyse entnommen werden. Die für die Entnahme verwendete Insulinspritze wurde vorher mit Heparin beschichtet um die Blutprobe vor Gerinnung zu schützen. Mit Hilfe eines Analysegerätes (Coulter® AC, T-8 Serie, Coulter Electronics GmbH, Krefeld, Germany) wurde das Blutbild bestimmt. Entnommen wurden daraus Parameter wie der Hämoglobingehalt und der Hämatokritwert. Mit einem Blutgasmessgerät (Chiron® 860, Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald, Deutschland) wurden insbesondere der Sauerstoffpartialdruck ( $pO_2$ ), der Partialdruck für Kohlendioxid ( $pCO_2$ ), der Lactat-, der BE- und der pH-Wert bestimmt.

### **2.4. Analyse der intravitalmikroskopischen Parameter**

Durch die Verwendung von geeigneten Fluoreszenzfarbstoffen konnte durch Labeling der Leukozyten mit Rhodamin 6G die Auswertung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und durch die Kontrastierung des Plasmas mit FITC-Dextran die Auswertung der Gefäßdurchmesser, der Blutflussgeschwindigkeit, der Extravasation von FITC-Dextran und der funktionellen Kapillardichte (FKD) vorgenommen werden. FITC-Dextran wurde in einer Dosierung von 0,15 mg/kg/KG i.v., Rhodamin 6G in einer Dosierung von 0,5 mg/kg/KG i.v. verabreicht.

Für die Analyse mikrozirkulatorischer Parameter wurden im Sichtfenster jeweils 6 Gewebeareale mit Venolen, 4 Gewebeareale mit Arteriolen und 6



Kapillarfelder herangezogen. Die Zahl der Versuchstiere betrug  $n = 7$  pro Versuchsgruppe.

#### 2.4.1. Gefäßdurchmesser

Die Bestimmung der Gefäßdurchmesser erfolgte manuell. Hierzu wurde nach Markieren zweier gegenüberliegender Punkte an der Gefäßwand die Strecke direkt gemessen. Diese Strecke entspricht dem Durchmesser des Gefäßes. Für jedes Gefäßsegment wurden fünf Einzelwerte ermittelt und daraus der Mittelwert gebildet.

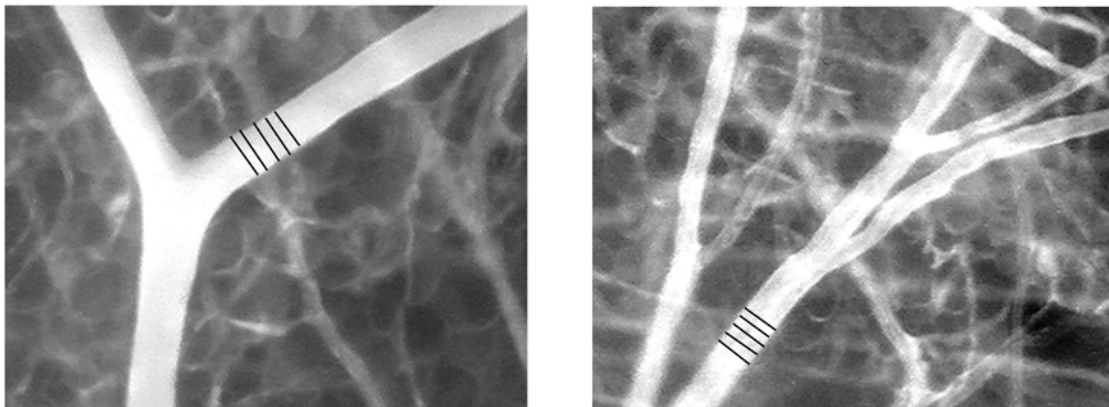


Abb 06: Manuelle Bestimmung des Gefäßdurchmessers einer Arteriolen (links) und einer Venolen (rechts).

#### 2.4.2. Blutflussgeschwindigkeit

Die Messung der venulären Blutflussgeschwindigkeit erfolgte mit Hilfe der Line-Shift-Diagramm-Methode (114). Hierfür werden im Standbild in die Mitte des Gefäßsegmentes eine Messlinie gezeichnet und anschließend während einer Videosequenz von 10 Sekunden für jedes einzelne Halbbild

getrennt die Grauwertdaten entlang der Messlinie erfasst. Nach Ablauf der Messsequenz werden diese Grauwertdaten als aneinandergereihte vertikale Linien auf dem Bildschirm dargestellt. Anhand der als schräge Linien erscheinenden Grauwertdaten gleichen Wertes im Line-Shift-Diagramm kann deren Steigung automatisch ermittelt und daraus die Geschwindigkeit berechnet werden.

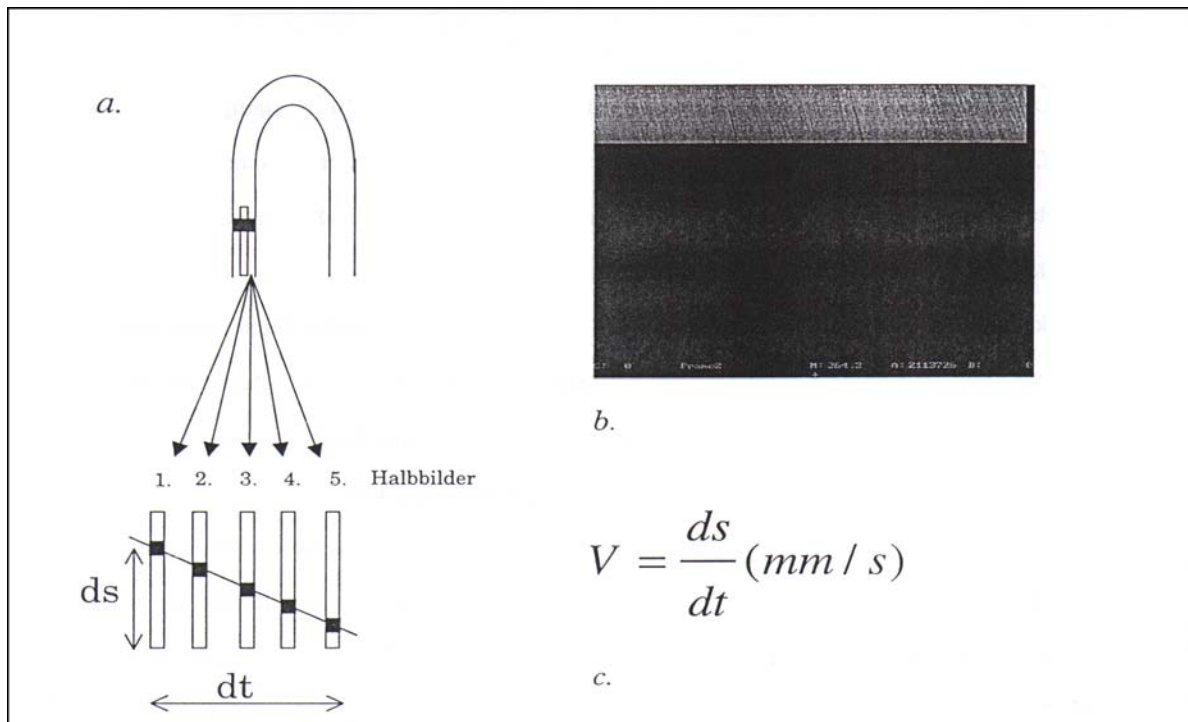


Abb 07: Schematische Darstellung der Line-Shift-Diagramm-Methode: Während der Messung werden für jedes Halbbild die Grauwertdaten entlang der Messlinie erfasst (a) und in einem Bildspeicher als vertikale Linien nebeneinander geschrieben. Nach Ablauf der Messsequenz wird der Bildspeicher mit den aneinandergereihten Messlinien angezeigt (b). Wenn sich z.B. während einer Messsequenz 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. oben wandert. (entnommen aus Klyscz et al., 1997) (114).

### **2.4.3. Extravasation**

Unter physiologischen Bedingungen ist das mikrovaskuläre Endothel für FITC-Dextran 150kD nur geringfügig permeabel, sodass es zu keiner nennenswerten Extravasation des Fluoreszenzfarbstoffes in das perivaskuläre Gewebe kommt (201). Wenn jedoch eine gestörte Endothelzellenfunktion vorliegt kann FITC-Dextran 150 kD in das perivaskuläre Gewebe austreten und als Areal höherer Fluoreszenzintensität registriert werden. Die Fluoreszenzintensität in zwei benachbarten Arealen innerhalb ( $I_i$ ) und außerhalb ( $I_a$ ) eines Gefäßsegmentes wurde densitometrisch gemessen und der entsprechende Fluoreszenzintensitätsquotient ( $I_a/I_i$ ) berechnet. Dieser Quotient wurde als Parameter für die Permeabilität des Endothels herangezogen (114).

### **2.4.4. Funktionelle Kapillardichte (FKD)**

Die funktionelle Kapillardichte (FKD) ist definiert als Länge der von Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfläche ( $\text{cm}/\text{cm}^2$ ) und stellt ein Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes dar (173). Die quantitative Erfassung der funktionellen Kapillardichte (FKD) erfolgte nach dem pythagoreischen Prinzip (242). Die auf dem Monitor abgebildeten Kapillaren werden nachgezeichnet und deren Länge pro definiertes Beobachtungsfeld berechnet.

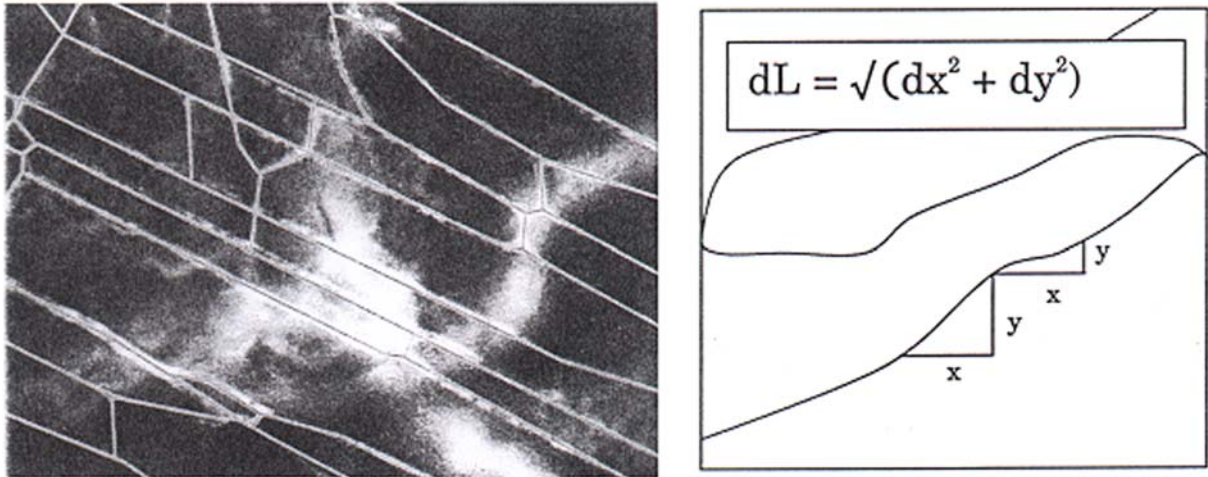


Abb. 08: Prinzip der pythagoreischen Kapillarlängenbestimmung (entnommen aus F-U Sack, Dissertationsschrift 1992)

#### 2.4.5. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Leukozyten eines 150–200  $\mu\text{m}$  langen Gefäßsegments wurden 30 Sekunden lang beobachtet und entsprechend ihrer Interaktion mit dem mikrovaskulärem Endothel in zwei Gruppen eingeteilt:

*Rollende Leukozyten:* Zellen im Randstrom, die eine quer zur Gefäßachse verlaufenden Linie signifikant langsamer überqueren als die Zellen im Zentralstrom. Sie wurden 30 Sekunden lang ausgezählt und in Zellen pro Minute (n/min) angegeben.

*Adhärenente Leukozyten:* Zellen, die ihre Position während einer Beobachtungszeit von 30 Sekunden in einem 200  $\mu\text{m}$  langen Gefäßabschnitt nicht veränderten. Ihre Anzahl wurde als Zellen pro  $\text{mm}^2$  Endothelzelloberfläche ( $\text{n}/\text{mm}^2$ ) angegeben. Aus dem Gefäßdurchmesser D und

der Länge des untersuchten Gefäßabschnitts  $L$  kann die Anzahl adhärenter Leukozyten pro  $\text{mm}^2$  Endothelzelloberfläche ( $AL$ ) wie folgt kalkuliert werden:

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

$N$  = Anzahl adhärenter Leukozyten

$D$  = Gefäßdurchmesser in  $\mu\text{m}$

$L$  = Länge des Gefäßabschnittes in  $\mu\text{m}$

$\pi$  = Kreiskonstante

## **2.5. Versuchsprotokoll**

Zu Beginn des Versuchs wurden die zu untersuchenden Gefäßabschnitte und Kapillarfelder ausgewählt und deren X-Y-Koordinaten für die späteren intravitalmikroskopischen Untersuchungen gespeichert.

### 2.5.1. Versuchsgruppen

Es ergaben sich folgende Versuchsgruppen:

Versuchprotokoll	Versuchsgruppe	Tierzahl
Moderate Hämodilution (Hkt 30%)	Hb-Dex-BTC	n = 7
	$\alpha\alpha$ -Hb	n = 7
	Dextran	n = 7

Tab. 02

### 2.5.2. Moderate Hämodilution

Nach Gabe der Fluoreszenzfarbstoffe wurden alle im Vorfeld ausgewählten zu untersuchenden Areale aufgezeichnet und zugleich MAP, HR, und BG registriert (baseline). Anschließend wurde bei den Tieren eine isovolämische Hämodilution bis zu einem Hämatokrit von 30% durchgeführt. Dazu wurde aus der Arteria Carotis interna Blut mit einer Rate von 0,2 ml pro Minute entnommen und durch eine entsprechende Menge von entweder Dextran 60,  $\alpha\alpha$ -Hb, bzw. Hb-Dex-BTC intravenös ersetzt.

Das insgesamt auszutauschende Volumen ( $V_a$ ), um den gewünschten Hämatokrit zu erreichen, wurde durch folgende Formel ermittelt:

$$V_a = V_g * \ln (HCT_a / HCT_z)$$

$V_a$  = auszutauschendes Volumen

$V_g$  = geschätztes Blutvolumen gesamt ( = Körpergewicht \* 0,065 )

$HCT_a$  = Ausgangs Hämatokrit

$HCT_z$  = Ziel Hämatokrit

$\ln$  = natürlicher Logarithmus

Nach Erreichen des Zielhämatokrits ( $\pm 0,3\%$  des gewünschten Wertes) wurden erneut intravitalmikroskopische Aufnahmen vorgenommen (0 min). Weitere Messungen erfolgten 30 und 60 Minuten nach Abschluss der Hämodilution. Vor jeder Aufnahme (baseline, 0', 30', 60') wurde dem Versuchstier zur Analyse arterielles Blut entnommen (0,1 ml) und durch die gleiche Menge der jeweils zu untersuchenden Lösungen substituiert.

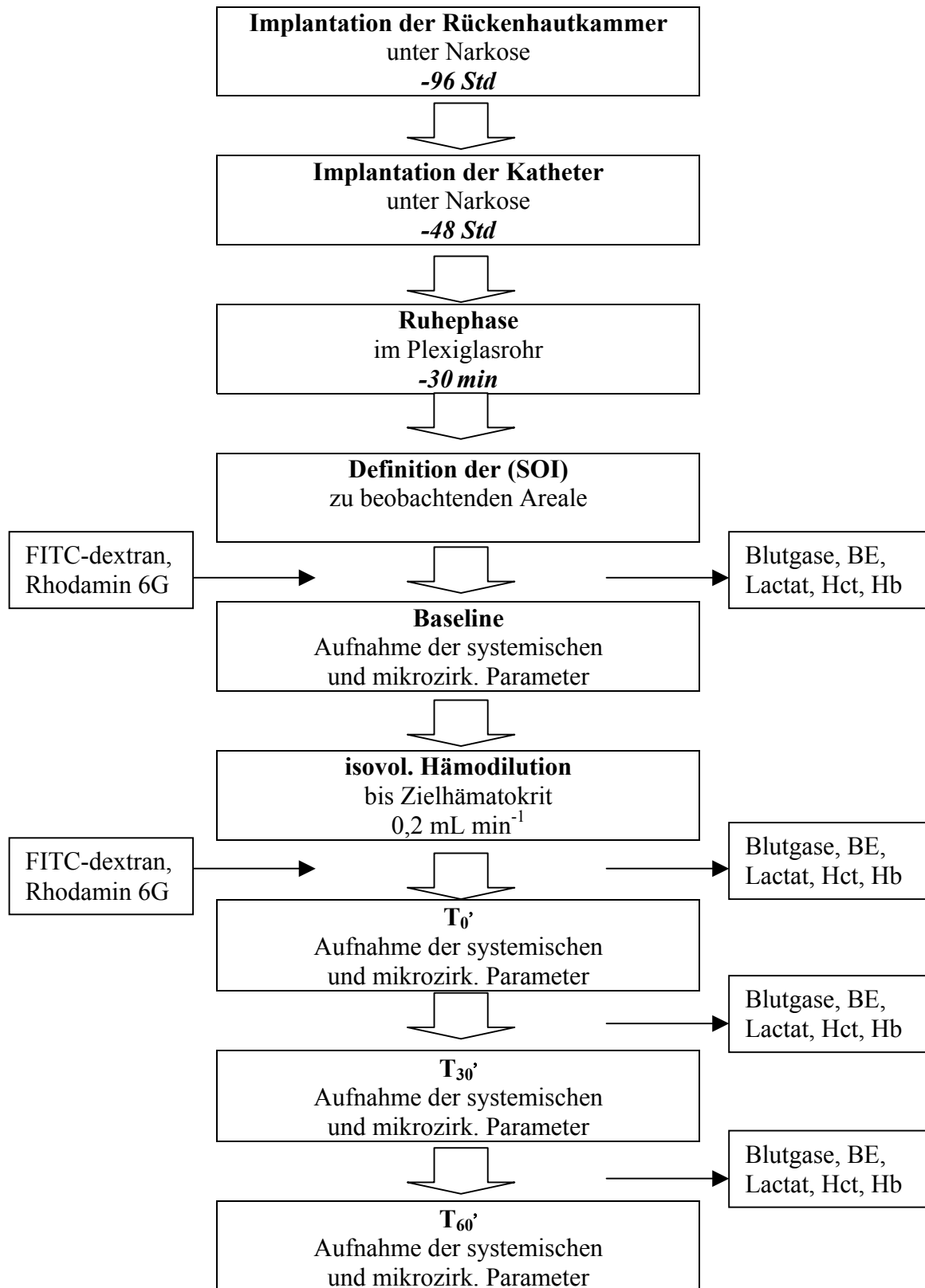


Abb. 09: Experimentelles Protokoll für die Moderate Hämodilution.



## 2.6. Verwendete Lösungen für die Hämodilution

Die zu untersuchende Lösung war Hb-Dex-BTC (Pasteur-Mérieux sérums & vaccins, Marcy l'Etoile, Frankreich). Als Referenzlösungen fanden  $\alpha$ -Hb (U.S. Army, USA) und 6% Dextran 60 (Pharmalink, Uppsala, Schweden) Anwendung.

### Eigenschaften der Lösungen

	Hb-Dex-BTC	$\alpha$ -Hb	Dextran 60
Konzentration (g/dl)	8.5	8.2	6.0
Molekulargewicht	32 kDa: - 64 kDa:< 5% > 64 kDa:> 90% > 500 kDa:< 5%	32 kDa:< 5% 64 kDa:> 95% > 64 kDa: kA > 500 kDa: kA	MG:60 kDa
HbO <sub>2</sub> (%)	90	85	kA
MetHb (%)	< 5	< 10	kA
Onkotischer Druck (torr)	40	34.5	39
Osmolarität (cP)	280	280	290
Viskosität	2.15	0.99	kA
P <sub>50</sub> (torr)	23	29.5	kA
pH	7.24	7.52	4.00–7.00

Tab. 03: kDa: Kilodalton; kA: Keine Angaben.

## **2.7. Statistische Auswertung**

Bei den dargestellten Werten handelt es sich um Mittelwerte  $\pm$  SEM.

Statistische Vergleiche innerhalb der Gruppen wurden vor der Hämodilution (Baseline) und zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Hämodilution (0 min, 30 min, 60 min) durch eine ANOVA RM für verbundene Stichproben + Bonferroni multiplen Vergleichstest durchgeführt (Graphpad InStat® 3.05, Graphpad Software Inc., San Diego, USA). Die Vergleiche zwischen den drei Gruppen wurden für jeden Zeitpunkt mit einem einfachen ANOVA + Bonferroni multiplen Vergleichstest durchgeführt.  $P < 0,05$  wurde als signifikant gewertet.

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Moderate Hämodilution

##### 3.1.1. Systemische Parameter

###### Hämatologie

Nach erfolgter Volumensubstitution sank der Hämatokritwert (Hkt) in allen drei Gruppen signifikant auf einen Mittelwert von 30,6 %. Zu allen nachfolgenden Zeitpunkten blieb der Hkt-Wert unverändert.

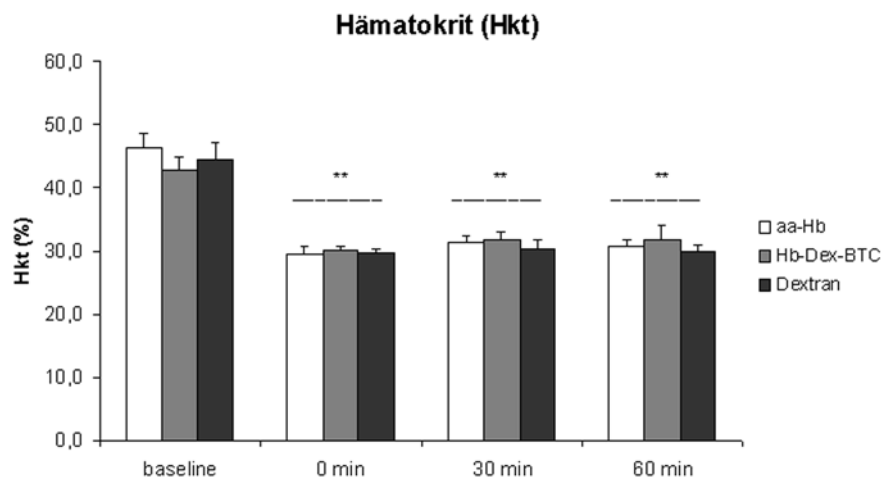


Abb. 10: Hämatokritwerte vor und während moderater Hämodilution. Die für die Blutgasanalyse entnommene Menge Blut wurde durch Kochsalzlösung als i.v. Bolus ersetzt.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline, \*\*  $P < 0,05$  vs. Dextran.

Der Hämoglobingehalt (Hb) verhielt sich ganz ähnlich und lag im Mittel zum Zeitpunkt baseline bei 14,8 g/dl. Nach einem signifikanten Abfall auf einen Mittelwert von 11,4 g/dl blieb der Hb-Gehalt bei aa-Hb und Hb-Dex-BTC zu allen nachfolgenden Zeitpunkten konstant. Dextran, als nicht Hb enthaltende Lösung, zeigte nach stattgefundenener Hämodilution einen um 1 g/dl stärkeren Abfall des Hb-Gehalts als die beiden anderen Lösungen.

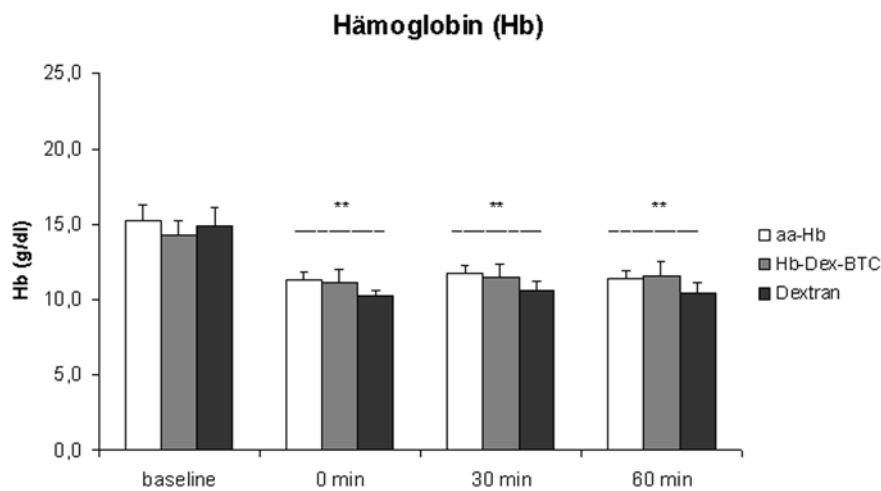


Abb. 11: Hämoglobingehalt des Blutes vor und während moderater Hämodilution. Die für die Blutgasanalyse entnommene Menge Blut wurde durch Kochsalzlösung als i.v. Bolus ersetzt.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline, \*\*  $P < 0,05$  vs. Dextran.

## Blutgase

Bei der quantitative Blutgasanalyse waren vor allem der  $pO_2$ ,  $pCO_2$  und der pH-Wert von größerer Bedeutung. In Bezug auf den  $pO_2$  zeigte Hb-Dex-BTC zum Zeitpunkt 30 min im Gegensatz zu den anderen beiden Gruppen einen signifikanten Abfall, der  $pCO_2$  dagegen einen signifikanten Anstieg. Zum letzten Beobachtungszeitpunkt lag Hb-Dex-BTC jedoch wieder auf gleicher Höhe mit aa-Hb und Dextran und zeigte keine signifikante Veränderung versus Baseline. Der arterielle pH-Wert sank nach erfolgter Volumensubstitution in allen Gruppen, am eindeutigsten jedoch bei Hb-Dex-BTC mit einem signifikanten Abfall auf einen Wert von 7,40. In der Dextran Gruppe sank der pH-Wert konstant bis zum Ende des Versuches, während er sich in den anderen Gruppe zum Zeitpunkt 60 min wieder erholte und gegenüber Baseline nur geringfügig niedriger war.

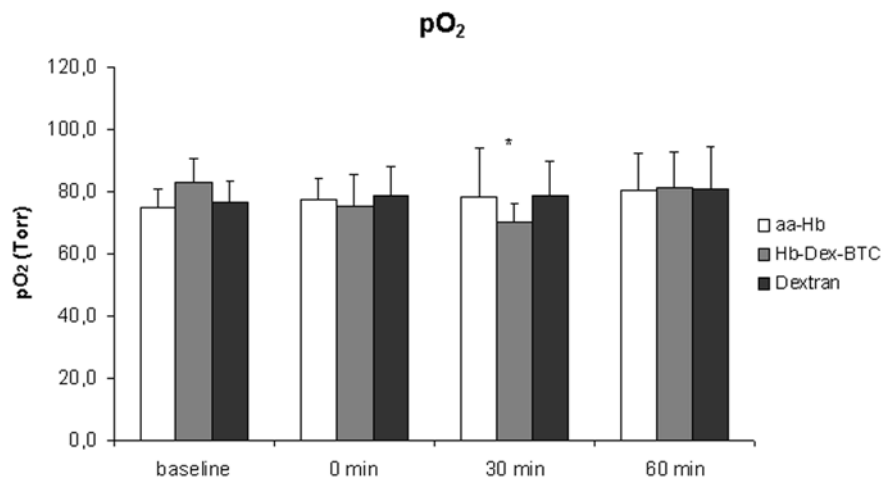


Abb. 12: Mittlerer  $pO_2$  im Blut vor und während moderater Hämodilution. Die für die Blutgasanalyse entnommene Menge Blut wurde durch Kochsalzlösung als i.v. Bolus ersetzt.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline, \*\*  $P < 0,05$  vs. Dextran.

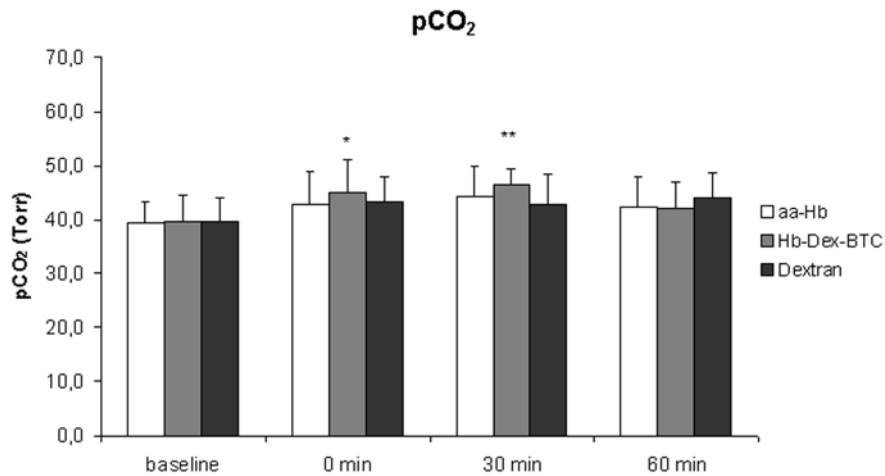


Abb. 13: Mittlerer pCO<sub>2</sub> im Blut vor und während moderater Hämodilution. Die für die Blutgasanalyse entnommene Menge Blut wurde durch Kochsalzlösung als i.v. Bolus ersetzt. n=7, MW± SEM, \* P < 0,05 vs. Baseline, \*\* P < 0,05 vs. Dextran.

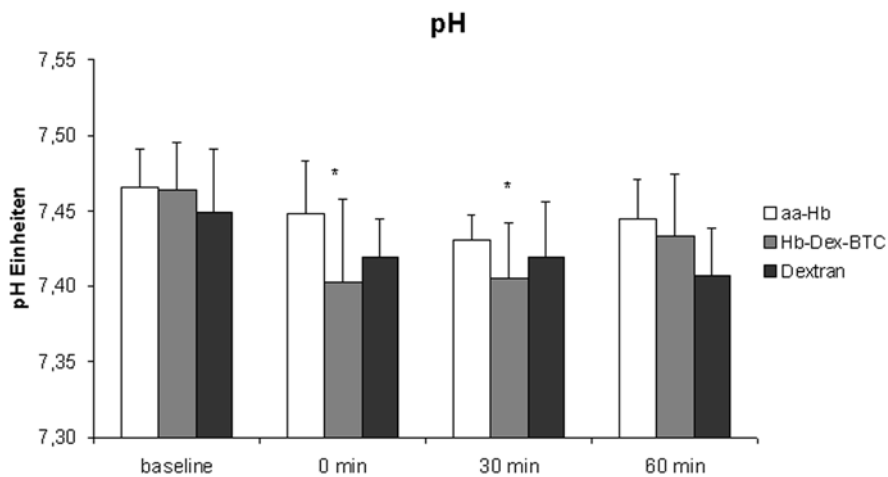


Abb. 14: Mittlerer pH Wert des Blutes vor und während moderater Hämodilution. Die für die Blutgasanalyse entnommene Menge Blut wurde durch Kochsalzlösung als i.v. Bolus ersetzt. n=7, MW± SEM, \* P < 0,05 vs. Baseline, \*\* P < 0,05 vs. Dextran.

### Makrohämodynamik

Ausgehend von einem mittleren arteriellen Blutdruck (MAP) von 89 mmHg kam es während der Volumensubstitution in der Dextrangruppe zu einem signifikanten Blutdruckabfall. Die anderen Gruppen zeigten beide einen hoch signifikanten wenn gleich unterschiedlich stark ausgeprägten Blutdruckanstieg. Folglich war der Blutdruckanstieg von  $\alpha\alpha$ -Hb und Hb-Dex-BTC im Vergleich zum Blutdruckabfall nach Dextran signifikant. Im Gegensatz zu  $\alpha\alpha$ -Hb, bei dem sich der erhöhte MAP bis zum Ende des Versuchs signifikant zeigte, kehrte der MAP-Wert in der Hb-Dex-BTC Gruppe zum Zeitpunkt 60 min wieder auf baseline Werte zurück.

Die Herzfrequenz (HF), zum Zeitpunkt Baseline im Mittel  $438 \text{ min}^{-1}$ , zeigte keine nennenswerte Veränderungen in der Dextrangruppe über die gesamte Dauer des Experiments. Anders reagierte die Hb-Dex-BTC Gruppe zum Zeitpunkt 0 min mit einem hoch signifikanten Abfall der HF versus Baseline sowie versus Dextran auf einen Wert von  $390 \text{ min}^{-1}$ , erholte sich aber wieder im Laufe des Versuches. Dagegen induzierte die Volumensubstitution bei der  $\alpha\alpha$ -Hb Gruppe eine Reduktion der HF, die sich zu allen Untersuchungszeitpunkten als signifikant erwies.

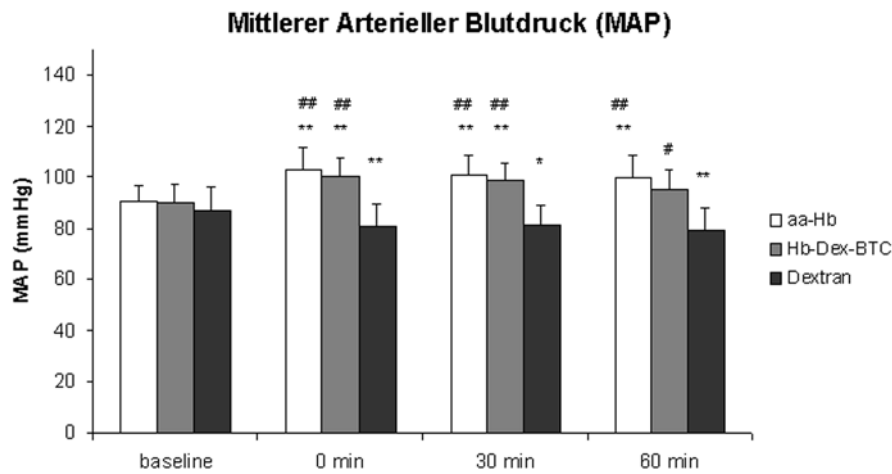


Abb. 15: Mittlerer arterieller Blutdruck, gemessen in der Arteria carotis communis dextra des syrischen Goldhamsters vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline, \*\*  $P < 0,01$  vs. Baseline, #  $P < 0,05$  vs. Dextran, ##  $P < 0,01$  vs. Dextran.

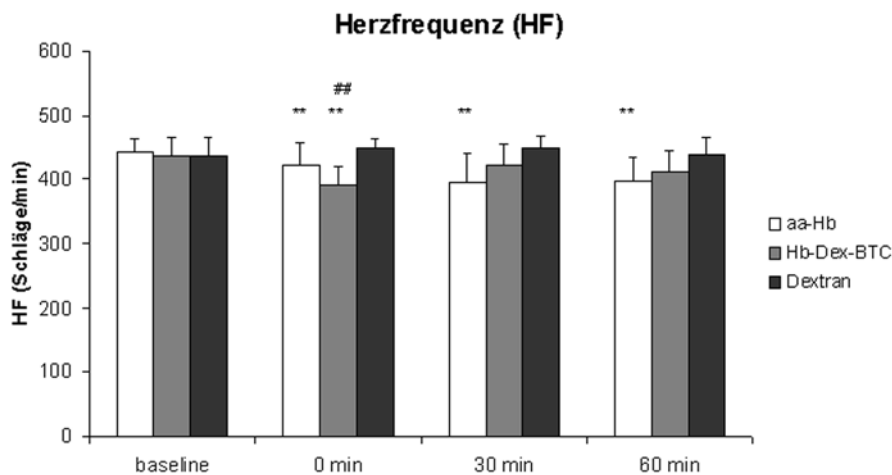


Abb. 16: Herzfrequenz, gemessen in der Arteria carotis communis dextra des syrischen Goldhamsters vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline, \*\*  $P < 0,01$  vs. Baseline, #  $P < 0,05$  vs. Dextran, ##  $P < 0,01$  vs. Dextran.



### 3.1.2. Gefäßdurchmesser

Ausgewertet wurden Gefäße unterschiedlichen Durchmessers, im Mittel jedoch postkapilläre Venolen mit einem Durchmesser von im Mittel 28  $\mu\text{m}$  und Arteriolen mit einem Durchmesser von im Mittel 34  $\mu\text{m}$ . Während der gesamten Untersuchungsdauer von 60 min wurden am Durchmesser der Venolen keine signifikanten Unterschiede sichtbar. In der Hb-Dex-BTC Gruppe konnte an den postkapillären Venolen eine geringe Dilatation gezeigt werden. Dasselbe gilt für aa-Hb. Eine Dilatation der Arteriolen war, wenn auch nur geringfügig, in allen Gruppen sichtbar. Auch bei diesem Parameter waren keine signifikanten Veränderungen nachweisbar.

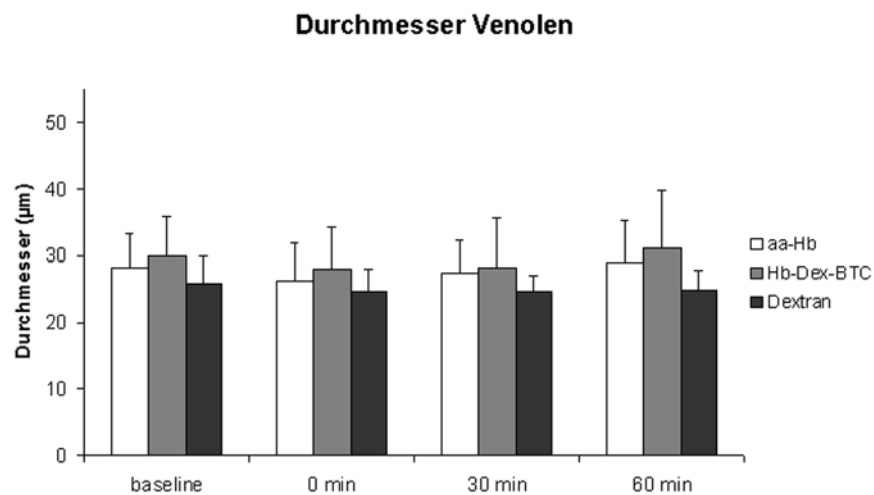


Abb. 17: Durchmesser postkapillärer Venolen des quergestreiften Rückenhautmuskels beim syrischen Goldhamster vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline.

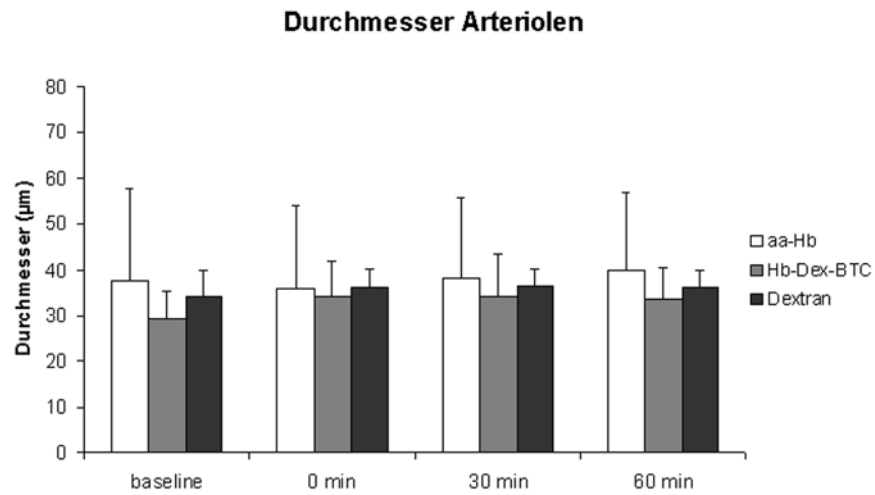


Abb. 18: Durchmesser von Arteriolen des quergestreiften Rückenhautmuskels beim syrischen Goldhamster vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline.

### 3.1.3. Blutflussgeschwindigkeit

Die Blutflussgeschwindigkeit mit Anfangswerten um die 0,5 mm/s in den postkapillären Venolen stieg, wenn auch nicht signifikant, zu Beginn in der Hb-Dex-BTC Gruppe und blieb im Verlauf des Versuches konstant bei einem Wert von 0,7 mm/s. In den anderen beiden Gruppen kam es, nach einem anfänglichen Anstieg, zu einem Abfall der Blutflussgeschwindigkeit, auf einen Wert von 0,5 mm/s in der Dextran Gruppe und von 0,4 mm/s in der aa-Hb Gruppe zum Zeitpunkt 60 min.

In Bezug auf die baseline Werte der jeweiligen Gruppe erwies sich dieser Abfall der Blutflussgeschwindigkeit als nicht signifikant.

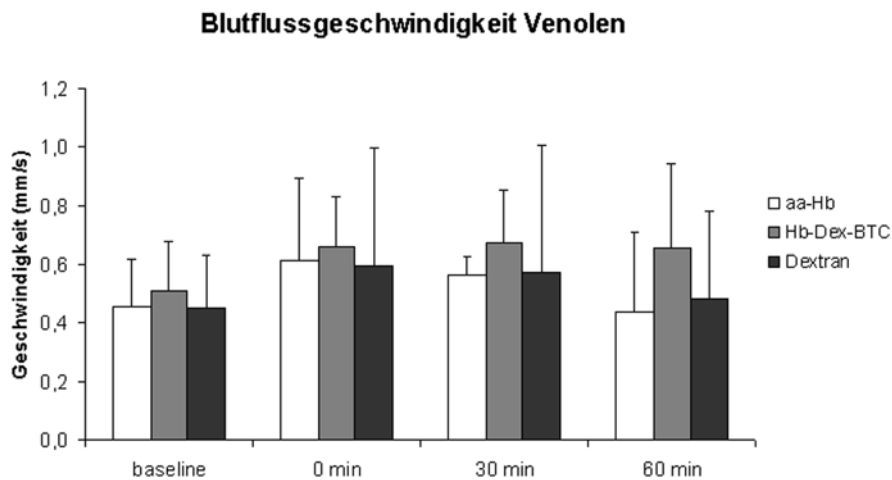


Abb. 19: Blutflussgeschwindigkeit in den postkapillären Venolen des quergestreiften Rückenhautmuskels beim syrischen Goldhamster vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline.

### 3.1.4. Extravasation

Außer einer scheinbar erhöhten Extravasation, bei der Volumensubstitution mit Dextran, aus postkapillären Venolen in das umliegende Gewebe zum Zeitpunkt 0 min, war über die gesamte Dauer des Experiments bei keiner der Gruppen eine nennenswerte Extravasation nachweisbar. Die Mittelwerte lagen zu Beginn, sowie am Ende des Beobachtungszeitraumes bei 0,44 Ia/Ii. Auch die Extravasation von Fluoreszenzfarbstoff aus den beobachteten Arteriolen zeigte sich bei allen Gruppen unauffällig.

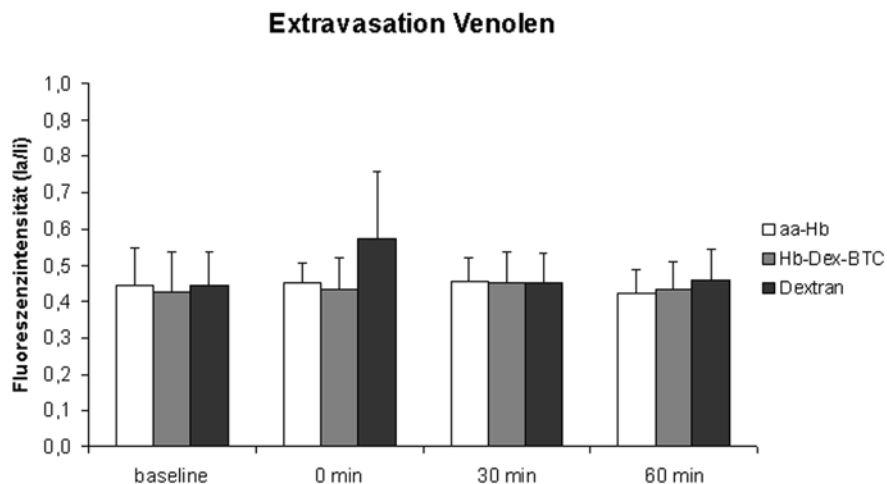


Abb. 20: Extravasation von Fluoreszenzfarbstoff aus postkapillären Venolen des quergestreiften Rückenhautmuskels beim syrischen Goldhamster vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline.

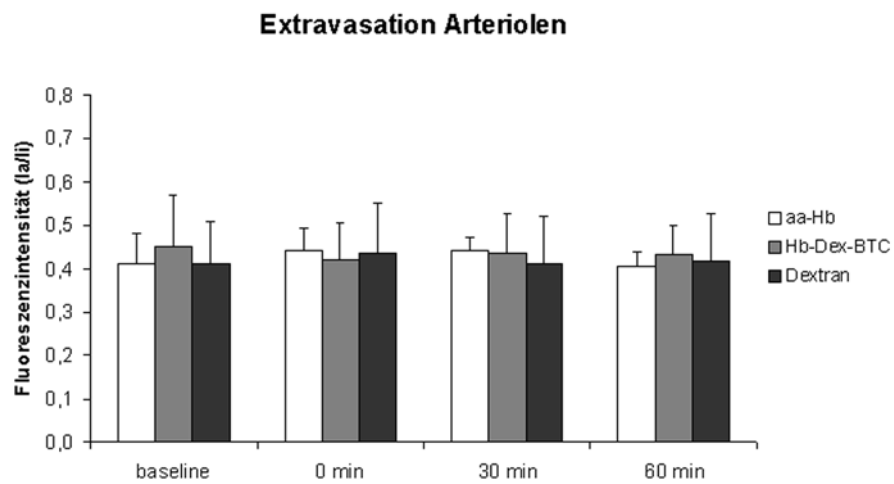


Abb. 21: Extravasation von Fluoreszenzfarbstoff aus den Arteriolen des quergestreiften Rückenhautmuskels beim syrischen Goldhamster vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline.

### 3.1.5. Funktionelle Kapillardichte (FKD)

Die Funktionelle Kapillardichte (FKD), als Maß für die nutritive Perfusion des Gewebes, blieb mit Mittelwerten um die 143  $\text{cm}/\text{cm}^2$  in der Hb-Dex-BTC und 145  $\text{cm}/\text{cm}^2$  in der Dextran Gruppe zu allen Zeitpunkten gegenüber den Anfangswerten von 161  $\text{cm}/\text{cm}^2$  und 158  $\text{cm}/\text{cm}^2$  nahezu unverändert. In der aa-Hb Gruppe war, zum Zeitpunkt 60 min, ein geringer Abfall der FKD auf einen Wert von 119  $\text{cm}/\text{cm}^2$  zu verzeichnen. Eine statistische Signifikanz ergab sich daraus jedoch nicht.

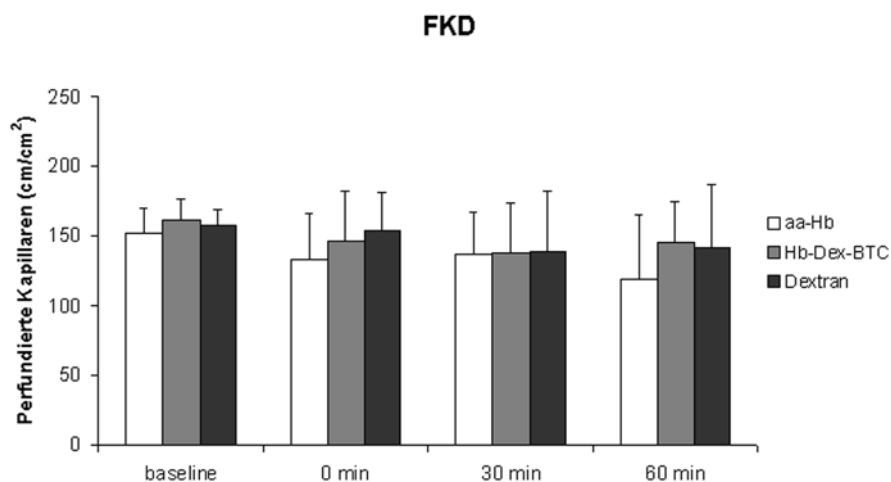


Abb. 22: Funktionelle Kapillardichte im quergestreiften Rückenhautmuskel beim syrischen Goldhamster vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline.

### 3.1.6. Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Anzahl der entlang des Endothels der postkapillären Venolen rollenden Leukozyten (Roller) verringerte sich bei allen Gruppen zu Beginn der Volumensubstitution, stieg jedoch, aa-Hb ausgenommen, im Laufe des Versuches wieder an. Bei allen Gruppen war die Anzahl der Roller über den gesamten Beobachtungszeitraum unter dem Ausgangswert, aber im Vergleich zu diesem nicht signifikant nachweisbar. Die am Endothel der postkapillären Venolen fest adhärenen Leukozyten (Sticker) hingegen, stiegen im Verlauf bei der Hb-Dex-BTC und der Dextran Gruppe und kehrten nur bei aa-Hb, zum Zeitpunkt 60 min, auf nahezu den Ausgangswert zurück. Eine statistische Signifikanz wurde jedoch in keiner der Gruppen erzielt.

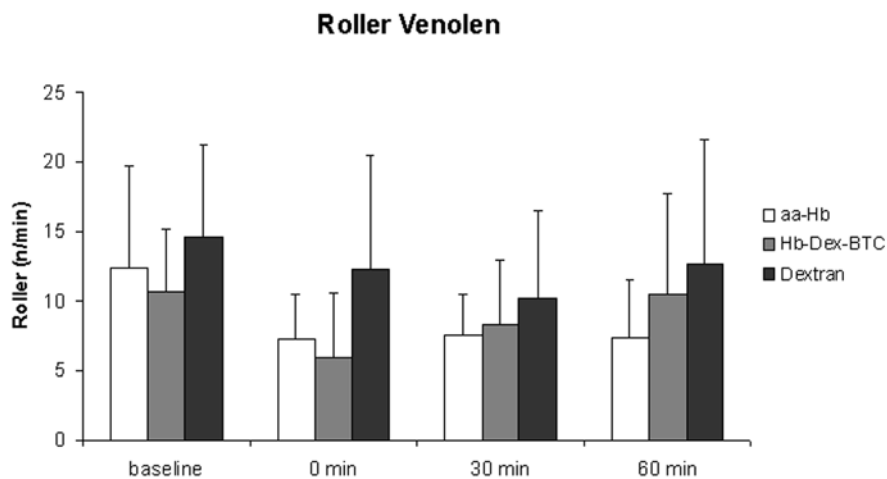


Abb. 23: Rollende Leukozyten (Roller) in den postkapillären Venolen des quergestreiften Rückenhautmuskels beim syrischen Goldhamster vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline.

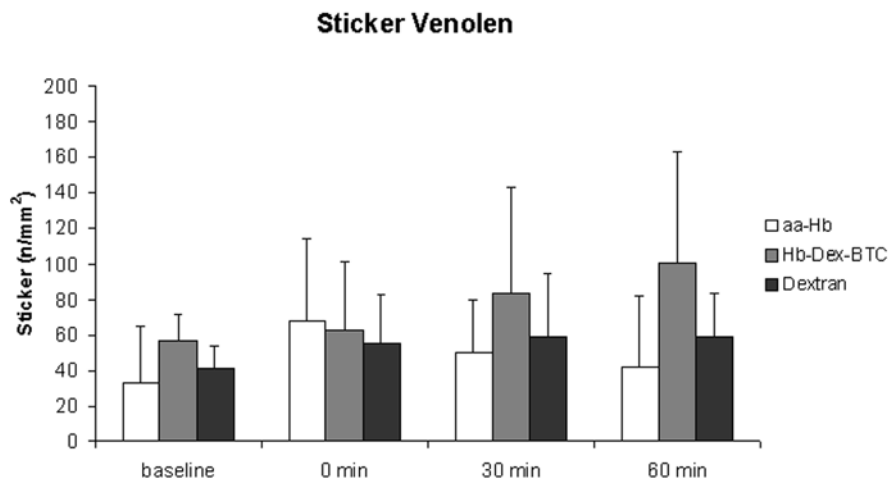


Abb. 24: Fest adhärenente Leukozyten (Sticker) in den postkapillären Venolen des quergestreiften Rückenhautmuskels beim syrischen Goldhamster vor und während moderater Hämodilution.  $n=7$ ,  $MW \pm SEM$ , \*  $P < 0,05$  vs. Baseline.



## **4. Diskussion**

### **4.1. Einleitung**

Die Gewebeoxygenierung ist abhängig von Sauerstoffangebot, Sauerstoffverbrauch und der lokalen O<sub>2</sub>-Diffusionskapazität. Das Sauerstoffangebot an ein Organ ist von Qualität und Quantität der Organperfusion und dem Sauerstoffgehalt des arteriellen Blutes abhängig. Eine Abnahme des Sauerstoffgehalts kann durch eine Zunahme der Organperfusion ausgeglichen werden. Da unter physiologischen Bedingungen das Sauerstoffangebot den Sauerstoffverbrauch übertrifft und nur ein Teil des Sauerstoffangebotes ausgeschöpft wird, kann mit Ausnahme des Herzens einer Abnahme des Sauerstoffangebotes auch mit einer Erhöhung der Sauerstoffextraktion begegnet werden.

#### **4.1.1. Kompensationsmechanismen bei Hämodilution**

##### **Systemische Kompensation bei Hämodilution**

Während der Hämodilution (HD) nehmen der Hämtokrit (Hkt) und damit auch die Viskosität des Blutes ab. Dies führt zu einer Nachlastsenkung, zu einer Zunahme des venösen Rückstroms, zu einer besseren ventrikulären Füllung und somit über den Frank-Starling-Mechanismus zu einer Erhöhung des Herzminutenvolumens (HMV) (152) (156). Mit der Zunahme des HMV lässt sich in den arteriolären Widerstandsgefäßen eine Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit (BFG) beobachten, die über eine erhöhte

---

Scherkraftvermittelte NO-Freisetzung zu einer Vasodilatation in diesen Gefäßen führt (43) (150) (167). Bis zu einem Hkt von 30% kann das Sauerstoffangebot an die Organe aufgrund der überproportionalen Zunahme von HMV und Organperfusion sogar noch zunehmen (150) (151) (152). Mit fortschreitender HD nimmt das HMV nicht weiter zu und somit das Sauerstoffangebot ab (209). Durch eine Zunahme der Sauerstoffextraktion kann aber der Sauerstoffverbrauch auch bei abnehmendem Sauerstoffangebot noch aufrecht erhalten werden (156) (209). Erst wenn auch dieser Kompensationsmechanismus erschöpft ist, ist der sogenannte kritische Hkt erreicht, bei dem eine weitere HD zu einer Gewebhypoxie und Azidose führen würde. Der kritische Hkt ist individuell nicht vorhersehbar, Voruntersuchungen haben jedoch gezeigt, dass dieser Wert beim Hund unter Raumluftatmung im Bereich von etwa 10% liegt (151).

### **Mikrozirkulatorische Kompensation bei Hämodilution**

Parallel zu den Veränderungen in der Makrozirkulation kommt es auch in der Mikrozirkulation zu Anpassungsvorgängen während der Hämodilution.

Unter physiologischen Bedingungen liegt der systemisch gemessene Hämatokrit über dem kapillären Hämatokrit; dieser nimmt während Hämodilution in vergleichsweise geringem Umfang ab (96) (156).

Weiterhin findet man bei moderater Hämodilution eine Zunahme der Blutflussgeschwindigkeit in Arteriolen und Kapillaren. Dadurch kann die Abnahme des kapillären Hämatokrits ausgeglichen werden, sodaß der Erythrozytenflux in den Kapillaren annähernd konstant bleibt (134) (151) (160). Da sich die Sauerstoffdiffusion aus den Arteriolen

---

indirekt proportional zur Blutflussgeschwindigkeit verhält und somit bei Hämodilution abnimmt, steht in den Kapillaren mehr sauerstoffreiches Blut für den Gasaustausch zur Verfügung (95) (96) (123).

Das lokale Sauerstoffangebot nimmt daher ebenso wenig ab wie das globale Sauerstoffangebot. Im Gegenteil ist häufig gezeigt worden, dass der Gewebesauerstoffpartialdruck ( $tPO_2$ ) bei moderater Hämodilution sogar zunehmen kann (156). Eine homogenere Verteilung der Perfusion sowohl in den zuführenden Arteriolen als auch in den Kapillaren ermöglicht darüber hinaus auch eine bessere Sauerstoffutilisation in zuvor mangelperfundierten Arealen, was ebenfalls zum Erhalt einer adequaten Gewebeoxygenierung beiträgt (129) (154) (160). Die erhöhte Blutflussgeschwindigkeit (BfG) kann die Sauerstoffversorgung allerdings nur bis zu einem Hämatokritwert von etwa 20% gewährleisten (156), da bei zu hoher BfG die Transitzeit der Erythrozyten in den Kapillaren zu kurz wird und somit die Sauerstoffabgabe an das Gewebe erschwert wird (68). In diesem Fall sinkt der lokale Sauerstoffgehalt des Gewebes unter die für die adäquate Funktion des Organs notwendige Konzentration (220) (223).

### **Viskosität**

Dass es sich beim Hämatokritwert um einen limitierenden Faktor in der Mikrozirkulation handelt, ist seit langem bekannt und wurde in der Literatur einschlägig behandelt (96) (134) (151) (156). In den letzten Jahren wurde jedoch immer klarer, dass auch die Viskosität des Gesamtblutes ein solcher limitierender Faktor sein kann (219).

---

Die Viskosität des Blutes wird vor allem durch den Hämatokritwert bestimmt, während sich die Scherrate aus Gefäßdurchmesser und Erythrozytenfließgeschwindigkeit (Efg) zusammensetzt (222). Nach isovolämischer HD steigt die Efg und mit ihr die Scherrate. Zu beobachten ist aber auch eine Migration der Erythrozyten in die Gefäßmitte. Somit bildet sich eine Plasmaschicht zwischen dem zentralen Strom und der Gefäßwand aus (6) (7) (186). Wichtig in diesem Zusammenhang ist somit die Viskosität des Plasmas. Plasmaviskosität und Scherrate definieren die Scherkraft (222), welche das Endothel stimuliert, vasoaktive Substanzen wie Prostazyklin (56) und NO (17) zu produzieren.

NO ist verantwortlich für die bei isovolämischer HD beobachtete arterioläre Vasodilatation (43), die mit einer erhöhten Erythrozytenfließgeschwindigkeit und gleichbleibender FKD einhergeht. Wenn aber bei fortschreitender HD das HMV nicht aufrecht erhalten werden kann und somit die Efg sinkt, wie es bei der extremen HD mit HES 200.000 bereits gezeigt worden ist (22), sinkt folglich die Scherrate. Bei gleichbleibender Plasmaviskosität wären somit die Scherkraft und mit ihr die NO Produktion vermindert. Durch die einsetzende Vasokonstriktion würde dann die kapilläre Perfusion sinken (219). Der reduzierte Blutfluss verursacht eine erhöhte Transitzeit der Erythrozyten in den Kapillaren und einen gesteigerten Sauerstoffverlust im arteriellen System durch die Metabolisierung im hochaktiven Endothel und Diffusion in das umgebende Gewebe (123), mit der Folge eines geringeren Sauerstoffangebots in der Mikrozirkulation (218). Ein Anheben der Plasmaviskosität könnte jedoch die Scherkraft zum Zeitpunkt einer bereits sinkenden Scherrate aufrecht

---

erhalten und durch eine anhaltende Vasodilatation zum regulierenden Faktor der FKD werden (222).

#### **4.1.2. Hämodilution mit Hämoglobinlösungen**

Hämoglobinlösungen sollen bei der Hämodilution im Unterschied zu den Kristalloid oder Kolloid basierenden Volumenexpandern nicht nur das zirkulierende Volumen sondern auch die Sauerstofftransportkapazität des Blutes aufrechterhalten. Im Vergleich findet man aber bei den Hämoglobinlösungen trotz des erhöhten Hämoglobingehaltes und somit erhöhter Sauerstofftransportkapazität des Blutes nach erfolgter tiefer Hämodilution im Gegensatz zu den reinen Volumenexpandern einen verminderten Gewebe- $PO_2$  in der Mikrozirkulation (218). Ferner ist nahezu regelmäßig ein Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks im systemischen und pulmonalen Kreislauf zu beobachten (83) (84), basierend auf einer Vasokonstriktion der Arteriolen. Der erhöhte totale periphere Widerstand limitiert zum einen den für die moderate Hämodilution typischen Anstieg des Herzzeitvolumens und führt aufgrund des reduzierten Perfusionsdruckes zu einem verminderten Blutfluss in den Kapillaren (174) (197). Diese Ergebnisse sind typisch für die Vasoaktivität von Hämoglobinlösungen und zeigen, dass eine Steigerung der Sauerstoffkapazität des Blutes bei gleichzeitig eingeschränkter mikrovaskulärer Perfusion keine ausreichende Sauerstoffversorgung des Gewebes zu garantieren vermag.

Neben der höheren Sauerstoffkapazität des Blutes bewirkt das frei im Plasma gelöste Hämoglobin eine Senkung des Diffusionswiderstandes für

---

Sauerstoff (86) (92) zwischen den Erythrozyten und dem Endothel. Dies könnte sich theoretisch positiv auswirken, da bei dieser Senkung die kurzen Transitzeiten der Erythrozyten in den Kapillaren, in Verbindung mit dem hohen Sauerstoffdiffusionswiderstand des Plasmas, die Sauerstoffabgabe an das Gewebe begrenzen. Bei moderater Hämodilution ist dagegen bei Vorliegen von zellfreiem Hb im Plasma durch die gesteigerte Sauerstoffdiffusibilität eine Überoxigenierung in den Arteriolen diskutiert worden, die im übrigen auch durch die aufgrund der Vasokonstriktion verminderten Blutflussgeschwindigkeit und der damit einhergehenden erhöhten Sauerstoffdiffusion aus den Arteriolen abgeleitet werden kann (124). Letztlich kann die Mikrozirkulation durch die Infusion von Hämoglobinlösungen durch deren vasoaktive Eigenschaften nachteilig beeinflusst werden (224).

#### **4.1.3. Vasokonstriktorischer Effekt von Hämoglobinlösungen**

Die Erklärungen vasokonstriktorischer Effekte von Hämoglobinlösungen finden in der Literatur verschiedene Ansätze:

1) Einen möglichen Erklärungsansatz könnten Studien zu Endothelin (ET) liefern. Die zentrale Gabe von ET verursacht eine dosisabhängige Erhöhung des totalen peripheren Widerstandes mit konsekutiver Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP). Neben der Verminderung des Blutflusses in den meisten Organen infolge eines verminderten HMV, führt zentral appliziertes ET zu einer Vasokonstriktion zentraler Gefäße und folglich zu einer enormen Erhöhung des zerebralen Gefäßwiderstandes (69) (71). Der direkte Effekt von ET an vasoaktiven Neuronen sowie die

---

anfängliche Erhöhung mit nachfolgender Senkung des Blutdruckes bei zentraler Gabe von ET lässt auf einen komplexen Mechanismus schließen (69) (71). Eine durch Hämoglobinlösungen induzierte Freisetzung von ET könnte also eine Rolle bei der kardiovaskulären Regulation spielen.

2) Denkbar wäre auch eine direkte Beteiligung adrenerger Mechanismen am Effekt von Hämoglobinlösungen auf den MAP. In einer Studie mit DCLHb (Kommerzielles Pendant zu  $\alpha\alpha$ -Hb) konnte gezeigt werden, dass ein durch  $\alpha$ -Adrenozeptoren vermittelter vasokonstriktorisches Effekt signifikant potenziert werden konnte (70). Dieser Effekt wird auf eine Sensitivierung der  $\alpha$ -Adrenozeptoren zurückgeführt und hat eine Erhöhung des MAP zur Folge. Außer in der erwähnten Studie von Gulati und Rebello (70) sind bisher allerdings keine weiteren Erkenntnisse zu diesem Thema gewonnen worden.

3) Auch  $O_2$  kann durch seine Interaktion mit dem Endothel die Vasoaktivität der Gefäße beeinflussen. Die frühzeitige Freisetzung von Sauerstoff in den Arteriolen ist bei frei im Plasma liegenden Hämoglobinlösungen vermutlich ausgeprägt und im Vergleich zu intraerythrozytärem Hämoglobin deutlich erhöht. Die Arteriolen reagieren auf diesen Reiz mit einer Vasokonstriktion und einer Erhöhung des totalen peripheren Widerstandes (232). Durch chemische Modifikationen am Hämoglobinmolekül wird versucht diesem unerwünschten Effekt vorzubeugen. Dabei wird der  $P_{50}$  erniedrigt und somit die frühzeitige Abgabe des Sauerstoffs vermindert (239). Dadurch werden nicht nur eine Vasokonstriktion, sondern auch ein früher Verbrauch von  $O_2$  in den

---

Arteriolen verhindert, wodurch mehr Sauerstoff die Kapillaren erreichen kann (224).

4) Eine weitere vasoaktiv wirkende Größe ist die Viskosität der Hämoglobinlösungen. Während die Viskosität des Blutes vom Hkt abhängt, ist die Scherkraft am Endothel durch die Plasmaviskosität und die BfG definiert. Die Scherkräfte stimulieren das Endothel zur Produktion vasoaktiver Substanzen, wie das Prostazyklin und NO (17) (115) (219) (222). Bereits bei moderater HD mit Dextran 60 wird die Plasmaviskosität erhöht (157). Da auch die BfG ansteigt, sollten somit die am Endothel wirkenden Scherkräfte in den Arteriolen zunehmen und zu einer vermehrten Freisetzung von NO mit konsekutiver Vasodilation führen, wie sie bereits nach moderater HD gezeigt worden ist (43). Liegt dagegen die Viskosität des verwendeten Blutersatzstoffes niedriger als die Plasmaviskosität (Hamster normal 1,2 cP) wie z.B. im Falle von  $\alpha\alpha$ -Hb (0,9 cP) so kann die Plasmaviskosität nach HD erniedrigt sein. Im Falle einer aufgrund der arteriolen Vasokonstriktion verminderten BfG kommt es somit zu einer Abnahme der Scherkräfte am Endothel und somit potentiell zu einer Vasokonstriktion. Hämoglobinlösungen mit einer hohen Viskosität können die Plasmaviskosität nach moderater HD erhöhen und somit einer Abnahme der Scherkräfte am Endothel entgegenwirken (38) (167), selbst wenn die BfG durch Vasokonstriktion vermindert ist. Ist die Viskosität der Lösung jedoch zu gering und nicht in der Lage die Viskosität des Plasmas zu steigern, kommt es zur Vasokonstriktion mit anschließender Verminderung der mikrovaskulären Perfusion der Organe (219) (222).



5) Der jedoch wahrscheinlichste vasokonstriktorisch wirkende Mechanismus ist das NO-Scavenging. Die Größe des Hämoglobinmoleküls erlaubt es diesem zu extravasieren. Im Vergleich zu O<sub>2</sub> besitzt NO eine vielfach höhere Affinität zu Hämoglobin und geht daher mit diesem bevorzugt eine Bindung ein. Durch die Bindung von NO an das Hämoglobinmolekül entsteht ein NO Mangel im Bereich des Endothel (41)(44). Da NO als Mediator an der glatten Muskulatur der Gefäße die Vasodilatation ermöglicht, geht eine verminderte NO-Konzentration mit einer Vasokonstriktion einher (41)(44). Basierend auf dieser Hypothese wurden polymerisierte und konjugierte Hämoglobine hergestellt, die aufgrund ihrer molekularen Größe nur noch geringfügig extravasieren können und daher das NO-Scavenging vermindern sollten (27). Ein weiterer experimenteller Ansatz ist die genetische Modifikation des Hämoglobinmoleküls am distalen Ende der Häm-Tasche, um die Affinität des NO und somit seine Bindung zu reduzieren (44). Beide Methoden könnten das NO-Scavenging minimieren und somit den vasokonstriktorischen Effekt der Hämoglobinlösungen reduzieren.

#### **4.2. Diskussion der Fragestellung**

Hämoglobinbasierte Sauerstoffträger (HBOC's) könnten in naher Zukunft zusätzlich zur Volumensubstitution aufgrund ihrer Sauerstoff transportierenden Eigenschaften die akute normovolämische Hämodilution optimieren und die Notwendigkeit von Fremdbluttransfusionen weiter reduzieren.

Die vasoaktiven Eigenschaften der Hämoglobinlösungen sind jedoch ein limitierender Faktor für die klinische Anwendung dieser Substanzen und

---

ihre Beseitigung daher von großer Bedeutung. Die Klärung der Frage, ob durch die Konjugation von Hämoglobin mit einem Makromolekül, wie es bei Hb-Dex-BTC der Fall ist, neben der Extravasation zugleich auch eine Vasokonstriktion vermieden werden kann ist daher ein wichtiger Schritt zur Beurteilung der Effekte von HbOC's (24) (27) (143) (146).

Von nicht geringerem Interesse ist der Einfluss der Plasmaviskosität auf die Regulation des Blutflusses und folglich auf die Gewebeoxygenierung. Die Verwendung hochvisköser Hämoglobinlösungen und die Aufrechterhaltung einer normalen Plasmaviskosität während Hämodilution könnte für die Mikrozirkulation und der davon abhängigen Gewebeoxygenierung von Vorteil sein. Die Überprüfung eines vorteilhaften Effektes und das Verständnis der damit verbundenen Mechanismen ist daher von großer Bedeutung (24) (26) (38) (143) (228).

Die vorliegende Arbeit wendet sich diesen speziellen Problemen zu, ohne deren Lösung die Effizienz der Hämoglobinlösungen in der Transfusionsmedizin nicht untersucht werden kann.

### **4.3. Diskussion von Material und Methodik**

#### **Modell**

Die in dieser Studie durchgeführten Untersuchungen wurden am Rückenhautkammermodell des syrischen Hamsters vorgenommen, da der untersuchte Musculus cutaneus maximus histomorphologisch der quergestreifter Muskulatur gleicht (155). Insbesondere entspricht das kapillare Netzwerk mit den parallel verlaufenden Gefäßen, sowie ihren

---

strickleiterartigen Querverbindungen der Angioarchitektur des quergestreiften Muskels. Aufgrund der Einschichtigkeit des kapillären Netzwerkes kann es in seiner zweidimensionalen Struktur mikroskopisch vollständig erfasst werden. Neben dem Kapillarbett können sowohl die zuführenden als auch die ableitenden Gefäße mikroskopisch beurteilt und untersucht werden.

Anhand dieses Gefäßsystems können mikrohämodynamische Parameter sowie das Fließverhalten von Blutzellen am wachen Versuchstier mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie beurteilt werden. Das Gewebe weist auch mehrere Tage nach Kammerimplantation keine Entzündungszeichen, wie extravasierte Blutbestandteile oder eine vermehrte intraluminale Präsenz von Leukozyten auf (155). Untersuchungen sind daher mit diesem Modell über einen längeren Zeitraum möglich.

Das Mikrogefäßsystem kann in verschiedenen Organen intravitalmikroskopisch dargestellt werden, wie unter anderem in der Leber (138), dem Gehirn (194) und dem Darm (118). Vergleichbar stehen zur direkten Visualisierung des Muskelgefäßsystems mehrere Modelle zur Verfügung, zum Beispiel der Tenuissimus-Muskel des Kaninchens (130), der Sartorius-Muskel der Katze (87), der Musculus extensor digitorum longus (55) und der Musculus cremaster der Ratte (94), sowie der Musculus tibialis anterior des Hamsters (36).

Alle diese Modelle können jedoch nur als Akutmodelle verwendet werden und ermöglichen daher eine Untersuchungsdauer von lediglich wenigen Stunden. Weitere Nachteile dieser Modelle sind die erforderliche Anästhesie und das frische chirurgische Trauma vor einer Untersuchung, die

---

möglicherweise die gewonnenen Ergebnisse verzerren oder gar verfälschen können. Sowohl die Anästhesie aufgrund ihrer vasomotorischen Einflüsse, als auch das chirurgische Trauma durch möglichen Vasospasmus der terminalen Arteriolen, können eine verminderte mikrovaskuläre Perfusion zur Folge haben (99) (155).

Ein chronisches Mikrozirkulationsmodell schließt solche durch Anästhesie oder chirurgisches Trauma verursachten Nebenwirkungen aus. Ein solches Modell, bei dem Beobachtungen ohne Verwendung von Narkose über einen längeren Zeitraum möglich sind, ist das von Endrich et al. entwickelte Rückenhautkammermodell des Hamsters (47). Es stehen weiterhin die Rückenhautkammermodelle der Ratte (23) und der Maus (126) zur Verfügung. Gegenüber den beiden anderen Modellen bietet das Hamstermodell den Vorteil, dass sich die zu präparierenden Gewebeschichten leichter voneinander lösen lassen und außerdem transparenter und somit besser beurteilbar sind. Aus den genannten Gründen wurden die hier vorliegenden Untersuchungen am quergestreiften Musculus cutaneus maximus des syrischen Goldhamsters mit Hilfe des Rückenhautkammermodells durchgeführt.

### **Untersuchungstechniken**

Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie hat gegenüber anderen Untersuchungsmethoden zur quantitativen Analyse der Mikrozirkulation den entscheidenden Vorteil, dass die Mikrozirkulation quantitativ und in hoher räumlichen und zeitlicher Auflösung beurteilt werden kann. Diese Art der Untersuchung erlaubt die quantitative Analyse der

---

Mikrohämodynamik, bestehend aus Messung der Blutflussgeschwindigkeit sowie der lokalen mikrovaskulären Gefäßdurchmesser, Messung der intravitalen Zell-Zell-Interaktion, der funktionellen Kapillardichte sowie der Extravasation von FITC-Dextran 150 kD in den perivaskulären Raum.

Bei indirekten Meßmethoden, wie der Mikrosphären-Technik (89) (90) oder der Laser Doppler Flowmetrie (158) (215), kann in der Regel nur die regionale Organdurchblutung, nicht aber die Mikrozirkulation als solche und ihre Untereinheiten beurteilt werden. Ergebnisse, die mit Hilfe der Histologie gewonnen werden, müssen kritisch interpretiert werden, da bei dieser Technik nur der Zustand zu einem bestimmten Zeitpunkt erfasst werden kann und das Verfahren anfällig für Artefakte durch Gewebeentnahme und Aufbereitung ist.

Mit der Einführung neuer quantitativer intravitalmikroskopischer Methoden zur Analyse der Mikrozirkulation (4) (97) (98) (107) und deren Kombination mit Videotechniken (100) (235) (236), ist Videofluoreszenzmikroskopie den integralen Verfahren wie zum Beispiel Mikrosphären-Technik (89) (90) bei bestimmten Fragestellungen klar überlegen. Im Gegensatz zu integrierend messenden Verfahren ist es mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie möglich geworden, kontinuierlich die dynamischen Veränderungen in den einzelnen Gefäßsegmenten sowohl im Hinblick auf die Blutfließgeschwindigkeit als auch auf die lokalen mikrovaskulären Zell-Zell-Interaktion zu untersuchen. Die Messung der Blutflussgeschwindigkeit erfolgte hier mit der Line-Shift-Diagramm-Methode, die eine ideale Kombination aus automatischem und interaktivem Verfahren darstellt. Sie

---

liefert schnell zuverlässige und objektive Messergebnisse und ermöglicht gleichzeitig eine gute Kontrolle und Bewertung der Güte der automatischen Messung (114). Die Bestimmung rollender (Roller) und am Endothel adhärenter Leukozyten (Sticker) in Venolen erfolgt nach in vivo Anfärbung der Zellen mit Rhodamin 6G. Durch die starke Leuchtkraft des Fluoreszenzmarkers und Fokussieren in verschiedenen Ebenen während der Beobachtungszeit ist es möglich, die Anzahl der Leukozyten auch in postkapillaren Venolen mit größerem Durchmesser zuverlässig zu ermitteln. Die intravitale Fluoreszenzmikroskopie erlaubt die Erfassung funktioneller Parameter wie etwa der funktionellen Kapillardichte (FKD) (173) (199) (242) (243) d.h., der Gefäßlänge von mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Fläche, sowie die quantitative Messung der Extravasation von Makromolekülen in das perivaskuläre Interstitium (177) (212). Studien über die Effekte verschiedener Arten des Volumenersatzes bei hämorrhagischem Schock zeigen, dass die FKD als ein Indikator für eine erfolgreiche Therapie im Sinne des Überlebens angesehen werden kann (111) (136) (173) (221). Bei der Analyse der Gefäßdurchmesser ist das Auflösungsvermögen des Mikroskops und des Kamera-Video-Systems von Bedeutung (107). Das in dieser Studie verwendete System bietet ein Auflösungsvermögen von  $1\mu\text{m} \times 1\mu\text{m}$ .

Ein computergesteuerter Mikroskopiertisch ermöglicht die Wiederauffindung der zu Beginn der Experimente ausgesuchten Gefäßsegmente zu den einzelnen Untersuchungszeitpunkten.

---

## 4.4. Diskussion der Ergebnisse

### 4.4.1. Kontrollgruppe (Dextran 60)

Der Abfall von Hkt und Hb kam durch die anfängliche Hämodilution zustande und war erwartungsgemäß signifikant.

Im Gegensatz zu den anderen Gruppen sank der MAP in der Dextran-Gruppe nach stattgefundener Hämodilution (HD) von Anfangs 87 mmHg auf 81 mmHg, blieb dann aber über die restliche Untersuchungsdauer konstant. Dieser Effekt ist bereits in Voruntersuchungen an Ratten (70) (71), sowie an syrischen Goldhamstern beobachtet worden (22) (123). In anderen vergleichbaren Untersuchungen an syrischen Goldhamstern wurden wiederum keine nennenswerten Veränderungen des MAP nach isovolämischer HD mit Dextran 60 beschrieben (174) (175) (176) (222). Der Grund für ein Absinken des MAP nach erfolgter HD ist daher nicht klar ersichtlich. Aufgrund der unterschiedlichen Ergebnisse in der Literatur bei gleicher Spezies dürfte eine speziesspezifische Reaktion eher unwahrscheinlich sein. Das gleiche gilt für mögliche Nebenwirkungen durch Anästhetika. Im Gegensatz zu Studien bei nicht anästhesierten Tieren (174) (175) (176) (222), konnte Kuo et al. eine Senkung des MAP bei syrischen Goldhamstern unter Einwirkung von Narkosemittel zeigen (123). In vorliegender Studie standen die Tiere jedoch nicht unter dem Einfluss eines Anästhetikums. Der Hämatokrit (Hk) des Hamsters ist mit bis zu 53% höher als der anderer Spezies. Untersuchungen an Ratten (202), aber auch an Menschen mit hohen Hk-Werten nach einem Höhengaufenthalt (241) zeigten eine Abnahme des MAP nach Hämodilution und somit ähnliche Veränderungen. Auch Nolte et al.

---

untersuchten syrische Goldhamster im Wachzustand, konnten aber keine Veränderung des MAP registrieren (174) (175) (176). Ein Volumenverlust durch Extravasation könnte ein möglicher Erklärungsansatz sein und würde einen erniedrigten MAP und eine erhöhte HF erklären. In der vorliegenden Studie konnte jedoch keine signifikante Extravasation des Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 150kDa (3.1.4) beobachtet werden. Eine Extravasation von Dextran mit einem Molekulargewicht von 60kDa ist aber nicht ausgeschlossen. Eine versehentliche Hypovolämie durch die für die Blutanalyse entnommene Blutmenge von 0,1 ml bietet aufgrund der geringen Blutabnahmemenge und der anschließenden Volumensubstitution mit dem exakt gleichen Volumen an Kochsalzlösung keine befriedigende Erklärung, zudem die MAP-Werte sowie die Hkt-Werte zu allen späteren Zeitpunkten trotz weiterer Blutabnahmen unverändert blieben. Denkbar wäre jedoch, dass die Geschwindigkeit der Volumensubstitution oder aber eine zu niedrige Temperatur der Kochsalzlösung einen solchen Effekt hätte auslösen können. Der Grund für ein Absinken des MAP nach stattgefunderer HD lässt sich jedoch nicht endgültig klären.

Die tendenziell steigende Herzfrequenz kommt aufgrund des sinkenden MAP zustande und ist eine Folge der systemischen Kompensation des Organismus (152) (156).

Es waren keine signifikanten Veränderungen der arteriellen und venolären Gefäßdurchmesser, der Blutflussgeschwindigkeit und der FKD messbar. Eine Vasodilatation der arteriolären Gefäße wird in Zusammenhang mit einem erniedrigten MAP und einem konstant bleibenden HMV in mehreren Studien



---

beschrieben (52) (151) (241). Andere Untersucher haben bei ähnlichen Studien festgestellt, dass Dextran 60 bei moderater Hämodilution keinen Einfluss auf diese Größen hat (123) (160) (174). Eine arterielle Vasokonstriktion konnte erst bei HD auf einen Hkt von ungefähr 10% (160) (174), sowie bei Einsatz von Narkosemittel beobachtet werden (123) (134) (160).

#### **4.4.2. $\alpha\alpha$ -Hb-Gruppe**

Auch in dieser Gruppe war der Abfall von Hkt und Hb signifikant. Die Werte blieben auch hier nach stattgefundenener Hämodilution über die Gesamtdauer der Versuche konstant.

Der MAP stieg im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant an und ist als direkte oder indirekte Reaktion der Arteriolen auf die Hämoglobinlösung zu sehen. Der vasokonstriktorische Effekt von  $\alpha\alpha$ -Hb beruht, wie bereits unter 4.1.3 beschrieben, auf verschiedenen Faktoren, von denen der  $\alpha$ -adrenerge Effekt und die Folgen geringer Viskosität von  $\alpha\alpha$ -Hb direkt untersucht worden sind (70) (219) (222). Das geringe Molekulargewicht von 64kDa lässt zudem eine Extravasation mit konsekutiv verstärktem NO-Scavenging und daraus folgender Vasokonstriktion vermuten (41).

Im Gegensatz zur Kontrollgruppe sinkt die Herzfrequenz in dieser Gruppe und ist auch hier aufgrund des steigenden MAP als Folge der systemischen Kompensation des Organismus zu deuten (152) (156). Dieser Befund ist mit Ergebnissen von Caron et al. (24) (26) (28) und Nolte et al. (175) vergleichbar. In den genannten Studien wurden bei HD mit  $\alpha\alpha$ -Hb an

---

Kaninchen wie an syrischen Goldhamstern Senkungen der Herzfrequenz in gleichem Maße beobachtet.

Die in diversen Studien beobachteten Veränderungen des arteriolären Gefäßdurchmessers unterscheiden sich sowohl hinsichtlich des Gefäßdurchmessers unter Ausgangsbedingungen als auch hinsichtlich des zeitlichen Verlaufes und bedürfen daher einer genaueren Erklärung. Die Arteriolen werden je nach Größe in A0 - A4 kategorisiert, wobei eine Arteriole nullter Ordnung (A0) einem großen Widerstandsgefäß (ca. 120µm) und eine Arteriole vierter Ordnung (A4) einer präkapillären Arteriole (ca. 10µm) entspricht (160) (218). Die Rückenhautkammer in vorliegender Studie wurde in Anlehnung an die Kammerpräparation nach Endrich et al. implantiert und lässt nur die Beobachtung arteriolärer Gefäße der Kategorie A1 bis A4 zu (47). Bei dieser Art der Präparation ist die Ausfallquote durch Entzündung im Vergleich zum Rückenhautkammermodell nach Sakai et al. (196), das die Möglichkeit zur Beobachtung von Gefäßen der Ordnung A0 - A4 bietet, deutlich geringer. Die am Institut für Chirurgische Forschung seit längerem etablierte Kammerimplantation nach Endrich et al. wurde in zahlreichen Voruntersuchungen zum Thema Hämoglobinlösungen eingesetzt (13) (141) (142) (174) (176) und bietet daher eine größere Zahl an Vergleichswerten.

Im Gegensatz zu den im folgenden Text erwähnten Ergebnissen ähnlicher Untersuchungen von Nolte et al. und Tsai et al. am Rückenhautkammermodell (174) (218), blieben in der  $\alpha\alpha$ -Hb Gruppe sowohl die Gefäßdurchmesser, als auch die Blutflussgeschwindigkeit zu allen Zeitpunkten nahezu konstant und zeigten keine signifikante Veränderung. Die unterschiedlichen

---

Beobachtungen können auf die verschiedenen Präparationstechniken zurückgeführt werden und stehen somit in keinem Widerspruch zueinander. Tsai et al. konnte in Untersuchungen mit der Rückenhautkammer nach Sakai et al. eine Vasokonstriktion nur bei Gefäßen der Größenordnung A0 bis A2 beobachten (197). Studien in der Rückenhautkammer durch Nolte et al. fanden in Anlehnung an die Implantationstechnik nach Endrich et al. statt und konnten zum Zeitpunkt 0 bis 2 min nach HD mit  $\alpha\alpha$ -Hb eine Vasokonstriktion auch für Gefäße der Kategorie A3 - A4 zeigen (174). Daß in vorliegender Studie keine arteriolären Gefäßveränderungen beobachtet wurden, kann an der zeitlich vorgeschalteten Beobachtung der Venolen liegen, während eine Vasokonstriktion präkapillärer Arteriolen in dem relativ kurzen Zeitfenster nicht aufgezeichnet werden konnte.

Ähnlich wie in vergleichbaren Studien fiel die FKD (174), jedoch nicht signifikant. Die FKD ist für die Vasokonstriktion arteriolärer Gefäße ein sensitiver Marker und wird als solcher herangezogen (173). Die niedrige Viskosität von  $\alpha\alpha$ -Hb und die somit nach HD erniedrigte Scherkraft führt zusammen mit dem Scavenging von NO zu einer Vasokonstriktion großer arteriolärer Widerstandsgefäße, und kann sich durch Erhöhung der Nachlast negativ auf das HMV auswirken. Im Gegensatz zu Perfluorokarbonen, die keine systemische Vasokonstriktion hervorrufen und somit ein erhöhtes HMV in Folge einer erhöhten Fluidität bewirken (74) (209), kann nach HD mit Hämoglobinlösungen die Zunahme der Nachlast durch arterioläre Vasokonstriktion das HMV stärker senken, als die erhöhte Fluidität das HMV zu erhöhen vermag (65) (175) (240). Eine durch das niedrige

---

Molekulargewicht von 64kDa stattfindende Extravasation könnte die durch NO-Scavenging vermittelte Vasokonstriktion verstärken (siehe 4.1.3).

Bezüglich Extravasation wurden keine signifikanten Veränderungen gemessen. Die gemessene Extravasation bezieht sich jedoch auf den Fluoreszenzfarbstoff FITC-Dextran mit einem Molekulargewicht von 150kDa (2.4.3), eine Extravasation von  $\alpha\alpha$ -Hb mit einem Molekulargewicht von 64kDa ist somit nicht ausgeschlossen.

#### **4.4.3. Hb-Dex-BTC-Gruppe**

Der Abfall von Hkt und Hb war wie in den beiden Gruppen zuvor erwartungsgemäß signifikant und kam durch die anfängliche Hämodilution zustande.

Der pH-Wert nahm tendenziell ab und zeigte sich zum Zeitpunkt 30 min signifikant erniedrigt. Der pH von Hb-Dex-BTC ist zwar mit 7,24 niedriger als der pH des Blutes, eine Beeinflussung des Gesamt-pH durch HD mit dieser Lösung ist jedoch nicht anzunehmen und in Voruntersuchungen auch bislang nicht gezeigt worden (24) (26). Wahrscheinlicher erscheint eine mögliche Azidose aufgrund respiratorischer Veränderungen nach erfolgter Hämodilution. In direktem Zusammenhang dazu stehen die Werte des  $O_2$ ,  $CO_2$  und  $HCO_3^-$ , über welche der Säure-Base-Haushalt reguliert wird. Die Blutgase  $O_2$  und  $CO_2$  zeigten in ihren mittleren Partialdrücken nach HD mit Hb-Dex-BTC signifikante Veränderungen, wobei der  $pO_2$  sank und der  $pCO_2$  dagegen anstieg. Der  $HCO_3^-$  bleibt konstant und lässt somit auf eine metabolisch kompensierte respiratorische Azidose schließen. Dieses

---

Phänomen ist in Voruntersuchungen mit Hb-Dex-BTC jedoch bisher nicht beschrieben worden (24) (26) und bedarf einer Erklärung. Da die genannten Studien an Kaninchen und vorliegende Studie an syrischen Goldhamstern erfolgte, ist eine speziesspezifische bzw. modellspezifische Reaktion nicht auszuschließen. Hierbei dürften anatomische und methodische Unterschiede eine große Rolle spielen. Denkbar wäre eine vorübergehende Flussumkehr in der Vena brachialis des Hamsters bei Infusion der Lösung in die Vena jugularis. Dies würde bedeuten, dass Hb-Dex-BTC während der HD bei veringertem Blutfluss in der Vena brachialis verweilen würde. Der hyperaggregierende Effekt von Hb-Dex-BTC ist bekannt (1.2) und hat eine Aggregation der Erythrozyten zur Folge, die bei wiederhergestelltem anterograden Blutstrom in der Vena brachialis in die Lunge wandern würden. Diese Aggregate können durch Verschlechterung des Blutflusses (10) (12) und einen prothrombotischen Effekt (116) zur Minderperfusion des Lungengewebes beitragen und den Gasaustausch in der Lunge negativ beeinflussen. Die Konsequenz wäre eine respiratorische Azidose. In den oben genannten Studien von Caron et al. am Kaninchen (24) (26) wurden die Hämoglobinlösungen jeweils über eine Ohrvene infundiert. Bei diesem intravenösen Zugang besteht wahrscheinlich keine Möglichkeit zur Flussumkehr oder retrograden Infusion. Die Infusionsrate bezogen auf das Körpergewicht unterschied sich jedoch nicht von der in unserer Studie verwendeten.

Der MAP stieg signifikant an und war mit dem der aa-Hb Gruppe vergleichbar. Auch hier ist diese Reaktion als ein direkter oder

indirekter vasokonstriktorischer Effekt von Hämoglobinlösungen zu sehen (4.1.3).

Nach abgeschlossener HD mit Hb-Dex-BTC war ein Anstieg des MAP um durchschnittlich 11% zu verzeichnen, vergleichbar mit dem in der  $\alpha\alpha$ -Hb-Gruppe jeweils zu den Zeitpunkten 0 und 30 min. Nach 60 min kehrte der Wert nahezu auf Ausgangsniveau zurück ( $95 \pm 8$  mmHg), wohingegen er mit  $100 \pm 9$  mmHg in der  $\alpha\alpha$ -Hb-Gruppe signifikant erhöht blieb. Dieser Befund deckt sich weitgehend mit vorhergehenden Studien von Caron et al., in denen Kaninchen mit verschiedenen Substanzen, darunter auch  $\alpha\alpha$ -Hb und Hb-Dex-BTC, auf einem Hkt zwischen 24% und 31% hämodiluiert wurden. Nach moderater HD wurden hierbei sowohl nach Blutaustausch mit  $\alpha\alpha$ -Hb als auch mit Hb-Dex-BTC Blutdruckanstiege in gleichem Umfang (9% - 13%) wie in vorliegender Studie gefunden (24) (26) (28).

Scheinbar besitzen daher  $\alpha\alpha$ -Hb und Hb-Dex-BTC die selben vasokonstriktorisches Eigenschaften. Caron et al. konnten im Mesenterium der Ratte nach topload Infusion von Hb-Dex-BTC im Vergleich mit  $\alpha\alpha$ -Hb sogar eine signifikant stärkere Vasokonstriktion feststellen, jedoch nur während der ersten 5 min nach Infusion (27). In dieselbe Richtung gehen Befunde aus den oben zitierten Studien bezüglich des systemisch vaskulären Widerstandes. Dieser stieg nach HD mit  $\alpha\alpha$ -Hb und Hb-Dex-BTC jeweils von  $2,8 \text{ mmHg} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-1}$  auf 4,6 bzw 4,9 gleich stark an (26). Zieht man jedoch die vascular hindrance (vascular hindrance = Systemisch vaskulärer Widerstand / Blutviskosität) heran, so zeigt sich jedoch in derselben Studie ein tendenziell stärkerer Anstieg nach HD mit  $\alpha\alpha$ -Hb (ca.

+100%) im Vergleich zur HD mit Hb-Dex-BTC (+63%) (26). Das unterschiedliche Verhalten der Vascular Hindrance nach HD lässt sich auf eine unterschiedliche Blutviskosität nach HD mit  $\alpha\alpha$ -Hb bzw. Hb-Dex-BTC zurückführen und deutet darauf hin, dass der Strömungswiderstand im Falle von  $\alpha\alpha$ -Hb vornehmlich durch Vasokonstriktion, jedoch im Falle von Hb-Dex-BTC zumindest teilweise auch durch eine relativ erhöhte Blutviskosität hervorgerufen wurde. Direkte Messungen der Blutviskosität in vitro nach HD von Hkt 40% auf Hkt 30% bei unterschiedlichen Scherraten haben nämlich gezeigt, dass dieser Parameter nach HD mit Hb-Dex-BTC (2.15 cP) weniger stark abfällt als nach HD mit autologem Plasma, wohingegen der entsprechende Wert für  $\alpha\alpha$ -Hb (0.99 cP) deutlich unter dem von autologem Plasma liegt (24) (26) (29). In vitro Messungen zufolge lag die Blutviskosität auch in unserer Studie bei einem Hk von 30% nach HD mit Hb-Dex-BTC zumindest bei niedrigen Scherraten deutlich höher als nach HD mit  $\alpha\alpha$ -Hb oder mit Dextran 60.

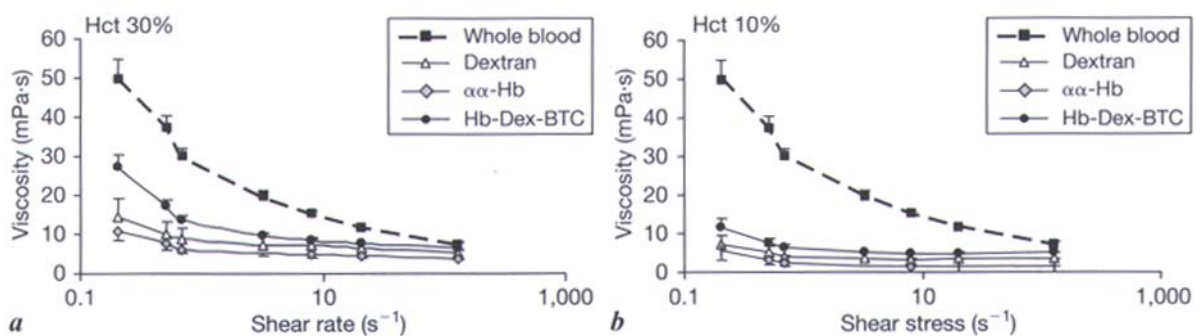


Abb 25: Viskosität von Blut (Hkt 45%) und nach HD bis Hkt von 30% (a) oder 10% (b) mit Dextran,  $\alpha\alpha$ -Hb und Hb-Dex-BTC (n=5). Die Viskosität wurde bei 37% in vitro gemessen für Scherraten von 0,5 bis 128,5 s<sup>-1</sup> und Scherkräften von 0,5 bis 128,5 s<sup>-1</sup> (nach Caron et al., 2004) (29).

---

Wie aus der Graphik ebenfalls ersichtlich ist nähern sich die Werte der Blutviskosität in allen Gruppen bei hohen Scherraten aneinander an was darauf hinweist, dass die nach HD mit Hb-Dex-BTC erhöhte Blutviskosität zum Teil auf den zuvor diskutierten hyperaggregatorischen Effekt dieser Hb-Lösung zurückgeführt werden kann. Tatsächlich konnten Menu et al. eine Korrelation zwischen der Blutviskosität und der Ausprägung des Erythrozyten aggregierenden Effektes einer Lösung zeigen (146). In dieser Studie wurde mit Hb-Dex-BTC im Vergleich zu autologem Plasma oder  $\alpha\alpha$ -Hb eine frühe Aggregation der Erythrozyten bei niedrigen Scherraten erreicht, die nur bei hohen Scherraten dissoziierten. Es kann daher vermutet werden, dass der hyperaggregatorische Effekt und somit auch die erhöhte Blutviskosität nach HD mit Hb-Dex-BTC nur in mikrovaskulären Gefäßen, und hier insbesondere in den Venolen, zum Tragen kommt.

Insgesamt gesehen sind daher die vasokonstriktorisches Eigenschaften von Hb-Dex-BTC im Vergleich zu  $\alpha\alpha$ -Hb vermutlich geringer. Neben einer geringeren Extravasation und der höheren in vitro Viskosität von Hb-Dex-BTC käme auch ein geringeres Scavenging von endotheliale NO als Erklärung in Frage (105). Jia et al. (105) stellten fest, dass durch die chemische Modifikationen im Hb-Dex-BTC die Reaktionsrate von NO mit Oxyhämoglobin von  $18,8 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  in HbA<sub>0</sub> auf  $11,3 \mu\text{M}^{-1}\text{s}^{-1}$  reduziert wird.

Die FKD fiel nach stattgefunderer HD mit Hb-Dex-BTC vergleichbar zu Dextran von Anfangs  $161 \text{ cm/cm}^2$  nicht signifikant auf Mittelwerte um die  $147 \text{ cm/cm}^2$  und blieb bis zum Zeitpunkt 60 min konstant. Dies könnte im Vergleich zur HD mit  $\alpha\alpha$ -Hb, nach der sich bei 60 min tendenziell



niedrigere Werte fanden, in einer geringeren Vasokonstriktion begründet liegen. Durch die höhere Blutviskosität nach HD mit Hb-Dex-BTC im Vergleich zu Dextran und  $\alpha\alpha$ -Hb sind die Scherkraft am Endothel und die damit verbundene NO Produktion im Endothel höher. Dadurch könnte die FKD aufrecht erhalten worden sein. Im Vergleich zu  $\alpha\alpha$ -Hb spielt auch noch das größere Molekulargewicht von Hb-Dex-BTC eine Rolle. Die vermutlich geringere Extravasation und die damit einhergehende vergleichsweise höhere Bioverfügbarkeit von endothelialelem NO könnte der Vasokonstriktion entgegengewirkt haben. Auch die höhere Plasmaviskosität nach HD mit Hb-Dex-BTC und eine Hyperaggregation in den Venolen könnte für einen höheren hydrostatischen Druck in den Kapillaren verantwortlich sein, der prinzipiell einer Aufrechterhaltung der FKD entgegenkommt.

## 5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Studie war es, im tierexperimentellen Modell der Rückenhautkammer am wachen syrischen Goldhamster die Wirkung einer isovolämischen Hämodilution von Hb-Dex-BTC,  $\alpha\alpha$ -Hb und Dextran 60 auf die Mikrozirkulation des Hautmuskels zu untersuchen.

Dazu wurde 21 syrischen Goldhamstern in Narkose eine Rückenhautkammer implantiert und Dauerkatheter in die A. carotis und V. jugularis gelegt. Nach Ablauf einer Erholungsphase von jeweils 2 Tagen wurden die wachen Tiere einer isovolämischen Hämodilution auf einen Hämatokrit von 30% unterzogen. Als Blutersatz wurde 6% Dextran 60,  $\alpha\alpha$ -Hb oder Hb-Dex-BTC verwendet.

Bestimmt wurden die systemischen Kreislaufparameter, die Hämoglobinkonzentration, der Hämatokritwert, Blutgase, Base Excess, Laktatkonzentration, sowie mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie insbesondere die arteriolen und venolen Gefäßdurchmesser, die Extravasation von 150.000 kDa FITC Dextran, die Blutflussgeschwindigkeit in postkapillären Venolen, die Leukozyten-Endothelzell-Interaktion und die funktionelle Kapillardichte als Maß der nutritiven Gewebepfusion.

Es konnte gezeigt werden:

1) Isovolumische Hämodilution mit Dextran 60 beeinflusst die mikrovaskuläre Perfusion in der Rückenhautkammer nicht. Bis auf einen Abfall des mittleren arteriellen Blutdruckes, begleitet von einem Anstieg der Herzfrequenz, finden sich auch bei den übrigen Parametern keine Veränderungen.

2) Der Blutaustausch mit  $\alpha\alpha$ -Hb führt zu einem sofortigen Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes, begleitet von einem Abfall der Herzfrequenz. Nur in dieser Gruppe kommt es nach HD zu einem signifikanten Abfall der venösen Blutflussgeschwindigkeit im Zeitverlauf und nur in dieser Gruppe findet sich eine starke Tendenz zur Abnahme der funktionellen Kapillardichte.

3) Nach Hämodilution mit Hb-Dex-BTC findet sich ebenfalls ein Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes, der sich innerhalb der ersten 30 min nach Abschluss der HD nicht von den Werten in der  $\alpha\alpha$ -Hb Gruppe unterscheidet, nach 60 Minuten jedoch wieder auf Ausgangswerte zurückkehrt. Die Herzfrequenz fällt in dieser Gruppe ebenfalls ab. Eine Abnahme der venösen Blutflussgeschwindigkeit, bzw. eine Tendenz zur Abnahme der funktionellen Kapillardichte wurde jedoch nicht beobachtet.

In der vorliegenden Studie wurden nur geringe Unterschiede zwischen den beiden Hämoglobinlösungen festgestellt, die bei vertiefter Hämodilution eventuell deutlicher zu Tage getreten wären. Bei der isovolämischen Hämodilution ist jedoch derzeit ein Hämatokrit von 30% der klinisch relevante Zielhämatokrit.

Ein Teil des in der Hb-Dex-BTC Gruppe beobachteten Blutdruckanstieges ließe sich auf den infolge der höheren Blutviskosität ebenfalls erhöhten systemischen Gefäßwiderstand zurückführen. Die Gründe für eine im Vergleich zu  $\alpha\alpha$ -Hb verminderte Vasokonstriktion wären somit in der höheren Plasmaviskosität und vermehrten Produktion von endotheliale NO sowie in einem verminderten Scavenging von NO zu suchen. Letzteres lässt sich einerseits auf die chemischen Modifikationen des Hb-Dex-BTC Moleküls selbst sowie andererseits auf die verminderte Extravasation des im Vergleich zu  $\alpha\alpha$ -Hb größeren Moleküls zurückführen.

Ein Vergleich der Effekte von  $\alpha\alpha$ -Hb und Hb-Dex-BTC auf die mikrovaskuläre Perfusion nach extremer Hämodilution muß das Ziel weiterer Studien sein.

---

## 6. Literaturverzeichnis

1. **Alayash, A.I., B.A. Brockner Ryan, L.L McLeod, D.W.Goldman, and R.E. Cashon.** Cell-free hemoglobin and tissue oxidants: Probing the mechanisms of hemoglobin cytotoxicity. *Karger, Tissue Engineering, Blood Substitutes, T.M.S Chang, Volume II*: 157-177, 1997.
2. **Alayash, A.I.** Oxidative mechanisms of hemoglobin-based blood substitutes. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 29: 415-425, 2001.
3. **Amato, A.C., and M. Pescatori.** Effect of perioperative blood transfusions on recurrence of colorectal cancer: meta-analysis stratified on risk factors. *Dis.Colon Rectum* 5: 570-585, 1998.
4. **Arfors, K.E., D. Bergqvist, M. Intaglietta and B. Westergreen.** Measurements of blood flow velocity in the microcirculation. *Ups.J.Med.Sci* 80: 27-33, 1975.
5. **Baldwin, A.L.** Blood substitutes and redox responses in the microcirculation. *Antioxid Redox Signal.* 6: 1019-1030, 2004.
6. **Barbee, K.A., T. Mundel, R. Lal, and P.F. Davies.** Subcellular distribution of shear stress at the surface of flow-aligned and nonaligned endothelial monolayers. *Am J Physiol.* 268:H1765-H1772, 1995.
7. **Barbee, K A.** Role of subcellular shear-stress distributions in endothelial cell mechanotransduction. *Ann Biomed Eng.* 30(4): 472-482, 2002.
8. **Baskurt, O.K., and H.J. Meiselman.** Blood Rheology and Hemodynamics. *Semin Thromb Hemost* 23: 435-450, 2003.
9. **Bell, K., K. Stott, C.J. Sinclair, W.S. Walker, and J.Gillon.** A controlled trial of intraoperative autologous transfusion in cardiothoracic surgery measuring effect on transfusion requirements and clinical outcome. *Transfus.Med.* 2: 295-300, 1992.
10. **Bishop, J.J., P.R. Nance, A.S. Popel, M. Intaglietta and P.C. Johnson.** Effect of erythrocyte aggregation on velocity profiles in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 280: H222-H236, 2001.
11. **Bishop, J.J., A.S. Popel, M. Intaglietta and P.C. Johnson.** Effect of aggregation and shear rate on the dispersion of red blood

cells flowing in venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 283: H1985-H1996, 2002.

12. **Bishop, J.J., P.R. Nance, A.S. Popel, M. Intaglietta and P.C. Johnson.** Relationship between erythrocyte aggregate size and flow rate in skeletal muscle venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 286: H113-H120, 2004.
13. **Botzlar, A., D. Nolte, and K. Messmer.** Effects of ultra-purified polymerized bovine hemoglobin on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster. *Eur.J.Med.Res.* 1:471-478, 1996.
14. **Brecher, M.E., and S.N. Hay.** Bacterial contamination of blood components. *Clin Microbiol Rev.* 18: 195-204, 2005.
15. **Brückner, U.B., F. Kefalianakis, H. Krieter, and K. Messmer.** Organ blood supply and tissue oxygenation after limited normovolemic hemodilution with 3% versus 6% Dextran-60. *Infusionsther.Transfusionsmed.* 20: 130-139, 1993.
16. **Brückner, U.B., and K. Messmer.** Organ blood supply and oxygenation during limited isovolemic hemodilution with 6% HES 200/0.62 and 6% Dextran 70. *Anaesthesist.* 40: 434-440, 1991.
17. **Buga, G.M., M.E. Gold, J.M. Fukuto, and L.J. Ignarro.** Shear stress-induced release of nitric oxide from endothelial cells grown on beads. *Hypertension* 17: 187-193, 1991.
18. **Burlacu, A., V. Jinga, A.V. Gafencu, and M. Simionescu.** Severity of oxidative stress generates different mechanisms of endothelial cell death. *Cell Tissue Res.* 306: 409-416, 2001.
19. **Bush, O.R., W.C. Hop, P.M. Hoynck-van, R.L. Marquet, and J. Jeekel.** Blood transfusions and prognosis in colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.* 328: 1372-1376, 1993.
20. **Busch, M.P., S.A. Glynn, S.L. Stramer, D.M. Strong, S. Caglioti, D.J. Wright, B. Pappalardo, and S.H. Kleinman.** A new strategy for estimating risks of transfusion-transmitted viral infections based on rates of detection of recently infected donors. *Transfusion* 45: 254-264, 2005.
21. **Cabel, M., H.J. Meiselman, A.S. Popel and P.C. Johnson.** Contribution of red blood cell aggregation to venous vascular resistance in skeletal muscle. *Am J Physiol* 272: H1020-H1032, 1997.
22. **Cabrales, P., A.G. Tsai, J.A. Frangos, J.C. Briceno and M. Intaglietta.** Oxygen delivery and consumption in the

- microcirculation after extreme hemodilution with perfluorocarbons. *Am J Physiol* 287: H320-H330, 2004.
23. **Cardon, S.Z., C.F. Oestermeyer, and E.H. Bloch.** Effect of oxygen on cyclic red blood cell flow in unanesthetized mammalian striated muscle as determined by microscopy. *Microvasc.Res.* 2: 67-76, 1970.
  24. **Caron, A., P. Menu, B. Faivre-Fiorina, P. Labrude, A.I. Alayash, and C. Vigneron.** Cardiovascular and hemorheological effects of three modified human hemoglobin solutions in hemodiluted rabbits. *J.Appl.Physiol.* 86: 541-548, 1999.
  25. **Caron, A., P. Menu, B. Faivre-Fiorina, P. Labrude, and C. Vigneron.** The Effects of stroma-free and dextran-conjugated hemoglobin on hemodynamics and carotid blood flow in hemorrhaged guinea pigs. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech* 27: 49-64, 1999.
  26. **Caron, A., P. Menu, B. Faivre-Fiorina, P. Labrude, A.I. Alayash, and C. Vigneron.** Systemic and renal hemodynamics after moderate hemodilution with HbOC's in anesthetized rabbits. *Am.J.Physiol.Heart Circ.Physiol.* 278: H1974-H1983, 2000.
  27. **Caron, A., E. Malfatti, O. Aguejouf, B. Faivre-Fiorina, and P. Menu.** Vasoconstrictive response of rat mesenteric arterioles following infusion of cross-linked, polymerized, and conjugated hemoglobin solutions. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech* 29: 19-30, 2001.
  28. **Caron, A., J.-C. Mayer, P.Menu, A. Alayash, P.-Y. Marie and C. Vigneron.** Measurement of blood volume after haemodilution with haemoglobin-based oxygen carriers by a radiolabelled-albumin method. *Tranfusion Medicine* 11: 433-442, 2001
  29. **Caron, A., J. Hutter, P. Menu and K. Messmer.** Dextran-Conjugated Hemoglobin does not alter microcirculatory parameters after moderate hemodilution. *Prog Appl Microcirc.: Messmer K., Burhop K.E., Hutter J. (eds): Basel, Karger; Vol 25: 27-38, 2004.*
  30. **Chang, T.M.S.** Modified hemoglobin blood substitutes: present status and future perspectives. *Biotechnol.Annu.Rev.* 4: 75-112, 1998.
  31. **Chien, S., and K.-M. Jan.** Red cell aggregation by macromolecules: roles of surface adsorption and electrostatic repulsion. *J.Supramol.Struct.* 12: 385-409, 1973.

- 
32. **Cregan, P., E. Donegan, and G. Gotelli.** Hemolytic transfusion reaction following transfusion of frozen and washed autologous red cells. *Transfusion* 31: 172-175, 1991.
  33. **D'Agnillo, F., and A.I. Alayash.** Site-specific modifications and toxicity of blood substitutes. The case of diaspirin cross-linked hemoglobin. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 40: 199-212, 2000.
  34. **D'Agnillo, F., and A.I. Alayash.** A role for the myoglobin redox cycle in the induction of endothelial cell apoptosis. *Free Radic Biol Med.* 33: 1153-1164, 2002.
  35. **Dai, B., L. Wang, G. Djajani, and C.D. Mazer.** Continuous and discontinuous cell-washing autotransfusion systems. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 18: 210-217, 2004.
  36. **Damon, D.H., and B.R. Duling.** Are physiological changes in capillary tube hematocrit related to alterations in capillary perfusion heterogeneity? *Int. J. Microcirc.: Clin. Exp.* 6: 309-319, 1987.
  37. **Desmond, M.J., M.J.G. Thomas, J. Gillon, and M.A. Fox.** Consensus conference on autologous transfusion. Perioperative red cell salvage. *Transfusion* 36: 644-651, 1996.
  38. **deWit, C., C. Schäfer, B.P. von, S.S. Bolz, and U. Pohl.** Elevation of plasma viscosity induces sustained NO-mediated dilation in the hamster cremaster microcirculation in vivo. *Pflügers Arch.* 434: 354-361, 1997.
  39. **Dietz, N.M., M.J. Joyner, and M.A. Warner.** Blood Substitutes: Fluids, Drugs or Miracle Solutions? *Anesth. Analg.* 82: 390-405, 1996.
  40. **Dodd, R.Y.** Current viral risks of blood and blood products. *Ann Med* 32: 469-474, 2000.
  41. **Doherty, D.H., M.P. Doyle, S.R. Curry, R.J. Vali, T.J. Fattor, J.S. Olson, and D.D. Lemon.** Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat. Biotechnol.* 16: 672-676, 1998.
  42. **Dorman, S.C., C.F. Kenny, L. Miller, R.E. Hirsch, and J.P. Harrington.** Role of redox potential of hemoglobin-based oxygen carriers on methemoglobin reduction by plasma components. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 30: 39-51, 2001.



- 
43. **Doss, D.N., F.G. Estafanous, C.M. Ferrario, J.M. Brum, and P.A. Murray.** Mechanism of systemic vasodilation during normovolemic hemodilution. *Anaesth.Analg.* 81: 30-34, 1995.
  44. **Doyle, M.P., I. Apostol, and B.A. Kerwin.** Glutaraldehyde modification of recombinant human hemoglobin alters its hemodynamic properties. *J.Biol.Chem.* 274: 2583-2591, 1999.
  45. **Duling, B.R., and R.M. Berne.** Longitudinal gradients in periarteriolar oxygen tension. A possible mechanism for the participation of oxygen in local regulation of blood flow. *Circ.Res.* 27: 669-678, 1970.
  46. **Edna, T.H., and T. Bjerkeset.** Perioperative blood transfusions reduce long-term survival following surgery for colorectal cancer. *Dis.Colon Rectum* 4: 451-459, 1998.
  47. **Endrich, B., K. Asaishi, A. Götz, and K. Messmer.** Technical report - a new chamber technique for microvascular study in unanesthetized hamster. *Res.Exp.Med.* 177: 125-134, 1980.
  48. **Faivre, B., P. Menu, P. Labrude, M. Grandgeorge, and C. Vigneron.** A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. II. Physicochemical and physiological assessments. Preliminary results on guinea pig. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech.* 20: 597-600, 1992.
  49. **Faivre, B., P. Menu, P. Labrude, M. Grandgeorge, and C. Vigneron.** Methemoglobin formation after administration of hemoglobin conjugated to carboxylate dextran in guinea pigs. Attempts to prevent the oxidation of hemoglobin. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech.* 22: 551-558, 1994.
  50. **Faivre, B., V. Labaeye, P. Menu, P. Labrude, and C. Vigneron.** Assessment of dextran 10-benzene-tetracarboxylate-hemoglobin, an oxygen carrier, using guinea pig isolated bowel model. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech.* 23: 495-504, 1995.
  51. **Faivre-Fiorina, B., A. Caron, C. Fassot, I. Fries, P. Menu, P. Labrude and C. Vigneron.** Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs. *Am. J. Physiol.* 276: H766-H770, 1999.
  52. **Fan, F.C., R.Y. Chen, G.B. Schuessler, and S. Chien.** Effects of hematocrit variations on regional hemodynamics and oxygen transport in the dog. *Am.J.Physiol.* 238: H545-H552, 1980.

- 
53. **Farrugia, A.** Risk of variant Creutzfeldt-Jakob disease from factor concentrates: current perspectives. *Haemophilia*. 8: 230-235, 2002.
  54. **Fischer, S.R., M. Burnet, D.L. Traber, D.S. Prough, and G.C. Kramer.** Plasma volume expansion with solutions of hemoglobin, albumin, and Ringer lactate in sheep. *Am J Physiol*. 276: H2194-H2203, 1999.
  55. **Forbes, T.L., M. Carson, K.A. Haris, G. DeRose, W.G. Jamieson, and R.F. Potter.** Skeletal muscle injury induced by ischemia-reperfusion. *Can.J.Surg*. 38: 56-63, 1995.
  56. **Frangos, J.A., S.G. Eskin, L.V. McIntire, and C.L. Ives.** Flow effects on prostacyclin production by cultured human endothelial cells. *Science* 227: 1477-1479, 1985.
  57. **Fratantoni, J.C.** Points to consider on efficacy evaluation of hemoglobin- and perfluorocarbon-based oxygen carriers. *Transfusion* 34: 712-713, 1994.
  58. **Gillon, J., M.J. Thomas, and M.J. Desmond.** Consensus conference on autologous transfusion. Acute normovolaemic haemodilution. *Transfusion* 36: 640-643, 1996.
  59. **Giordano, G.F., D.M. Giordano, B.A. Wallace, K.M. Giordano, R.S. Prust, and S.G. Sandler.** An analysis of 9.918 consecutive perioperative autotransfusions. *Surg.Gynecol.Obstet*. 176: 103-110, 1993.
  60. **Glück, D., K. Kubanek, C. Maurer, and N. Petersen.** Seroconversion of HIV, HCV, and HBV in blood donors in 1996-risk of virus transmission by blood products in Germany. *Infusionsther.Transfusionsmed*. 25: 82-84, 1998.
  61. **Glynn, S.A., S.H. Kleinmann, G.B. Schreiber, M.P. Bush, D.J. Wright, J.W. Smith, C.C. Nass, and A.E. William.** Trends in incidence and prevalence of major transfusion-transmissible viral infections in US blood donors, 1991 to 1996. Retrovirus Epidemiology Donor Study (REDS). *JAMA* 284: 238-240, 2000.
  62. **Goodnough, L.T., M.E. Brechner, M.H. Kanter, and J.P. AuBuchon.** Transfusion medicine. First of two parts. Blood transfusion. *N.Engl.J.Med*. 340: 438-447, 1999.
  63. **Goodnough, L.T.** Risks of blood transfusion. *Crit Care Med*. 31: S678-S686, 2003.

- 
64. **Goodnough, L.T.** Autologous blood donation. *Crit Care.* 8: S49-52, 2004.
65. **Gould, S.A., L.R. Sehgal, A.L. Rosen, H.L. Sehgal and G.S. Moss.** The efficacy of polymerized pyridoxylated hemoglobin solutions as an O<sub>2</sub> carrier. *Ann Surg.* 211: 394-398, 1990.
66. **Gould, S.A., L.R. Sehgal, H.L. Sehgal, R. DeWoskin, and G.S. Moss.** The clinical development of human polymerised hemoglobin. *Karger, Tissue Engineering, Blood Substitutes, T.M.S Chang, Volume II:* 12-38, 1997.
67. **Grant, L.** The sticking and emigration of white blood cells in inflammation. In Grant, L., B.W. Zweifach, R.T. McCluskey (Eds.): "The Inflammatory Process", 2: 3-46, *Academic Press, New York*, 1973.
68. **Groebe, K. and G. Thews.** Basic mechanisms of diffusive and diffusion-related oxygen transport in biological systems: a review. *Adv.Exp.Biol.* 317: 21-33, 1992.
69. **Gulati, A., A. Kumar, S. Morrison and B.T. Shahani.** Effect of centrally administered endothelin agonists on systemic and regional blood circulation in the rat: role of sympathetic nervous system. *Neuropeptides.* 31: 301-309, 1997.
70. **Gulati, A. and S. Rebello.** Role of adrenergic mechanisms in the pressor effect of diaspirin cross-linked hemoglobin. *J.Lab.Clin.Med.* 124: 125-133, 1994.
71. **Gulati, A., A.P. Sen, A.C. Sharma and G. Singh.** Role of ET and NO in resuscitative effect of diaspirin cross-linked hemoglobin after hemorrhage in rat. *Am.J.Physiol.* 273: H827-H836, 1997.
72. **Gustafsson, L., L. Appelgren and H.E. Myrvold.** Effects of increased plasma viscosity and red blood cell aggregation on blood viscosity in vivo, *Am J Physiol* 241: H513-H518, 1981.
73. **Habler, O. and K. Messmer.** Methods for reduction of homologous blood transfusions in operative medicine. *Anaesthesist* 46: 915-926, 1997.
74. **Habler, O.P., M.S. Kleen, J.W. Hutter, A.H. Podtschaske, M. Tiede, G.I. Kemming, M.V. Welte, C.O. Corso, S. Batra, P.E. Keipert, N.S. Faithfull, and K.F. Messmer.** Effects of hyperoxic ventilation on hemodilution-induced changes in anesthetized dogs. *Transfusion* 38: 135-44, 1998.

- 
75. **Habler, O. and K. Messmer.** Hyperoxaemia in extreme haemodilution. *Br.J.Anaesth.* 81 Suppl 1: 79-82, 1998.
76. **Habler, O.P. and K.F. Messmer.** Tissue perfusion and oxygenation with blood substitutes. *Adv.Drug.Deliv.Rev.* 40: 171-184, 2000.
77. **Habler, O., M. Kleen, G. Kemming, and B. Zwissler.** Hyperoxia in extreme hemodilution. *Eur Surg Res.* 34: 181-187, 2002.
78. **Haney, C.R., P.W. Buehler, and A. Gulati.** Purification and chemical modifications of hemoglobin in developing hemoglobin based oxygen carriers. *Adv.Drug.Deliv.Rev.* 40: 153-169, 2000.
79. **Harrington, J.P., Y. Gonzalez, and R.E. Hirsch.** Redox concerns in the use of acellular hemoglobin-based therapeutic oxygen carriers: the role of plasma components. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 28: 477-492, 2000.
80. **Harris, A.G., R. Leiderer, F. Peer, and K. Messmer.** Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am.J.Physiol.* 71: 2388-2398, 1996.
81. **Harris, A.G., R. Hecht, F. Peer, D. Nolte, and K. Messmer.** An improved intravital microscopy system. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 17: 322-327, 1997.
82. **Heiss, M.M, W. Mempel, C. Delanoff, K.W. Jauch, C. Gabka, M. Mempel, H.J. Dieterich, H.J. Eissner, and F.W. Schildberg.** Blood transfusion-modulated tumor recurrence: first results of a randomized study of autologous versus allogeneic blood transfusions in colorectal cancer surgery. *J.Clin.Oncol.* 12: 1859-1867, 1994.
83. **Hess, J.R., V.W. MacDonald and W.W. Brinkley.** Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol* 74: 1769-1778, 1993.
84. **Hess, J.R., V.W. MacDonald, C.S. Gomez and V Coppes.** Increased vascular resistance with hemoglobin-based oxygen carriers. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22: 361-372, 1994.
85. **Hess, J.R., and M.J.G. Thomas.** Blood use in war and disaster: lessons from the past century. *Transfusion* 43: 1622-1633, 2003.
86. **Hellums, J.D.** The resistance to oxygen transport in the capillaries relative to that in the surrounding tissue. *Microvasc.Res.* 13: 131-136, 1977.

- 
87. **Henrich, H., and P.C. Johnson.** Influence of hematocrit in post-ischemic kidney damage. *Am.J.Physiol.* 234: H352-H360, 1978.
  88. **Hermann, K.S.** Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran. *Microvasc.Res.* 26: 238-249, 1983.
  89. **Heymann, M.A., B.D. Payne, J.I. Hoffmann, and A.M. Rudolph.** Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog.Cardiovasc.Dis.* 20: 55-79, 1977.
  90. **Hoffmann, J.I., M.A. Heymann, A.M. Rudolph, and B.D. Payne.** Uses and abuses of the radioactive microsphere method of measuring regional blood flow. *Bibl.Anat.* 15: 20-23, 1977.
  91. **Holt, S., H. Donaldson, G. Hazlehurst, Z. Varghese, M. Contreras, E. Kingdon, P. Sweny, and A. Burns.** Acute transplant rejection induced by blood transfusion reaction to the Kidd blood group system. *Nephrol Dial Transplant.* 19: 2403-2406, 2004.
  92. **Homer, L.D., P.K. Weathersby, and L.A. Kiesow.** Oxygen gradients between red blood cells in the microcirculation. *Microvasc.Res.* 22: 308-323, 1981.
  93. **Hoots, W.K., C. Abrams, and D. Tankersleydagger.** The impact of Creutzfeldt-Jakob disease and variant Creutzfeldt-Jakob disease on plasma safety. *Transfus.Med.Rev.* 15: 45-59, 2001.
  94. **Hutchins, P.M., R.F. Bond, and H.D. Green.** Participation of oxygen in the local control of skeletal muscle microvasculature. *Circ.Res.* 34: 85-93, 1974.
  95. **Intaglietta, M.** Microcirculatory effects of hemodilution: background and analysis. In: *The role of hemodilution in optimal patient care*, edited by R.F. Tuma, J.V. White, and K. Messmer. München: *Zuckschwerdt Verlag*, p. 21-41, 1989.
  96. **Intaglietta, M., P.C. Johnson, and R.M. Winslow.** Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc.Res.* 32: 632-643, 1996.
  97. **Intaglietta, M., W.R. Tompkins and D.R. Richardson.** Velocity measurements in the microvasculature of the cat omentum by on-line method. *Microvasc.Res.* 2: 462-473, 1970.
  98. **Intaglietta, M., and W.R. Tompkins.** Microvascular measurements by video image shearing and splitting. *Microvasc.Res.* 5: 309-312, 1973.

- 
99. **Intaglietta, M., and K. Messmer.** Microangiodynamics, peripheral vascular resistance and the normal microcirculation. *Int.J.Microcirc.: Clin.Exp.* 2: 3-10, 1983.
100. **Intaglietta, M., N.R. Silverman, and W.R. Tompkins.** Capillary flow velocity measurements in vivo and in situ by television method. *Microvasc.Res.* 10: 165-179, 1975.
101. **Intaglietta, M.** Microcirculatory basis for the design of artificial blood. *Microcirculation.* 6: 247-258, 1999.
102. **Jeney, V., J. Balla, A. Yachie, Z. Varga, G.M. Vercellotti, J.W. Eaton, and G. Balla.** Pro-oxidant and cytotoxic effects of circulating heme. *Blood* 100: 879-887, 2002.
103. **Jensen, L.S., E. Puho, L. Pedersen, F.V. Mortensen, and H.T. Sorensen.** Long-term survival after colorectal surgery associated with buffy-coat-poor and leucocyte-depleted blood transfusion: a follow-up study. *Lancet* 365(9460): 681-682, 2005.
104. **Jesch, F., B. Endrich, and K. Messmer.** Oxygen transport and hemodynamics of stroma-free hemoglobin solutions. *Adv.Exp.Med.Biol.* 75: 105-112, 1976.
105. **Jia, Y., F. Wood, P. Menu, B. Faivre, A. Caron, and A.I. Alayash.** Oxygen binding and oxidation reactions of human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran. *Biochim Biophys Acta.* 1672: 164-173, 2004.
106. **Johnson, P.C.** Autoregulation of blood flow. *Circ.Res.* 59: 483-495, 1986.
107. **Johnson, P.C.** Measurements of microvascular dimensions in vivo. *J.Appl.Physiol.* 23: 593-596, 1967.
108. **Jones, J.A.** Red blood cell substitutes: current status. *Br.J.Anaesth.* 1995, 74: 697-703, 1995.
109. **Karpinski, M., D. Pochinco, I. Dembinski, W. Laidlaw, J. Zacharias, and P. Nickerson.** Leukocyte reduction of red blood cell transfusions does not decrease allosensitization rates in potential kidney transplant candidates. *J Am Soc Nephrol.* 15: 818-824, 2004.
110. **Kemming, G.I., F.G. Meisner, M. Kleen, J.M. Meier, J. Tillmanns, J.W. Hutter, C.J. Wojtczyk, K.B. Packert, D. Bottino, and**

- O.P. **Habler**. Hyperoxic ventilation at the critical haematocrit. *Resuscitation*. 56: 289-297, 2003.
111. **Kerger, H., D.J. Saltzman, M.D. Menger, K. Messmer and M. Intaglietta**. Systemic and subcutaneous microvascular pO<sub>2</sub> dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am J Physiol* 270: H827-836, 1996.
112. **Kim, S., A.S. Popel, M. Intaglietta and P.C. Johnson**. Aggregate formation of erythrocytes in postcapillary venules. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 288: H584-H590, 2005.
113. **Klein, H.G.** Allogeneic transfusion risks in the surgical patient. *Am.J.Surg.* 170: 21S-26S, 1995.
114. **Klyscz, T., M. Jünger, F. Jung, and H. Zeintl**. Cap image - a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy. *Biomed.Tech.Berl.* 42: 168-175, 1997.
115. **Koller, A., D. Sun, and G. Kaley**. Role of shear stress and endothelial prostaglandins in flow- and viscosity-induced dilation of arterioles in vitro. *Circ.Res.* 72: 1276-1284, 1993.
116. **Koller, A., and G. Kaley**. Shear stress dependent regulation of vascular resistance in health and disease: role of endothelium. *Endothelium* 4: 247-272, 1996.
117. **Koller, A., and G. Kaley**. Shear stress induced dilation of arterioles. *Am. J. Physiol.* 274: H382-383, 1998.
118. **Koo, A., and F.W. Leung**. Microcirculation of the colon: Macromolecular permeability and loss of endothelial viability in experimental colitis in rats. *Prog.Appl.Microcirc.* 17: 90-100, 1990.
119. **Kooby, D.A., J. Stockman, L. Ben-Porat, M. Gonen, W.R. Jarnagin, R.P. Dematteo, S. Tuorto, D. Wuest, L.H. Blumgart, and Y. Fong**. Influence of transfusions on perioperative and long-term outcome in patients following hepatic resection for colorectal metastases. *Ann Surg.* 237: 860-879, 2003.
120. **Kreimeier, U. and K. Messmer**. Hemodilution in clinical surgery: state of the art 1996. *World J.Surg.* 20: 1208-1217, 1996.
121. **Kreimeier, U. and K. Messmer**. Perioperative hemodilution. *Transfus Apheresis Sci.* 27: 59-72, 2002.

- 
122. **Krieter, H., U.B. Brückner, F. Kefalianakis, and K. Messmer.** Does colloid-induced plasma hyperviscosity in haemodilution jeopardize perfusion and oxygenation of vital organs? *Acta Anaesthesiol.Scand.* 39: 236-244, 1995.
123. **Kuo, L. and R.N. Pittman.** Effect of hemodilution on oxygen transport in arteriolar networks of hamster striated muscle. *Am.J.Physiol.* 254: H331-H339, 1988.
124. **Kuo, L. and R.N. Pittman.** Influence of hemoconcentration on arteriolar oxygen transport in hamster striated muscle. *Am.J.Physiol.* 259: H1694-H1702, 1990.
125. **Kwapisz, M.M., G. Dietrich, H. Viehl, and G. Hempelmann.** Risk factors and frequency of adverse effects after autologous blood donation. *Anaesthesist* 47: 644-650, 1998.
126. **Lehr, H.A., M. Leunig, M.D. Menger, and K. Messmer.** Dorsal skinfold chamber technique for intravital microscopy in nude mice. *Am.J.Pathol.* 143: 1055-1062, 1993.
127. **Lin, L., D.N. Cook, and G.P. Wiesenbahn.** Photochemical inactivation of viruses and bacteria in platelet concentrates by use of a novel psoralen and long-wavelength ultraviolet light. *Transfusion* 37: 423-435, 1997.
128. **Lindbom, L., S. Mirhashemi, M. Intaglietta, and K.E. Arfors.** Increase in capillary blood flow and relative haematocrit in rabbit skeletal muscle following acute normovolaemic anaemia. *Acta Physiol.Scand.* 134: 503-512, 1988.
129. **Lindbom, L., S. Mirhashemi, K.E. Arfors, and M. Intaglietta.** Blood flow and hematocrit distribution in response to acute normovolaemic hemodilution. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 5: 278, 1986.
130. **Lindbom, L., R.F. Tuma, and K.E. Arfors.** Influence of oxygen on perfused capillary density and capillary red cell velocity in rabbit skeletal muscle. *Microvasc.Res.* 19: 197-208, 1980.
131. **Linden, J.V., and M.S. Kruskall.** Autologous blood: always safer? *Transfusion* 37: 455-456, 1997.
132. **Linden, J.V., M.A. Tourault, and C.L. Scribner.** Decrease in frequency of transfusion fatalities. *Transfusion* 37: 243-244, 1997.



- 
133. **Linden, J.V., K. Wagner, A.E. Voytovich, and J. Sheehan.** Transfusion errors in New York State: an analysis of 10 years experience. *Transfusion* 40: 1207-1213, 2000.
134. **Lipowsky, H.H. and J.C. Firrell.** Microvascular hemodynamics during systemic hemodilution and hemoconcentration. *Am.J.Physiol.* 250: H908-H922, 1986.
135. **Llewelyn, C.A., P.E. Hewitt, R.S. Knight, K. Amar, S. Cousens, J. Mackenzie, and R.G. Will.** Possible transmission of variant Creutzfeldt-Jakob disease by blood transfusion. *Lancet* 363: 417-421, 2004.
136. **Loeb, A.L., L.J. McIntosh, N.R. Raj, and D.E. Longnecker.** Resuscitation after hemorrhage using recombinant human hemoglobin (rHb1.1) in rats: effects on nitric oxide and prostanoid systems. *Crit.Care Med.* 26: 1071-1080, 1998.
137. **Loeb, A.L., L.J. McIntosh, N.R. Raj, and D.E. Longnecker.** Regional vascular effects of rHb1.1, a hemoglobin-based oxygen carrier. *J.Cardiovasc.Pharmacol.* 30: 703-710, 1997.
138. **McCuskey, R.S.** A dynamic and static study of hepatic arterioles and hepatic sphincters. *Am.J.Anat.* 119: 455-478, 1966.
139. **Meier, J., G.I. Kemming, H. Kisch-Wedel, S. Wolkhammer, and O.P. Habler.** Hyperoxic ventilation reduces 6-hour mortality at the critical hemoglobin concentration. *Anesthesiology.* 100:70-76, 2004.
140. **Mempel, W.** Current focus: blood transfusion. Risks and problems in blood transfusion. *Zentralbl.Chir.* 118: 563-566, 1993.
141. **Menger, M.D., D. Steiner, and K. Messmer.** Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated skin muscle: significance of no reflow. *Am.J.Physiol.* 263: H1892-1900, 1992.
142. **Menger, M.D., F.U. Sack, J.H. Barker, G. Feifel, and K. Messmer.** Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. *Res.Exp.Med.* 188: 151-165, 1988.
143. **Menu, P., W. Bleeker, D. Logrois, A. Caron, B. Faivre-Fiona, S. Muller, P. Labrude, and J.F. Stoltz.** In vivo effects of Hb solutions on blood viscosity and rheologic behavior of RBCs: comparison with clinically used volume expanders. *Transfusion* 40: 1095-1103, 2000.

- 
144. **Menu, P., A. Caron, B Faivre-Fiona, and J.F. Stoltz.** Potential effects of hemoglobin solutions on blood components. *Transfusion* 39: 226-227, 1999.
145. **Menu, P., B Faivre-Fiona, P Labrude, P. Riffard, M. Grandgeorge, and C. Vigneron.** Human hemoglobin conjugated to carboxylate dextran as a potential red blood cell substitute. II. Pharmacotoxicological evaluation. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech* 22: 543-549, 1994.
146. **Menu, P., D Logrois, B Faivre-Fiona, M. Donner, P Labrude, J.F. Stoltz, and C. Vigneron.** Rheological behaviour of red blood cells suspended in hemoglobin solutions. In vitro study comparing dextran-benzene-tetra-carboxylate-hemoglobin, stroma free hemoglobin and plasma expanders. *Transf.Sci.* 20: 5-16, 1999.
147. **Menu, P., M. Donner, B Faivre, , P Labrude, and C. Vigneron.** In vitro effects of dextran-benzene-tetra-carboxylate hemoglobin on human blood rheological properties. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech.* 23: 319-330, 1995.
148. **Messmer, K.** Basic surgical research. *Langengeck's Arch.Surg.* 383: 297-299, 1998.
149. **Meßmer, K., and F. Krombach.** Mikrozirkulationsforschung in der experimentellen Chirurgie. *Chirurg* 69: 333-338, 1998.
150. **Messmer, K., D.H. Lewis, L. Sunder-Plassmann, W.P. Klövekorn, N. Mendler, and K. Holper.** Acute normovolemic hemodilution. Changes of central hemodynamics and microcirculatory flow in skeletal muscle. *Eur.Surg.Res.* 4: 55-70, 1972.
151. **Messmer, K., D.H. Lewis, L. Sunder-Plassmann, W.P. Klövekorn, and K. Holper.** Circulatory significance of hemodilution: rheological changes and limitations. *Adv.Microcirc.* 4: 1-77, 1972.
152. **Messmer, K., L. Sunder-Plassmann, F. Jesch, L. Görnandt, E. Sinagowitz, and M Kessler.** Oxygen supply to the tissues during limited normovolemic hemodiution. *Res.Exp.Med.Berl.* 159: 152-166, 1973.
153. **Messmer, K.** Oxygen-carrying blood substitutes. *Int.Anesthesiol.Clin.* 21: 137-154, 1983.
154. **Messmer, K., M. Kessler, B.A. Krumme, J. Hoper, R. Strehlau, D. Briggs, P. Schmiedeck and R. Spetzler.** Proceedings: Microcirculatory changes during normovolemic hemodilution. *Arzneimittelforschung.* 25: 1670, 1975.

- 
155. **Messmer, K., W. Funk, B. Endrich, and H. Zeintl.** The perspectives of new methods in microcirculation research. *Prog.Appl.Microcirc.* 6: 77-90, 1984.
156. **Messmer, K.** Acute preoperative hemodilution: physiological basis and clinical application. *The role of hemodilution in optimal patient care, edited by R.F. Tuma, J.V. White, and K. Messmer. München: Zuckschwerdt Verlag, p. 54-73, 1989.*
157. **Messmer, K., L. Sunder-Plassman, W.P. Klöverkorn and K. Holper.** Circulatory significance of hemodilution: Rheological changes and limitations. In: *Adv. Microcirc.*, ed. H. Harders. Karger, Basel, Schweiz. 4: 1-77, 1972.
158. **Micheels, J., B. Alsbjorn and B. Sorensen.** Laser doppler flowmetry. A new non-invasive measurement of microcirculation in intensive care? *Resuscitation* 12: 31-39, 1984.
159. **Migita, R., A. Gonzales, M.L. Gonzales, K.D. Vandergriff, and R.M. Winslow.** Blood volume and cardiac index in rats after exchange transfusion with hemoglobin-based oxygen carriers. *J. Appl. Physiol.* 82: 1995-2002, 1997.
160. **Mirhashemi, S., G.A. Breit, C.R. Chavez, and M. Intaglietta.** Effects of hemodilution on skin microcirculation. *Am.J.Physiol.* 254: H411-H416, 1988.
161. **Miyata, S., T. Kawai, S. Yamamoto, Y. Iwatani, O. Uchida, H. Imanaka, K. Sase, T. Yagihara, and M. Kuro.** Network computer-assisted transfusion-management system for accurate blood component-recipient identification at the bedside. *Transfusion* 44: 364-372, 2004.
162. **Monk, T.G., L.T. Goodnough, J.D. Birkmeyer, M.E. Brecher, and W.J. Catalona.** Acute normovolemic hemodilution is a cost-effective alternative to preoperative autologous blood donation by patients undergoing radical retropubic prostatectomy. *Transfusion* 35: 559-565, 1995.
163. **Monk, T.G., L.T. Goodnough, M.E. Brecher, J.W. Colberg, G.L. Andriole, and W.J. Catalona.** A prospective randomized comparison of three blood conservation strategies for radical prostatectomy. *Anesthesiology.* 91: 24-33, 1999.
164. **Monk, T.G., L.T. Goodnough, M.E. Brecher, D.D. Pulley, J.W. Colberg, G.L. Andriole, and W.J. Catalona.** Acute normovolemic hemodilution can replace preoperative autologous blood donation as a standard of care for autologous blood

- procurement in radical prostatectomy. *Anesth Analg.* 85: 953-958, 1997.
165. **Motterlini, R., R. Foresti, and K. Vandegriff.** Oxidative-stress response in vascular endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions. *Am.J.Physiol.* 38: H648-H655, 1995.
166. **Mouelle, P., P. Menu, P. Labrude, M. Grandgeorge, and C. Vigneron.** A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. III. Evaluations by perfusion of normal and ischemic guinea-pig heart. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech* 20: 697-701, 1992.
167. **Murray, J.F., E. Escobar and E. Rapaport.** Effects of blood viscosity on hemodynamic responses in acute normovolemic anemia. *Am.J.Physiol.* 216:638-642, 1969.
168. **Nagababu, E., S. Ramasamy, J.M. Rifkind, Y. Jia, and A.I. Alayash.** Site-specific cross-linking of human and bovine hemoglobins differentially alters oxygen binding and redox side reactions producing rhombic heme and heme degradation. *Biochemistry.* 41: 7407-7415, 2002.
169. **Napier, J.A., M. Bruce, J. Chapman, J.K. Duguid, P.R. Kelsey, S.M. Knowles, M.F. Murphy, L.M. Williamson, J.K. Wood, D. Lee, M. Contreras, N. Cross, M.J. Desmond, J. Gillon, A. Lardy, and F.G. Williams.** Guidelines for autologous transfusions. II. Perioperative haemodilution and cell salvage. British Committee for Standards in Haematology Blood Transfusion Task Force. Autologous Transfusion Working Party. *Br.J.Anaesth.* 78: 768-771, 1997.
170. **Narvios, A.B., B. Lichtiger.** Bedside Leukoreduction of cellular blood components in preventing cytomegalovirus transmission in allogeneic bone marrow transplant recipients: a retrospective study. *Haematologica* 86: 749-752, 2001.
171. **Ness, P.M., D.L. Bourke, and P.C. Walsh.** A randomized trial of perioperative hemodilution versus transfusion of preoperatively deposited autologous blood in elective surgery. *Transfusion* 32: 226-230, 1992.
172. **Nolte, D., M.D. Menger, and K. Messmer.** Microcirculatory models of ischaemia-reperfusion in skin and striated muscle. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp* 15: 9-16, 1995.
173. **Nolte, D., H. Zeintl, M. Steinbauer, S. Pickelmann, and K. Messmer.** Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 15: 244-249, 1995.

- 
174. **Nolte, D., A. Botzlar, S. Pickelmann, E. Bouskela, and K. Messmer.** 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: 314-327, 1997.
175. **Nolte, D., P. Steinhauser, S. Pickelmann, S. Berger, R. Hartl, and K. Messmer.** Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on local tissue oxygen tension in striated skin muscle: an efficacy study in the hamster. *J.Lab.Clin.Med.* 130: 328-338, 1997.
176. **Nolte, D., M. Bayer, H.A. Lehr, M. Becker, F. Krombach, U. Kreimeier, and K. Messmer.** Attenuation of postischemic microvascular disturbances in striated muscle by hyperosmolar saline dextran. *Am.J.Physiol.* 263: H1411-1416, 1992.
177. **Olsson, Y., E. Svensjö, K.E. Arfors and D Hultström.** Fluorescein labelled dextrans as tracers for vascular permeability studies in the nervous system. *Acta.Neuropathol.(Berl)* 33: 45-50, 1975.
178. **Opelz, G., Y. Vanrenterghem, G. Kirste, D.W. Gray, T. Horsburgh, J.G. Lachance, F. Largiader, H. Lange, K. Vujaklija-Stipanovic, J. Alvarez-Grande, W. Schott, J. Hoyer, P. Schnuelle, C. Descoedres, H. Ruder, T. Wujciak, V. Schwarz.** Prospective evaluation of pretransplant blood transfusion in cadaver kidney recipients. *Transplantation* 7: 964-967, 1997.
179. **Page, T.C., W.R. Light, C.B. McKay, and J.D. Hellums.** Oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures in an in vitro capillary as a model of hemoglobin-based oxygen carrier performance. *Microvasc Res.* 55 : 54-64, 1998.
180. **Page, T.C., W.R. Light, and J.D. Hellums.** Prediction of microcirculatory oxygen transport by erythrocyte/hemoglobin solution mixtures. *Microvasc Res.* 56 : 113-126, 1998.
181. **Palaparthi, R., H. Wang, and A. Gulati.** Current aspects in pharmacology of modified hemoglobins. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 40: 185-198, 2000.
182. **Pearson, M.J., and H. Lipowsky.** Influence of erythrocyte aggregation on leukocyte margination in postcapillary venules of rat mesentery. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H1460-H1471, 2000.

- 
183. Pohl, U. and C. de Wit. Interaction of nitric oxide with myogenic and adrenergic vasoconstrictor processes in the control of microcirculatory blood flow. *Pflügers Arch.* 432: R107-R110, 1996.
184. Pomper, G.J., Y. Wu, and E.L.Snyder. Risks of transfusion-transmitted infections: 2003. *Curr Opin Hematol.* 10(6): 412-418, 2003.
185. Pries, A.R. The functional microcirculatory unit. *Prog.Appl.Microcirc.* 23: 1-11, 1999.
186. Pries, A.R., T.W. Secomb, M. Sperandio, and P. Gaehtgens. Blood flow resistance during hemodilution: effect of plasma composition. *Cardiovasc Res.* 37: 225-235, 1998.
187. Provan, D. Better blood transfusion. *BMJ.* 318: 1435-1436, 1999.
188. Prouchayret, F., G. Fasan, M. Grandgeorge, C. Vigneron, P. Menu, and E. Dellacherie. A potential blood substitute from carboxylic dextran and oxyhemoglobin. I. Preparation, Purification and characterization. *Biomat.Art.Cells Immob.Biotech.* 20: 319-322, 1992.
189. Quellec, P., M. Leonard, M. Grandgeorge, and E. Dellacherie. Human hemoglobin confugated to carboxylate dextran as a potential red blood cell substitute. I. Further physico-chemical characterization. *Art.Cells Blood Subs.Immob.Biotech* 22: 669-676, 1994.
190. Rabiner, S.F., J.R. Helbert, H. Lopas, and L.H. Friedman. Evaluation of stroma-free hemoglobin solution for use as a plasma expander. *J.Exp.Med.* 126: 1127-1142, 1967.
191. Reed, M.W.R., and F. Miller. Importance of light dose in fluorescent microscopy. *Microvasc.Res.* 36: 104-110, 1988.
192. Rifkind, J.M., E. Nagababu, S. Ramasamy, and L.B. Ravi. Hemoglobin redox reactions and oxidative stress. *Redox Rep.* 8: 234-237, 2003.
193. Rochon, G., A. Caron, M. Toussaint-Hacquard, A.I. Alayash, M. Gentils, P. Labrude, J.F. Stoltz and P. Menu. Hemodilution with stoma-free hemoglobin at physiologically maintained viscosity delays the onset of vasoconstriction. *Hypertension* 43:1110-1115, 2004.
194. Rosenblum, W.I., and B.W. Zweifach. Cerebral microcirculation in the mouse brain. *Arch.Neurol.* 9: 414-423, 1963.

- 
195. Sakai, H., A.G. Tsai, R.J. Rohlf, H. Hara, S. Takeoka, E. Tsuchida, and M. Intaglietta. Microvascular responses to hemodilution with Hb vesicles as red blood cell substitutes: influence of O<sub>2</sub> affinity. *Am.J.Physiol.* 276: H553-H562, 1999.
196. Sakai, H., H. Hara, A.G. Tsai, E. Tsuchida, P.C. Johnson and M. Intaglietta. Changes in resistance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model. *Am.J.Physiol.* 276 (*Heart Circ. Physiol.* 45): H563-H571, 1999.
197. Sakai, H., H. Hara, M. Yuasa, A.G. Tsai, S. Takeoka, E. Tsuchida, and M. Intaglietta. Molecular dimensions of Hb-based O<sub>2</sub> carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am.J.Physiol.* 279: H908-H915, 2000.
198. Sazama, K. Reports of 355 transfusion-associated deaths: 1976 through 1985. *Transfusion* 30: 583-590, 1990.
199. Schmid-Schoenbein, G.W., B.W. Zweifach and S. Kovalchek. The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues. *Microvasc.Res.* 14: 303-317, 1977.
200. Schreiber, G.B., M.P. Busch, S.H. Kleinman, and J.J. Korelitz. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N.Engl.J.Med.* 334: 1685-1690, 1996.
201. Schröder, U., K.E. Arfors, and O. Tangen. Stability of fluorescein labeled dextran in vivo and in vitro. *Microvasc.Res.* 11: 33-39, 1976.
202. Seiffge, D. Hemodilution in spontaneously hypertensive rats: its effect on blood pressure and blood rheology. *Bibl. Haematol.* 47: 70-76, 1981.
203. Sewel, I.A. Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch. *J.Anat.* 100: 839-856, 1966.
204. Sharma, A.C. and A. Gulati. Effect of dapsirin cross-linked hemoglobin and norepinephrine on systemic hemodynamics and regional circulation in rats. *J.Lab.Clin.Med.* 123: 299-308, 1994.
205. Shen, T.J., N.T. Ho, V. Simplaceanu, M. Zou, B.N. Green, M.F. Tam, and C. Ho. Production of unmodified human adult hemoglobin in *Escherichia coli*. *Biochemistry* 90: 8108-8112, 1993.

- 
206. **Sibbald, W.J., K. Messmer, and M.P. Fink.** Roundtable Conference on Tissue Oxygenation in Acute Medicine, Brussels, Belgium, 14-16 March 1998. *Intensive Care Med.* 26: 780-791, 2000.
207. **Simoni, J., G. Simoni, and C.D. Lox.** Reaction of human endothelial cells to bovine hemoglobin solutions and tumor necrosis factor. *Art.Cells Blood Subs. Immob. Biotech.* 22: 777-781, 1994.
208. **Sirsjö, A., H.A. Lehr, D. Nolte, T. Haapaniemi, D.H. Lewis, G. Nylander, and K. Messmer.** Hyperbaric oxygen treatment enhances the recovery of blood flow and functional capillary density in postischemic striated muscle. *Circ.Shock* 40: 9-13, 1993.
209. **Spahn, D.R., B.J. Leone, J.G. Reves, and T. Pasch.** Cardiovascular and coronary physiology of acute isovolemic hemodilution: a review of nonoxygen-carrying and oxygen-carrying solutions. *Anesth.Analg.* 78: 1000-1021, 1994.
210. **Spahn, D.R.** Current status of artificial oxygen carriers. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 40: 143-151, 2000.
211. **Steinbauer, M., A.G. Harris, C. Abels, and K. Messmer.** Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbeck's Arch Surg* 385: 290-298, 2000.
212. **Svensjö, E., K.E. Arfors, G. Arturson, and G. Rutili.** The Hamster cheek pouch preparation as a model for studies of macromolecular permeability of the microvasculature. *Uppsala J.Med.Sci.* 83: 71-79, 1978.
213. **Thomas, M.J.G., J. Gillon, and M.J. Desmond.** Consensus conference on autologous transfusion. Preoperative autologous donation. *Transfusion* 36: 633-639, 1996.
214. **Thomas, M.J.G., J. Gillon, and M.J. Desmond.** Preoperative autologous donation: what was the impact of the 1995 consensus statement? *Transfus Med.* 9: 241-257, 1999.
215. **Tooke, J.E., J. Ostergren and B. Fagrell.** Synchronous assessment of human skin microcirculation by laser Doppler flowmetry and dynamic capillaroscopy. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 2: 277-284, 1983.
216. **Toussaint, M., V. Latger-Cannard, A. Caron, T. Lecompte, J.F. Stoltz, C. Vigneron, and P. Menu.** Effects of three Hb-based



- oxygen-carrying solutions on neutrophil activation in vitro: quantitative measurement of the expression of adherence receptors. *Transfusion* 41: 226-231, 2001
217. **Touissaint-Hacquard, M., Y. Devaux, D. Longrois, B. Faivre-Fiorina, S. Muller, J.F. Stoltz, C. Vigneron and P. Menu.** Biological response of human aortic endothelial cells exposed to acellular hemoglobin solutions developed as potential blood substitutes. *Life Sciences* 72: 1143-1157, 2003.
218. **Tsai, A.G.** Influence of cell-free Hb on local tissue perfusion and oxygenation in acute anemia after isovolemic hemodilution. *Transfusion* 41: 1290-1298, 2001.
219. **Tsai, A.G., and M. Intaglietta.** High viscosity plasma expanders: Volume restitution fluids for lowering the transfusion trigger. *Biorheology* 38: 229-237, 2001.
220. **Tsai, A.G. and M. Intaglietta.** Local tissue oxygenation by statistically distributed sources. *Microvasc.Res.* 44: 200-213, 1992.
221. **Tsai, A.G., B. Friesenecker, and M. Intaglietta.** Capillary flow impairment and functional capillary density. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 15: 238-243, 1995.
222. **Tsai, A.G., B. Friesenecker, M. McCarthy, H. Sakai, and M. Intaglietta.** Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skinfold model. *Am.J.Physiol.* 275: H2170-H2180, 1998.
223. **Tsai, A.G., K.E. Arfors, and M. Intaglietta.** Analysis of oxygen transport to tissue during extreme hemodilution. *Adv.Exp.Med.Biol.* 277: 881-886, 1990.
224. **Tsai, A.G. and M. Intaglietta.** The unusual properties of effective blood substitutes. *Keio J Med.* 51: 17-20, 2002.
225. **Tsai, A.G., B. Friesenecker, R.M. Winslow and M. Intaglietta.** Functional capillary density changes during blood substitution with alpha alpha Hb and dextran 70: influence on oxygen delivery. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 22: 841-847, 1994.
226. **Tsai, A.G., P. Cabrales, and M. Intaglietta.** Oxygen-carrying blood substitutes: a microvascular perspective. *Expert Opin Biol Ther.* 4: 1147-1157, 2004.

- 
227. **Turner, C.L., A.C. Casbard, and M.F. Murphy.** Barcode technology: its role in increasing the safety of blood transfusion. *Transfusion* 43: 1200-1209, 2003.
228. **Vamvakas, E.C. and H.F. Taswell.** Epidemiology of blood transfusion. *Transfusion* 34: 464-470, 1994.
229. **Vamvakas, E.C.** Risk of transmission of Creutzfeldt-Jakob disease by transfusion of blood, plasma, and plasma derivatives. *J Clin Apheresis.* 14: 135-143, 1999.
230. **Vamvakas, E.C.** White-blood-cell-containing allogeneic blood transfusion, postoperative infection and mortality: a meta-analysis of observational 'before-and-after' studies. *Vox Sang.* 86: 111-119, 2004.
231. **Van de Watering, L.M., J. Hermans and J.G. Houbiers.** Beneficial effects of leukocyte depletion of transfused blood on postoperative complications in patients undergoing cardiac surgery: a randomized clinical trial. *Circulation* 97: 562-568, 1998.
232. **Vandegriff, K.D., A. Malavalli, J. Wooldridge, J. Lohmann and R.M. Winslow.** MP4, a new nonvasoactive PEG-Hb conjugate. *Transfusion* 43: 509-516, 2003.
233. **Wallis, J.P., A.W. Wells, J.N. Matthews, and C.E. Chapman.** Long-term survival after blood transfusion: a population based study in the North of England. *Transfusion.* 44: 1025-1032, 2004.
234. **Waters, J.H.** Indications and contraindications of cell salvage. *Transfusion* 44: 40S-44S, 2004.
235. **Wayland, H., and P.C. Johnson.** Erythrocyte velocity measurements in microvessels by a correlation method. *Bibl.Anat.* 22: 333-337, 1967.
236. **Wayland, H., and P.C. Johnson.** Erythrocyte velocity measurements in microvessels by a two-slit photometric method. *J.Appl.Physiol.* 9: 160-163, 1967.
237. **Winslow, R.M.** Blood substitutes. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 40: 131-142, 2000.
238. **Winslow, R.M.** Blood substitutes - a moving target. *Nature Medicine* 1: 1212-1215, 1995.
239. **Winslow, R.M. and K.D. Vandegriff.** Hemoglobin oxygen affinity and the design of red cell substitutes. *Winslow RM, Vandergriff*

---

*KD, Intaglietta M (eds.): Advances in Blood Substitutes: industrial opportunities and medical challenges. Birkhäuser: 167-188, 1997.*

240. **Winslow, R.M., A. Gonzales, M.L. Gonzales, M. Magde, M. McCarthy, R.J. Rohlfis and K.D. Vandegriff.** Vascular resistance and the efficacy of red cell substitutes in a rat hemorrhage model. *J. Appl. Physiol.* 85: 993-1003, 1998.
241. **Winslow, R.M., C.C. Monge, E.G. Brown, H.G. Klein, F. Sarnquist, N.J. Winslow and S.S. McKneally.** Effects of hemodilution on oxygen transport in high-altitude polycythemia. *J. Appl. Physiol.* 59: 1495-1502, 1985.
242. **Zeintl, H., W.R. Tompkins, K. Messmer, and M. Intaglietta.** Static and dynamic microcirculatory video image analysis applied to clinical investigations. *Prog.Appl.Microcirc.* 11: 1-10, 1986.
243. **Zeintl, H., F.-U. Sack, M. Intaglietta and K. Messmer.** Computer assisted leukocyte velocity measurement in intravital microscopy. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 8: 293-302, 1989.
244. **Zuck, T.F.** Difficulties in demonstrating efficacy of blood substitutes. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 22: 945-953, 1994.
245. **Zuckerman, S.H., M.P. Doyle, R. Gorczynski, and G.J. Rosenthal.** Preclinical biology of recombinant human hemoglobin, rHb1.1. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 26: 231-257, 1998.

## 7. Lebenslauf

### Persönliche Daten

Name: Lars Daniel Filzen  
Adresse: Theresienstrasse 102, 80333 München  
Geburtsdatum: 25.09.1972  
Geburtsort: Lissabon, Portugal  
Familienstand: Ledig

### Schulischer Werdegang

1978 - 1982: Grundschule, Deutsche Schule Lissabon, Portugal  
1982 - 1987: Gymnasium, Deutsche Schule Lissabon, Portugal  
1987 - 1988: Gymnasium, Deutsche Schule zu Porto, Portugal  
1988 - 1994: Gymnasium, Adolf - Weber - Gymnasium, München  
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

### Zivildienst

1994 - 1996: Heilpädagogische - Tagesstätte - Hausham, Miesbach

### Studium

1997 - 2004: Studiengang Humanmedizin, Ludwig-Maximilians-Universität, München  
Drittes Staatsexamen: April 2004

### Dissertationsschrift

1999 - 2006: Doktorand am Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München  
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c.mult K. Meßmer)

### Berufliche Laufbahn

Seit 2005 : Assistenzarzt Chirurgie, Departement Chirurgie/Orthopädie, KSSW - Wolhusen, Luzern

## 8 . Danksagung

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Dr. h.c. mult K. Meßmer für die Aufnahme in das Institut für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilian-Universität München und die Überlassung des Themas meiner Dissertationsschrift, sowie für seine fachliche Unterstützung während der experimentellen Arbeit und der Abfassung meiner Dissertation.

Ferner danke ich Dr. med. A. Caron für die freundliche Überlassung von Hb-Dex-BTC, sowie für seinen unermüdlichen Einsatz im Rahmen der experimentellen Versuche.

Meinem Betreuer Dr. med. J. Hutter danke ich für seine Bemühungen während der Auswertung der Ergebnisse sowie für seine zahlreichen Verbesserungsvorschläge und Korrekturen meiner Dissertation.

Besonderen Dank schulde ich Dr. med. I. Sinitsina, die mir alles beigebracht hat, was für die Durchführung der experimentellen Versuche notwendig war und mir mit ihrer Geduld und fachlichen Unterstützung den Weg für dieses Projekt geebnet hat.

Nicht zuletzt möchte ich mich bei allen Mitarbeitern des Institutes für Chirurgische Forschung, insbesondere Alke Schropp, sowie bei allen Mitarbeitern der Tierhaltung für die fortwährende Unterstützung bedanken.