

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

**Die Effekte des künstlichen Sauerstoffträgers Diaspirin cross-
linked hemoglobin auf die Mikrozirkulation
des Pankreas**

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

vorgelegt von
Ernst Felix Wilhelm von Dobschütz
aus Erlangen/Bayern

2002

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. B. F. Becker
Prof. Dr. R. Gärtner
Prof. Dr. A. L. Gerbes
Prof. Dr. U. Pohl

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. vet. T. Hoffmann

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

Tag der mündlichen Prüfung: 13. 6. 2002

Inhaltsverzeichnis:

1. EINLEITUNG	5
1.1 KÜNSTLICHE SAUERSTOFFTRÄGER	5
1.2 EXPERIMENTELLE UND KLINISCHE STUDIEN MIT DCLHB.....	9
1.3 NEBENWIRKUNGEN VON DCLHB	10
1.4 MIKROZIRKULATION BEI AKUTER PANKREATITIS UND AUSWIRKUNG VON DCLHB..	11
2. ZIEL DER STUDIE.....	16
3. MATERIAL UND METHODEN	17
3.1 VORBEMERKUNG	17
3.2 EXPERIMENTELLES MODELL	17
3.2.1 Versuchstiere.....	17
3.2.2 Anästhesie und Beatmung	18
3.2.3 Mikrochirurgische Technik	19
3.3 UNTERSUCHUNGSMETHODEN	21
3.3.1 Makrohämodynamik.....	21
3.3.2 Mikrohämodynamik.....	21
3.3.2.1 Funktionelle Kapillardichte	23
3.3.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	24
3.3.3 Laborparameter	25
3.3.4 Lipidperoxidation im Pankreasgewebe.....	26
3.3.5 Granulozyteninfiltration im Pankreasgewebe.....	26
3.4 EXPERIMENTELLES PROTOKOLL	28
3.4.1 Kontrollbedingungen und I/R des Pankreas	28
3.4.1.1 Versuchsgruppen.....	29
3.4.1.2 Versuchsablauf.....	30
3.4.2 Hämorrhagischer Schock.....	31
3.4.2.1 Versuchsgruppen.....	31
3.4.2.2 Versuchsablauf.....	31
3.5 MEDIKAMENTE UND VOLLBLUTKONSERVIERUNG	32
3.6 STATISTIK.....	33
4. ERGEBNISSE.....	34
4.1 KONTROLLBEDINUNGEN	34
4.1.1 Makrohämodynamik.....	34
4.1.2 Mikrohämodynamik.....	34
4.1.2.1 Funktionelle Kapillardichte	34
4.1.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	38
4.1.3 Laborparameter	38
4.1.4 Granulozyteninfiltration im Pankreasgewebe.....	42
4.2 NORMOTHERME ISCHÄMIE UND REPERFUSION DES PANKREAS	43
4.2.1 Makrohämodynamik.....	43
4.2.2 Mikrohämodynamik.....	43
4.2.2.1 Funktionelle Kapillardichte	43
4.2.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion	46
4.2.3 Laborparameter	48
4.2.4 Granulozyteninfiltration im Pankreasgewebe.....	48

4.3 HÄMORRHAGISCHER SCHOCK.....	52
4.3.1 Makrohämodynamik.....	52
4.3.2 Mikrohämodynamik.....	54
4.3.2.1 Funktionelle Kapillardichte	54
4.3.2.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion	56
4.3.3 Laborparameter	58
4.3.4 Lipidperoxidation.....	61
5. DISKUSSION.....	63
5.1 DISKUSSION DER METHODIK	63
5.1.1 Diskussion der experimentellen Modelle	63
5.1.1.1 Modell der experimentellen Pankreatitis	63
5.1.1.2 Modell des Hämorrhagischen Schocks.....	68
5.1.2 Diskussion der gemessenen Parameter.....	70
5.1.2.1 Quantifizierung der Mikrohämodynamik	70
5.1.2.2 Quantifizierung der Leukozyten-Endothelinteraktion	74
5.1.2.3 Laborparameter	77
5.1.2.4 Lipidperoxidation im Pankreasgewebe.....	78
5.2 DISKUSSION DER ERGEBNISSE	82
5.2.1 Einflüsse von DCLHb unter Kontrollbedingungen.....	82
5.2.2 Einflüsse von DCLHb nach normothermer Ischämie des Pankreas	84
5.2.2.1 Einflüsse von DCLHb auf die Makrohämodynamik	84
5.2.2.2 Einflüsse von DCLHb auf die Mikrohämodynamik.....	85
5.2.2.3 Einflüsse von DCLHb auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion	90
5.2.2.4 Einflüsse von DCLHb auf Serumparameter	91
5.2.3 Einflüsse von DCLHb nach hämorrhagischem Schock.....	92
5.2.3.1 Effekte von DCLHb auf die Makrohämodynamik	94
5.2.3.2 Effekte von DCLHb auf die Mikrohämodynamik	95
5.2.3.3 Effekte von DCLHb auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion	95
5.2.3.4 Effekte von DCLHb auf die Oxygenierung	96
5.2.3.5 Effekte von DCLHb auf die Lipidperoxidation im Pankreasgewebe	98
5.3 KLINISCHE BEDEUTUNG DER ERGEBNISSE UND AUSBLICK.....	100
6. ZUSAMMENFASSUNG.....	102
7. LITERATURVERZEICHNIS.....	105
9. ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	131
10. DANKSAGUNG.....	132
11. CURRICULUM VITAE.....	134

1. Einleitung

1.1 Künstliche Sauerstoffträger

Unfälle sind die häufigste Todesursache zwischen dem ersten und 45. Lebensjahr¹¹⁵. Hierbei versterben diese Patienten meistens während der ersten Stunden nach dem Unfall entweder an den Folgen eines hohen Blutverlustes oder eines Schädelhirntraumas^{185, 218}. Der meist zu späte Therapiebeginn des hämorrhagischen Schocks führt zu einer ischämischen Schädigung des Organsystems und folgendem Multiorganversagen. Bei der Therapie des akuten Blutverlustes werden als Blutersatzstoffe am Unfallort vor allem Nicht-Sauerstoff-transportierende kristalloide und kolloide Infusionslösungen eingesetzt. Im Krankenhaus stehen neben diesen Lösungen auch allogene Blutkonserven zur Verfügung. Jährlich werden in der Bundesrepublik Deutschland 4 Millionen allogene Blutkonserven transfundiert. Diese bergen jedoch einige schwerwiegende Risiken und Nachteile, die ihren unbegrenzten Einsatz limitieren⁶⁴:

- 1) Infektionen durch Viren und Bakterien können durch modernste Screeninguntersuchung der Spender bei einer Bluttransfusion noch nicht verhindert werden.
- 2) Die Blutgruppenantigenität der Blutkonserven erfordert vor Transfusion einen hohen logistischen Aufwand zur Vermeidung einer Fehltransfusion, der den schnellen Einsatz am Unfallort und im Schockraum unmöglich macht.
- 3) Ein Lungenödem mit nicht kardial bedingter Ursache kann nach Transfusion von allogem Blut auftreten.
- 4) Eine immunsupprimierende Wirkung wird aufgrund der Ergebnisse retrospektiver Studien mit erhöhter Rezidivrate bei Kolonkarzinompatienten und Wundheilungstörungen bei Patienten, die allogene Blutkonserven erhalten haben, diskutiert²⁴⁷.

Der Anstieg des Durchschnittsalters der Patienten in den Industrieländern und der damit verbundene Anstieg großer Operationen wird bis zum Jahr 2030 bei einem gleichzeitigen Rückgang der Spendebereitschaft zu einem Mangel an Blutkonserven führen⁷⁵. Die Erforschung von Fremdblut ersparenden Maßnahmen ist somit ein internationales Ziel der chirurgischen und intensivmedizinischen Forschung. Die präoperative Eigenblutspende, der Einsatz von rekombinant hergestelltem Erythropoetin,

die perioperative normovolämische Hämodilution, die Erforschung der kritischen Hämoglobinkonzentration als Transfusionstrigger und die Retransfusion von mit "cell-saver" aufbereitetem Blut sind hierzu wichtige Ansätze. Diese Maßnahmen sind auf die operative und intensivmedizinische Anwendung in der Klinik beschränkt. Deshalb ist man seit längerer Zeit auf der Suche nach einem künstlich hergestellten Sauerstoffträger, der auch für den präklinischen Einsatz geeignet ist. Desweiteren würde ein klinisch einsetzbarer künstlicher Sauerstoffträger einem großen Teil der Weltbevölkerung in Ländern, denen bisher die Möglichkeit einer Bluttransfusion durch das Fehlen von Blutbanken verwehrt ist, einen Zugang zu großen Operationen, wie Transplantationen und Bypassoperationen erleichtern²⁴¹.

Bei der Erforschung von künstlichen Sauerstoffträgern befasst man sich neben den Perfluorkarbonen, seit vielen Jahren mit stromafreien Hämoglobinlösungen. Im Jahr 1898 injizierte von Starck erstmalig einem Hund eine Hämoglobinlösung²³². Zur Herstellung dieser Lösungen verwendet man heute entweder menschliches Hämoglobin aus dem Lysat abgelaufener Blutkonserven, bovines oder rekombinant hergestelltes Hämoglobin¹³². Die erste Patientin, der eine Hämoglobinlösung bei hämorrhagischem Schock injiziert wurde, verstarb trotz anfänglich positiver Effekte wenige Tage später an einem Nierenversagen⁵. Diese ersten Hämoglobinlösungen zeigen in verschiedenen experimentellen Studien folgende Nachteile, die eine Anwendung am Menschen unmöglich machen:

- 1) Durch Fehlen des in Erythrozyten-membranen vorhandenen Metaboliten 2,3-Bisphosphoglycerat besteht bei dem Hämoglobin eine erhöhte Affinität für Sauerstoff, welche die Sauerstoffabgabe an hypoxisches Gewebe erschwert.
- 2) Der schnelle intramolekulare Zerfall freier Hämoglobinmoleküle im systemischen Kreislauf führt zu einer kurzen intravaskulären Plasmahalbwertszeit von unmodifizierten Hämoglobinlösungen. Aufgrund ihres geringen Molekulargewichts werden die beim Zerfall entstandenen Dimere in den Glomerula der Niere filtriert und bewirken durch Anreicherung von Proteinen im Tubulus eine erhebliche Nierentoxizität¹⁸⁶.
- 3) Freies Hämoglobin führt durch seine Eigenschaft als Fenton Reagenz zur Generierung von Gewebe-toxischen Sauerstoffradikalen^{4, 180}
- 4) Vasoaktive Eigenschaften durch Scavenging des vom Gefäßendothel freigesetzten relaxierenden Faktors NO, die vermehrte Freisetzung des Gefäß-konstringierenden

Faktors Endothelin und die Sensibilisierung von adrenergen Rezeptoren führen zu einem Anstieg des mittleren arteriellen (MAP) sowie des pulmonal arteriellen Blutdrucks und zur Auslösung von Mikrozirkulationsstörungen nach Injektion von freien Hämoglobinlösungen.

Um diese Nachteile der stromafreien Hämoglobinlösungen auszuschalten werden die Hämoglobinlösungen chemisch modifiziert:

- 1) Schädliche Stromabestandteile von Erythrozytenmembranen, die wegen ihrer pyrogenen Eigenschaften zu Fieberschüben führen, werden aus den Lösungen mittels Ultrafiltration entfernt.
- 2) Die Bindungsstellen von 2,3-Bisphosphoglycerat am Hämoglobinmolekül werden mit verschiedenen Liganden wie zum Beispiel Pyridoxal-5-Phosphat abgesättigt, um die O₂-Affinität zu senken.
- 3) Die Plasmahalbwertszeit der Hämoglobinlösungen wird durch Verbesserung der intramolekularen Stabilität der Hämoglobinmoleküle verlängert. Hierzu wird das Hämoglobin intramolekular mittels Diaspirin kreuzvernetzt^{234, 246}. In neueren Entwicklungsstufen von künstlichen Sauerstoffträgern wird die Verlängerung der Halbwertszeit durch intermolekulare Vernetzung der Hämoglobinmoleküle (Polyhämoglobine)^{146, 196} bzw. durch Verkapselung von Hämoglobin in Liposomen (künstliche Erythrozyten)¹⁶⁸ erreicht.

Zunächst für militärische Zwecke der U.S. Armee entwickelt, wurde 1986 erstmalig von Chatterjee das $\alpha\alpha$ -Crosslinked Hemoglobin beschrieben, welches an den beiden ϵ -Aminogruppen von Lysin99 _{α 1} und Lysin99 _{α 2} der Globinketten durch die Kreuzvernetzung mit 3,5-Dibromosalicyl-Fumarat stabilisiert ist (Abb. 1)³⁷. Das kommerziell entwickelte Äquivalent der Firma Baxter ist das Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb, HemAssist™). Die Infektion von Patienten durch eine solche Lösung, welche aus abgelaufenen Blutkonserven hergestellt wird, wird durch einen Sterilisationsschritt ausgeschlossen. Dieser vernichtet alle bisher bekannten durch Bluttransfusionen übertragenen Viren^{10, 17, 55}.

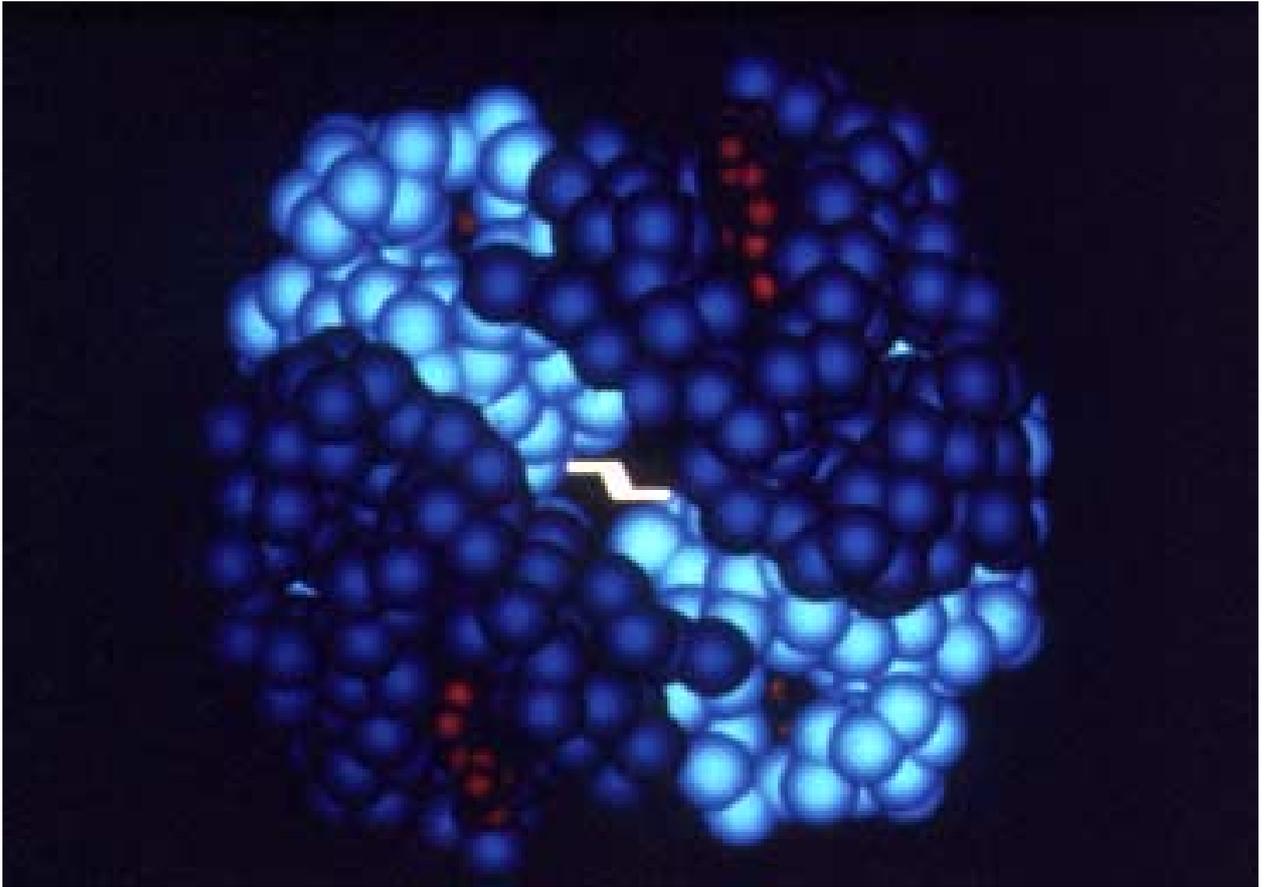


Abbildung 1: *Diaspirin cross-linked hemoglobin Molekül: Die beiden α -Globin Ketten sind mit 3,5-Dibromosalicylfumarat (weißes Molekül) kreuzvernetzt (Baxter Hemoglobin Therapeutics, Chicago, U. S. A.)*

1.2 Experimentelle und klinische Studien mit DCLHb

DCLHb wurde für verschiedene Indikationen in experimentellen und klinischen Studien getestet. *In vitro* Studien zeigten, daß die intramolekulare Kreuzvernetzung des freien Hämoglobins zwischen den beiden α -Globin Ketten zu einer Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve führt^{37, 208}. Die Rechtsverschiebung bewirkt eine bessere Abgabe des transportierten Sauerstoffs an hypoxisches Gewebe, was besonders bei einem Einsatz im hämorrhagischen Schock von Vorteil ist. Partielle und komplette Austauschtransfusionen an Ratten^{101, 102} und Schweinen⁸² konnten die grundsätzliche Fähigkeit von DCLHb nachweisen, Sauerstoff zu transportieren. Erste experimentelle Studien an Ratten mit letalem hämorrhagischen Schock zeigten eine Verbesserung der Überlebensrate durch DCLHb Infusion im Vergleich zu Ringer-Laktat¹⁷³. Die Effektivität von DCLHb bei der Therapie des hämorrhagischen Schocks wurde daraufhin in vielen kontrollierten und unkontrollierten Schockmodellen bei verschiedenen Spezies bestätigt^{36, 38, 49, 59, 68, 154, 155, 174, 194, 244}. Im Großtierversuch konnte am Institut für Chirurgische Forschung bei extremer Hämodilution durch die Verwendung von DCLHb der kritische Hämatokritwert im Vergleich zu einer mit Albumin behandelten Gruppe deutlich gesenkt werden¹⁴³. Neben der Fähigkeit Sauerstoff zu transportieren, zeigte DCLHb auch vasoaktive Eigenschaften. Diese besonderen Charakteristika der Lösung sind für die experimentellen Effekte bei anderen klinischen Anwendungsgebieten verantwortlich. Hierbei zeigt DCLHb einen Zell-protectiven Effekt bei fokaler Ischämie von Herz^{141, 142} Skelettmuskel¹⁶⁹ und Gehirn^{40, 42}. Der kreislaufstabilisierende Effekt von DCLHb durch NO-scavenging und Endothelinerhöhung kann für die Therapie des septischen Schock genutzt werden^{150, 204}.

Die Anwendbarkeit einer DCLHb Infusion am Menschen wurde in einer Placebo-kontrollierten cross-over Studie an 24 freiwilligen Probanden getestet, die eine topload Infusion von 25, 50 oder 100 mg/kg intravenös erhielten¹⁷². Außerdem wurde DCLHb in verschiedenen pathophysiologischen Situationen in Phase II Studien bei Patienten mit Sepsis¹⁷⁷, hämorrhagischem Schock²⁰⁷, apoplektischem Insult¹⁸⁷, kardialen Bypassoperationen¹⁴ und während Hämodialyse²¹³ infundiert. Bei diesen Patienten zeigten sich keine präexistenten Antikörper gegen DCLHb und keine immunologische Reaktion nach DCLHb Infusion¹⁶⁴. DCLHb war die erste stromafreie Hämoglobinlösung,

die bis zur Phase III im klinischen Einsatz getestet wurde. Hierbei konnte in einer randomisierten Multicenter-Studie mit 209 Patienten durch postoperative Infusion von bis zu 750 ml DCLHb nach kardialer Bypassoperation in der DCLHb Gruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe die Gabe von Blutkonserven um 19% verringert werden¹²¹. Die Phase III Multicenter-Studie zur Therapie des traumatisch bedingten hämorrhagischen Schocks wurde jedoch im September 1998 mangels Erreichen der Zielp Parameter und einer höheren Mortalität in der DCLHb Behandlungsgruppe vorzeitig abgebrochen²⁰⁶.

1.3 Nebenwirkungen von DCLHb

Die Kreuzvernetzung und Veränderung der Herstellungsschritte schaltet bei DCLHb viele der oben beschriebenen Nebenwirkungen der ursprünglichen stromafreien Hämoglobinlösungen aus. Nach wie vor treten jedoch bei der Anwendung der Lösung Nebenwirkungen auf, deren Ursachen nicht vollständig geklärt sind. In allen Tier- und Humanstudien mit DCLHb kam es nach Infusion von DCLHb zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP)¹³⁴. Ein solcher Anstieg des MAP tritt auch bei den meisten anderen bisher verwendeten stromafreien Hämoglobinlösungen auf⁶⁶. Die Ursache dieses MAP-Anstiegs nach Infusion von Hämoglobinlösungen wird vornehmlich auf den scavenging-Effekt des Hämoglobins von Stickstoffmonoxid (NO) zurückgeführt¹⁷¹. Daneben gibt es noch weitere Hypothesen, die eine Beteiligung von Endothelin⁷² und eine Sensibilisierung des adrenergen Systems⁷⁰ für die vasoaktive Wirkung von Hämoglobin verantwortlich machen. Dieser vasoaktive Effekt von DCLHb gilt auch als Ursache für den Anstieg des pulmonal arteriellen Drucks bei verschiedenen Spezies.

Von besonderer Bedeutung sind gastrointestinale Nebenwirkungen nach Infusion von DCLHb. Bei einigen Patienten (<10% der Studienpatienten) kam es zu einem Anstieg der Pankreasamylaseaktivität im Serum nach DCLHb-Infusion¹²¹. Desweiteren zeigten einige Patienten klinische Zeichen einer akuten Pankreatitis. Ein Patient entwickelte eine nekrotisierende Pankreatitis während der perioperativen Hämodilution bei einer Hüftoperation. Auch wenn eine akute Pankreatitis bei Intensiv- und Schockpatienten unabhängig von der Applikation von DCLHb auftritt, konnte ein Zusammenhang zwischen der Infusion von DCLHb und dem Auftreten von Hyperamylasämie sowie

klinischer akuter Pankreatitis nicht ausgeschlossen werden. Anstieg der Lipase- und Amylaseaktivität im Serum nach Infusion von Hämoglobinlösungen wurde erstmalig nach der Infusion von rekombinatem Hämoglobin am Menschen beschrieben²²⁶. Als mögliche Ursachen des Amylaseanstiegs sowie der Induktion einer akuten Pankreatitis nach Infusion von DCLHb werden zwei hypothetische Ansätze diskutiert:

1) NO-scavenging nach Infusion von DCLHb führt zu einem Anstieg des Tonus des Sphinkter Oddi mit konsekutivem Rückstau und Druckanstieg im Pankreasgang und induziert damit, ähnlich wie bei der Einklemmung eines Gallensteins eine akute Pankreatitis. Bei einer anderen rekombinanten Hämoglobinlösung konnte gezeigt werden, daß durch Infusion Tonusveränderungen am Ösophagussphinkter¹⁵¹ und Sphinkter Oddi⁴⁷ auftreten, welche vor allem durch Modulation der relaxierenden Wirkung von NO an der glatten Muskulatur erklärt werden⁸¹. In einer experimentellen Studie am australischen Opossum wurde gezeigt, daß die Infusion von DCLHb zu einer dosisunabhängigen Durchflußverminderung durch den Sphinkter Oddi führt¹¹⁴.

2) Die vasokonstringierende Wirkung sowie die erhöhte Bildung von gewebetoxischen Sauerstoffradikalen durch DCLHb bedingt eine Mikrozirkulationsstörung des Pankreas mit Ischämie-induzierter akuter Pankreatitis.

1.4 Mikrozirkulation bei akuter Pankreatitis und Auswirkung von DCLHb

Die Mikrozirkulation ist ein wichtiger Bestandteil der Pathophysiologie verschiedener inflammatorischer Krankheitsprozesse. Neben der nutritiven Funktion der Kapillaren, Arteriolen und Venolen sind diese Gefäße auch an der Immunmodulation und Entzündungsreaktion beteiligt. Bei akuter Pankreatitis ist die Mikrozirkulationsstörung ein zentraler pathophysiologischer Prozeß^{85, 109}. Wie in mehreren experimentellen und klinischen Untersuchungen nachgewiesen, zeigen sich bei akuter Pankreatitis folgende Charakteristika:

- 1) Abnahme der kapillären Perfusion im exokrinen Gewebe
- 2) Leukozytenaktivierung, Adhärenz und Diapedese der Leukozyten durch das Endothel postkapillärer Venolen.
- 3) Zunahme der Gefäßpermeabilität und Ödembildung
- 4) Bildung von Mikrothromben in der Mikrostrombahn

Die Abnahme der Pankreasperfusion führt zu einer ischämischen Schädigung des Pankreasgewebe. Eine Unterversorgung des Pankreasgewebes mit Sauerstoff kann schon per se eine akute Pankreatitis auslösen. Pannum beschrieb zum ersten Mal im Jahre 1886 eine durch Ischämie induzierte akute Pankreatitis nach Injektion von Wachskugeln in die Pankreasarterien¹⁶². Klinische Fälle von akuter Pankreatitis nach hämorrhagischem Schock^{79, 236}, koronarer Bypassoperation⁵⁶, Aortenaneurysmaoperation⁷³, Mesenterialinfarkt¹⁸¹ und nach Pankreastransplantation⁹⁰ werden auf einen Ischämie-Reperfusionsschaden zurückgeführt.

Die Pathophysiologie des Ischämie-Reperfusionsschadens ist bei verschiedenen Organen unterschiedlich. Organübergreifend führt der Ischämie-Reperfusionsschaden zu einer Depletion der ATP-Speicher in den Zellen aufgrund des fehlenden Sauerstoffantransportes während der Gewebhypoxie (Abb.2). Während der ischämischen Phase erfolgt hierbei nicht nur der katabole Abbau von ATP zu Hypoxanthin, sondern auch die Umwandlung der Xanthindehydrogenase zur Sauerstoffradikal-produzierenden Xanthinoxidase. Der Abbau energiereicher Phosphate führt im Rahmen der Reperfusion des Gewebes und dem wieder einsetzenden Antransport von molekularem Sauerstoff unter Anwesenheit von Hypoxanthin und Xanthinoxidase zur Bildung aggressiver Sauerstoff-Radikale. Diese Radikale bewirken eine Lipidperoxidation mit konsekutiver Membrandesintegration, wodurch letztendlich die Lyse der Zelle und somit der Verlust der endothelialen Integrität mit einem Anstieg der mikrovaskulären Permeabilität eingeleitet wird. Der Angriff auf die Zellintegrität hat eine Freisetzung von proinflammatorischen Mediatoren (Komplement, Cytokine, Eicosanoide) zur Folge. Desweiteren führt der Zellschaden zu einer Störung der Mikrozirkulation mit Verlust der Kapillarperfusion und Emigration von Leukozyten in das entzündete Gewebe. Durch die Freisetzung verschiedener Noxen aus den aktivierten Leukozyten und die fortbestehende Unterversorgung des Gewebes mit Sauerstoff wird der Gewebeschaden intensiviert. Der weitere Abbau der energiereichen Triphosphate ist die Folge.

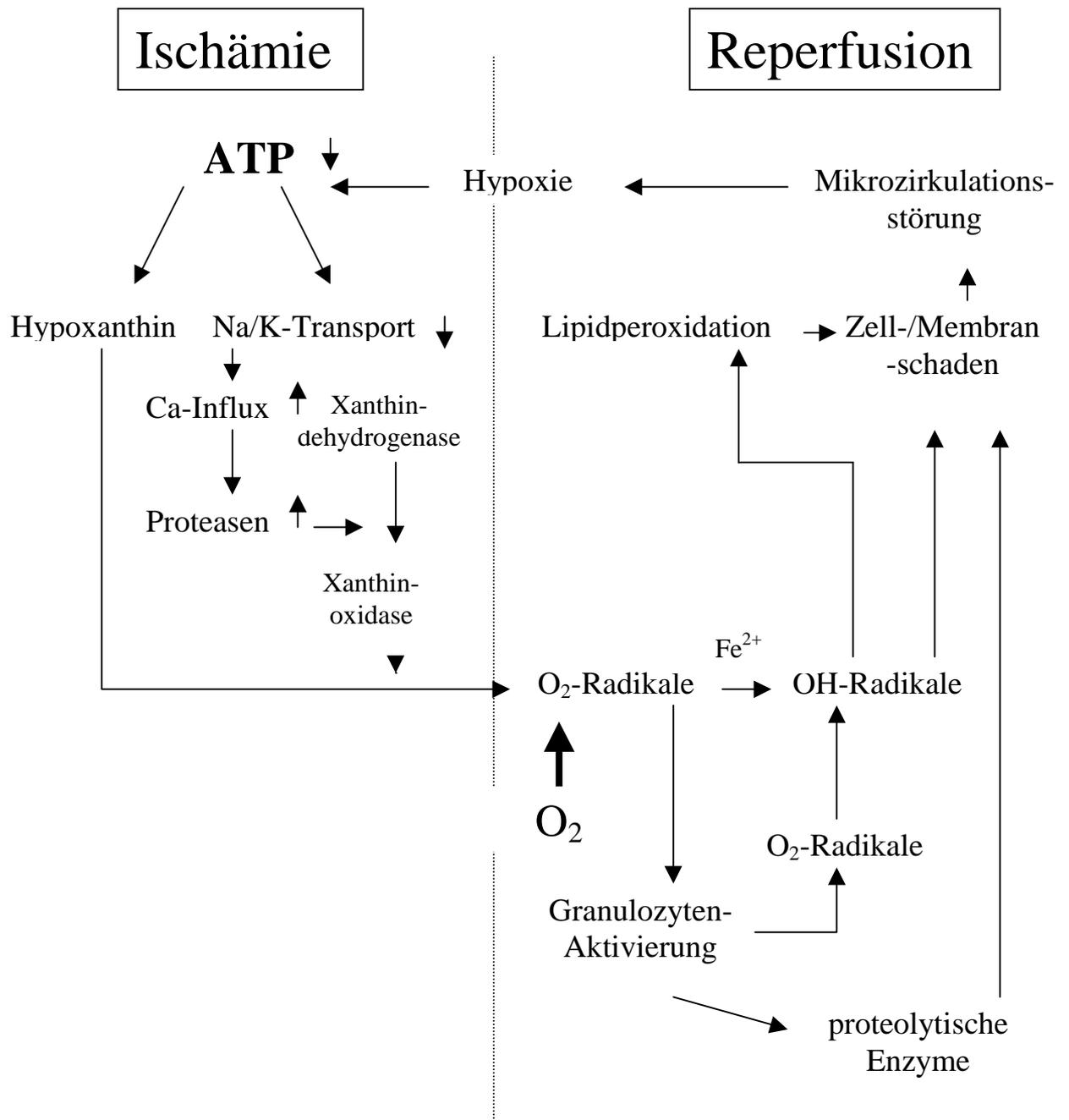


Abbildung 2: Der pathophysiologische "Teufelskreis" des Ischämie-Reperfusionsschadens mit einem Abfall energiereicher Phosphate, gestörter Na/K-Transportfunktion in die Zelle, Bildung von Sauerstoffradikalen, Aktivierung neutrophiler Granulozyten und Mikrozirkulationsstörung⁸⁵.

Tabelle 1:

Ätiologische Faktoren der akuten Pankreatitis nach Büsing²⁹ und Lankisch¹²²

- Gallensteine
 - Alkoholismus
 - Obstruktion des Pankreasgangs
 - Tumoren
 - Erkrankungen des Duodenums
 - Pancreas divisum
 - Obstruktion durch Würmer
 - Fremdkörper
 - Infektionen
 - Medikamente (z.B.: Thiazide, ACE-Hemmer)
 - Vergiftungen (z.B.: anti-Cholinesterase wirksame Insektizide, Skorpionbiß)
 - Endokrine- und Stoffwechselerkrankungen
 - Primärer Hyperparathyroidismus und Hyperkalzämie
 - Schwangerschaft
 - Hyperlipämie
 - Hypothermie
 - Pankreastransplantation
 - Trauma
 - hämorrhagischer Schock
 - Gefäßerkrankungen
 - Medizinische Maßnahmen
 - Pankreasbiopsie
 - ERCP
 - Chirurgische Maßnahmen
 - zystische Fibrose
 - Reye´s Syndrom
 - Kawasaki Krankheit
 - Hereditäre akute Pankreatitis
 - idiopathische Pankreatitis
-

Entzündungen der Bauchspeicheldrüse werden in akute und chronische Formen eingeteilt. Nach dem Klassifikationssystem, welches beim internationalen Symposium in Atlanta 1992 vereinbart wurde^{24, 122}, ist die akute Pankreatitis ein akuter Entzündungsprozeß des Pankreas, der mit unterschiedlicher Beteiligung des umgebenden Gewebes bzw. entfernter Organsysteme einhergeht. Hiernach unterscheidet man eine milde Form der

akuten Pankreatitis mit geringer Organdysfunktion und Restitutio ad integrum von einer schweren Form, die durch eine massive Organdysfunktion und die typischen Komplikationen wie Nekrose, Abszeß und Pseudozyste gekennzeichnet ist. Bis heute sind die Pathophysiologie und die initialen Mechanismen des Übergangs der leichten in die schwere Form nicht vollständig geklärt. Neben den beiden häufigsten ätiologischen Faktoren, dem chronischen Alkoholabusus und einem eingeklemmten Gallenstein, gibt es auch verschiedene andere Ursachen (s. Tab.1.) Die Vielfältigkeit der Ursachen einer akuten Pankreatitis werden durch die obige Tabelle deutlich. Neben den zuvor genannten beiden Haupttheorien über die Ursache des Auftretens einer akuten Pankreatitis bzw. Hyperamylasämie und der Infusion von DCLHb können natürlich noch viele andere Faktoren eine Rolle spielen. Ein Anstieg der Pankreasenzyme bei Intensivpatienten ist durch die Vielzahl der applizierten Medikamente, die künstliche Ernährung der Patienten mit Lipid-haltigen Infusionslösungen und die Prädisposition aufgrund verschiedenster Vorerkrankungen nichts ungewöhnliches. Da DCLHb zumeist bei solchen Patienten angewendet wurde, bleibt immer noch offen, ob wirklich ein Zusammenhang zwischen DCLHb und den detektierten Nebenwirkungen besteht. Die Mikrozirkulation ist hierbei ein wichtiger Indikator der Funktion und Schädigung in der Frühphase der akuten Pankreatitis. Die beiden durch DCLHb beeinflussten vasoaktiven Faktoren NO und Endothelin spielen eine entscheidende Rolle in der Regulation der kapillären Perfusion. Die bisherigen Experimente mit DCLHb weisen auf eine deutliche vasokonstringierende Eigenschaft von DCLHb hin. Kenntnisse über die Wirkung von DCLHb auf die Mikrozirkulation des Pankreas sind von entscheidender Wichtigkeit. Hierbei steht nicht nur die mögliche direkte Pankreatitis-auslösende Wirkung von DCLHb im Vordergrund. Auch eine Beeinflussung der Mikrozirkulation des Pankreas bei einem vorgeschädigten Organ ist insbesondere im Hinblick auf die spätere Anwendung einer Hämoglobinlösung bei Intensivpatienten wichtig.

2. Ziel der Studie

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, die Auslösung von möglichen Mikrozirkulationsstörung unter Kontrollbedingungen durch Diaspirin cross-linked hemoglobin zu untersuchen. Desweiteren sollte die Auswirkung des künstlichen Sauerstoffträgers DCLHb auf die Mikrozirkulationsstörung bei postischämischer Pankreatitis und hämorrhagischem Schock in einem Modell an der Ratte geklärt werden. Hierbei sollte vor allem die Frage beantwortet werden, ob die Infusion von DCLHb über eine Störung der Mikrozirkulation mit Abnahme der kapillären Perfusion und Zunahme der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion eine Pankreatitis induziert. Die Phänomene der Mikrozirkulation des Pankreas werden mit Hilfe der intravitalen Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

In ihrer Systematik ist diese Arbeit der Fragestellung folgend, innerhalb der einzelnen Kapitel in drei Abschnitte gegliedert:

- 1.) Auswirkung von DCLHb auf die Mikrozirkulation des Pankreas unter Kontrollbedingungen.
- 2.) Auswirkung von DCLHb auf die Mikrozirkulation des Pankreas nach normothermer Ischämie und Reperfusion.
- 3.) Auswirkung von DCLHb auf die Mikrozirkulation des Pankreas nach hämorrhagischem Schock und Vergleich sowohl mit der Gabe von konserviertem Vollblut als auch eines kolloidalen Plasmaexpanders.

3. Material und Methoden

3.1 Vorbemerkung

Die im folgenden beschriebenen Versuche wurden mit Genehmigung der zuständigen Behörde der Regierung von Oberbayern in der Zeit von März 1997 bis Oktober 1998 im Mikrozirkulationslabor des Instituts für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität, München durchgeführt.

3.2 Experimentelles Modell

3.2.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden männliche Sprague-Dawley Ratten mit einem Körpergewicht von 190-260 g verwendet (Charles River Wiga, Sulzfeld, Deutschland und Eigenzucht des Tierstalls des Instituts für Chirurgische Forschung, München, Deutschland). Die Tiere wurden artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes (Bundesgesetzblatt vom 18. 1. 1986, Teil I) in Gruppen von zwei bis drei Tieren im Tierstall des Instituts für Chirurgische Forschung gehalten. Die Tiere hatten bis zum Versuchsbeginn freien Zugang zu Wasser und bis 12 h vor Narkosebeginn freien Zugang zu Trockenfutter (Ssniff Spezialdiäten, Soest, Deutschland: 18000 I. E./kg Vit. A, 1280 I. E./kg Vit. D3, 120 mg/kg Vit E). Sie waren einem kontinuierlichen Tag/Nachtzyklus von 12 h sowie einer kontinuierlichen Temperatur von 24°C ausgesetzt. Die Nüchternphase diente der Verbesserung der Präparationsbedingungen und sollte standardisierte Ausgangsbedingungen der Pankreasstimulation durch die Nahrung gewährleisten.

3.2.2 Anästhesie und Beatmung

Die Narkose der Tiere wurde durch Ätherinhalation eingeleitet. Anschließend wurde Pentobarbital in einer Dosis von 50 mg/kg Körpergewicht (KG) intraperitoneal injiziert. Die Tiere wurden auf einer Heizplatte (Fa. Effenberger, Pfaffing, Deutschland) auf dem Rücken gelagert und die Körperkerntemperatur mittels einer rektal platzierten Sonde zwischen 36,5°C und 37,5°C gehalten. Darauffolgend wurden die Tiere tracheotomiert und nach Intubation mit einer gekürzten Venenverweilkanüle (Vygonüle G 12, VYGON, Aachen) Volumen-kontrolliert beatmet (Harvard Rodent Ventilator Model 683, Harvard Apparatus, South Natick, Mass. U. S. A.); dabei wurden die Tiere mit einem Atemhubvolumen von 2-2,5 ml, mit einem Lachgas/Sauerstoffgemisch mit einer inspiratorischen Sauerstofffraktion (FiO_2) von 0,25-0,40 und einer Atemfrequenz von 57-65 Atemzüge/min beatmet. Die rechte Arteria carotis und die rechte Arteria jugularis wurden dargestellt und nach einer queren Inzision des Gefäßlumens mit einem Polyethylene-Katheter (PE-50, 0,58 mm ID, Portex, Hythe, Kent, UK) kanüliert. An den arteriellen Katheter wurde ein Statham Druckabnehmer-Element (Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, Deutschland) angeschlossen und der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) und die Herzfrequenz (HF) kontinuierlich gemessen (Monitor Typ 863, Siemens, München, Deutschland). Außerdem wurden über den arteriellen Katheter Proben zur Blutgasanalyse (Ciba Corning 860, Chiron diagnostics GmbH, Fernwald, Deutschland) und zur Bestimmung der Serumparameter entnommen. Über den intravenösen Katheter erfolgte die Infusion der Versuchslösungen sowie von Pentobarbital zur Aufrechterhaltung der Narkose über den gesamten Versuchszeitraum (12mg/kgKG/h). Während des ganzen Versuchs wurde der arterielle pO_2 zwischen 95 und 120 mmHg und der arterielle pCO_2 zwischen 35 und 40 mmHg durch Anpassung der Beatmungsgrößen konstant gehalten. Durch intravenöse Injektion von Na-Bikarbonat 8,4% (0,1 ml/mmol/neg BE/100gKG) wurde vor der ersten Messung der negative Basenüberschuß (BE) auf Werte von 0 ± 2 und der pH auf Werte von $7,39 \pm 0,02$ korrigiert.

3.2.3 Mikrochirurgische Technik

Das Legen der Katheter sowie die intraabdominelle Präparation erfolgte unter Einsatz eines Operations-Mikroskops (Wild M3Z, Heerbrugg, Schweiz) mit 6,5-30-facher Vergrößerung.

Zur Messung der intravitalmikroskopischen Parameter sowie zur Induktion der Ischämie des Pankreas wurde das Abdomen der Tiere über eine quere Oberbauchlaparotomie eröffnet. Der kraniale Wundrand wurde mittels auf der Heizplatte magnetisch befestigter justierbarer Wundhaken (Fa. Effenberger, Pfaffing, Deutschland) offen gehalten. Die Leber und der Dünndarm wurden durch Abdeckung mittels einer Teflon Frischhaltefolie gegen Austrocknung geschützt. Die weitere Präparation erfolgte analog der Beschreibung bei der Etablierung des experimentellen Tiermodells zur Ischämie und Reperfusion des Pankreas⁸⁶. Pankreas mit anhängender Milz wurde für intravitalmikroskopische Aufnahmen nach Ligatur der A. gastrolienalis auf einem beweglichen Beobachtungstisch ausgelagert. Hierbei wurde darauf geachtet, daß das Pankreas möglichst wenig berührt wird. Bei den Ischämie-Reperfusions-Versuchen und den Versuchen zur Untersuchung der DCLHb Infusion unter Kontrollbedingungen wurde zunächst die A. gastroduodenalis im Ligamentum hepatoduodenale an der T-förmigen Abzweigung der A.hepatica communis nach dem Abgang der A. hepatica propria dargestellt. Für die weitere Präparation der anderen Gefäße wurde die Heizplatte mit dem darauf fixierten Versuchstier um 45° gekippt, so daß die linke Körperhälfte unten zu liegen kam. Anschließend wurde der gesamte Dün- und Dickdarm en-bloc extrakorporal – eingehüllt in eine Folie und damit gegen Austrocknung geschützt - nach links verlagert. Durch dieses Manöver wurden die Vena cava inferior und die Aorta mit ihren Abgängen, dem Truncus coeliacus, der A. mesenterica cranialis und der A. mesenterica caudalis, freigelegt (Abb. 3). A. gastrica sinistra und A. lienalis wurden unmittelbar nach ihrem Abgang aus dem Truncus coeliacus freigelegt. Zuletzt wurde die A. pancreaticoduodenalis caudalis präpariert, die als erster Abgang aus der A. mesenterica cranialis abzweigt.

Die Induktion einer kompletten reversiblen normothermen Ischämie des Pankreas erfolgte durch temporäre Okklusion der A. gastroduodenalis, der A. gastrica sinistra, der A.

lienalis und der A. pancreaticoduodenalis caudalis mittels mikrovaskulärer Gefäßclips (Aesculap-Yasargil-Standard-Aneurysm-Clip Temporary, Cat. No. Fe 751 K, Schließkraft 70 gms, Fa. Aesculap, Tuttlingen, Deutschland). Nach einer einstündigen normothermen Ischämie wurden diese Gefäßclips entfernt und damit die Reperfusion des Organs eingeleitet. Bei der Etablierung des Modells konnte mittels Intravitalmikroskopie und Laserdopplerflowmetrie gezeigt werden, daß es nach Abklemmen der obengenannten Gefäße zu keinem Anfluten von intravenös injiziertem Fluoreszenzfarbstoff sowie zu einer vollständigen Unterbrechung des Pankreasblutflusses kommt⁸³. Auch führt das Abklemmen der Gefäße mittels dieser Clips histologisch zu keinem Intima-Schaden, der Ursache für eine unvollständige Reperfusion des Pankreas sein könnte.

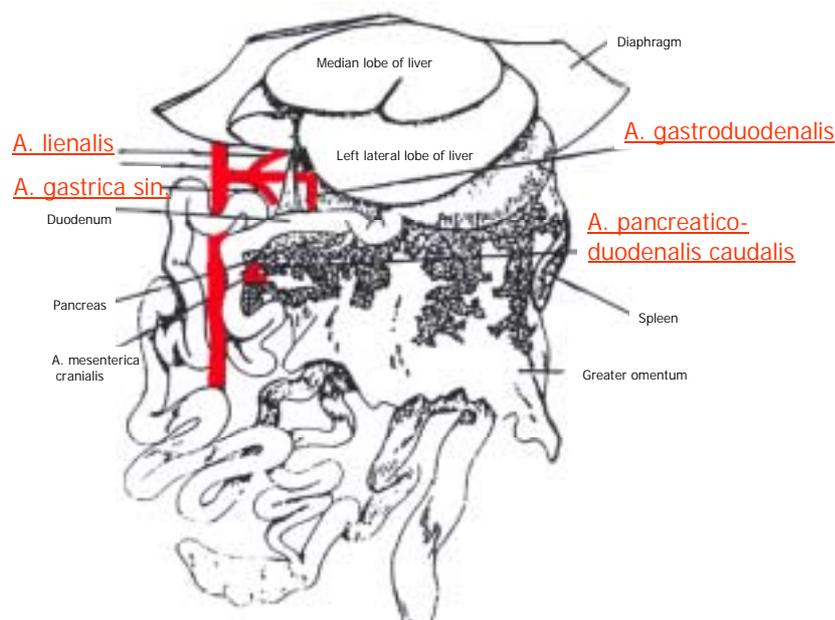


Abbildung 3: Anatomischer Situs der Laborratte mit Darstellung der blut-versorgenden Arterien des Pankreas nach Hoffmann⁸⁶

3.3 Untersuchungsmethoden

3.3.1 Makrohämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck wurde über einen intraarteriell liegenden Katheter mit einem Statham Druckabnehmer-Element kontinuierlich gemessen. Die Herzfrequenz wurde durch Auszählen der Amplitude an einem angehaltenen MAP-Kurvenbild bestimmt.

3.3.2 Mikrohämodynamik

Die Analyse der Mikrozirkulation erfolgte mittels der intravitalen Epifluoreszenzmikroskopie. Für diese Untersuchungstechnik wurde das Pankreas zusammen mit der Milz auf einen beweglichen Beobachtungstisch ausgelagert, der mit einem Parafilm überzogen war (Abb. 4). Dieser wurde von distal in das geöffnete Abdomen bis zum Magen hineingeschoben. Die Milz wurde mit Hilfe eines Gewebeklebers (Histoacryl, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) auf dem Parafilm befestigt. Danach wurde das Pankreas durch Befestigung der äußeren Mesenterialbegrenzung auf dem Beobachtungstisch aufgespannt. Anschließend wurden Pankreas, Mesenterium und Milz mittels einer handelsüblichen Frischhaltefolie vollständig bedeckt um ein Austrocknen und Gasaustausch mit der Umgebungsluft zu verhindern. Nach Lagerung des Tieres unter dem Intravitalmikroskop wurde die Heizplatte im Bereich des Kopfes um 45° angehoben, um eine horizontale Lage des Pankreas zu erreichen und eine Fokussierung des gesamten Beobachtungsareals zu ermöglichen. Für die intravitalmikroskopischen Aufnahmen verwenden wir ein modifiziertes Leitz-Orthoplan Mikroskop (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland). Dabei wurde für die Auflicht-Technik eine 100 Watt Quecksilber (HBO) Lichtquelle (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) an einen Ploemo-Pak-Illuminator mit einem I_{2/3} (Exzitation 450-490 nm, Emission >515 nm) und einem N₂ (Exzitation 530-560 nm, Emission >580nm) Filterblock (Leitz) adaptiert. Für die quantitative Analyse der

Mikrozirkulation wurde ein Salzwasser-Immersionobjektiv 25x (n. a.: 0,60; beide Objektive Leitz GmbH, Wetzlar) verwendet. Die Bilder wurden von einer charge-coupled device (CCD) Video-Kamera (FK 6990, Cohu, Prospective Measurements Inc., San Diego, CA, USA) mit einer Lichtempfindlichkeit von 10^{-2} lux und einer Aufzeichnungsgeschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgenommen und von einem Videobandgerät (video recorder AG-7330, Panasonic, München) zur späteren offline Analyse aufgezeichnet. Zur leichteren Identifizierung der Videosequenzen wurde ein Zeitgenerator (VTG-33, For-A-Company, Tokyo, Japan) mit Datum und Uhrzeit auf dem Monitorbildschirm (PVM-2042QM, Sony GmbH, München) eingeblendet und auf einem Videoband gespeichert. Unter Verwendung des oben erwähnten Salzwasser-Immersionobjektivs bei Berücksichtigung der Vergrößerungseffekte von Mikroskop, Kamera und Bildschirm (Diagonale des Bildschirms: 48 cm) wurde eine 800-fache Gesamtvergrößerung erreicht.

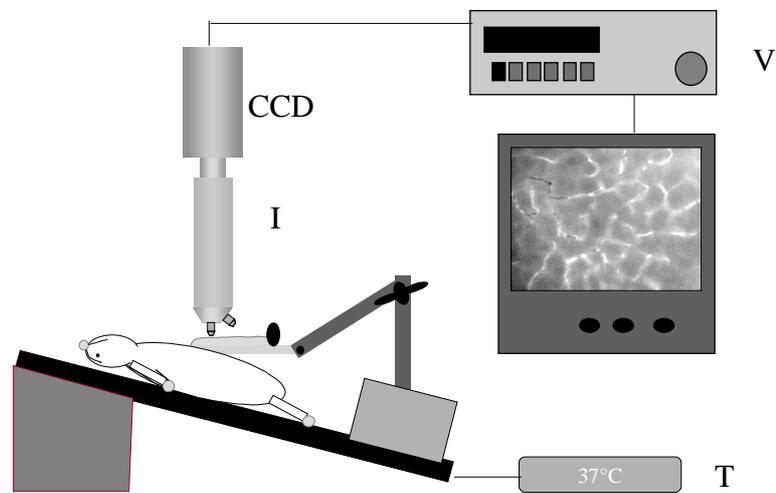


Abbildung 4: *Intravitalmikroskopischer Versuchsaufbau mit Intravitalmikroskop (I), Videokamera (CCD), Heizplatte (T), Videorekorder (V)*

3.3.2.1 Funktionelle Kapillardichte

Die quantitative Bestimmung der mikrovaskulären Perfusion erfolgte mit Hilfe des Parameters Funktionelle Kapillardichte (FKD). Hierbei wird die Länge (cm) der mit roten Blutkörperchen perfundierten Kapillaren pro intravitalmikroskopischem Beobachtungsfeld (cm^2) erfasst. Nicht perfundierte oder nur mit Plasma perfundierte Kapillaren wurden nicht in die Auswertung mit aufgenommen. Die Kontrastierung des Plasmas und dadurch Visualisierung der perfundierten Kapillaren erfolgte durch 0,15 ml i. v. Injektion von 0,75% Hydroxyäthylstärke (FITC-HAES, Fa. Lävosan, Linz, Österreich) mit einem Molekulargewicht von 200.000, welche mit dem Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiozyanat markiert ist. Nach Anregung der Plasmafluoreszenz mittels der Lichtquelle werden vom Fluorochrom Fluoreszein Lichtwellen mit einer Wellenlänge von 500 bis 550 nm emittiert, die dann über den

vorgeschalteten Filter ein kontrastiertes Bild der Mikrozirkulation des Pankreas ergeben. Insgesamt wurden 10 randomisierte Felder des exokrinen Pankreas mit einer Fläche von 400 x 300 µm pro Beobachtungszeitpunkt ausgewertet. Jedes dieser Felder wurde über 30 Sekunden beobachtet und aufgezeichnet, um eine eindeutige Beurteilbarkeit bei der Auswertung zu gewährleisten. Die funktionelle Kapillardichte wurde nach der von Schmid-Schönbein et al.¹⁹¹ (1977) beschriebenen Methode bestimmt. Der Ermittlung dieses Parameters sind stereologische Prinzipien zugrunde gelegt. Die Methode bedient sich statistischer Annäherungsverfahren, welche die geometrische Gesamtstruktur eines Objekts in Beziehung setzen zu einem repräsentativen Teil an der Gesamtstruktur¹⁵⁶. Dazu wurde ein auf transparenter Folie gezeichnetes quadratisches Gitternetz (400 x 300 µm) auf der Scheibe des Monitors befestigt und die Zahl der Kreuzungspunkte zwischen den Linien des Gitternetzes und den perfundierten Kapillaren gezählt. Aus der Zahl der Kreuzungspunkte und der Kantenlänge der Quadrate wurde die funktionelle Kapillardichte mit Hilfe der folgenden Formel berechnet:

$$\text{Funktionelle Kapillardichte (FKD)} = L_K = \pi / 2 \times N_K / P \text{ [cm}^{-1}\text{]}$$

L_K = Länge perfundierter Kapillaren

N_K = Anzahl der Kreuzungspunkte

P = Anzahl der Quadrate des Gitternetzes

d = Kantenlänge der Quadrate (cm)

Das arithmetische Mittel aller 10 Beobachtungsfelder ergibt schließlich die funktionelle Kapillardichte zu einem Meßzeitpunkt.

3.3.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Für die Quantifizierung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden adhärenente Leukozyten ("Sticker") in postkapillären Venolen ausgewertet. Die Beobachtungszeit betrug auch hier für jeden aufgenommenen Gefäßabschnitt 30 Sekunden. Die Beurteilung der Leukozyten erfolgte nach deren *in vivo* Markierung durch intravenöse Injektion von 0,1 ml 0,02 %iger Rhodamin-Lösung (Sigma-Aldrich Co, Deisenhofen, Deutschland). Durch diesen Fluoreszenzfarbstoff wird das Cytochrom C der Mitochondrien der Zellen

selektiv angefärbt. Zu Beginn jeder erneuten Beobachtungsphase mußte zur Aufrechterhaltung der Fluoreszenz 0,1 ml Rhodamin 6G nachinjiziert werden. Die Leukozyten-Endothel-Interaktion wurde in postkapillären Venolen des Pankreas mit einem Gesamtdurchmesser des Gefäßsegments zwischen 20 und 50 μm mit einem geraden Verlauf des Gefäßsegments von 100 bis 150 μm Länge untersucht. Pro Beobachtungszeitpunkt wurden mindestens drei postkapilläre Venolen des Pankreas aufgenommen. Die identischen Venolen wurden zu den beiden folgenden Beobachtungsphasen wieder aufgesucht. Als adhärent wurde ein Leukozyt definiert, der über einen Beobachtungszeitraum von 30 Sekunden stationär an der Endotheloberfläche blieb. Die Endotheloberfläche wurde unter der Annahme einer zylindrischen Gefäßgeometrie aus Gefäßdurchmesser und Länge des untersuchten Gefäßsegments errechnet. Hierbei wurde als Dimension die Zellzahl pro Endotheloberfläche [mm^{-2}] angegeben.

3.3.3 Laborparameter

Für regelmäßige Blutgasanalysen wurde eine heparinisierte Glaskapillare (Typ D941-8,5-8,5, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) mit ca. 90 μl Blut aus dem arteriellen Katheter gefüllt und mit Hilfe eines Blutgasanalysegerätes (Ciba Corning 860, Chiron diagnostics GmbH, Fernwald, Germany) die arteriellen Partialdrücke von Sauerstoff, Kohlendioxid, sowie pH, Standardbikarbonat, Basenüberschuß, Laktat und die Sauerstoffsättigung bestimmt.

Der systemische Hämatokrit sowie die systemische Hämoglobinkonzentration wurden in einer heparinisierten Blutprobe mittels eines Coulter Counter (Typ 540, Coulter Electronics, Hialeah, Florida, USA) bestimmt.

Die Bestimmung der Interleukin-6 Konzentration sowie die Aktivität der Amylase im Serum erfolgte im arteriellen EDTA-Blut. Die Blutproben wurden bei 3000U/min für 10 min bei 4°C zentrifugiert. Danach wurden sie bis zur Messung bei -70°C eingefroren. Die Messung der Serumamylase-Aktivität erfolgte mittels eines random-excess analyzer (COBAS INTEGRA, Roche, Basel, Schweiz) durch Herrn Dr. C. Engelschalk (Institut für Klinische Chemie, Klinikum Großhadern, Ludwig-Maximilians-Universität München).

Zur Messung der Interleukin-6 Serumkonzentration wurde ein Rattenblut IL-6 ELISA Kit (Nr. I051502A, Laboserv, Staufenberg, Deutschland) verwendet. Freies Hämoglobin kann zur Interferenz mit der jeweiligen Testmethode führen. Zur Klärung einer möglichen Interferenz wurde eine Verdünnungsreihe von verschiedenen DCLHb-Konzentrationen mit Serum eines gesunden Tieres hergestellt. Daraufhin wurden die Proben mittels der beiden Testverfahren auf eine Interferenz mit dem vorhandenen DCLHb überprüft. Der Amylase-Test ergab valide Daten bis zu einer DCLHb-Konzentration von 200mg/dL Serum. Mit dem IL-6 ELISA zeigte sich eine Abweichung der Ergebnisse ab einer DCLHb-Konzentration von 1500 mg/dL Serum. Daher konnten bei der Gabe der höheren Dosierung von DCLHb unter Kontrollbedingungen die beiden Serumparmeter nicht mehr zuverlässig bestimmt werden.

3.3.4 Lipidperoxidation im Pankreasgewebe

Als Maß der Sauerstoffradikalbildung im Pankreasgewebe nach hämorrhagischem Schock wurde die Lipidperoxidation quantifiziert.

Hierzu wurden die Thiobarbitursäure-reaktiven Materialien (TBARM) mittels des von Ohkawa beschriebenen Assays bestimmt¹⁵⁹. Das Pankreasgewebe wurde am Ende des Versuchs entnommen und mittels flüssigem Stickstoff gefroren. Die Gewebeproben wurden bis zur Messung in einem -70°C Gefrierschrank aufbewahrt. Vor der Messung wurden die Gewebeproben bei Raumtemperatur aufgetaut und mit einem Rasiermesser in kleine Stücke zerteilt. 1g Pankreasgewebe wurde mit 10 ml einer 4°C kalten 1,1% KCl Lösung vermischt und mittels eines Homogenisators bei 1200 U/min für fünf Minuten homogenisiert (Homogenisator, Braun, Melsungen, Deutschland). Nach Zentrifugation der Proben wurde die TBARM-Konzentration im Überstand spektrophotometrisch bestimmt.

3.3.5 Granulozyteninfiltration im Pankreasgewebe

Am Ende der Beobachtungszeit wurden von vier Tieren pro Versuchsgruppe Gewebeproben aus dem Pankreaskopf entnommen. Die Proben wurden sofort mittels

einer 10% Formalin-Pufferlösung fixiert, dehydriert, in Paraffin eingebettet und mit einem Mikrotom (Leica, München, Deutschland) in einem Abstand von ca. 3 μm geschnitten. Die angefertigten Schnitte wurden mit einer Granulozytenesterase Färbung (Fa. Sigma) angefärbt. In 10 Beobachtungsfeldern pro Schnitt mit einem Durchmesser von 250 μm wurde die Anzahl der extravasierten Leukozyten (Zellen/ mm^2) ohne Kenntnis der Versuchsgruppe bestimmt.

3.4 Experimentelles Protokoll

3.4.1 Kontrollbedingungen und I/R des Pankreas

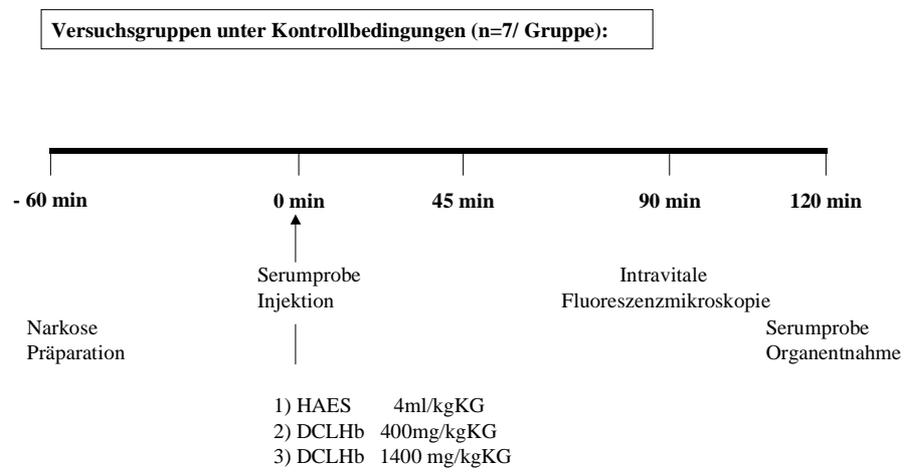


Abbildung 5: Experimentelles Protokoll des ersten Versuchsabschnitts unter Kontrollbedingungen

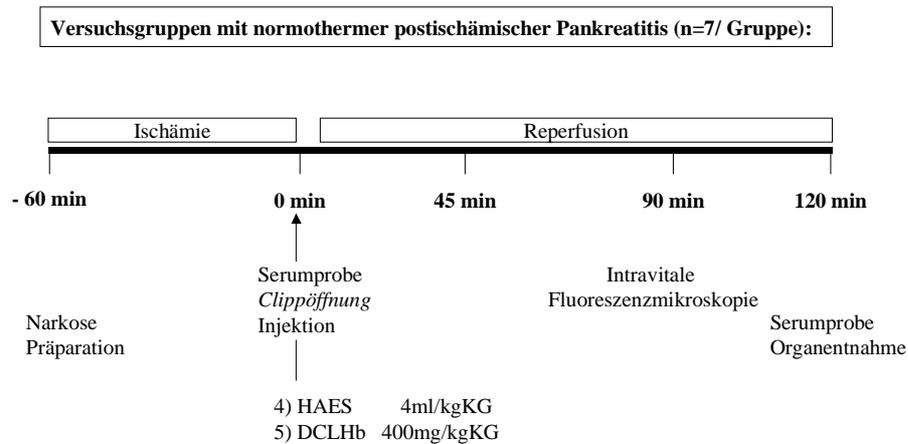


Abbildung 6: Experimentelles Protokoll des zweiten Versuchabschnitts bei postischämischer Pankreatitis

3.4.1.1 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in Gruppen mit jeweils sieben Tieren eingeteilt. Unter Kontrollbedingungen wurde den Tieren nach einer sham-Operation entweder 1) 4 ml/kg KG 10% Hydroxyäthylstärke; 2) 400 mg/kg KG (4ml/kg) DCLHb oder 3) 1400mg/kg KG (14ml/kg) DCLHb intravenös injiziert (Abb. 5). Nach einer einstündigen normothermen Ischämie des Pankreas wurde den Tieren unmittelbar zu Beginn der Reperfusion entweder 4) 400 mg/kg (4ml/kg) DCLHb oder 5) 4 ml/kg 10% Hydroxyäthylstärke injiziert (Abb. 6).

3.4.1.2 Versuchsablauf

In dem ersten Teil der Studie wurden die Auswirkungen einer DCLHb-Infusion auf die Mikrozirkulation des Pankreas unter Kontrollbedingungen und nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas untersucht. Nach Narkoseeinleitung und Legen der arteriellen Katheter wurden die Blutgaswerte bestimmt, und die Beatmung und eine eventuell bestehende Azidose korrigiert. Nach einer Stabilisierungsphase von 15 Minuten erfolgte eine quere Oberbauchlaparotomie mit der Mobilisation des Pankreas und der Präparation der das Pankreas versorgenden Gefäße. Hierauf wurden die basalen Blutgasparameter bestimmt und über den arteriellen Katheter 1 ml Blut für die Bestimmungen der Aktivität der Amylase im Serum sowie der Interleukin-6 Konzentration abgenommen. Nach Aufzeichnung der basalen makrozirkulatorischen Parameter wurden die Tiere entweder den Shamgruppen oder den Ischämiegruppen randomisiert zugeteilt. In den Sham-operierten Tieren wurde nun entweder eine 10% Hydroxyethylstärke-Lösung als Kontroll-lösung (4ml/kg KG), DCLHb in einer niederen Dosierung (4ml/kgKG) oder DCLHb in einer hohen Dosierung (14ml/kg KG) intravenös als Bolus injiziert. Nach Infusion der Lösungen wurde während der ersten 15 Minuten der mittlere arterielle Blutdruck gemessen. 15 Minuten nach Infusion wurde arterielles Blut für die Blutgasanalyse sowie die Bestimmung der IL-6 Serumkonzentration abgenommen. Sodann wurde das Pankreas auf einen Beobachtungstisch für die *in vivo* Fluoreszenzmikroskopie ausgelagert und zu den Zeitpunkten 45, 90 und 120 Minuten nach Infusion die mikrozirkulatorischen Parameter bestimmt. In den Ischämie - Tieren erfolgte die Induktion einer vollständigen normothermen Ischämie des Pankreas für eine Stunde mittels mikrovaskulärer Gefäßclips. Unmittelbar nach Öffnen der Gefäßklips wurde den Tieren 10% Hydroxyäthylstärke-Lösung bzw. DCLHb als Bolus injiziert. Nach Infusion der Lösungen wurde während der ersten 15 Minuten kontinuierlich der mittlere arterielle Blutdruck gemessen. 15 Minuten nach Infusion wurde arterielles Blut für die Blutgasanalyse sowie die Bestimmung der IL-6 Serumkonzentration abgenommen. 45, 90 und 120 Minuten nach Injektion der Lösungen wurden die mikrozirkulatorischen Parameter bestimmt. Danach wurde den Tieren Blut abgenommen und nach Organentnahme die Experimente durch eine Überdosis mit Pentobarbital beendet.

3.4.2 Hämorrhagischer Schock

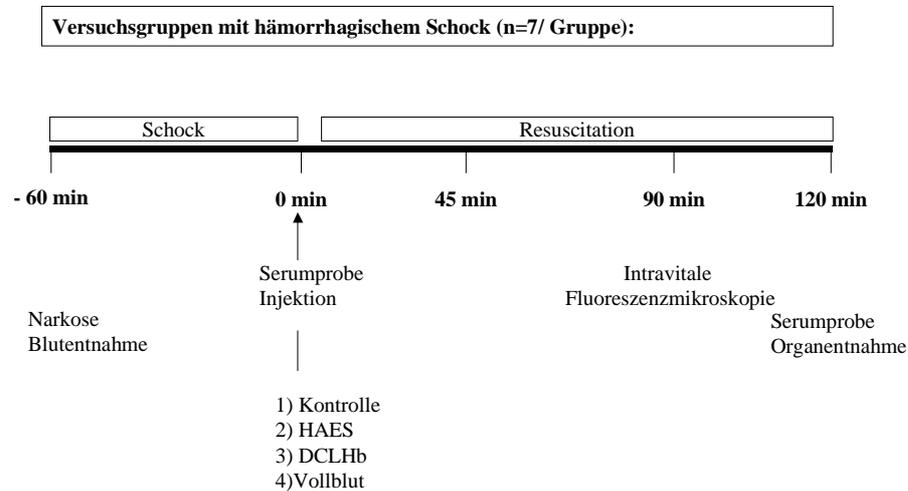


Abbildung 7: Experimentelles Protokoll der Versuchstiere mit 1h Blutdruck-kontrolliertem hämorrhagischem Schock

3.4.2.1 Versuchsgruppen

Die Tiere wurden in Gruppen mit jeweils sieben Tieren eingeteilt. 1) Sham-operierte Tiere ohne Schockinduktion dienten als Kontrolltiere. Nach einer einstündigen Druck-kontrollierten Hämorrhagie erhielten die Tiere entweder 2) 6 % Hydroxyethylstärkelösung, [200 000/0,5] 3) DCLHb oder 4) Vollblut.

3.4.2.2 Versuchsablauf

In diesem Teil der Studie wurden die Auswirkungen einer DCLHb Infusion als Blutersatz nach hämorrhagischem Schock im Vergleich zur Hydroxyethylstärklösung und Vollblut auf die Mikrozirkulation des Pankreas untersucht. Das in dieser Studie verwendete

Schockmodell wurde in Anlehnung an das im Institut für Chirurgische Forschung etablierte Modell einer Druck-gesteuerten Hämorrhagie mit einem MAP von 40 mmHg über eine Stunde durchgeführt²²⁸. Nach der Erhebung der basalen Messungen wurde Blut über den arteriellen Katheter dem Kreislauf entzogen und der MAP innerhalb von 10 min auf Werte von 40 mmHg gesenkt. Um diesen Druck über 60 Minuten konstant zu halten wurde den Tieren weiteres Blut entnommen, sobald der MAP über 45 mmHg anstieg. Nach diesem Schockintervall wurden die Tiere über ein Losverfahren den oben beschriebenen Gruppen zugeteilt. Danach wurde den Tieren die jeweilige Infusionslösung mit dem selben Volumen, das den Tieren bei Schockinduktion entnommen wurde, intravenös reinjiziert. Nach 15 minütiger Stabilisierungsphase mit Kontrolle des mittleren arteriellen Blutdrucks erfolgte eine transverse Laparatomie und Auslagerung des Pankreas. Die mikrozirkulatorischen Parameter wurden zu den Zeitpunkten 45, 90 und 120 Minuten nach Infusion der Lösungen erfaßt. 120 Minuten nach Reperfusion wurden die Tiere mit einer Überdosis an Pentobarbital getötet und das Pankreas zur Bestimmung der TBARM-Konzentration in flüssigem Stickstoff tiefgefroren.

3.5 Medikamente und Vollblutkonservierung

6% Hydroxyethylstärkelösung (HAES) wurde über die Apotheke des Klinikums Großhadern von der Firma Fresenius AG (Bad Homburg, Deutschland) erworben. DCLHb (Lot No. 97J10AD11-111997) wurde von der Firma Baxter Healthcare Corp. (Round Lake, IL, USA) zur Verfügung gestellt. Nach Herstellerangaben enthalten 250 ml DCLHb folgende Bestandteile: 25 g Hämoglobin; 1,425g Natriumchlorid; 0,95g Natrium DL-Laktat, 0,075 g Kaliumchlorid, 0,0325 g Calciumchlorid, 0,010 g Magnesiumchlorid, Wasser für Injektionszwecke ad 250 ml; Methämoglobinkonzentration <5%; $P_{50}=32$ mmHg (normales menschliches Blut 26mmHg); pH bei 37°C 7,4; onkotischer Druck 42 mmHg. Die DCLHb-Chargen wurden in einem -70°C Gefrierschrank gelagert und eine halbe Stunde vor Gebrauch aufgetaut. Die Tiere der Vollblutgruppe der Schockstudie erhielten ihr eigenes konserviertes Vollblut reinjiziert: Das Blut wurde bei Schockinduktion in Spritzen aufgezogen, welche CPDA-1 im selben Verhältnis wie im handelsüblichen Blutspendebeuteln enthielten (63ml CPDA-1/450ml Blut). CPDA-1

wurde aus handelsüblichen Blutspendebeuteln (Baxter S. A., Maurepas, Frankreich) gewonnen.

3.6 Statistik

Die statistische Auswertung der Daten erfolgte an einem personal computer mit den Statistikprogrammen SigmaStat 2.0 (Jandel, San Rafael, CA, U.S.A.) und STATISTICA (StatSoft GmbH, Hamburg, Deutschland). Falls nicht anders vermerkt, sind alle Werte als Mittelwert (MW) \pm Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben. Die Mittelwerte der mikrozirkulatorischen Parameter setzen sich aus den Mittelwerten der einzelnen Messungen pro Versuchstier zu den jeweiligen Versuchszeitpunkten zusammen.

Im ersten Teil der Studie wurden zu den einzelnen Zeitpunkten statistische Unterschiede zwischen den Gruppen bei normalverteilten Daten mittels einer one-way ANOVA gefolgt von einem Student-Newman-Keuls post hoc Test getestet. Nicht normal verteilte Daten wurden mittels einer one-way repeated-measure ANOVA on ranks gefolgt von einem Dunnett`s post hoc Test überprüft. Die Amylase-Werte wurden mit einem Wilcoxon`s signed rank Test getestet. Die Daten der Tiere in den Schockgruppen wurden mittels einer two-way ANOVA gefolgt von einem Student-Newman-Keuls-Test getestet. Eine Irrtumswahrscheinlichkeit von $p < 5\%$ wurde als signifikant angesehen.

4. Ergebnisse

4.1 Kontrollbedingungen

4.1.1 Makrohämodynamik

Der mittlere arterielle Blutdruck blieb in der Hydroxyäthylstärke-behandelten Gruppe unter Kontrollbedingungen konstant (Abb.8). Die Infusion von DCLHb in der Dosierung von 400mg/kg KG führte zu einem sofortigen signifikanten Anstieg des MAP um 18%. Die Hypertension blieb bis eine Stunde nach Injektion bestehen. In der Gruppe mit 1400mg/kg KG stieg der MAP um 21% nach Injektion und blieb über den gesamten Versuchsablauf signifikant erhöht. In der HAES-behandelten Gruppe sowie in der mit 400mg/kg KG behandelten DCLHb Gruppe kam es über den gesamten Versuchsablauf zu keiner Veränderung der Herzfrequenz. In der Hochdosisgruppe wurde ein signifikanter Abfall der Herzfrequenz gegenüber der HAES-behandelten Gruppe während des gesamten Versuchsablaufs beobachtet (Tab. 2).

4.1.2 Mikrohämodynamik

4.1.2.1 Funktionelle Kapillardichte

Nach Auslagerung des Pankreas und intravenöser Injektion des Plasmamarkers FITC-HAES zeigte sich das mit 25-facher Vergrößerung aufgenommene Bild eines bienenwabenhörmig dargestellten Pankreasgewebes (Abb.9 A).

In der HAES behandelten Kontrollgruppe sowie in der mit 400mg/kgKG behandelten DCLHb Gruppe zeigten sich während des Versuchs FKD-Werte um 350 cm/cm², die sich über den gesamten Beobachtungszeitraum nicht signifikant veränderten (Abb.10). Die höhere Dosierung von DCLHb ergab nach 90 und 120 Minuten einen signifikanten Anstieg der kapillären Perfusion, gegenüber der Kontrollgruppe.

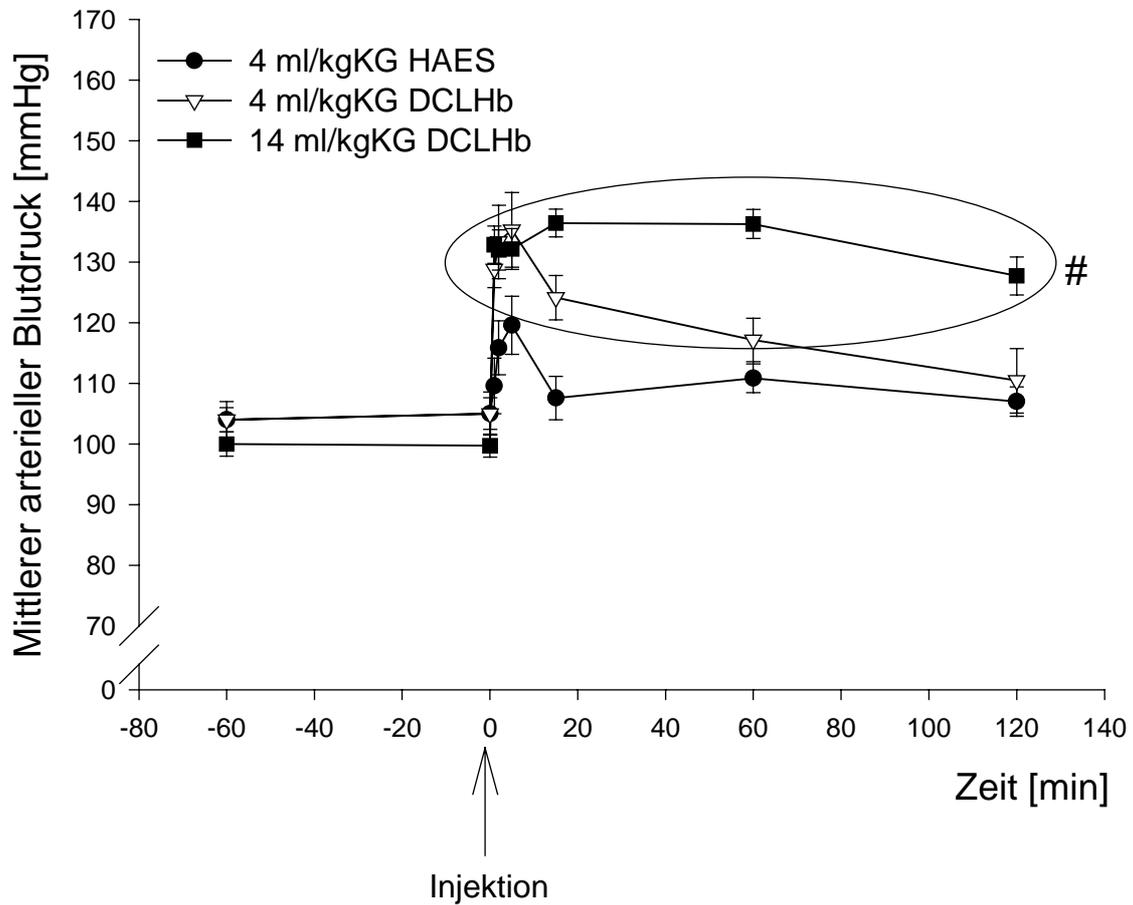


Abbildung 8: Mittlerer arterieller Blutdruck unter Kontrollbedingungen nach HAES, 4ml/kgKG DCLHb und 14 ml/kgKG DCLHb Infusion. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ signifikant gegenüber HAES (Kontrolle) und signifikant gegenüber dem Meßzeitpunkt vor Injektion; Dunn`s und Dunnet`s Test.

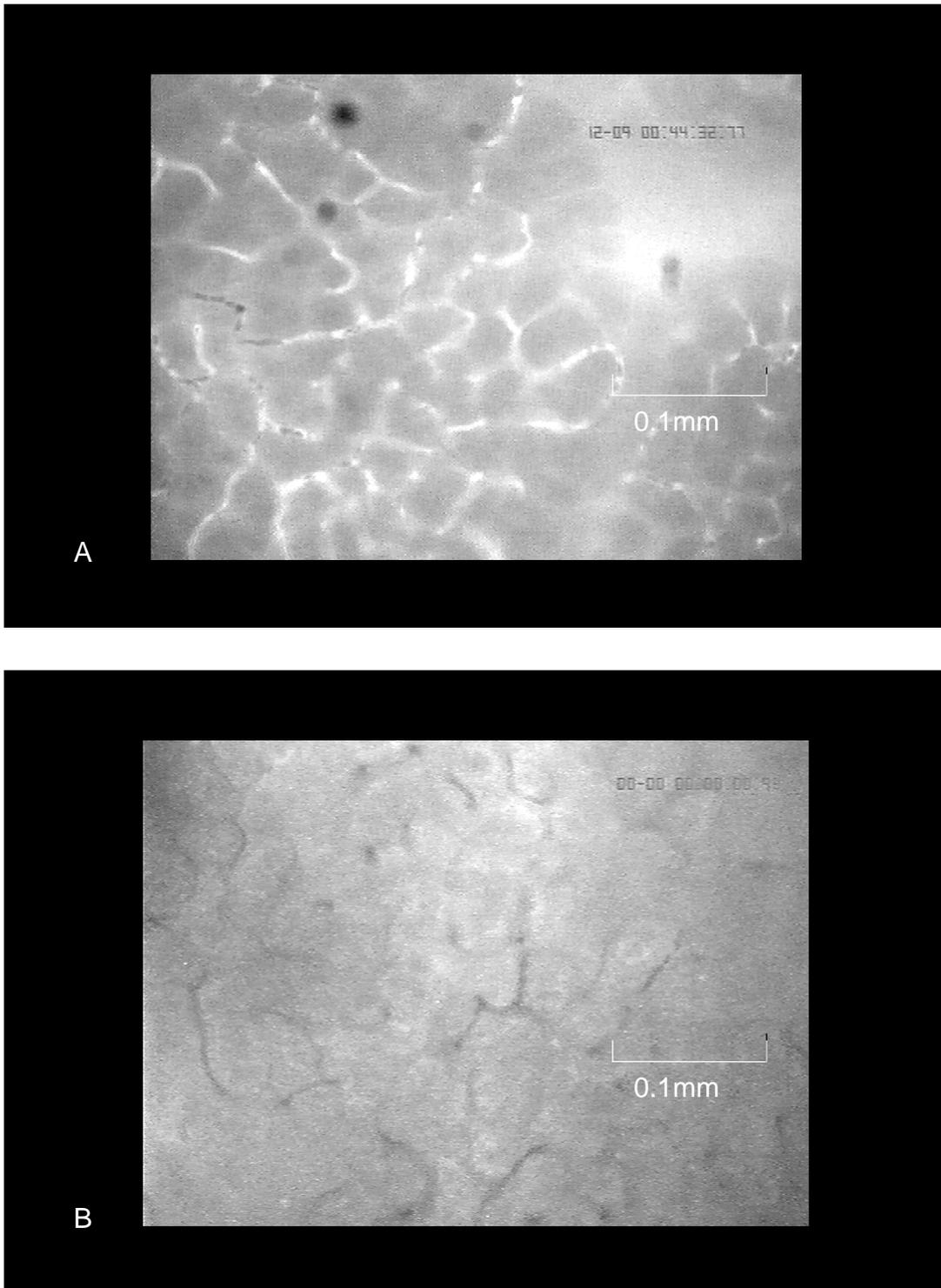


Abbildung 9: *Intravitalmikroskopisches Bild des exokrinen Pankreasgewebes unter Kontrollbedingungen (A) und bei postischämischer Pankreatitis (B). Nach der Injektion des Plasmamarkers FITC-HAES ist das bienenwabenförmige Bild der Pankreaskapillaren deutlich zu sehen. Nach Ischämie und Reperfusion kommt es zu Ödembildung, Kontrastumkehr und Abnahme der Zahl perfundierter Kapillaren.*

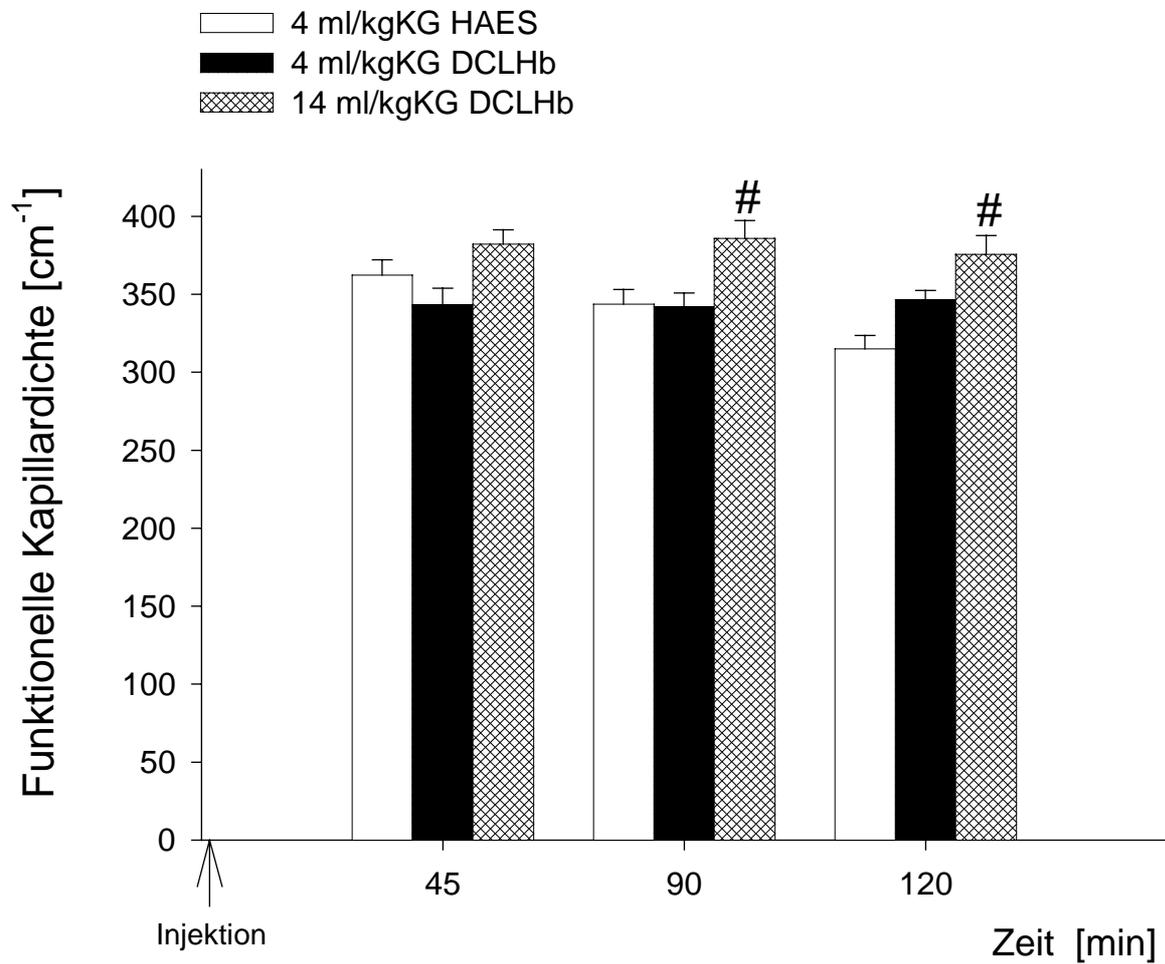


Abbildung 10: Funktionelle Kapillardichte des Pankreas unter Kontrollbedingungen nach DCLHb Infusion. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ signifikant gegenüber HAES (Kontrolle); Dunn's Test.

4.1.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

In allen drei Gruppen kam es während des Versuchs zu einem signifikanten Anstieg der Adhärenz von Leukozyten in postkapillären Venolen. Es zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied im Intergruppenvergleich. (Abb. 11 + 23 A)

4.1.3 Laborparameter

Während des gesamten Versuchsablaufs konnte kein signifikanter Anstieg der Amylaseaktivität sowie der Interleukin-6 Serumkonzentration gemessen werden (Abb. 12 und 13). Der Intergruppenvergleich zwischen den beiden Gruppen zeigte ebenfalls keinen Unterschied. In der Hochdosisgruppe von DCLHb konnten keine Werte erhoben werden, da es zu einer Interaktion des freien Hämoglobins mit dem Assay kam, der durch Verdünnungsschritte nicht ausgeglichen werden konnte.

In den Versuchsgruppen zeigten sich keine signifikanten Veränderungen des pH und des systemischen Hämatokrits während des gesamten Versuchs. Der negative Basenüberschuss der Hochdosisgruppe war gegenüber der HAES behandelten Gruppe 60 und 120 Minuten nach Injektion verringert (Tab.: 2).

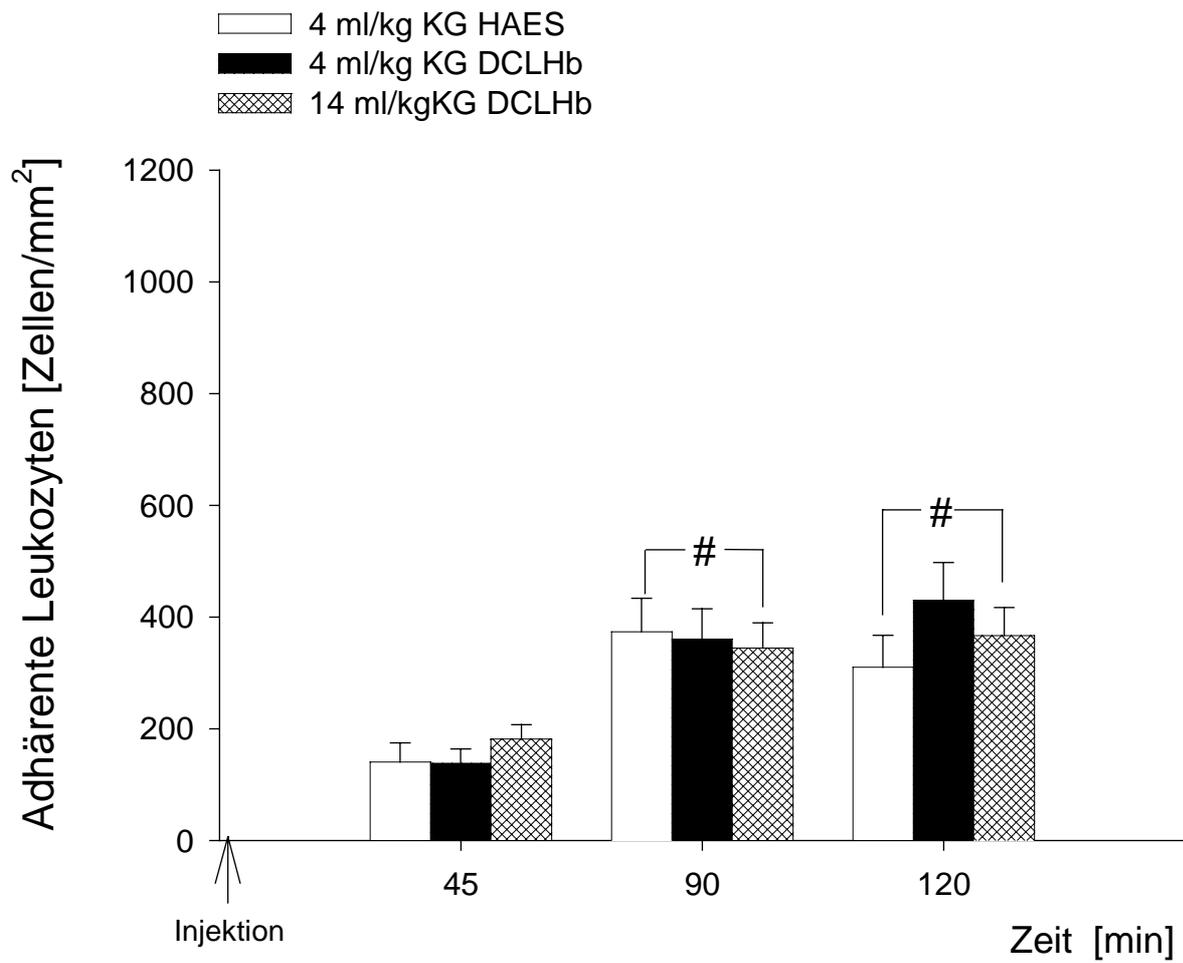


Abbildung 11: Leukozytenadhärenz in postkapillären Venolen des Pankreas nach DCLHb-Infusion unter Kontrollbedingungen. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ gegenüber 45 Minuten Werte; Dunn`s Test.

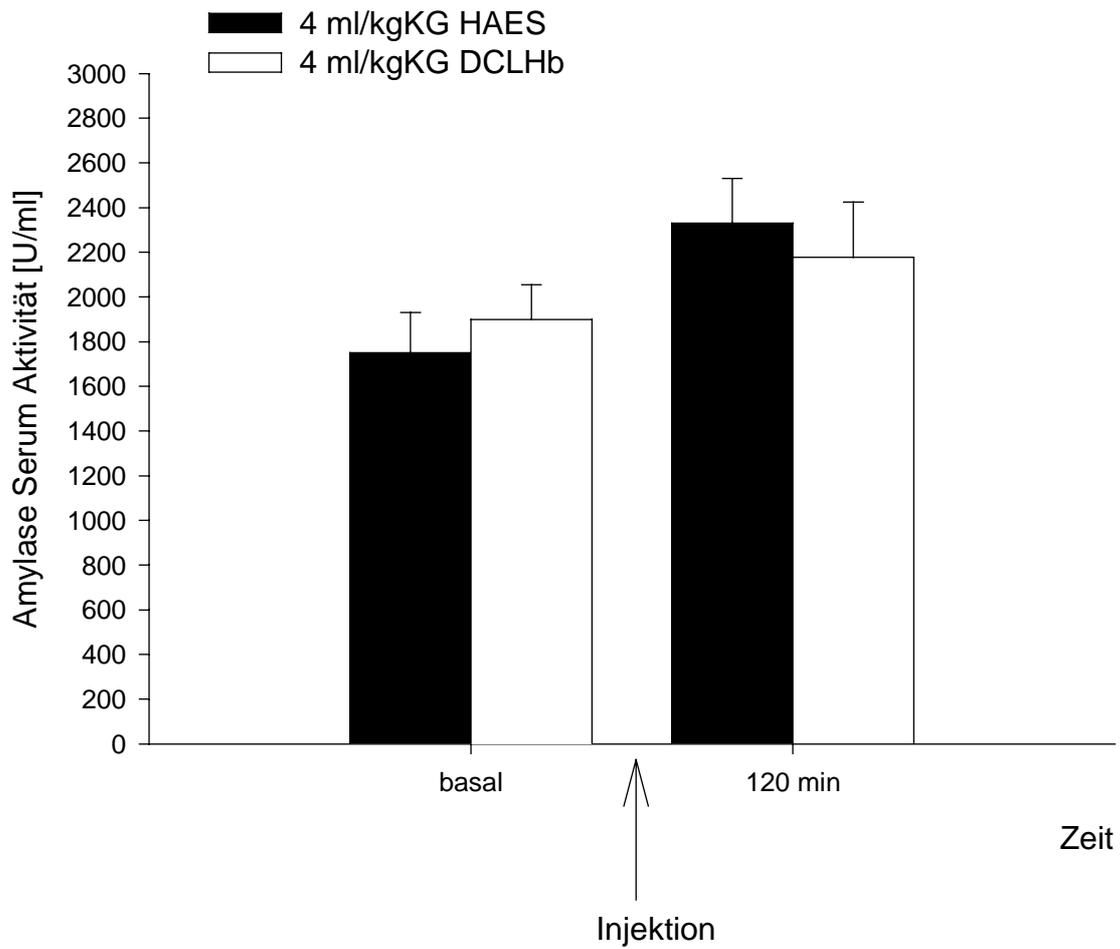


Abbildung 12: Amylase-Serumaktivität vor und am Ende des Versuchs. Mittelwert \pm SEM, keine signifikanten Unterschiede.

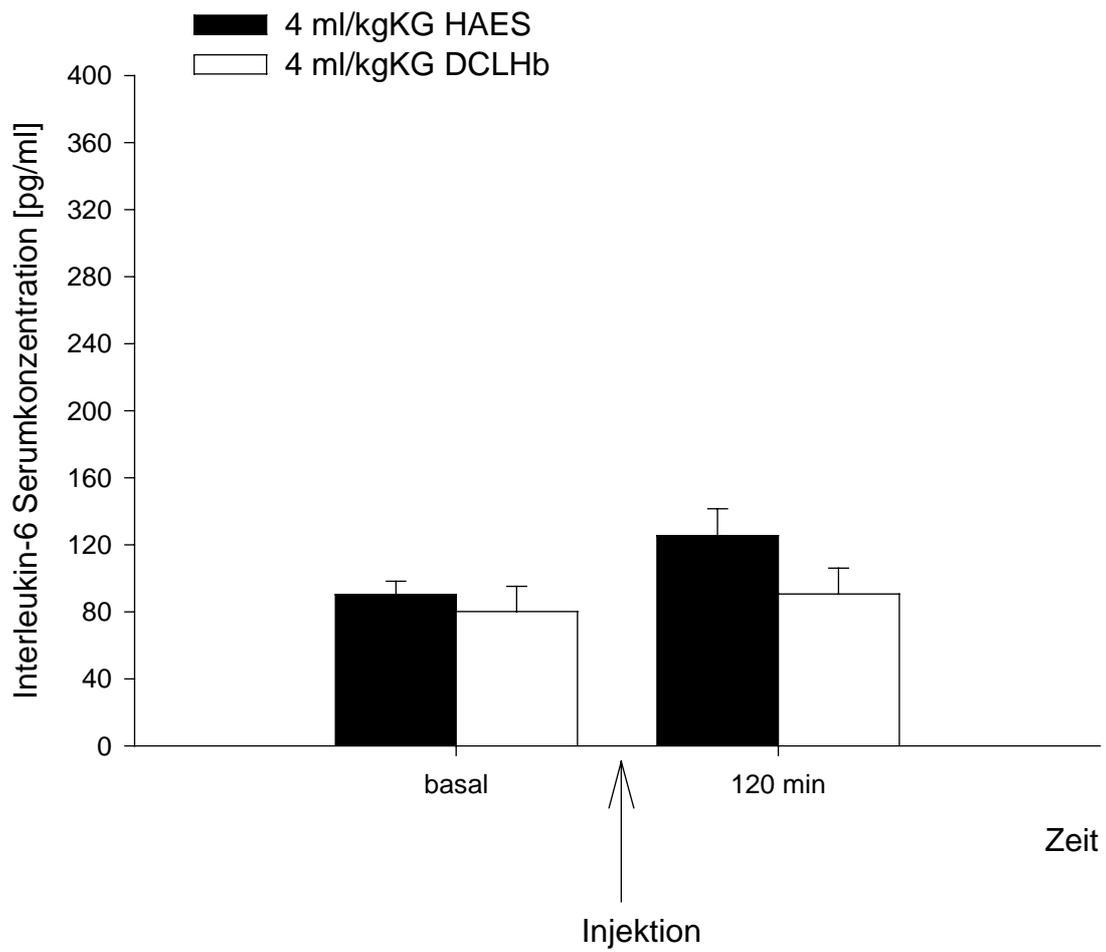


Abbildung 13: Interleukin-6 Serumkonzentration vor und am Ende des Versuchs. Mittelwert \pm SEM, keine signifikanten Unterschiede.

Parameter	Ausgangs- bedingungen	15 min nach Injektion	60 min nach Injektion	120 min nach Injektion
pH				
4 ml/ kgKG HAES	7,40±0,01	7,40±0,01	7,38±0,02	7,37±0,01
4 ml/ kgKG DCLHb	7,42±0,01	7,41±0,01	7,37±0,01	7,37±0,01
14 ml/kg KG DCLHb	7,42±0,01	7,40±0,01	7,43±0,01	7,42±0,01
Basenüberschuß (-mmol/l)				
4 ml/ kgKG HAES	0,8±0,3	1,0±0,3	5,3±0,6	4,8±0,5
4 ml/ kgKG DCLHb	1,8±0,8	1,4±0,9	4,3±0,6	3,9±0,7
14 ml/kg KG DCLHb	1,1±0,8	1,8±0,9	0,7±0,3#	1,3±0,7#
Herzfrequenz (1/min)				
4 ml/ kgKG HAES	420±7	443±16	450±14	423±12
4 ml/ kgKG DCLHb	429±16	438±19	426±18	405±16
14 ml/kg KG DCLHb	383±9	365±22 #	380±20 #	360±20 #
Hämatokrit (%)				
4 ml/ kgKG HAES	41,6±0,9	39,7±0,7	39,8±0,6	39,0±0,7
4 ml/ kgKG DCLHb	41,8±0,9	40,2±0,5	40,7±0,9	39,8±1,1
14 ml/kg KG DCLHb	40,8±1,0	37,4±1,2	36,5±2,5	39,0±0,9

Tabelle 2: Säure-Basenhaushalt, Herzfrequenz und Hämatokrit unter Kontrollbedingungen nach DCLHb-Infusion. Mittelwert ± SEM, # $p < 0,05$ gegenüber HAES (Kontrolle), Dunn`s Test.

4.1.4 Granulozyteninfiltration im Pankreasgewebe

In den mit Esterasefärbung dargestellten Gewebeschnitten des Pankreas zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bezüglich der Infiltration von Leukozyten in das Pankreasgewebe. (HAES Kontrolle: $0,8 \pm 0,5/ \text{mm}^2$; 400 mg/kg DCLHb: $1,2 \pm 1,2/ \text{mm}^2$, 1400 mg/kg DCLHb: $1,6 \pm 0,7/ \text{mm}^2$)

4.2 Normotherme Ischämie und Reperfusion des Pankreas

4.2.1 Makrohämodynamik

Ischämie und nachfolgende Reperfusion nach Öffnung der mikrovaskulären Clips führt zu einem rapiden Abfall des mittleren arteriellen Blutdrucks in den beiden Ischämie-Reperfusionen-Gruppen. Durch die Injektion von HAES blieb dieser über den gesamten Reperusionszeitraum um ca. 25% signifikant gegenüber der sham-operierten Gruppe vermindert. Die intravenöse Infusion der Hämoglobinlösung DCLHb führte zu einem sofortigen Anstieg des mittleren Blutdrucks auf Ausgangswerte. Dieser blieb über den verbleibenden Versuchszeitraum auf diesen Werten stabil (Abb. 14).

4.2.2 Mikrohämodynamik

4.2.2.1 Funktionelle Kapillardichte

Eine Stunde normotherme Ischämie und zwei Stunden Reperfusion des Pankreasgewebes bewirkten eine signifikante Abnahme der Kapillardichte über die drei Meßzeitpunkte während zwei Stunden Reperfusion in der HAES Gruppe (von 266 ± 15 auf $188 \pm 12 \text{ cm}^{-1}$) im Vergleich zur sham-operierten Kontrollgruppe (von 362 ± 10 auf $318 \pm 10 \text{ cm}^{-1}$) (Abb. 15). Durch die Infusion von DCLHb in einer Dosierung von 400 mg/kg KG wurde dieser Perfusionsausfall leicht, aber am Ende der Beobachtungszeit dennoch signifikant ($p < 0,05$) vermindert ($220 \pm 12 \text{ cm}^{-1}$).

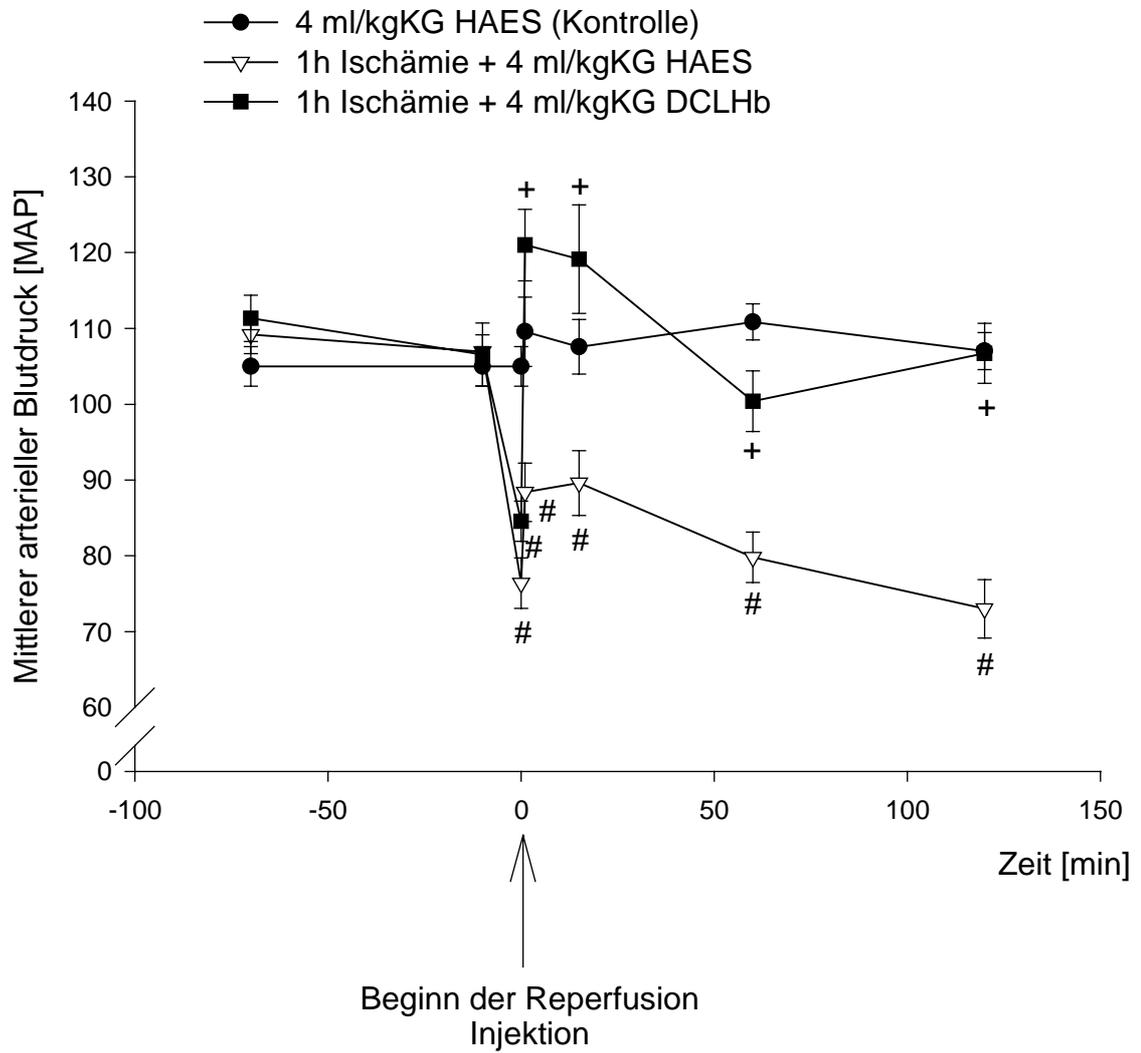


Abbildung 14: Mittlerer arterieller Blutdruck nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas und DCLHb Injektion. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ gegenüber HAES (Kontrolle), Dunn`s Test; + $p < 0,05$ gegenüber HAES, Dunn`s Test;

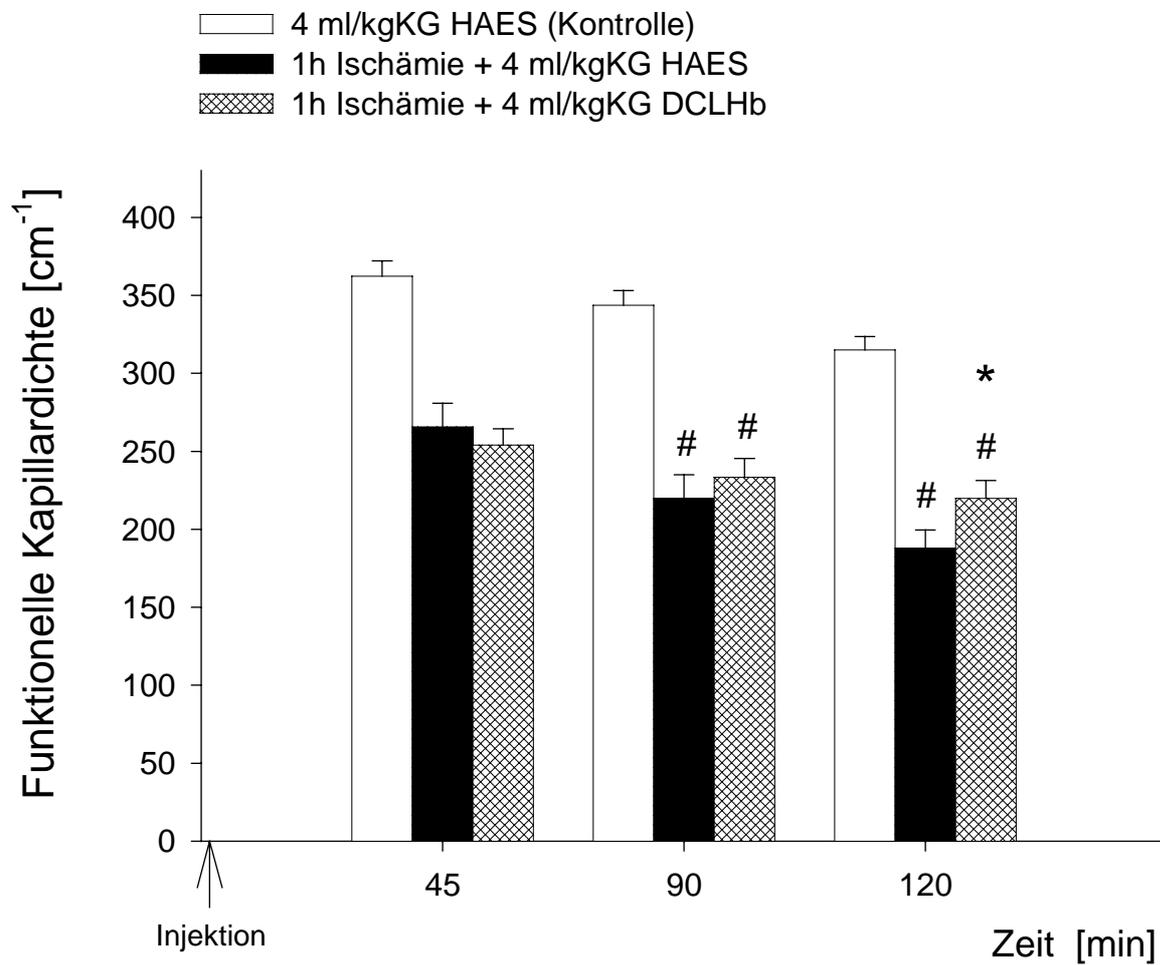


Abbildung 15: Funktionelle Kapillardichte nach Ischämie und Reperfusion des Pankreas und DCLHb Injektion. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ gegenüber HAES (Kontrolle), * $p < 0,05$ gegenüber 1h Ischämie + 4 ml/kgKG HAES; Dunn`s Test.

4.2.2.2 Leukozyten-Endothelzell-Interaktion

Die Anzahl adhärenter Leukozyten in postkapillären Venolen nach Ischämie und Reperfusion war im Vergleich zur sham-operierten Gruppe deutlich erhöht. Durch die DCLHb Behandlung war dieser Effekt in der Ischämiegruppe im Vergleich zur HAES behandelten Gruppe signifikant ($p < 0,05$) geringer ausgeprägt (Abb. 16 +23 B).

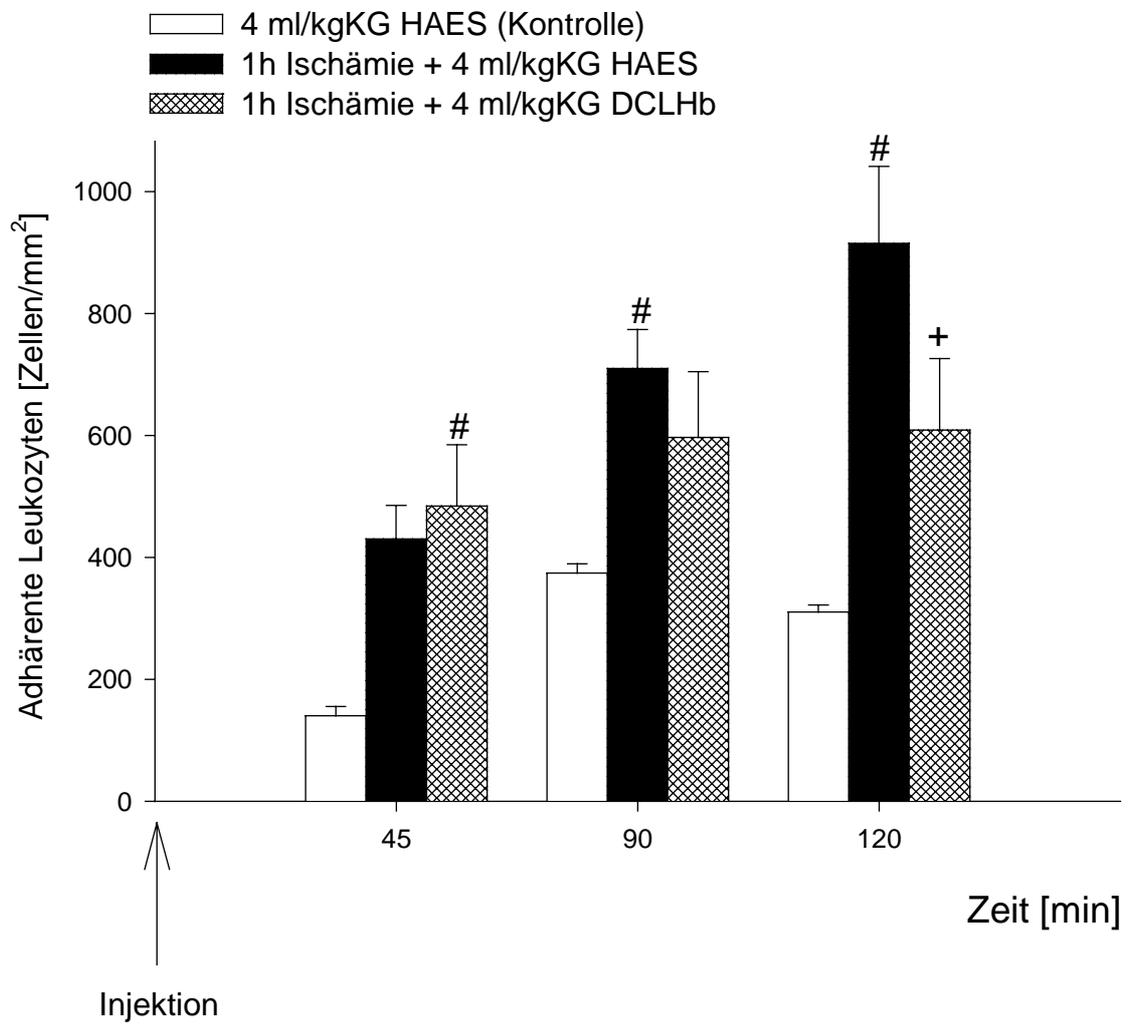


Abbildung 16: Adhärente Leukozyten nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas sowie HAES oder DCLHb Injektion. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ gegenüber HAES (Kontrolle), + $p < 0,05$ gegenüber 1h Ischämie + HAES; Dunn's Test.

4.2.3 Laborparameter

Ein signifikanter Anstieg sowohl der Amylaseaktivität als auch der Interleukin-6 Serumkonzentration während des Versuchszeitraums trat nur in der HAES-behandelten Ischämiegruppe auf. In der DCLHb Gruppe kam es zu keinem Anstieg der beiden Serumparameter (Abb 17 + 18).

Nach 60 und 120 Minuten Reperfusion kam es in beiden Ischämiegruppen zu einer Azidose mit einem signifikanten Abfall des pH-Wertes (Tabelle 3), der jedoch zwischen den beiden Gruppen keinen Unterschied aufwies. Der Basenüberschuß zeigte sowohl während Ischämie als auch Reperfusion keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden Ischämiegruppen.

4.2.4 Granulozyteninfiltration im Pankreasgewebe

In den Gewebeschnitten des Pankreas zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen bezüglich der Infiltration von Leukozyten in das Pankreasgewebe (HAES Kontrolle: $0,8 \pm 0,5/ \text{mm}^2$; Ischämie + HAES: $39,1 \pm 20,2/ \text{mm}^2$, Ischämie + 400 mg/kg DCLHb: $6,1 \pm 3,6/ \text{mm}^2$).

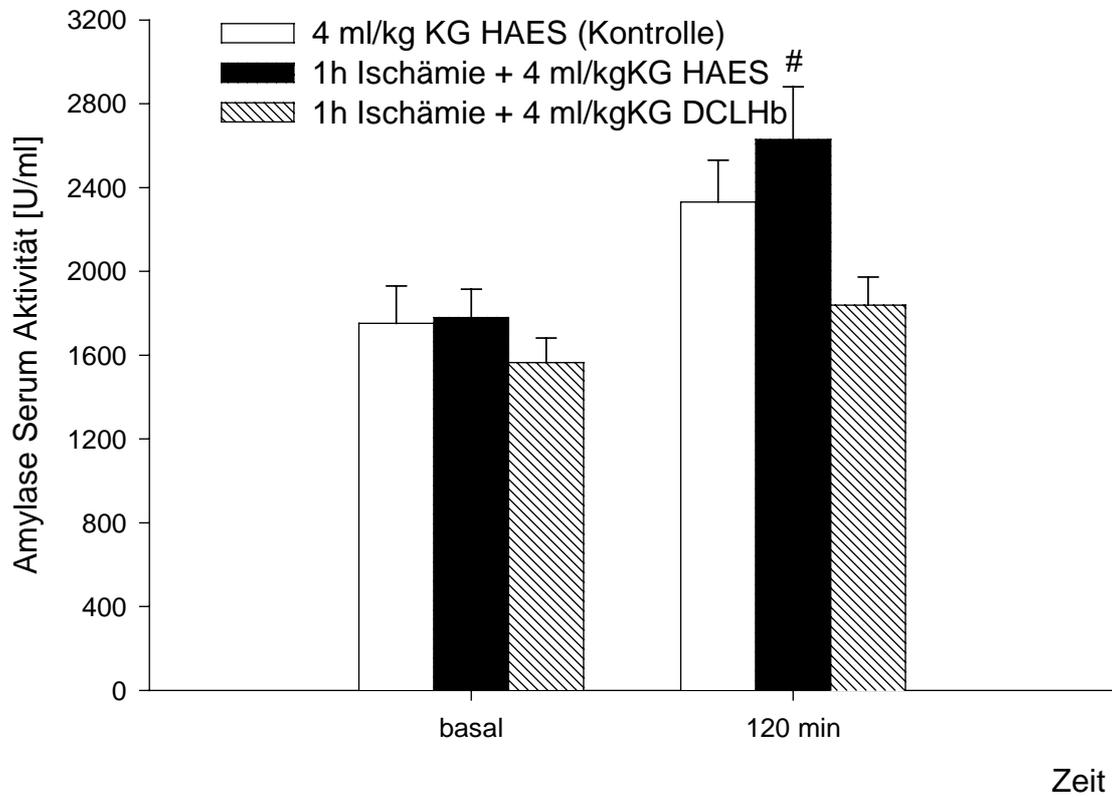


Abbildung 17: Amylase-Serumaktivität vor und 120 Minuten nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas und DCLHb Injektion. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ signifikant gegenüber basal; Dunn`s Test.

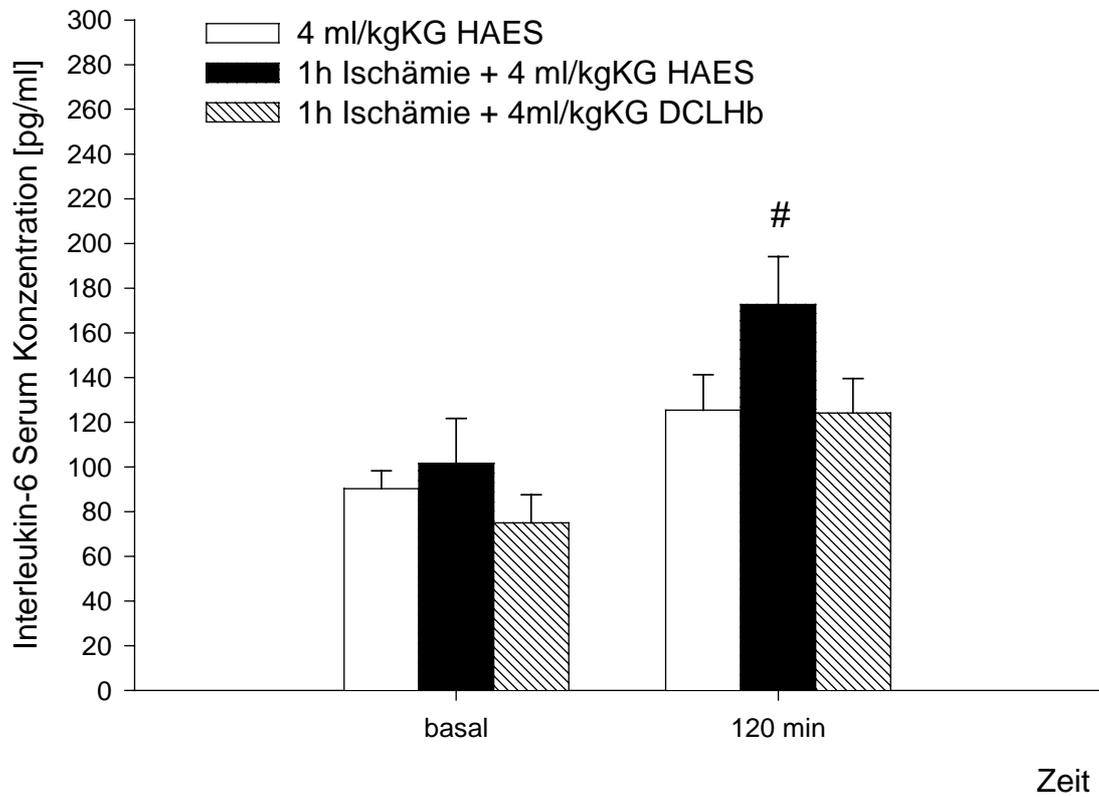


Abbildung 18: Interleukin-6 Serumkonzentration vor und 120 Minuten nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas und DCLHb Injektion. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ gegenüber basal; Dunn's Test.

Parameter	Ausgangs- bedingungen	Ischämie	15 min nach Injektion	60 min nach Injektion	120 min nach Injektion
pH					
4ml/kgKG HAES (sham)	7,40±0,01	7,40±0,02	7,40±0,01	7,38±0,02	7,37±0,01
1h Ischämie + HAES	7,42±0,01	7,38±0,01	7,36±0,01	7,32±0,01 #	7,30±0,02 #
1h Ischämie + DCLHb	7,40±0,01	7,38±0,01	7,38±0,02	7,32±0,01 #	7,31±0,02 #
Basenüberschuß (-mmol/l)					
4ml/kgKG HAES (sham)	0,8±0,3	0,9±0,3	1,0±0,3	5,3±0,6	4,8±0,5
1h Ischämie + HAES	0,5±0,6	5,1±0,9	4,0±0,3	7,8±0,7	9,3±0,8
1h Ischämie + DCLHb	1,7±0,6	4,7±0,9	3,5±0,9	7,7±0,7	9,4±0,9
Herzfrequenz (1/min)					
4ml/kgKG HAES (sham)	420±7	430±8	443±16	450±14	423±12
1h Ischämie + HAES	430±10	406±12	411±16	403±9	419±14
1h Ischämie + DCLHb	430±15	419±23	431±17	403±13	396±12
Hämatokrit (%)					
4ml/kgKG HAES (sham)	41,6±0,9	41,3±0,5	39,7±0,7	39,8±0,6	39,0±0,7
1h Ischämie + HAES	43,0±0,5	41,4±0,7	39,9±0,7	42,7±0,8	42,1±1,1
1h Ischämie + DCLHb	43,6±0,6	43,4±0,6	43,0±0,6 #	41,2±1,0	40,0±1,0

Tabelle 3: Säure-Basenhaushalt, Herzfrequenz und Hämatokrit unter Kontrollbedingungen und nach normothermer Ischämie und Reperfusion des Pankreas nach DCLHb Infusion. Mittelwert ± SEM, # $p < 0,05$ gegenüber HAES (Kontrolle); Dunn`s Test.

4.3 Hämorrhagischer Schock

4.3.1 Makrohämodynamik

Zur Induktion und Aufrechterhaltung des hämorrhagischen Schocks wurde den Versuchstieren in der Hydroxiäthylstärke-Gruppe $6,6 \pm 0,8$ ml, in der DCLHb-Gruppe $8,1 \pm 0,8$ ml und in der Vollblut Gruppe $8,4 \pm 1,0$ ml Blut aus dem arteriellen Katheter entnommen. DCLHb und Vollblut bewirkten unmittelbar nach intravenöser Injektion eine Wiederherstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks auf Werte wie in der Kontrollgruppe (Abb.19). Die Blutdruckwerte in der Hydroxiäthylstärke behandelten Gruppe waren im Vergleich zu DCLHb und Vollblut im gesamten Reperfusionzeitraum signifikant geringer. Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den experimentellen Gruppen bezüglich der Herzfrequenz (Tabelle 4).

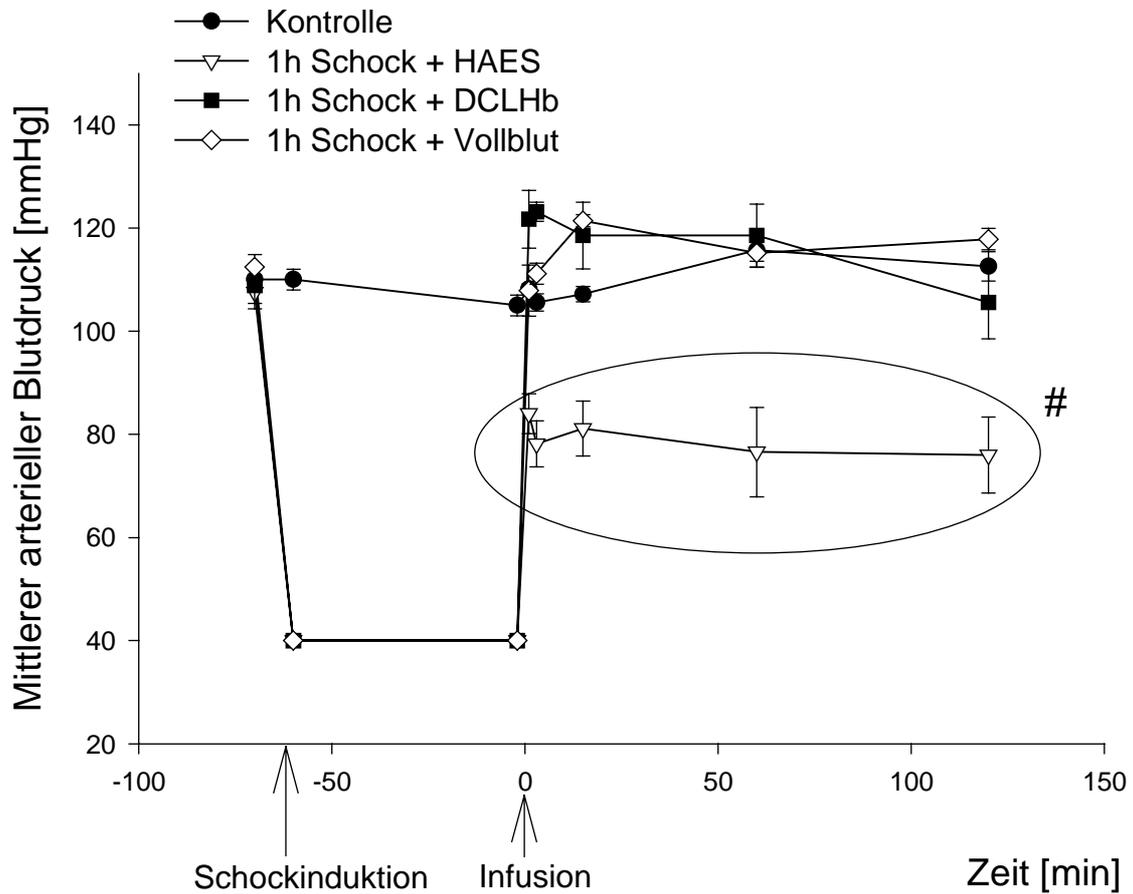


Abbildung 19: Mittlerer arterieller Blutdruck nach einer Stunde hämorrhagischem Schock. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle, DCLHb, Vollblut und Zeitpunkt vor Schockinduktion, Dunn`s und Dunnet`s Test.

4.3.2 Mikrohämodynamik

4.3.2.1 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte (FKD) des exokrinen Pankreas war in allen Versuchsgruppen nach Schock-Induktion und Reperfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe während des gesamten Beobachtungszeitraums signifikant reduziert (Abb.20). Zwei Stunden nach Reinfusion wurde die FKD in der HAES-Gruppe zu 66%, in der DCLHb Gruppe zu 80% und in der Vollblutgruppe zu 84% im Vergleich zur Kontrollgruppe ($366 \pm 28 \text{ cm}^{-1}$) wiederhergestellt. Zu diesem Zeitpunkt waren die gemessenen FKD-Werte der DCLHb- und Vollblut-behandelten Gruppe signifikant höher als bei den HAES-behandelten Tieren. Während des ganzen Untersuchungszeitraums zeigten die FKD-Werte zwischen der DCLHb und der Vollblutgruppe keine signifikanten Unterschiede.

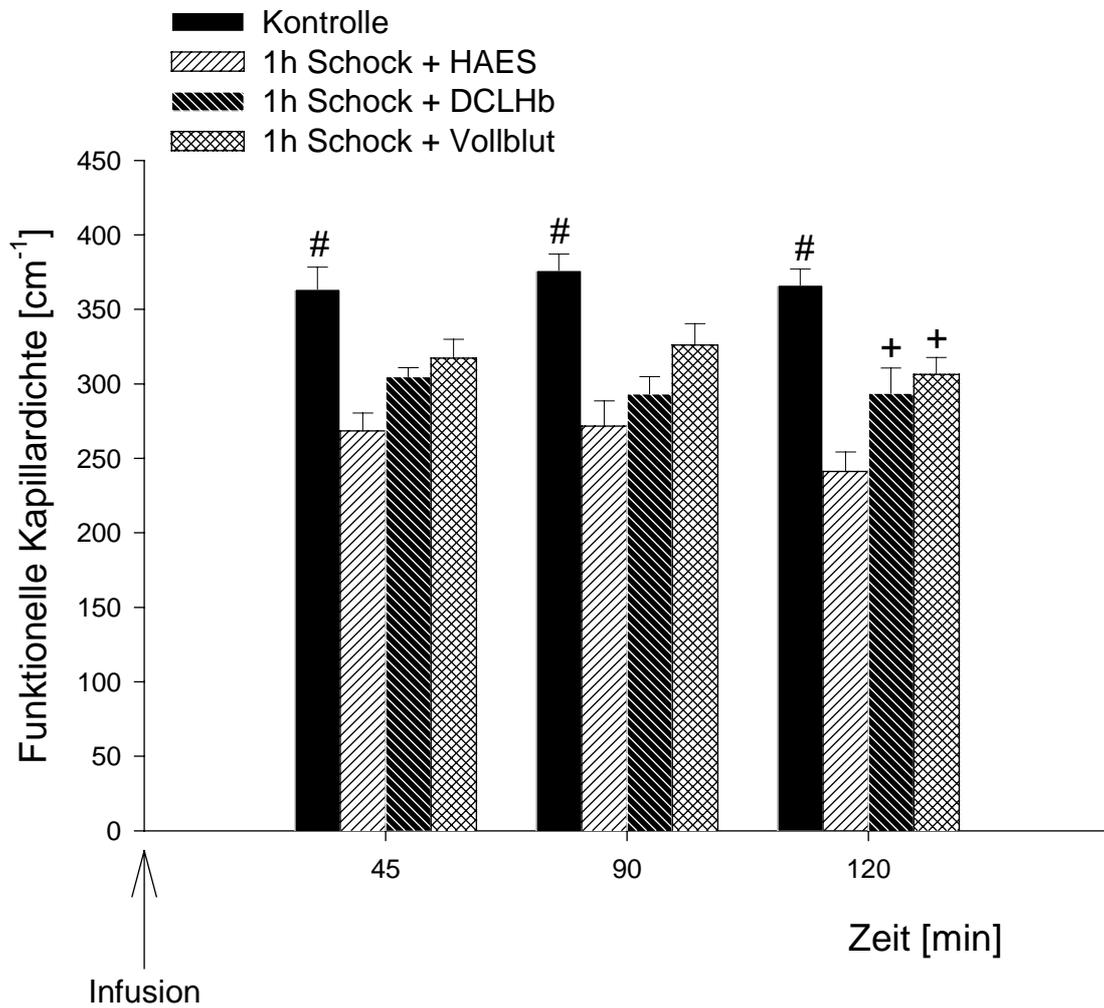


Abbildung 20: Funktionelle Kapillardichte des Pankreas nach einer Stunde hämorrhagischem Schock und Reinfusion von HAES, DCLHb oder Vollblut. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ gegenüber HAES, DCLHb und Vollblut, + $p < 0,05$ gegenüber HAES.

4.3.2.2 Leukozyten-Endothel-Interaktion

Am Ende der Beobachtungszeit war die Adhärenz der Leukozyten in postkapillären Venolen in der HAES behandelten Schockgruppe im Vergleich zur Kontrollgruppe (149 ± 111 Zellen/mm²) signifikant ($p < 0,01$) um den Faktor 4,1 erhöht (Abb.21). Auch in der DCLHb- und der Vollblutgruppe stieg die Anzahl adhärenter Leukozyten deutlich an, jedoch ohne einen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

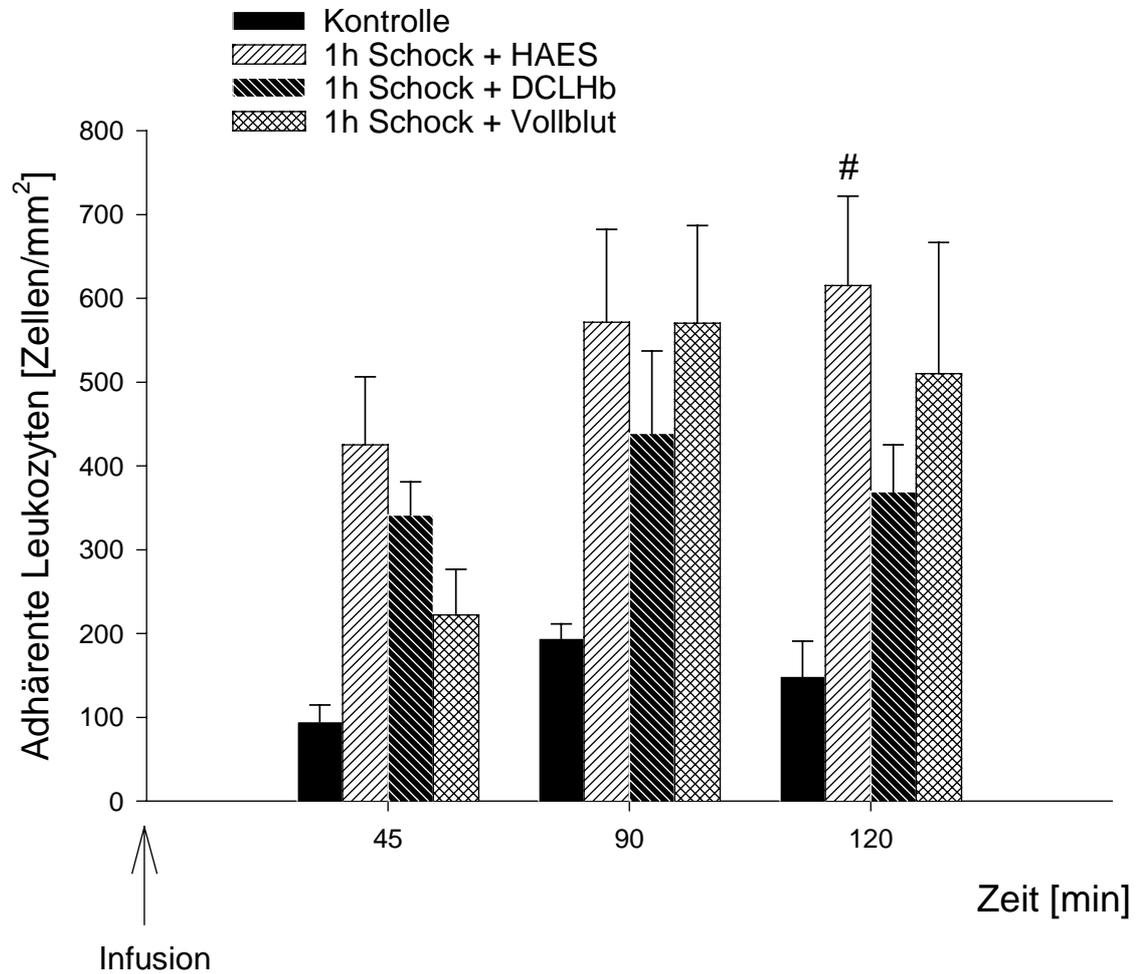


Abbildung 21: Adhärenz von Leukozyten in postkapillären Venolen nach hämorrhagischem Schock und Reinfusion von HAES, DCLHb oder Vollblut. Mittelwert \pm SEM, # $p < 0,05$ gegenüber Kontrolle.

4.3.3 Laborparameter

Nach Induktion des hämorrhagischen Schocks waren die Hämatokrit-Werte der HAES-behandelten Gruppe signifikant höher als in den anderen beiden Gruppen. Während der Beobachtungszeit nach Gabe der Infusionslösungen waren die Hämatokritwerte in der DCLHb- und Hydroxiäthylstärke-Gruppe signifikant geringer im Vergleich zur Vollblutgruppe und zur sham-operierten Kontrollgruppe. 15 Minuten nach Gabe der Infusionslösung bewirkte die Infusion von HAES sogar einen signifikant geringeren Hämatokritwert im Vergleich zu DCLHb. Im Gegensatz dazu führte die DCLHb-Gabe im Vergleich zur HAES-Gabe zu signifikant höheren Hämoglobin-Konzentrationen während des gesamten Reperfusionzeitraums (Tab. 4). Zur Aufrechterhaltung eines ausreichenden arteriellen Sauerstoffpartialdrucks während der ersten 15 Minuten nach Infusion von DCLHb mußten die jeweiligen Versuchstiere mit einer um mindestens 20% gesteigerten Fraktion des Sauerstoffs in der Inspirationsluft beatmet werden. Dies führte zu einem signifikanten ($p < 0,0005$) Abfall des $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ -Verhältnisses zu diesem Zeitpunkt im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen (Tabelle 5). Durch die Induktion der Hämorrhagie stieg der negative Basenüberschuß und die Konzentration von Laktat im Blut signifikant ($p < 0,05$) im Vergleich zur Kontrollgruppe an. DCLHb bewirkte eine deutliche Verbesserung der Azidose im Vergleich zur HAES-Behandlung am Ende der Beobachtungszeit. Während des gesamten Beobachtungszeitraums gab es keine signifikanten Unterschiede der Blut-Laktat-Konzentration in allen drei Therapiegruppen.

Parameter	Ausgangs- bedingungen	Schock	15 min nach Injektion	60 min nach Injektion	120 min nach Injektion
Herzfrequenz (1/min)					
Kontrolle	370 ± 10	370 ± 8	367 ± 15	361 ± 8	364 ± 21
1h Schock + HAES	355 ± 21	352 ± 43	327 ± 32	321 ± 25	324 ± 26
1h Schock + DCLHb	383 ± 26	330 ± 30*	352 ± 21	346 ± 40	324 ± 26*
1h Schock + Vollblut	358 ± 30	334 ± 35	346 ± 26	330 ± 21	355 ± 27
Hämatokrit (%)					
Kontrolle	39 ± 2	39 ± 2	40 ± 1	41 ± 2	39 ± 2
1h Schock + HAES	41 ± 2	31 ± 5*+§	15 ± 3*+§	18 ± 3*+§	19 ± 3*+§
1h Schock + DCLHb	40 ± 3	25 ± 2*+#	18 ± 6*+§	19 ± 4*+§	18 ± 4*+§
1h Schock + Vollblut	42 ± 2	26 ± 5*+	38 ± 3	40 ± 2	37 ± 4
Hämoglobin (g/dl)					
Kontrolle	12,5 ± 0,4	12,8 ± 0,4	12,9 ± 0,8	12,9 ± 0,9	12,7 ± 1,0
1h Schock + HAES	13,0 ± 0,6	9,7 ± 0,9*+	5,4 ± 0,8*+§	6,1 ± 1,0*+§	6,0 ± 0,8*+§
1h Schock + DCLHb	12,7 ± 1,0	8,8 ± 0,5*+	9,0 ± 1,4*+#	9,8 ± 2,0*+#	8,0 ± 1,3*+#
1h Schock + Vollblut	13,7 ± 0,7	8,6 ± 1,6*+	12,6 ± 0,8	12,7 ± 0,9	12,1 ± 0,8

Tabelle 4: Herzfrequenz, Hämatokrit und Hämoglobinkonzentration nach hämorrhagischem Schock und Infusion eines Blutersatzstoffs oder Vollblut, Mittelwert ± SD, * $p < 0,05$ gegen Ausgangswert, + $p < 0,05$ gegen Kontrolle # $p < 0,05$ gegen HAES, § $p < 0,05$ gegen Vollblut.

Parameter	Ausgangs- bedingungen	Schock	15 min nach Infektion	60 min nach Injektion	120 min nach Injektion
Pa₀₂/Fi₀₂					
Kontrolle	332±45	299±38	306±53	292±28	290±28
1h Schock + HAES	279±46	359±29	256±48	281±33	309±51
1h Schock + DCLHb	278±35	393±49#	151±46§#&*	251±84	331±86
1h Schock + Vollblut	335±59	369±36	282±27	306±33	304±31
pH					
Kontrolle	7.38±0.02	7.38±0.02	7.38±0.01	7.37±0.03	7.35±0.02
1h Schock + HAES	7.41±0.03	7.35±0.05	7.27±.09§#*	7.33±0.05§	7.33±0.04§
1h Schock + DCLHb	7.40±0.02	7.37±0.06	7.34±0.05&	7.39±0.04&	7.43±0.03&#
1h Schock + Vollblut	7.42±0.02	7.36±0.04	7.33±0.05§	7.37±0.03	7.36±0.02
Base excess (mM)					
Kontrolle	-1.1±1,6	-1.1±1.6	-1.3±2.1	-1.7±1.9	-2.2±1
1h Schock + HAES	-1.3±1.0	-7.0±3.4§#	-6.2±4.0§#	-3.9±3.8	-4.0±4.2
1h Schock + DCLHb	-0.6±1.5	-5.9±1.2§#	-1.5±1.6&	0.4±3.4	0.5±2.6
1h Schock + Vollblut	-1.6±0.9	-6.5±3.5§#	-4.8±3.6	-3.5±2.3	-3.0±1.0
Laktat (mM)					
Kontrolle	1.0±0.2	1.0±0.2	0.9±0.3	1.0±0.2	0.7±0.2
1h Schock + HAES	0.7±0.3	3.6±1.6§#	1.9±1.3	1.0±2.0	1.1±0.6
1h Schock + DCLHb	0.8±0.6	3.3±2.3§#	1.6±0.4	0.8±0.9	0.9±0.1
1h Schock + Vollblut	0.6±0.1	2.4±0.6§	0.9±0.1	0.7±0.2	0.6±0.1

Tabelle 5: Verhältnis von Pa₀₂ und Fi₀₂, sowie pH, Base excess und Laktat nach hämorrhagischem Schock und Infusion eines Blutersatzstoffs, Mittelwert ± SD, § p<0,05 gegen Ausgangswert, # p< 0,05 gegen Kontrolle & p< 0,05 gegen HAES, * p<0,05 gegen Vollblut.

4.3.4 Lipidperoxidation

2 Stunden nach Reinfusion der Infusionslösungen wurde die Konzentration der Thiobarbitursäure-reaktiven Substanzen (TBARM) als Parameter für den oxidativen Streß im Pankreasgewebe gemessen. In der Kontrollgruppe konnte mit der von uns verwendeten Methode kein Nachweis von solchen Substanzen erzielt werden (Abb.22). Die Behandlung der beiden Gruppen mit DCLHb bzw. Vollblut ($4,8 \pm 0,7$ bzw. $3,7 \pm 0,7$ nmol/g) führte zu einem signifikanten ($p < 0,05$) Anstieg der TBARM Konzentration im Vergleich zur Kontroll- und HAES-behandelten Gruppe. Zwischen den beiden mit Sauerstoff-transportierenden Lösungen behandelten Gruppen zeigte sich kein signifikanter Unterschied (Abb. 22).

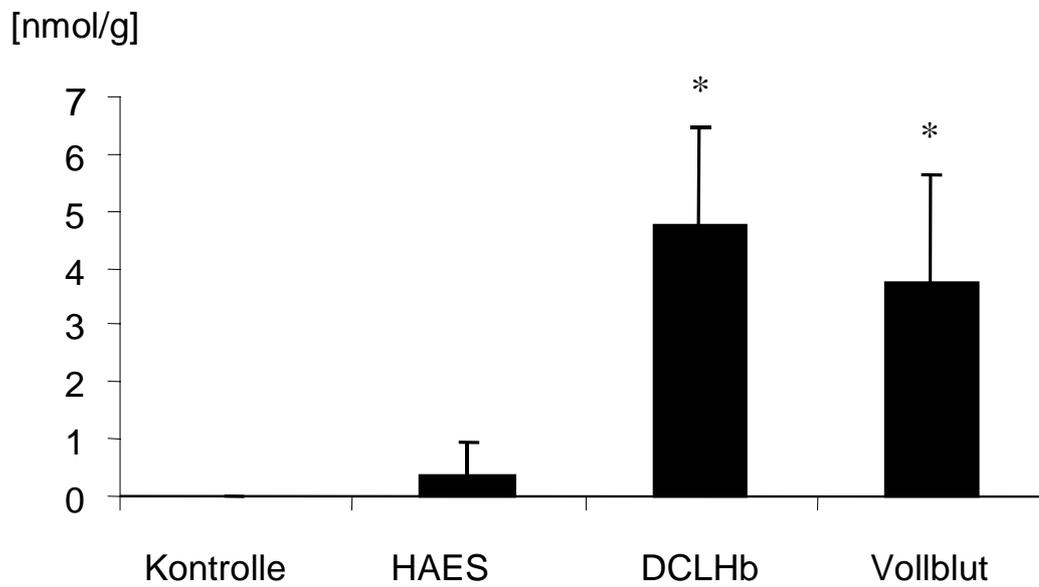


Abbildung 22: Thiobarbitursäure-reaktive Substanzen im Pankreasgewebe als indirekter Parameter der Sauerstoffradikalbildung nach hämorrhagischem Schock und Reinfusion von HAES, DCLHb oder Vollblut, Mittelwert \pm SD, $p < 0,05$ signifikant im Vergleich zur Kontrollgruppe und zur HAES behandelten Gruppe.

5. Diskussion

5.1 Diskussion der Methodik

5.1.1 Diskussion der experimentellen Modelle

5.1.1.1 Modell der experimentellen Pankreatitis

1856 induzierte Bernard durch Einspritzen von Galle und Olivenöl in den Pankreasgang eines Hundes erstmalig eine experimentelle akute Pankreatitis¹⁹. In der Folge wurden viele verschiedene Tiermodelle entwickelt, die dieses Krankheitsbild zur Untersuchung von Therapiemaßnahmen simulieren und Erkenntnisse über die Pathophysiologie liefern sollten. Trotz der großen Zahl an Veröffentlichungen mit diesen Modellen, gibt es bis heute kein geeignetes spezifisches Therapeutikum für die Behandlung der akuten Pankreatitis. Auch die initialen Mechanismen einer akuten Pankreatitis sind nicht vollständig geklärt. Dieses Problem wurde gerade in letzter Zeit durch den geringen Erfolg zweier klinischer Studien mit dem PAF-Antagonisten Lexipafant¹⁰⁵ sowie dem Sekretin Analogon Oktreotid²²⁰ deutlich. In beiden Studien hatten tierexperimentelle Untersuchungen eine gute Wirksamkeit der Arzneistoffe ergeben^{140, 163}. Bei einem retrospektiven Vergleich von verschiedenen klinischen und experimentellen Studien zur akuten Pankreatitis konnte gezeigt werden, daß Therapeutika, die in 81% der Tierstudien zu einer Verbesserung der Überlebensrate führten, nur in 10% der klinischen Studien von Nutzen waren²¹⁰. Die hohe Diskrepanz zwischen den Experimenten und der klinischen Forschung bei der akuten Pankreatitis ist somit ein ungelöstes Phänomen. Bezogen auf die jeweilige Fragestellung ist deshalb eine sorgfältige Auswahl des zur Anwendung kommenden Tiermodells von besonderer Bedeutung.

In Tabelle 6 sind die gängigsten experimentellen *in vivo* Modelle der akuten Pankreatitis dargestellt. Entsprechend des experimentellen Aufbaus werden hierbei Modelle unterschieden, welche die akute Pankreatitis durch a) hormonelle Überstimulation, b) Nahrungsmittelzusätze c) Injektion von Agentien in den Ductus pancreaticus d) Ligatur des Ductus und e) vaskulär ischämische Mechanismen auslösen.

Die Modelle basieren weitestgehend auf vier Theorien, die bisher zur Entstehung der akuten Pankreatitis existieren:

1) Der amerikanische Pathologe Opie fand 1901 bei einem Patienten einen eingeklemmten Gallenstein im Ductus choledochus, welcher die Öffnung des Ductus pancreaticus verschlossen hatte¹⁶⁰. Er postulierte, daß der Aufstau von Pankreassekret zur Auslösung einer akuten Pankreatitis führt (erste-Opie Theorie). Dieser Theorie kommen die Modelle mit Ligation des Ductus pancreaticus beim Kaninchen¹⁸³ und am Opossum¹⁹⁸ am nächsten, bei denen hierdurch eine ödematöse Pankreatitis induziert werden kann.

Table 6: Experimentelle Modelle der akuten Pankreatitis nach Al-Mufti³, Banerjee¹³, Buehler²⁸, und Lerch¹²⁷,

Modell	Spezies	Morphologie der Pankreatitis
<i>a) Überstimulation:</i> Cerulein	Ratte, Hund Maus	ödematös
Skorpiontoxin Cholinesterase-Intoxikation	Ratte, Hund Hund	ödematös, nekrotisierend ödematös
<i>b) Nahrung:</i> Cholin-defiziente Ethionin-supplementierte Diät	weibl. Maus	nekrotisierend
<i>c) Ganginfusion:</i> Taurocholat Galle	Ratte, Hund Hund	nekrotisierend hämorrhagisch
<i>d) Gangverschuß:</i> Sphinkter Oddi Ductus pancreaticus + choledochus Ductus pancreaticus Duodenum	Opossum Opossum Opossum Ratte, Hund	nekrotisierend nekrotisierend ödematös nekrotisierend
<i>e) Vaskulär-ischämisch:</i> Arterielle Verschlüsse Mikrosphäreninjektion Pankreastransplantation	Ratte, Hund Ratte Ratte, Schwein	ödematös, nekrotisierend ödematös, nekrotisierend ödematös, nekrotisierend

- 2) Die retrograde Infusion von Gallensalzen in den Ductus pancreaticus der Ratte^{2, 80} und des Hundes²¹² basiert auf der zweiten Theorie von Opie. Nachdem er einen eingeklemmten Gallenstein in der Papilla Vateri bei einem Patienten mit einem gemeinsamen Ausführungsgang von Pankreas und Gallengang (common channel) vorfand, postulierte er, daß der Rückstau des Gallesekrets in das Pankreas und die hierdurch ausgelöste Enzymaktivierung zu einer Andauung des Organs und somit zu einer akuten Pankreatitis führt¹⁶¹. Eine klinische Beobachtung mit sehr großer Bedeutung relativiert die Relevanz dieser Theorie: Nachdem nach einer Gallenstein-bedingten Cholezystektomie mittels eines T-Drains die gesamte Galle aus dem Gallengang abgeleitet wurde, entwickelte der Patient dennoch aufgrund eines eingeklemmten Steines in der Papilla Vateri eine akute Pankreatitis, die sich nach der Entfernung des Steines vollständig zurückbildete¹²⁸. Eine Beteiligung von Galle an der Entstehung der akuten Pankreatitis ist somit unwahrscheinlich. Außerdem übersteigt der im Pankreasgang vorherrschende Druck den im Ductus choledochus, was zu einem Reflux von Pankreassekret in den Gallengang und nicht umgekehrt führen müßte³⁵. Der kausale Faktor für die Induktion einer bilären akuten Pankreatitis wird somit dem Rückstau von Pankreassekret im Pankreasgang angelastet. Die klinische Relevanz von Modellen mit Reflux von Galle in den Pankreasgang scheint somit in Bezug auf die Untersuchung von Pathomechanismen der akuten Pankreatitis fraglich, und die zitierten Veröffentlichungen weisen auf die erhebliche Relevanz der ersten Opie-Theorie hin. Lediglich die Erforschung von Therapiemaßnahmen und systemischen Komplikationen einer akuten Pankreatitis erscheinen mit diesen Modellen sinnvoll. Die beiden ersten Theorien und experimentellen Ansätze beziehen sich ausschließlich auf die Entstehung der bilären Pankreatitis. Ursachen der ähnlich häufigen alkoholtoxisch induzierten Pankreatitis sowie durch andere Faktoren ausgelöste Pankreatitiden werden durch diese nicht berücksichtigt.
- 3) Reflux aus dem Duodenum als Ursache für die Aktivierung von Pankreasenzymen und Auslösung einer akuten Pankreatitis ist die Grundlage der Modelle von Seidel¹⁹⁷ und Pfeffer¹⁶⁷. Hierbei wird den Tieren oberhalb und unterhalb der Papilla Vateri das Duodenum ligiert, was zu einer geschlossenen Duodenum-Schleife führt. Dieser Theorie wird in der neueren Literatur wegen fehlender klinischer Relevanz wenig Bedeutung beigemessen und das Modell in letzter Zeit nicht mehr verwendet.
- 4) Vaskuläre Ursachen der akuten Pankreatitis sind die Grundlage des in unserer Arbeit verwendeten Modells. Die vaskuläre Theorie geht zurück auf die experimentelle

Auslösung einer akuten Pankreatitis durch die intraarterielle Injektion von Wachskugeln in Pankreasarterien durch Pannum im Jahre 1862¹⁶². Hierdurch wurde zum ersten mal bewiesen, daß durch eine Unterbrechung der Blutzufuhr zum Pankreas, experimentell eine akute Pankreatitis ausgelöst werden kann. Diese Theorie wurde, wie in der Einleitung bereits beschrieben, durch verschiedene klinische Beobachtungen des Auftretens der akuten Pankreatitis nach Schock²³⁶, Pankreastransplantation³¹, Bypassoperation⁵⁶, Aortenaneurysmaoperation⁷³ und arterieller Embolie¹⁸¹ bestätigt. Durch die Injektion von Mikrosphären mit einem Durchmesser von 10-20 µm in die Arteria pancreaticoduodenalis superior konnte Pfeffer bei anästhesierten Hunden eine nekrotisierende akute Pankreatitis auslösen, deren Ausprägung proportional zur Größe der injizierten Sphären anstieg¹⁶⁶. Daneben gibt es noch weitere Modelle der ischämisch induzierten Pankreatitis mit Ligatur der verschiedenen, das Pankreas versorgenden Arterien und Venen. Diese Okklusionsmodelle erzeugten entweder keine vollständige Ischämie des Pankreas²⁰⁵ oder gleichzeitig eine Ischämie der angrenzenden Organe wie Leber, Darm und Magen²¹⁵, wodurch eine genaue Untersuchung der für das Pankreas spezifischen Charakteristika des Ischämie-Reperfusionsschadens erschwert wird⁸³. Das von Hoffmann et al. entwickelte Modell induziert eine akute Pankreatitis durch eine temporäre, vollständige Ischämie des Pankreas⁸⁶. Auch bei der experimentellen Pankreastransplantation kommt es zu einem für die akute Pankreatitis charakteristischen Mikrozirkulationsschaden. In anderen experimentellen Modellen der akuten Pankreatitis wurde ebenfalls gezeigt, daß es nach Pankreatitisinduktion zur Reduktion der Pankreasmikrozirkulation und damit zu einer ischämischen Schädigung des Pankreasgewebes kommt. Dies wird als wichtiger Faktor für die Progression der akuten Pankreatitis gewertet^{104, 109, 235}. Auch gibt es Hinweise dafür, daß die alkoholtoxische Pankreatitis eine vaskuläre Ursache hat²¹⁷. So konnte gezeigt werden, daß die Applikation von Alkohol zu einer Abnahme der kapillären Perfusion des Pankreas führt, was vor allem durch einen Endothelin-abhängigen vasokonstriktiven Mechanismus erklärt wird⁵⁸.

In anderen nichtinvasiven Modellen läßt sich die Pankreatitisinduktion nicht direkt auf eine der oben genannten Theorien zurückführen. Als Modell der ödematösen Pankreatitis wird das Pankreasgewebes mit dem Cholecystokinin-Analagon Cerulein hyperstimuliert²⁴⁰. Dieses nichtinvasive Modell ist einfach zu handhaben und standardisiert, zeigt aber wenig Parallelität zur humanen Pankreatitis. Eine akute Pankreatitis wird auch beobachtet nach Bissen verschiedener Skorpion-Arten^{16, 184} und

nach Vergiftungen mit Anticholinesterase-wirksamen Insektiziden⁵³, die ebenfalls eine Hyperstimulation des Pankreas auslösen. Ein weiteres nichtinvasives Modell ist die Induktion einer akuten nekrotisierenden Pankreatitis durch eine Cholin-defiziente, Ethionin-angereicherte Diät bei weiblichen Mäusen¹⁵². Dieses Modell hat sich besonders bei der Anwendung an Complement-Faktor 5 und Complement 5a-Rezeptor knockout-Mäusen bewährt²⁰.

Die Fragestellung unserer Studie bezieht sich auf die möglichen Ursachen für das Auftreten einer akuten Pankreatitis nach der Infusion des künstlichen Sauerstoffträgers DCLHb. Hierbei sollten die Auswirkungen einer Infusion von DCLHb auf die Mikrozirkulation des Pankreas untersucht werden. Neben den Veränderungen der Mikrozirkulation des Pankreas nach DCLHb-Infusion unter Kontrollbedingungen, sollte auch untersucht werden, ob DCLHb eine bereits induzierte ödematöse Pankreatitis durch vasokonstriktive Eigenschaften verstärken und in eine nekrotisierende Pankreatitis überführen kann. Da die Effekte auf die Mikrozirkulation durch die bekannte vasoaktive Wirkung der Hämoglobinlösung am besten durch die intravitalmikroskopische Untersuchung charakterisiert werden können, benötigt man für diese Studie ein Modell, welches eine standardisierte Evaluierung der Mikrozirkulation mittels dieser Methode zuläßt. Zusätzlich muß das Modell einen Schaden auslösen, der stufenweise verstärkbar ist und durch die gemessenen Parameter gut quantifiziert werden kann. Mit dem in dieser Studie verwendeten Modell konnte eine vollständige, reversible, normotherme Ischämie des Pankreas induziert werden. Im Gegensatz zu Transplantationsmodellen wird das Pankreas *in situ* belassen und durch die Präparation der Gefäße nur wenig beeinträchtigt. Das verwendete Ischämie-Reperusionsmodell des Pankreas erfüllt alle Kriterien und Standards, die für eine akute experimentelle Pankreatitis gelten⁶¹: Nach der Induktion der akuten Pankreatitis kommt es zum Anstieg der Pankreasenzyme⁸⁶, die Pankreatitisinduktion führt zu einem licht- und elektronenmikroskopisch nachweisbaren Bild einer akuten Pankreatitis⁸⁴. Je nach Dauer der Ischämiezeit, die in diesem Versuchsaufbau ebenfalls frei wählbar ist, kann der induzierte Schaden entweder die Charakteristika einer ödematösen (1h) oder hämorrhagisch nekrotisierenden Pankreatitis (2h) aufweisen⁸⁶. Durch die Wahl des Versuchstiers Ratte erlaubt das Modell einen leichten Zugang zum Pankreas, und macht hierdurch intravitalmikroskopische Untersuchungen möglich. Eine Verbesserung der in diesem Modell im akuten Stadium untersuchten Parameter der Mikrozirkulation durch die Behandlung der Tiere mit einem

Bradykinin-2-Rezeptorantagonisten⁸⁷ entspricht einer Reduktion des histologischen Schadens sowie der Mortalitätsrate nach Pankreatitisinduktion bei einem chronischen Versuchsaufbau mit Reperfusion über 5 Tage⁸⁹. Dies weist auf die besondere Bedeutung der frühen mikrozirkulatorischen Veränderungen nach Pankreatitisinduktion hin.

Das Ziel dieser Studie war es, mögliche vaskuläre Ursachen einer durch DCLHb ausgelösten bzw. verstärkten Pankreatitis zu detektieren. Die Wahl der Pankreatitisinduktion über einen vaskulären Mechanismus erscheint uns deshalb als experimenteller Ansatz für diese Fragestellung am nützlichsten.

5.1.1.2 Modell des Hämorrhagischen Schocks

Der hämorrhagische Schock ist ein durch akuten Blutverlust ausgelöstes Versagen des Kreislaufs und verschiedener Organfunktionen. Bereits im vorigen Jahrhundert wurde die Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks in experimentellen Modellen getestet. Arbeiten von Kronecker (1886)¹¹⁷ und Crile (1899)⁴⁵ konnten zeigen, daß die Aufrechterhaltung eines bestimmten Volumens mittels Kochsalzlösung nach Entbluten zu einer verringerten Mortalität von Tieren im hämorrhagischen Schock führt. Bereits sehr früh entwickelte sich eine Diskussion darüber, wie der experimentell induzierte hämorrhagische Schock soweit standardisiert werden kann, daß sich aus den erzielten Versuchsergebnissen therapeutische Optionen für den Patienten ableiten lassen²³³. Ähnlich wie bei den experimentellen Modellen der akuten Pankreatitis, besteht bei den einzelnen Schockmodellen eine erhebliche Diskrepanz zwischen den in der Forschung erfolgreichen Therapieverfahren und der späteren Anwendung am Menschen⁵⁰. Die einzelnen experimentellen Modelle sind sehr unterschiedlich für die Beantwortung bestimmter Fragestellungen geeignet. Die Auswahl des geeigneten Modells muß deshalb sehr genau an die jeweilige Fragestellung angepaßt werden. Bezüglich der zur Schockinduktion verwendeten Methoden unterscheidet man drei Hauptrichtungen:

- 1) Entnahme eines definierten Blutvolumens⁴⁶.
- 2) Entnahme von Blut zur Einhaltung eines zuvor definierten arteriellen Blutdrucks über einen bestimmten Zeitraum (Verfahren nach Wiggers)¹²⁰.
- 3) Modelle mit unkontrolliertem hämorrhagischen Schock¹⁸⁸.

Soll der wirkliche Nutzen einer Therapie des hämorrhagisch-traumatischen Schocks untersucht werden, so gibt man in letzter Zeit immer mehr Modellen den Vorzug, die die Unfallsituation möglichst real wiedergeben. Um dies im Experiment zu simulieren, entwickelte die Arbeitsgruppe von Safar ein Modell, das drei Zeitphasen unterscheidet. Während der ersten Phase wird den Tieren ein fest definiertes Blutvolumen entnommen. Danach wird, um die präklinische Situation zu simulieren, den Tieren die Schwanzspitze kupiert (unkontrollierter Blutverlust). In einer dritten Phase, die der präklinische Resuscitationsphase entspricht, wird den Tieren eine moderate Flüssigkeitstherapie unter Blutdruckkontrolle verabreicht^{34, 203}. Dieses Modell erscheint neben dem Modell der Induktion eines Polytraumas beim Nager durch eine Zentrifuge¹⁸⁸, am besten geeignet, die Situation eines Schockpatienten unter Realbedingungen nachzustellen. Durch die schwierige Standardisierbarkeit der Modelle mit unkontrolliertem hämorrhagischem Schock, benötigt man jedoch eine sehr hohe Anzahl an Versuchstieren um statistische Aussagen treffen zu können.

Unsere Fragestellung behandelt die Auswirkung eines künstlichen Sauerstoffträgers auf die Mikrozirkulation des Pankreas während Reperfusion. Wir wollten nicht, wie in anderen Experimenten bereits geschehen, die generelle Effektivität von DCLHb bei der Therapie des hämorrhagischen Schock prüfen und dabei die Pankreasmikrozirkulation als unseren Zielparameter verwenden. Das von uns verwendete Modell mußte folgende Kriterien erfüllen:

- 1) Das Organ muß während der Reperfusion für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen gut zugänglich sein.
- 2) Für die Auslagerung des Pankreas benötigen die Tiere eine ausreichende Anästhesie.
- 3) Um konkrete statistisch ausgewertete Aussagen über die Mikrozirkulation treffen zu können, sollte der durch Hämorrhagie induzierte Schaden der Tiere gut standardisierbar sein.

Bei experimentellen Modellen mit Entnahme eines festen Blutvolumens können die Tiere je nach vorheriger Flüssigkeitsaufnahme und körperlicher Konstitution sehr unterschiedlich auf gleiche Volumina entnommenen Blutes reagieren. Die Wahl fiel deshalb auf ein Blutdruck-kontrolliertes Hämorrhagie-Modell. Am Institut für

Chirurgische Forschung wurden bereits Versuche mit einem ähnlichen Modell des hämorrhagischen Schocks zur Untersuchung der Mikrozirkulation des Pankreas durchgeführt. Dies ermöglicht einen Vergleich der erzielten Ergebnisse²²⁸. Die in vielen Blutdruck-kontrollierten Modellen angewendete Heparinisierung der Tiere zur Vermeidung einer Verlegung der Katheter kam in unserem Modell nicht in Frage. Untersuchungen an einem mit unserem Versuchsprotokoll vergleichbaren Modell zeigen eine hohe Diskrepanz der Tiere im hämorrhagischen Schock die vor Schockinduktion heparinisiert wurden, im Vergleich zu nicht heparinisierten Tieren¹⁷⁵. Für den Unterschied zwischen verschiedenen experimentell erfolgreich getesteten Therapieformen des hämorrhagischen Schocks und der später weniger erfolgreichen Testung in klinischen Studien wird vor allem die initiale Heparinisierung vor Hämorrhagieinduktion in früheren Arbeiten verantwortlich gemacht⁵⁰. In der von uns durchgeführten Studie erwies sich das Durchspülen der Katheter nach Blutentnahme mit 0,1 ml physiologischer Kochsalzlösung als ein ausreichender Schutz vor Thrombosierung.

5.1.2 Diskussion der gemessenen Parameter

5.1.2.1 Quantifizierung der Mikrohämodynamik

Das Pankreas wird von zuführenden Arterien mit oxygeniertem Blut versorgt. Die Anatomie der Mikrozirkulation des Pankreas unterscheidet sich jedoch von anderen Organen in entscheidenden Punkten. Obwohl die endokrinen Inselzellen nur 1,5 % des Pankreasvolumens ausmachen, schätzt man, daß ca. 11-23% des gesamten arteriellen Blutes zu den Langerhanschen Inseln transportiert wird. Es konnte gezeigt werden, daß die die Inseln drainierenden Gefäße zu einem nicht unerheblichen Teil das exokrine Pankreasgewebe durchströmen. Diese Gefäße gleichen in ihrer Morphologie nicht der größerer Venolen. Deshalb handelt es sich hierbei nicht um einen Portalkreislauf im klassischen Sinne mit zwei hintereinander geschalteten Kapillarsystemen, sondern einem "kontinuierlichen" portalen Kreislauf²¹. Eine experimentelle Untersuchung zeigt eine deutliche Ischämie-Resistenz des endokrinen Gewebes im Vergleich zum exokrinen Gewebe auf²³⁰. Wahrscheinlich ist die hohe Blutversorgung der Inseln vor allem auf den Zu- und Abtransport der Hormone und nicht auf einen Mehrbedarf der Inseln an

Sauerstoff zurückzuführen. Zielort und interessantes Untersuchungsgebiet für die akute Pankreatitis und die mögliche ischämische Schädigung des Organs bleibt deshalb das exokrine Gewebe. Um die Blutversorgung eines Organs zu charakterisieren gibt es unterschiedliche physiologische Parameter und Größen. Die Durchblutung oder der arterielle Blutfluß eines Organs ist als Volumenfluß pro Zeit in einem Organ definiert (ml/min oder ml/min/100g Gewebe). Die prozentuale Pankreasdurchblutung der anästhesierten Laborratte liegt bei $1,04 \pm 0,11$ % des gesamten Herzzeitvolumens²²⁹. Als Verfahren der Wahl für die experimentelle Messung dieser Größen, dient die Blutflußmessung mit Flußmessköpfen an den zuführenden Arterien, sowie die Mikrosphären- und Clearance-Technik. Erfahrungen aus anderen experimentellen Untersuchungen zeigen den Unterschied zwischen Gesamtdurchblutung und nutritiver Blutversorgung eines Organs auf. Eine Embolisation von Mikrogefäßen durch Injektion von Mikrosphären in einem experimentellen Perfusionsmodell am Gastrocnemiusmuskel des Hundes führte zu einer deutlichen Abnahme des Gesamtblutflusses des Organs. Der Anstieg der Sauerstoffsättigung des venösen Effluats an diesem Modell trotz abnehmendem Gesamtblutfluß weist auf eine prozentuale Zunahme des nicht nutritiven Blutflusses nach Embolisation der Gefäße hin⁶². Dieses Beispiel beweist die Schwierigkeit, von der Gesamtdurchblutung eines Organs direkt Rückschlüsse auf den am Sauerstoffaustausch beteiligten Blutfluß zu treffen. Die gleiche These wird auch durch die experimentellen Arbeiten an einem Pankreatitismodell am Schwein unterstützt. Durch Aufrechterhaltung der Makrohämodynamik nach Induktion einer akuten Pankreatitis durch retrograde Infusion von Taurocholinsäure in den Pankreasgang gelang es, die Gesamtdurchblutung des Pankreas im Vergleich zu Kontrolltieren aufrechtzuerhalten. Bei unveränderter Gesamtdurchblutung kam es jedoch zu einem signifikanten Abfall der arterio-venösen Sauerstoffgehaltsgleichheit (AVDO₂) nach Abnahme von Blutproben aus Pankreas zu- und abführenden Gefäßen. Dies bedeutet, daß der Sauerstoffverbrauch des Pankreas bei diesen Experimenten trotz aufrechterhaltener Gesamtdurchblutung des Organs abnahm. Der verminderte Sauerstoffverbrauch bei diesen Experimenten wird vornehmlich durch die Ausfälle der funktionell-nutritiven Perfusion im Kapillarnetz erklärt²²⁷. Intravitalmikroskopische Untersuchungen dokumentieren die Existenz von arterio-venösen Shunts in der Mikrostrombahn des Pankreasgewebes¹⁴⁵. Blut, das durch diese AV-shunts fließt, ist wohl Bestandteil der Gesamtdurchblutung, nicht aber des Anteils, der an der funktionell-nutritiven Durchblutung des Organs beteiligt ist. Aufgrund

dieser Untersuchungen sind Veränderungen der Gesamtdurchblutung eines Organs disproportional zum funktionell-nutritiven Blutfluß eines Organs und lassen somit keine direkten Rückschlüsse auf diesen zu.

Die Auswirkungen einer DCLHb Infusion auf die Organdurchblutung, welche mittels Laser-Doppler und Mikrosphären-Methode bestimmt wurde, sind unter physiologischen Bedingungen und beim hämorrhagischem Schock sowie unter Gabe verschiedener vasoaktiver Medikamente vielfältig untersucht worden^{65, 67 - 69, 71, 76, 143}. Obwohl hierbei ebenfalls Daten über die Pankreasdurchblutung erhoben wurden, lassen diese Studien, aufgrund der zuvor beschriebenen Unterschiede der Gesamtdurchblutung und der funktionell-nutritiven Perfusion eines Organs, nur bedingt Rückschlüsse auf die funktionelle Kapillarversorgung des Organs zu. Bei unseren Untersuchungen interessierten wir uns deshalb vor allem für die Auswirkungen von DCLHb auf die nutritive Versorgung des exokrinen Pankreasgewebes. Da andere funktionell-nutritive Parameter wie der Gewebe-PO₂ und die arterio-venöse Sauerstoffsättigungsdifferenz an einem Kleintiermodell nur sehr schwer und logistisch aufwendig zu erheben sind, wählten wir als funktionellen Parameter die mit dem Fluoreszenzmikroskop *in vivo* ermittelte Anzahl Erythrozyten-perfundierter Kapillaren.

Die ersten intravitalmikroskopischen Untersuchungen an Kapillaren des Pankreas stammen aus den Jahren 1955 von Illig⁹³. Hierzu wurde die Technik der Transillumination verwendet. Ihm folgten weitere Untersuchungen zur Abhängigkeit der Kapillardurchblutung des Pankreas von digestiven Hormonen und anatomische Studien, die alle ähnliche Techniken verwendeten. Eine Untersuchung der Pankreasperfusion mittels Epifluoreszenzmikroskopie mit späterer off-line Auswertung von Videoaufnahme wurde zum ersten Mal von der Arbeitsgruppe Klar und Meßmer durchgeführt¹⁰⁷. Verschiedene experimentelle Studien zeigen deutlich, daß es nach Induktion der akuten Pankreatitis zu einem Ausfall der kapillären Perfusion kommt. Hierbei wurden indirekte Techniken wie die Krypton-85 Clearance Technik²¹¹ oder die intraarterielle Injektion von Methylenblau und India Ink angewandt⁷. Die von uns verwendete Technik der intravitalen Epifluoreszenzmikroskopie des Pankreas macht eine Darstellung der Pankreaskapillaren mit hoher Auflösung möglich. Durch die Kontrastierung der Kapillaren mit der mit Fluoreszenzfarbstoff Fluoreszeinisothiozyanat markierter Hydroxyethylstärke kann deutlich zwischen mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren und nicht perfundierten Kapillaren unterschieden werden. Der Versuchsaufbau ermöglicht

auch eine Messung der funktionellen Kapillardichte derselben Areale zu verschiedenen Beobachtungszeitpunkten. Durch die Verwendung verschiedener Filterblöcke ist mit diesem Versuchsaufbau auch die gleichzeitige fluoreszenzmikroskopische Messung der Leukozyten-Endothel-Zellinteraktion möglich. Da die Pankreasperfusion sehr inhomogen ist, benötigt man zur direkten Analyse der Kapillaren eine Meßtechnik, die die Kapillaren mit einer sehr hohen Auflösung darstellt. Um diese Heterogenität der Perfusion in ihrer ganzen Breite zu erfassen wurden pro Beobachtungszeitpunkt zehn Kapillarfelder aufgenommen. Zur Auswertung der funktionellen Kapillardichte als Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfläche werden stereologische Prinzipien angewendet. Diese Methode verwendet eine statistische Näherung um eine geometrische Struktur zu bestimmen, indem man nur die Anzahl eines Teils der Gesamtstruktur auswertet. Für die Auswertung der FKD gibt es daneben noch die computergestützte Auswertung mittels CAMAS, die ein pythagoreisches Prinzip zur Ermittlung der FKD verwendet¹⁵⁶. In unserer Studie kam das stereologische Prinzip zur Anwendung, da hiermit alle vorausgegangenen Studien ausgewertet wurden und dadurch ein Vergleich mit diesen Studien möglich war.

Neuere Studien zur Messung des PO₂ mit Phosphorescence Quenching von metallorganischen Komponenten lassen Zweifel an der Bedeutung der Kapillargefäße für die direkte Sauerstoffversorgung des Gewebes aufkommen⁹⁶. Die von Krogh und Erlangen aufgestellte Theorie, daß der Sauerstoffaustausch primär durch einzelne zentral gelegene Kapillaren erfolgt, die einen umgebenden Gewebezylinder mit Sauerstoff versorgen¹¹⁶, wird durch die von Intaglietta und Mitarbeitern⁹⁶ erhobenen Daten in Frage gestellt. Mit Hilfe der Phosphorescence Quenching-Methode konnten die Autoren zeigen, daß der größte Sauerstoffgradient zwischen Gefäß und umgebendem Gewebe im Bereich der Arteriolen mit einem Durchmesser von 50-60 µm besteht. Diese Beobachtungen unterstützen Ergebnisse von Duling und Berne aus dem Jahre 1970; sie hatten als Erste einen hohen Verlust von Sauerstoff entlang des arteriolen Netzwerks mit Hilfe von Mikrokathoden nachgewiesen⁵⁴. Nach der Schlußfolgerung von Intaglietta und Mitarbeitern dient die kapilläre Perfusion der Sauerstoffversorgung vor allem des sehr stoffwechselaktiven Gefäßendothels und der Versorgung des perikapillären Gewebes im Bereich von 3µm. Auch wenn die bisher angemeldeten Zweifel an der Meßmethode noch nicht vollständig ausgeräumt sind, ergibt sich jedoch eine völlig neue Sichtweise der Physiologie der Mikrozirkulation. Ohne auf die Vor- und Nachteile der beschriebenen

Methode näher eingehen zu wollen, bleibt für unsere Untersuchungen die funktionelle Kapillardichte der wichtigste Parameter zur Messung der funktionell-nutritiven Perfusion des Pankreasgewebes. Die von Intaglietta und Mitarbeitern durchgeführten Messungen und Theorien sind bisher ausschließlich an der Mikrozirkulation des Hautmuskels am wachen syrischen Goldhamster und den Mesenteriumgefäßen der Ratte untersucht. Da dieses Muskelgewebe in Ruhe noch keine vollständigen Rückschlüsse auf den Sauerstofftransport in einem inneren Organ geben kann, sind die Ergebnisse nur bedingt auf das Pankreas übertragbar. Zum anderen stellen auch Intaglietta et al. die Wichtigkeit der kapillären Perfusion für ein Organ nicht in Frage. Bei Untersuchungen am wachen Syrischen Goldhamster erwies sich die Bestimmung die Höhe der FKD als sensitivster Parameter der Überlebenswahrscheinlichkeit nach Induktion eines teilweise letalen hämorrhagischen Schock¹⁰³. Bei den überlebenden Tieren betrug die FKD des Muskelgewebes ungefähr 40% des Ausgangswertes während bei den nicht überlebenden Tiere keine FKD-Werte ermittelt werden konnten. Aus dem gemessenen Gewebe-PO₂ des subkutanen Fettgewebes konnte keine Aussage über das Outcome der Tiere getroffen werden¹⁰³. Die besondere Wichtigkeit der FKD als funktioneller Parameter für die Beurteilung der Vitalität eines untersuchten Organs steht daher außer Zweifel.

5.1.2.2 Quantifizierung der Leukozyten-Endothelinteraktion

Die Leukozyten-Endothel-Interaktion ist neben dem kapillären Perfusionsausfall ein entscheidendes Charakteristikum der akuten Pankreatitis sowie des Ischämie-Reperfusionsschadens. 1867 beobachtete Cohnheim mittels Intravitalmikroskopie am Mesenterium des Frosches, daß ein Teil der passierenden Leukozyten am Endothel entlangrollt³⁹. Das beschriebene Phänomen wurde von Atherton und Born erstmalig 1972 in der Hamsterbackentasche quantitativ analysiert⁹. In der Mikrozirkulationsforschung werden nach dem Stufenmodell der Adhäsionskaskade drei Interaktionsformen der Leukozyten mit dem Endothel unterschieden, denen letztlich die Extravasation der Leukozyten aus dem Intravasalraum ins Gewebe folgen kann²⁷:

- 1) Freifließende Leukozyten ohne Interaktion mit dem Gefäßendothel,
- 2) "Rollende" Leukozyten, welche intermittierend mit dem Gefäßendothel interagieren,
- 3) Adhärente Leukozyten, die fest am Endothel anhaften.

In unserem Modell wird die Quantifizierung der Leukozytenadhärenz in postkapillären Venolen als ein Maß für die frühe Leukozytenakkumulation des Pankreas verwendet. Bei den bisherigen Untersuchungen^{86 - 88, 231} hat sich dieser Parameter als besonders geeignet für die Abschätzung eines inflammatorischen Schadens erwiesen.

Durch die selektive Akkumulation des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffs Rhodamin 6G in den Mitochondrien markiert der Farbstoff alle Subpopulationen der Leukozyten ohne die Erythrozyten anzufärben (Abb. 23 A+B). Diese spezifische Anreicherung von Rhodamin 6G beruht entweder auf der negativen Ladung der mitochondrialen Matrix²⁶ oder auf der Bildung unlöslicher Salze zwischen dem kationischen Farbstoff und den negativ geladenen Cardiolipinmolekülen, einem integralen Bestandteil der inneren Mitochondrienmembran¹⁷⁶. In durchflußzytometrischen Untersuchungen wurde nachgewiesen, daß in der von uns verwendeten Dosierung von Rhodamin 6G 60 Minuten nach intravenöser Applikation noch über 95% der Granulozyten und Monozyten mit Fluoreszenzfarbstoff markiert sind¹².

Die Methode der *in vivo* Anfärbung von Leukozyten und spätere Beobachtung erwies sich als geeignet zur Quantifizierung der Leukozyten-Endothel-Interaktion bei den verschiedensten tierexperimentellen Modellen^{1, 11, 119, 225}. Bereits extravasierte Leukozyten können durch das eingeschränkte Beobachtungsfeld mit der intravitalmikroskopischen Technik nicht so gut erfasst werden wie mit anderen Methoden. Die Quantifizierung der extravasierten Leukozyten mittels Esterasefärbung in histologischen Schnitten erbrachte in unserem Modell keine signifikanten Ergebnisse, was wohl auf die kurze Beobachtungszeit während Reperfusion zurückzuführen ist. Die Adhärenz von Leukozyten in postkapillären Venolen erscheint daher als besonders geeigneter Parameter zur Erfassung des entzündlichen Stimulus in der Frühphase der postischämischen Pankreatitis.

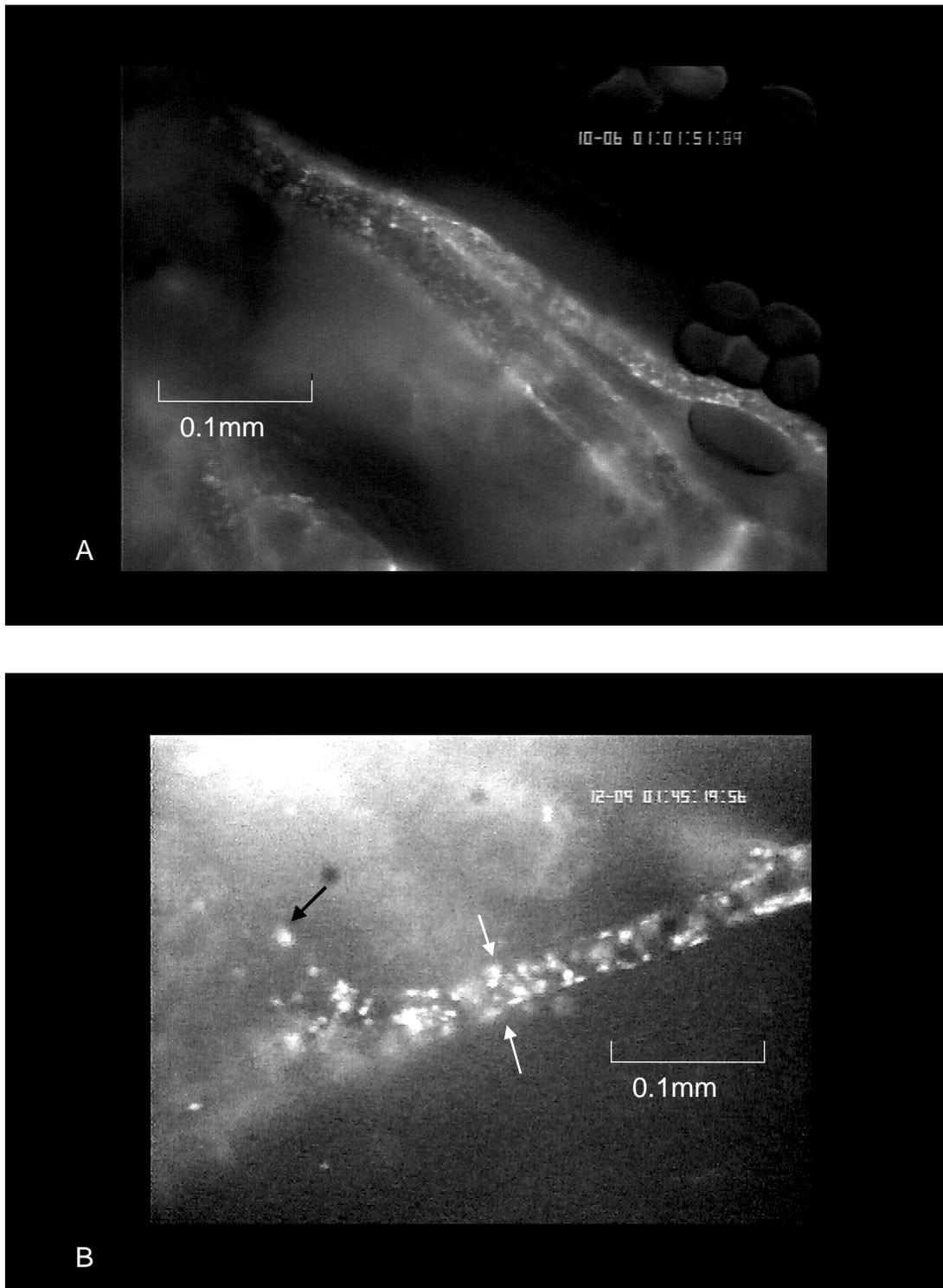


Abbildung 23: *Intravitalmikroskopisches Bild postkapillärer Venolen des Pankreas unter Kontrollbedingungen (A) und bei postischämischer Pankreatitis (B). Nach der Injektion von Rhodamin 6G färben sich die Leukozyten an. Unter Kontrollbedingungen sind wenig adhärenente Leukozyten zu sehen. Nach Ischämie und Reperfusion des Pankreas ist die Anzahl adhärenente Leukozyten signifikant erhöht.*

5.1.2.3 Laborparameter

Zur Diagnose der akuten Pankreatitis werden verschiedene Laborparameter verwendet. Hierbei wird zwischen Parametern unterschieden, die die Diagnose der akuten Pankreatitis in der Differentialdiagnose zu anderen abdominalen Erkrankungen sichern und solchen, die den komplikationsreichen Verlauf und die Schwere einer akuten Pankreatitis zu erfassen versuchen.

Ein besonderes Charakteristikum der akuten Pankreatitis ist eine Erhöhung der Pankreas-spezifischen Enzyme, wie zum Beispiel Amylase und Lipase, im Serum. 1910 beschrieb Wolgemuth zum ersten Mal eine Erhöhung der Amylasekonzentration im Urin bei Patienten mit akuter Pankreatitis²⁴². Die Sensitivität für die Erhöhung der Serumamylaseaktivität bei der Diagnose der akuten Pankreatitis liegt zwischen 80 und 90%¹²². Die Amylase gilt heute als Goldstandard zur Sicherung der Diagnose einer akuten Pankreatitis. In dem von Hoffmann etablierten Modell des postischämischen Reperfusionsschadens bei akuter Pankreatitis erfolgte ein signifikanter Anstieg der Pankreas-Amylase im Serum nach Ischämieperioden von 1 und 2 Stunden⁸⁶. Auch in anderen experimentellen Studien der postischämischen Pankreatitis wie zum Beispiel an dem *ex vivo*-Modell von Broe und Mitarbeitern mit 2 Stunden Ischämie und 4 Stunden Reperfusion²⁵ und der Induktion einer akuten Pankreatitis durch die intravaskuläre Injektion von Mikrosphären wurde ein erheblicher Anstieg der Amylaseaktivität im Serum verzeichnet¹⁷⁸.

Mit der Möglichkeit zur Bestimmung der Konzentration verschiedener Zytokine mittels Zytokin-spezifischer Antikörper-kits entdeckte man, daß die akute Pankreatitis mit dem Anstieg vieler proinflammatorischer Zytokine einhergeht. Hierbei erkannte man, daß die Serum-Zytokinkonzentrationen die Prognose, Mortalität und die Wahrscheinlichkeit eines Multiorganversagens spezifischer vorhersagen konnte, als dies durch die herkömmlichen Punktesysteme von Ranson und der APACHE II score möglich war¹⁵⁷. Interleukin-6 ist ein Mitglied der inflammatorischen Zytokinfamilie, dessen besonderes Charakteristikum die Induktion der Akut-Phase-Protein-Antwort des Körpers ist. Es wird schon sehr früh nach Beginn der akuten Pankreatitis hochreguliert. Bis heute ist unklar, ob Interleukin-6 bei inflammatorischen Krankheitsbildern mehr eine entzündungsfördernde oder -hemmende Eigenschaft besitzt²⁴³. Unabhängig von seiner funktionellen Bedeutung kommt es bei Patienten mit einer letal verlaufenden komplikationsreichen Pankreatitis zu einem

sehr viel höheren Anstieg der Interleukin-6 Konzentration im Serum im Vergleich zu Patienten mit einem unkomplizierten Verlauf. Als Prognoseparameter über den Ausprägungsgrad einer akuten Pankreatitis ist der Wert der Serumkonzentration daher weithin akzeptiert⁹⁵. Die Serumkonzentration von Interleukin-6 wurde sogar als Endpunkt-Parameter einer Studie zur Therapie der akuten Pankreatitis verwendet¹⁰⁶. Aus Kostengründen wird in der klinischen Anwendung der Bestimmung des C-reaktiven Proteins der Vorzug gegeben. Dieser Parameter steigt deutlich später nach dem Auftritt der Erkrankung an und ist in seiner prognostischen Sensitivität und Spezifität dem Interleukin-6 unterlegen.

Nach Infusion einer Hämoglobinlösung befinden sich erhebliche Mengen von freiem Hämoglobin im Serum. Dieses Hämoglobin kann zu einem nicht unerheblichen Teil die Ergebnisse vieler klinisch verwendeter Labortests verfälschen¹³³. Um dies bei den von uns durchgeführten Messungen auszuschließen wurden Standard-Serumproben in einer aufsteigenden Konzentrationen mit DCLHb versetzt. Danach wurde die jeweiligen Werte mit den beiden verwendeten Meßverfahren für Amylase und Interleukin-6 gemessen. Es hat sich gezeigt, daß die in der Gruppe mit einer Dosierung von 1400mg/kg KG erfasste Messung keine zuverlässigen validen Messergebnisse liefern. Deshalb konnten in dieser Gruppe mit den uns zu Verfügung stehenden Mitteln keine validen Serumparameter erhoben werden.

5.1.2.4 Lipidperoxidation im Pankreasgewebe

Ein freies Radikal ist eine chemische Verbindung oder ein Einzelement, welches mit einem oder mehreren nicht paarig angelegten Elektronen existieren kann. Durch die stufenweise Reduktion von Sauerstoff und Aufnahme von Elektronen, können aus dem Sauerstoff zwei Arten von freien Radikalen entstehen (Hydroperoxyl-Radikal: HO_2 ; Hydroxyl-Radikal: $\cdot\text{OH}$). Diese freien Sauerstoffradikale entstehen ständig bei der aeroben Verstoffwechslung des Sauerstoffs im Körper. Normalerweise werden sie durch antioxidative Schutzmechanismen in den verschiedenen Kompartimenten intra- und extrazellulär katalytisch abgebaut. Vermehrte Sauerstoffradikalbildung bewirkt oxidativen Stress. Durch seine gewebetoxische Charakteristik gilt dieser oxidative Stress als Schlüsselmechanismus der unterschiedlichsten Krankheits- und Alterungsprozesse im

Körper. Ein potentieller Angriffspunkt dieser gebildeten Sauerstoffradikale ist die mehrfach ungesättigten Fettsäuren der Zellmembranen. Der Vorgang der Oxidation von mehrfach ungesättigten Fettsäuren durch freie Radikale wird als Lipidperoxidation bezeichnet. Hierbei werden die angegriffenen Fettsäuren einer Reihe von Reaktionsschritten unterworfen. Als erster Schritt wird die Fettsäure (LH) von einem Radikal angegriffen, das ein ausreichendes Potential zur Lösung eines Wasserstoffatoms (H[•]) aus einer Methylen-Gruppe (-CH₂) besitzt. Dieser Anfangsschritt setzt eine Menge von Kettenreaktionen in Gang (Übersichtsarbeit⁷⁴). Abbildung 24 gibt eine grobe Übersicht über diese Vorgänge. Ausgeprägte Lipidperoxidation der Zellmembranen verursacht einen Verlust der Fließeigenschaften der Membran sowie eine Zunahme der Permeabilität für Ionen und hiermit verbunden einen Verlust des Membranpotentials und schließlich den Bruch der Membran mit Verlust von Zellorganellen. Die entstandenen Lipidhydroperoxide können auch weiter miteinander polymerisieren bzw. zu verschiedenen Aldehyden fragmentieren. Es entstehen Um- und Abbauprodukte, die auch wieder eine spezifische biologische Wirksamkeit besitzen. Lipidperoxidation gilt somit als ein Maß für den durch oxidativen Stress verursachten Gewebeschaden.

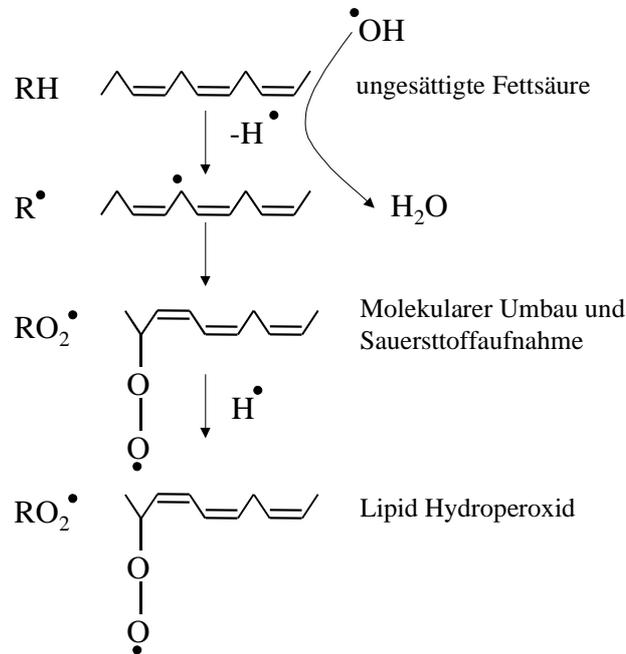


Abbildung 24: Lipidperoxidation durch Angriff eines Sauerstoffradikals an einer mehrfach ungesättigten Fettsäure. Nach Gutteridge, 1995⁷⁴.

Die Quantifizierung des oxidativen Stresses ist auf verschiedene Weise möglich. Hierbei unterscheidet man direkte von indirekten Methoden. Die direkte Messung von freien Sauerstoffradikalen ist äußerst aufwendig. In vielen Fällen verlässt man sich deshalb auf indirekte Messungen durch quantitative Bestimmung von körpereigenen Antioxidantien oder der Lipidperoxidation im Gewebe⁸. Diese Methoden haben vielfältige Störeinflüsse, werden aber bei vielen Versuchen zur groben Abschätzung des oxidativen Stress herangezogen. Zur Abschätzung der Lipidperoxidation hat sich der Nachweis eines Abbauproduktes von Lipid-Hydroperoxid, das Malondialdehyd durchgesetzt. Malondialdehyd (MDA) reagiert mit Thiobarbitursäure (TBA) in einer Kondensationsreaktion in einem Verhältnis von 1:2⁹⁷. Dieses Kondensat ist ein rotes Pigment und besitzt fluoreszierende Eigenschaften. Durch den spektrophotometrischen Nachweis dieser Reaktionsprodukte kann die Konzentration von MDA gemessen und

hierdurch eine Aussage über den lipidperoxidativen Schaden getroffen werden. Nachteil dieses Test ist die geringe Spezifität. Nicht aus dem Lipid-System entstammende Biomaterialien wie zum Beispiel Bilirubin und andere Abbauprodukte der Lipidperoxidation reagieren ebenfalls auf diesen Test mit Thiobarbitursäure positiv^{111, 221}. Aufgrund dieser Störeinflüsse kann man bei diesem Testergebnis nicht von MDA sondern nur von Thiobarbitursäure-reaktiven Materialien sprechen. Bei der alleinigen Interpretation der Daten ist somit bezüglich der Aussage besondere Vorsicht geboten. Dennoch gibt er eine grobe Abschätzung des Ausmaßes der Lipidperoxidation im Gewebe. Insbesondere eine vermehrte Lipidperoxidation durch das Vorhandensein eines höheren Gehalts an MDA in einer der Versuchsgruppen im Pankreasgewebe kann durch diesen Test detektiert werden.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Einflüsse von DCLHb unter Kontrollbedingungen

Die systemische, intravenöse Infusion von DCLHb führt zu einem Blutdruckanstieg. Hierbei ist die Höhe des Anstiegs dosisunabhängig, die Zeitdauer der Hypertonie war in der Gruppe mit der höheren Dosierung länger. DCLHb in einer niedrigen und hohen Dosierung führt weder zu einem Abfall der funktionellen Kapillardichte noch zu einer vermehrten Adhärenz aktivierter Leukozyten in postkapillären Venolen des Pankreas. In der Gruppe mit der höheren Dosierung von DCLHb fand sich ein signifikanter Anstieg der funktionellen Kapillardichte. Ein Anstieg der gemessenen Konzentrationen von Amylase und Interleukin-6 blieb jedoch aus. Somit konnte in unserer Studie nach intravenöser Infusion von DCLHb kein Hinweis auf die Induktion eines entzündlichen Gewebeschadens im Pankreas detektiert werden.

Ein Blutdruckanstieg nach DCLHb-Infusion ist in den meisten aller durchgeführten Studien beschrieben worden. Hierbei führt die Infusion von DCLHb zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Blutdrucks um etwa 20 bis 30% bei Hamster¹⁵³, Laborratte^{102, 134}, Schwein¹⁴¹ und Mensch¹⁷². Auch in unserer Studie war die Höhe des Anstiegs nicht abhängig von der Dosierung. Die Hypertonie wurde bei höherer Dosierung (1000 mg/kgKG) über eine Zeit von bis zu 240 Minuten aufrechterhalten¹³⁴. In verschiedenen *in vitro* Studien zeigte DCLHb einen kontraktilen Effekt auf isolierte Gefäßringe^{60, 78}. Im Serum der Ratten stieg nach Infusion von DCLHb die Konzentration des Gefäß-konstringierenden Faktors Endothelin-1 an. Desweiteren konnte der Blutdruckanstieg sehr gut durch die Gabe eines Endothelin-Konverting-Enzym-Hemmers, durch NO-Donoren¹⁹³ und durch einen Alpha1-Rezeptorblocker⁷⁰ rückgängig gemacht werden. Deshalb wurde das Scavenging von NO, die Hochregulation von Endothelin und die Beeinflussung des adrenergen Systems über eine Kontraktion der Widerstandsgefäße als entscheidende Faktoren für den Blutdruckanstieg diskutiert. In Experimenten an Ratten, in denen die Blutverteilung im Körperkreislauf nach DCLHb-Applikation mittels Mikrosphären-Technik und Laser-Doppler-Methode beobachtet wurde, zeigt sich eine

deutliche Zunahme des Blutflusses zum Pankreas und anderen Organen des Splanchnikus-Gebietes mit der von uns angewendeten Dosierungen von DCLHb¹⁹⁹. In unserer Studie nimmt die FKD in der Versuchsgruppe mit höherer Dosierung von DCLHb zu. Die intravenöse Infusion von DCLHb hat somit nicht nur eine Umverteilung des arteriellen Blutflusses zu Gunsten des Splanchnikusgebietes zur Folge, sondern auch eine Zunahme der nutritiv-kapillären Perfusion in diesen Organen unter Kontrollbedingungen.

Die These, die gefäßreaktive Wirkung von DCLHb könne durch eine Mikrozirkulationsstörung über eine Minderversorgung des Gewebes mit Sauerstoff zu einem Entzündungsreiz des Pankreas führen, läßt sich durch unsere Ergebnisse bei Kontrollbedingungen nicht bestätigen. Der fehlende Anstieg der Entzündungsparameter Interleukin-6 und der Amylase-Serumaktivität nach der Infusion mit DCLHb spricht ebenfalls gegen die Induktion einer entzündlichen Reaktion im Pankreas nach Infusion von DCLHb.

5.2.2 Einflüsse von DCLHb nach normothermer Ischämie des Pankreas

Wie in der Einleitung erwähnt, führt die Ischämie und Reperfusion des Pankreas klinisch zu einer akuten Pankreatitis, zum Beispiel bei Posttransplantatpankreatitis³⁰ oder Pankreatitis nach koronarer Bypassoperation⁵⁶. Desweiteren betrachtet man die Ischämie auch als einen wichtigen Faktor für die Progression bei dem Übergang von der ödematösen zur nekrotisierenden Pankreatitis. Der Ischämie-Reperfusionsschaden des Pankreas ist durch die vielfältigen Vorarbeiten in dem von unserer Arbeitsgruppe validierten Modell besonders bezüglich Manifestation der Mikrozirkulationsstörung charakterisiert⁸⁵. Die Applikation von DCLHb hat dessen protektive Wirksamkeit auf den Ischämie-Reperfusionsschaden bei den Organen Niere¹⁷⁰, Herz¹⁴¹, Hautmuskel¹⁶⁹ und Gehirn⁴¹ bewiesen. Die Sonderstellung des Reperfusionsschadens des Organs Pankreas, zum Beispiel durch die Aktivierung digestiver Enzyme, erforderte jedoch eine spezielle Analyse der Mikrozirkulation des Pankreas.

5.2.2.1 Einflüsse von DCLHb auf die Makrohämodynamik

Nach Ischämie unmittelbar nach dem Öffnen der Gefäßclips zur Reperfusion fällt der mittlere arterielle Blutdruck der Versuchstiere deutlich ab. Durch die Infusion von DCLHb kann diese postischämische Hypotonie über den gesamten Beobachtungszeitraum verhindert und stabilisiert werden.

Die in unseren Experimenten aufgezeigte Hypotonie während der Reperusionsphase ist auch klinisch ein relevantes Problem bei der akuten Pankreasentzündung. Neben der massiven Volumentherapie benötigen diese Patienten oft Katecholamine zur Unterstützung der makrohämodynamischen Kreislauffunktion²⁰⁹. Verschiedene experimentelle Studien an dem von uns angewendeten Tiermodell weisen auf die massive Freisetzung von Bradykinin bei der akuten Pankreatitis hin^{87, 89, 126}. Diese und andere vom Pankreas freigesetzten vasorelaxierenden Mediatoren werden für die Hypotension und den Schockzustand bei Patienten mit akuter Pankreatitis verantwortlich gemacht¹³⁷. Die Schocksituation bei Patienten mit Pankreatitis ist durchaus vergleichbar

mit anderen Hypotonieformen bei Intensivpatienten, bei denen der Einsatz von DCLHb bereits untersucht worden ist. In einer experimentellen Studie bewirkte DCLHb die Steigerung des mittleren arteriellen Blutdrucks von hypotonen Tieren an einem Sepsis Modell der Ratte¹⁵⁰. Dieses positive Resultat ließ sich auch in einer Phase II Patientenstudie durch die Behandlung von Sepsispatienten mit DCLHb nachvollziehen¹⁷⁷. Der Katecholamineinsatz zur Stabilisierung des Blutdrucks konnte in dieser Studie durch die Infusion von DCLHb signifikant reduziert werden.

Die deutliche Stabilisierung der Makrohämodynamik bei den mit DCLHb behandelten Tieren in unserer Studie ist deshalb in der Postischämiephase ein erwünschter Effekt, der wahrscheinlich auch in der klinischen Situation bei Behandlung von Kreislauf-instabilen Intensivpatienten mit DCLHb positive Auswirkungen haben könnte.

5.2.2.2 Einflüsse von DCLHb auf die Mikrohäodynamik

Die in unserem Modell angewandte Ischämie des Pankreas für 60 min hat eine Abnahme der funktionellen Kapillardichte nach 2h Reperfusion um 40% zur Folge. Zum letzten Beobachtungszeitpunkt waren die Werte für die funktionelle Kapillardichte im Vergleich zur HAES-behandelten Ischämiegruppe in der DCLHb Gruppe geringfügig angestiegen.

Der normotherme Ischämie-Reperfusionsschaden ist durch eine Abnahme der kapillären Perfusion charakterisiert, der zu einer nutritiven Minderversorgung des Gewebes während Reperfusion führt. Dieses Phänomen wurde 1959 durch Sheehan nach Ischämie und Reperfusion der Niere zum ersten Mal beobachtet²⁰⁰ und danach an den Organen Leber¹¹³, Skelettmuskel¹⁴⁴, Gehirn⁶, Herz¹¹⁰, Darm¹³⁸ und Pankreas⁸⁶ ebenfalls beschrieben. Neben dem Ischämie- und Reperfusionsschaden führen beim Pankreas auch andere Pankreatitis-induzierende Maßnahmen, wie die retrograde Infusion von Taurocholinsäure in den Gallengang^{104, 109}, zu einer Abnahme der funktionellen Kapillardichte. Die genaue Ursache dieses kapillären "no-reflow" Phänomens während der Reperfusion ist bis heute nicht vollständig aufgeklärt. Als kausale Ursachen werden die Hämokonzentration durch eine Zunahme der endothelialen Permeabilität, die Verlegung der Kapillaren durch Leukozyten, die Bildung von okklusiven Mikrothromben nach Aktivierung von Thrombozyten und die Schwellung der Endothelzellen diskutiert^{139, 144}.

Neben diesen Theorien war unklar, inwieweit lokale Regelmechanismen der Mikrozirkulation durch die Infusion von DCLHb diesen kapillären Perfusionsausfall verstärken und das Pankreas damit zusätzlich schädigen können. In der Literatur werden bisher drei Möglichkeiten untersucht, über die DCLHb in die Regulation der Mikro- und Makrozirkulation eingreifen könnte. Diese werden im Folgenden bezüglich Ihrer Bedeutung für die mikrovaskuläre Perfusion bei akuten Pankreatitis diskutiert.:

1) Hämoglobin ist ein bekannter Scavenger von **Stickstoffmonoxid (NO)**. NO reagiert mit Hämoglobin auf folgenden Reaktionswegen²²⁴:

a) Durch die kovalente Bindung an Cystein (cys93 β) der beta-Globinkette, kann sich S-Nitrosohämoglobin (SNO-Hb) bilden. Dieses wird unter bestimmten Bedingungen wieder an das Gewebe abgegeben. Hämoglobin würde somit weniger als ein Scavenger, als vielmehr als NO-Transporter im Kreislaufsystem wirken⁹⁸.

b) Oxyhämoglobin wird von NO zu Methämoglobin oxidiert (Hb Fe³⁺). Da diese Reaktion bedeutend schneller abläuft als die Reaktion mit Cysteinresten, wird sie als der Hauptmechanismus des NO-Scavenging angesehen^{52, 129}. In einer klinischen Studie an 26 chirurgischen Patienten wurde nach Gabe von DCLHb ein Anstieg der Methämoglobinkonzentration im Blut auf $4,08 \pm 1,36$ % gemessen¹⁵⁸.

c) NO bindet an die Hämgruppe von Deoxyhämoglobin und bildet Nitrosohämoglobin.

Die tatsächliche oder die *de facto* Bedeutung der Interaktion von NO und Hämoglobin ist noch nicht vollständig geklärt. Das von den Gefäßendothelien gebildete NO diffundiert aufgrund des Konzentrationsgradienten sowohl nach luminal als auch abluminal zu den glatten Muskelzellen. An diesen löst NO über einen Guanylatcyclase-abhängigen Mechanismus eine Vasorelaxation aus. Die kurze Halbwertszeit von NO und die hohe *in vitro*-Reaktionsrate mit Hämoglobin ($k = 3\text{-}5 \times 10^{-7} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$) würden eine Aktivierung des Zielmoleküls der Guanylatcyclase in der glatten Gefäßmuskelzelle in einem normalen Kreislaufsystem und damit eine Vasokonstriktion aufgrund des schnellen NO-Abbaus

durch Hämoglobin unmöglich machen. Das in Erythrozyten vorhandene Hämoglobin interagiert jedoch im Gegensatz zu freiem Hämoglobin in gleicher Konzentration um den Faktor 500-1000 langsamer mit NO^{129, 130}. Die Ursache dieses Unterschieds zwischen der schnellen Reaktion von NO mit freiem Hämoglobin und der langsamen mit in Erythrozyten gebundenem Hb ist Gegenstand neuester Forschungsarbeit²²². Vaughn et al. konnten zeigen, daß die Simulation von Flußbedingungen in isolierten Mikrogefäßen die NO-abhängige Dilatation der Gefäße nicht so ausgeprägt verhindern kann, wie dies durch in Stase befindliches Blut möglich ist¹²⁹. Das Hb von in Stase befindlichem Blut besitzt somit eine weit höhere Interaktionsfähigkeit als das in strömenden Erythrozyten gebundene. Im Gegensatz dazu wurde der NO-Verbrauch von freiem Hämoglobin unter Fluß-Bedingungen im Vergleich zu Experimenten ohne Blutfluß, nicht gesenkt. Daher wurde von Liao et al.¹²⁹ postuliert, daß der erythrozytenfreie Raum am Rande der Gefäßwand unter Flußbedingungen eine schnelle Interaktion des im Erythrozyten gebundenen Hämoglobin mit dem vom Gefäßendothel freigegebenen NO verhindert. Freie Hämoglobinlösungen bestehen jedoch aus einer homogenen Lösung, die somit sowohl das luminale NO als auch durch Diffusion über die Endothelwand hinaus das abluminale NO "verbrauchen" können. Desweiteren wurde an einem isoliert perfundierten Lungenmodell gezeigt, daß DCLHb auch Kapillaren perfundieren kann, die normalerweise für Erythrozyten nicht zugänglich sind⁴³. Da Blutfluß-abhängige Effekte mit freier Hämoglobinlösung nicht erzielt werden konnten, geht man davon aus, daß der direkte Kontakt einer Hämoglobinlösung mit der Gefäßwand zur verstärkten Reaktion des Hämoglobins mit NO am Entstehungsort führt¹²⁹. Die Blutfluß-abhängigen Mechanismen und der erythrozytenfreie Raum erklären aber noch lange nicht vollständig den Unterschied der Reaktion von NO mit freiem und Erythrozyten-gebundenem Hämoglobin. Vaughn et al. postulieren, daß der Erythrozyt einen unbekanntem intrinsischen Mechanismus besitzt, der eine Diffusion des NO in den Erythrozyten verhindert²²³. Mit Hilfe eines Computersimulationsmodell postuliert die selbe Arbeitsgruppe, daß die Permeabilität durch eine einzelne Erythrozytenmembran beziehungsweise die Reaktionsrate des Hämoglobins im Erythrozyten um den Faktor 2000 niedriger liegt als zuvor vermutet wurde²²². Eine Aufklärung dieses Mechanismus könnte Möglichkeiten bei der biochemischen Modifikation und Weiterentwicklung von neuen Hämoglobinlösungen und künstlich hergestellten Erythrozyten bieten. Da DCLHb

als stromafreie Hämoglobinlösung frei im Plasma vorliegt, kann dessen Interaktion mit NO mit dem mit freien Hämoglobin verglichen werden.

Neben der oben beschriebenen Eigenschaft als Botenstoff bei der Relaxation von glatten Muskelzellen hat NO noch viele weitere Aufgaben. So ist bekannt, daß es während Entzündungsreaktionen vermehrt gebildet wird und zu einer Hemmung der Blutplättchenadhärenz und –aggregation führt. Desweiteren verringert es die Chemotaxis von Leukozyten. Bei der gleichzeitigen Bildung von Sauerstoffradikalen reagiert NO mit diesen zu dem gewebetoxischen Peroxynitrit. Die vielfältige Wirkungsweise von NO ist wahrscheinlich die Ursache, warum in der Literatur widersprüchliche Daten bei der Verwendung von NO-Inhibitoren und deren Auswirkungen auf die akute Pankreasentzündung bestehen. Die Gabe von NO-Donoren erwies sich in dem Modell der ödematösen Pankreatitisinduktion durch Cerulein²³⁸, einem Ischämie/Reperusionsmodell des Pankreas am Schwein¹⁸ und bei nekrotisierender Pankreatitis^{51, 239} als protektiv. In einer intravitalmikroskopischen Studie erzeugte die Gabe eines NO-Inhibitors die Zunahme der Leukozyten-Endothelinteraktion in postkapillären Venolen bei Cerulein-induzierter Pankreatitis⁹⁴. Desweiteren wurde in einem anderen Modell der postischämischen Pankreatitis eine deutliche Zunahme der NO-Produktion durch den vermehrten Nachweis von NO-Metaboliten und nitrosyliertem Hämoglobin im portalvenösen Blut in der Ischämiegruppe nachgewiesen. Auch hier konnte durch die Gabe eines NO-Inhibitors die NO-Produktion verringert werden, was zu einer Erhöhung des Schadens und einer Abnahme des Pankreasblutflusses führte²¹⁶. Im Gegensatz dazu konnte in einem anderen letalen Modell der akuten Pankreatitis (Mortalität:100%) die Stabilisierung des arteriellen Blutdrucks durch die Gabe eines NO-Synthase-Inhibitors das Outcome der Tiere deutlich verbessern. Zusammengefasst existieren in der Literatur mehr Beispiele, die auf eine deutlich protektive Wirkung von NO während der akuten Entzündung des Pankreas hinweisen. Die Stabilisierung der Makrohämodynamik, die verringerte Bildung von Peroxynitrit und die Verringerung der Adhärenz von Leukozyten und Plättchen könnten mögliche Ursachen für die Verringerung des postischämischen Gewebeschadens und die leichte Verbesserung der postischämischen Mikrozirkulation sein.

2) **Endothelin** ist ein vom Gefäßendothel gebildeter vasokonstringierender Faktor. Es konnte gezeigt werden, daß Endothelin mit dem vasorelaxierenden Faktor NO an der

Endothelzelle in einem geregelten Gleichgewicht steht¹⁷⁹. Wie schon in der Einleitung beschrieben, führt die Infusion von DCLHb zu einer Zunahme der Endothelinkonzentration im Serum. Bei Hunden sinkt nach Infusion von Endothelin der Blutfluß zum Pankreas um ca. 50%²¹⁴. Desweiteren konnte durch Applikation von Endothelin eine ödematöse Pankreatitis in eine hämorrhagische Pankreatitis überführt werden¹³¹. Eine einzelne Studie postuliert den protektiven Effekt einer Endothelin-Infusion auf die Ausprägung einer akuten Pankreatitis¹¹². Es kann somit davon ausgegangen werden, daß die Zunahme der Endothelinproduktion eine gewebezerstörende und die inflammatorische Reaktion der postischämischen Pankreatitis verstärkende Wirkung hat. Auf Grund unserer Ergebnisse, die eher eine Verbesserung der Mikrozirkulation durch DCLHb während Reperfusion ergaben, erscheint dieser Mechanismus für die Mikrozirkulation des Pankreas weniger relevant.

3) Ein weiteres Substrat kardiovaskulärer Eigenschaften der zirkulatorischen Eigenschaften von DCLHb ist das **adrenerge System**. Es konnte nämlich gezeigt werden, daß ein Alpha1-Rezeptorblocker zwar die blutdrucksteigernde Wirkung von DCLHb aufheben kann, ein direkter Einfluß auf die Veränderung des Blutflusses zu den Organen des Bauchraums wurde jedoch nicht nachgewiesen⁷⁰. Deshalb erscheint der Einfluß auf die Mikrozirkulation des Pankreas durch DCLHb über einen adrenergen Mechanismus unwahrscheinlich.

Unsere Ergebnisse haben gezeigt, daß DCLHb keine negative Beeinflussung der FKD bei postischämischer Pankreatitis auslöst. Im Gegenteil wurde 120 Minuten nach Reperfusion sogar eine leichte, aber auch signifikante Verbesserung des postischämischen Perfusionsausfalls durch die DCLHb Gabe festgestellt. Die leichte Verbesserung der Mikrohämodynamik kann durch die bessere Gesamtverfassung der Tiere mit Stabilisierung der Makrohämodynamik, der verminderten Bildung von Peroxynitrit während Reperfusion und den verbesserten Sauerstoffantransport ins Gewebe durch DCLHb erklärt werden. Unsere Daten liefern somit keine Hinweise für ein erhöhtes Risiko einer akuten Pankreatitis über einen mikrozirkulatorisch vermittelten Mechanismus durch Infusion von DCLHb.

5.2.2.3 Einflüsse von DCLHb auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion

40 Minuten nach Reperfusion und DCLHb-Gabe war die Adhärenz von Leukozyten in postkapillären Venolen des Pankreas im Vergleich zur mit HAES behandelten Ischämie-Reperfusiongruppe nicht signifikant unterschiedlich. Erst später, nach 120 Minuten Reperfusion, zeigte sich ein deutlicher Rückgang der Anzahl adhärenter Leukozyten nach der Infusion bei Anwendung von DCLHb.

Die Aktivierung von Leukozyten spielt in der Pathogenese des Ischämie-Reperfusionsschadens eine entscheidende Rolle. Aktivierte Granulozyten schädigen das entzündete Gewebe über verschiedene pathophysiologische Mechanismen^{125, 237}:

- 1) Leukozyten besitzen ein membranständiges NADPH-abhängiges Oxidase-Enzym-System, welches sie zur Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen nach ihrer Aktivierung befähigt (respiratory burst).
- 2) Aktivierte Leukozyten können das Lumen der Kapillaren des entzündlich geschädigten Gewebes verlegen und hierdurch zu dem Perfusionsversagen und dem no-reflow Phänomen beitragen.
- 3) Aus den Granula der Leukozyten können nach Entzündungsreiz proteolytische Enzyme und Giftstoffe freigesetzt werden, die neben ihrer direkten gewebeschädigenden Wirkung auch sekundäre immunologische Effekte, wie die Aktivierung von Thrombozyten oder die Regulation von Adhäsionsmolekülen beeinflussen^{23, 32}.

Von besonderer Relevanz, auch für die postischämische Mikrozirkulation, erwiesen sich hierbei die beiden von den Leukozyten freigesetzten Serin-Proteasen Cathepsin G und neutrophile Elastase. An unserem Modell der postischämischen Pankreatitis konnten wir eine theapeutische Beeinflussbarkeit des kapillären “no-reflow” Phänomens nach Gabe eines rekombinanten Serin-Protease-Inhibitors gegen diese beiden Proteasen erzielen²³¹. Dieses Ergebnis unterstreicht die Bedeutung der Aktivierung von neutrophilen Granulozyten für die Pathogenese des Reperfusionsschadens am Pankreas.

Die Adhäsion von Leukozyten an postkapillären Venolen wird nach heutigem Kenntnisstand nachhaltig durch die Freisetzung von NO aus dem Endothel beeinflusst. Durch die Pionierarbeit von Kubes¹¹⁸ konnte gezeigt werden, daß die Superfusion des Mesenteriums der Katze mit NOS-Inhibitoren zu einer vermehrten Adhäsion von Leukozyten führt. Aus dieser Hypothese entstanden die verschiedensten experimentellen Arbeiten, in denen die Abhängigkeit der Leukozytenadhäsion von NO demonstriert werden konnte (Übersichtsarbeit¹²⁴). Auch Endothelin hat Auswirkungen auf die Adhäsionskaskade der Leukozyten. Intravitalmikroskopische Arbeiten aus unserem Labor zeigten eine deutliche proadhäsive Wirkung durch die Applikation von Endothelin-1 in postkapillären Venolen des Dünndarms der Ratte²². NO-scavenging Effekte und die vermehrte Freisetzung von Endothelin hätten eher eine vermehrte Adhäsion von Leukozyten in der Mikrostrombahn erwarten lassen. Gerade in der Anfangsphase der Reperfusion würde man durch die verstärkte Reaktion von NO eine deutliche Steigerung der Adhäsion erwarten. Im Gegensatz dazu zeigt sich aber der deutliche Rückgang der Adhäsion zum Ende der Reperfusionsphase. Die verminderte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion von DCLHb könnte durch die verbesserte Makrohämodynamik mit Verstärkung der Scherkräfte zu suchen sein, die auf die Leukozyten einwirken und dadurch antiadhäsive Eigenschaften generieren.

Die Studie ergibt somit keinen Anhalt dafür, daß ein zusätzlicher entzündlicher Stimulus durch DCLHb ein erhöhtes Risiko für Pankreatitis bewirkt.

5.2.2.4 Einflüsse von DCLHb auf Serumparameter

In der HAES-behandelten Ischämiegruppe beobachteten wir einen Anstieg der Serumamylaseaktivität sowie der Interleukin-6 Serumkonzentration. Dieser blieb in der DCLHb-behandelten Gruppe aus. Die klinische Bedeutung dieser beiden Parameter wurde schon im Kapitel 5.1.2.3 erörtert. Insbesondere der fehlende Anstieg der Interleukin-6 Serumkonzentration als Prognoseparameter weist auf die fehlende entzündliche Stimulation nach DCLHb für das Pankreas hin. Somit konnte auch von Seiten der Serumparameter kein zusätzlicher entzündlicher Schaden des Organs durch die DCLHb-Infusion detektiert werden.

5.2.3 Einflüsse von DCLHb nach hämorrhagischem Schock

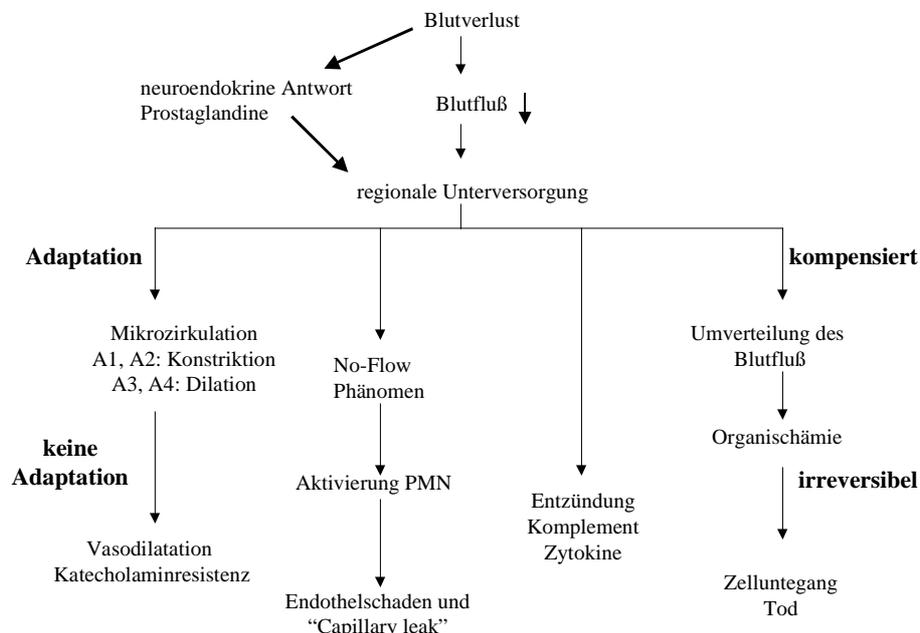


Abbildung 25: Pathophysiologie des hämorrhagischen Schock (aus Peitman et al. ¹⁶⁵).

Der Kreislauf-Schock ist ein pathophysiologischer Zustand, der durch eine akute Verminderung der Sauerstoffversorgung lebenswichtiger Organe gekennzeichnet ist¹⁴⁷. Ein akuter Blutverlust von mehr als 30% des gesamten Blutvolumens bewirkt eine Reduktion der Fähigkeit des Kreislaufes, Sauerstoff in ausreichender Menge für Körperfunktionen zur Verfügung zu stellen. Der entscheidende Mechanismus des hämorrhagischen Schocks ist eine zu geringe Perfusion lebenswichtiger Organe, die entweder durch einen verminderten Blutfluß oder eine ungenügende Verteilung des Blutvolumens im Körper verursacht wird²⁰¹. Diese initialen Mechanismen führen zu verschiedenen neuronalen und biochemischen Antworten, die letztlich eine Dysfunktion der Organe zu Folge haben. Am Anfang des hämorrhagischen Schocks steht der akute Blutverlust. Die verschiedenen hierdurch verursachten Folgen sind im Überblick in Abbildung 25 dargestellt. Werden die durch Hämorrhagie ausgelösten Pathomechanismen nicht rechtzeitig bekämpft, sterben die Patienten im irreversiblen Schock mit einem Multiorganversagen. Viele experimentelle Forschungsarbeiten mittels intravitaler Video-

Fluoreszenzmikroskopie konnten den entscheidenden Beitrag der Mikrozirkulation zum Schockgeschehen belegen. Die verschiedenen Organdysfunktionen nach hämorrhagischem Schock werden heute vor allem durch mikrozirkulatorische Störungen erklärt. Einschwemmung von Leukozytenaggregaten, Sauerstoffradikalbildung, Komplementaktivierung und pro-inflammatorische Zytokine aus ischämisch geschädigtem Körpergewebe bewirken eine Permeabilitätsänderung des pulmonalen Kapillarsystems und führen hierdurch zum posthämorrhagischen Lungenschaden (ARDS)¹⁶⁵. Weitere wichtige Schock-Organ sind Darm, Niere, und Leber. Schon früh wurde man auch auf die Rolle des Pankreas als Schock-Organ aufmerksam. Auch wenn Komplikationen die direkt hieraus entspringen verglichen mit dem Lungen- und Nierenversagen selten sind, können auch hier fatale Folgen für den Patienten entstehen. Das Pankreas ist reich an proteolytischen Enzymen, die bei einer ischämischen Schädigung im Schock in die Zirkulation freigesetzt werden können. Hier tragen sie zu den verschiedenen Organschäden bei. Ein sogenannter "Myocardial depressant factor", der eine negativ inotrope Wirkung auf die Myokardfunktion im Schock besitzt, wird aus dem ischämisch geschädigten Pankreasgewebe freigesetzt^{135, 245}. Die letztendliche Bedeutung eines solchen Faktors konnte nie gesichert werden. Die Arbeitsgruppe von Schmid-Schönbein konnte in neueren Experimenten zeigen, daß die Inhibition von Proteasen des Pankreas im ischämischen Darmlumen zu einer verminderten Freisetzung von Leukozyten-Aktivatoren in das Blutplasma von Ratten führt¹⁴⁹. Durch das ischämisch geschädigte Darmgewebe während hämorrhagischem Schock werden nach Schmid-Schönbein über diesen Mechanismus Pankreasenzyme in die Zirkulation freigesetzt und tragen über die beschriebene Leukozyten-Aktivierung entscheidend zum Multiorganversagen bei^{189, 190}. Bei Sektionen von Patienten, die am hämorrhagischen Schock verstorben waren, sind öfters entzündliche Veränderungen des Pankreas beobachtet worden^{63, 79, 99, 236}. Tierexperimentelle Untersuchungen zeigen eine Abnahme des Blutflusses und des Gewebe-PO₂ des Pankreas während Hämorrhagie²²⁹. Auch eine Abnahme der kapillären Perfusion über die Resuscitation-phase hinaus nach Gabe verschiedener Infusionslösungen ist bekannt²²⁹. Diese mikrozirkulatorischen Veränderungen werden als Ursache der beschriebenen "Schockpankreatitis" angesehen und vor allem durch einen Ischämie-Reperfusionsschaden hervorgerufen.

Da die Indikation für den Einsatz der DCLHb-Lösung vor allem die Anwendung bei Patienten mit hämorrhagischem Schock sein sollte, wurde in dem letzten Teil unserer

Untersuchung der inflammatorische Schaden des Pankreas durch eine Hämorrhagie induziert. Veränderungen der entstandenen Mikrozirkulationsstörung nach Therapie mit DCLHb sollten in Bezug zu zwei anderen Therapiemaßnahmen gesetzt werden und durch diesen Vergleich eine Verschlechterung bzw. Verbesserung der Pankreasperfusion detektiert werden.

5.2.3.1 Effekte von DCLHb auf die Makrohämodynamik

DCLHb führt zu einer vollständigen Wiederherstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks nach hämorrhagischem Schock. Der MAP wurde unmittelbar nach Infusion von DCLHb auf Ausgangswerte angehoben. Das Ziel der Schocktherapie ist ein möglichst schneller Ersatz des verlorenen Volumens und der Sauerstofftransportkapazität. Auch wenn die Mikrozirkulationsstörung heute als das Hauptproblem in der Pathophysiologie des hämorrhagischen Schocks angesehen wird, kann in der initialen Phase ein Schockzustand bei einem Patienten nur aufgrund der Veränderungen des arteriellen Blutdrucks und der Herzfrequenz diagnostiziert und therapiert werden. Andere Parameter, die in der Behandlung auf der Intensivstation sicher Ihre Berechtigung haben, sind nicht ohne Zeitverlust zu erheben und in der Kürze der Zeit, die zur Reaktion auf den akuten Blutverlust zur Verfügung steht, wenig hilfreich. Leider kann die vorherrschende Mikrozirkulationsstörung bisher klinisch nur unzureichend diagnostiziert und therapiert werden, da Möglichkeiten zur direkten Messung der Mikrozirkulation am Patienten fehlen. Ein prospektiv getesteter Algorithmus zur Therapie des traumatisch bedingten hämorrhagischen Schocks in der Notaufnahme erwies sich als erfolgreich und wirkte sich positiv auf das Outcome der Patienten aus. Hierbei war das erste therapeutische Ziel, durch schnelle Volumengabe den MAP über 80 mmHg anzuheben²⁰². Erst nach dieser ersten Stufe der Volumentherapie erfolgte die weitere Zufuhr von Flüssigkeit und Blut nach intensivmedizinischen Gesichtspunkten (Zielpunkte einer Volumentherapie beim Schockpatient nach Marino¹³⁶: ZVD = 15mmHg, Wedge-Druck = 10-12mmHg, Herzindex > 3 l/min/m², Sauerstoffverbrauch [VO₂] >100ml/min/m², Laktat <4mmol/l, Base deficit -3 bis +3 mmol/l). Die schnelle Restoration des MAP durch DCLHb ist somit ein erwünschter Effekt und Grundvoraussetzung einer erfolgreichen Therapie des hämorrhagischen Schocks.

5.2.3.2 Effekte von DCLHb auf die Mikrohämodynamik

Die beiden Sauerstoff-transportierenden Lösungen DCLHb und Vollblut erbrachten nach Infusion deutlich höhere FKD-Werte des Pankreas, als sie nach Infusion von HAES gemessen wurden. Die aus dem Blutverlust entstehende Dysfunktion der Mikrozirkulation bewirkt sowohl eine Verstärkung der initialen ischämischen Schädigung des Gewebes, als auch der darauffolgenden inflammatorischen Reaktion des Organs. Für den entzündlichen Gewebeschaden des Pankreas nach hämorrhagischem Schock wird vor allem die Ischämie während der Schockphase und die weiterbestehende Mikrozirkulationsstörung bei wiederhergestellter Makrohämodynamik durch Blutersatzstoffe verantwortlich gemacht^{85, 109, 182, 236}. Die Länge der Erythrozyten-perfundierten Kapillaren ist prognostisch entscheidend für die Vitalität eines Organs nach hämorrhagischem Schock. Die FKD gibt Aufschluß über den funktionell für die nutritive Versorgung des Organs wichtigen Anteil an der Gesamtdurchblutung²¹⁹. Die posthämorrhagische Infusion von DCLHb resultiert in einer Zunahme der Gesamtdurchblutung des Gastrointestinaltraktes in Schockexperimenten an der Ratte⁶⁸. Durch unsere Experimente konnte gezeigt werden, daß die Zunahme des Gesamtblutflusses zum Pankreas sich offenbar auch günstig auf die funktionell bedeutende kapilläre Perfusion des Organs auswirkt. Die Gabe von Hydroxiäthylstärke hatte in unserer Studie einen ähnlichen Hämatokritwert zur Folge wie in der DCLHb Gruppe; dies spricht für einen vergleichbaren Volumeneffekt der beiden verwendeten Lösungen. Die Wiederherstellung der kapillären Perfusion in der DCLHb behandelten Gruppe war jedoch deutlich besser als durch HAES und zeigte keine Verschlechterung im Vergleich zur Vollblutinfusion.

5.2.3.3 Effekte von DCLHb auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion

Die Aktivierung von Leukozyten ist ein entscheidendes Kennzeichen der inflammatorischen Reaktion beim hämorrhagischen Schock. Die Induktion einer Neutropenie bei Ratten bewirkt eine Reduktion des kapillären "no-reflow" Phänomens

des Pankreas im hämorrhagischen Schock¹⁵. Auf die verschiedenen Möglichkeiten der Schädigung des entzündeten Gewebes durch Leukozyten ist in dem Abschnitt der postischämischen Pankreatitis schon genauer eingegangen worden. Die Wichtigkeit der Adhäsionskaskade der Leukozytenaktivierung im hämorrhagischen Schock wird in einem Primatenmodell besonders deutlich. Die Applikation eines monoklonalen gegen das Leukozyten-Adhäsionsmolekül CD 18 gerichteten Antikörpers geht mit einer Reduktion des benötigten Infusions-Volumens und einer Verbesserung der Überlebenschancen des hämorrhagischen Schocks einher¹⁴⁸.

In unseren Untersuchungen zeigte sich 120 Minuten nach der Infusion von HAES eine signifikante Erhöhung der Leukozytenadhärenz in postkapillären Pankreasvenolen. Im Gegensatz dazu blieb ein Anstieg der Leukozytenadhärenz in der DCLHb behandelten Gruppe aus. Hierdurch ergibt sich die Schlußfolgerung, daß eine Infusion von DCLHb keine spezielle Pankreatitis-auslösende Wirkung im Vergleich zu den beiden anderen getesteten Therapieverfahren besitzt.

5.2.3.4 Effekte von DCLHb auf die Oxygenierung

Die Zunahme des pulmonalen Gefäßwiderstandes (PVR) durch die vasoaktive Wirkung von Hämoglobinlösungen ist ein vielfach beobachtetes Phänomen¹⁰⁰. Hierbei scheint eine Abhängigkeit von der Art der infundierten Hämoglobinlösung und der jeweils für die Experimente verwendeten Spezies zu bestehen⁷⁷. Bei der Applikation von DCLHb bei Patienten mit kardialer Bypassoperation zeigte sich gegenüber der Kontrollgruppe eine deutliche Tendenz zu einem höheren PVR. Der durchschnittliche PVR in der DCLHb-behandelten Gruppe lag innerhalb der ersten 24h bei Werten um 190 dyn/sec/cm^5 während in der Gruppe, die ausschließlich mit Erythrozytenkonzentraten behandelt wurde, nur Durchschnittswerte von 160 dyn/sec/cm^5 erreicht wurden. An zwei von sieben Messzeitpunkten fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den beiden Studiengruppen bezüglich des PVR¹²¹. In einem Modell am Schwein konnte gezeigt werden, daß die inhalative Gabe von NO zu einer Reduktion des Anstiegs des pulmonalarteriellen Druckes nach Gabe von DCLHb führt¹⁹⁵. Dies erlaubt den Schluß, daß dieser Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes durch NO-scavenging Effekte in der pulmonalen Strombahn ausgelöst wird. Ob dieser Anstieg des PVR durch die vasoaktive

Wirkung auf größere arterielle Gefäße oder mehr durch den Einfluß auf Alveolen-versorgende Arteriolen hervorgerufen wird, bleibt eine zu klärende Frage.

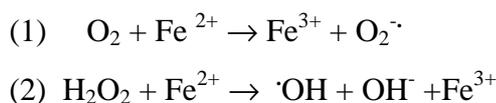
Unsere Studie ergab als Nebenbeobachtung ebenfalls Hinweise auf die vasoaktive Wirkung von DCLHb auf das pulmonale Gefäßbett. Bei Gabe des Sauerstoffträgers während der Reperfusionphase bei den Tieren mit hämorrhagische Schock mußten diese während der ersten 15 Minuten mit einer erheblich höheren inspiratorischen Sauerstofffraktion während der Einatmungsphase beatmet werden. Um diesen Mehrbedarf an Sauerstoff bei der DCLHb Infusion zu quantifizieren, errechneten wir den Quotienten aus dem gemessenen arteriellen Sauerstoffpartialdruck und der inspiratorischen Sauerstofffraktion ($P_{aO_2}/F_{i O_2}$) mit der die Tiere beatmet wurden. Dieser Quotient wird Oxygenierungsindex bezeichnet. Bei einem gesunden Individuum beträgt der Anteil des Blutflusses (Q_s), der nicht unmittelbar am Gasaustausch in der Lunge teilnimmt weniger als 10% des gesamten Herzzeitvolumen (Q_t). Dieses Verhältnis ist die Shunt-Fraktion (Q_s/Q_t) der Lungendurchblutung und gilt als sensitiver Parameter einer mikrozirkulatorisch hervorgerufenen Störung des pulmonalen Gasaustausches. Auch wenn die Genauigkeit der Korrelation zwischen der pulmonalen Shunt-Fraktion und dem errechneten Oxygenierungsindex unterschiedlich bewertet wird^{33, 48}, gilt der Oxygenierungsindex als geeigneter Parameter für die grobe Abschätzung der pulmonalen Shuntfraktion in der klinischen Anwendung⁴⁴. Dabei entsprechen $P_{aO_2}/F_{i O_2}$ Werte unter 200 etwa einer Q_s/Q_t Fraktion von über 20%, $P_{aO_2}/F_{i O_2}$ Werte über 200 einem Q_s/Q_t Verhältnis von unter 20%¹³⁶. Der signifikante Abfall des errechneten Oxygenierungsindex in der DCLHb-Gruppe während der ersten 15 Minuten nach Infusion ist somit wohl auf eine Zunahme des nicht am Gasaustausch beteiligten Blutflusses durch die Lunge zurückzuführen. Dies könnte durch eine vasokonstringierende Wirkung auf die am Gasaustausch beteiligten Mikrogefäße infolge des durch DCLHb induzierten NO-scavenging erklärt werden.

Diese pulmonale Nebenwirkung von DCLHb wurde in unseren Experimenten nur in der Studie des hämorrhagischen Schock detektiert. Wir wählten für die Schockstudie eine relativ kurze Infusionszeit von DCLHb um hier der klinischen Situation bei akuten Blutverlust möglichst nahe zu kommen. Die Dosierungen von DCLHb in der Schockstudie waren im Vergleich zu den Versuchsgruppen unter Kontrollbedingungen beziehungsweise nach normothermer Ischämie und Reperfusion deutlich höher. Dadurch konnte die Notwendigkeit des erhöhten Sauerstoffbedarf nur in der Gruppe mit der

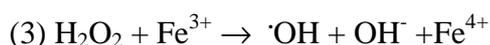
vergleichsweise hohen Dosierung nach hämorrhagischem Schock erfaßt werden. Diese Nebenwirkung erscheint in unseren Versuchen als nicht besonders dramatisch. Beim Patienten jedoch könnte ein solcher Anstieg des PVR bei Intensivpatienten durchaus zu Problemen führen. Bei der Neuentwicklung von Hämoglobinprodukten sollte daher eine solche Nebenwirkung durch eine Modifizierung der Scavenging-Eigenschaften von NO von vornherein vermieden werden.

5.2.3.5 Effekte von DCLHb auf die Lipidperoxidation im Pankreasgewebe

Oxidativer Streß durch Generierung von Gewebe-toxischen Sauerstoffradikalen wird als schädigender Faktor in der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis¹⁹² und des Ischämie-Reperfusionsschadens diskutiert⁹². Ein Schlüsselmechanismus zur Entstehung dieser Radikale ist die Hochregulation der Xanthinoxidase zum Abbau der angesammelten Adeninnukleotide während der Reperfusionsphase⁹¹. Daneben setzen aktivierte Leukozyten reaktive Radikale frei. Freie Sauerstoffradikale können Adhäsionsmoleküle hochregulieren, die Nukleinsäuren angreifen und verschiedene Enzyme und Peroxidasen in der Zellmembran deaktivieren⁵⁷. Hämoglobin selbst ist ebenfalls an der Bildung von Sauerstoffradikalen beteiligt. Im Rahmen der Fenton-Reaktion kann das 2-wertige Eisen des Hämoglobins zu Fe³⁺ umgewandelt werden. Hierbei entstehen durch die Autooxidation des Hämoglobins die gewebe-toxischen Superoxid- und Hydroxylradikale:



Das so entstandene Fe³⁺ kann über den weiteren Verbrauch von Wasserstoffperoxid zum 4-wertigen Ferryl-Hämoglobin umgewandelt werden:



Diese vielfältigen Möglichkeiten der Bildung freier Radikale und Entstehung des ebenfalls gewebetoxischen Ferryl-Hämoglobin stellen die Sicherheit der Anwendung von künstlich hergestellten Hämoglobinlösungen als Sauerstoffträger in Frage. Innerhalb des

Blutstroms gibt es mehrere Antioxidantien, welche die obengenannten Reaktionsschritte des Hämoglobins verhindern und das mehrwertige Eisen wieder in seinen zweiwertigen Zustand zurückversetzen. Hämoglobin kann nur in diesem Zustand Sauerstoff transportieren. In den Erythrozytenmembranen befinden sich gebundene Antioxidantien wie zum Beispiel Vitamin E und Coenzym Q. Desweiteren haben verschiedene Plasmabestandteile wie Albumin und Haptoglobin eine hohe antioxidative Wirkung⁷⁴. Nach Wegfall der Erythrozytenmembran können diese Autooxidationsvorgänge ungehinderter ablaufen. Das Hämoglobin kann aus seinem Sauerstoff-transportierenden Zustand zu Methämoglobin umgewandelt werden. In einem Modell mit Austauschtransfusion von mit Glutaraldehyd polymerisierten bovinen Hämoglobin ist in einer experimentellen Studie eine Methämoglobinkonzentration von bis zu 40 % innerhalb der ersten 24h nach Gabe nachgewiesen worden¹²³. Die These, freies Hämoglobin könnte zu einer vermehrten Bildung von Sauerstoffradikalen beitragen, die einen entstandenen Reperfusionsschaden im hämorrhagischen Schock durch die vermehrte Lipidperoxidation verstärkt, hat somit einen ernst zu nehmenden Hintergrund.

Um die Lipidperoxidation zu charakterisieren und eventuell ausschließen zu können, wurde als Maß die TBARM-Konzentration im Überstand des Pankreas Homogenat gemessen. Hierbei zeigte sich eine erhebliche Zunahme der TBARM Konzentration nach der Gabe von DCLHb und Vollblut. Da nach DCLHb die Lipidperoxidation nicht höher als nach Therapie mit Vollblut war, ist eine zusätzliche, das Gewebe übermäßig schädigende, Radikalbildung durch DCLHb nicht anzunehmen. Dies unterstützt Ergebnisse einer experimentellen Studie mit Ischämie und Reperfusion der Niere, in welcher ebenfalls keine erhöhte Radikalbildung nach DCLHb Infusion mittels Elektronenspinresonanz-Technik gemessen wurde¹⁷⁰. Der Befund einer erhöhten Lipidperoxidation nach Gabe der beiden Sauerstoff-transportierenden Infusionslösungen paßt sehr gut in das pathophysiologische Bild eines Reperfusionsschadens, der während der Resuscitation-Phase entsteht. Die funktionelle Kapillardichte in diesen beiden Gruppen war jedoch deutlich höher als in der HAES behandelten Gruppe. Somit ist die schnelle Wiederaufführung einer Sauerstoff-transportierenden Lösung sicher die beste Möglichkeit zur Behandlung der Hypoxie. Die erhöhte Lipidperoxidation ist wohl Zeichen eines Schadens, der sich in unserem Versuchsaufbau nicht entscheidend auf die Mikrozirkulation des Pankreas auswirkt.

5.3 Klinische Bedeutung der Ergebnisse und Ausblick

Die Mikrozirkulation ist das Zielorgan der Pathophysiologie des hämorrhagischen Schock und des Ischämie-Reperfusionsschadens. Daher ist die Wiederherstellung der funktionellen Kapillarperfusion bei der primären Behandlung des akuten Blutverlusts ein angestrebtes Therapieziel. Unsere Ergebnisse konnten zeigen, daß die Infusion des Blutersatzstoffs DCLHb keine negativen Effekte auf die mikrozirkulatorischen Parameter funktionelle Kapillardichte und Leukozyten-Endothelzell-Interaktion im exokrinen Pankreasgewebe besitzt. Die Gabe von DCLHb nach hämorrhagischem Schock in höherer Dosierung bewirkte eine fast vollständige Wiederherstellung der Pankreas-mikrozirkulation, die vergleichbar mit der Infusion von Vollblut war.

In klinischen Studien wurde nach Anwendung von DCLHb bei einigen Patienten ein Anstieg der Pankreasamylaseaktivität im Serum sowie in wenigen Fällen eine akute Pankreatitis ungeklärter Genese beobachtet. In der Pathophysiologie der akuten Pankreatitis rücken immer mehr mikrozirkulatorische und inflammatorische Störungen in den Vordergrund. Der mikrozirkulatorische Schaden einer akuten Pankreatitis ist durch die verminderte funktionelle Kapillardichte, eine Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktion und der vermehrten Erzeugung von Sauerstoffradikalen im exokrinen Pankreasgewebe charakterisiert. Mechanismen wie das Scavenging von NO, die vermehrte Produktion von Endothelin und die Überlastung des Kreislaufs durch reaktive Sauerstoffradikale sind entscheidend an der Dysregulation der Mikrozirkulation beteiligt. Hieraus entstand der Verdacht auf die Generierung von Pankreatitiden als unerwünschte Nebenwirkung von DCLHb.

In Bezug auf die klinische Relevanz der Ergebnisse lassen sich aus dieser tierexperimentellen Arbeit folgende Schlußfolgerungen ziehen:

Das Ausbleiben einer Mikrozirkulationsstörung durch eine Infusion von DCLHb bei Ischämie-Reperfusion und hämorrhagischem Schock spricht gegen die Möglichkeit der Auslösung oder Verstärkung einer inflammatorischen Reaktion im Pankreasgewebe. Die bekannten vasokonstriktiven Wirkungen von DCLHb wie Scavenging von NO, die vermehrte Ausschüttung von Endothelin und der erhöhte oxidative Streß waren entweder nicht sehr ausgeprägt oder konnten durch die positiven Einflüsse von DCLHb (wie z. B.

Volumenexpansion und O₂-Transport) kompensiert werden. Bezüglich des Organs Pankreas kann DCLHb somit als ein im Tierversuch sicheres Medikament gelten.

DCLHb bewirkt eine suffiziente Wiederherstellung der Pankreasmikrozirkulation nach hämorrhagischem Schock und erscheint deshalb als geeignetes Therapeutikum in der primären Blutersatztherapie.

Unsere Ergebnisse haben auch unmittelbare Bedeutung bei der perioperativen Anwendung einer modifizierten Hämoglobinlösung während Pankreaseingriffen und der intensivmedizinischen Therapie von Sepsispatienten mit akuter Pankreatitis. Da nach dem heutigen Erkenntnisstand die in solchen Situationen angewendeten Infusionslösungen vor allem eine Verbesserung der Mikrozirkulation des Pankreas bewirken sollten¹⁰⁸, könnte DCLHb auch in diesem Bereich als brauchbarer Blutersatzstoff zum Einsatz kommen.

Aufgrund des Scheiterns der US-Studie mit DCLHb bei Traumapatienten wurde die Entwicklung und Zulassung dieser Hämoglobinlösung nicht mehr weiterverfolgt²⁰⁶. Andere modifizierte Hämoglobinprodukte menschlichen und bovinen Ursprungs sind weiterhin in klinischer Testung. Bezüglich der Mikrozirkulation sollten diese Produkte die Sicherheits- und Leistungsstandards von DCLHb mindestens erreichen oder übertreffen, um eine reale Aussicht auf eine erfolgreiche klinische Anwendung zu erlangen. Besonders erfolgversprechend erscheint die Herstellung von Hämoglobinlösungen mittels rekombinanter Technik. Dabei können durch die gentechnische Veränderung der einzelnen Seitenketten und Aminosäuresequenzen Eigenschaften wie das NO-scavenging und der Sauerstofftransport durch die Hämoglobinlösung nach Wunsch modifiziert werden. Eine Abänderung der Globinketten des Hämoglobins unter Aufhebung der NO Bindungskapazität *in vitro* führt zu einer Verminderung der vasoaktiven Effekte der jeweiligen Lösung. Auch blieb bei diesen Lösungen der sonst beobachtete Anstieg des arteriellen Blutdrucks aus⁵². Die Untersuchung der Effekte dieser Lösungen auf die Mikrozirkulation verschiedener Organe steht aber noch aus. Es bleibt zu hoffen, daß diese neuen methodischen Ansätze eines Tages auch für eine Anwendung in der klinischen Praxis bezahlbar und nutzbar sind.

6. Zusammenfassung

Der Einsatz von allogenen Blutkonserven bei hämorrhagischem Schock ist durch den hohen logistischen Aufwand der Kreuzproben und die Knappheit von Spenderblut limitiert. Deshalb ist die Erforschung eines künstlichen Blutersatzstoffs ein internationales Ziel der chirurgischen und intensivmedizinischen Forschung. Ziel dieser experimentellen Studie war die Analyse der Mikrozirkulation des Pankreas der Ratte nach intravenöser Applikation der modifizierten Hämoglobininlösung Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb, HemAssist™).

Durch die Anwendung der intravitalen Videofluoreszenzmikroskopie konnte der Perfusionsparameter funktionelle Kapillardichte nach Injektion des Fluoreszeinmarkierten Plasmamarkers HAES als Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfeld im exokrinen Pankreas quantitativ erfaßt werden. Zur Darstellung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion nach einem Entzündungsreiz erfolgte die Messung der Adhärenz von *in vivo* mit Rhodamin 6G gefärbten Leukozyten am Endothel postkapillärer Pankreasvenolen. Diese Parameter wurden unter folgenden Versuchsbedingungen erhoben:

- 1) Unter **Kontrollbedingungen** erfolgte eine intravenöse topload-Infusion von DCLHb in zwei Versuchsgruppen (je n=7) in einer Dosierung von 400 und 1400 mg/kg Körpergewicht.
- 2) Durch temporäre Okklusion aller vier das Pankreas versorgenden Arterien über 1h wurde eine **postschämische Pankreatitis** induziert; zu Beginn der Reperfusion erfolgte eine topload-Infusion von DCLHb (400 mg/kgKG).
- 3) Zur Auslösung eines **hämorrhagischen Schocks** wurde Tieren arterielles Blut bis zum Erreichen eines mittleren arteriellen Blutdrucks von 40 mmHg entnommen; dieser Blutdruckwert wurde durch weitere Entnahme von Blut über 60 Minuten konstant gehalten. In zwei Therapiegruppen wurde den Tieren Vollblut bzw. DCLHb appliziert, wobei das gegebene dem entnommenen Blutvolumen entsprach.

In allen drei Untersuchungen erhielten Tiere in identisch behandelten Kontrollgruppen isovolämische Infusionen einer kolloidalen HydroxiäthylstärkeLösung (HAES). Die Analyse der Mikrozirkulation am ausgelagerten Pankreas erfolgte an drei unterschiedlichen Meßzeitpunkten über einen Beobachtungszeitraum von 120 Minuten

nach Injektion der Lösungen. Zur zusätzlichen Charakterisierung des inflammatorischen Schadens des Pankreas wurde in den beiden topload Studien die Messung der Amylaseaktivität und der Konzentration von Interleukin-6 im Serum durchgeführt. In der Schockstudie wurde die Lipidperoxidation im Pankreasgewebe mittels TBARM-Assay quantifiziert.

Unter Zuhilfenahme dieser Methodik konnten die eingangs gestellten Fragen wie folgt beantwortet werden:

- 1) Unter Kontrollbedingungen beobachteten wir nach Infusion von 1400 mg/kg KG DCLHb eine Zunahme der funktionellen Kapillardichte um 18% im Vergleich zu der mit HAES beziehungsweise mit 400 mg/kg KG DCLHb behandelten Versuchsgruppe. Die Adhärenz von Leukozyten in postkapillären Venolen und die gemessenen Plasmaparameter blieben unverändert. Somit ergab sich unter Kontrollbedingungen kein Hinweis auf die Auslösung einer Mikrozirkulationsstörung durch DCLHb.
- 2) Normotherme Ischämie und Reperfusion des Pankreas führten in der mit HAES behandelten Versuchsgruppe im Vergleich zu nichtischämischen Kontrolltieren zum signifikanten Abfall der funktionellen Kapillardichte, zur Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktion und zu einer Reduktion des mittleren arteriellen Blutdrucks um etwa 31%. Hingegen beobachteten wir nach der topload-Infusion mit DCLHb (400 mg/kg Kg) zu Beginn der Reperfusion eine signifikante Verbesserung der funktionellen Kapillardichte, eine signifikante Reduktion der Leukozyten-Endothel-Interaktion und einer Wiederherstellung des mittleren arteriellen Blutdrucks auf Kontrollwerte. Eine Aggravierung der postischämischen Pankreatitis durch die Infusion von DCLHb konnte in diesem Modell nicht bestätigt werden.
- 3) Die Primärtherapie mit DCLHb war nach Induktion eines hämorrhagischen Schocks durch die signifikant bessere Wiederherstellung der funktionellen Kapillarperfusion und des mittleren arteriellen Blutdrucks dem Kolloid Hydroxiäthylstärke überlegen und erzielte vergleichbare Werte wie in der Vollblut-behandelten Gruppe. Es kam zu keiner Erhöhung der Adhärenz von Leukozyten in postkapillären Pankreasvenolen bei den mit DCLHb therapierten Tieren. Eine signifikant erhöhte Lipidperoxidation im Pankreasgewebe nach Infusion der beiden Sauerstoff-transportierenden Lösungen im Vergleich zur HAES-Behandlung kann durch die verbesserte Reperfusion erklärt

werden. Hinsichtlich der Effektivität als Blutersatztherapie ist die Infusion von DCLHb nach Hämorrhagie mit konserviertem Vollblut vergleichbar.

Im Rahmen von klinischen Studien mit DCLHb wurde bei einigen Patienten ein Anstieg der Amylaseaktivität im Serum und in wenigen Fällen eine akute Pankreatitis beobachtet, deren Ursache nicht vollständig geklärt werden konnte. Die aus diesen Veränderungen abgeleitete These, daß DCLHb durch NO-Scavenging, Endothelin-Freisetzung und vermehrte Sauerstoffradikalbildung in der Mikrozirkulation des exokrinen Pankreas eine Pankreatitis-induzierende Wirkung besitzt, konnte durch unsere Versuche widerlegt werden.

7. Literaturverzeichnis

1. **Abels C., Rohrich F., Corvin S., Meyermann R., Baethmann A., Schurer L.** Leukocyte-endothelium-interaction in pial vessels following global, cerebral ischaemia. *Acta Neurochir (Wien)* 142: 333-339, 2000.
2. **Aho H. J., Koskensalo S. M., Nevalainen T. J.** Experimental pancreatitis in the rat. Sodium taurocholate-induced acute haemorrhagic pancreatitis. *Scand J Gastroenterol* 15: 411-416, 1980.
3. **Al-Mufti R. A., Williamson R. C. N.** Experimental models of pancreatitis. *Ann Acad Med Singapore* 28: 133-140, 1999.
4. **Alayash A. I.** Hemoglobin-based blood substitutes: oxygen carriers, pressor agents, or oxidants? *Nat Biotechnol* 17: 545-549, 1999.
5. **Amberson W., Jennings J. J., Rhode M.** Clinical experience with hemoglobin-saline solutions. *J Appl Physiol* 1: 469-489, 1949.
6. **Ames A., Wright R. L., Kowada M., Thurston J. M., Majno G.** Cerebral ischemia II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52: 437-452, 1968.
7. **Anderson M. C., Schiller W. R.** Microcirculatory dynamics in the normal and inflamed pancreas. *Am J Surg* 115: 118-127, 1968.
8. **Armstrong D., Browne R.** The analysis of free radicals, lipid peroxides, antioxidant enzymes and compounds related to oxidative stress as applied to the clinical chemistry laboratory. *Adv Exp Med Biol* 366: 43-58, 1994.
9. **Atherton A., Born G. V.** Quantitative investigations of the adhesiveness of circulating polymorphonuclear leukocytes to blood vessel walls. *J Physiol* 233: 157-165, 1972.
10. **Azari M., Ebeling A., Baker R., Burhop K., Camacho T., Estep T., Guzder S., Marshall T., Rohn K., Sarajari R.** Validation of the heat treatment step used in

the production of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) for viral inactivation. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 26: 577-582, 1998.

11. **Baatz H., Pleyer U., Thiel H. J., Hammer C.** In vivo study of leukocyte-endothelium interaction in endotoxin-induced uveitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 36: 1960-1967, 1995.
12. **Baatz H., Steinbauer M., Harris A. G., Krombach F.** Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 15: 85-91, 1995.
13. **Banerjee A. K., Galloway S., Kingsnorth A. N.** Experimental models of acute pancreatitis. *Br J Surg* 81: 1096-1103, 1994.
14. **Baron JF, Berridge J, Brichant JF, Demeyere R, Lamy M, Larbuisson R, Lehot JJ, Parsloe M, Sinclair CJ, Vandermeersch E.** The use of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) as an alternative to blood transfusion in cardiac surgery patients following cardiopulmonary bypass: a pivotal efficacy trial. *Anesthesiology* 87 Suppl.: A217, 1997.
15. **Barroso-Aranda J., Schmid-Schönbein G. W., Zweifach B. W., Engler R. L.** Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circ Res* 63: 437-447, 1988.
16. **Bartholomew C., McGeeney K. F., Murphy J. J., FitzGerald O., Sankaran H.** Experimental studies on the aetiology of acute scorpion pancreatitis. *Br J Surg* 63: 807-810, 1976.
17. **Bechtel M. K., Bagdasarian A., Olson W. P., Estep T.** Virus removal or inactivation in hemoglobin solutions by ultrafiltration or detergent/solvent treatment. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 16: 123-128, 1988.
18. **Benz S., Schnabel R., Weber H., Pfeiffer F., Wiesner R., von Breitenbuch P., Nizze H., Schareck W., Hopt U. T.** The nitric oxide donor sodium nitroprusside is protective in ischemia/reperfusion injury of the pancreas. *Transplantation* 66: 994-999, 1998.

19. **Bernard C.** Mémoire sur le Pancreas et sur le Rôle du Suc Pancréatique dans les Phénomènes Digestifs des Matières Grasses Neutres. *Balliere (Paris) 2*: 278-278, 1856.
20. **Bhatia M., Saluja A. K., Singh V. P., Frossard J. L., Lee H. S., Bhagat L., Gerard C., Steer M. L.** Complement factor C5a exerts an anti-inflammatory effect in acute pancreatitis and associated lung injury. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 280: G974-G978, 2001.
21. **Bockman D. E.** Microvasculature of the pancreas: Relation to acute pancreatitis. *Int J Pancreatol* 12: 11-21, 1992.
22. **Boros M., Massberg S., Baranyi L., Okada H., Messmer K.** Endothelin 1 induces leukocyte adhesion in submucosal venules of the rat small intestine. *Gastroenterology* 114: 103-114, 1998.
23. **Borregaard N., Cowland J. B.** Granules of the human neutrophilic polymorphonuclear leukocyte. *Blood* 89: 3503-3521, 1997.
24. **Bradley E. L.** A clinically based classification system for acute pancreatitis. Summary of the international symposium on acute pancreatitis, Atlanta, Ga, September 11 through 13, 1992. *Arch Surg* 128: 586-590, 1993.
25. **Broe P. J., Zuidema G. D., Cameron J. L.** The role of ischemia in acute pancreatitis: studies with an isolated perfused canine pancreas. *Surgery* 91: 377-382, 1982.
26. **Bunting J. R., Phan T. V., Kamali E., Dowben R. M.** Fluorescent cationic probes of mitochondria. Metrics and mechanism of interaction. *Biophys J* 56: 979-993, 1989.
27. **Butcher E.** Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* 67: 1033-1036, 1991.
28. **Büchler M., Beger H. G.** Standards in experimental pancreatitis. *Eur Surg Res* 24 (Suppl. 1): 1-13, 1992.

29. **Büsing, M.** Morphologie der Transplantatpankreatitis. in: Hopt, U. T., Büsing, M., and Becker, H. D. (Hsg.) Akute Pankreatitis, Transplantatpankreatitis. Karger. Basel, S.62-69, 1994.
30. **Büsing M., Hopt U. T., Jochum M., Blumenstock I., Nader A.** Characterization of early graft damage after pancreatic transplantation. *Transplant Proc* 24: 811-812, 1992.
31. **Büsing M., Hopt U. T., Quacken M., Becker H. D., Morgenroth K.** Morphological studies of graft pancreatitis following pancreas transplantation. *Br J Surg* 80: 1170-1173, 1993.
32. **Cai T. Q., Wright S. D.** Human leukocyte elastase is an endogenous ligand for the integrin CR3 (CD11b/CD18, Mac-1, alpha M beta 2) and modulates polymorphonuclear leukocyte adhesion. *J Exp Med* 184: 1213-1223, 1996.
33. **Cane R. D., Shapiro B. A., Templin R., Walther K.** Unreliability of oxygen tension-based indices in reflecting intrapulmonary shunting in critically ill patients. *Crit Care Med* 16: 1243-1245, 1988.
34. **Capone A., Safar P., Stezoski S. W., Peitzman A., Tisherman S.** Uncontrolled hemorrhagic shock outcome model in rats. *Resuscitation* 29: 143-152, 1995.
35. **Carr-Locke D. L., Gregg J. A.** Endoscopic manometry of pancreatic and biliary sphincter zones in man. Basal results in healthy volunteers. *Dig Dis Sci* 26: 7-15, 1981.
36. **Chappell J. E., McBride W. J., Shackford S. R.** Diaspirin cross-linked hemoglobin resuscitation improves cerebral perfusion after head injury and shock. *J Trauma* 41: 781-788, 1996.
37. **Chatterjee R., Welty E. V., Walder R. Y., Pruitt S. L., Rogers P. H., Arnone A., Walder J. A.** Isolation and characterization of a new hemoglobin derivative cross-linked between the alpha chains (lysine 99 alpha 1---- lysine 99 alpha 2). *J Biol Chem* 261: 9929-9937, 1986.

38. **Cohn S., Farrell T. J.** Diaspirin cross-linked hemoglobin resuscitation of hemorrhage: comparison of a blood substitute with hypertonic saline and isotonic saline. *J Trauma* 39: 210-216, 1995.
39. **Cohnheim J.** Über Entzündung und Eiterung. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol* 40: 1-79, 1867.
40. **Cole D. J., Drummond J. C., Patel P., Nary J., Applegate R. L. 2.** Effect of oncotic pressure of diaspirin cross-linked hemoglobin (dclhb) on brain injury after temporary focal cerebral ischemia in rats. *Anesth Analg* 83: 342-347, 1996.
41. **Cole D. J., Nary J., Reynolds L. W., Patel P., Drummond J. C.** Experimental subarachnoid hemorrhage in rats: effect of intravenous alpha-alpha diaspirin crosslinked hemoglobin on hypoperfusion and neuronal death. *Anesthesiology* 87: 1486-1493, 1997.
42. **Cole D. J., Schell R. M., Drummond J. C., Reynolds L.** Focal cerebral ischemia in rats. Effect of hypervolemic hemodilution with diaspirin cross-linked hemoglobin versus albumin on brain injury and edema. *Anesthesiology* 78: 335-342, 1993.
43. **Conhaim R. L., Rodenkirch L., Watson K. E., Harms B.** Acellular hemoglobin solution enters compressed lung capillaries more readily than red blood cells. *J Appl Physiol* 89: 1198-1204, 2000.
44. **Covelli H. D., Nesson V. J., Tuttle W. K.** Oxygen derived variables in acute respiratory failure. *Crit Care Med* 11: 646-649, 1983.
45. **Crile G. W.** An experimental research into surgical shock. Philadelphia: J. B. Lipincott. 1899.
46. **Crippen D., Safar P., Snyder C., Porter L.** Dying pattern in volume-controlled hemorrhagic shock in awake rats. *Resuscitation* 21: 259-270, 1991.
47. **Cullen J. J., Conklin J. L., Murray J., Ledlow A., Rosenthal G.** Effects of recombinant human hemoglobin on opossum sphincter of Oddi motor function in vivo and in vitro. *Dig Dis Sci* 41: 289-294, 1996.

48. **Dean J. M., Wetzel R. C., Rogers M. C.** Arterial blood gas derived variables as estimates of intrapulmonary shunt in critically ill children. *Crit Care Med* 13: 1029-1033, 1985.
49. **DeAngeles D., Scott A., McGrath A., Korent V., Rodenkirch L., Conhain R., Harms B.** Resuscitation from hemorrhagic shock with diaspirin cross linked hemoglobin, blood, or hetastarch. *J Trauma* 42: 406-412, 1997.
50. **Deitch E. A.** Animal models of sepsis and shock: A review and lessons learned. *Shock* 9: 1-11, 1998.
51. **Dobosz M., Hac S., Wajda Z.** Does nitric oxide protect from microcirculatory disturbances in experimental acute pancreatitis in rats? *Int J Microcirc Clin Exp* 16: 221-226, 1996.
52. **Doherty D. H., Doyle M. P., Curry S. R., Vali R. J., Fattor T. J., Olson J. S., Lemon D. D.** Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat Biotechnol* 16: 672-676, 1998.
53. **Dressel T. D., Goodale-RL J., Arneson M. A., Borner J. W.** Pancreatitis as a complication of anticholinesterase insecticide intoxication. *Ann Surg* 189: 199-204, 1979.
54. **Duling B. R., Berne R. M.** Longitudinal gradients in periarteriolar oxygen tension. A possible mechanism for the participation of oxygen in local regulation of blood flow. *Circ Res* 27: 669-677, 1970.
55. **Estep T. N., Bechtel M. K., Miller T. J., Bagdasarian A.** Virus inactivation in hemoglobin solutions by heat. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 16: 129-134, 1988.
56. **Fernandez del Castillo C., Harringer W., Warshaw A. L., Vlahakes G. J., Koski G., Zaslavsky A. M., Rattner D. W.** Risk factors for pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med* 325: 382-387, 1991.
57. **Flowers F., Zimmerman J. J.** Reactive oxygen species in the cellular pathophysiology of shock. *New Horiz* 6: 169-180, 1998.

58. **Foitzik T., Hotz H. G., Hot B., Kirchengast M., Buhr H. J.** Endothelin-1 mediates the alcohol-induced reduction of pancreatic capillary blood flow. *J Gastrointest Surg* 2: 379-384, 1998.
59. **Frankel H. L., Nguyen H. B., Shea Donohue T., Aiton L. A., Ratigan J., Malcolm D. S.** Diaspirin cross-linked hemoglobin is efficacious in gut resuscitation as measured by a GI tract optode. *J Trauma* 40: 231-240, 1996.
60. **Freas W., Llave R., Jing M., Hart J., McQuillan P., Muldoon S.** Contractile effects of diaspirin cross-linked hemoglobin (dclhb) on isolated porcine blood vessels. *J Lab Clin Med* 125: 762-767, 1995.
61. **Friess H., Weber A., Büchler M.** Standards in monitoring acute experimental pancreatitis. *Eur Surg Res* 24 (Suppl. 1): 1-13, 1992.
62. **Gaetgens P., Benner K. U., Schickendantz S.** Nutritive and non-nutritive blood flow in canine skeletal muscle after partial microembolization. *Pflügers Arch* 361: 183-189, 1976.
63. **Gmaz Nikulin E., Nikulin A., Plamenac P., Hegewald G., Gaon D.** Pancreatic lesions in shock and their significance. *J Pathol* 135: 223-236, 1981.
64. **Goodnough L., Brecher M. E., Kanter M. H., AuBuchon J. P.** Transfusion medicine. First of two parts--blood transfusion. *N Engl J Med* 340: 438-447, 1999.
65. **Gulati A.** Effect of diaspirin crosslinked hemoglobin on systemic and regional blood circulation. In: Sibbald W. J., Messmer K., Fink M. P., (eds.) *Tissue oxygenation in acute medicine*. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. pp. 307-317. 1998.
66. **Gulati A., Barve A. T., Sen A.** Pharmacology of hemoglobin therapeutics. *J Lab Clin Med* 133: 112-119, 1999.
67. **Gulati A., Rebello S.** Diaspirin cross-linked hemoglobin (dclhb): involvement of adrenergic mechanisms in the pressor effect. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22: 603-612, 1994.

68. **Gulati A., Sen A.** Dose-dependent effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on regional blood circulation of severely hemorrhaged rats. *Shock* 9: 65-73, 1998.
69. **Gulati A, Sen A, Tyagi MG.** Increase in endothelin and removal of nitric oxide (NO) contribute toward the efficacy of diaspirin crosslinked hemoglobin in hemorrhaged rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 24: 345, 1996.
70. **Gulati A., Sharma A. C.** Prazosin blocks the pressor but not the regional circulatory effects of diaspirin crosslinked hemoglobin. *Life Sci* 55: 121-130, 1994.
71. **Gulati A., Sharma A. C., Singh G.** Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit Care Med* 24: 137-147, 1996.
72. **Gulati A., Singh G., Rebello S., Sharma A. C.** Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci* 56: 1433-1442, 1995.
73. **Gullo L., Cavicchi L., Tomassetti P., Spagnolo C., Freyrie A., D'Addato M.** Effects of ischemia on the human pancreas. *Gastroenterology* 111: 1033-1038, 1996.
74. **Gutteridge J. M.** Lipid peroxidation and antioxidants as biomarkers of tissue damage. *Clin Chem* 41: 1819-1828, 1995.
75. **Habler O., Kleen M., Meßmer K.** Künstliche Sauerstoffträger: Alternativen zur Fremdbluttransfusion? *Zentralbl Chir* 124: 260-270, 1999.
76. **Habler O., Kleen M., Pape A., Meisner F., Kemming G., Messmer K.** Diaspirin-crosslinked hemoglobin reduces mortality of severe hemorrhagic shock in pigs with critical coronary stenosis. *Crit Care Med* 28: 1889-1898, 2000.
77. **Habler O., Messmer K.** Tissue perfusion and oxygenation with blood substitutes. *Advanced Drug Delivery Reviews* 40: 171-184, 2000.

78. **Hart J. L., Ledvina M. A., Muldoon S. M.** Actions of diaspirin cross-linked hemoglobin on isolated rat and dog vessels. *J Lab Clin Med* 129: 356-363, 1997.
79. **Hegewald G., Nikulin A., Gmaz Nikulin E., Plamenac P., Barenwald G.** Ultrastructural changes of the human pancreas in acute shock. *Pathol Res Pract* 179: 610-615, 1985.
80. **Heinkel K.** Die Ratte als Versuchstier in der experimentellen Pankreas-Diagnostik. *Klin Wochenschr* 31: 815, 1953.
81. **Herrmann B. W., Cullen J. J., Ledlow A., Murray J. A., Conklin J. L.** The effect of peroxynitrite on sphincter of Oddi motility. *J Surg Res* 81: 55-58, 1999.
82. **Hess J. R., Wade C. E., Winslow R. M.** Exchange transfusion in swine for the evaluation of $\alpha\alpha$ -cross-linked hemoglobin as a red cell substitute. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 17: 632, 1989.
83. **Hoffmann T. F.** Die Mikrozirkulationsstörung des Pankreas nach Ischämie und Reperfusion und ihre therapeutische Beeinflussung: Eine experimentelle in vivo Studie an der Ratte. München: Habilitation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität. 1995.
84. **Hoffmann T. F., Kübler J., Meßmer K.** Bradykinin-Antagonisierung bei Ischämie und Reperfusion des Pankreas. *Zentralbl Chir* 121: 412-22; 1996b.
85. **Hoffmann T. F., Leiderer R., Harris A. G., Messmer K.** Ischemia and reperfusion in pancreas. *Microsc Res Tech* 37: 557-571, 1997.
86. **Hoffmann T. F., Leiderer R., Waldner H., Arbogast S., Messmer K.** Ischemia reperfusion of the pancreas: a new in vivo model for acute pancreatitis in rats. *Res Exp Med (Berl)* 195: 125-144, 1995.
87. **Hoffmann T. F., Leiderer R., Waldner H., Messmer K.** Bradykinin antagonists HOE-140 and CP-0597 diminish microcirculatory injury after ischaemia-reperfusion of the pancreas in rats. *Br J Surg* 83: 189-195, 1996b.

88. **Hoffmann T. F., Steinbauer M., Waldner H., Messmer K.** Exogenous bradykinin enhances ischemia/reperfusion injury of pancreas in rats. *J Surg Res* 62: 144-151, 1996a.
89. **Hoffmann T. F., Waldner H., Messmer K.** The bradykinin antagonist CP-0597 can limit the progression of postischemic pancreatitis. *Immunopharmacology* 33: 243-246, 1996a.
90. **Hopt, U. T.** Spezifische Noxen in der Pathogenese der Transplantatpankreatitis. in: Hopt, U. T., Büsing, M., and Becker, H. D. (Hsg.) Akute Pankreatitis/Transplantat-Pankreatitis. Karger. Basel, S.22-31, 1994.
91. **Hotter G., Closa D., Gelpi E., Prats N., Rosello Catafau J.** Role of xanthine oxidase and eicosanoids in development of pancreatic ischemia-reperfusion injury. *Inflammation* 19: 469-478, 1995.
92. **Hotter G., Leon O. S., Rosello Catafau J., Lopez Boado M. A., Parellada P. P., Henriques R. D., Fernandez Cruz L., Gelpi E.** Tissue prostanoic acid release, phospholipase A2 activity, and lipid peroxidation in pancreas transplantation. *Transplantation* 51: 987-990, 1991.
93. **Illig L.** Die Kreislaufmikroskopie am Mesenterium und Pankreas des lebenden Kaninchens. *Z Exp Med* 126: 249-277, 1955.
94. **Inagaki H., Nakao A., Kurokawa T., Nonami T., Harada A., Takagi H.** Neutrophil behavior in pancreas and liver and the role of nitric oxide in rat acute pancreatitis. *Pancreas* 15: 304-309, 1997.
95. **Inagaki T., Hoshino M., Hayakawa T., Ohara H., Yamada T., Yamada H., Iida M., Nakazawa T., Ogasawara T., Uchida A., Hasegawa C., Miyaji M., Takeuchi T.** Interleukin-6 is a useful marker for early prediction of the severity of acute pancreatitis. *Pancreas* 14: 1-8, 1997.
96. **Intaglietta M., Johnson P. C., Winslow R. M.** Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 32: 632-643, 1996.

97. **Janero D. R.** Malondialdehyde and thiobarbituric acid-reactivity as diagnostic indices of lipid peroxidation and peroxidative tissue injury. *Free Radic Biol Med* 9: 515-540, 1990.
98. **Jia L., Bonaventura C., Bonaventura J., Stamler J. S.** S-Nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380: 221-226, 1996.
99. **Jones R. T., Garcia J. H., Mergner W. J., Pendergrass R. E., Valigorsky J. M., Trump B. F.** Effects of shock on the pancreatic acinar cell. Cellular and subcellular effects in humans. *Arch Pathol* 99: 634-644, 1975.
100. **Kasper S. M., Grune F., Walter M., Amr N., Erasmi H., Buzello W.** The effects of increased doses of bovine hemoglobin on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg* 87: 284-291, 1998.
101. **Keipert P. E., Gomez C. L., Gonzales A., MacDonald V. W., Hess J. R., Winslow R. M.** Diaspirin cross-linked hemoglobin: tissue distribution and long-term excretion after exchange transfusion. *J Lab Clin Med* 123: 701-711, 1994.
102. **Keipert P. E., Gonzales A., Gomez C. L., MacDonald V. W., Hess J. R., Winslow R. M.** Acute changes in systemic blood pressure and urine output of conscious rats following exchange transfusion with diaspirin- crosslinked hemoglobin solution. *Transfusion* 33: 701-708, 1993.
103. **Kerger H., Saltzman D. J., Menger M. D., Messmer K., Intaglietta M.** Systemic and subcutaneous microvascular PO₂ dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am J Physiol* 270: H827-36, 1996.
104. **Kerner T., Vollmar B., Menger M. D., Waldner H., Messmer K.** Determinants of pancreatic microcirculation in acute pancreatitis in rats. *J Surg Res* 62: 165-171, 1996.

105. **Kingsnorth A. N.** Platelet activating factor and results of PAF antagonist therapy. In: Johnson C. D., Imrie C. W., (eds.) *Pancreatic disease towards the year 2000*. London, Berlin, Heidelberg: Springer. pp. 51-56. 1999.
106. **Kingsnorth A. N., Galloway S. W., Formela L. J.** Randomized, double-blind phase II trial of Lexipafant, a platelet- activating factor antagonist, in human acute pancreatitis. *Br J Surg* 82: 1414-1420, 1995.
107. **Klar E., Endrich B., Messmer K.** Microcirculation of the pancreas. A quantitative study of physiology and changes in pancreatitis. *Int J Microcirc Clin Exp* 9: 85-101, 1990.
108. **Klar E., Foitzik T., Buhr H., Messmer K., Herfarth C.** Isovolemic hemodilution with dextran 60 as treatment of pancreatic ischemia in acute pancreatitis. Clinical practicability of an experimental concept. *Ann Surg* 217: 369-374, 1993.
109. **Klar E., Messmer K., Warshaw A. L., Herfarth C.** Pancreatic ischemia in experimental acute pancreatitis: mechanism, significance, therapy. *Br J Surg* 77: 1205-1210, 1990.
110. **Kloner R. A., Ganote C. E., Jennings R. B.** The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest* 54: 1496-1508, 1974.
111. **Knight J. A., Pieper R. K., McClellan L.** Specificity of the thiobarbituric acid reaction: its use in studies of lipid peroxidation. *Clin Chem* 34: 2433-2438, 1988.
112. **Kogire M., Inoue K., Higashide S., Takaori K., Echigo Y., Gu Y. J., Sumi S., Uchida K., Imamura M.** Protective effects of endothelin-1 on acute pancreatitis in rats. *Dig Dis Sci* 40: 1207-1212, 1995.
113. **Kondo T., Todoroki T., Hirano T., Schildberg F. W., Messmer K.** Impact of ischemia-reperfusion injury on dimensional changes of hepatic microvessels. *Res Exp Med (Berl)* 198: 63-72, 1998.
114. **Konomi H., Woods C. M., Meedeniya A. C., Giles L. C., Toouli J., Saccone G. T.** Effects of diaspirin cross-linked hemoglobin on motor function of the

- duodenum and biliary system in the Australian brush-tailed possum in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 296: 1067-1073, 2001.
115. **Kreimeier U., Meßmer K.** Prähospitaler Flüssigkeitstherapie. *Anaesthesist* 45: 884-899, 1996.
116. **Krogh, A.** The anatomy, physiology of capillaries. in: Hartner. New York 1959.
117. **Kronecker H.** Kritisches und Experimentelles über lebensrettende Infusionen von Kosalzlösungen bei Hunden. *Correspondenzblatt für Schweizer Ärzte* 16: 447-455, 1886.
118. **Kubes P., Suzuki M., Granger D. N.** Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88: 4651-4655, 1991.
119. **Kuebler W. M., Kuhnle G. E., Groh J., Goetz A. E.** Leukocyte kinetics in pulmonary microcirculation: intravital fluorescence microscopic study. *J Appl Physiol* 76: 65-71, 1994.
120. **Lamson P. D., De Turk W. E.** Studies on shock induced by haemorrhage. XI A method of the accurate control of blood pressure. *J Pharmacol Exp Ther* 83: 250-252, 1945.
121. **Lamy M. L., Daily E. K., Brichant J. F., Larbuisson R. P., Demeyere R. H., Vandermeersch E. A., Lehot J. J., Parsloe M. R., Berridge J. C., Sinclair C. J., Baron J. F., Przybelski R. J.** Randomized trial of dapsirin cross-linked hemoglobin solution as an alternative to blood transfusion after cardiac surgery. The DCLHb cardiac surgery trial collaborative group. *Anesthesiology* 92: 646-656, 2000.
122. **Lankisch P. G., Banks P. A.** Pancreatitis. 1. Berlin, Heidelberg, New York: Springer-Verlag. p 78-83. 1997.
123. **Lee R., Neya K., Sivizzero T. A., Vlahakes G. J.** Limitations of the efficacy of hemoglobin oxygen carrying solutions. *J Appl Physiol* 78: 236-246, 1995.

124. **Lefer A. M., Lefer D. J.** The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 32: 743-751, 1996.
125. **Lehr H.-A., Arfors K.-E.** Mechanism of tissue damage by leukocytes. *Current opinion in hematology* 1: 92-99, 1994.
126. **Lembeck F., Griesbacher T.** Pathophysiological and possible physiological roles of kinins in the pancreas. *Immunopharmacology* 33: 336-338, 1996.
127. **Lerch M. M., Adler G.** Experimental pancreatitis. *Curr Opin Gastro* 9: 752-759, 1993.
128. **Lerch M. M., Weidenbach H., Hernandez C. A., Preclik G., Adler G.** Pancreatic outflow obstruction as the critical event for human gall stone induced pancreatitis. *Gut* 35: 1501-1503, 1994.
129. **Liao J. C., Hein T., Vaughn M. W., Huang K., Kuo L.** Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8757-8761, 1999.
130. **Liu X., Miller M. J., Joshi M. S., Sadowska-Krowicka H., Clark D. A., Lancaster J. R. J.** Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 273: 18709-18713, 1998.
131. **Liu X. H., Kimura T., Ishikawa H., Yamaguchi H., Furukawa M., Nakano I., Kinjoh M., Nawata H.** Effect of endothelin-1 on the development of hemorrhagic pancreatitis in rats. *Scand J Gastroenterol* 30: 276-282, 1995.
132. **Looker D., Abbott-Brown D., Cozart P., Durfee S., Hoffman S., Mathews A. J., Miller-Roehrich J., Shoemaker S., Trimble S., Fermi G.** A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature* 356: 258-260, 1992.
133. **Ma Z., Monk T., Goodnough L., McClellan M., Gawryl M. A., Clark T. A., Moreira P. A., Keipert P. E., Scott M.** Effect of hemoglobin and perflubron based oxygen carriers on common clinical laboratory tests. *Clinical Chemistry* 43: 1732-1737, 1997.

134. **Malcolm D. S., Hamilton I. N., Jr., Schultz S. C., Cole F., Burhop K.** Characterization of the hemodynamic response to intravenous diaspirin crosslinked hemoglobin solution in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22: 91-107, 1994.
135. **Manabe T., Suzuki T., Honjo I.** Role of the pancreas in organ blood flow during shock. *Surg Gynecol Obstet* 146: 577-582, 1978.
136. **Marino P. L.** Hypoxemia and hypercapnia. The ICU book. Baltimore, Maryland, USA: Williams & Wilkins. pp. 339-354. 1998.
137. **Marshall J. B.** Acute pancreatitis. A review with an emphasis on new developments. *Arch Intern Med* 153: 1185-1198, 1993.
138. **Massberg S., Eisenmenger S., Enders G., Krombach F., Messmer K.** Quantitative analysis of small intestinal microcirculation in the mouse. *Res Exp Med (Berl)* 198: 23-35, 1998.
139. **Mazzoni M. C., Borgström P., Warnke K. C., Skalak T. C., Intaglietta M., Arfors K. E.** Mechanisms and implications of capillary endothelial swelling and luminal narrowing in low-flow ischemias. *Int J Microcirc Clin Exp* 15: 265-270, 1995.
140. **McKay C., Curran F. J., Sharples C. E., Young C. A., Baxter J. N., Imrie C. W.** The use of lexipafant in the treatment of acute pancreatitis. *Adv Exp Med Biol* 416: 365-370, 1996.
141. **McKenzie J. E., Cost E., Scandling D. M., Ahle N. W., Savage R. W.** Effects of diaspirin crosslinked haemoglobin during coronary angioplasty in the swine. *Cardiovasc Res* 28: 1188-1192, 1994.
142. **McLuckie AE, Hammond EH, Savage RW, Scandling DM, West SD, Sherfy EC, McKenzie JE.** Diaspirin crosslinked hemoglobin(DCLHb) infusion improves regional myocardial function in porcine infarction model. *FASEB J* 9: A9, 1995.

143. **Meisner F. G., Kemming G. I., Habler O. P., Kleen M. S., Tillmanns J. H., Hutter J. W., Bottino D. A., Thein E., Meier J. M., Wojtczyk C. J., Pape A., Messmer K.** Diaspirin crosslinked hemoglobin enables extreme hemodilution beyond the critical hematocrit. *Crit Care Med* 29: 829-838, 2001.
144. **Menger M. D., Rücker M., Vollmar B.** Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: On the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock* 8: 2-7, 1997.
145. **Menger M. D., Vollmar B.** In vivo documentation of an arteriovenous shunt in rat pancreatic acinar tissue. *Pancreas* 13: 125-129, 1996.
146. **Messmer K., Jesch F., Endrich B., Hobbhahn J., Peters W., Schoenberg M.** Tissue PO₂ during reanimation with hemoglobin solutions. *Eur Surg Res* 11: 161-171, 1979.
147. **Meßmer, K.** Schock. in: Siegenthaler, W. (Hsg.) *Klinische Pathophysiologie*. Thieme. Stuttgart, New York, S.551-564, 2001.
148. **Mileski W. J., Winn R. K., Vedder N. B., Pohlman T. H., Harlan J. M., Rice C. L.** Inhibition of CD18-dependent neutrophil adherence reduces organ injury after hemorrhagic shock in primates. *Surgery* 108: 206-212, 1990.
149. **Mitsuoka H., Kistler E. B., Schmid-Schönbein G. W.** Generation of in vivo activating factors in the ischemic intestine by pancreatic enzymes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97: 1772-1777, 2000.
150. **Mourelatos M. G., Enzer N., Ferguson J. L., Rypins E. B., Burhop K. E., Law W. R.** The effects of diaspirin cross-linked hemoglobin in sepsis. *Shock* 5: 141-148, 1996.
151. **Murray J. A., Ledlow A., Launspach J., Evans D., Loveday M., Conklin J. L.** The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor functions in humans. *Gastroenterology* 109: 1241-1248, 1995.

152. **Niederau C., Lüthen R., Niederau M. C., Grendell J. H., Ferrell L. D.** Acute hemorrhagic necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine supplemented diet. *Eur Surg Res* 24 (suppl 1): 40-54, 1992.
153. **Nolte D., Botzlar A., Hecht R., Csapo C., Menger M. D., Messmer K.** Diaspirin crosslinked hemoglobin: evaluation of effects on the microcirculation of striated muscle. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 22: 587-592, 1994.
154. **Nolte D., Botzlar A., Pickelmann S., Bouskela E., Messmer K.** 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, 1997b.
155. **Nolte D., Steinhauser P., Pickelmann S., Berger S., Hartl R., Messmer K.** 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, 1997a.
156. **Nolte D., Zeintl H., Steinbauer M., Pickelmann S., Messmer K.** Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int J Microcirc Clin Exp* 15: 244-249, 1995.
157. **Norman J.** The role of cytokines in the pathogenesis of acute pancreatitis. *Am J Surg* 175: 76-83, 1998.
158. **O'Hara J. F., Colburn W. A., Tetzlaff J. E., Novick A. C., Angermeier K. W., Schubert A.** Hemoglobin and methemoglobin concentrations after large-dose infusions of diaspirin cross-linked hemoglobin. *Anesth Analg* 92: 44-48, 2001.
159. **Ohkawa H., Ohishi N., Yagi K.** Assay for lipid peroxides in animal tissues by thiobarbituric acid reaction. *Anal Biochem* 95: 351-358, 1979.
160. **Opie.** The relation of cholelithiasis to disease of the pancreas and to fat necrosis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 12: 19-21, 1901.
161. **Opie F. L.** Etiology of acute hemorrhagic pancreatitis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 12: 182-185, 1901.

162. **Pannum P. L.** Experimentelle Beiträge zur Lehre von der Embolie. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 25: 308, 1862.
163. **Paran H., Klausner J., Siegal A., Graff E., Freund U., Kaplan O.** Effect of the somatostatin analogue octreotide on experimental pancreatitis in rats. *J Surg Res* 62: 201-206, 1996.
164. **Patel M. J., Webb E. J., Shelbourn T. E., Mattia-Godberg C., George A. J. T., Zhang F., Moore E. G., Nelson D.** Absence of immunogenicity of Diaspirin cross-linked hemoglobin in humans. *Blood* 91: 710-716, 1998.
165. **Peitzman A. B., Billiar T. R., Harbrecht B. G., Kelly E., Udekwu A. O., Simmons R. L.** Hemorrhagic shock. *Curr Probl Surg* 32: 925-1002, 1995.
166. **Pfeffer R. B., Lazzarini-Robertson A., Safadi D., Mixter G., Secoy C. F., Hinton J. W.** Gradiations of pancreatitis, edematous, through hemorrhagic, experimentally produced by controlled injection of microspheres into blood vessels in dogs. *Surgery* 51: 764-769, 1962.
167. **Pfeffer R. B., Stasior O., Hinton J. W.** The clinical picture of the sequential development of acute pancreatitis in the dog. *Surg Forum* 8: 248-251, 1957.
168. **Phillips W. T., Klipper R. W., Awasthi V. D., Rudolph A. S., Cliff R., Kwasiborski V., Goins B. A.** Polyethylene glycol-modified liposome-encapsulated hemoglobin: a long circulating red cell substitute. *J Pharmacol Exp Ther* 288: 665-670, 1999.
169. **Pickelmann S., Nolte D., Leiderer R., Schütze E., Messmer K.** Attenuation of postischemic reperfusion injury in striated skin muscle by diaspirin-cross-linked Hb. *Am J Physiol* 275: 361-368, 1998.
170. **Pincemail J., Detry O., Philippart C., Defraigne J. O., Franssen C., Burhop K., Deby C., Meurisse M., Lamy M.** Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb): absence of increased free radical generation following administration in a rabbit model of renal ischemia and reperfusion. *Free Radic Biol Med* 19: 1-9, 1995.

171. **Przybelski R. J., Daily E. K.** The Pressor/Perfusion Effect of Diaspirin Cross-Linked Hemoglobin (DCLHb). *Yearbook of Intensive and Emerg Care Med.* pp. 252-263. 1994.
172. **Przybelski R. J., Daily E. K., Kisicki J. C., Mattia-Goldberg C., Bounds M. J., Colburn W. A.** Phase I study of the safety and pharmacologic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin solution. *Crit Care Med* 24: 1993-2000, 1996.
173. **Przybelski R. J., Kant G. J., Bounds M. J., Slayter M. V., Winslow R. M.** Rat maze performance after resuscitation with cross-linked hemoglobin solution. *J Lab Clin Med* 115: 579-588, 1990.
174. **Przybelski R. J., Malcolm D. S., Burris D. G., Winslow R. M.** Cross-linked hemoglobin solution as a resuscitative fluid after hemorrhage in the rat. *J Lab Clin Med* 117: 143-151, 1991.
175. **Rana M. W., Singh G., Wang P., Ayala A., Zhou M., Chaudry I. H.** Protective effects of preheparinization on the microvasculature during and after hemorrhagic shock. *J Trauma* 32: 420-426, 1992.
176. **Rashid F., Horobin R. W.** Interaction of molecular probes with living cells and tissues. A structure-activity analysis of mitochondrial staining by cationic probes, and a discussion of the synergistic nature of image-based and biochemical approaches. *Histochemistry* 94: 303-308, 1990.
177. **Reah G., Bodenham A. R., Mallick A., Daily E. K., Przybelski R. J.** Initial evaluation of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) as a vasopressor in critically ill patients. *Crit Care Med* 25: 1480-1488, 1997.
178. **Redha F., Uhlschmid G., Ammann R. W., Freiburghaus A. U.** Injection of microspheres into pancreatic arteries causes acute hemorrhagic pancreatitis in the rat: a new animal model. *Pancreas* 5: 188-193, 1990.
179. **Rubanyi G. M., Polokoff M. A.** Endothelins: Molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacological Reviews* 46: 325-415, 1994.

180. **Sadrzadeh S. M., Graf E., Panter S. S., Hallaway P. E., Eaton J. W.** Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *J Biol Chem* 259: 14354-14356, 1984.
181. **Sakorafas G. H., Tsiotos G. G., Bower T. C., Sarr M. G.** Ischemic necrotizing pancreatitis - Two case reports and review of the literature. *Int J Pancreatol* 24: 117-121, 1998.
182. **Sakorafas G. H., Tsiotos G. G., Sarr M. G.** Ischemia/Reperfusion-Induced pancreatitis. *Dig Surg* 17: 3-14, 2000.
183. **Saluja A., Saluja M., Villa A., Leli U., Rutledge P., Meldolesi J., Steer M.** Pancreatic duct obstruction in rabbits causes digestive zymogen and lysosomal enzyme colocalization. *J Clin Invest* 84: 1260-1266, 1989.
184. **Sankaran H., Bartholomew C., FitzGerald O., McGeeney K. F.** Secretory effect of the venom of the scorpion *Tityus trinitatis* on rat pancreatic slices. *Toxicon* 15: 441-446, 1977.
185. **Sauaia A., Moore F. A., Moore E. E., Moser K. S., Brennan R., Read R. A., Pons P. T.** Epidemiology of trauma deaths: a reassessment. *J Trauma* 38: 185-193, 1995.
186. **Savitzky J. P., Doczi J., Black J., Arnold J. D.** A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clinical Pharmacol Ther* 23: 73-80, 1967.
187. **Saxena R.** Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier, DCLHb, in acute ischemic stroke. *Stroke* 30: 993-996, 1999.
188. **Scalia R., Gauthier T. W., Lefer A. M.** Beneficial effects of lex032, a novel recombinant serine protease inhibitor, in murine traumatic shock. *Shock* 4: 251-256, 1995.
189. **Schmid-Schönbein G. W., Hugli T. E., Kistler E. B., Sofianos A., Mitsuoka H.** Pancreatic enzymes and microvascular cell activation in multiorgan failure. *Microcirculation* 8: 5-14, 2001.

190. **Schmid-Schönbein G. W., Kistler E. B., Hugli T. E.** Mechanisms for cell activation and its consequences for biorheology and microcirculation: Multi-organ failure in shock. *Biorheology* 38: 185-201, 2001.
191. **Schmid-Schönbein G. W., Zweifach B. W., Kovalcheck S.** The application of stereological principles to morphometry of the microcirculation in different tissues. *Microvasc Res* 14: 303-317, 1977.
192. **Schoenberg M., Büchler M., Beger H. G.** Oxygen radicals in experimental acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 41: 313-319, 1994.
193. **Schultz S. C., Grady B., Cole F., Hamilton I., Burhop K., Malcolm D. S.** A role for endothelin and nitric-oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 122: 301-308, 1993.
194. **Schultz S. C., Hamilton I. N., Jr., Malcolm D. S.** Use of base deficit to compare resuscitation with lactated Ringer's solution, Haemaccel, whole blood, and diaspirin cross-linked hemoglobin following hemorrhage in rats. *J Trauma* 35: 619-625, 1993.
195. **Sefton W., Pudimat P., Bina S., Lojeski E., Mongan P., Muldoon S.** Inhaled nitric oxide attenuates increased pulmonary artery pressure following diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHB) administration. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 27: 203-213, 1999.
196. **Sehgal L. R., Rosen A. L., Gould S. A., Sehgal H. L., Moss G. S.** Preparation and in vitro characteristics of polymerized pyridoxylated hemoglobin. *Transfusion* 23: 158-162, 1983.
197. **Seidel H.** Bemerkungen zu meiner Methode der experimentellen Erzeugung der akuten hämorrhagischen Pankreatitis. *Zentralbl Chir* 37: 1601-1604, 1910.
198. **Senninger N., Moody F. G., Coelho J. C., Van Buren D. H.** The role of biliary obstruction in the pathogenesis of acute pancreatitis in the opossum. *Surgery* 99: 688-693, 1986.

199. **Sharma A. C., Gulati A.** Effect of diaspirin cross-linked hemoglobin and norepinephrine on systemic hemodynamics and regional circulation in rats. *J Lab Clin Med* 123: 299-308, 1994.
200. **Sheehan H. L., Davis J. C.** Renal ischemia with failed reflow. *J Pathol Bacteriol* 78: 105-120, 1959.
201. **Shoemaker W. C.** Diagnosis and treatment of the shock syndromes. In: Grenvik A. G., Holbrook P. R., Shoemaker W. C., (eds.) Textbook of critical care. Philadelphia, London, Toronto, Montreal, Sydney, Tokyo: W.B. Saunders Company. pp. 85-102. 1995.
202. **Shoemaker W. C., Kvetan V., Fyodorov V., Kram H. B.** Clinical algorithm for initial fluid resuscitation in disasters. *Crit Care Clin* 7: 363-381, 1991.
203. **Shoemaker W. C., Peitzman A. B., Bellamy R., Bellomo R., Bruttig S. P., Capone A., Dubick M., Kramer G. C., McKenzie J. E., Pepe P. E., et al.** Resuscitation from severe hemorrhage. *Crit Care Med* 24: 12-23, 1996.
204. **Sielenkämper A. W., Chin Yee I. H., Martin C. M., Sibbald W. J.** Diaspirin crosslinked hemoglobin improves systemic oxygen uptake in oxygen supply-dependent septic rats. *Am J Respir Crit Care Med* 156: 1066-1072, 1997.
205. **Slater D. N., Bardsley D., Mangnall Y., Smythe A., Fox M.** Pancreatic ischaemia; sensitivity and reversibility of the changes. *Br J Exp Pathol* 56: 530-536, 1975.
206. **Sloan E. P., Koenigsberg M., Gens D., Cipolle M., Runge J., Mallory M. N., Rodman G. J.** Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *JAMA* 282: 1857-1864, 1999.
207. **Sloan EP, Koenigsberg MD, Bickell WH.** The use of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) solution in the hospital management of hemorrhagic hypovolemic shock. *Academic Emerg Med* 2: A78, 1995.

208. **Snyder S. R., Welty E. V., Walder R. Y., Williams L. A., Walder J. A.** HbXL99 alpha: a hemoglobin derivative that is cross-linked between the alpha subunits is useful as a blood substitute. *Proc Natl Acad Sci U S A* 84: 7280-7284, 1987.
209. **Steinberg W., Tenner S.** Acute pancreatitis. *N Engl J Med* 330: 1198-1210, 1994.
210. **Steinberg W. M., Schlesselman S. E.** Treatment of acute pancreatitis. Comparison of animal and human studies. *Gastroenterology* 93: 1420-1427, 1987.
211. **Studley J. G. N., Mathie R. T., Blumgart L. H.** Regional pancreatic perfusion. *Acta Chir Scand* 152: 373-378, 1986.
212. **Sum P. T., Bencomse S. A., Beck J. T.** Pathogenesis of bile-induced acute pancreatitis in the dog: Experiments with detergents. *Am J Dig Dis* 15: 637-646, 1970.
213. **Swan S. K., Halstenson C. E., Collins A. J., Colburn W. A., Blue J., Przybelski R. J.** Pharmacologic profile of diaspirin cross-linked hemoglobin in hemodialysis patients. *Am J Kidney Dis* 26: 918-923, 1995.
214. **Takaori K., Inoue K., Kogire M., Higashide S., Tun T., Aung T., Doi R., Fujii N., Tobe T.** Effects of endothelin on microcirculation of the pancreas. *Life Sci* 51: 615-622, 1992.
215. **Tamura K., Manabe T., Kyogoku T., Andoh K., Ohshio G., Tobe T.** Effect of postischemic reperfusion on the pancreas. *Hepatogastroenterology* 40: 452-456, 1993.
216. **Tanaka S., Kamiike W., Kosaka H., Ito T., Kumura E., Shiga T., Matsuda H.** Detection of nitric oxide production and its role in pancreatic ischemia-reperfusion in rats. *Am J Physiol* 271: G405-9, 1996.
217. **Toyama M. T., Lewis M. P., Kusske A. M., Reber P. U., Ashley S. W., Reber H. A.** Ischaemia-reperfusion mechanisms in acute pancreatitis. *Scand J Gastroenterol Suppl* 219: 20-23, 1996.

218. **Trunkey D. D.** Trauma. *Sci Am* 249: 28-35, 1983.
219. **Tsai AG., Kerger H., Intaglietta M.** Oxygen distribution and consumption by the microcirculation and the determinants of tissue survival. In: Sibbald W. J., Messmer K., Fink M. P., (eds.) Tissue oxygenation in acute medicine. Berlin, Heidelberg, New York: Springer. pp. 55-62. 1998.
220. **Uhl W., Büchler M., Malfertheiner P., Beger H. G., Adler G., Gaus W.** A randomised, double blind, multicentre trial of octreotide in moderate to severe acute pancreatitis. *Gut* 45: 97-104, 1999.
221. **Valenzuela A.** The biological significance of malondialdehyde determination in the assessment of tissue oxidative stress. *Life Sci* 48: 301-309, 1991.
222. **Vaughn M. W., Huang K., Kuo L., Liao J. C.** Erythrocyte consumption of nitric oxide: competition experiment and model analysis. *Nitric Oxide* 5: 18-31, 2001.
223. **Vaughn M. W., Huang K. T., Kuo L., Liao J. C.** Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J Biol Chem* 275: 2342-2348, 2000.
224. **Veeramachaneni N. K., Harken A. H., Cairns C. B.** Clinical implications of hemoglobin as a nitric oxide carrier. *Arch Surg* 134: 434-437, 1999.
225. **Veihelmann A., Szczesny G., Nolte D., Krombach F., Refior H. J., Messmer K.** A novel model for the study of synovial microcirculation in the mouse knee joint in vivo. *Res Exp Med (Berl)* 198: 43-54, 1998.
226. **Viele M. K., Weiskopf R. B., Fisher D.** Recombinant human hemoglobin does not affect renal function in humans: Analysis of safety and pharmacokinetics. *Anesthesiology* 86: 848-858, 1997.
227. **Vollmar B.** Enzym- und Mediatorfreisetzung bei experimenteller Pankreatitis. Dissertation, Medizinische Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität, München. 1991.

228. **Vollmar B., Preissler G., Menger M.** Small-volume resuscitation restores hemorrhage-induced microcirculatory disorders in rat pancreas. *Crit Care Med* 24: 445-450, 1996.
229. **Vollmar B., Conzen P. F., Kerner T., Habazettl H., Vierl M., Waldner H., Peter K.** Blood flow and tissue oxygen pressures of liver and pancreas in rats: effects of volatile anesthetics and of hemorrhage. *Anesth Analg* 75: 421-430, 1992.
230. **Vollmar B., Janata J., Yamauchi J., Wolf B., Heuser M., Menger M. D.** Exocrine, but not endocrine, tissue is susceptible to microvascular ischemia/reperfusion injury following pancreas transplantation in the rat. *Transpl Int* 12: 50-55, 1999.
231. **von Dobschuetz E., Hoffmann T., Messmer K.** Inhibition of neutrophil proteinases by recombinant serpin Lex032 reduces capillary no-reflow in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *J Pharmacol Exp Ther* 290: 782-788, 1999.
232. **von Starck G.** Über Hämoglobin Injektionen. *Münch Med Wochenschr* 14: 69-113, 1898.
233. **Walcott W. W.** Standardisation of experimental hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 143: 254-261, 1945.
234. **Walder J. A., Zaugg R. H., Walder R. Y., Steele J. M., Klotz I. M.** Diaspirins that cross-link beta chains of hemoglobin: bis(3,5- dibromosalicyl) succinate and bis(3,5-dibromosalicyl) fumarate. *Biochemistry* 18: 4265-4270, 1979.
235. **Waldner H., Schmand J., Vollmar B., Goetz A., Conzen P., Schweiberer L., Brendel W.** Die Pankreasdurchblutung bei der experimentellen bilären Pankreatitis. *Langenbecks Arch Chir* 375: 112-118, 1990.
236. **Warshaw A. L., O'Hara P. J.** Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann Surg* 188: 197-201, 1978.
237. **Weiss S. J.** Tissue destruction by neutrophils. *N Engl J Med* 320: 365-376, 1989.

238. **Werner J., Fernandez del Castillo C., Rivera J., Kollias N., Lewandrowski K., Rattner D. W., Warshaw A. L.** On the protective mechanisms of nitric oxide in acute pancreatitis. *Gut* 43: 401-407, 1998.
239. **Werner J., Rivera J., Fernandez del Castillo C., Lewandrowski K., Adrie C., Rattner D. W., Warshaw A. L.** Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis. *Surgery* 121: 23-30, 1997.
240. **Willemer S., Elsässer H. P., Adler G.** Hormone-induced pancreatitis. *Eur Surg Res* 24 (suppl 1): 29-39, 1992.
241. **Winslow R. M.** New Transfusion Strategies: Red cell substitutes. *Annu Rev Med* 50: 337-353, 1999.
242. **Wohlgemuth J.** Beitrag zur funktionellen Diagnostik des Pankreas. *Berl Klin Wochenschr* 47: 92-95, 1910.
243. **Xing Z., Gauldie J., Cox G., Baumann H., Jordana M., Lei X. F., Achong M. K.** IL-6 is an antiinflammatory cytokine required for controlling local or systemic acute inflammatory responses. *J Clin Invest* 101: 311-320, 1998.
244. **Xu L. A., Sun L., Rollwagen F., Li Y., Pacheco N., Pikoulis E. A., Leppaniemi A. T., Soltero R. A., Burris D. A., Malcolm D., Nielsen T. B.** Cellular responses to surgical trauma, hemorrhage, and resuscitation with diaspirin cross-linked hemoglobin in rats. *J Trauma* 42: 32-41, 1997.
245. **Yarom R., Sagher U., Rosen H., Becker Y., More R., Chandler J. A.** Effect of extracts from ischemic pancreas (Myocardial depressant factor?) on plateletes. *Isr J Med Sci* 18: 689-694, 1982.
246. **Zaugg R. H., Walder J. A., Walder R. Y., Steele J. M., Klotz I. M.** Modification of hemoglobin with analogs of aspirin. *J Biol Chem* 255: 2816-2821, 1980.
247. **Zimmermann T., Dobroschke J., Borowek U., Padberg W.** Der Einfluß der perioperativen Fremdblutgabe auf die Prognose des kolorektalen Karzinoms. *Zentralbl Chir* 116: 1125-1138, 1991.

9. Abkürzungsverzeichnis

DCLHb	Diaspirin cross-linked hemoglobin
FiO ₂	Fraktion des Sauerstoffs in der Einatemluft
FKD	Funktionelle Kapillardichte, Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren/ Beobachtungsfeld [cm/cm ²]
FITC	Fluoreszeinisothiozyanat
HAES	Hydroxyäthylstärke
KG	Körpergewicht
MAP	Mittlerer arterieller Blutdruck
MDA	Malondialdehyd
NOS	No-Synthase
PVR	Pulmonaler Gefäßwiderstand
paO ₂	arterieller Sauerstoffpartialdruck
Q _s	Shuntvolumen des Lungen Blutflusses
Q _t	Herzzeitvolumen des rechten Herzens
TBA	Thiobarbitursäure
TBARM	Thiobarbitursäure reaktive Materialien

10. Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Konrad Meßmer, Direktor des Instituts für Chirurgische Forschung der Ludwig-Maximilians-Universität München. Durch die Aufnahme an das Institut und die Überlassung des Themas der Doktorarbeit ermöglichte er mir den Einstieg in die experimentelle Medizin und das Erlernen des wissenschaftlichen Arbeitens. Nur sein unermüdlicher Einsatz und die vielfältigen Impulse machten die zügige Fertigstellung dieser Arbeit möglich. Seine schnellen und genauen Korrekturen und seine kompetente Ausstrahlung als akademischer Lehrer sind mir Wegweiser und Vorbild in meinem weiteren Berufsweg.

Bedanken möchte ich mich auch bei meinem Betreuer Herrn Privatdozent Dr. med. Dr. med. vet. Tomas Hoffmann. Von ihm konnte ich die Grundzüge chirurgischen Handelns und Denkens erlernen. Ohne sein stets offenes Ohr für alle Probleme und seine pragmatischen Entscheidungen, die mit der Anfertigung der Arbeit verbunden waren, wäre ein gutes und erfolgreiches Arbeiten unmöglich gewesen.

Desweiteren danke ich meinem Kollegen Herrn Dr. med. Steffen Maßberg, der mich am Anfang der Arbeit in vielfältiger Weise unterstützt und in die präparatorischen Techniken mit viel Geduld eingeführt hat. Sein Ehrgeiz und Eifer schafften die notwendige Arbeitsatmosphäre im Labor, die die anfänglichen Schwierigkeiten überstehen half.

Herrn Dr. Tadashi Kondo danke ich für die Hilfe beim Erlernen der Anästhesie der Ratten.

Herrn Dr. Engelschalk aus dem Institut für Klinische Chemie danke ich für die Hilfe bei den Messungen der Serumparameter.

Dank auch den medizinisch technischen Assistentinnen Frau Christine Czapo, Frau Alke Schropp und Frau Silvia Münsing. Ihr Einsatz bei der Bereitstellung und

Wartung des Gas-Check, die Durchführung der Elisa-Messungen und die Anfertigung der histologischen Schnitte haben wesentlich zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Darüberhinaus danke ich Herrn Müller für die Bereitstellung des Stickstoffs sowie allen anderen Mitarbeitern, -doktoranden und Kollegen des Instituts für Chirurgische Forschung, die durch viele Gespräche und Anregungen die Fertigstellung der Arbeit ermöglichten.

11. Curriculum Vitae

Ernst Felix Wilhelm von Dobschütz

- Geburtsdatum / -ort:** 30. Dezember 1974, Erlangen
- Eltern:** Dr. med. Christiane von Dobschütz, geb. Erhard
Dr. theol. Detlef von Dobschütz
- Schulbildung:** 1980-1984 Grundschule St. Anna, Augsburg
1984-1993 Humanistisches Gymnasium St. Stephan,
Augsburg
- Schulabschluß:** 1993 Abitur
- Grundwehrdienst:** 1993/94 Gebirgsjägerbataillon 233, Mittenwald
- Studium:** WS 1994/95- WS 2000/01 Studium der Humanmedizin
Technische Universität, München
- Teilapprobation:** Mai 2001
- Arzt im Praktikum:** Institut für Chirurgische Forschung, Klinikum Großhadern,
Ludwig-Maximilians-Universität München
(Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer)

Veröffentlichungen:**Abstracts:**

- 1) **von Dobschuetz E.**, T. Hoffmann, K. Messmer: New serine proteinase inhibitor Lex032 reduces perfusion failure of ischemia-reperfusion induced acute pancreatitis in rats. *Digestion* 59: 224; 1998

- 2) **von Dobschütz E.**, T. Hoffmann, K. Meßmer: Der Einfluß des Serin Proteinase Inhibitors Lex032 auf die Mikrozirkulationsstörung bei Ischämie/Reperfusion induzierter akuter Pankreatitis der Ratte. in: Bauer H, Hohenberger W, Metak G (Hsg.) Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e. V., Wissenschaftliche Referate, 75. Tagung, Erlangen: Hieronymus Verlag München: S. 24, 1998.

- 3) **von Dobschuetz E.**, T. Hoffmann, K. Messmer: Effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on normal and postischemic microcirculation of the pancreas. *Eur Surg Res* 31 (suppl): 175; 1999.

- 4) **E. von Dobschuetz**, T. Hoffmann, K. Messmer: Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) restores pancreatic microcirculatory failure after hemorrhagic shock. *Shock* 11 (suppl): 14; 1999.

- 5) **von Dobschütz E.**, T. Hoffmann, K. Meßmer: Die Wirkung von Diaspirin cross-linked hemoglobin auf die normale und postischämische Mikrozirkulation des Pankreas. in: Thetter O, Passlick B, Bauer H, Metak G (Hsg.) Vereinigung der Bayerischen Chirurgen e. V., Wissenschaftliche Referate, 76. Tagung, München: Hieronymus Verlag München: S. 24, 1999.

Originalia:

- 1) **von Dobschuetz E**, Hoffmann T, Engelschalk C, Messmer K. Effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on normal and postischemic microcirculation of the rat pancreas. *Am J Physiol* 276: G1507-14, 1999.
- 2) **von Dobschuetz E**, Hoffmann T, Messmer K. Inhibition of neutrophil proteinases by recombinant serpin Lex032 reduces capillary no-reflow in ischemia/reperfusion-induced acute pancreatitis. *J Pharmacol Exp Ther* ;290: 782-8, 1999.
- 3) **von Dobschuetz E**, Hoffmann T, Messmer K. Diaspirin cross-linked hemoglobin effectively restores pancreatic microcirculatory failure in hemorrhagic shock. *Anesthesiology* 91: 1754-62, 1999.
- 4) **von Dobschütz E**, Pahernik S, Hoffmann T, Meßmer K, Dellian M. Messung der mikrovaskulären Permeabilität im Pankreas bei postischämischer Pankreatitis mittels intravitaler Video-Fluoreszenz-Mikroskopie. *Chirurgisches Forum* 29: 601-5, 2000.
- 5) Langer S, Harris AG, Biberthaler P, **von Dobschuetz E**, Messmer K. Orthogonal polarization spectral imaging as a tool for the assessment of hepatic microcirculation: a validation study. *Transplantation* 71: 1249-56, 2001.