

**Effekte stromafreier Hämoglobinlösungen auf
die Mikrozirkulation im quergestreiften
Rückenhautmuskel beim Hamster**

ANDREAS BOTZLAR

Aus dem Institut für Chirurgische Forschung
der Universität München
Komm. Direktor: Prof. Dr. med. A. Baethmann

**Effekte stromafreier Hämoglobinlösungen auf
die Mikrozirkulation im quergestreiften
Rückenhautmuskel beim Hamster**

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

vorgelegt von
Andreas Botzlar

aus
Passau

2003

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. med. O. Adam.....
Priv. Doz. Dr. rer. hum. biol. Dipl.-Biol. St. Zahler.....
Prof. Dr. med. E. A. Siess.....

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: Priv. Doz. Dr. med. D. Nolte

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

Tag der mündlichen Prüfung: 20.11.2003

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	7
2	Theoretischer Teil	10
2.1	Applikationsformen.....	10
2.1.1	Hypervolämische Infusion	10
2.1.2	Isovolämische Hämodilution	10
2.1.3	Hämorrhagischer Schock	10
2.1.3.1	Pathophysiologie	11
2.1.3.1.1	Veränderungen in der Mikrozirkulation.....	11
2.1.3.1.2	Verhalten der Leukozyten	12
2.1.3.2	Therapeutische Ansätze.....	14
2.2	Blut und Blutersatz.....	14
2.2.1	Historischer Rückblick.....	14
2.2.2	Heutiger Stand der Bluttransfusion.....	16
2.2.3	Physiologie des Sauerstofftransportes durch Hämoglobin	18
2.2.3.1	Humanes Hämoglobin	20
2.2.3.2	Bovines Hämoglobin	20
2.2.3.3	Pathobiochemie	20
2.2.4	Sauerstofftragende Lösungen.....	21
2.2.4.1	Perfluorocarbone	21
2.2.4.2	Stromafreie Hämoglobinlösungen	21
2.2.5	Probleme der stromafreien Hämoglobinlösungen.....	22
2.2.5.1	Sauerstoffbindung.....	22
2.2.5.2	Nephrotoxizität	22
2.2.5.3	Kontamination	23
2.2.5.4	Vasokonstriktion.....	23
2.2.5.5	Lipidperoxidation	24

2.2.6	Modifizierte Hämoglobine	24
2.2.6.1	N-terminal verändertes Hämoglobin	24
2.2.6.2	"Cross-linked" Hämoglobin.....	25
2.4.6.3	Polymerisiertes und "Cross-linked" Hämoglobin.....	25
2.4.6.4	Hämoglobinbindung an Makromoleküle.....	26
2.4.6.5	Hämoglobin in Liposomen	26
2.4.6.6	Rekombinantes Hämoglobin	27
2.3	Intravitalmikroskopische Technik.....	27
3	Material und Methodik	29
3.1	Versuchstiere und Materialien	29
3.1.1	Versuchstiere.....	29
3.1.2	Versuchsmodell.....	29
3.1.3	Implantation der Rückenhautkammer	31
3.1.4	Implantation der arteriellen und venösen Verweilkatheter.....	33
3.1.5	Beurteilung der Kammerpräparation.....	35
3.2	Apparative Ausstattung	36
3.2.1	Untersuchungstechniken	36
3.2.2	Intravitale Fluoreszenzvideomikroskopie	36
3.2.2.1	Optisches System.....	36
3.2.2.2	Beleuchtung.....	37
3.2.2.3	Videoanlage	37
3.2.2.4	Mikroskopiertisch.....	38
3.2.2.5	Auswerteeinheit	38
3.3	Versuchsdurchführung	40
3.3.1	Makrohämodynamische Untersuchungen.....	40
3.3.1.1	Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes	40
3.3.1.2	Messung des Hämatokrits.....	40
3.3.2	Analyse der intravitalmikroskopischen Parameter	40
3.3.2.1	Mikrohämodynamik	41
3.3.2.1.1	Gefäßdurchmesser	41
3.3.2.1.2	Fließgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen	41
3.3.2.2	Leukozyten/Endothel-Interaktion.....	42
3.3.2.3	Mikrovaskuläre Permeabilität.....	44
3.3.2.4	Funktionelle Kapillardichte	44

3.3.3	Versuchsprotokolle	45
3.3.3.1	Hypervolämische Infusion.....	45
3.3.3.2	Isovolämische Hämodilution	46
3.3.3.3	Hämorrhagischer Schock.....	47
3.3.4	Versuchsgruppen.....	48
3.3.4.1	Hypervolämische Infusion.....	48
3.3.4.2	Isovolämische Hämodilution	49
3.3.4.3	Hämorrhagischer Schock.....	49
3.3.5	Hämoglobinlösungen	50
3.3.5.1	Bovine Hämoglobinlösungen	50
3.3.5.2	Humane Hämoglobinlösungen	50
3.4	Statistische Auswertung	51
4	Ergebnisse	52
4.1	Hypervolämische Infusionen.....	52
4.1.1	Mikrohämodynamik	56
4.1.2	Leukozyten/Endothel-Interaktion	58
4.1.3	Mikrovaskuläre Permeabilität	60
4.1.4	Funktionelle Kapillardichte.....	62
4.2	Isovolämische Hämodilution.....	63
4.2.1	Makrohämodynamik	63
4.2.2	Mikrohämodynamik	65
4.2.3	Leukozyten/Endothel-Interaktion	67
4.2.4	Mikrovaskuläre Permeabilität	69
4.2.5	Funktionelle Kapillardichte.....	70
4.3	Hämorrhagischer Schock	72
4.3.1	Makrohämodynamik	73
4.3.2	Mikrohämodynamik	75
4.3.3	Leukozyten/Endothel-Interaktion	78
4.3.4	Mikrovaskuläre Permeabilität	80
4.3.5	Funktionelle Kapillardichte.....	82

5	Diskussion	85
5.1	Methodik	85
5.2	Ergebnisse	86
	5.2.1 Hypervolämische Infusion	86
	5.2.1.1 Mikrohämodynamik	86
	5.2.1.2 Leukozyten/Endothel-Interaktion	87
	5.2.1.3 Mikrovaskuläre Permeabilität	87
	5.2.1.4 Funktionelle Kapillardichte.....	88
	5.2.2 Isovolumämische Hämodilution.....	88
	5.2.2.1 Makrohämodynamik	88
	5.2.2.2 Mikrohämodynamik	89
	5.2.2.3 Leukozyten/Endothel-Interaktion	90
	5.2.2.4 Mikrovaskuläre Permeabilität	91
	5.2.2.5 Funktionelle Kapillardichte.....	91
	5.2.3 Hämorrhagischer Schock und Wiederbelebung.....	92
	5.2.3.1 Makrohämodynamik	92
	5.2.3.2 Mikrohämodynamik.....	93
	5.2.3.3 Leukozyten/Endothel-Interaktion	94
	5.2.3.4 Mikrovaskuläre Permeabilität	95
	5.2.3.5 Funktionelle Kapillardichte.....	96
5.3	Weitere Ergebnisse und klinischer Einsatz	96
6	Bewertung	99
7	Zusammenfassung	101
8	Summary	103
9	Literaturverzeichnis	104
10	Danksagung	136
11	Lebenslauf	137

1. Einleitung

Trotz lokaler und systemischer Gegenregulationen kommt es bei länger anhaltender Ischämie von Geweben und Organen durch den fehlenden Abtransport von Stoffwechselprodukten wie Kohlendioxid und Milchsäure zu einer zusätzlichen Einschränkung der nutritiven Durchblutung. Die zugrundeliegenden Mechanismen, welche für die Verstärkung von Ischämie und Hypoxie im Sinne eines *circulus vitiosus* verantwortlich gemacht werden, sind eine Verminderung der kapillären Perfusion (MESSMER et KREIMEIER, 1989), hervorgerufen durch zunehmende Endothelzellschwellung (MAZZONI et al., 1988, 1989) und eine gesteigerte Ödemneigung des Gewebes aufgrund der Extravasation von Plasmabestandteilen (KORTUIS et al., 1985).

Zur Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion stehen neben der Beeinflussung der makrohämodynamischen Parameter Blutdruck und Herzfrequenz verschiedene therapeutische Maßnahmen zur Verfügung (MESSMER, 1975; MESSMER et SUNDER-PLASSMANN, 1976). So können – über die günstige Beeinflussung der Blutviskosität – durch Anwendung der isovolämischen Hämodilution mit Plasmaexpandern protektive Effekte bezüglich der Ausbildung des postischämischen Reperfusionsschadens im quergestreiften Muskel erreicht werden (MENGER et al., 1989a, 1989b). Ferner kann durch den Einsatz hyperosmolarer Lösungen die hypoxiebedingte Endothelzellschwellung und somit das Ausmaß des postischämischen Reperfusionsschadens im Muskel signifikant reduziert werden (MAZZONI et al., 1989; NOLTE et al., 1992b). Neben diesen einerseits auf die Rheologie des Blutes und andererseits auf das vaskuläre Endothel wirksamen therapeutischen Maßnahmen erscheinen bei der Volumensubstitution jene Lösungen therapeutisch besonders vielversprechend, die neben einer Verbesserung der Fließeigenschaften auch die Fähigkeit des Sauerstofftransportes in das Gewebe aufweisen.

Mit den Perfluorocarbonen (CLARK et GOLLAN, 1966; CLARK et al., 1975) und den aus Vollblut angereinigten stromafreien Hämoglobinslösungen (DE VENUTO et al., 1979) bestehen derzeit zwei Substanzgruppen, welche die sauerstofftragende Funktion des Blutes übernehmen können und daher im folgenden aufgrund dieser partiellen Funktion nur unter Vorbehalt als „Blutersatzlösungen“ bezeichnet werden:

Bei Perfluorocarbonen steht dem Vorteil der biologischen Inertheit die lineare Abhängigkeit der Sauerstoffbindung vom Sauerstoffpartialdruck gegenüber: die für eine ausreichende Oxygenierung notwendige Sauerstoffatmosphäre von 100 % (NAITO et YOKOHAMA, 1978) kann klinisch nur durch Beatmung erreicht werden. Somit erfahren diese Lösungen ihren Einsatz primär an intubierten Patienten. Gegenwärtig könnten die Perfluorocarbone bei der klinischen Therapie des akuten Lungenversagens Neugeborener (hyalines Membransyndrom) durch „Liquid Ventilation“, das heißt durch intraalveoläre Infusion der kollabierten Lungenbläschen mit einer Perfluorocarbonlösung unter PEEP-Beatmung, erfolgreich eingesetzt werden (CURTIS et al., 1991; JACKSON et al., 1994).

Dem klinischen Einsatz von Hämoglobinlösungen standen bisher verschiedene Toxizitätsprobleme entgegen (WINSLOW, 1989). Hierzu gehören die zu Niereninsuffizienz führende renale Ausscheidung des in α - β -Heterodimere zerfallenden Hämoglobinmoleküls (URBAITIS et al., 1991), die Aktivierung der Komplementkaskade (FEOLA et al., 1988) und schließlich die vasokonstringierende Wirkung des Hämoglobinmoleküls selbst (MACDONALD et WEIR, 1991). Die Vernetzung der Hämoglobinmoleküle durch intramolekulare kovalente Bindungen verhinderte den Zerfall des Hämoglobinmoleküls in α - β -Heterodimere sowie deren konsekutive renale Ausscheidung (CHATTERJEE et al., 1986) und konnte so das Problem der Nephrotoxizität beseitigen. Nach Auflösung der Erythrozytenmembran gelang die Anreinigung bei der Gewinnung der Lösungen zunächst nur unzureichend, so daß die Kontamination der Produkte mit Endotoxin oder noch vorhandenen Membranphospholipiden Nebenwirkungen wie pseudoallergische Reaktionen durch Komplementaktivierung verursachten; einige Hersteller haben diese Schwierigkeit jedoch überwunden (SNYDER et al., 1987; PRZYBELSKI et al., 1991). Die vollständige Klärung der vasokonstringierenden Effekte des Hämoglobinmoleküls, denen auch die Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdruckes zuzuschreiben ist, steht nach wie vor aus (COLLINS et al., 1993). Durch histomorphologische Untersuchungen konnte zwar der Nachweis für die Fähigkeit dieser Lösungen, Sauerstoff zu transportieren und ins Gewebe abzugeben (COLE et al., 1992, 1993), erbracht werden, die Zulassung von Hämoglobinlösungen am Menschen erforderte jedoch, daß die Wirkung dieser Lösungen auf der Ebene der Mikrozirkulation vor allem im Hinblick auf mögliche Vasokonstriktion und auf intravitale Aktivierung und Adhäsion der intravaskulären Leukozyten untersucht würde (FRATANTONI, 1991).

Der Tonus des kardiovaskulären Gefäßsystems wird durch das exakte Gleichgewicht von gefäßerweiternden und gefäßverengenden und vom Gefäßendothel erzeugten Substanzen aufrechterhalten (VANE et BOTTING, 1992). Hämoglobinlösungen stehen im Verdacht, nicht nur den als Stickoxid (PALMER et al., 1987) identifizierten „endothelial derived relaxing

factor“ zu binden, sondern auch die vermehrte Freisetzung von Endothelin-1 aus dem Gefäßendothel zu provozieren, was den beobachteten Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes erklären könnte. Zusammen mit einem gesteigerten Angebot von molekularem Sauerstoff könnte die Freisetzung von Eisenionen (Fe^{2+}) aus der Häm-Gruppe des Hämoglobinmoleküls in das Gewebe die Funktion von Hämoglobin als stark wirksamem Fenton-Reagens (SADRZADEH et al., 1984) ermöglichen. Auf diese Weise würde die Bildung von zytotoxischen Hydroxylradikalen (OH^\bullet) in der Haber-Weiß-Reaktion begünstigt und die weitere Lipidperoxidation verstärkt.

Die Intravitalmikroskopie ermöglicht die direkte Darstellung des gesamten mikrozirkulatorischen Netzwerkes aus Arteriolen, Kapillaren und postkapillären Venolen. Somit können Gefäßdurchmesser, die Interaktionen verschiedener Zellen und die endotheliale Permeabilität unter pathologischen und pathophysiologischen Bedingungen untersucht werden (ASAISHI et al., 1981; ZEITL et al., 1989).

Unter Verwendung des Rückenhautkammermodells am Syrischen Goldhamster (ENDRICH et al., 1980) wurde daher in der vorliegenden Studie die Wirkung verschiedener, chemisch modifizierter Hämoglobinlösungen auf die Mikrozirkulation im quergestreiften Rückenhautmuskel im Vergleich zu herkömmlichen Plasmaexpandern – wie etwa 6 %igem Dextran 60 – untersucht. Ziel war es, die Effekte der Lösungen auf die mikrovaskuläre Gewebepfusion dabei sowohl unter physiologischen Bedingungen von hypervolämischer Infusion und isovolämischer Hämodilution als auch unter den pathophysiologischen Bedingungen des hämorrhagischen Schocks und der nachfolgenden Wiederbelebung qualitativ und quantitativ zu erfassen.

2. Theoretischer Teil

2.1 Applikationsformen

2.1.1 Hypervolämische Infusion

Die in dieser Studie durchgeführte hypervolämische Infusion stellt eine Vergrößerung des zirkulierenden Blutvolumens durch Infusion einer isoonkotischen Lösung um maximal 10 % dar, die definitionsgemäß nicht in relevanten makrohämodynamischen Veränderungen resultiert.

2.1.2 Isovolumische Hämodilution

Die isovolämische Hämodilution stellt bei definitionsgemäß konstantem, zirkulierendem Blutvolumen den simultanen Austausch von Vollblut durch eine identische Menge einer isoonkotischen kolloidalen Infusionslösung dar. Seit ihrer Einführung (LAKS et al., 1973; KLÖVEKORN et al., 1974) hat sie einen festen Platz im klinischen Repertoire der Kompensation des intra-operativen Blutverlustes (HABLER et MESSMER, 1997; BRYSON et al., 1998). Sie wird bei gesunden Patienten durch die Verschlechterung der plasmatischen Gerinnung deutlich vor Erreichen eines für die Gewebeoxygenierung kritischen Hämatokrit limitiert (McLoughlin et al., 1996).

2.1.3 Hämorrhagischer Schock

Der hämorrhagische Schock ist definiert als akute Kreislaufinsuffizienz durch ein Mißverhältnis zwischen Volumenkapazität des Gefäßsystems und zirkulierendem Blutvolumen aufgrund massiven Blutverlustes nach Traumen oder großen Operationen (VON SANDERSLEBEN, 1990; MARZI et MUTSCHLER, 1999). Dadurch kommt es zu einem

ungenügenden Blutangebot an das Herz und konsekutiv vermindertem Herzzeitvolumen, Hypotonie, Akkumulation von Metaboliten des Zellstoffwechsels und reduzierter Sauerstoffabgabebereitschaft des Hämoglobins, wobei die Gesamtheit dieser Erscheinungen in einem als Schocksyndrom bezeichneten Kreislaufversagen enden (MESSMER et al., 1987).

2.1.3.1 Pathophysiologie

Der von starkem Blutverlust hervorgerufene Volumenmangel führt zu einem verminderten Rückstrom aus den venösen Kapazitätsgefäßen, wodurch die Durchblutung der Peripherie weiter eingeschränkt wird. Es kommt dann zur Sequestration roter Blutkörperchen in das perivaskuläre Gewebe der Endstrombahn und damit zu weiter abnehmendem venösen Rückfluß zum Herzen, worauf der Organismus durch vermehrte Katecholaminausschüttung aus dem Nebennierenmark kompensatorisch sympathikoadrenerg reagiert. Je nach Schwere des Schocks wird so durch Stimulation von β_1 -Rezeptoren eine Zunahme der Herzfrequenz und durch Stimulation von α -Rezeptoren eine Vasokonstriktion sowohl der Arteriolen als auch der venösen Kapazitätsgefäße erreicht, wodurch sich der hydrostatische Druck im postkapillären Gefäßbett erhöht. Es kommt folglich zu gesteigerter Extravasation von Plasmaproteinen und von intravasaler Flüssigkeit in das hypoxisch vorgeschädigte Gewebe (MESSMER et al., 1987).

2.1.3.1.1 Veränderungen in der Mikrozirkulation

Das normale mikrovaskuläre Perfusionsmuster ist gekennzeichnet durch die zeitliche und räumliche Variation des kapillären Flusses und unter anderem abhängig von der Fluidität des Blutes selbst. Diese ist durch Flußgeschwindigkeit, lokalen Hämatokrit und Verformbarkeit der Erythrozyten bestimmt. Weiterhin hängt das normale mikrovaskuläre Perfusionsmuster vom lokalen Blutdruck, von der arteriolären Vasomotion und schließlich von der Leukozyten/Endothel-Interaktion als Schlüsselfunktionen der Regulation des Gefäßwiderstandes und somit der nutritiven Versorgung des Gewebes mit Nährstoffen und Sauerstoff (MESSMER et SUNDER-PLASSMANN, 1976; MESSMER et KREIMEIER, 1989) ab. Im Schock sind zentrale und vor allem lokale Kontrollmechanismen der Mikrozirkulation beeinträchtigt. Die im Rahmen der sympathikoadrenergen Reaktion ausgeschütteten Katecholamine wirken über α -Rezeptoren auf die präkapillären Arteriolen und postkapillären

Venolen vasokonstriktorisch und vermindern so den strömungswirksamen Druckgradienten und damit die Gesamtzahl der perfundierten Kapillaren (KESSLER et al., 1976; MESSMER et INTAGLIETTA, 1986; MESSMER et SUNDER-PLASSMANN, 1976; SUNDER-PLASSMANN et MESSMER, 1972). Die Vasomotion der Arteriolen ist vermindert oder nicht mehr vorhanden (INTAGLIETTA, 1991). Das Absinken der intravaskulären Blutflußgeschwindigkeit betrifft vor allem die Venolen, wo es zum Stillstand der Perfusion bis hin zum Austreten von Blutbestandteilen aus dem Gefäßbett kommen kann. Die inhomogene Gewebeperfusion (APPELGREEN et LEWIS, 1972) beeinträchtigt den An- und Abtransport von Sauerstoff, Nährstoffen und Stoffwechselprodukten, so daß es auf Grund der Akkumulation saurer Stoffwechselprodukte zu Dilatation der präkapillären Arteriolen bei anhaltender Konstriktion der postkapillären Venolen (MESSMER et SUNDER-PLASSMANN, 1976) und zu hypoxiebedingter Schwellung von Endothelzellen (MAZZONI et al., 1988, 1989) sowie zu gesteigerter Interaktion von Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel postkapillärer Venolen kommt (MENGER et al., 1988; GRANGER et al., 1989). Schließlich resultiert daraus eine mechanisch bedingte Verminderung der mikrovaskulären Durchblutung bis hin zum vollständigen Verschuß des Gefäßlumens durch geschwollene Endothelzellen und ihnen angelagerte korpuskuläre Blutbestandteile (HAMMERSEN et al., 1989), wobei der Blutfluß in Kapillaren durch einzelne Leukozyten, welche im reduzierten Kapillarlumen steckenbleiben, unterbunden werden kann (SCHMID-SCHÖNBEIN, 1987).

2.1.3.1.2 Verhalten der Leukozyten

Neben den mechanischen Veränderungen der Perfusion spielen pathobiochemische Reaktionen auf zellulärer Ebene eine besondere Rolle. Es kommt durch lokale Schädigung des Gefäßendothels und verminderten Blutfluß zur Aktivierung der Komplementkaskade. Die dabei gebildeten Komplementfaktoren C3a und C5a bewirken die chemotaktische Aktivierung von Leukozyten und mononukleären Zellen und deren Akkumulation, Aggregation und Adhäsion am Gefäßendothel postkapillärer Venolen. Im Gefäßendothel kommt es unter ischämischen Bedingungen zur Enzymkonversion: Xanthindehydrogenase wird zu Xanthinoxidase (GRANGER, 1988; GRISHAM et al., 1987; PARKS et GRANGER, 1988; GRANGER et al., 1989). Bei der Reperfusion nützt das aus dem ATP-Abbau stammende Hypoxanthin molekularen Sauerstoff als Coenzym für den weiteren Abbau zur Harnsäure. Auf diese Weise entsteht das hochreaktive Superoxid-Radikal ($O_2^{\cdot -}$), welches in Anwesenheit von Wasser die spontane Bildung von Wasserstoffperoxid (H_2O_2) begünstigt (GRANGER,

1988; GRANGER et al., 1989). Aus H_2O_2 und $\text{O}_2^{\cdot-}$ kann in Anwesenheit von Eisenionen (Fe^{2+}) über die Haber-Weiss-Reaktion das stark zytotoxische Hydroxylradikal (OH^{\cdot}) entstehen, während in Anwesenheit von Chloridionen (Cl^-) und Myeloperoxidase (MPO) aus Granulozyten die ebenfalls stark zytotoxische hypochlorige Säure (HOCl) gebildet wird. Diese Radikale und Säuren können direkt eine Denaturierung von Zellproteinen induzieren oder aber indirekt durch Lipidperoxidation von Membranphospholipiden zur weiteren chemotaktischen Aktivierung und Akkumulation von Leukozyten beitragen (MCCORD, 1985; GRANGER et al., 1989; SMITH et al., 1989; LEHR et al., 1992, 1993a, 1993b). Die Leukozyten reagieren darauf mit Aggregation und Adhärenz am Gefäßendothel sowie Emigration ins Gewebe und bilden weitere Sauerstoffradikale. Außerdem setzen sie lysosomale Enzyme frei und bilden weitere, dem Arachidonsäuremetabolismus entstammende Entzündungsmediatoren. So leisten sie der fortschreitenden Zerstörung der durch Akkumulation in der anaeroben Glykolyse entstandener saurer Metabolite bereits vorgeschädigten Zellen Vorschub (Abb. 1).

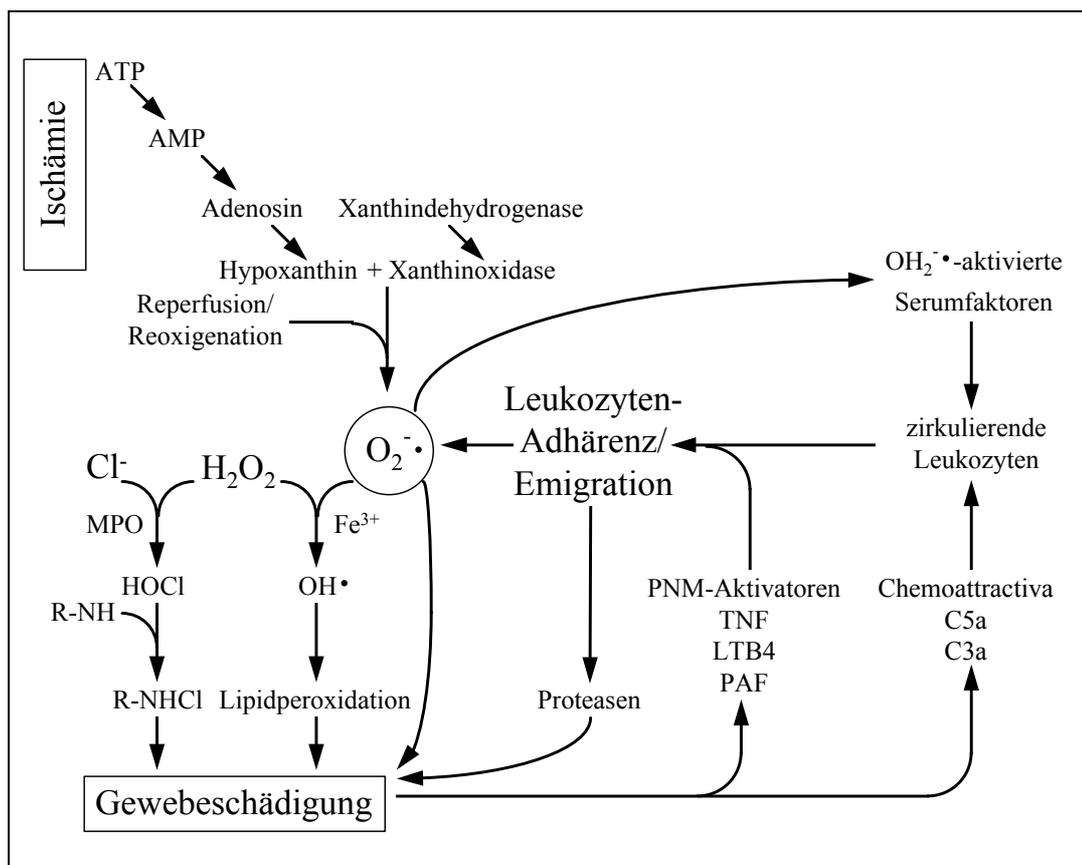


Abb. 1: Pathophysiologische Vorgänge im Rahmen von Ischämie und Reperfusion (mod. nach GRANGER et al., 1988)

2.1.3.2 Therapeutische Ansätze

Aus den dargestellten pathophysiologischen Zusammenhängen ergeben sich verschiedene Möglichkeiten, die Störungen der Gewebemöostase zu beeinflussen. Die Hämodilution mit Volumenersatzmitteln wie etwa Dextran (MESSMER et al., 1986; MENGER et al., 1988, 1989) und Hydroxyäthylstärke (MENGER et al., 1993) zielen auf die Verbesserung der rheologischen Eigenschaften der Mikrozirkulation ab. Dabei konnte gezeigt werden, daß eine signifikante Verminderung der postischämischen Leukozyten/Endothel-Interaktion sowie eine Verbesserung der kapillären Perfusion mit gleichzeitig signifikant verbesserter Gewebeoxygenierung erreicht wurde. Die isovolämische Hämodilution mit Kolloiden führt über die Verminderung des Hämatokrits und eine Steigerung der kapillären Blutflußgeschwindigkeit zur Verbesserung der Sauerstofftransportkapazität des Blutes, was in einer homogenen Sauerstoffverteilung und besseren Perfusion resultiert (MIRHASHEMI et al., 1985; MESSMER et al., 1973; MESSMER, 1975; MESSMER et al., 1986; SCHMID-SCHÖNBEIN et RIEGER, 1981; STÜCKER et al., 1983; SUNDER-PLOSSMANN et al., 1973; VICAUT et al., 1985). Das gleiche Ziel – erweitert um die Möglichkeit des Sauerstofftransportes – wird mit dem Einsatz von Blutpräparaten sowie sauerstofftragenden Lösungen auf Hämoglobin- und auf Perfluorocarbonbasis verfolgt.

2.2 Blut und Blutersatz

2.2.1 Historischer Rückblick

Seit alters her wurden dem Blut die verschiedensten Eigenschaften zugesprochen. Das Christusbild vom Pelikan, der sich mit dem Schnabel die Brust aufreißt, um seinen Nachwuchs zu ernähren, findet seine Wurzeln im alten Ägypten und basiert auf der grundlegenden Vorstellung, Blut beinhalte das irdische Leben. Im alten Rom versprachen sich Epileptiker Heilung vom Trinken des Blutes von Gesunden – bevorzugt wurde dabei dasjenige getöteter Gladiatoren. Die Leibärzte von Papst Innozenz VIII. versuchten im 15. Jahrhundert, das Leben ihres greisen Herren durch das Blut dreier Knaben zu verlängern.

1628 publizierte William Harvey – als Erster in der abendländischen Kultur – die von ihm seit 1616 vertretene Theorie der Zirkulation des Blutes (HARVEY, 1653). Während Sir Christopher Wren ab 1656 mit Hilfe von Federkiel und Harnblase die Injizierbarkeit von Ale, Wein, Skammonium, Opium und im Tierexperiment auch von Blut überprüfte, führte John Willkens

den ersten indirekten Bluttransfer auf einen Menschen durch: er spritze einer Prostituierten das Blut eines Hundes. Richard Lower leitete erstmals 1665/1666 Blut direkt aus der Arterie eines Tieres in die Vene eines zweiten; daneben arbeitete er an der Perfektionierung der intravenösen Applikation von Lösungen aus Wein und Bier, welche sich nur *in* aber nicht *ex vivo* mit Blut mischen ließen, und ersetzte später die bis dahin üblichen Federkiele durch Silberröhrchen (HOLLINGSWORTH, 1928). Vor medizinischem Hintergrund arbeitete zeitgleich auch Jean Baptiste Denis, Leibarzt König Ludwigs XIV. von Frankreich, an der Übertragung von Blut auch von Menschen auf Menschen, mußte diese Bemühungen aufgrund einer letalen Inkompatibilitätsreaktion nach wiederholter heterologer Transfusion jedoch aufgeben.

Zeit	Forscher	Innovation
1628	Harvey	Entdeckung der Blutzirkulation
1656	Wren	Erste intravenöse Volumensubstitution
1665	Lower	Erste homologe direkte Bluttransfusion am Tier
1667	Denis	Erste heterologe Bluttransfusion am Menschen
1818	Blundell	Erste homologe Bluttransfusion am Menschen
1835	Bishoff	Defibrinierung
1867	Pasteur	Eiterbildung durch Bakterien
1867	Lister	Antisepsis
1898	von Stark	Erste Infusion von Hämoglobinlösung an Menschen
1900	Landsteiner	Isoagglutinine
1916	Sellards / Minot	Präparation stabiler Hämoglobinlösung
1933	Amberson	Ersatz von Blut durch Hämoglobinlösung
1940	Wangensteen	Blutplasma-Infusion
1957	Chang	Hämoglobin in Liposomen
1966	Clark	Atmung einer Maus in Fluorocarbonlösung
1967	Sloviter	Infusion einer Perfluorocarbonlösung
1967	Rabiner	Stromafreie Hämoglobinlösung
1968	Bunn	Hämoglobin-Dimerisation
1969	Benesch	Reduzierte Sauerstoffaffinität von Hämoglobin

Tab. I: Geschichte des Blutersatzes

In seiner Dissertation von 1817 erwähnt John Henry Leacock als mögliche Behandlungsform des massiven Blutverlustes die Bluttransfusion, wobei er der homologen Transfusion wegen des geringeren Risikos den Vorzug vor der heterologen gibt. In Kenntnis dieser Aussage sammelte der Geburtshelfer James Blundell Blut seiner Assistenten, um es Wöchnerinnen mit sonst fatalen Blutungen ab 1818 erfolgreich zu injizieren (JONES et MACKMUL, 1928). Ein erster bedeutender Schritt war die Entdeckung der Defibrinierung des Blutes durch Bishoff 1835 (WINSLOW, 1991), so daß bis 1875 weltweit etwa 350 Bluttransfusionen durchgeführt werden konnten. Die Erfolgsquote lag jedoch nur bei ca. 50 %, da gravierende Probleme erst nach und nach gelöst wurden. Nachdem Lister 1867 auf der Grundlage der Erkenntnisse von Pasteur die aseptische Technik in das Transfusionswesen eingeführt hatte wurde das seit 1869 als Antikoagulans verwendete Natriumphosphat, das mit vielen Blutbestandteilen interferierte, ab 1914 durch Natriumcitrat ersetzt. Ein wesentlicher Beitrag zur Vermeidung von Inkompatibilitätsreaktionen war die Entdeckung der im ABO-System klassifizierten Erythrozytenantigene durch Landsteiner.

Während zu Beginn des 20. Jahrhunderts die Aufmerksamkeit mehr auf die Erforschung von Blutersatzlösungen gerichtet war (AMBERSON, 1937), gelang in der Zeit des Zweiten Weltkrieges in den Vereinigten Staaten von Amerika der Nachweis, daß Blutplasma dem Menschen direkt verabreicht werden kann (WANGENSTEEN et al., 1940). Damit war der Durchbruch bei der Transfusion zumindest von Blutbestandteilen, die ihre erste militärmedizinische Anwendung bereits 1870/71 im Krieg zwischen Preußen und Frankreich erfahren hatte, erreicht. Von 1941 bis 1945 wurden vom US-amerikanischen Roten Kreuz ca. 13 Millionen Blutkonserven gesammelt (WINSLOW, 1991) und zunächst zu Plasma, welches getrocknet transportiert wurde, und später vor allem zu Humanalbumin verarbeitet. Es hatte sich nämlich herausgestellt, daß unerwünschte Wirkungen des Blutplasmas der Globulinfraktion und nicht dem Albumin zuzuschreiben waren (COHN, 1947). Nachdem durch Verwenden einer Mischung aus Zitronensäure und Dextrose nach drei Wochen noch ca. 70 % der gelagerten Erythrozyten vital waren (LOUTIT et MOLLISON, 1943), wurden ab 1944 die ersten Vollblutkonserven mit einer Haltbarkeit von 38 Tagen nach Europa verschifft.

2.2.2 Heutiger Stand der Bluttransfusion

Die Gefahren der Bluttransfusion konnten bis heute erheblich reduziert werden. Trotzdem stellt die Infusion von Spenderblut nach wie vor ein nicht zu unterschätzendes Risiko für den Patienten dar. In den Vereinigten Staaten von Amerika werden derzeit ca. 10 Millionen

Blutkonserven transfundiert, ein Drittel davon unter Notfallbedingungen (COHN, 1997). So werden für die inzwischen wieder deutlich reduzierte Wahrscheinlichkeit der Übertragung von HIV 1 oder HIV 2 durch Bluttransfusionen in den Vereinigten Staaten von Amerika und der Bundesrepublik Deutschland immer noch Werte zwischen 1:420.000 und 1:900.000 angegeben (POSEY, 1989; KLEIN, 1994; KLEIN, 1995; SCHWARTZ et al., 1995; SCHREIBER et al., 1996; HABLER et MESSMER, 1997), für die Übertragung von Hepatitis B Werte um 1:65.000 (KLEIN, 1994; KLEIN, 1995; SCHREIBER et al., 1996) und für Hepatitis C Werte zwischen 1:3.000 und 1:125.000 (DONAHUE et al., 1992; KLEIN, 1994; KLEIN, 1995; RIGGERT et al., 1996; SCHREIBER et al., 1996). Neben weiteren Viren können auch Bakterien mit einer Wahrscheinlichkeit von bis zu 1:2.500 (KLEIN, 1995) bei der Transfusion von Blut übertragen werden. Eine Kontrolle neuer, vermuteter Infektionswege wie bei der Varianten Creutzfeld-Jakob-Krankheit ist derzeit noch nicht möglich und kann bisher nur durch Ausschluß potentiell kontaminierter Spender erfolgen (WINSLOW, 2000; DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 2001). Die immunsuppressive Wirkung der Bluttransfusion (HEISS et al. 1997) wird ausschließlich in der Transplantationschirurgie als Vorteil geschätzt wird (OPELZ et al., 1973), außerdem konnte auch nachgewiesen werden, daß sich transfundierte Lymphozyten wie ein transplantiertes Organ im Empfängerorganismus etablieren können (DZIK, 1994).

Die begrenzte Verfügbarkeit und Haltbarkeit von Blutkonserven bei gleichzeitig großem volkswirtschaftlichen Aufwand zu deren Bereitstellung führten zu intensiven Bemühungen um die Entwicklung brauchbarer Blutersatzlösungen und deren industrielle Herstellung (WINSLOW, 1989). Der zivile und militärische Blutbedarf hat zudem auch in jüngster Zeit keineswegs abgenommen. Pro Jahr werden in der Bundesrepublik Deutschland ca. 4 Millionen, in den Vereinigten Staaten ca. 16 Millionen Blutkonserven verbraucht, die immer aufwendigeren Testverfahren unterzogen werden müssen (AUBUCHON et al., 1997), während die Ressource Blut jedoch immer knapper wird (DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES, 1999). Aufgrund neuer Kriegstechniken und den so veränderten Anforderungen auch an das Sanitätswesen (POPE et al., 1999) wurde im Zweiten Golfkrieg Blut vor allem der unbegrenzten Haltbarkeit wegen gefroren transportiert und gelagert. Die Aufarbeitung zu applizierbaren Produkten vor Ort erforderte jedoch eine enorme Logistik, wie sie nur mit Lazarettschiffen gewährleistet werden kann (WINSLOW, 2000).

Blutersatzstoffe sollen nun ohne die Gefahren von Infektionen und immunologischen Unverträglichkeitsreaktionen von den biologische Funktionen des Blutes im wesentlichen den Gastransport, die nutritive Versorgung des Gewebes und eine Beteiligung an der Regulation des Säure-Basen-Haushaltes übernehmen.

2.2.3 Physiologie des Sauerstofftransportes durch Hämoglobin

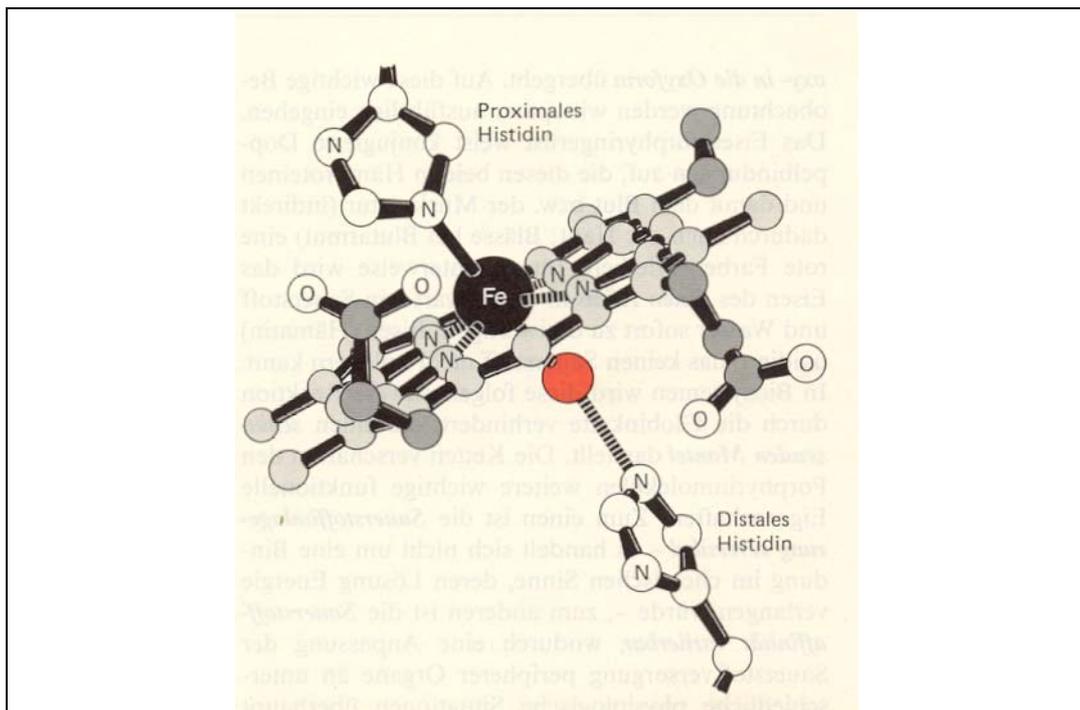


Abb. 2: Das Sauerstoffatom schiebt sich bei Anlagerung an das zentrale Eisenatom zwischen das Porphyringerüst und die Seitenkette des distalen Histidinrestes. (G. Löffler und P. E. Petrides: Physiologische Chemie, 1988, Springer, Berlin Heidelberg, p. 119)

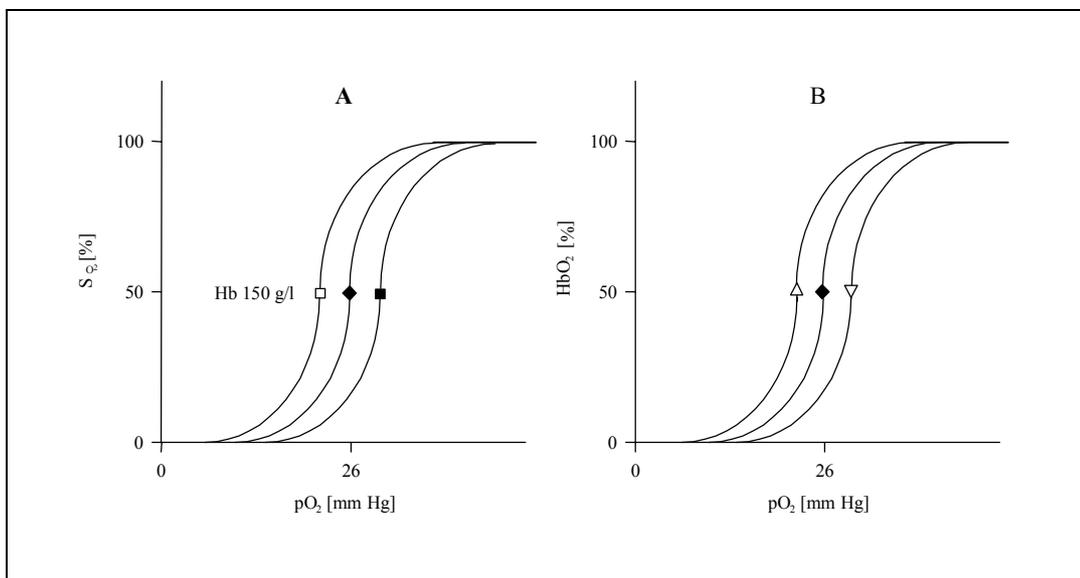


Abb. 3: Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobins (\blacklozenge)
 A. Rechtsverschiebung durch $pH \downarrow$, $CO_2 \uparrow$, $DPG \uparrow$ (\blacksquare);
 Linksverschiebung durch $pH \uparrow$, $CO_2 \downarrow$, $DPG \downarrow$ (\square)
 B. Effekte von erhöhtem (\triangle) und erniedrigtem (\blacktriangledown) Hämoglobingehalt auf die Sauerstofftransportkapazität des Blutes

Da der Fähigkeit der zu entwickelnden Blutersatzlösungen zum Sauerstofftransport zentrale Bedeutung beigemessen wurde (RABINOVICI et al., 1990; VANDEGRIFF et al., 1989), stellte die Physiologie des Hämoglobinmoleküls, welches für den Transport von Sauerstoff zum Gewebe sowie den Abtransport von Kohlendioxid (CO₂) aus dem Gewebe verantwortlich ist, einen zentralen Forschungsschwerpunkt dar. Hämoglobin ist ein tetrameres Protein, das beim Menschen aus insgesamt 674 Aminosäuren besteht, ein Molekulargewicht von 64.500 Dalton aufweist und erstmals von Hoppe-Seyler kristallisiert wurde. Der unpolare und daher im wässrigen Milieu von Extra- und Intrazellulärraum nur schlecht lösliche Sauerstoff wird von ihm an ein zweiwertiges Eisenatom seiner prosthetischen Gruppe – dem Häm-Molekül – angelagert, ohne daß sich dabei die Wertigkeit des Eisens ändert (Abb. 2); die Sauerstofftransportkapazität des Blutes wird durch Hämoglobin auf das 70fache gesteigert. Das in menschlichen Erythrozyten befindliche Hämoglobin ist bei 37°C, einem pH von 7,4 und einem Sauerstoffpartialdruck von 26,6 mm Hg zu 50 % gesättigt (p₅₀). Wegen der Kooperativität seiner vier Proteinketten – das vierte Sauerstoffmolekül wird einige hundert Male schneller aufgenommen als das erste – weist das Hämoglobinmolekül eine sigmoide Sauerstoffbindungskurve auf, wie sie in Abb. 3 in Abhängigkeit vom Sauerstoffpartialdruck dargestellt ist.

Metabolische Veränderungen wie Azidose oder Hyperkapnie bewirken eine Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve. Aufgrund der unter diesen Bedingungen reduzierten Sauerstoffaffinität des Hämoglobinmoleküls ist zwar ein höherer Sauerstoffpartialdruck zu dessen Oxygenierung notwendig, der Sauerstoff wird aber im hypoxischen, saueren Gewebe leichter abgegeben. Hingegen bewirkt der in den Lungenkapillaren lokal erhöhte pH-Wert eine gesteigerte Aufnahme von Sauerstoff (BOHR et al., 1904). Nicht sicher geklärt ist, ob die CO₂-Konzentration eine spezifische Wirkung auf das Hämoglobinmolekül hat oder lediglich über die Änderung des pH-Wertes Einfluß nimmt. Zwar tragen Erythrozyten unter Ruhebedingungen nur etwa 38 % der Kohlendioxidfracht, während der größere Teil im Blutplasma transportiert wird, jedoch sind insgesamt nur ungefähr 10 % des Kohlendioxides physikalisch gelöst. Die übrigen 90 % der Kohlendioxidfracht werden durch eine intraerythrozytäre Carboanhydrase zu Bikarbonationen umgeformt und die dabei entstehenden Protonen durch Hämoglobin abgepuffert, wodurch das Molekül auch beim Abtransport von Kohlendioxid eine wichtige Stellung einnimmt.

2.2.3.1 Humanes Hämoglobin

In menschlichen Erythrozyten wird die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins durch organische Phosphate – vor allem durch 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG) aber auch durch Adenosintriphosphat – wesentlich beeinflusst. Ein Konzentrationsanstieg führt jeweils zur Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve des Hämoglobinmoleküls, woraus sich eine erschwerte Oxygenierung des Moleküls in der Lunge sowie eine erleichterte Sauerstoffabgabe durch das Molekül im sauerstoffkonsumierenden Gewebe ergibt. Der Signalmetabolit 2,3-DPG entsteht auf einem Nebenweg der Glykolyse und vermindert die Sauerstoffaffinität von Hämoglobin durch Anlagerung an das deoxygenierte Molekül.

2.2.3.2 Bovines Hämoglobin

Bovines Hämoglobin weist unter physiologischen Bedingungen eine geringere Sauerstoffaffinität und einen ausgeprägteren Bohr-Effekt als humanes Hämoglobin auf. Außerdem wird die Sauerstoffaffinität nicht durch das nur intrazellulär zur Verfügung stehende 2,3-DPG sondern durch Cl⁻-Ionen beeinflusst (BUNN, 1971, FEOLA et al., 1983; FRONTICELLI et al., 1984). Daher erscheint bovines Hämoglobin für die Verwendung in zellfreien Hämoglobinlösungen besonders geeignet.

2.2.3.3 Pathobiochemie

Bei gesteigertem oxidativen Stress kann das Hämoglobinmolekül als Fenton-Reagens (SADREZADEH et al., 1984) die Bildung von zytotoxischen Hydroxylradikalen aus über die Haber-Weiss-Reaktion bereitgestelltem Wasserstoffperoxid begünstigen und so der Lipidperoxidation Vorschub leisten. In Erythrozyten sorgen die Enzyme Superoxiddismutase und Peroxidase für eine stete Entgiftung. Da das normalerweise zweiwertig gebundene Häm-Eisen hierbei ein Elektron zur Verfügung stellt, wird das Hämoglobin zu Methämoglobin oxidiert, welches über das dreiwertige Eisen keinen Sauerstoff mehr binden kann. Dieser Vorgang wird als Autooxidation bezeichnet. Der Methämoglobingehalt in Erythrozyten ist Dank des NADH-abhängigen Enzyms Methämoglobinreduktase normalerweise nicht größer als 1 bis 2 %.

2.2.4 Sauerstofftragende Lösungen

Bei der Entwicklung von Lösungen, welche die Sauerstofftransportfunktion des Blutes übernehmen können, werden die Molekülgruppe der Perfluorocarbone und das natürliche Trägermolekül für Sauerstoff im Gefäßbett von Lebewesen, das Hämoglobin, untersucht.

2.2.4.1 Perfluorocarbone

Die chemisch hergestellten, halogenierten Perfluorocarbonmoleküle sind biologisch völlig inert und können große Mengen von Gasen, also auch von Sauerstoff, binden. Da sie nicht biologischen Ursprungs, billig zu produzieren und lange haltbar sind, sind sie als Blutersatzlösung interessant. Perfluorocarbone sind nicht mit wässrigen Lösungen vermischbar und bedürfen der Emulsion, um intravenös appliziert zu werden. Die Empfänger können dabei grippeähnliche Symptome sowie eine Thrombozytopenie entwickeln (FLAIM, 1997). Neben der Beatmung mit Flüssigkeiten (CLARK et GOLLAN, 1966) bei unterschiedlichen Formen des Lungenversagens bei Neugeborenen (hyalines Membransyndrom) oder Erwachsenen (ARDS) und der Verwendung zur Reabsorption von Luftbläschen nach kardiochirurgischen Eingriffen (WINSLOW, 2000) können sie vor allem zur akuten normovolämischen Hämodilution vor bzw. während chirurgischer Eingriffe mit großem Blutverlust eingesetzt werden (HABLER et al., 1998). Ihr Einsatz wird aber durch eine kurze Halbwertszeit und die Elimination der emulgierten Perfluorocarbontröpfchen durch das Retikuloendotheliale System limitiert.

2.2.4.2 Stromafreie Hämoglobinlösungen

Bei der Entwicklung einer sauerstofftragenden Blutersatzlösung bot sich als möglichst physiologischer Ansatz eine Proteinlösung an, welche aus Erythrozyten herausgelöstes, stromafreies Hämoglobin enthielt. Noch am Ende des 19. Jahrhunderts gelang erstmals die Präparation und subkutane Injektion von stromafreiem Hämoglobin (VON STARK, 1898), wobei die anämischen Patienten lediglich mit einer Schwellung an der Injektionsstelle reagierten. Sellards und Minot gelang die Herstellung einer stabileren Hämoglobinlösung (SELLARDS et MINOT, 1916), deren Injektion jedoch immer in Hämoglobinurie, in drei der von ihnen behandelten 33 Fälle auch in Fieber und Krampfanfällen resultierte. Auch die

Patienten anderer Forscher litten nach Applikation von Hämoglobinlösungen hauptsächlich unter Bauchschmerzen und Bauchkrämpfen, Übelkeit, Erbrechen und Krampfanfällen. Amberson, der während des Zweiten Weltkrieges die Technik der Hämoglobinpräparation weiter verbessert hatte, infundierte 1947 einer Patientin mit postpartalem hämorrhagischen Schock 2,3 Liter einer von ihm hergestellten Hämoglobinlösung. Die Hämodynamik der Patientin konnte so zwar stabilisiert werden, sie starb jedoch in der oligurischen Phase der sich entwickelnden Niereninsuffizienz (AMBERSON et al., 1949). In der Folgezeit wurde eine Vielzahl von Hämoglobinlösungen aus unterschiedlichen Quellen auf verschiedene Weise hergestellt, die aber folgende grundsätzliche Probleme gemein haben.

2.2.5 Probleme der stromafreien Hämoglobine

2.2.5.1 Sauerstoffbindung

Stromafreies (humanes) Hämoglobin zeigt aufgrund des fehlenden allosterischen Regulators 2,3-Diphosphoglycerat eine gesteigerte Sauerstoffaffinität, was in einer Linksverschiebung – der Halbsättigungsdruck pO_{50} beträgt bei 37 °C und pH 7,4 für stromafreies humanes Hämoglobin 16 mm Hg – und einer Abflachung der Sauerstoffbindungskurve (SUNDER-PLASSMANN et al., 1975) resultiert. Wie bereits erwähnt, wird dadurch die Abgabe von Sauerstoff in das Gewebe erschwert (SUNDER-PLASSMANN et al., 1973; JESCH, 1981). Durch Bindung geeigneter Effektoren, wie z.B. Pyridoxalphosphat, an die prostetische Gruppe des Hämoglobinmoleküls (BENESCH et BENESCH, 1969; JESCH et al., 1976; MESSMER et al., 1979) konnten pO_{50} -Werte im physiologischen Bereich erzielt werden.

2.2.5.2 Nephrotoxizität

Ein Problem aller chemisch nicht veränderten Hämoglobinlösungen war die kurze Verweildauer der Hämoglobinlösungen im Organismus, verursacht durch den endogenen Zerfall des Hämoglobins in seine beiden $\alpha\beta$ -Heterodimere. Aufgrund ihrer Nierengängigkeit führten diese zum Crush-Syndrom und letztlich zum Nierenversagen. Der Zerfall des Tetramers konnte durch eine intermolekulare Vernetzung der Proteinketten (KOTHE et al., 1985) – z. B. durch Vernetzung der Lysinreste auf Position 99 der α -Ketten des Hämoglobinmoleküls (CHATTERJEE et al., 1986) – wirksam verhindert werden. Auch die

intramolekulare Vernetzung mit Bis-(3,5-dibromosalicyl)-Fumarat (Diaspirin) wurde vorgenommen (SNYDER et al., 1987; LARSEN et al., 1990). Die Polymerisation zu größeren Molekülaggregaten wird u. a. mit Glutaraldehyd erreicht (SEHGAL et al., 1983). Diese chemische Modifikation beseitigte nicht nur das Problem der Nephrotoxizität, auch die Isoonkotizität höherer Hämoglobinkonzentrationen wurde so ermöglicht (DE VENUTO et ZENGA, 1982; PALLER, 1988; LEE et al., 1989).

2.2.5.3 Kontamination

Die problematische Anreinigung des Proteins Hämoglobin bei der Herstellung der Lösungen und die damit verbundene, von Endotoxin verursachte Komplementaktivierung führte im Experiment zu Thrombopenie, Leukozytopenie und disseminierter intravasaler Koagulopathie bis hin zum Multiorganversagen (FEOLA et al., 1988). Das Toxizitätsproblem verringerte sich erheblich, seit es möglich geworden ist, Hämoglobin durch Zentrifugation mit Chlorophorm vollständig von Membranphospholipiden zu reinigen und durch spezielle Filtrationstechniken von Endotoxin zu befreien.

2.2.5.4 Vasokonstriktion

Als weitere Wirkung wird der spezies- und dosisunabhängige Blutdruckanstieg direkt auf die vasokonstriktorisches Effekte des Hämoglobinmoleküls zurückgeführt. Als Ursachen werden verschiedene Hypothesen der Wechselwirkung des Hämoglobins mit vasoregulatorischen Mechanismen angeführt:

1. Hämoglobin bindet den endothelial gebildeten Vasodilatator NO (endothelium derived relaxing factor) und blockiert so dessen vasodilatatorische Aktivität (MARTIN et al., 1985).
2. Hämoglobin verursacht eine gesteigerte Ansprechbarkeit adrenerger Rezeptoren für Katecholamine (COLLINS et al., 1993; GULATI et al., 1994b).
3. Hämoglobin induziert die Freisetzung des endothelial gebildeten Vasokonstriktors Endothelin-1 (MACDONALD et WEIR, 1991; MACHI et al., 1991; SCHULTZ et al., 1993; MALCOLM et al., 1994).
4. Oxigeniertes Hämoglobin erhöht akut die intrazelluläre Konzentration von Inositol-Phosphaten, welche als "second messengers" bei der Kontraktion der glatten Muskelzellen von Blutgefäßen dienen (VOLLRATH et al., 1990).

2.2.5.5 Lipidperoxidation

Sowohl reduzierte (Fe^{2+}) als auch oxidierte (Fe^{3+}) Eisen-Ionen tragen zur Bildung von Radikalen bei: Fe^{2+} reagiert mit Lipidhydroperoxiden zu Alkoxyradikalen und Peroxyradikale werden in Anwesenheit von Fe^{3+} gebildet. Beide katalysieren die weitere Lipidperoxidation als Kettenreaktion. Da die autooxidative Potenz von Eisen dafür nicht ausreicht, wird diese vermutlich von Eisen-Chelat-Komplexen in Gang gesetzt (BUCHER et al., 1983).

2.2.6 Modifizierte Hämoglobine

Seit Herstellung der ersten wirklich stromafreien Hämoglobinlösung (RABINER et al., 1967) wurden vielfältige Modifikationen des Hämoglobinmoleküls vorgenommen, um oben genannte Probleme zu überwinden.

2.2.6.1 N-terminal verändertes Hämoglobin

Die Carbamylation der N-terminalen Gruppe von Hämoglobinmonomeren führte bei α -Ketten zu einer gesteigerten, bei β -Ketten zu einer verringerten O_2 -Affinität. Neben dem Nachweis der Beteiligung von Valin NA(1) α am Bohr-Effekt und der CO_2 -Bindung an Hämoglobin konnte gezeigt werden, daß die Formation von Sichelzellen so unterbunden werden kann (MANNING, 1981). Um die O_2 -Affinität der positiv geladenen 2,3-DPG-Tasche zu vermindern, wurde die N-terminale Gruppe mit Glyoxylsäure carboxymethyliert und mit Natriumborhydrid reduziert. Der Bohr-Effekt und die Auswirkungen der CO_2 -Bindung blieben dabei nahezu unangetastet (FANTL et al., 1987a, 1987b).

Pyridoxalaldehyde reagieren je nach Oxygenierungsgrad mit verschiedenen Bindungsstellen des Hämoglobinmoleküls (BENESCH et BENESCH, 1969; BENESCH et al., 1971, 1972). Mit Pyridoxal-5-Phosphat kann die N-terminale Gruppe der β -Ketten von Deoxyhämoglobin modifiziert werden (BENESCH et BENESCH, 1981), wobei durch die elektrostatische Interaktion des Pyridoxal-5-Phosphat mit dem Lysin EF(86) β die Wirkung von 2,3-DPG simuliert und die O_2 -Affinität bei erhaltener Kooperativität halbiert wird (BENESCH et al., 1982). Von diesem Produkt wurden größere Mengen hergestellt (DE VENUTO et ZENGA, 1983), und seine Wirksamkeit bei der Behandlung des hämorrhagischen Schocks ohne begleitende Immunsuppression nachgewiesen (HOYT et al., 1981; JESCH et al., 1982), jedoch

fiel es durch eine kurze Halbwertszeit und hohen onkotischen Druck auf (SEHGAL et al., 1984; GOULD et al., 1986; SEHGAL et al., 1988). Außerdem fand sich eine große Heterogenität dieses mit Pyridoxal-5-Phosphat modifizierten Hämoglobins (MCGARRITY et al., 1987).

2.2.6.2 "Cross-linked" Hämoglobin

Um die Plasmahalbwertszeit zu verlängern und gleichzeitig eine Beeinträchtigung der Nieren zu verhindern, eignet sich u. a. eine Modifikation mit 2-Nor-2-Formyl-Pyridoxal-5-Phosphat (NFPLP). Es bewirkt eine Verbindung zwischen dem Valin NA(1) β der einen und dem Lysin EF6(82) β der anderen β -Kette und senkt so nicht nur die O₂-Affinität des Moleküls sondern verhindert auch die Dissoziation des Tetramers in $\alpha\beta$ -Heterodimere (BENESCH et al., 1975; ARNONE et al., 1977). Auch kann durch Mono-(3,5-dibromosalicyl)-Fumarat eine Pseudo-Crosslink genannte Stabilisierung zwischen den Lysinen EF6(82) β beider β -Ketten und damit ebenfalls eine Stabilisierung des Tetramers mit deutlich ausgeprägterer Reduzierung der O₂-Affinität erzielt werden (BUCCHI et al., 1989). Die Schwierigkeiten bei der Herstellung der Lösung waren aber erheblich (BENESCH et BENESCH, 1981) und es gelang nur, maximal 80 % der Moleküle zu koppeln (VAN DER PLAS et al., 1987). Leichter zu produzieren und wirksamer NFPLP waren aufgrund ihrer geringeren Größe die Bis-Pyridoxal-Phosphate, in Sonderheit das Pyrophosphat (KEIPERT et al., 1989). Schließlich konnte gezeigt werden, daß die Verwendung von Bis-(3,5-dibromosalicyl)-Fumarat unter anaeroben Bedingungen ebenfalls zur Stabilisierung des Tetramers und Verringerung der O₂-Affinität führt (TYE et al., 1983). Das Crosslink wird hierbei zwischen den Lysinen G6(99) α der beiden α -Ketten ausgebildet (CHATTERJEE et al., 1986; VANDEGRIFF et al., 1989). Das Produkt war die bis dahin am wenigsten heterogene Hämoglobinlösung.

2.2.6.3 Polymerisiertes und "cross-linked" Hämoglobin

Die stabilisierten Hämoglobinmoleküle können durch Anfügen einer reaktiven Gruppe zu größeren Aggregaten arrangiert werden, wobei Glutaraldehyd (ROSEN et al., 1982; SEHGAL et al., 1983) am häufigsten verwendet wird. Die so erreichte relativ niedrige O₂-Affinität und die auf 46 Stunden verlängerte Plasmahalbwertszeit stellten einen erheblichen Fortschritt dar (GOULD et al., 1986), gleichzeitig konnte eine höhere Hämoglobinkonzentration (14 – 16 g/dl) isoonkotisch appliziert werden. Das Präparat wies jedoch eine erhebliche

Heterogenität auf (MARKS et al., 1988), außerdem ist Glutaraldehyd sehr leicht flüchtig und schon in geringer Konzentration zytotoxisch (SPEER et al., 1980). Andere Agentien zur Polymerisation von Hämoglobinmolekülen zeigen im wesentlichen die selben Probleme (MOK et al., 1975; SCANNON, 1982; HSIA et al., 1986).

2.2.6.4 Hämoglobinbindung an Makromoleküle

Eine andere Variante Hämoglobin chemisch zu modifizieren, um die oben genannten Ziele zu erreichen, stellt die Konjugation an Makromoleküle wie Dextran (TAM et al., 1976), Polyvinylpyrrolidon (SCHMIDT, 1979), Inulin (IWASAKI et al., 1983), Polyethylenglykol (AJISAKA et IWASHITA, 1980; YABUKI et al., 1990) oder Polyoxyethylen (MATSUSHITA et al., 1988) dar.

2.2.6.5 Hämoglobin in Liposomen

Die Herstellung einer Art künstlichen Blutzelle aus in eine Membran gepacktem Hämoglobin gelang erstmals 1957 (CHANG, 1988). Hämoglobin kann in Liposomen aus natürlichem Lecithin oder synthetischen, aus gesättigten Fettsäuren hergestellten Phospholipiden verpackt werden. Letztere sind im Gegensatz zu jenen aus Lecithin unempfindlich gegen Lipidperoxidation. Die Hämosome (RABINOVICI et al., 1990) oder "neo red cells" (USUBA et al., 1992) bezeichneten Emulsionen haben als unilamelläre Liposomen mit einem Durchmesser von weniger als 1 Mikrometer ausgezeichnete rheologische Eigenschaften und weisen neben einem sehr hohen Hämoglobingehalt eine niedrige osmotische Aktivität (RABINOVICI et al., 1995) auf, woraus hervorragende Sauerstofftransport- und -verteilungskapazität resultiert. Weiterhin besteht die Möglichkeit, Medikamente unter anderem zum Schutz vor Oxidation zu integrieren (SZE BENI et al., 1988) oder die Sauerstoffbindungskurve bzw. den Sauerstoffhalbsättigungsdruck an Blut durch Zugabe von 2,3-DPG anzupassen (TSUCHIDA, 1992). Die lagerungsstabilen Liposome, die sogar gefriergetrocknet werden können, sind weder nephrotoxisch noch wirken sie antigen, sie werden jedoch von Makrophagen in Milz und Leber abgefangen, persistieren nach Aufnahme in Leberzellvakuolen und werden in das durch sie aktivierte Retikuloendotheliale System eingebaut. Außerdem ist auch hier die Endotoxinkontamination ein wesentliches Problem bei der Herstellung (RABINOVICI et al., 1989).

2.2.6.6 Rekombinantes Hämoglobin

Eine weitere Möglichkeit der Hämoglobingewinnung ist die gentechnische Produktion in Zellkulturen, wobei auch die Veränderung der Sauerstofftransporteigenschaften und der Plasmahalbwertszeit möglich sind (COGHLAN et al., 1992; OGDEN et al., 1992). Derzeit handelt es sich dabei wegen der damit verbundenen Probleme der Verfahrenstechnik um eine für die Bereitstellung größerer Mengen nicht geeignete Methode. Es ist auch schon gelungen, funktionelles humanes Hämoglobin in transgenen Mäusen zu synthetisieren (BEHRINGER et al., 1989). Auch die Anreinigung des rekombinanten Hämoglobins stellt aber ein ernsthaftes Problem dar: die Kontamination mit Endotoxin steht insbesondere bei der Produktion von Hämoglobin in *Escherichia coli*-Kulturen im Vordergrund.

2.3 Intravitalmikroskopische Technik

Bereits Anfang dieses Jahrhunderts wurden Untersuchungen mit direkter Visualisierung durchgeführt und nach Einführung eines transparenten Kammermodells am Kaninchenohr morphologische und funktionelle Veränderungen analysiert (SANDISON, 1924, 1928). In den folgenden Jahren wurde eine Reihe von Verbesserungen der chirurgischen Technik erzielt, wie etwa eine an die Körperhaut adaptierte Kammertechnik am Kaninchenohr (WILLIAMS, 1934) und eine Rückenhautkammer bei Mäusen (ALGIRE, 1943). Eine erhebliche Verbesserung der optischen Qualität im Vergleich zur Kaninchenohrpräparation wurde durch eine neue, zweigeteilte Kammer aus Plexiglas erzielt, welche in die Hamsterbackentasche implantiert wurde (SANDERS, 1963; SANDERS et SHUBIK, 1964) und Untersuchungen bei Transillumination des ektropionierten Mundschleimhautepithels erlaubte. Weiterhin wurden Kammerpräparationen entwickelt, welche in die Rückenhautfalte von Ratten implantiert werden konnten; sie bestanden aus Plexiglas (YAMAURA et al., 1971) oder Aluminium (PAPENFUSS et al., 1979). Das für die Ratte beschriebene Rückenhautkammermodell wurde auf den Syrischen Goldhamster übertragen. Dabei wurde nachgewiesen, daß keine ultrastrukturellen Veränderungen des unter dem Kammerfenster liegenden Haut-muskelgewebes induziert wurden (ENDRICH et al., 1980). Ein Überblick über die verschiedenen Techniken bei der Implantation von Rückenhautkammern wurde in jüngerer Zeit von Nolte gegeben (NOLTE et al., 1995a) Die Voraussetzungen einer idealen Kammerpräparation – die anatomische und funktionelle Integrität des ortständigen Gewebeareals (SEWELL, 1966) – waren in diesem Modell ebenso erfüllt wie die Möglichkeit

zur chronischen Beobachtung des in der Kammer befindlichen Gewebeareals. Zur Verminderung der durch die Präparation hervorgerufenen Artefakte schlug Sewell eine weitestgehende Reduktion der Anästhesie oder – wenn möglich – den völligen Verzicht auf Anästhesie während der Intravitalmikroskopie vor. Die Einflüsse von Inhalations- und Injektionsanästhetika auf makrohämodynamische Parameter, die zur Veränderung der mikrohämodynamischen Parameter beitragen, sollten so ausgeschlossen werden. Unter anderem resultierte die in Abhängigkeit von der Dosierung einer Allgemeinanästhesie auftretende systemische Hypotension in einer peripheren Dilatation der Mikrogefäße (ALтура et al., 1980; LONGNECKER et HARRIS, 1980; CONZEN et al., 1989a, 1989b; HABAZETTL et al., 1989). Weiterhin wurde gezeigt, daß sich das Interaktionsverhalten von Leukozyten und Gefäßendothel in Anhängigkeit vom verwendeten Anästhetikum signifikant verändern kann (MILLER et al., 1996). Ein intravitalmikroskopisches Modell, bei dem sich das Tier ohne Anwendung von Anästhesie zur Untersuchung physiologischer Meßdaten der Mikrozirkulation in einem normalen Wachzustand befindet, stellt folglich ein "ideales" Mikrozirkulationsmodell dar. Die transparenten Hautmodelle wurden bis zum Jahre 1980 nur verwendet, um morphologische und hämodynamische Aspekte der Mikrogefäße auf mikroskopischer Ebene (CLARK, 1935; ALGIRE et LEGALLAIS, 1947; ALGIRE et MERWIN, 1955) sowie die funktionellen Veränderungen einzelner Blutzellen bei deren Passage durch das kapillare Netzwerk zu beschreiben und eine genaue Analyse der Gefäßarchitektur und des Mikrogefäßnetzes des jeweils untersuchten Gewebeareals durchzuführen (GOODALL et al., 1965). Nach Einführung des Rückenhautkammermodells am Syrischen Goldhamster (ENDRICH et al., 1980) war mit Hilfe der quantitativen Fluoreszenzmikroskopie und eines computergestützten Mikrozirkulationsanalysesystems (ZEINTL et al., 1989) eine umfassende Analyse der Mikrozirkulation am wachen Versuchstier bezüglich der lokalen Mikrohämodynamik und der in den Gefäßen stattfindenden Zell/Zell-Interaktion möglich. Entscheidend verbessert wurde das Modell durch den Einsatz von Titan als Material für die Konstruktion der Rückenhautkammer, da es sich gegenüber dem bis dahin gebräuchlichen Aluminium durch größere Biokompatibilität und mechanische Stabilität auszeichnet. In zahlreichen Untersuchungen wurde an diesem Modell die Wirkung von Pharmaka auf die mikrovaskuläre Durchblutung und die Interaktion von Leukozyten mit dem mikrovaskulären Endothel quantitativ erfaßt (MENGER et al., 1989a, 1990, 1991; LEHR et al., 1991a, 1991b, 1992; NOLTE et al., 1991a, 1991b, 1992a).

3. Material und Methode

3.1 Versuchstiere und Materialien

3.1.1 Versuchstiere

Für die Untersuchungen wurden fünf bis sieben Wochen alte syrische Goldhamster mit einem Körpergewicht zwischen 50 und 70 Gramm verwendet. Die Tiere stammten aus der Zucht des Instituts für Chirurgische Forschung der Universität München sowie von der Firma Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland). Im Tierstall herrschten als Umweltbedingungen 22°C Raumtemperatur, 40 % relative Luftfeuchtigkeit und ein 12-Stunden Hell-Dunkel-Rhythmus. Jungtiere wurden mit einem Körpergewicht von 40 bis 45 Gramm von der Mutter abgesetzt und in geschlechtsgetrennten Gruppen von zwei oder drei Tieren gehalten. Als Nahrung stand ihnen handelsübliches Futter für Nagetiere (Altromin®-Standard-Diät Ratten/Mäuse, Altromin GmbH & Co KG, Lage, Deutschland) und Leitungswasser ad libitum zur Verfügung; Sägespäne dienten als Einstreu. Nach dem chirurgischen Eingriff befanden sich die Tiere in Einzelkäfigen. In den Versuch wurden nur solche Versuchstiere aufgenommen, welche keine Anzeichen von Erkrankungen, ein normales Freß- und Putzverhalten sowie die von Sewell geforderten Güte-Kriterien (SEWELL, 1966) aufwiesen. Die Versuche wurden von Mai 1991 bis Dezember 1994 im Institut für Chirurgische Forschung der Universität München durchgeführt und ausgewertet. Die unten aufgeführten Ergebnisse wurden an 130 Tieren ermittelt, für Vorversuche waren weitere 60 Tiere eingesetzt worden.

3.1.2 Versuchsmodell

Für die Untersuchungen wurde das Rückenhautkammer-Modell beim syrischen Goldhamster (ENDRICH et al., 1980) verwendet. Aus Gründen der biologischen Verträglichkeit, der Stabilität des Rahmens und zur Reduzierung der thermischen Konduktion wurde als

Werkstoff das biologisch inerte Titan gewählt. Die Rückenhautkammer (Abb. 4) besteht aus zwei symmetrischen Kammerhälften, in deren Zentrum eine kreisförmige Öffnung mit einem Durchmesser von 11,8 Millimeter eingelassen ist. Sie dient dem Einlegen eines mit einem Sprengring fixierbaren Deckglases für intravitalmikroskopische Untersuchungen. Der obere Rand der Kammerrahmen, an dem sich die Bohrungen für Schrauben und Fäden befinden, dient zur Fixierung der Rückenhaut an der Kammer. Vor Beginn der Implantation werden drei Schrauben mit den zugehörigen Distanzmuttern, welche im Bereich des Sichtfensters einen Abstand von ca. 0,45 Millimeter zwischen den Kammerhälften aufrechterhalten, an der späteren rechten Kammerhälfte befestigt. Die Distanz entspricht der Dicke der Hautpräparation, so daß eine Kompression des freipräparierten Rückenhautmuskels verhindert wird. Im Anschluß an die Präparation werden die beiden Kammerhälften miteinander verschraubt und durch zwei Einzelnähte am oberen Rand zusätzlich an der Rückenhaut fixiert.

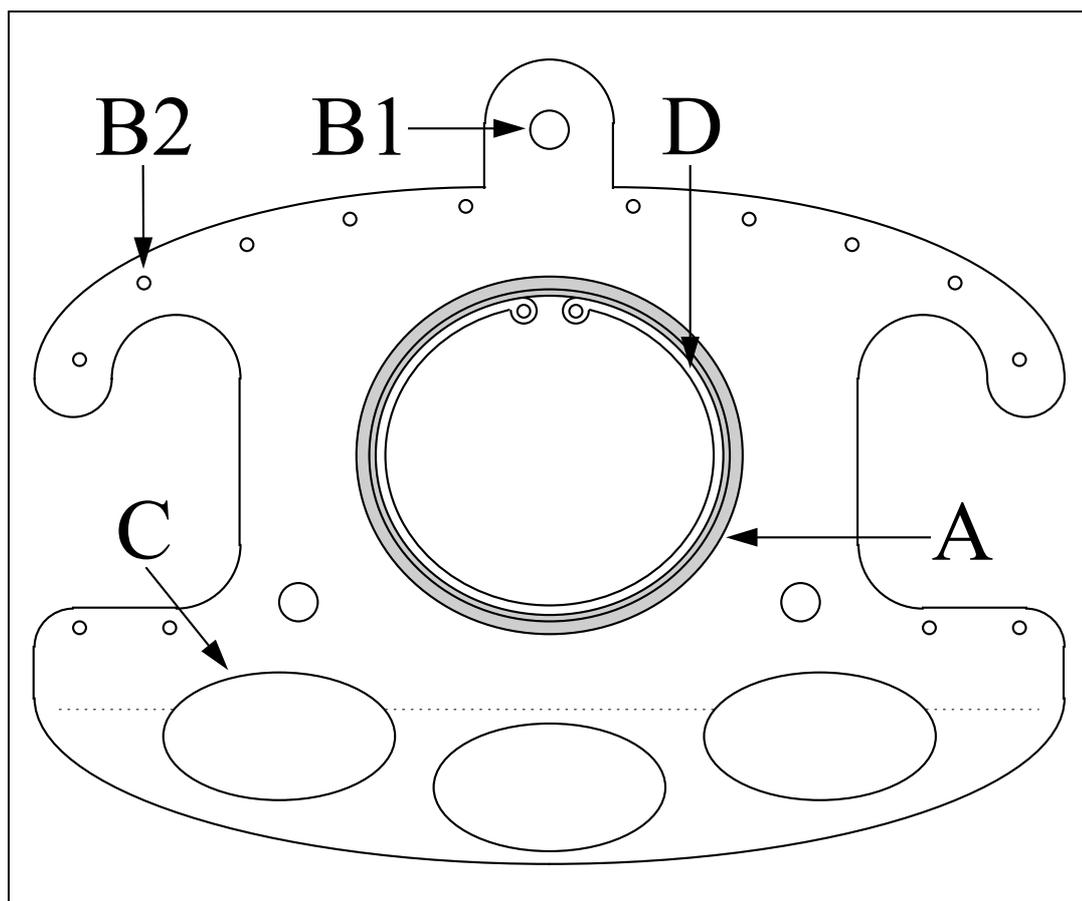


Abb. 4: Konstruktionsskizze einer Rückenhautkammerhälfte. Eine Rückenhautkammer besteht aus zwei spiegelbildlichen, durch Schrauben verbundenen Kammerhälften.

- A = Öffnung zur intravitalmikroskopischen Untersuchung des Hautmuskels
- B1 = Bohrungen für Fixierungsschrauben und Adaptierung der beiden Kammerhälften
- B2 = Bohrungen für Haltefäden
- C = Öffnungen im Bereich des Sattels als Gewichtsreduktion
- D = Sprengring zur Deckglasfixierung (Maßstab 1 : 0,5)

Über das in die Titankammer eingelassene Fenster können dann mittels Durchlicht- und Fluoreszenz-Auflicht-Mikroskopie sämtliche Gefäßabschnitte des in der Rückenhautkammer enthaltenen quergestreiften Rückenhautmuskels, bestehend aus präkapillären Arteriolen, nutritiven Kapillaren, postkapillären Venolen und Sammelvenolen, beobachtet werden.

3.1.3 Implantation der Rückenhautkammer

Die Implantation der Rückenhautkammer (Institut für Chirurgische Forschung der Universität München, München, Deutschland) erfolgt nach der von Endrich beschriebenen Methode (ENDRICH et al., 1980). Neben den für die Präparation benötigten Instrumenten wurden auch die Titankammern sowie die zugehörigen Schrauben und Distanzmutter, Sprengringe und Deckgläschen dampfsterilisiert.

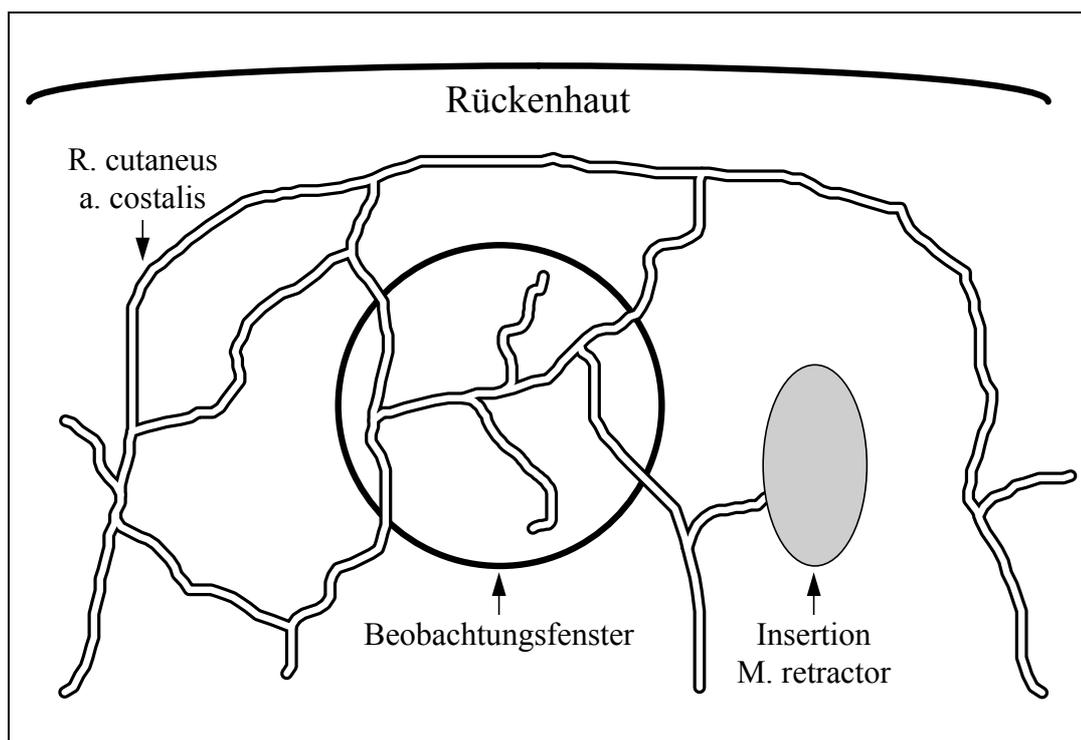


Abb. 5: Schematische Darstellung der Positionierung des Beobachtungsfensters zwischen Ramus cutaneus arteriae costalis und Insertionsgebiet des Musculus retractor.

Vor Implantation der Rückenhautkammer wurden die Tiere durch eine intraperitoneale Injektion von 50 Milligramm Pentobarbital-Natrium (Nembutal[®], Sanofi, Hannover, Deutschland) pro Kilogramm Körpergewicht zunächst narkotisiert. Anschließend erfolgte die Rasur mit einem elektrischen Rasiergerät (Typ GT 104 / GH 204, Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) und die Epilierung mit Enthaarungscreme (Pilca Med[®]-Enthaarungscreme, Schwarzkopf, Hamburg, Deutschland). Nach zweiminütiger Hautdesinfektion mit Kodan-

Tinktur-Forte[®]-Spray (Schölke & Mayr GmbH, Norderstedt, Deutschland) wurde der chirurgische Eingriff auf einem auf 37°C vorgeheizten Kleintier-Operationstisch (IFB, Hiddenhausen, Deutschland) durchgeführt. Unter visueller Kontrolle des Gefäßverlaufs wurde die extendierte Rückenhaut mit einem kranialen und einem kaudalen Haltefaden (Ethibond[®], grün geflochten, 5-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) fixiert, so daß unter weitgehender Überlagerung der Gefäße beider Seiten die mediane Linie einen Scheitel bildete. Die bereits mit Schrauben und Distanzmuttern versehene Kammerhälfte wurde auf der dem Präparationsareal abgewandten, rechten Seite des Versuchstiers mit zwei Einzelnähten so angebracht, daß sich das Beobachtungsfenster zwischen dem Ramus cutaneus arteriae costalis und dem Insertionsgebiet des Musculus retractor befand (Abb. 5).

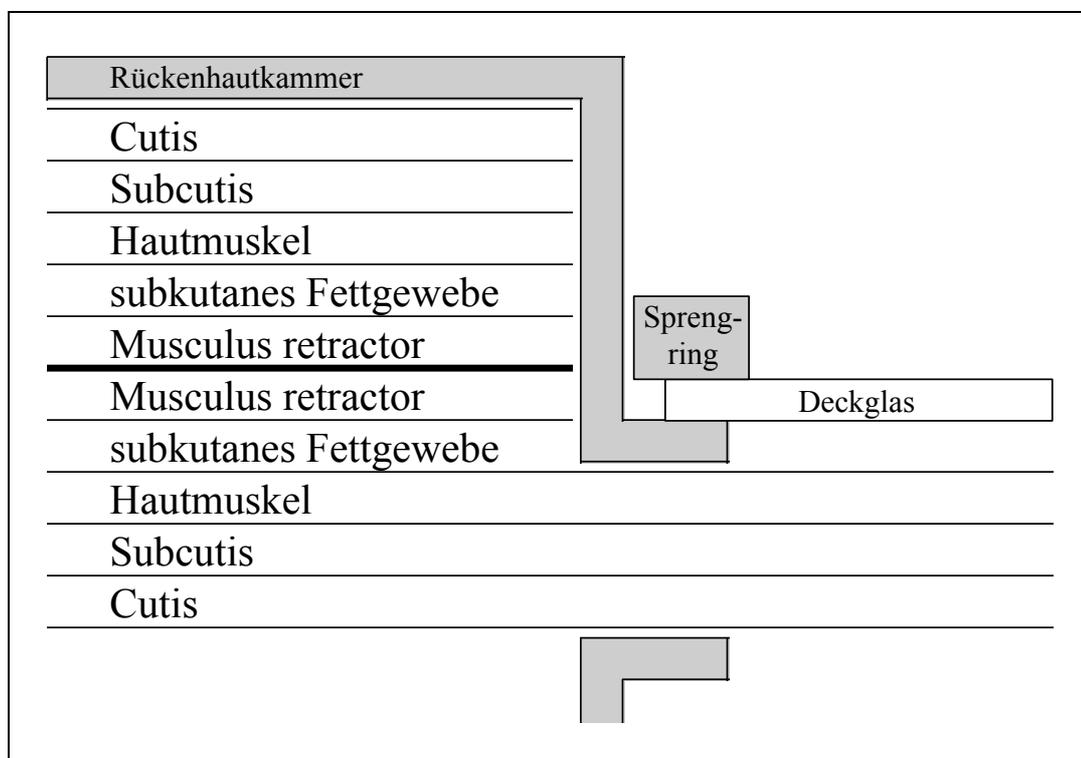


Abb. 6: Hautschichten des syrischen Goldhamsters im Bereich des Beobachtungsfensters und Fixierung des Deckgläschens im Kammerring durch einen Sprengring.

Die beiden unteren Schrauben wurden nach Hautinzisionen auf die gegenüberliegende Seite vorgeschoben und jeweils mit einer Moskitoklemme versehen, so daß die Haut plan auf der Innenseite der rechten Kammerhälfte zu liegen kam. Zur Vermeidung größerer Blutungen durfte sich das den Muskel versorgende Gefäßbündel nicht im Operationsfeld befinden. Im Bereich des Beobachtungsfensters wurde nun aus dem so vorbereiteten Hautareal die Cutis in einem kreisförmigen Gebiet von ca. 15 Millimeter Durchmesser mit einer Schere vorsichtig entfernt; anschließend wurde das Versuchstier in Rechtsseitenlage unter das Operationsmikroskop (Typ M 650, Wild, Heerbrugg, Schweiz) gelegt. Die verbliebenen Schichten der linken Hautseite – Subcutis, Hautmuskel, subkutanes Fettgewebe und

Retraktormuskel – wurden bei zehnfacher, der Retraktormuskel und das subkutane Fettgewebe der rechten, unteren Hautseite bei 16-facher Vergrößerung abpräpariert, so daß nur noch die Cutis und Subcutis mit der ca. 30 Mikrometer dicken Hautmuskelschicht der rechten Hautseite verblieb (Abb. 6).

Während der gesamten Präparation wurde mit besonderer Sorgfalt das chirurgische Trauma so gering wie möglich gehalten, um Störungen der Gewebemöostase zu vermeiden. Zum Schutz gegen Austrocknung wurden die entsprechenden Gewebeschichten zwischen den einzelnen Präparationsschritten mit physiologischer Kochsalzlösung feucht gehalten. Nach Beendigung der Präparation wurde die zweite Kammerhälfte mit dem durch einen Sprengring fixierten Deckgläschen auf die freipräparierte Hautseite aufgesetzt und mit zwei Muttern an den beiden unteren Schrauben die gegenüberliegenden Kammerhälfte druckfrei angeschraubt; Austrocknung, Traumatisierung und sekundäre Infektion des Gewebes sowie eine Kompression der in die Beobachtungskammer ziehenden Gefäße konnten dadurch ausgeschlossen werden. Abschließend wurde der obere Rand der Kammer mit zwei Einzelnähten durch die dafür vorgesehenen Bohrungen an der Haut festgenäht.

3.1.4 Implantation der arteriellen und venösen Verweilkatheter

Zwei Tage nach der Kammerimplantation wurden unter den gleichen Anästhesiebedingungen, wie sie für die Kammerpräparation gewählt worden waren, die Verweilkatheter implantiert. Nach Enthaarung der Halsregion mit Pilca Med[®] wurde bei den Versuchstieren in Linksseitenlage eine Infusionskanüle (Abbocath[®] 13 G * 51 mm, Abbott, Ingelheim, Deutschland) subkutan vom kranialen Rand der Kammer entlang der rechten Halsseite bis in die Region der rechten Vena jugularis dextra vorgeschoben und vorsichtig perkutan nach außen geführt; nach Entfernung des Stahlmandrins wurden die beiden ca. 40 Zentimeter langen Polyäthylenkatheter (PE-10, 800/110/100/100, Innendurchmesser 0,28 Millimeter, Außendurchmesser 0,56 Millimeter, Portex Ltd., Lythe, Kent, England) vom Ort der transkutanen Inzision in das Präparationsfeld geführt und schließlich die Infusionskanüle entfernt. Die Katheter wurden über Kanülen (0,4 * 20 Millimeter (27 G), Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit Tuberkulinspritzen (1 Milliliter-Einmalspritze G 17 8 A, Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) verbunden, die mit physiologischer Kochsalzlösung gefüllt waren. Eine luftblasenfreie Befüllung der Katheter vor Insertion sowie die jederzeitige Überprüfung der intravasalen Lage der Katheters nach Insertion durch Aspiration wurde so ermöglicht.

Der Hamster wurde nun auf zwei ca. 20 * 10 * 5 Zentimeter großen Plexiglasblöcken unter dem oben beschriebenen Operationsmikroskop so in Rückenlage gebracht, daß sich die Rückenhautkammer zwischen den beiden Blöcken befand. An der Durchtrittsstelle der Katheter wurde die Haut mit einem ca. zwei Zentimeter langen Längsschnitt in der Medioklavikularlinie vom rechten Unterkieferast bis zum Schlüsselbein eröffnet und zunächst der Thymus mit zwei spitzen chirurgischen Pinzetten freipräpariert und stumpf nach medial verlagert.

Zur Insertion des arteriellen Katheters wurde die Arteria carotis communis dextra im Trigonum caroticum von dem sie umgebenden Fettgewebe freipräpariert und dargestellt. Weiter wurden drei Schlingen aus Naht-Seide (Perma-Hand[®] Seide, schwarz geflochten, 6-0, Ethicon, Norderstedt, Deutschland) vorgelegt: zwei davon proximal der geplanten Inzisionsstelle. Eine weitere distal der geplanten Inzisionsstelle unmittelbar proximal der Aufzweigung der Arteria carotis communis in die Arteriae carotis interna und carotis externa. Diese Schlinge wurde zur Vermeidung einer retrograden Blutung nach Eröffnen des Gefäßes zugezogen, chirurgisch verknotet und unter leichtem Zug fixiert, wodurch ein Ausweichen der Arteria carotis während des Eingriffes vermieden wurde. Um bei der Eröffnung der Arterie eine starke Einblutung in das Operationsfeld zu verhindern, wurde das Gefäß proximal aller Schlingen mit einer Yasargil-Klemme (Yasargil[®], Aesculap, Tuttlingen, Deutschland) abgeklemmt. Danach konnte die Arterie mit einer Gefäßschere eröffnet und der Katheter einige Millimeter nach zentral vorgeschoben werden. Sobald der Katheter mit einer der beiden proximal der Inzisionsstelle liegenden Schlingen fixiert war, konnte die Yasargil-Klemme entfernt und der Katheter insgesamt ca. 15 Millimeter herzwärts vorgeschoben und mit den beiden verbleibenden Schlingen endgültig fixiert werden.

Zur Insertion des venösen Katheters wurde die Vena jugularis communis dextra von dem sie umgebenden Fettgewebe freipräpariert und dargestellt. Anschließend wurden drei Schlingen aus Naht-Seide vorgelegt: zwei distal der Einmündung des Gefäßes in die Vena brachiocephalica und eine proximal der Einmündung der Vena jugularis interna, welche sofort zugezogen und chirurgisch verknotet wurde, um eine Einblutung in das Operationsfeld nach Eröffnen des Gefäßes zu vermeiden. Nach Eröffnen der Vena jugularis communis mit einer Gefäßschere wurde der Katheter ca. 15 Millimeter nach zentral vorgeschoben und mit den liegenden Schlingen fixiert.

Abschließend wurde der Thymus reponiert und die Hautwunde mit fünf bis sechs Einzelknopfnähten verschlossen. Die am kranialen Ende der Rückenhautkammer transkutan austretenden Katheter wurden mit mehreren Schlingen und Knoten an den hierfür vorgesehenen Bohrungen der rechten Kammerhälfte befestigt, in Achter-Touren um die

Rückenhautkammer gelegt und mit zwei ca. 5 Millimeter breiten Leukosilk®-Streifen (Beiersdorf, Hamburg, Deutschland) an der Rückenhautkammer festgeklebt.

3.1.5 Beurteilung der Kammerpräparation

Nach Implantation der Rückenhautkammer wurde den Hamstern eine Ruhepause von zwei Tagen, nach Implantation der Verweilkatheter eine weitere von einem Tag gewährt, um Veränderungen der Mikrozirkulation durch chirurgisches Trauma oder Narkose auszuschließen.

Für Versuche kamen nur solche Tiere in Betracht, welche normale Nahrungsaufnahme, arttypisches Verhalten sowie Reaktion auf Futterreize zeigten. Am Ende der Ruhephasen wurde die Kammerpräparation kontrolliert. Es durften keine Blutungen, Schwellungen oder makro- bzw. mikroskopisch sichtbaren Entzündungen vorhanden sein (SEWELL, 1966; ZWEIFACH, 1973), wie zunehmende Vasodilatation und Schlängelung der physiologischerweise gestreckt verlaufenden Gefäße oder Neovaskularisation (ENDRICH et al., 1980), Ödembildung, Permeabilitätsstörungen (SVENSJÖ et al., 1978) oder vermehrtes Anhaften von Leukozyten am Endothel der postkapillären Venolen. Bei Vorhandensein nur eines dieser Kriterien wurde das Versuchstier von der Studie ausgeschlossen.

3.2 Apparative Ausstattung

3.2.1 Untersuchungstechniken

Für die intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Mikrozirkulation im quergestreiften Rückenhautmuskel des syrischen Goldhamsters stand folgende Meßanordnung zur Verfügung: Die Hamster wurden für die Dauer des Versuches in einer Untersuchungsröhre Tubus, deren Innendurchmesser mit ca. 35 Millimetern in etwa dem Körperumfang eines Hamsters entspricht, immobilisiert. Die notwendige Frischluftzufuhr wurde durch eine ca. 10 Millimeter große Öffnung an der Vorderseite der Untersuchungsröhre sichergestellt. Weiterhin hatte sie im oberen Bereich einen ca. 5 Millimeter breiten Schlitz in Längsrichtung, welcher der Aufnahme der Rückenhautkammer diente.

Der in der Untersuchungsröhre befindliche Hamster wurde nun auf einer Plexiglasbühne derart fixiert, daß die frei abstehende Rückenhautkammer auf einem Präzisionshalter mit dem Kammerring in einer Bohrung (h7-Passung) im rechten Winkel zur optischen Achse bewegungsstabil zu liegen kam und somit ohne Beeinträchtigung ihrer Durchblutung oder der Atmung und Kreislaufsituation des Tieres unter dem Mikroskop beobachtet werden konnte.

3.2.2 Intravitale Fluoreszenzvideomikroskopie

3.2.2.1 Optisches System

Das Mikroskop Orthoplan[®] (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) war mit einem Projektionsokular mit 1,25-fachem Vergrößerungsfaktor ausgestattet. Drei Objektive kamen zur Anwendung: für Übersichtsaufnahmen wurden ein 2,5-fach vergrößerndes und ein 10-fach vergrößerndes Objektiv mit langem Arbeitsabstand (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet, für die quantitativen Analysen der Mikrozirkulation wurde ein 25-fach vergrößerndes Salzwasser-Immersionsobjektiv (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) verwendet.

Durch Einsatz eines FSA-Tubus-GW sowie eines Vario-Zooms (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) für stufenlose, maximal fünffache Vergrößerung konnten die intravitalmikroskopischen Bilder mittels einer CCD-Kamera (charge coupled device camera FK6990, Lichtempfindlichkeit 10^{-2} Lux, Prospective Measurements Inc., San Diego, Kalifornien, USA) aufgezeichnet werden.

Das gesamte Mikroskop war, um dessen Bewegung in der vertikalen Achse (z-Achse) zu ermöglichen, an einem Mikro-Makrotrieb aufgehängt, der zur Feinfokussierung der jeweiligen Präparationsareale diente.

3.2.2.2 Beleuchtung

Als Lichtquelle diente eine 75 Watt Xenon-Lichtquelle (XBO-75, Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) an einem mit den Filterblöcken I2/3 und N2 (Leitz GmbH, Wetzlar, Deutschland) bestückten Ploemopak-Illuminator-System. Die Anregung erfolgte mit Licht der Wellenlänge 380 - 760 Nanometer, das emittierte Licht wurde mit einem Bandpassfilter BP 450-490 (Anregungsfilter I2/3, Anregungsbereich: blau) und BP 530-560 (Anregungsfilter N2, Anregungsbereich: grün) gefiltert. Soweit notwendig, wurden Langpaßfilter LP 515 (FITC-Dextran) und LP 580 (Rhodamin 6G) als Sperrfilter vorgeschaltet.

Als Durchlichtquelle stand eine Kaltlichtquelle (Kaltlichtfontaine 485, Fa. Karl Storz, Tuttlingen, Deutschland) zur Verfügung. Das emittierte Licht passierte vor der Durchleuchtung der Beobachtungskammer einen 443 Nanometer-Filter.

Von allen untersuchten Gefäßen wurden durch einfaches Umschalten der Filterblöcke I2/3 und N2 Videosequenzen in FITC-Dextran-Kontrastierung zur Auswertung der Gefäßdurchmesser, der Blutflußgeschwindigkeit, der Extravasation und der funktionellen Kapillardichte sowie in Rhodamin 6G-Kontrastierung zur Auswertung der Leukozyten/Endothel-Interaktion aufgenommen.

3.2.2.3 Videoanlage

Die intravitalmikroskopischen Bilder wurden nach Einblendung eines Zeit-Codes (Videozeitgenerator VTG 33; Fora Company Ltd., Tokio, Japan) auf einem $\frac{3}{4}$ -Zoll Videobandgerät (Sony U-Matic, Vo-5800--PS; Sony GmbH, München, Deutschland) mit einer Geschwindigkeit von 50 Halbbildern pro Sekunde aufgezeichnet, wobei während der Versuche das Live-Bild (online) auf einem Videomonitor (PVM-1442QM; Sony GmbH, München, Deutschland) dargestellt wurde, was Aufnahmekontrollen zu jedem Zeitpunkt erlaubte. Für die Videoaufnahmen wurden Videokassetten (KAC-60BRS, Sony GmbH, München, Deutschland) verwendet. Über ein Mikrofon am Videobandgerät konnten Identifikationskriterien wie Art des Versuches, Zeitpunkt und Ort sowie

Versuchsbedingungen und Beobachtungen am Bildschirm auf dem Band protokolliert werden.

3.2.2.4 Mikroskopiertisch

Die Untersuchungsplattform wurde auf dem Mikroskopiertisch in den dafür vorgesehenen Führungsschienen platziert. Da die Plattform hierdurch jedes Mal in die identische Ausgangsposition gebracht wurde, stellte diese Fixierung einen für alle Versuche einheitlichen Nullpunkt sicher. Durch zwei Schrittmotoren war der Mikroskopiertisch in zweidimensionaler Richtung (x-Achse, y-Achse) beweglich. Eine Koordinatensteuerung (KOS Ingenieurbüro Uhlenbohm, Deisenhofen, Deutschland) erhielt von einem Computer über eine RS-232-Schnittstelle die Positionierungsbefehle in Form von x- und y-Koordinaten und steuerte damit die Schrittmotoren an. Alle eingangs definierten Beobachtungspunkte konnten so zu unterschiedlichen Zeitpunkten immer wieder aufgerufen und untersucht werden.

Für die Untersuchungen zum Einfluß von Hämoglobinlösungen wurden sechs Gefäßareale (SOI, "site of interest") ausgewählt, von denen ein SOI eine Arteriole, die übrigen fünf SOIs Venolen und Sammelvenolen enthielten. Weiterhin wurde über einem SOI ein ca. 1,65 Quadratmillimeter großes Gewebeareal (ROI, "region of interest") zur Bestimmung der funktionellen Kapillardichte festgelegt.

3.2.2.5 Auswerteeinheit

Zur offline-Auswertung der Videobänder wurden das oben genannte Videogerät und die computergestützten Mikrozirkulations-Analyse-Systeme CAMAS (ZEINTL et al., 1989) und CAPIFLOW (Version 3.1, Lawrence Comp., Sulzbach, Deutschland) verwendet (Abb. 7). Zur Verarbeitung der Bilder stand bei CAMAS eine vollständige Bildverarbeitungseinheit zur Verfügung, der ein Computer (M 380 XP1, Olivetti, Italien), ein Videomonitor (PMV-1442QM, Sony GmbH, München, Deutschland), ein Digitalisierbrett mit dazugehöriger Digitalisierlupe (MM II-1201, Summagraphics Corp., München, Deutschland) und ein Farbbildschirm zugeschaltet waren. Das Analyseprogramm CAPIFLOW wurde auf einem gesonderten Computer (Petruich GmbH, Germering, Deutschland) betrieben, dem

ebenfalls ein Videomonitor (PMV-1442QM, Sony GmbH, München, Deutschland) zugeschaltet war.

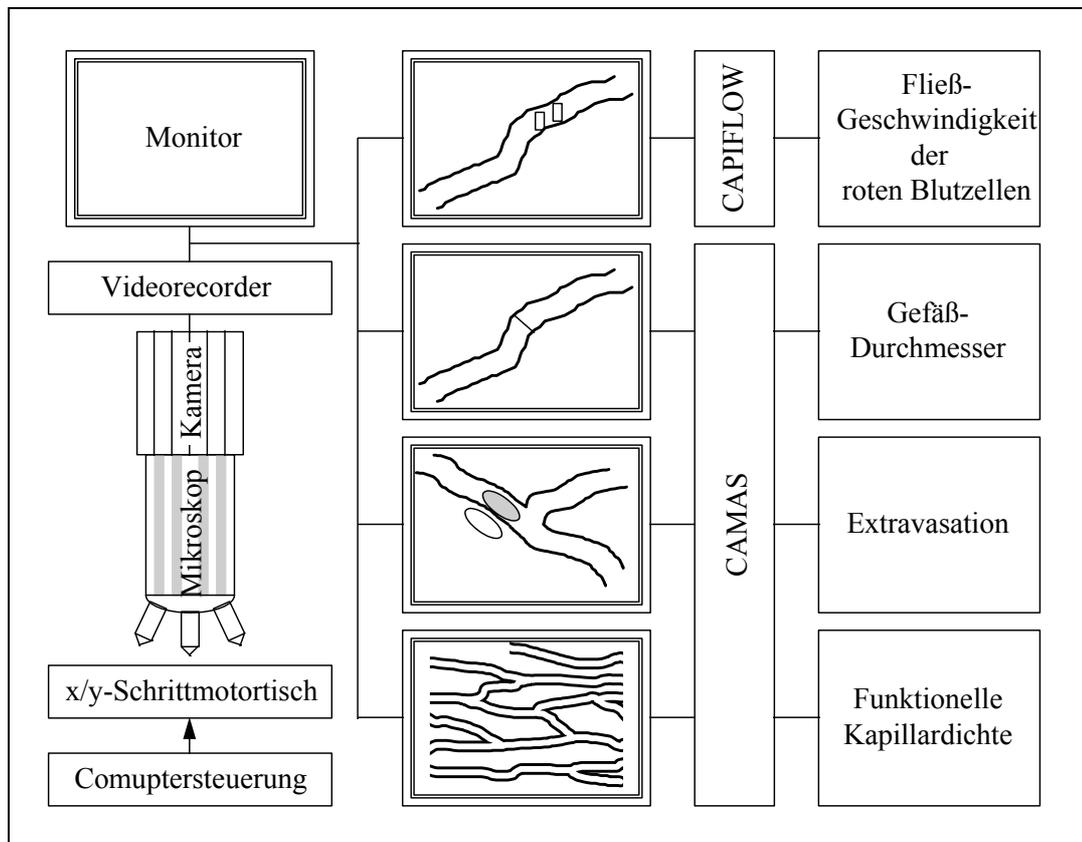


Abb. 7: Bildaufnahme und -analysesystem der intravitalmikroskopischen Auswerteeinheit.

3.3 Versuchsdurchführung

3.3.1 Makrohämodynamische Untersuchungen

3.3.1.1 Messung des mittleren arteriellen Blutdruckes

Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) wurde über den in der Arteria carotis implantierten chronischen Verweilkatheter mit Statham-Elementen PD 23 gemessen (Gould Statham, Kalifornien, USA) und in Millimetern Quecksilbersäule [mm Hg] angegeben. Die Messungen wurden zu den jeweils angegebenen Versuchszeitpunkten (siehe 3.3.3) durchgeführt.

3.3.1.2 Messung des Hämatokrits

Der Hämatokrit wurde durch die Zentrifugation arteriellen Vollblutes in einer Hämatokrit-Zentrifuge (Typ 2011, Hettich, Tuttlingen, Deutschland) bei einer Drehzahl von 13.000 Umdrehungen pro Minute über einen Zeitraum von fünf Minuten und anschließendem Ablesen der Sedimenthöhe an einer Hämatokrit-Skala in Prozent [%] ermittelt.

3.3.2 Analyse der intravitalmikroskopischen Parameter

Alle im folgenden dargestellten Parameter wurden durch Analyse der auf Videoband aufgezeichneten Bildsequenzen offline erhoben, so daß der Untersucher sich während der Versuche vollkommen auf deren Ablauf konzentrieren konnte, wodurch die Gesamtdauer der Versuche und vor allem die Expositionszeit der Präparationen mit dem energiereichen Fluoreszenzlicht auf ein Minimum reduziert wurde. Wiederholte Bildaufzeichnungen an den zuvor definierten SOIs erlaubte der verwendete Schrittmotor. Insgesamt wurde so ein hohes Maß an Präzision erreicht. Dabei kamen zwei verschiedene Fluoreszenzmarker zum Einsatz:

- FITC-Dextran 150.000 (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) als hochmolekularer Plasmamarker in einer Dosis von 10 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht [mg/kg KG] intravenös verabreicht zur Bestimmung des Gefäßdurchmessers, der Fließgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen, der Extravasation und der funktionellen Kapillardichte (FKD).
- Rhodamin 6G (Sigma, Deisenhofen, Deutschland) in einer Dosis von 0,1 Milligramm pro Kilogramm Körpergewicht [mg/kg KG] intravenös verabreicht zur selektiven Sichtbarmachung der Leukozyten.

3.3.2.1 Mikrohämodynamik

3.3.2.1.1 Gefäßdurchmesser

Dem Computer der Auswerteeinheit konnten mit Hilfe des Digitalisierbrettes die Koordinaten zweier Punkte, die sich auf einer senkrecht zum Gefäßverlauf liegenden Geraden befanden, vermittelt werden, aus deren Distanz und dem bekannten Vergrößerungsfaktor mittels CAMAS (ZEINTL et al., 1989) der Gefäßdurchmesser errechnet wurde. Die Werte wurden in Mikrometer [μm] angegeben.

3.3.2.1.2 Fließgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen

Zur Messung der Fließgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen wurde die Zweischlitz-Methode (dual slit technique) angewandt, welche nach dem zeitlichen Korrelationsverfahren arbeitet (INTAGLIETTA et TOMPKINS, 1987). Für die vorliegenden Untersuchungen wurde das Analyseprogramm CAPIFLOW verwendet. Dabei wurden auf dem Monitor zwei Videodensitometerfenster über dem zu messenden Gefäß positioniert und die aufgrund der vorbeifließenden Erythrozyten gemessenen densitometrischen Muster korreliert. Aus dem Abstand (Δs) und der zeitlichen Verzögerung (Δt) der über den beiden Fenstern gemessenen Muster wurde die Fließgeschwindigkeit der roten Blutzellen abgeleitet und in Millimeter pro Sekunde [mm/s] angegeben.

In Arteriolen war der Fluß zu schnell ($>1,8$ mm/s), um mit Hilfe von CAPIFLOW eine Messung und Korrelation der densitometrischen Muster durchführen zu können, so daß

ausschließlich die Fließgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen in postkapillären Venolen bestimmt wurde.

3.3.2.2 Leukozyten/Endothel-Interaktion

Die Leukozyten jedes Gefäßsegmentes wurde 30 Sekunden lang ausgezählt, wobei die Leukozyten eine gedachte Linie passierten und nach folgenden Kriterien eingeteilt wurden:

- Als nicht-adhärenente Leukozyten wurden diejenigen Zellen definiert, welche sich frei im Blutstrom bewegten und im beobachteten Gefäßabschnitt keine merklich geringere Geschwindigkeit als der Blutstrom selbst hatten. Sie werden als Zellen pro Blutvolumen [Zellen/mm³] angegeben, welche eine "Lichtschanke" mit dem Gefäßdurchmesser d passieren.

Aus dem Gefäßdurchmesser und der Blutzellgeschwindigkeit wurde die Zahl der nicht-adhärenenten Leukozyten (NA) pro Mikroliter an der "Lichtschanke" vorbeifließenden Blutes wie folgt kalkuliert:

$$NA = \frac{n \cdot 10^6}{d^2 \cdot \pi \cdot v \cdot 15}$$

n = Anzahl der nicht-adhärenenten Leukozyten

d = Gefäßdurchmesser in Mikrometer [μm]

v = Blutzellgeschwindigkeit im Gefäßabschnitt in Millimeter pro Sekunde [mm/s]

- Als rollende Leukozyten, sogenannte "Roller", wurden sich im Randstrom bewegende Zellen bezeichnet, die am mikrovaskulären Endothel mit einer Geschwindigkeit vorbeifließen, die deutlich gegenüber dem zentralen und gefäßwandnahen Blutfluß reduziert ist. Sie sind als Zellen pro Gefäßumfang und Minute [Zellen/mm * min] angegeben, die eine "Lichtschanke" mit dem Gefäßdurchmesser d passieren.

Aus dem Gefäßdurchmesser wurde die Zahl der an der "Lichtschanke" vorbeierollenden Leukozyten (R_o) pro Millimeter "Lichtschanke" und Minute wie folgt kalkuliert:

$$R_o = \frac{n \cdot 10^3}{d \cdot \pi}$$

n = Zahl der rollenden Leukozyten pro Minute

d = Gefäßdurchmesser in Mikrometer [μm]

- Als adhärenente Leukozyten, sogenannte "Sticker", wurden diejenigen Zellen definiert, welche sich während der Beobachtungszeit von 30 Sekunden in einem 200 Mikrometer langen Gefäßabschnitt nicht vom Gefäßendothel lösten. Sie werden als Zellen pro Quadratmillimeter Endothelfläche [Zellen/ mm^2] angegeben.

Aus dem Gefäßdurchmesser wurde die Anzahl adhärenenter Leukozyten (St) pro Quadratmillimeter Endotheloberfläche wie folgt kalkuliert:

$$St = \frac{n \cdot 10^6}{d \cdot \pi \cdot l}$$

n = Anzahl der adhärenenten Leukozyten

d = Gefäßdurchmesser in Mikrometer [μm]

l = Länge des Gefäßabschnittes: 200 Mikrometer

3.3.2.3 Mikrovaskuläre Permeabilität

Zur Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität wurden an die Gefäße angrenzende Gewebeareale definiert, die sich, vor allem im Bereich der postkapillären Venolen, im Falle der Extravasation des hochmolekularen Plasmamarkers FITC-Dextran (MG 150.000 Da) in das Interstitium als hell leuchtende Flächen darstellten. Im offline-Modus wurde dann mit Hilfe von CAMAS der entsprechende Fluoreszenzintensitätsquotient

$$Q_F = \frac{I_a}{I_i}$$

berechnet, wobei I_a die Fluoreszenzintensität außerhalb und I_i die Fluoreszenzintensität innerhalb des Gefäßsegmentes bedeutet.

3.3.2.4 Funktionelle Kapillardichte

Die funktionelle Kapillardichte wurde bestimmt, indem mit dem Cursor über dem Digitalisierbrett die auf dem Monitor abgebildeten, von Erythrozyten durchströmten Kapillaren im offline-Modus nachgezeichnet und mit Hilfe von CAMAS die Länge der nachgezeichneten Kapillaren als Quotient des untersuchten Gewebeareals in Millimeter pro Quadratmillimeter [mm/mm^2] angegeben wurde. Der Quotient aus der Standardabweichung eines Mittelwertes und dem jeweiligen Mittelwert selbst wurde als Varianz der funktionellen Kapillardichte angegeben. Als zusätzliches Maß der Homogenität der Gewebepfusion in den Versuchsprotokollen von isovolämischer Hämodilution sowie hämorrhagischem Schock und Wiederbelebung wurde die Varianz der funktionellen Kapillardichte in den pro Beobachtungszeitpunkt untersuchten acht Gesichtsfeldern errechnet.

3.3.3 Versuchsprotokolle

3.3.3.1 Hypervolämische Infusion

Die zu untersuchenden Lösungen (siehe 3.3.4) wurden den Tieren als Bolus von 10 % ihres Blutvolumens (errechnet aus 7 % des Körpergewichtes) intravenös injiziert. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden zu den in Abb. 8 angegebenen Zeitpunkten durchgeführt.

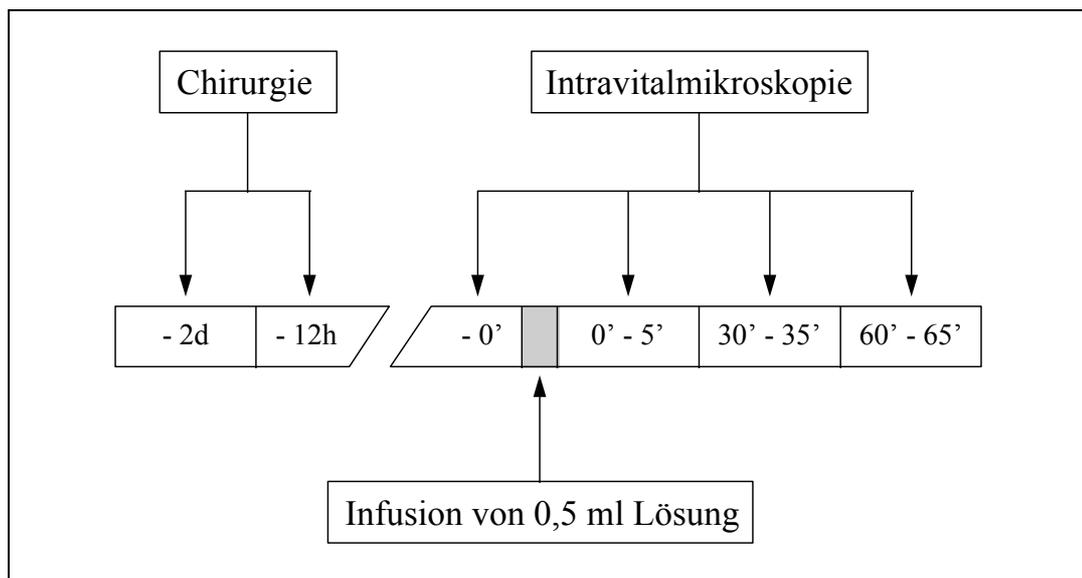


Abb. 8: Versuchsprotokoll für die hypervolämische Infusion. Die intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden zu den hier gezeigten Zeitpunkten vor und nach hypervolämischer Infusion der verschiedenen Lösungen (physiologische Kochsalzlösung, Albumin, bovine und humane Hämoglobinlösungen) durchgeführt.

3.3.3.2 Isovolumische Hämodilution

Nach Untersuchung der Auswirkung einer geringen Volumenmenge der Hämoglobinlösung (10 %ige hypervolumische Infusion) auf die Mikrozirkulation sollten größere Volumina verabreicht werden, um mögliche dosisabhängige Effekte der Hämoglobinlösungen zu erfassen. Dazu wurde eine isovolämische Hämodilution (Hämatokrit: 30 %) durch simultane Gabe der Lösung über den Verweilkatheter in der Vena jugularis und Entzug von Blut über den Verweilkatheter in der Arteria carotis über fünf bis maximal zehn Minuten durchgeführt (MENGER et al., 1988). Die makrohämodynamischen und intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden zu den in Abb. 9 angegebenen Zeitpunkten vorgenommen.

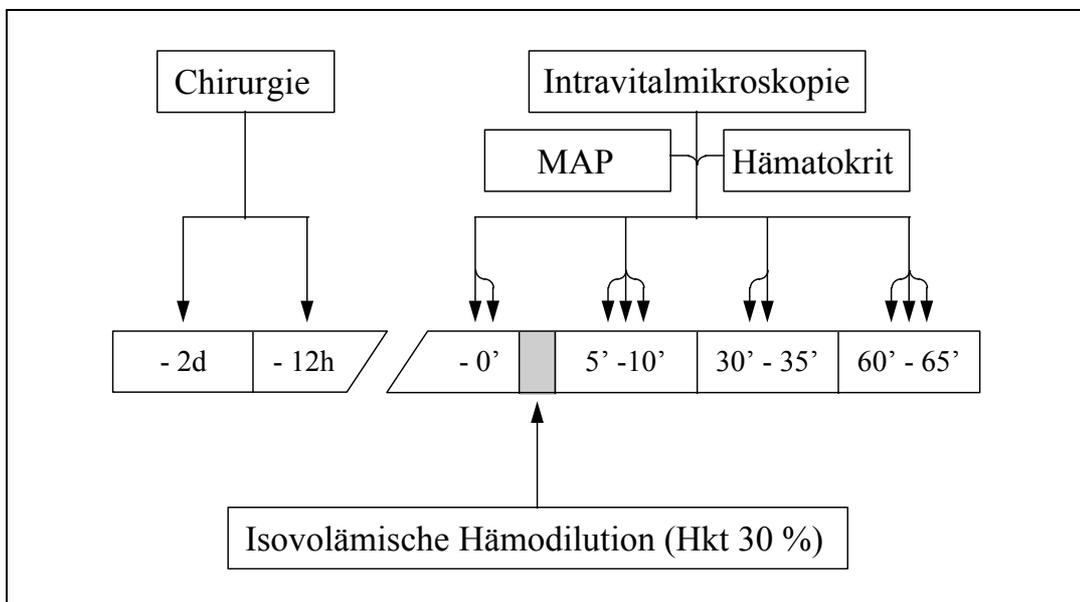


Abb. 9: Versuchsprotokoll für isovolämische Hämodilution. Die makrohämodynamischen und intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden zu den hier gezeigten Zeitpunkten vor und nach isovolämischer Hämodilution mit den verschiedenen Lösungen (Dextran 60, bovine und humane Hämoglobinlösungen) durchgeführt.

3.3.3.3 Hämorrhagischer Schock und Wiederbelebung

Nach den unter 3.3.3.1 und 3.3.3.2 beschriebenen Versuchsansätzen der Volumengabe unter physiologischen Bedingungen sollte schließlich auch die für diese Lösungen wesentliche Indikation des Volumenersatzes am Modell des hämorrhagischen Schocks untersucht werden. Dazu wurde bei den Tieren durch Entzug von ca. 50 % des Blutvolumens (errechnet aus 7 % des Körpergewichtes) ein hämorrhagischer Schock induziert (Abb. 10). Wurden keine wiederbelebenden Maßnahmen ergriffen, so verstarben die Tiere spätestens zwei Stunden nach Induktion des Schocks, der durch einen mittleren arteriellen Blutdruck von ca. 35 Millimeter Quecksilbersäule definiert war. Bei Reinfusion des entzogenen Blutes tolerierten die Tiere eine maximale Schockdauer von 45 Minuten. Die Tiere der Versuchsgruppen wurden demnach 45 Minuten nach Schock-Induktion mit den entsprechenden Lösungen therapiert und die intravitalmikroskopischen Untersuchungen zu den in Abb. 10 angegebenen Zeitpunkten durchgeführt.

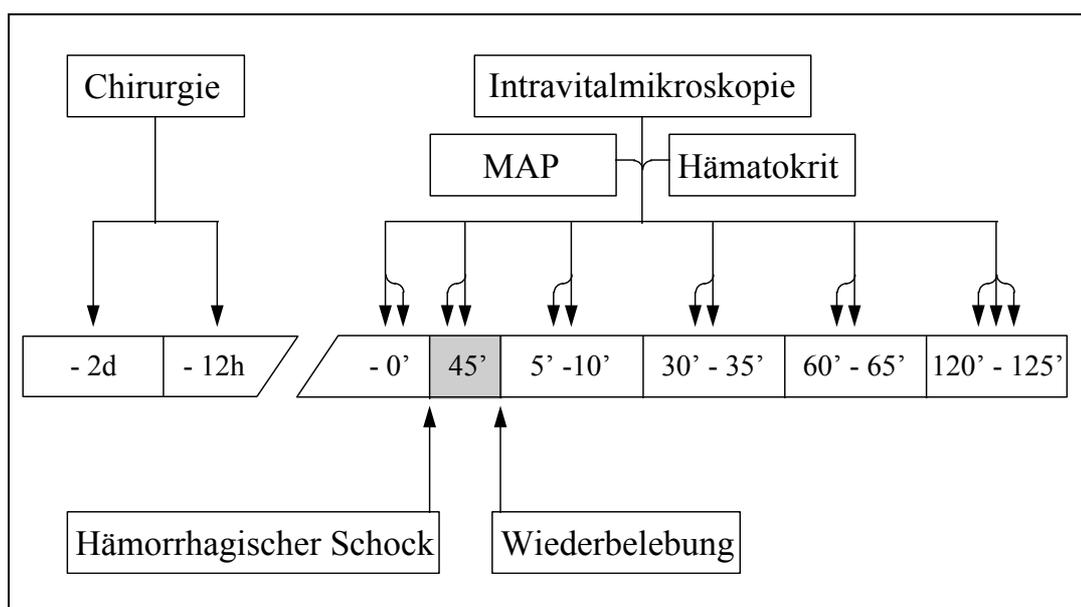


Abb. 10: Versuchsprotokoll für hämorrhagischen Schock. Die makrohämodynamischen und intravitalmikroskopischen Untersuchungen wurden zu den hier gezeigten Zeitpunkten vor und während des hämorrhagischen Schocks sowie nach Infusion der verschiedenen Lösungen (Dextran 60, Ringer-Lösung, Eigenblut, bovine und humane Hämoglobinlösung) durchgeführt.

3.3.4 Versuchsgruppen

In allen Versuchsgruppen wurde die Mikrozirkulation zu den angegebenen Zeitpunkten anhand der verschiedenen Versuchsprotokolle (Abb. 8 bis Abb. 10) intravitalmikroskopisch untersucht.

3.3.4.1 Hypervolämische Infusion

Bei der jeweils angegebenen Anzahl von Tieren wurde die Wirkung einer 10 %igen hypervolämischen Infusion folgender Lösungen untersucht:

Lösung	Hersteller	Anzahl der Versuchstiere
Isotone Kochsalzlösung (NaCl 0,9 %)	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	7
Albuminlösung	Baxter Healthcare Corp., Deerfield, Illinois, USA	9
Bovine Hb-Lösung F-1	Biopure Corp., Boston, Massachusetts, USA	4
Bovine Hb-Lösung 038	Biopure Corp.	3
Bovine Hb-Lösung 1	Biopure Corp.	6
Bovine Hb-Lösung 2 (U-PBHb [®])	Biopure Corp.	8
Humane Hb-Lösung 1	Baxter Healthcare Corp.	3
Humane Hb-Lösung 2 (DCLHb [®])	Baxter Healthcare Corp.	3
Humane Hb-Lösung 3	Baxter Healthcare Corp.	3
Humane Hb-Lösung 4	Baxter Healthcare Corp.	3
Humane Hb-Lösung 5	Baxter Healthcare Corp.	3
Humane Hb-Lösung 6	Baxter Healthcare Corp.	3
Humane Hb-Lösung 7	Baxter Healthcare Corp.	3

Tab. 2: Lösungen, die als hypervolämische Infusion verabreicht wurden.

3.3.4.2 Isovolumische Hämodilution

Auf der Grundlage der Ergebnisse nach hypervolumischer Infusion wurde die Wirkung einer isovolumischen Hämodilution mit folgenden Lösungen bei der jeweils angegebenen Anzahl von Tieren untersucht:

Lösung	Hersteller	Anzahl der Versuchstiere
Macrodex [®] (6 %, MG 60.000 g/mol)	Schiwa GmbH, Glansdorf, Deutschland	8
Bovine Hb-Lösung 1	Biopure Corp., Boston, Massachusetts, USA	8
Bovine Hb-Lösung 2 (U-PBHb [®])	Biopure Corp.	8
Humane Hb-Lösung 2 (DCLHb [®])	Baxter Healthcare Corp., Deerfield, Illinois, USA	8

Tab. 3: Lösungen, die bei Untersuchungen zur isovolumischen Hämodilution eingesetzt wurden.

3.3.4.3 Hämorrhagischer Schock

Für die Untersuchung der Wiederbelebung nach hämorrhagischem Schock wurden auf der Grundlage der Ergebnisse der isovolumischen Hämodilution folgenden Lösungen bei der jeweils angegebenen Anzahl von Tieren eingesetzt:

Lösung	Hersteller	Anzahl der Versuchstiere
Macrodex [®] (6 %, MG 60.000 g/mol)	Schiwa GmbH, Glansdorf, Deutschland	8
Ringer-Lösung DAB 7 [®]	Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland	8
Eigenblut (Antikoagulation durch Zusatz von Natriumcitrat)		8
Bovine Hb-Lösung 2 (U-PBHb [®])	Biopure Corp., Boston, Massachusetts, USA	7
Humane Hb-Lösung 2 (DCLHb [®])	Baxter Healthcare Corp., Deerfield, Illinois, USA	8

Tab. 4: Lösungen, mit denen nach Induktion des hämorrhagischen Schocks die Wiederbelebung durchgeführt wurde.

3.3.5 Hämoglobinlösungen

3.3.5.1 Bovine Hämoglobinlösungen

Die bovinen Hämoglobinlösungen waren durch intermolekulare Vernetzung zwischen den einzelnen Ketten des Hämoglobinmoleküls (α und β) mit Glutaraldehyd als Vernetzer zu größeren Molekülen polymerisiert (FEOLA et al., 1983; CHANG, 1997; PEARCE et GAWRYL, 1997). Von den verwendeten Lösungen sind in Tabelle 5 Bovine Hämoglobinlösung 1 und U-PBHb[®] genauer spezifiziert. Das Bovine Hämoglobin wird weltweit unter Überwachung der Haltungsbedingungen einschließlich der verwendeten Futtermittel durch den Produzenten der Hämoglobinlösung gewonnen. Seit die Übertragung der Bovinen Spongiformen Enzephalopathie (BSE) durch Prione sowie die hierdurch vermittelte Auslösung der Varianten Creutzfeld-Jacob-Krankheit beim Menschen vermutet wird, werden nur noch Rinder aus BSE-freien Regionen verwendet (PEARCE et GAWRYL, 1997). An Ratten konnte gezeigt werden, daß heterologe Hämoglobinlösung nur dann zu Immunreaktionen bei Empfängern führen, wenn die Empfänger zuvor durch wiederholte subkutane Injektionen des heterologen Hämoglobins gegen dieses immunisiert worden waren (CHANG et al., 1992).

	Bovine Hämoglobinlösung 1	U-PBHb [®]
Hämoglobin-Konzentration	11 g/dl	13 g/dl
Methämoglobin-Gehalt	< 10 %	< 10 %
Natrium	120 mmol/l	150 mmol/l
Kalium	4,0 mmol/l	4,0 mmol/l
Chlorid	115 mmol/l	145 mmol/l
Osmolarität	250 mOsm/kg	295 mOsm/kg
Onkotischer Druck	20 mmHg	18 mmHg
pH bei 25°C	7,8	7,8
p50	34 mmHg	38 mmHg
MG	64 - 500 kDa	130 - 500 kDa
Phospholipid-Gehalt	< 3 nmol/ml	< 3 nmol/ml
Endotoxin-Gehalt	< 0,5 U/ml	< 0,5 U/ml

Tab. 5: Zusammensetzung der bovinen Hämoglobinlösungen (mit freundlicher Genehmigung von Dr. M. Gawryl, Biopure Corp. Boston, Massachusetts, USA).

3.3.5.2 Humane Hämoglobinlösungen

Die verwendete humane Hämoglobinlösung war intramolekular zwischen den beiden α -Ketten des Hämoglobinmoleküls vernetzt. Dies wurde durch den Einsatz von

Di-acetyl-salizylat (Diaspirin) bei der Herstellung der Lösung erreicht (CHATTERJEE et al., 1986; CHANG, 1997; NELSON, 1997). Da die verwendeten Varianten der Lösung nur im unterschiedlichen Gehalt an Membran-Phospholipiden differieren, ist in Tabelle 6 als Beispiel DCLHb[®] genauer spezifiziert. Vom Produzenten der Hämoglobinlösung wurde zudem ein Verfahren zur Entfernung von Viren wie HIV, CMV und den verschiedenen Hepatitis-Viren entwickelt, so daß die Übertragung von Krankheiten durch die Hämoglobinlösung ausgeschlossen scheint (NELSON, 1997).

	DCLHb [®]
Hämoglobin-Konzentration	10,0 g/dl
Methämoglobin-Gehalt	7,6 %
Natrium	132,0 mmol/l
Kalium	4,0 mmol/l
Osmolarität	284 mOsm/l
Onkotischer Druck	42 mmHg
pH bei 25°C	7,75
p50	36 mmHg
MG	64 kDa
Endotoxin-Gehalt	< 0,5 U/l

Tab. 6: Zusammensetzung der human Hämoglobinlösung (mit freundlicher Genehmigung von Dr. K. Burhop, Baxter Healthcare Corp., Deerfield, Illinois, USA).

3.4 Statistische Auswertung

Die Werte der einzelnen Meßzeitpunkte wurden als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung (SA) der Mittelwerte der Einzeltiere berechnet, die wiederum als arithmetisches Mittel aus den Einzelmeßwerten eines Versuchstiers zum jeweiligen Meßzeitpunkt errechnet wurden. Zur Berechnung des Signifikanzniveaus abhängiger Daten wurde zum Vergleich einzelner Meßwerte innerhalb der Gruppen die Friedman-Varianz-Analyse und zum Vergleich verschiedener Gruppen zu einem Meßzeitpunkt die Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse, jeweils gefolgt von einem Student-Newman-Keul-Test (Sigma Stat for Windows, Version 1.00, Jandel Scientific, San Rafael, Kalifornien, USA) durchgeführt. Als statistisch relevant wurden hierbei p-Werte $< 0,05$ angesehen. In den Abbildungen sind die Daten trotz nonparametrischer Verteilung der Meßwerte als arithmetisches Mittel \pm Standardabweichung dargestellt, um eine rasche Interpretation und die Vergleichbarkeit mit der gängigen Literatur zu gewährleisten.

4. Ergebnisse

4.1 Hypervolämische Infusionen

In den Tabellen 7 bis 9 sind die Ergebnisse aller Lösungen, welche dem Protokoll der hypervolämischen Infusion unterzogen wurden, als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Parameter wurden zu folgenden Meßzeitpunkten erhoben:

- 0 unmittelbar vor hypervolämischer Infusion
- 1 0 Minuten nach hypervolämischer Infusion
- 2 30 Minuten nach hypervolämischer Infusion
- 3 60 Minuten nach hypervolämischer Infusion

In den Abbildungen 11 bis 16 wird nur auf jene Lösungen eingegangen, welche aufgrund der Ergebnisse bei der hypervolämischen Infusion zur isovolämischen Hämodilution (Bovine Hämoglobinlösung 1, U-PBHb[®] und DCLHb[®]) und zur Wiederbelegung nach hämorrhagischem Schock (U-PBHb[®] und DCLHb[®]) verwendet wurden (siehe 3.3.4.2 und 3.3.4.3). Sie werden im Vergleich zur hypervolämischen Infusion von physiologischer Kochsalzlösung und Albumin dargestellt.

	Durchmesser in Arteriolen [μm]	Durchmesser in Venolen [μm]	Blutzell- geschwindigkeit in Venolen [mm/sec]	Meß- zeitpunkt
NaCl	47,8 \pm 13,4	28,1 \pm 3,1	0,33 \pm 0,10	0
	48,5 \pm 13,2	29,6 \pm 3,4	0,33 \pm 0,08	1
	44,7 \pm 13,2	29,5 \pm 3,5	0,37 \pm 0,14	2
	46,6 \pm 13,2	29,7 \pm 2,2	0,31 \pm 0,11	3
Albumin	52,6 \pm 19,3	27,2 \pm 2,2	0,29 \pm 0,19	0
	46,2 \pm 11,7	26,8 \pm 1,8	0,48 \pm 0,15	1
	54,3 \pm 24,6	27,8 \pm 2,2	0,56 \pm 0,12	2
	53,8 \pm 18,2	27,5 \pm 3,3	0,52 \pm 0,18	3
Bovine Hb-Lösung F-1	62,8 \pm 16,2	32,5 \pm 3,8	0,29 \pm 0,09	0
	56,3 \pm 11,6	32,4 \pm 4,7	0,40 \pm 0,05	1
	56,7 \pm 14,0	32,1 \pm 5,0	0,39 \pm 0,07	2
	56,1 \pm 15,5	31,0 \pm 5,1	0,29 \pm 0,15	3
Bovine Hb-Lösung 038	71,8 \pm 2,6	28,9 \pm 2,8	0,24 \pm 0,05	0
	67,6 \pm 7,8	28,6 \pm 4,2	0,38 \pm 0,14	1
	63,5 \pm 9,0	29,3 \pm 3,9	0,38 \pm 0,13	2
	74,0 \pm 12,8	30,9 \pm 4,1	0,31 \pm 0,16	3
Bovine Hb-Lösung 1	62,3 \pm 15,5	33,3 \pm 4,9	0,36 \pm 0,17	0
	64,3 \pm 16,5	32,8 \pm 4,9	0,37 \pm 0,19	1
	64,6 \pm 14,1	33,7 \pm 4,3	0,34 \pm 0,18	2
	64,7 \pm 16,1	33,4 \pm 4,1	0,30 \pm 0,15	3
Bovine Hb-Lösung 2 (U-PBHb [®])	54,1 \pm 13,0	25,1 \pm 1,9	0,43 \pm 0,21	0
	53,1 \pm 12,0	25,2 \pm 2,9	0,40 \pm 0,24	1
	51,8 \pm 12,2	25,0 \pm 1,7	0,43 \pm 0,15	2
	53,5 \pm 11,0	25,2 \pm 2,2	0,39 \pm 0,14	3
Humane Hb-Lösung 1	53,0 \pm 20,1	28,2 \pm 3,4	0,46 \pm 0,09	0
	49,2 \pm 18,6	28,0 \pm 2,7	0,41 \pm 0,11	1
	55,7 \pm 27,9	29,2 \pm 3,8	0,44 \pm 0,10	2
	55,6 \pm 26,5	29,3 \pm 3,7	0,35 \pm 0,05	3
Humane Hb-Lösung 2 (DCLHb [®])	62,2 \pm 14,7	26,1 \pm 1,1	0,35 \pm 0,11	0
	60,3 \pm 12,3	27,0 \pm 1,8	0,37 \pm 0,16	1
	57,7 \pm 16,0	27,2 \pm 1,8	0,42 \pm 0,23	2
	59,2 \pm 13,2	28,1 \pm 1,4	0,29 \pm 0,17	3
Humane Hb-Lösung 3	69,7 \pm 5,3	25,2 \pm 2,4	0,37 \pm 0,04	0
	71,8 \pm 15,2	24,6 \pm 1,5	0,33 \pm 0,14	1
	77,3 \pm 6,8	24,6 \pm 2,0	0,39 \pm 0,09	2
	74,2 \pm 4,0	26,7 \pm 3,3	0,34 \pm 0,10	3
Humane Hb-Lösung 4	65,8 \pm 5,8	26,4 \pm 1,4	0,37 \pm 0,11	0
	62,5 \pm 6,8	26,1 \pm 1,7	0,38 \pm 0,09	1
	65,0 \pm 8,4	26,6 \pm 2,3	0,44 \pm 0,07	2
	59,3 \pm 6,2	27,7 \pm 1,5	0,45 \pm 0,12	3
Humane Hb-Lösung 5	53,5 \pm 20,2	29,1 \pm 2,2	0,25 \pm 0,08	0
	53,3 \pm 21,2	29,8 \pm 3,4	0,29 \pm 0,16	1
	51,2 \pm 24,5	30,5 \pm 3,6	0,31 \pm 0,13	2
	54,3 \pm 25,0	30,9 \pm 2,8	0,34 \pm 0,18	3
Humane Hb-Lösung 6	62,0 \pm 14,1	32,1 \pm 2,2	0,27 \pm 0,15	0
	44,7 \pm 13,1	33,7 \pm 2,0	0,26 \pm 0,14	1
	55,0 \pm 9,2	35,1 \pm 1,5	0,22 \pm 0,10	2
	53,8 \pm 12,1	35,6 \pm 1,1	0,14 \pm 0,14	3
Humane Hb-Lösung 7	71,0 \pm 18,7	30,4 \pm 1,6	0,19 \pm 0,09	0
	64,7 \pm 8,5	31,5 \pm 3,0	0,21 \pm 0,13	1
	67,8 \pm 21,5	31,2 \pm 2,4	0,32 \pm 0,21	2
	64,0 \pm 28,1	31,7 \pm 0,5	0,34 \pm 0,17	3

Tab. 7: Mikrohämodynamik vor und nach hypervolämischer Infusion

	Nicht-Adhärente Leukozyten in Venolen [Zellen/ μ l]	Rollende Leukozyten in Venolen [Zellen/mm \cdot min]	Adhärente Leukozyten in Venolen [Zellen/mm 2]	Meß- zeitpunkt
NaCl	3.566 \pm 1.782	242 \pm 67	30 \pm 27	0
	2.693 \pm 1.099	197 \pm 99	35 \pm 43	1
	2.310 \pm 605	224 \pm 87	30 \pm 38	2
	3.170 \pm 1.543	188 \pm 93	53 \pm 32	3
Albumin	3.212 \pm 1.509	170 \pm 97	19 \pm 12	0
	2.372 \pm 1.488	215 \pm 78	31 \pm 30	1
	2.871 \pm 1.786	226 \pm 52	25 \pm 20	2
	3.054 \pm 1.639	225 \pm 63	20 \pm 17	3
Bovine Hb-Lösung F-1	2.291 \pm 482	427 \pm 190	14 \pm 13	0
	2.707 \pm 931	404 \pm 82	5 \pm 5	1
	1.978 \pm 722	405 \pm 116	4 \pm 4	2
	2.434 \pm 1.076	229 \pm 76	5 \pm 5	3
Bovine Hb-Lösung 038	1.301 \pm 813	110 \pm 15	26 \pm 12	0
	1.259 \pm 468	187 \pm 110	47 \pm 40	1
	1.344 \pm 532	148 \pm 51	63 \pm 57	2
	1.311 \pm 396	158 \pm 65	35 \pm 16	3
Bovine Hb-Lösung 1	2.328 \pm 651	138 \pm 69	11 \pm 12	0
	2.569 \pm 881	141 \pm 54	16 \pm 13	1
	2.046 \pm 980	90 \pm 49	24 \pm 23	2
	1.701 \pm 979	68 \pm 30	21 \pm 17	3
Bovine Hb-Lösung 2 (U-PBHb [®])	3.075 \pm 1.434	298 \pm 123	22 \pm 16	0
	4.199 \pm 2.566	212 \pm 106	10 \pm 13	1
	3.345 \pm 1.646	260 \pm 115	14 \pm 14	2
	3.063 \pm 1.377	258 \pm 107	11 \pm 11	3
Humane Hb-Lösung 1	1.924 \pm 844	225 \pm 52	27 \pm 12	0
	2.411 \pm 477	228 \pm 92	55 \pm 15	1
	1.601 \pm 493	217 \pm 60	41 \pm 21	2
	1.903 \pm 189	223 \pm 73	47 \pm 22	3
Humane Hb-Lösung 2 (DCLHb [®])	2.279 \pm 817	233 \pm 65	32 \pm 20	0
	2.220 \pm 787	225 \pm 43	36 \pm 24	1
	3.277 \pm 1.611	241 \pm 56	24 \pm 15	2
	3.301 \pm 1.045	201 \pm 72	24 \pm 18	3
Humane Hb-Lösung 3	1.640 \pm 674	210 \pm 81	49 \pm 12	0
	1.647 \pm 640	207 \pm 117	61 \pm 27	1
	1.107 \pm 503	205 \pm 68	79 \pm 42	2
	1.386 \pm 579	154 \pm 78	58 \pm 8	3
Humane Hb-Lösung 4	1.432 \pm 60	193 \pm 63	16 \pm 10	0
	1.426 \pm 523	180 \pm 57	26 \pm 18	1
	1.939 \pm 430	225 \pm 51	15 \pm 11	2
	1.659 \pm 51	210 \pm 41	15 \pm 12	3
Humane Hb-Lösung 5	1.542 \pm 590	185 \pm 20	14 \pm 7	0
	1.206 \pm 641	190 \pm 57	45 \pm 35	1
	1.656 \pm 537	266 \pm 59	58 \pm 36	2
	1.296 \pm 256	277 \pm 100	36 \pm 23	3
Humane Hb-Lösung 6	1.150 \pm 330	136 \pm 56	13 \pm 5	0
	967 \pm 107	192 \pm 97	20 \pm 9	1
	1.261 \pm 225	244 \pm 132	30 \pm 11	2
	1.704 \pm 297	221 \pm 92	34 \pm 8	3
Humane Hb-Lösung 7	4.234 \pm 3.337	158 \pm 81	21 \pm 7	0
	3.415 \pm 2.787	140 \pm 106	22 \pm 8	1
	2.539 \pm 1.010	164 \pm 108	24 \pm 2	2
	2.038 \pm 420	164 \pm 69	34 \pm 13	3

Tab. 8: Leukozyten/Endothel-Interaktion vor und nach hypervolämischer Infusion

	Extravasation in Arteriolen	Extravasation in Venolen	Funktionelle Kapillardichte [cm/cm ²]	Meß- zeitpunkt
NaCl	0,32 ± 0,07	0,39 ± 0,09	132 ± 39	0
	0,27 ± 0,07	0,46 ± 0,14	133 ± 42	1
	0,27 ± 0,10	0,42 ± 0,08	136 ± 33	2
	0,34 ± 0,09	0,45 ± 0,11	129 ± 33	3
Albumin	0,45 ± 0,12	0,52 ± 0,07	127 ± 29	0
	0,39 ± 0,09	0,48 ± 0,06	130 ± 33	1
	0,44 ± 0,14	0,52 ± 0,08	143 ± 16	2
	0,45 ± 0,14	0,55 ± 0,09	134 ± 25	3
Bovine Hb-Lösung F-1	0,47 ± 0,05	0,54 ± 0,09	115 ± 29	0
	0,41 ± 0,05	0,52 ± 0,08	117 ± 24	1
	0,45 ± 0,03	0,51 ± 0,08	127 ± 26	2
	0,47 ± 0,05	0,53 ± 0,07	119 ± 16	3
Bovine Hb-Lösung 038	0,39 ± 0,02	0,54 ± 0,03	98 ± 10	0
	0,42 ± 0,07	0,51 ± 0,04	97 ± 17	1
	0,40 ± 0,03	0,51 ± 0,03	108 ± 4	2
	0,39 ± 0,04	0,54 ± 0,00	105 ± 9	3
Bovine Hb-Lösung 1	0,27 ± 0,09	0,30 ± 0,12	114 ± 17	0
	0,27 ± 0,17	0,27 ± 0,07	111 ± 18	1
	0,25 ± 0,10	0,31 ± 0,09	112 ± 24	2
	0,28 ± 0,13	0,30 ± 0,08	108 ± 27	3
Bovine Hb-Lösung 2 (U-PBHb [®])	0,45 ± 0,11	0,55 ± 0,06	142 ± 19	0
	0,44 ± 0,11	0,56 ± 0,05	141 ± 21	1
	0,46 ± 0,14	0,59 ± 0,06	144 ± 31	2
	0,50 ± 0,09	0,59 ± 0,05	144 ± 26	3
Humane Hb-Lösung 1	0,57 ± 0,13	0,56 ± 0,05	125 ± 36	0
	0,56 ± 0,16	0,57 ± 0,08	118 ± 41	1
	0,59 ± 0,10	0,55 ± 0,09	128 ± 37	2
	0,57 ± 0,04	0,58 ± 0,08	145 ± 34	3
Humane Hb-Lösung 2 (DCLHb [®])	0,53 ± 0,09	0,59 ± 0,11	135 ± 15	0
	0,51 ± 0,08	0,58 ± 0,08	132 ± 19	1
	0,57 ± 0,09	0,62 ± 0,07	144 ± 19	2
	0,57 ± 0,11	0,65 ± 0,09	137 ± 15	3
Humane Hb-Lösung 3	0,51 ± 0,08	0,68 ± 0,10	103 ± 9	0
	0,47 ± 0,07	0,66 ± 0,10	91 ± 15	1
	0,49 ± 0,08	0,69 ± 0,10	82 ± 26	2
	0,48 ± 0,08	0,69 ± 0,11	98 ± 0	3
Humane Hb-Lösung 4	0,40 ± 0,07	0,57 ± 0,04	123 ± 42	0
	0,39 ± 0,09	0,58 ± 0,07	91 ± 54	1
	0,45 ± 0,13	0,58 ± 0,06	96 ± 36	2
	0,52 ± 0,14	0,59 ± 0,06	109 ± 45	3
Humane Hb-Lösung 5	0,48 ± 0,04	0,57 ± 0,05	150 ± 4	0
	0,43 ± 0,06	0,54 ± 0,04	144 ± 5	1
	0,50 ± 0,07	0,56 ± 0,07	139 ± 11	2
	0,53 ± 0,13	0,62 ± 0,13	146 ± 2	3
Humane Hb-Lösung 6	0,30 ± 0,04	0,41 ± 0,03	113 ± 29	0
	0,32 ± 0,05	0,40 ± 0,02	112 ± 22	1
	0,32 ± 0,04	0,42 ± 0,01	108 ± 24	2
	0,31 ± 0,05	0,41 ± 0,01	96 ± 24	3
Humane Hb-Lösung 7	0,39 ± 0,04	0,44 ± 0,12	128 ± 5	0
	0,39 ± 0,04	0,41 ± 0,10	121 ± 6	1
	0,41 ± 0,07	0,43 ± 0,11	101 ± 7	2
	0,41 ± 0,05	0,44 ± 0,12	121 ± 5	3

Tab. 9: Mikrovaskuläre Permeabilität und Funktionelle Kapillardichte vor und nach hypervolämischer Infusion

4.1.1 Mikrohämodynamik

Der Durchmesser der präkapillären Arteriolen und postkapillären Venolen (Abb. 11) wurde bei den Tieren vor und nach hypervolämischer Infusion der beschriebenen Lösungen zu den angegebenen Zeitpunkten gemessen.

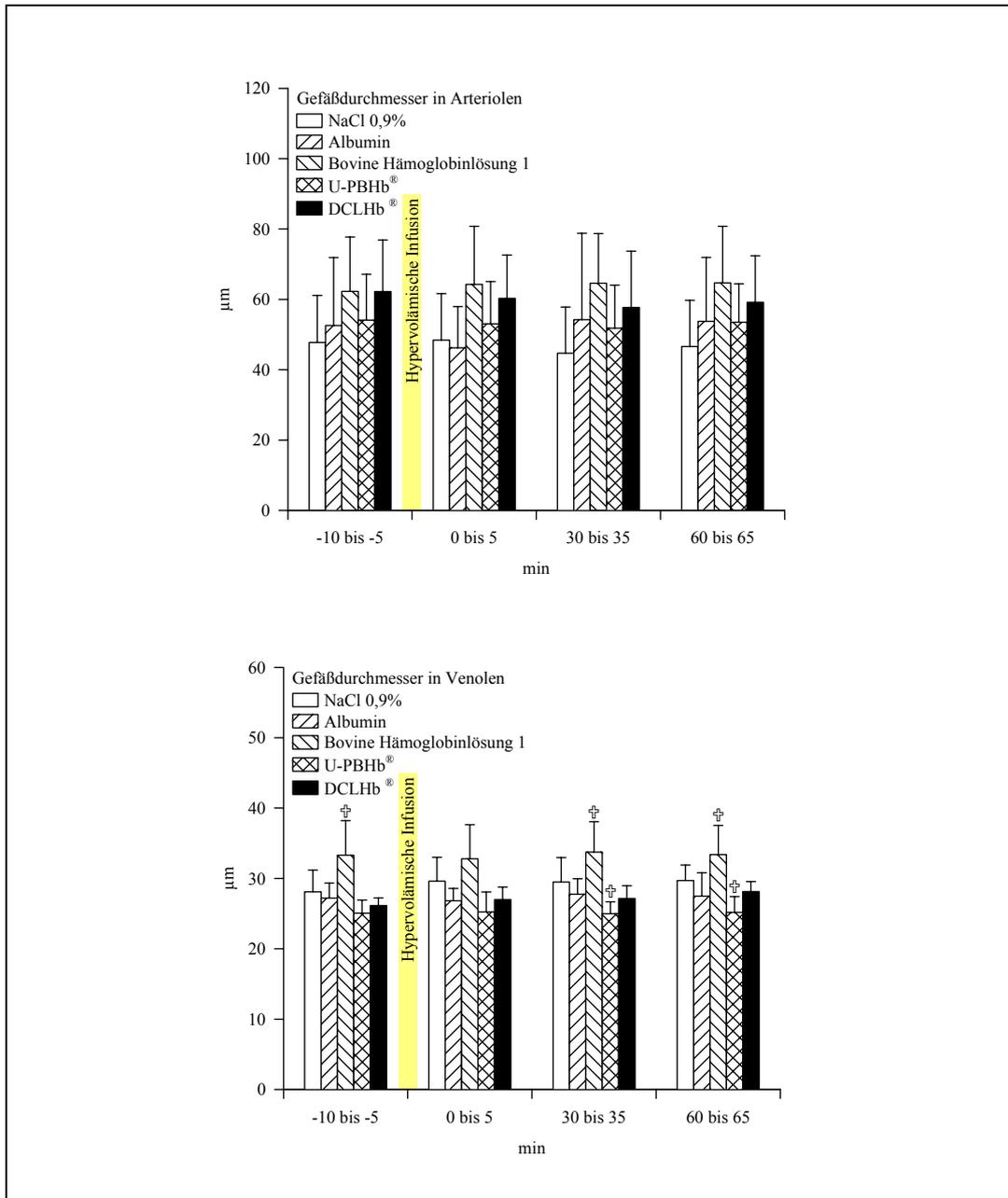


Abb. 11: Mikrohämodynamik I vor und nach hypervolämischer Infusion
Mittelwert \pm Standardabweichung.

\ddagger $p < 0,05$ vs. NaCl 0,9 %: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse
und Student-Newman-Keul-Test

Die hypervolämische Infusion der dargestellten Lösungen führte bei keiner der dargestellten Gruppen zu irgendeinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Änderung des arteriolen Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Ausgangswert, überzufällige Unterschiede der

Gruppen der mit Boviner Hämoglobinlösung 1, U-PBHb[®] oder DCLHb[®] behandelten Tiere zu den Gruppen der mit physiologischer Kochsalzlösung oder Albumin behandelten Tiere konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Bei der Messung des venolären Gefäßdurchmessers (Abb. 11) fällt die Gruppe der Tiere, die Bovine Hämoglobinlösung 1 erhalten sollten, schon vor Applikation der Lösung gegenüber der Gruppe jener Tiere, die mit physiologischer Kochsalzlösung infundiert werden sollten, durch einen überzufällig größeren venolären Gefäßdurchmesser auf. Dieser Unterschied findet sich 30 und 60 Minuten nach der hypervolämischen Infusion der Lösungen wieder. Eine signifikante Veränderung des venolären Gefäßdurchmessers gegenüber dem Ausgangswert infolge hypervolämischer Infusion wurde bei keiner der beschriebenen Lösungen beobachtet. Insgesamt fällt jedoch außer bei jenen Tieren, die mit U-PBHb[®] infundiert wurden, eine tendenzielle Größenzunahme im Zeitverlauf auf. Hieraus erklärt sich auch der signifikante Unterschied der mit U-PBHb[®] behandelten Tiere gegenüber den mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tieren 30 und 60 Minuten nach hypervolämischer Infusion.

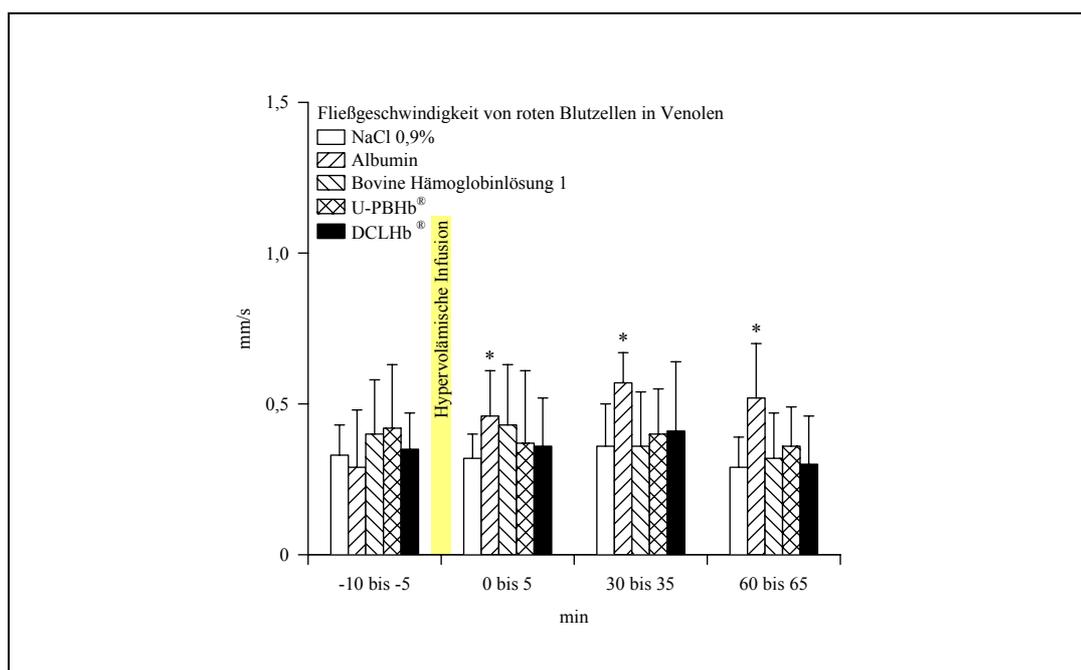


Abb. 12: Mikrohäodynamik II vor und nach hypervolämischer Infusion
Mittelwert \pm Standardabweichung.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test

Die Geschwindigkeit der frei in postkapillären Venolen fließenden roten Blutzellen (Abb. 12) war nach hypervolämischer Infusion von Albumin zu allen Zeitpunkten gegenüber dem Ausgangswert signifikant erhöht, die Applikation der anderen beschriebenen Lösungen führte zu keiner signifikanten Änderung gegenüber dem Ausgangswert. Zu den jeweiligen Meßzeitpunkten konnte allerdings kein überzufälliger Unterschied in der Geschwindigkeit der

frei in postkapillären Venolen fließenden roten Blutzellen in den Gruppen der mit Boviner Hämoglobinlösung 1, U-PBHb[®] oder DCLHb[®] behandelten Tiere zu der in den Gruppen der mit physiologischer Kochsalzlösung oder Albumin behandelten Tiere beobachtet werden.

4.1.2 Leukozyten/Endothel-Interaktion

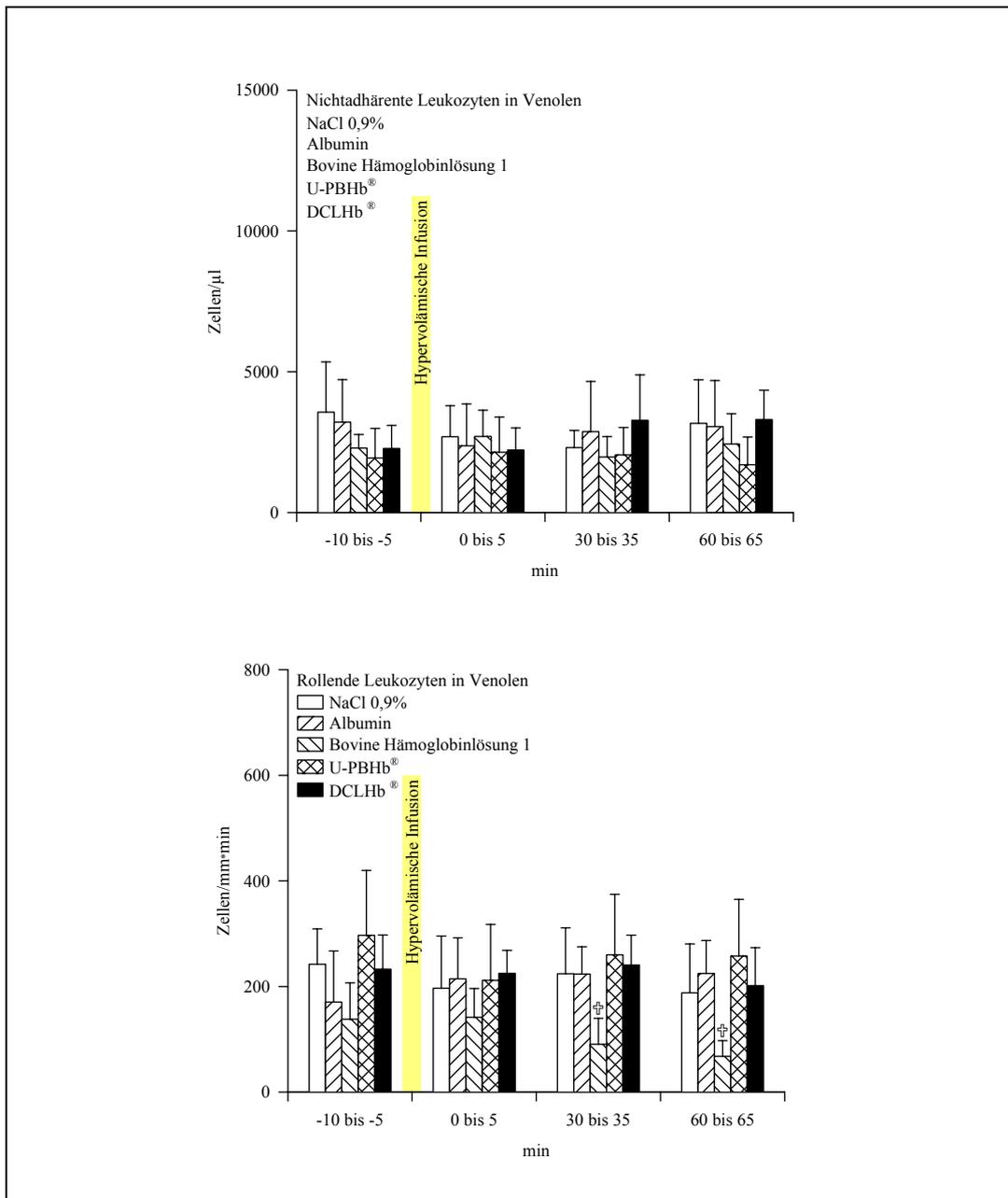


Abb. 13: Leukozyten/Endothel-Interaktion I vor und nach hypervolämischer Infusion
Mittelwert \pm Standardabweichung.

† $p < 0,05$ vs. NaCl 0,9 %: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse
und Student-Newman-Keul-Test

Die Anzahl der frei im Blutstrom der postkapillären Venolen fließenden Leukozyten in Bezug auf das die Gefäße durchströmende Blutvolumen (Abb. 13) wurde bei keiner der dargestellten Gruppen durch die hypervolämische Infusion zu irgendeinem Zeitpunkt signifikant gegenüber

dem Ausgangswert verändert, überzufällige Unterschiede der Gruppen der mit Boviner Hämoglobinlösung 1, U-PBHb[®] oder DCLHb[®] behandelten Tiere zu den Gruppen der mit physiologischer Kochsalzlösung oder Albumin behandelten Tiere konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Die Anzahl der eine virtuelle Lichtschranke passierenden rollenden Leukozyten (Abb. 13) erfuhr durch die hypervolämische Infusion der dargestellten Lösungen im Vergleich zum Ausgangswert keine überzufällige Änderung, jedoch war ihre Zahl 30 und 60 Minuten nach der Applikation von Boviner Hämoglobinlösung 1 signifikant geringer als nach Applikation von physiologischer Kochsalzlösung.

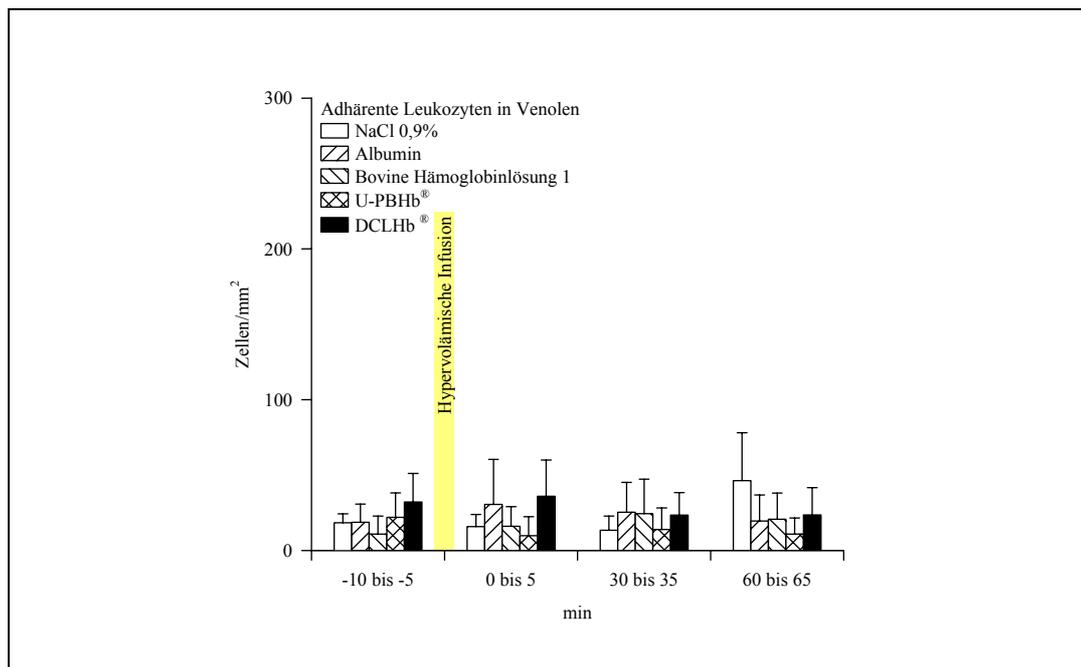


Abb. 14: Leukozyten/Endothel-Interaktion II vor und nach hypervolämischer Infusion
Mittelwert \pm Standardabweichung.

Auf die Anzahl der am Gefäßendothel der postkapillären Venolen adhärenz Leukozyten in Bezug auf die Gefäßinnenfläche (Abb. 14) hatte die hypervolämische Infusion bei keiner der dargestellten Gruppen im Vergleich zum Ausgangswert einen signifikanten Einfluß, überzufällige Unterschiede der Gruppen der mit Boviner Hämoglobinlösung 1, U-PBHb[®] oder DCLHb[®] behandelten Tiere zu den Gruppen der mit physiologischer Kochsalzlösung oder Albumin behandelten Tiere konnten auch hier nicht beobachtet werden.

4.1.3 Mikrovaskuläre Permeabilität

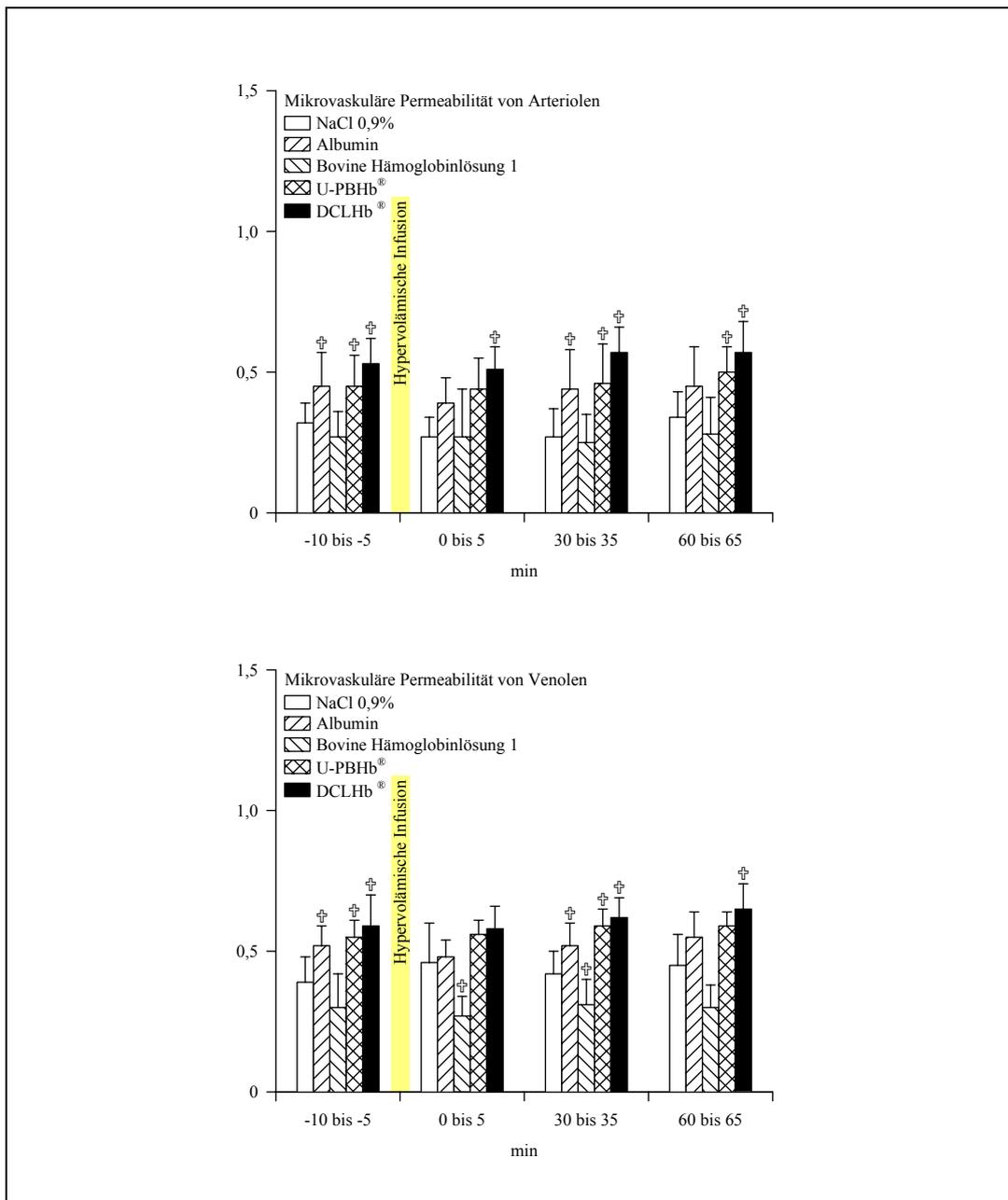


Abb. 15: Mikrovaskuläre Permeabilität vor und nach hypervolämischer Infusion
Mittelwert \pm Standardabweichung.
 \ddagger $p < 0,05$ vs. NaCl 0,9 %: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse
und Student-Newman-Keul-Test

Bei der Messung der Fluoreszenzintensität außerhalb des Gefäßbettes bezogen auf die Fluoreszenzintensität innerhalb des Gefäßbettes als Maß der mikrovaskulären Permeabilität (Abb. 15) fallen außer der Gruppe der Tiere, die Bovine Hämoglobinlösung 1 erhalten sollten, die Tiere, die mit allen anderen dargestellten Lösungen (Albumin, U-PBHb® und DCLHb®) behandelt werden sollten, schon vor Applikation der Lösung gegenüber der Gruppe jener Tiere, die mit physiologischer Kochsalzlösung infundiert werden sollten, durch einen signifikant höhere mikrovaskuläre Permeabilität in Arteriolen und Venolen auf. In den

beobachteten Arteriolen bleiben diese Unterschiede nach hypervolämischer Infusion tendenziell bestehen, wobei der Unterschied zur Gruppe der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tieren 30 Minuten nach Applikation bei den mit Albumin, U-PBHb[®] und DCLHb[®] behandelten Tieren erneut signifikant war. Unmittelbar nach hypervolämischer Infusion war dies lediglich bei der Gruppe der mit DCLHb[®] behandelte Tieren, 60 Minuten nach Applikation war dies bei den Gruppen der mit U-PBHb[®] oder DCLHb[®] behandelten Tiere der Fall. Zu keinem Zeitpunkt nach hypervolämischer Infusion konnte jedoch in einer der dargestellten Gruppe eine überzufällige Änderung der arteriolen mikrovaskulären Permeabilität im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden. Auch in den beobachteten Venolen blieben die Unterschiede in der mikrovaskulären Permeabilität nach hypervolämischer Infusion tendenziell bestehen, wobei der Unterschied zur Gruppe der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Tieren 30 Minuten nach Applikation bei allen anderen Gruppen signifikant war. Unmittelbar nach hypervolämischer Infusion war dies lediglich bei der Gruppe der mit Boviner Hämoglobinlösung 1 behandelten Tiere, 60 Minuten nach Applikation nur bei der Gruppe der mit DCLHb[®] behandelten Tieren der Fall. Zu keinem Zeitpunkt nach hypervolämischer Infusion konnte jedoch in einer der dargestellten Gruppe eine signifikante Änderung der venolären mikrovaskulären Permeabilität im Vergleich zum Ausgangswert beobachtet werden.

4.1.4 Funktionelle Kapillardichte

Auf die als Länge der perfundierten Kapillaren pro Fläche angegebene funktionelle Kapillardichte (Abb. 16) hatte die hypervolämische Infusion aller dargestellten Lösungen im Vergleich zum Ausgangswert zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluß, signifikante Unterschiede der Gruppen der mit Boviner Hämoglobinlösung 1, U-PBHb[®] oder DCLHb[®] behandelten Tiere zu den Gruppen der mit physiologischer Kochsalzlösung oder Albumin behandelten Tiere konnten ebenfalls nicht beobachtet werden.

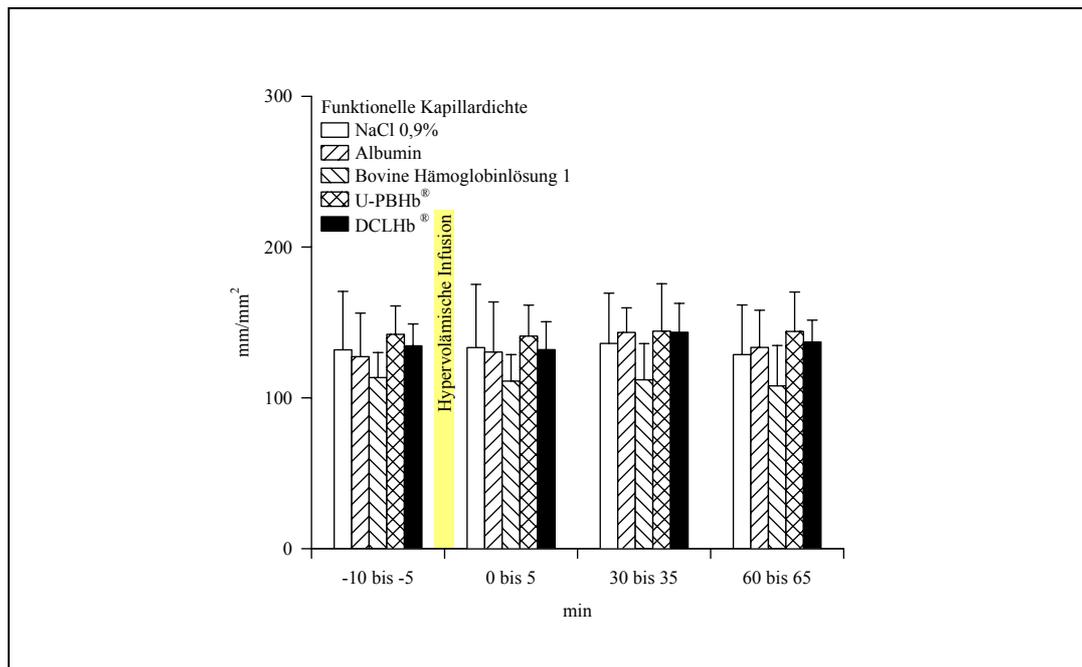


Abb. 16: Funktionelle Kapillardichte vor und nach hypervolämischer Infusion
Mittelwert ± Standardabweichung.

4.2 Isovolumische Hämodilution

In den Abbildungen 17 bis 23 sind die Lösungen, die dem Protokoll der isovolämischen Hämodilution unterzogen wurden, im Vergleich mit Dextran 60 als Mittelwert \pm Standard-Abweichung dargestellt. Die Parameter wurden zu folgenden Meßzeitpunkten erhoben:

- unmittelbar vor isovolämischer Hämodilution
- 0 Minuten nach isovolämischer Hämodilution
- 30 Minuten nach isovolämischer Hämodilution
- 60 Minuten nach isovolämischer Hämodilution

4.2.1 Makrohämodynamik

Der Hämatokrit (Abb. 17) der Tiere aller Gruppen wurde durch die isovolämische Hämodilution auf 51 bis 60 % der Ausgangswerte signifikant gesenkt. Auch 60 Minuten nach isovolämischer Hämodilution wurde weiterhin ein im Vergleich zu den Ausgangswerten signifikant geringerer Hämatokrit (55 bis 65 % der Ausgangswerte) gemessen. Ein überzufälliger Unterschied der Gruppen der mit den Hämoglobinlösungen behandelten Tiere zur Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) beträgt beim Syrischen Goldhamster ca. 100 mmHg, aus technischen Gründen wurde er bei der Versuchsdurchführung erst nach der isovolämischen Hämodilution sowie nur bei den mit Dextran 60, U-PBHb[®] und DCLHb[®] behandelten Tieren gemessen. Unmittelbar nach isovolämischer Hämodilution konnte beim MAP (Abb. 17) kein überzufälliger Unterschied der Gruppen der mit den Hämoglobinlösungen behandelten Tiere zur Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere beobachtet werden, während 30 Minuten nach isovolämischer Hämodilution ein signifikanter Anstieg des MAP in den Gruppen der mit den Hämoglobinlösungen diluierten Tiere über den MAP der Gruppe der mit Dextran 60 diluierten Tiere auffiel. Bei der Gruppe der mit DCLHb[®] behandelten Tiere konnte dieser Effekt auch 60 Minuten nach isovolämischer Hämodilution noch beobachtet werden.

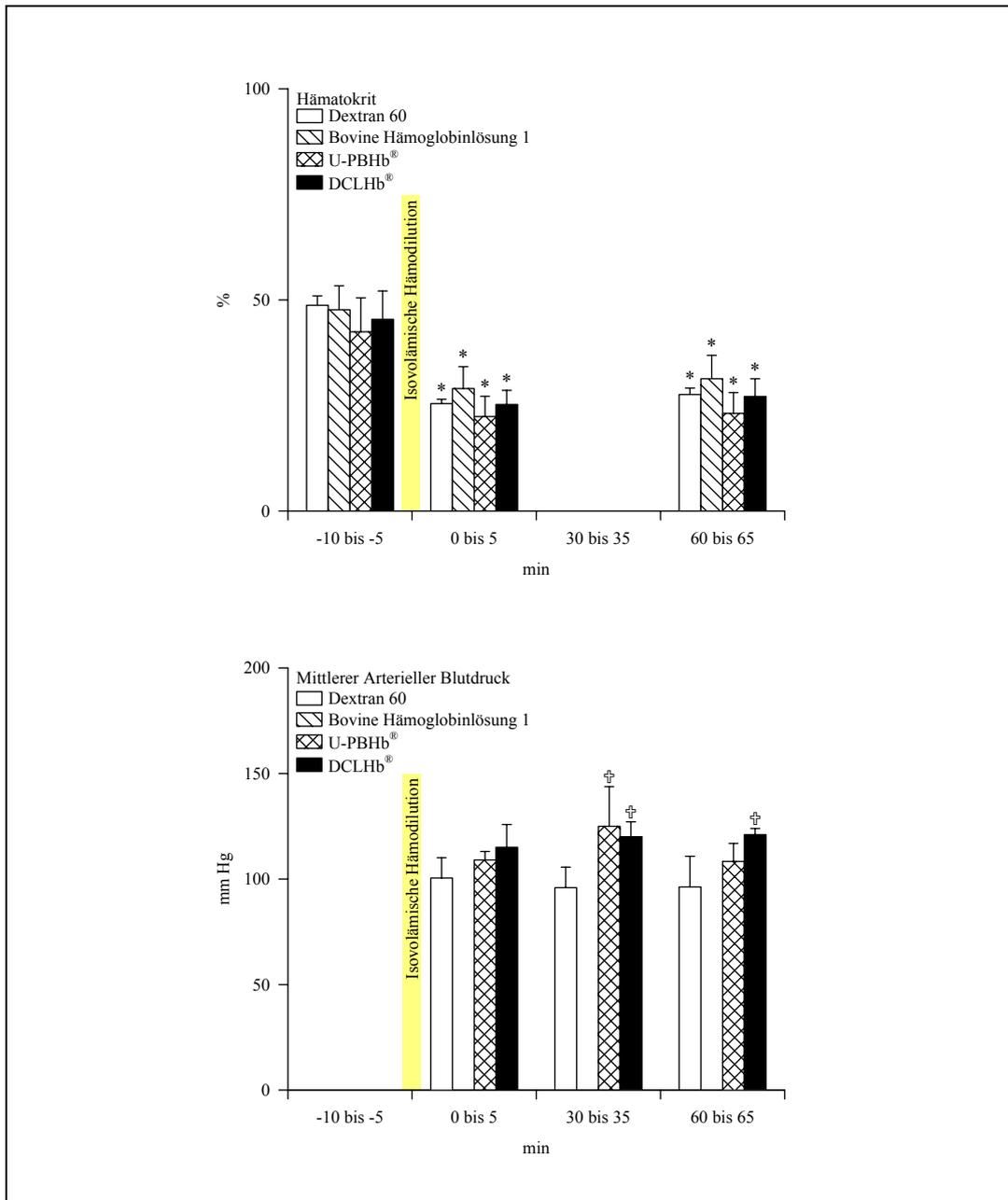


Abb. 17: Makrohämodynamik vor und nach isovolämischer Hämodilution, Mittelwert \pm Standardabweichung.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test

‡ $p < 0,05$ vs. Dextran 60: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse und Student-Newman-Keul-Test

4.2.2 Mikrohämodynamik

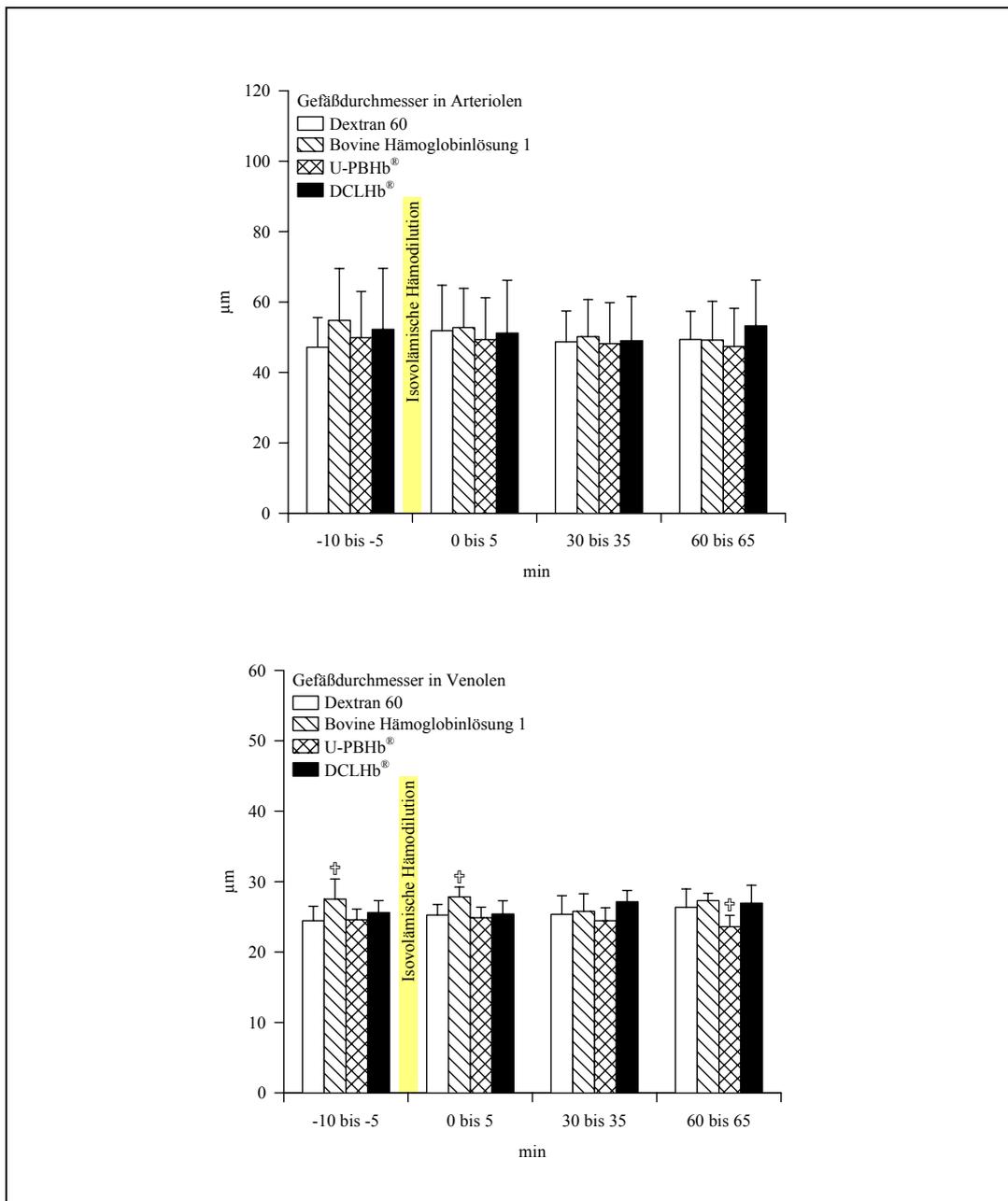


Abb. 18: Mikrohämodynamik I vor und nach isovolämischer Hämodilution
Mittelwert \pm Standardabweichung.

‡ $p < 0,05$ vs. Dextran 60: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse
und Student-Newman-Keul-Test

Nach isovolämischer Hämodilution kam es unabhängig davon, ob die Tiere der einzelnen Gruppen mit Dextran 60 oder einer der Hämoglobinlösungen (Bovine Hämoglobinlösung 1, U-PBHb® oder DCLHb®) behandelt worden waren, zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Änderung der arteriolen Gefäßdurchmesser (Abb. 18) im Vergleich zum Ausgangswert. Überzufällige Unterschiede der Gruppen der mit den untersuchten Hämoglobinlösung behandelten Tiere zu der Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere konnten ebenfalls nicht beobachtet werden. Auch bei den venolären Gefäßdurchmessern

(Abb. 18) kam es nach isovolämischer Hämodilution unabhängig davon, ob die Tiere der einzelnen Gruppen mit Dextran 60 oder einer der Hämoglobinlösungen behandelt worden waren, zu keinem Zeitpunkt zu einer signifikanten Änderung. Allerdings lag der durchschnittliche venoläre Gefäßdurchmesser der Tiere, die mit Boviner Hämoglobinlösung 1 diluiert werden sollten, unter Ausgangsbedingungen um 16 % (signifikant) über dem durchschnittlichen venoläre Gefäßdurchmesser jener Tiere, welche mit Dextran 60 diluiert werden sollten. Unmittelbar nach isovolämischer Hämodilution konnte dieser signifikante Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen noch beobachtet werden, 30 und 60 Minuten nach isovolämischer Hämodilution bestand er nicht mehr. Der durchschnittliche venoläre Gefäßdurchmesser stieg 60 Minuten nach isovolämischer Hämodilution mit Dextran 60 um 8 % über den Ausgangswert an, während er bei den mit U-PBHb[®] behandelten Tieren um 4 % unter den Ausgangswert abfiel, so daß für diesen Zeitpunkt ein überzufälliger Unterschied zwischen diesen beiden Gruppen resultiert. Zu keinem Zeitpunkt nach isovolämischer Hämodilution kam es zu einer signifikanten Veränderung der Geschwindigkeit der roten Blutzellen in Venolen (Abb. 19) im Vergleich zum Ausgangswert in einer der untersuchten Gruppen. Überzufällige Unterschiede der Gruppen der mit den untersuchten Hämoglobinlösung behandelten Tiere zu der Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere konnten ebenfalls nicht beobachtet werden.

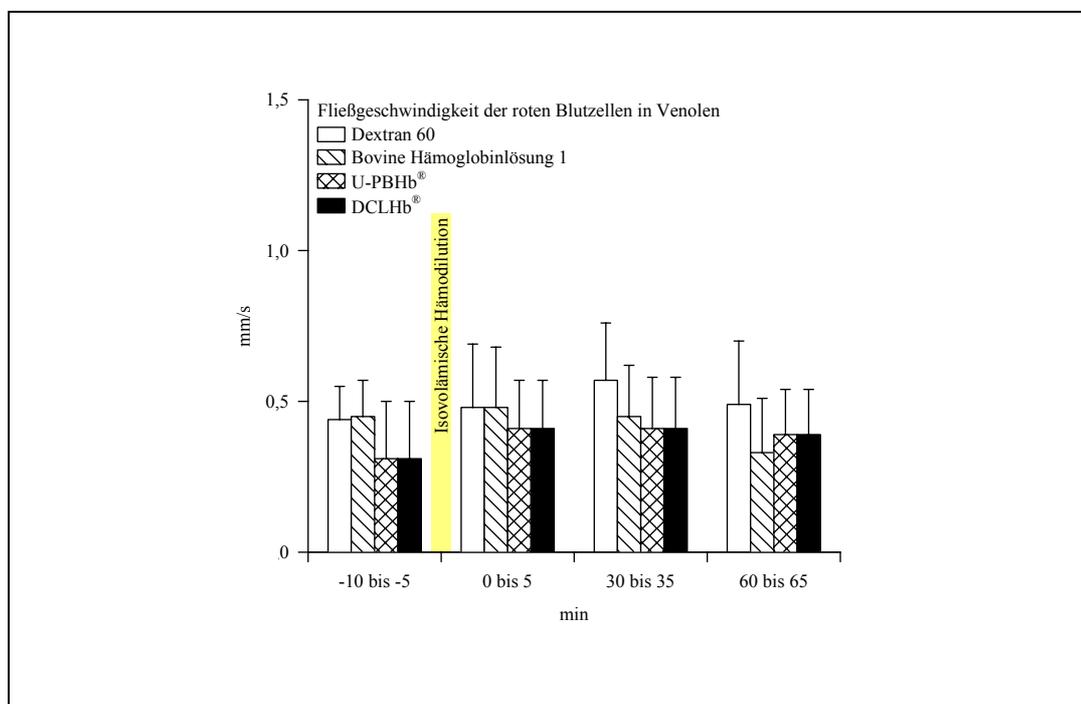


Abb. 19: Mikrohämodynamik II vor und nach isovolämischer Hämodilution, Mittelwert \pm Standardabweichung.

4.2.3 Leukozyten/Endothel-Interaktion

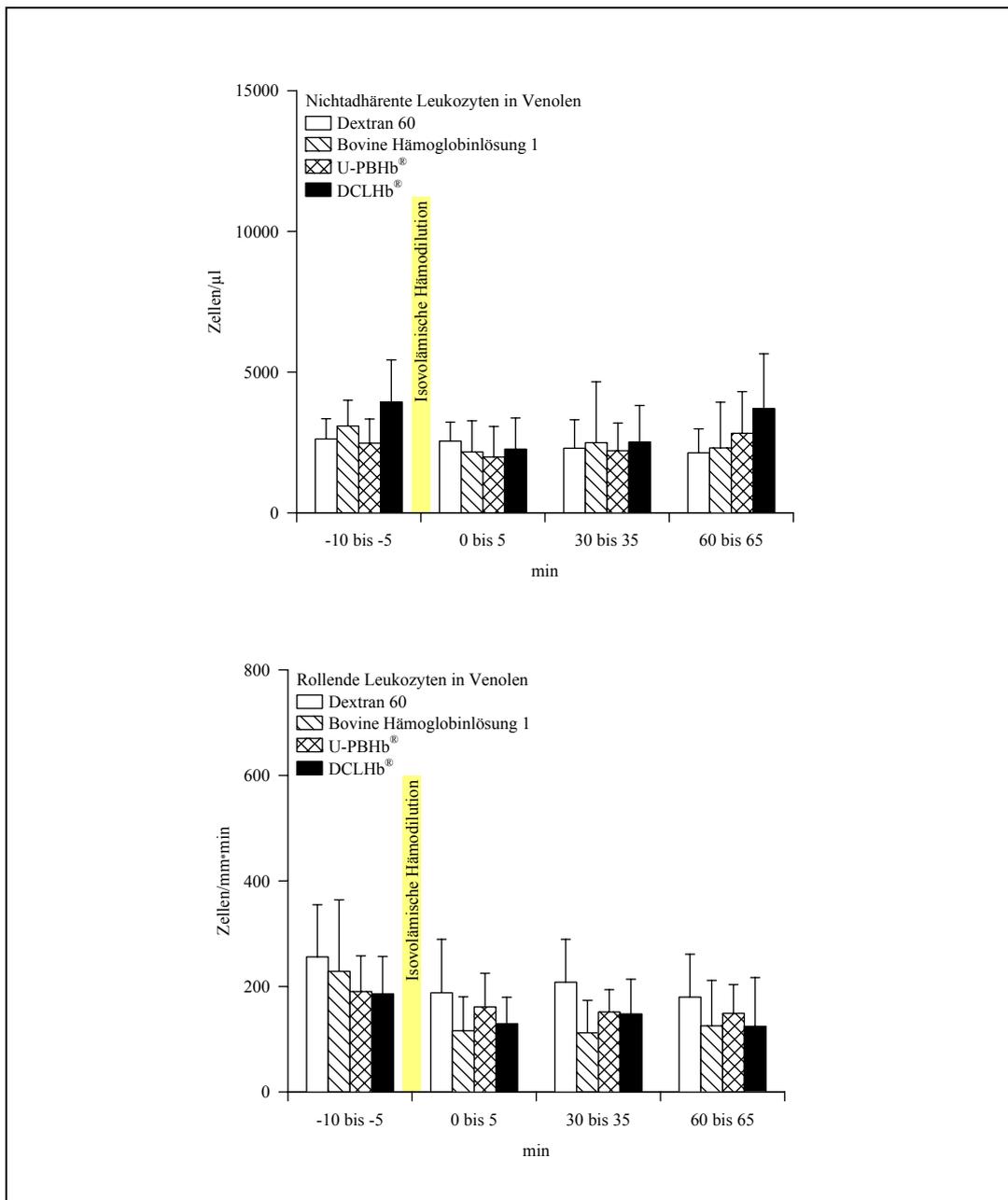


Abb. 20: Leukozyten/Endothel-Interaktion I vor und nach isovolumämischer Hämodilution, Mittelwert \pm Standardabweichung.

Bei der Anzahl der frei im Blutstrom der postkapillären Venolen fließenden Leukozyten in Bezug auf das die Gefäße durchströmende Blutvolumen (Abb. 20) kam es im Vergleich zum Ausgangswert bei keiner der untersuchten Gruppen zu einer signifikanten Veränderung. Zu keinem Zeitpunkt konnte außerdem ein signifikanter Unterschied der Gruppen der mit den Hämoglobinlösungen diluierten Tiere zur Gruppe der mit Dextran 60 diluierten Tiere beobachtet werden. Bei der durchschnittlichen Anzahl der am Gefäßendothel entlangrollenden Leukozyten (Abb. 20) wurde ebensowenig ein Effekt beobachtet wie bei den frei im Blutstrom der postkapillären Venolen fließenden Leukozyten. Auf die Anzahl der am Gefäß-

endothel der postkapillären Venolen adhären Leukozyten in Bezug auf die Gefäßinnenfläche (Abb. 21) hatte die isovolämische Hämodilution mit Dextran 60 U-PBHb[®] oder DCLHb[®] im Vergleich zum Ausgangswert zu keinem Zeitpunkt einen signifikanten Einfluß, während ihre durchschnittliche Anzahl in der Gruppe der mit Boviner Hämoglobinlösung 1 diluierten Tiere 30 bzw. 60 Minuten nach der Behandlung signifikant anstieg. Berücksichtigt werden muß jedoch, daß die Anzahl der am Gefäßendothel der postkapillären Venolen adhären Leukozyten in Bezug auf die Gefäßinnenfläche in den Gruppen der Tiere, die mit Boviner Hämoglobinlösung 1 oder mit DCLHb[®] diluiert werden sollten, unter Ausgangsbedingungen überzufällig geringer war als die in der Gruppe der Tiere, die mit Dextran 60 diluiert werden sollten. Nach der isovolämischen Hämodilution konnten keine Unterschiede mehr zwischen den Gruppen der mit den Hämoglobinlösungen behandelten Tiere und der Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere beobachtet werden.

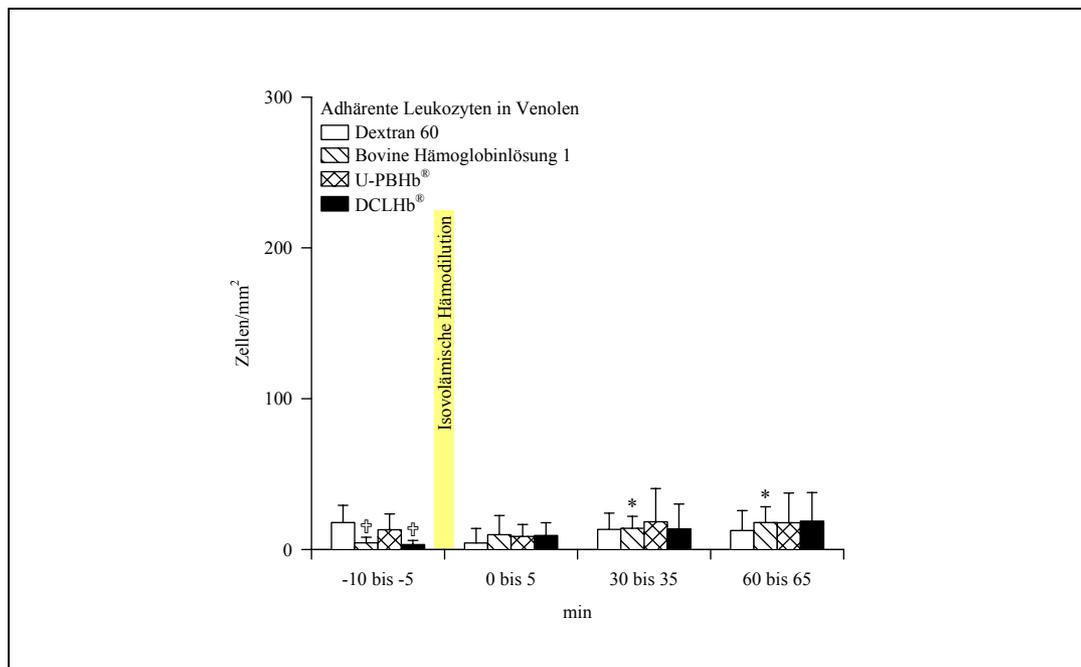


Abb. 21: Leukozyten/Endothel-Interaktion II vor und nach isovolämischer Hämodilution
Mittelwert \pm Standardabweichung.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test
† $p < 0,05$ vs. Dextran 60: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse und Student-Newman-Keul-Test

4.2.4 Mikrovaskuläre Permeabilität

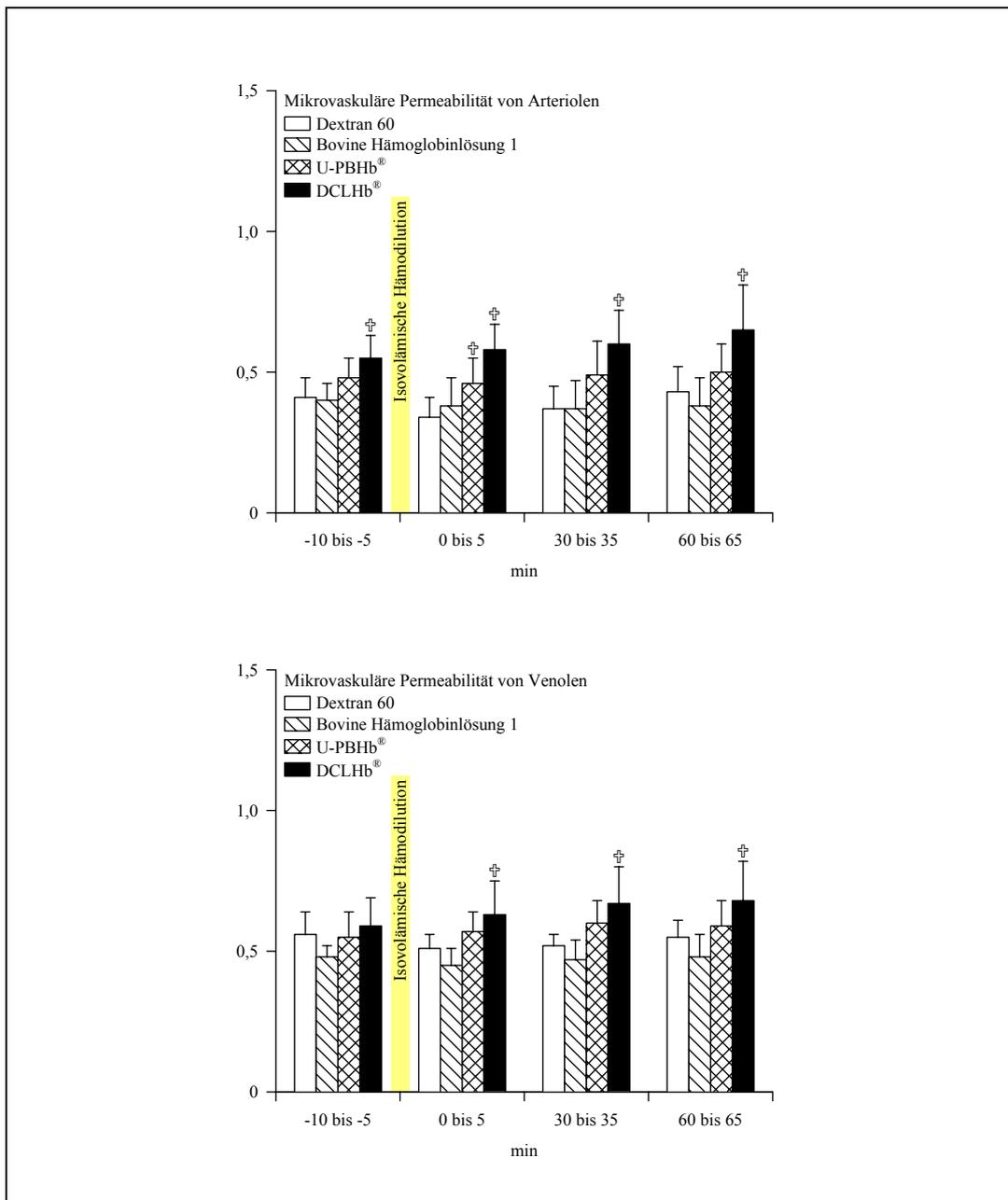


Abb. 22: Mikrovaskuläre Permeabilität vor und nach isovolämischer Hämodilution
Mittelwert \pm Standardabweichung.

Bei der Messung der Fluoreszenzintensität außerhalb des Gefäßbettes bezogen auf die Fluoreszenzintensität innerhalb des Gefäßbettes als Maß der mikrovaskulären Permeabilität (Abb. 22) fällt die Gruppe der Tiere, die mit DCLHb® diluiert werden sollten, gegenüber der Gruppe der Tiere, die mit Dextran 60 diluiert werden sollten, schon vor isovolämischer Hämodilution durch eine überzufällig höhere mikrovaskuläre Permeabilität in Arteriolen auf. Dieser Unterschied bleibt nach isovolämischer Hämodilution bestehen und konnte auch in Venolen zu allen Zeitpunkt nach der Behandlung beobachtet werden. Zudem fiel die Gruppe der mit U-PBHb® Tiere behandelten Tiere unmittelbar nach isovolämischer Hämodilution

durch eine im Vergleich zur Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere durch eine signifikant höhere mikrovaskuläre Permeabilität auf. In allen beobachteten Gruppen kam es zu keinem Zeitpunkt nach isovolämischer Hämodilution sowohl bei Arteriolen als auch bei Venolen zu einer signifikanten Veränderung der mikrovaskulären Permeabilität im Vergleich zum Ausgangswert. Eine höhere Fluoreszenzintensität außerhalb des Gefäßbettes als innerhalb des Gefäßbettes (Werte $> 1,00$) wurde zu keinem Zeitpunkt beobachtet (Minimum: 0,34, Maximum: 0,68).

4.2.5 Funktionelle Kapillardichte

Vor und nach isovolämischer Hämodilution konnten keine signifikanten Unterschiede in der als Länge der perfundierten Kapillaren pro Fläche angegebenen funktionellen Kapillardichte (Abb. 23) bei den Gruppen der mit den Hämoglobinlösungen behandelten Tiere im Vergleich zur Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere beobachtet werden. Allerdings fällt die Gruppe der mit U-PBHb[®] behandelten Tiere zu allen Zeitpunkten nach isovolämischer Hämodilution durch eine im Vergleich zum Ausgangswert signifikant geringere funktionelle Kapillardichte (70 bis 77 % des Ausgangswertes) auf. Für die mit Dextran 60, U-PBHb[®] oder DCLHb[®] behandelten Tiere wurde zudem als Maß der Homogenität der kapillären Perfusion die Varianz der funktionellen Kapillardichte bestimmt: die Gruppe der mit U-PBHb[®] behandelten Tiere fiel zu allen Zeitpunkten nach isovolämischer Hämodilution durch eine im Vergleich zum Ausgangswert überzufällig erhöhte Varianz der funktionellen Kapillardichte (62 bis 85 % über dem Ausgangswert) auf. Bei den Gruppen der mit den Hämoglobinlösungen behandelten Tiere wurde nur unmittelbar nach isovolämischer Hämodilution mit DCLHb[®] ein signifikanter Unterschied zur Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere beobachtet.

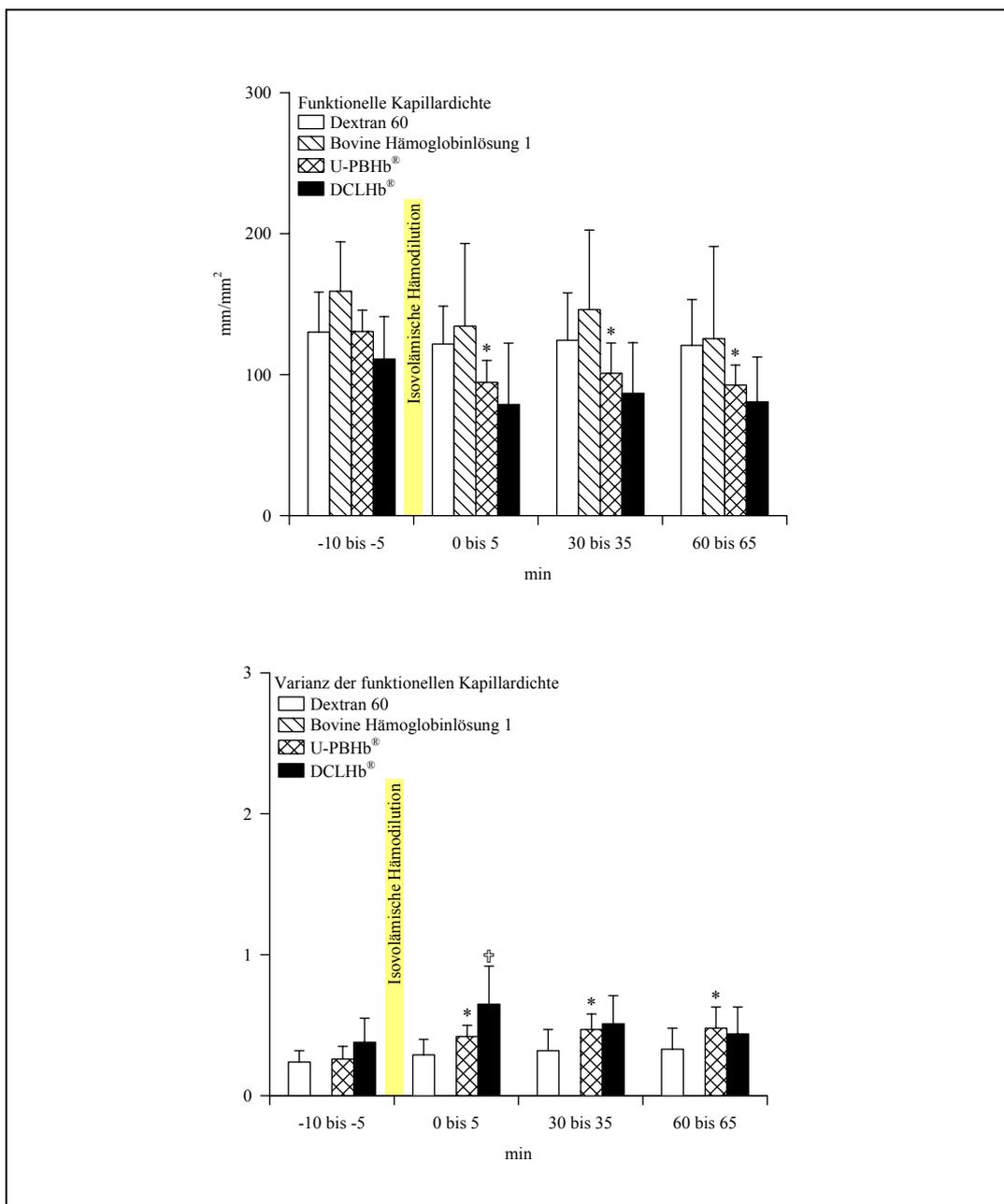


Abb. 23: Funktionelle Kapillardichte vor und nach isovolämischer Hämodilution
Mittelwert ± Standardabweichung.
* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen
und Student-Newman-Keul-Test
† $p < 0,05$ vs. Dextran 60: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse
und Student-Newman-Keul-Test

4.3 Hämorrhagischer Schock und Wiederbelebung

Die Effekte der Hämoglobinlösungen U-PBHb[®] und DCLHb[®] sollten nun im Vergleich zu üblichen Substitutionslösungen (siehe 3.3.4.3) unter den Streßbedingungen des hämorrhagischen Schocks untersucht werden, wobei als Zielgröße das als 7 % des Körpergewichtes berechnete halbe Blutvolumen innerhalb von fünf Minuten entzogen wurde. Die Wiederbelebung durch Volumensubstitution fand 45 Minuten später statt.

In den Abbildungen 24 bis 30 sind die Lösungen (U-PBHb[®] und DCLHb[®]), die dem Protokoll der Induktion eines hämorrhagischen Schocks und nachfolgender Wiederbelebung unterzogen wurden, sowie Dextran 60 im Vergleich mit autologem Blut und Ringer-Lösung als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Parameter wurden zu folgenden Meßzeitpunkten erhoben:

- unmittelbar vor Induktion des hämorrhagischen Schocks
- 30 Minuten nach Induktion des hämorrhagischen Schocks
- 0 Minuten nach Wiederbelebung
- 30 Minuten nach Wiederbelebung
- 60 Minuten nach Wiederbelebung
- 120 Minuten nach Wiederbelebung

Weder beim durchschnittlichen Ausgangsgewicht der Tiere (53 g bis 60 g) noch beim den Tieren durchschnittlich entzogenen Blutvolumen (1,75 ml bis 2,15 ml) weisen die untersuchten Gruppen signifikante Unterschiede zueinander auf.

4.3.1 Makrohämodynamik

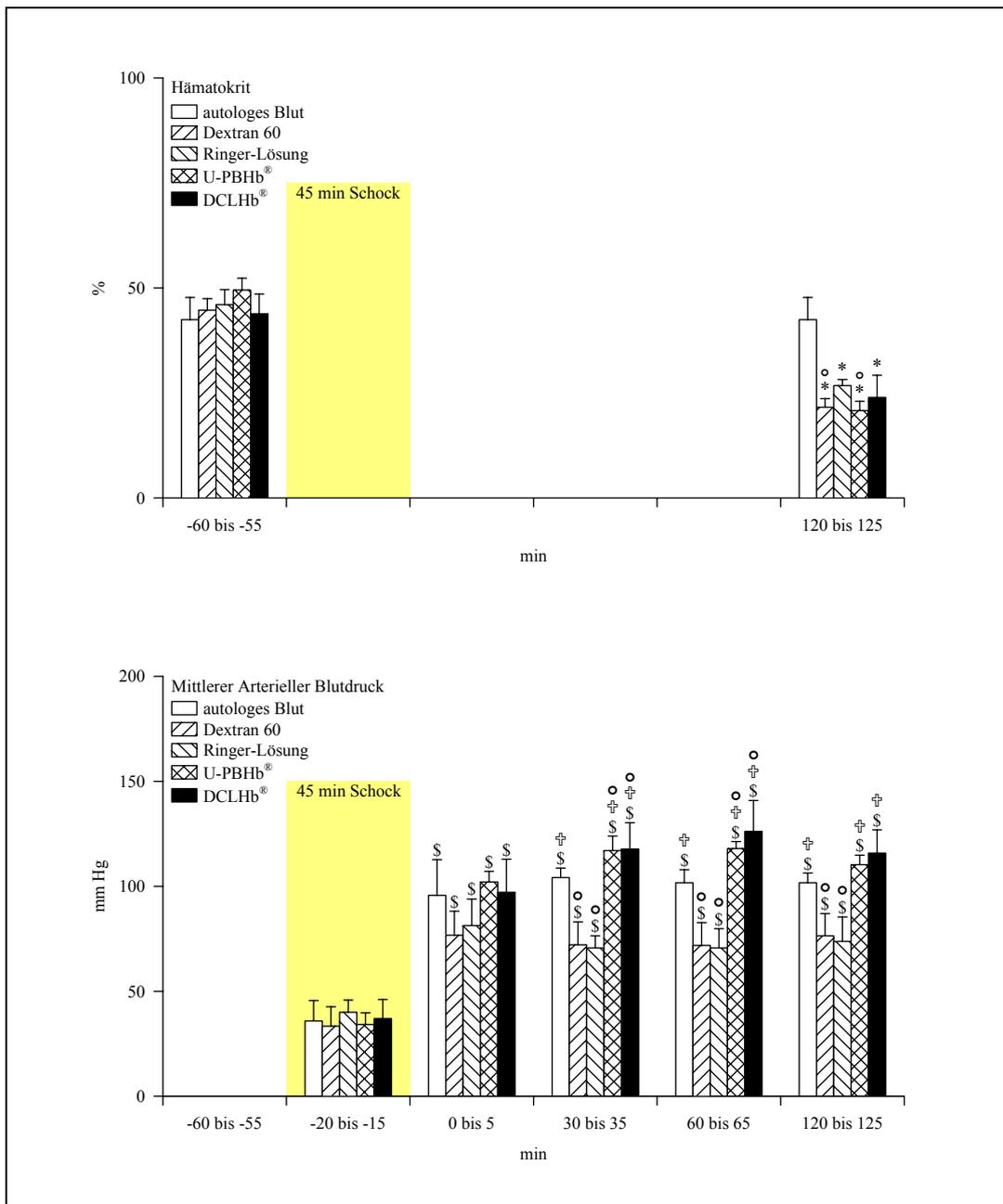


Abb. 24: Makrohämodynamik vor, während und nach hämorrhagischem Schock
Mittelwert ± Standardabweichung.

- * $p < 0,05$ vs. Ausgangswert: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test
- \$ $p < 0,05$ vs. Schock: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test
- † $p < 0,05$ vs. Ringer-Lösung: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse und Student-Newman-Keul-Test
- $p < 0,05$ vs. autolog. Blut: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse und Student-Newman-Keul-Test

Vor Induktion des hämorrhagischen Schocks bestand beim durchschnittlichen Hämatokrit (Abb. 24) der Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen Dextran 60 behandelt werden sollten, kein überzufälliger Unterschied zu den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung wiederbelebt werden sollten. Um die Beobachtung der

Mikrozirkulation nicht zu stören, wurde die Bestimmung des Hämatokrits nach der Behandlung nur am Ende der Beobachtungszeit durchgeführt. Bei der Gruppe der Tiere, die das entzogene Blut zurückerhalten hatten, wurde 120 Minuten nach der Behandlung wieder ein Hämatokrit im Ausgangsniveau gemessen, während bei den Tieren, die nicht mit autologem Blut behandelt worden waren, der Hämatokrit 120 Minuten nach der Behandlung signifikant (42 % bis 59 % des Ausgangswertes) unter Ausgangsniveau lag. Der Unterschied im Hämatokrit zur Gruppe der mit autologem Blut behandelten Tiere war am Ende der Beobachtungszeit allerdings nur bei den Gruppen der mit Dextran 60 oder U-PBHb[®] behandelten Tiere signifikant, ein Unterschied zur Gruppe der mit Ringer-Lösung behandelten Tiere fiel bei keiner der anderen Gruppen auf. Der mittlere arterielle Blutdruck (MAP) beträgt beim Syrischen Goldhamster ca. 100 mmHg. Aus technischen Gründen wurde er bei der Versuchsdurchführung erst nach Induktion des hämorrhagischen Schocks gemessen. Nach Wiederbelebung zeigten die Tiere aller untersuchten Gruppen über den gesamten Beobachtungszeitraum einen im Vergleich zu dem während der Schockphase gemessenen MAP signifikant höheren MAP (Abb. 24). Der MAP der Gruppen der Tiere, die mit Dextran 60 oder Ringer-Lösung behandelt worden waren, war 30, 60 und 120 Minuten nach Wiederbelebung signifikant geringer als der MAP der Gruppe der Tiere, die autologes Blut zurückerhalten hatten. Demgegenüber war der MAP der Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen behandelt worden waren, 30 und 60 Minuten nach Wiederbelebung signifikant höher als der MAP der Gruppe der Tiere, die autologes Blut zurückerhalten hatten. Demzufolge war der MAP der Gruppen der mit den Hämoglobinlösungen sowie der mit autologem Blut behandelten Tiere 30, 60 und 120 Minuten nach Wiederbelebung auch signifikant höher als der MAP der Gruppe der Tiere, die mit Ringerlösung behandelt worden waren.

4.3.2 Mikrohämodynamik

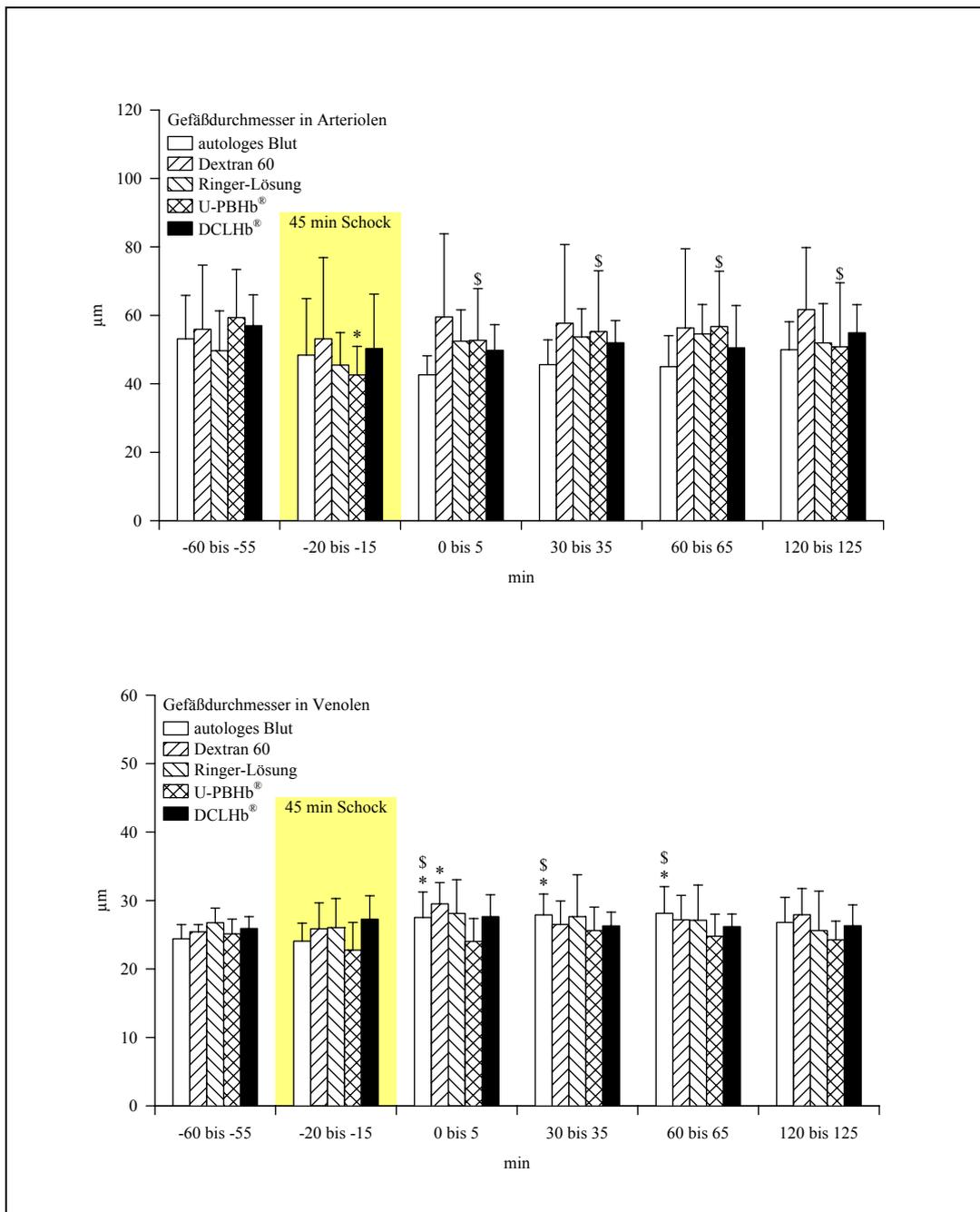


Abb. 25: Mikrohämodynamik I vor, während und nach hämorrhagischem Schock
Mittelwert \pm Standardabweichung.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test
\$ $p < 0,05$ vs. Schock: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test

Die Induktion des hämorrhagischen Schocks resultierte lediglich bei den Tieren der Gruppe, die mit U-PBHb® wiederbelebt werden sollten, in einer überzufälligen Abnahme des arteriölen Gefäßdurchmessers (Abb. 25). Nach Wiederbelebung wurde bei dieser Gruppe über den gesamten Beobachtungszeitraum signifikant gegenüber dem in der Schockphase gemessenen Wert vergrößerte arteriöle Gefäßdurchmesser festgestellt. Ein signifikanter Unterschied

zum Ausgangswert bestand bei dieser Gruppe nach Wiederbelebung nicht. Bei keiner untersuchten Gruppen kam es durch die Induktion des hämorrhagischen Schocks oder durch die Behandlung mit einer der Lösungen oder mit autologem Blut zu einer überzufälligen Veränderung des arteriolen Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Ausgangswert bzw. zum während der Schockphase gemessenen Wert. Zu keinem Zeitpunkt bestanden signifikante Unterschiede des arteriolen Gefäßdurchmessers der Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen oder Dextran 60 behandelt wurden, zu den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung behandelt wurden. Die venulären Gefäßdurchmesser (Abb. 25) wurden durch die Induktion des hämorrhagischen Schocks nicht signifikant verändert. Bei der Gruppe der Tiere, die mit autologem Blut behandelt worden waren, fiel eine überzufällige Vergrößerung des venulären Gefäßdurchmessers im Vergleich zum Ausgangswert und zum während der Schockphase gemessenen Wert unmittelbar, 30 und 60 Minuten nach Wiederbelebung auf. Der gleiche Effekt wurde auch bei der Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere unmittelbar nach Wiederbelebung beobachtet. Die Wiederbelebung der Tiere mit Ringer-Lösung oder einer der Hämoglobinlösungen hatte im Beobachtungszeitraum keinen signifikanten Einfluß auf den durchschnittlichen venulären Gefäßdurchmesser der untersuchten Gruppen im Vergleich zum Ausgangswert oder zum während der Schockphase gemessenen Wert. Zu keinem Zeitpunkt bestanden außerdem signifikante Unterschiede des venulären Gefäßdurchmessers der Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen oder Dextran 60 therapiert wurden, zu den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung therapiert wurden. Unter Ausgangsbedingungen war die durchschnittliche Geschwindigkeit der roten Blutzellen in Venolen (Abb. 26) bei den Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen oder Dextran 60 behandelt werden sollten, im Vergleich den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung behandelt werden sollten, nicht überzufällig verschieden. Nach Induktion des hämorrhagischen Schocks war die Geschwindigkeit der roten Blutzellen in Venolen so gering, daß mit der verwendeten Technik keine Messung möglich war. Daher sind hier und auch für die Leukozyten/Endothel-Interaktion (siehe 4.3.3), wo zur Diskriminierung frei im Blutstrom postkapillärer Venolen fließender, am Gefäßendothel entlangrollender und am Gefäßendothel adhärenter Leukozyten ein erkennbarer Blutfluß unverzichtbar ist, für die Schockphase jeweils keine Meßwerte angegeben. Unmittelbar nach Wiederbelebung war die Geschwindigkeit der roten Blutzellen in Venolen in allen Gruppen signifikant geringer als unter Ausgangsbedingungen. Dieser Effekt fiel während des gesamten Beobachtungszeitraums nach Wiederbelebung bei der Gruppe der mit U-PBHb[®] therapierten Tiere sowie 30 Minuten nach Wiederbelebung noch bei der Gruppe der mit Ringer-Lösung

therapierten Tiere auf. Zu allen verbleibenden Zeitpunkten und bei den übrigen beobachteten Gruppen keine überzufälligen Unterschiede zu den jeweiligen Ausgangswerten festgestellt. Bei den Gruppen der mit autologem Blut oder DCLHb[®] behandelten Tiere war die Geschwindigkeit der roten Blutzellen in Venolen zudem 30, 60 und 120 Minuten nach Wiederbelebung signifikant gegenüber den unmittelbar nach Wiederbelebung gemessenen Werten erhöht. Im übrigen bestanden auch nach der Wiederbelebung zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede der Geschwindigkeit der roten Blutzellen in den Venolen der Gruppen der Tiere, die mit einer der Hämoglobinlösungen oder Dextran 60 behandelt worden waren, zu den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung behandelt worden waren.

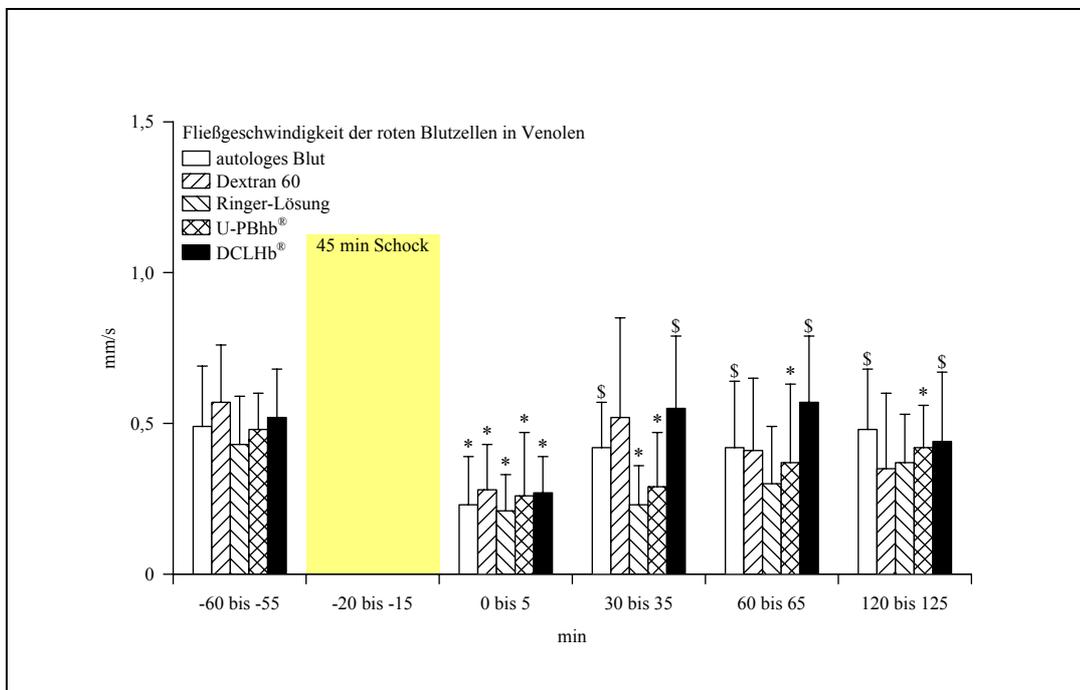


Abb. 26: Mikrohämodynamik II vor, während und nach hämorrhagischem Schock
Mittelwert \pm Standardabweichung.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test
\$ $p < 0,05$ vs. nach Schock: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test

4.3.3 Leukozyten/Endothel-Interaktion

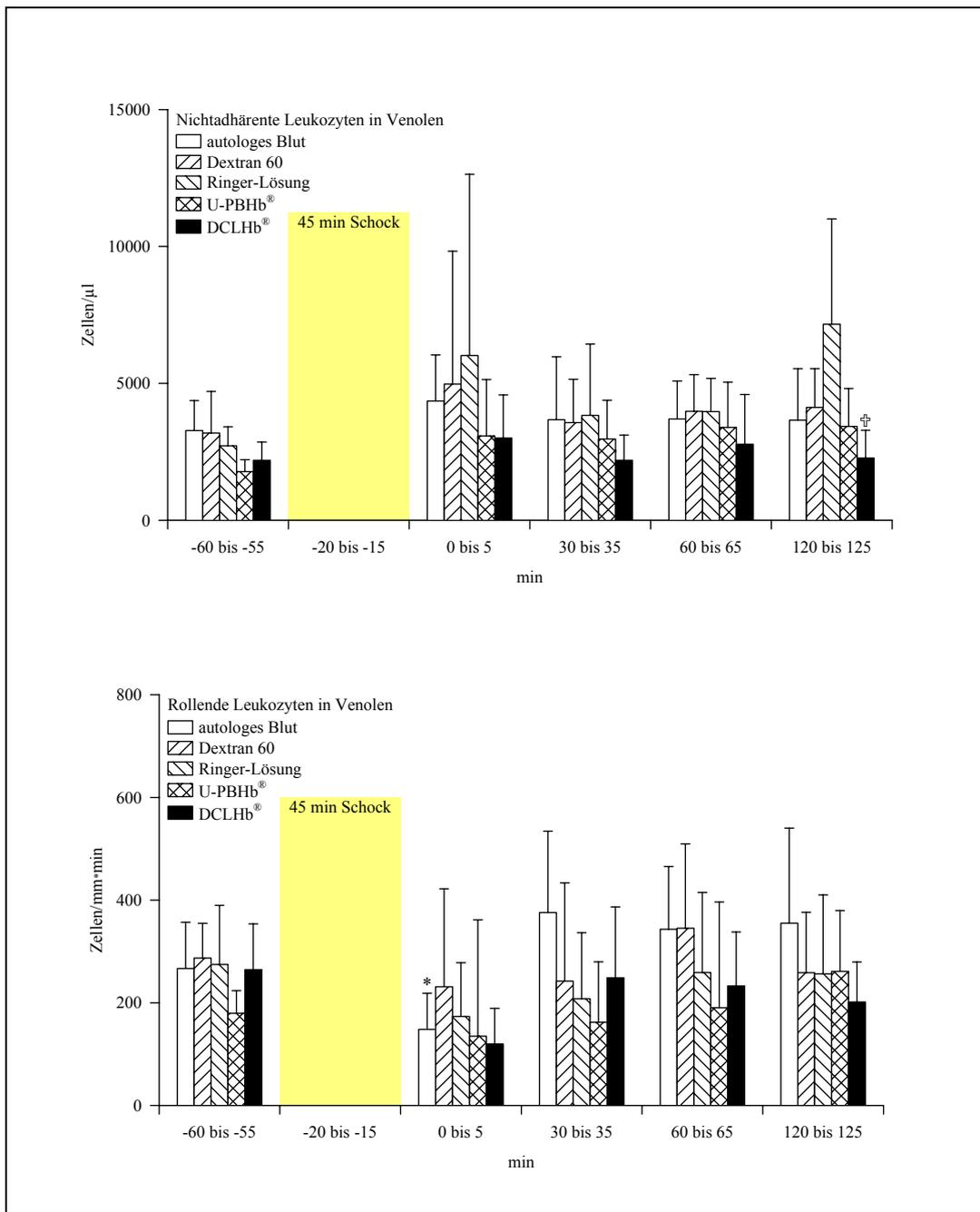


Abb. 27: Leukozyten/Endothel-Interaktion I vor, während und nach hämorrhagischem Schock Mittelwert \pm Standardabweichung.

* $p < 0,05$ vs. Ausgangswert: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test
 † $p < 0,05$ vs. Ringer-Lösung: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse und Student-Newman-Keul-Test

Bei der Anzahl der frei im Blutstrom der postkapillären Venolen fließenden Leukozyten in Bezug auf das die Gefäße durchströmende Blutvolumen (Abb.27) kam es nach Wiederbelebung im Vergleich zum Ausgangswert bei keiner der untersuchten Gruppen zu einer signifikanten Veränderung. Ausschließlich bei der Gruppe der mit DCLHb® behandelten Tiere fiel 120 Minuten nach Wiederbelebung eine im Vergleich zu Gruppe der

mit Ringer-Lösung behandelten Tiere eine signifikant geringere Anzahl der frei im Blutstrom der postkapillären Venolen fließenden Leukozyten auf. Ein überzufälliger Unterschied zur Gruppe der mit autologem Blut behandelten Tiere sowie zu beiden Kontrollgruppen zu anderen Zeitpunkten nach Wiederbelebung ergab sich nicht. Dies gilt auch für die Gruppen der mit Dextran 60 oder U-PBHb[®] behandelten Tiere für den gesamten Beobachtungszeitraum nach Wiederbelebung. Bei der durchschnittlichen Anzahl der am Gefäßendothel entlangrollenden Leukozyten (Abb. 27) wurde als einziger Effekt in der Gruppe der mit autologem Blut behandelten Tiere unmittelbar und ausschließlich nach Wiederbelebung eine im Vergleich zum Ausgangswert signifikant geringere Anzahl festgestellt.

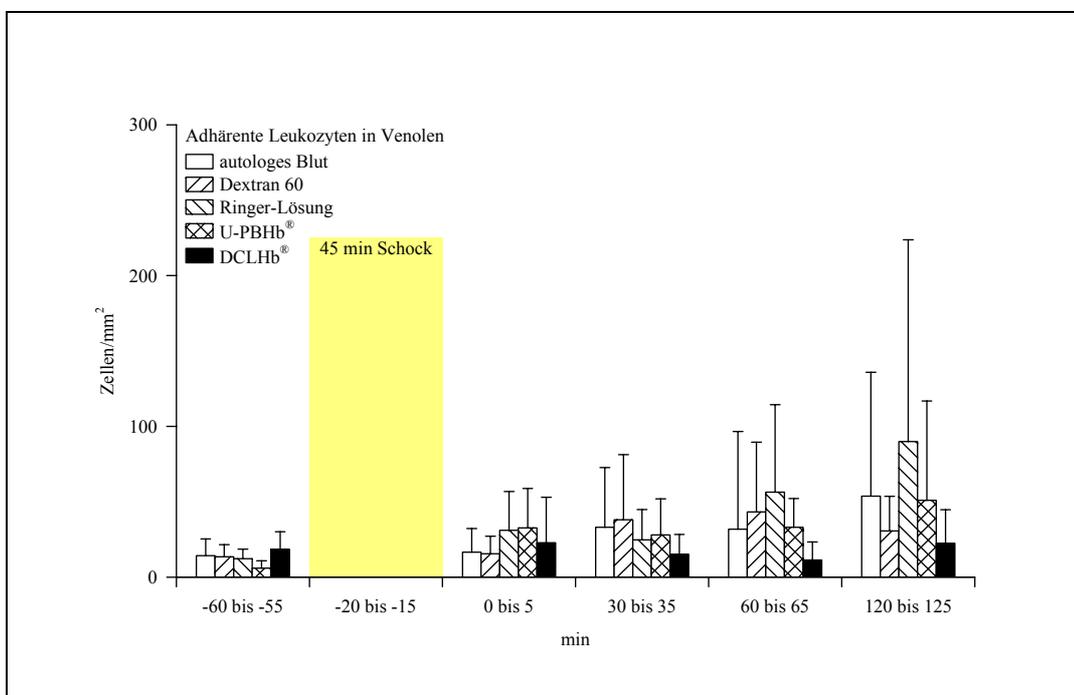


Abb. 28: Leukozyten/Endothel-Interaktion II vor, während und nach hämorrhagischem Schock Mittelwert \pm Standardabweichung.

Auf die Anzahl der am Gefäßendothel der postkapillären Venolen adhärenen Leukozyten in Bezug auf die Gefäßinnenfläche (Abb. 28) hatte die Induktion des hämorrhagischen Schockes und die nachfolgende Wiederbelebung im Vergleich zum Ausgangswert zu keinem Beobachtungszeitpunkt einen signifikanten Einfluß. Zwar kam es bis 120 Minuten nach Wiederbelebung bei den Gruppen der mit autologem Blut (von 14 auf 54 Leukozyten/mm²), Ringer-Lösung (von 12 auf 90 Leukozyten/mm²) oder U-PBHb[®] (von 6 auf 51 Leukozyten/mm²) behandelten Tiere bis 120 Minuten nach Wiederbelebung zu einem Anstieg der Zahl der am Gefäßendothel der postkapillären Venolen adhärenen Leukozyten auf das vier bis achtfache, aufgrund der erheblichen Streuung der Einzelwerte konnte der Trend jedoch nicht als überzufällig erkannt werden. Im übrigen bestand weder vor Induktion des

hämorrhagischen Schocks noch während des gesamten Beobachtungszeitraums nach Wiederbelebung ein signifikanter Unterschied in der Anzahl der am Gefäßendothel der postkapillären Venolen adhärenenten Leukozyten bei den Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen oder Dextran 60 behandelt wurden, im Vergleich zu den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung behandelt wurden.

4.3.4 Mikrovaskuläre Permeabilität

Die Induktion des hämorrhagischen Schocks und die nachfolgende Wiederbelebung führte in keiner der beobachteten Gruppen zu einer signifikanten Veränderung der Fluoreszenzintensität außerhalb des arteriolären Gefäßbettes bezogen auf die Fluoreszenzintensität innerhalb des arteriolären Gefäßbettes als Maß der arteriolären mikrovaskulären Permeabilität (Abb. 29) im Vergleich zum Ausgangswert oder zum während der Schockphase gemessenen Wert. Auch fiel weder vor Induktion des hämorrhagischen Schocks noch während des hämorrhagischen Schocks noch während des gesamten Beobachtungszeitraums nach Wiederbelebung ein überzufälliger Unterschied in der arteriolären mikrovaskulären Permeabilität bei den Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen oder Dextran 60 behandelt wurden, im Vergleich zu den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung behandelt wurden, auf. Bei der Untersuchung der venolären mikrovaskulären Permeabilität (Abb. 29) bot sich ein nahezu identisches Bild: lediglich unmittelbar nach Wiederbelebung zeigte die Gruppe der mit U-PBHb[®] behandelten Tiere eine im Vergleich zur Gruppe der mit autologem Blut behandelten Tiere eine gesteigerte venoläre mikrovaskuläre Permeabilität.

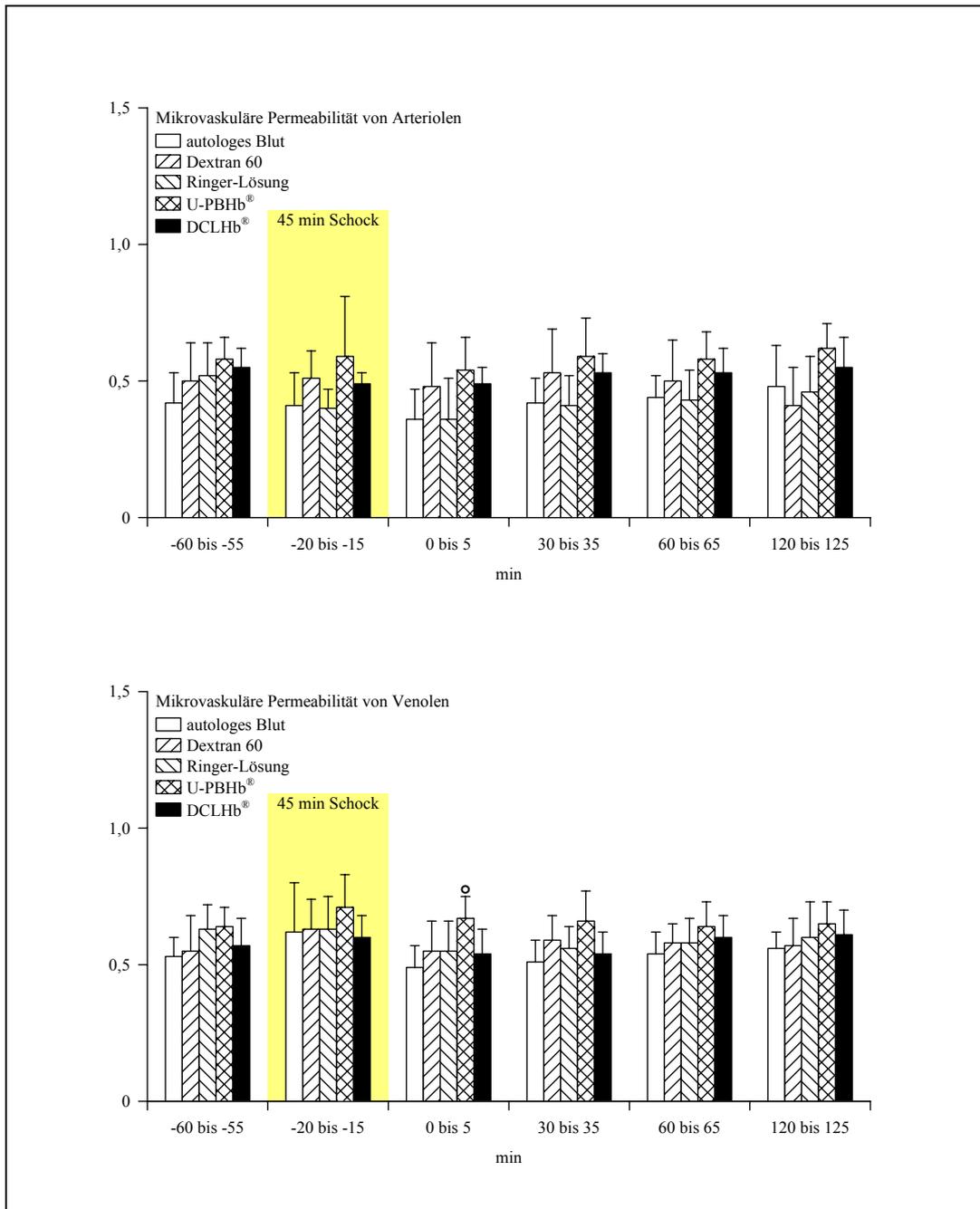


Abb. 29: Mikrovaskuläre Permeabilität vor, während und nach hämorrhagischem Schock
Mittelwert \pm Standardabweichung.

○ $p < 0,05$ vs. autolog. Blut: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse und Student-Newman-Keul-Test

4.3.5 Funktionelle Kapillardichte

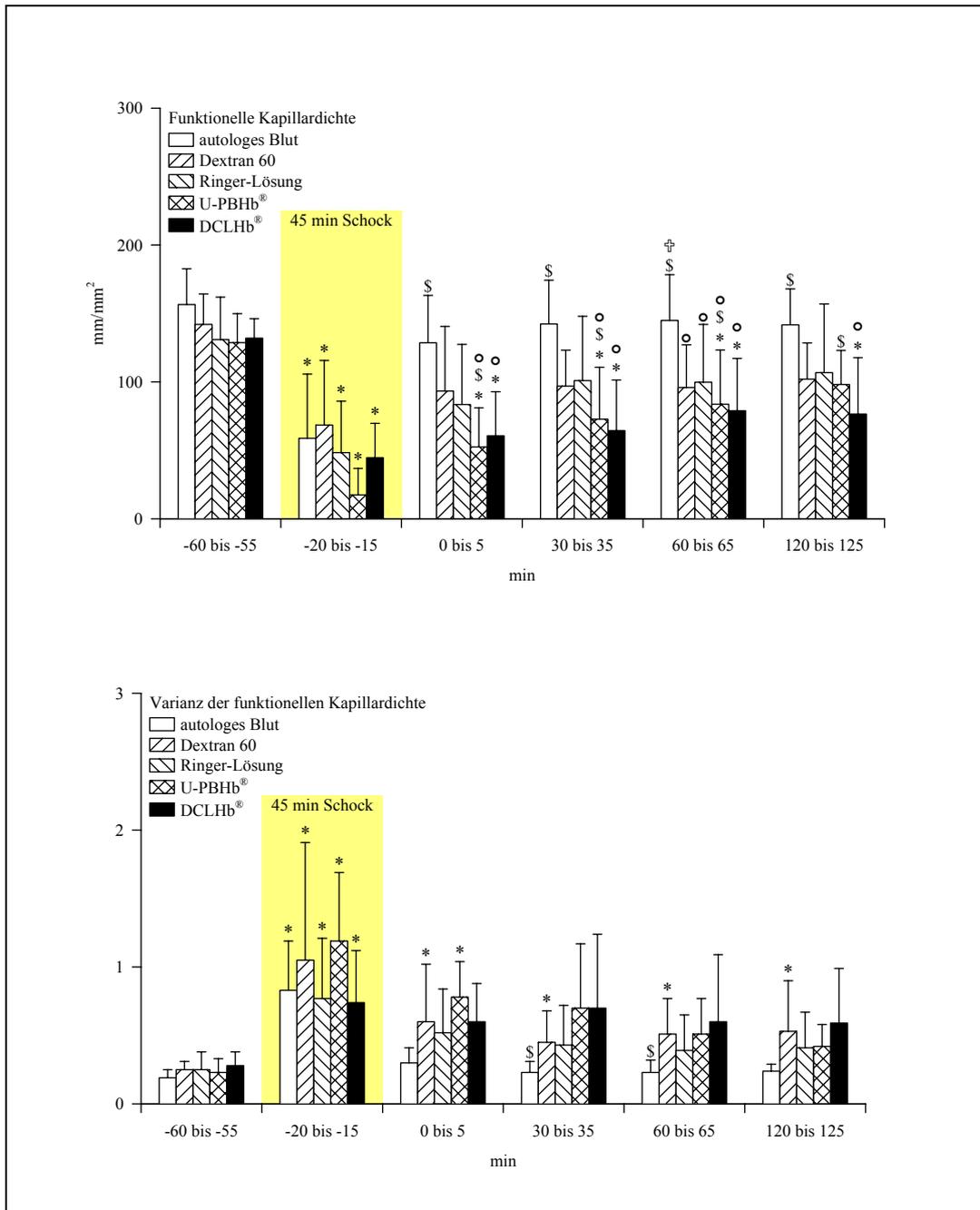


Abb. 30: Funktionelle Kapillardichte vor, während und nach hämorrhagischem Schock Mittelwert \pm Standardabweichung.

- * $p < 0,05$ vs. Ausgangswert: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test
- \$ $p < 0,05$ vs. Schock: Friedman-Varianz-Analyse für wiederholte Messungen und Student-Newman-Keul-Test
- † $p < 0,05$ vs. Ringer-Lösung: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse und Student-Newman-Keul-Test
- $p < 0,05$ vs. autolog. Blut: Kruskal-Wallis-Varianz-Analyse und Student-Newman-Keul-Test

Unter Ausgangsbedingungen war die als Länge der perfundierten Kapillaren pro Fläche angegebene funktionelle Kapillardichte (Abb. 30) bei den Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen oder Dextran 60 therapiert werden sollten, im Vergleich den Gruppen

der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung therapiert werden sollten, nicht überzufällig verschieden. Durch die Induktion des hämorrhagischen Schocks fällt sie in allen untersuchten Gruppen (auf 14 % bis 48 % der Ausgangswerte) signifikant ab, überzufällige Unterschiede zwischen den Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen oder Dextran 60 behandelt werden sollten, im Vergleich zu den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung behandelt werden sollten, fielen auch während der Schockphase nicht auf. Nur durch die Wiederbelebung mit autologem Blut wurde die funktionelle Kapillardichte soweit (auf 82 % bis 93 % des Ausgangswertes) normalisiert, daß sie während des gesamten Beobachtungszeitraumes nach Wiederbelebung signifikant über dem während der Schockphase gemessenen Wert lag und sich gleichzeitig vom Ausgangswert nicht mehr überzufällig unterschied. In den Gruppen der mit den Hämoglobinlösungen therapierten Tiere wurde durch die Behandlung eine im Vergleich zu den Ausgangswerten und im Vergleich zu der bei der Gruppe der mit autologem Blut therapierten Tiere zu den jeweiligen Beobachtungszeitpunkten eine signifikant geringere funktionelle Kapillardichte erreicht: nur 120 Minuten nach Wiederbelebung wurde in der Gruppe der mit U-PBHb[®] behandelten Tiere eine nicht überzufällig unter dem Ausgangswert und unter dem in der Gruppe der mit autologem Blut behandelten Tiere zu diesem Zeitpunkt liegende funktionelle Kapillardichte ermittelt. Aufgrund der in der Gruppe der Tiere, die mit U-PBHb[®] behandelt werden sollten, während der Schockphase sehr – aber im Vergleich zu den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung behandelt werden sollten, nicht überzufällig – geringen funktionellen Kapillardichte unterscheiden sich bei dieser Gruppe alle nach Wiederbelebung gemessenen Werte signifikant vom während der Schockphase gemessenen Wert. Während des gesamten Beobachtungszeitraums nach Wiederbelebung wurde in der Gruppen der mit Ringer-Lösung oder Dextran 60 behandelten Tiere eine zwar deutlich – aber nicht signifikant – geringere funktionelle Kapillardichte gemessen als unter Ausgangsbedingungen. Im Vergleich zur Gruppe der mit autologem Blut behandelten Tiere fiel bei diesen beiden Gruppen nur 60 Minuten nach Wiederbelebung ein signifikanter Unterschied auf. Die als Maß der Homogenität der kapillären Perfusion bestimmte Varianz der funktionellen Kapillardichte (Abb. 30) zeigte eine kongruente Entwicklung. Durch die Induktion des hämorrhagischen Schocks stieg sie in allen untersuchten Gruppen signifikant an, überzufällige Unterschiede zwischen den Gruppen der Tiere, die mit den Hämoglobinlösungen oder Dextran 60 behandelt werden sollten, im Vergleich zu den Gruppen der Tiere, die mit autologem Blut oder Ringer-Lösung behandelt werden sollten, fielen unter Ausgangsbedingungen, während der Schockphase und während des gesamten Beobachtungszeitraumes nach Wiederbelebung nicht auf. Nur in der Gruppe der mit

autologem Blut behandelten Tiere ging sie 30 und 60 Minuten nach Wiederbelebung signifikant unter das während der Schockphase ermittelte Ausmaß zurück und unterschied sich während des gesamten Beobachtungszeitraums nach Wiederbelebung nicht überzufällig von dem unter Ausgangsbedingungen festgestellten Wert. Bei der Gruppe der mit Dextran 60 behandelten Tiere war die Inhomogenität der kapillären Perfusion auch über den gesamten Beobachtungszeitraum nach Wiederbelebung signifikant über das Ausgangsniveau erhöht. Dieser Effekt wurde auch bei der Gruppe der mit U-PBHb[®] behandelten Tiere ausschließlich unmittelbar nach Wiederbelebung beobachtet. Im übrigen fielen keine überzufälligen Unterschiede der untersuchten Gruppe nach Wiederbelebung im Vergleich zu den Ausgangswerten oder den während der Schockphase errechneten Werten auf.

5. Diskussion

5.1 Methodik

Das Rückenhautkammermodell beim syrischen Goldhamster hat sich als besonders geeignet für intravitalmikroskopische Untersuchungen erwiesen, da die Rückenhaut in lockerem Verbund zum Körper steht und zum Zwecke der Kammerpräparation problemlos vom Rücken des Tieres abgehoben werden kann. Ohne die Notwendigkeit akuter chirurgischer Eingriffe sind so in der Rückenhautkammer chronische Mikrozirkulationsuntersuchungen möglich (ENDRICH et al., 1980; COLANTUONI et al., 1982; FUNK et al., 1983; NOLTE et al., 1995a). Lokale Parameter wie Ionenkonzentration, Gaspartialdrucke und Temperatur werden dabei vom Gewebe selbst reguliert (FUNK et al., 1983). Bei Hamstern mit und ohne Rückenhautkammer wurden nach zwei und nach acht Tagen bezüglich der arteriellen und zentralvenösen Blutdrucke, des Hämatokrits, der arteriellen Blutgase und der pH-Werte keine Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden (BALDINGER, 1986). Elektronenmikroskopische Untersuchungen erbrachten ebenfalls keine Unterschiede hinsichtlich der Ultrastruktur des Skelettmuskels, des subkutanen Gewebes, des Gefäßendothels und der Gewebe-Mastzellen beim Vergleich von Rückenhautmuskelgewebe aus Rückenhautkammern und von Kontrolltieren ohne Rückenhautkammer (FUNK et al., 1983; ENDRICH, 1984). Zahlreiche, in der Zwischenzeit durchgeführte Untersuchungen (MENGER et al., 1988, 1989b; LEHR et al., 1992, 1993a; NOLTE et al., 1992b; NOLTE et al., 1995a) lassen das verwendete Rückenhautkammermodell als für die vorliegenden Untersuchungen geeignet erscheinen, insbesondere sind auch phototoxische Effekte durch die Fluoreszenzmikroskopie selbst ausgeschlossen (STEINBAUER et al., 2000).

In der vorliegenden Studie wurde neben dem angestrebten Toxizitätsausschluß und der Frage nach der Effektivität der getesteten Hämoglobinlösungen hinsichtlich der mikrovaskulären Gewebepfusion erstmals die Mikrozirkulation im Rückenhautmuskel während des hämorrhagischen Schocks untersucht. Da Vorversuche ergeben hatten, daß eine Schockphase von 120 Minuten von den meisten Versuchtieren nicht überlebt wurde, wurde eine Schockdauer von 45 Minuten vorgegeben. Wird allerdings Blut in bis zu vier Portionen

orientiert an einem minimalen MAP von 40 mmHg und über 30 Minuten hinweg entzogen, adaptieren sich die Tiere so an die Bedingungen der Schockphase, daß gut die Hälfte der Versuchstiere auch eine Schockphase von 240 Minuten überlebt und anschließend retransfundiert werden kann (KERGER et al., 1996, 1997, 1999). Das Muskelgewebe wird in den 45 Minuten der Schockphase nicht schwerwiegend geschädigt. In Untersuchungen am verwendeten Versuchsmodell konnte gezeigt werden, daß mit irreversiblen Schäden erst ab einer Ischämiezeit von vier Stunden zu rechnen ist (SACK et al., 1987; HARRIS et al., 1996). Da ein Schock unter anderem in einer systemischen Leukozytose resultiert, erschien der gewählte Versuchsansatz auch besonders geeignet, die Wirkung der Hämoglobinlösungen auf die intra-mikrovaskulär aktivierten Leukozyten zu untersuchen.

5.2 Ergebnisse

5.2.1 Hypervolämische Infusion

Der Anstieg des mittleren arteriellen Blutdruckes (MAP) nach Anwendung von Hämoglobinlösungen wurde bereits von zahlreichen Autoren beobachtet (VOGEL et al., 1986; HESS et al., 1993; DUNLAP et al., 1995; MALCOM et al., 1994; STEINHAUSER, 1994; NOLTE et al., 1997a; TSAI, 2001). Bei der hypervolämischen Infusion wurde diesem Effekt nicht erneut nachgegangen. Mittlerweile scheint klar, daß der Anstieg des MAP und auch die zu beobachtende Vasokonstriktion um so geringer ausfallen je größer die eingesetzten, vernetzen Hämoglobinmoleküle sind (SAKAI et al., 2000).

5.2.1.1 Mikrohämodynamik

Die arteriolen und venolen Gefäßdurchmesser blieben nach hypervolämischer Infusion der untersuchten Lösungen in allen Gruppen unverändert. Die nach hypervolämischer Infusion von Albumin erhöhte Geschwindigkeit der frei in postkapillären Venolen fließenden roten Blutzellen mit einem Maximum 30 Minuten nach Applikation erklärt sich am ehesten durch den höheren onkotischen Druck der Albumin-Lösung.

5.2.1.2 Leukozyten/Endothel-Interaktion

Aufgrund der Interaktion von Hämoglobin mit vasoaktiven Mediatoren (GULATI et REBELLO, 1994; SCHULTZ et al., 1993; TODA, 1990) und Produkten der Lipidperoxidation nimmt man an, es wirke als Fenton-Reagens (SADRZADEH et al., 1984) und begünstige so die Bildung von zytotoxischen Hydroxylradikalen (OH^\bullet) in der Haber-Weiss-Reaktion und verstärke so die Lipidperoxidation. Hierauf reagiert die Leukozyten/Endothel-Interaktion sehr sensibel, wie das vermehrte Rollen und Adhärenzen von Leukozyten bei Hamstern nach intravenöser Gabe von oxidierten LDL zeigt (LEHR et al., 1992). Eine relevante Veränderung der Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel der postkapillären Venolen nach hypervolämischer Infusion der auch graphisch dargestellten Hämoglobinlösungen (Abb. 13 und 14) konnte ebenso wenig wie nach Applikation von physiologischer Kochsalzlösung oder Albumin beobachtet werden. Es liegt der Schluß nahe, daß die untersuchten Hämoglobinlösungen frei von Verunreinigungen – wie z. B. Endotoxin – sind, welche die Leukozyten/Endothel-Interaktion anregen könnten. Höhere Dosen von Endotoxin verstärken unabhängig von der Spezies die durch Ischämie und Reperfusion angeregte Leukozyten/Endothel-Interaktion (LEHR et al., 1993b). In den untersuchten Lösungen konnte jedoch praktisch kein Endotoxin nachgewiesen werden (WHITE et al., 1986).

5.2.1.3 Mikrovaskuläre Permeabilität

Die Permeabilität des mikrovaskulären Gefäßbettes für Makromoleküle wie den Plasmamarker FITC-Dextran 150 nimmt durch Einschränkung oder Verlust der Barrierefunktion nach Endothelschädigung zu. Diese kann nicht nur durch die Aktivierung und Adhärenz von Leukozyten am Gefäßendothel (BARROSO-ARANDA et SCHMID-SCHÖNBEIN, 1989) sondern auch unabhängig von Leukozyten durch die Bildung toxischer Sauerstoffradikale (GRANGER, 1988; GRANGER et al., 1989) verursacht werden. Die hypervolämische Infusion der untersuchten Hämoglobinlösungen beeinträchtigte die Barrierefunktion des Gefäßendothels für Makromoleküle nicht, so daß die Bildung toxischer Sauerstoffradikale durch die Lösungen im verwendeten Versuchsmodell ausgeschlossen erscheint. Im Fall von DCLHb[®] wurde dies auch direkt nachgewiesen (PINCEMAIL et al., 1995).

5.2.1.4 Funktionelle Kapillardichte

Die hypervolämische Infusion der untersuchten Hämoglobinlösungen wirkte sich grundsätzlich nicht wesentlich auf die funktionelle Kapillardichte aus, die als wesentlicher Parameter für die Gewebeintegrität angesehen wird (SZCZESNY et al., 2001). Weiterhin ergab sich auch keine Anhalt für eine Verstopfung der Kapillaren durch Leukozyten ("capillary plugging"). Dieser Effekt resultiert zwar auch in einer verminderten funktionellen Kapillardichte, hat allerdings auf die Gewebeintegrität keinen nennenswerten Einfluß (HARRIS et al., 1997). Eine Minderdurchblutung bestimmter Organsysteme in Folge der Applikation einer Hämoglobinlösung konnte zumindest für DCLHb[®] ausgeschlossen werden (SHARMA et GULATI, 1994).

5.2.2 Isovolumische Hämodilution

5.2.2.1 Makrohämodynamik

Bei der isovolämischen Hämodilution ist die Zielgröße der Hämatokrit. Dieser war auch am Ende der Beobachtungszeit in allen beobachteten Gruppen gleich. Von der beschleunigten Elimination einer der untersuchten Lösungen aus dem Gefäßbett kann somit nicht ausgegangen werden. Nach isovolämischer Hämodilution mit U-PBHb[®] oder DCLHb[®] wurde im Gegensatz zur isovolämischen Hämodilution mit Dextran 60 ein Anstieg des MAP mit einem Maximum 30 Minuten nach der Intervention registriert. Dieser lange bekannte Effekt wird auch von anderen Arbeitsgruppen regelmäßig gefunden (HARRINGER et al., 1992; WASCHKE et al., 1993; HESS et al., 1994; SHARMA et GULATI, 1994) und kann medikamentös unterdrückt werden (SHARMA et GULATI, 1995). Der Gefäßtonus wird von Endothelin (endothelium derived constriction factor) und NO[•] (endothelium-derived relaxing factor) reguliert (POHL et BUSSE, 1989; RUBANYI et POLOKOFF, 1994). Im Gegensatz zum Hämoglobin der Erythrozyten kann modifiziertes, zellfreies Hämoglobin in Endothel und glatte Muskulatur der Gefäßwände eindringen (GOULD et al., 1997) und dort an NO[•] binden (MACDONALD et MOTTERLINI, 1994; HESS et al., 1994; NAKAI et al., 1994; NELSON, 1997). Oxyhämoglobin wird hierbei zu Methämoglobin und Nitrit, Deoxyhämoglobin bindet NO[•] an seinen Eisen-Kern. Nach Infusion von bis zu 750 ml DCLHb[®] (O'HARA et al., 2001) und bis zu 150 ml U-PBHb[®] (SPRUNG et al., 2002) im Rahmen elektiver chirurgischer Eingriffe bei Menschen wurde zwar vermehrt Methämoglobin nachgewiesen, jedoch kam es zu keinem

Methämoglobinanstieg, aus dem Komplikationen resultierten. Andererseits wird von einer Hämoglobin-induzierten Freisetzung von Endothelin (MACHI et al., 1991; MALCOLM et al., 1994) ausgegangen, bei Ratten konnten erhöhte Endothelin-1-Spiegel nach Applikation von DCLHb[®] nachgewiesen werden (GULATI et al., 1995). Die Veränderungen des MAP müssen somit in Zusammenschau mit den Veränderungen der mikrovaskulären Gefäßdurchmesser betrachtet werden. Nach Inkubation von Endothelzellen menschlicher Nabelvenen mit U-PBHb[®] und anderen bovinen Hämoglobinlösungen wurden dagegen verminderte Endothelin-1-Spiegel nachgewiesen. Der verursachte Abfall des Endothelin-1-Spiegels fiel dabei um so deutlicher aus, je ausgeprägter die durch die Inkubation mit der jeweiligen Hämoglobinlösung hervorgerufene oxidative Schädigung des Endothels war (SIMONI et al., 1995).

5.2.2.2 Mikrohämodynamik

Nach isovolämischer Hämodilution konnten im beschriebenen Versuchsablauf keine relevanten Veränderungen der mikrovaskulären – insbesondere der arteriolären – Gefäßdurchmesser beobachtet werden. Allerdings konnte für DCLHb[®] von der eigenen Arbeitsgruppe am identischen Versuchsmodell unter den Bedingungen der hypervolämischen Infusion und der isovolämischen Hämodilution eine nur maximal zwei Minuten nach Applikation andauernde arterioläre Vasokonstriktion um ca. 25 % nachgewiesen werden (NOLTE et al., 1997a), die bei der in der vorliegenden Untersuchung gewählten zeitlichen Abfolge der Beobachtungen – es wurden zu jedem Untersuchungszeitpunkt zunächst für ca. drei Minuten die Venolen auf Video aufgenommen – aus dem diagnostischen Fenster fällt. Die Geschwindigkeit der frei in Venolen fließenden Erythrozyten wurde durch die isovolämische Hämodilution nicht relevant verändert. Für DCLHb[®] wurde eine Zunahme des Herzzeitvolumens ohne Anstieg der Herzfrequenz nachgewiesen. Hierbei wurde mit radioaktiven Mikrosphären eine vermehrte Durchblutung von Herz, Milz, Dünndarm, Magen, Magen und Haut, jedoch eine unveränderte Durchblutung von Gehirn, Leber, Nieren, Dickdarm und des muskuloskeletalen Systems gemessen (GULATI et al., 1994). Auch hier wurde, wie von weiteren Untersuchern (HESS et al., 1994; NAKAI et al., 1994) eine Zunahme des muskuloskeletalen sowie des gesamten peripheren Gefäßwiderstandes festgestellt. Er dürfte aber, wie auch die nur kurz zu beobachten arterioläre Vasokonstriktion (NOLTE et al., 1997a) weniger als das gesteigerte Herzzeitvolumen Ursache des oben beschriebenen Anstiegs des MAP sein. Neben den oben beschriebenen Auswirkungen von Hämoglobin auf Endothelin und NO[•] (siehe 5.2.2.1) wird außerdem ein Einfluß von Hämoglobin auf die

sympathische, nicht aber auf die cholinerge neurogene Regulation der Gefäßregulation vermutet (LINNIK et LEE, 1989, 1993; GULATI et SHARMA, 1994; SHARMA et GULATI, 1994). Für nach zufälligem Muster perfundierte Mikrogefäße wurde allerdings ein Überwiegen der Autoregulation über die sympathische Regulation der Durchblutung, insbesondere unter kritischen Perfusionsbedingungen, nachgewiesen (ERNI et al., 1999).

5.2.2.3 Leukozyten/Endothel-Interaktion

Aufgrund der unter Normalbedingungen sehr hohen Blutflußgeschwindigkeit in Arteriolen ist die Beobachtung der Interaktion von Leukozyten mit dem Gefäßendothel dort nicht nur technisch schwierig. Vielmehr wird die hohe Blutflußgeschwindigkeit als Ursache für die fehlende Interaktion von Leukozyten mit dem arteriolen Gefäßendothel angenommen (LEY et al., 1989; LAWRENCE et al., 1990). Trotzdem konnte die Abhängigkeit der postischämischen Leukozyten/Endothel-Interaktion in Venolen von der Veränderung der mikrovaskulären Blutflußgeschwindigkeit ausgeschlossen werden (SACK et al., 1987; LEHR et al., 1991a; MENGER et al., 1991; NOLTE et al., 1991a, 1991b). Die Senkung des systemischen Hämatokrits bis 20 % hat keinen Einfluß auf den mikrovaskulären Hämatokrit (INTAGLIETTA, 1989). Die nach isovolämischer Hämodilution mit den untersuchten Lösungen beobachtete Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel der postkapillären Venolen bleibt also im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen durch die Hämatokritveränderung selbst unbeeinflusst. Die initiale Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel der postkapillären Venolen wird vor allem durch Selektine und Chemokine sowie Glykoproteinen als deren Liganden vermittelt (BEVILACQUA et NELSON, 1993; VARKI, 1997; LEY et al., 1998; EBNET et VESTWEBER, 1999; VESTWEBER et BLANKS, 1999). Eine relevante Veränderung der Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel der postkapillären Venolen konnte nach isovolämischer Hämodilution mit den untersuchten Hämoglobinlösungen ebenso wie nach Applikation von Dextran 60 nicht beobachtet werden. Eine Schädigung des mikrovaskulären Endothels durch isovolämische Hämodilution mit den untersuchten Hämoglobinlösungen erscheint ausgeschlossen (NOLTE et al., 1994).

5.2.2.4 Mikrovaskuläre Permeabilität

Wenn auch die Messungen der Fluoreszenzintensität innerhalb und außerhalb der beobachteten Gefäße als Maß der Extravasation von Fluoreszenzmarkern und damit der mikrovaskulären Permeabilität nicht völlig homogene Ergebnisse erbracht haben, so konnten doch keine relevanten Veränderungen dieses Parameters festgestellt werden. Die gleichsinnigen Beobachtungen bei Leukozyten/Endothel-Interaktion und mikrovaskulärer Permeabilität erklären sich u. a. durch beiden gemeinsame Effekte wie die Mediation durch Leukotriene (LEHR et al., 1991b) oder die Lipidperoxidation (SADRZADEH et al., 1984). Auch für purifiziertes stromafreies Hämoglobin wurde in vitro eine Induktion der Lipidperoxidation in Abhängigkeit von Lagerzeit und Lagertemperatur nachgewiesen (FAASSEN et al., 1988), aufgrund der vorliegenden Ergebnisse ist aber Anregung der Lipidperoxidation unwahrscheinlich.

5.2.2.5 Funktionelle Kapillardichte

In Folge der isovolämischen Hämodilution wurde bei allen untersuchten Lösungen, insbesondere jedoch bei U-PBHb[®], eine verminderte funktionelle Kapillardichte gefunden, die Varianz der funktionellen Kapillardichte nahm in gleicher Weise leicht zu. Die funktionelle Kapillardichte wird als Länge aller von Erythrozyten durchströmten Kapillaren pro Fläche angegeben (siehe 3.3.2.4, NOLTE et al., 1995b), zellfreie Hämoglobinlösungen können jedoch auch ausschließlich von Plasma durchströmte Kapillaren erreichen. So konnte trotz reduzierter funktioneller Kapillardichte in identischen Versuchsprotokollen für U-PBHb[®] und DCLHb[®] eine Homogenisierung der Geweboxygenierung nachgewiesen werden konnte (NOLTE et al., 1997b; BOTZLAR et al., 2002). Der therapeutische Effekt der Hämodilution bei der Behandlung einer fokalen cerebralen Ischämie bei Ratten konnte durch die Anwendung von DCLHb[®] erheblich gesteigert werden (COLE et al., 1992, 1993). Die Tiere tolerierten dabei eine Hämodilution bis zu einem Hämatokrit von 9 % problemlos. Mit U-PBHb[®] wurden bei Untersuchungen zu Gehirndurchblutung und Glucoseverwertung durch das Gehirn Hämodilutionen bis zu einem Hämatokrit < 3 % durchgeführt und von den Versuchstieren uneingeschränkt toleriert (WASCHKE et al., 1993). Die dabei beobachtete Steigerung der Gehirndurchblutung bei gleichbleibender Oxygenierung wurde nicht dadurch verursacht, daß die Hämoglobinlösungen im Gegensatz zu Blut Newton'sche Flüssigkeiten sind (WASCHKE et al., 1994). Für DCLHb[®] wurde schließlich der Nachweis erbracht, daß eine

Hämodilution auch über die für nicht sauerstofftragende Lösungen kritische Grenze hinaus möglich ist. Bei einem Hämatokrit von 1,2 % waren bei Schweinen Durchblutung und Funktion des Herzens im Gegensatz zur Hämodilution mit Humanalbumin (auf einen Hämatokrit von 6,1 %) regelrecht erhalten. Auf die Sauerstoffversorgung der Peripherie nach extremer Hämodilution hatte die Hämoglobinlösung allerdings keinen positiven Einfluß (MEISNER et al., 2001).

5.2.3 Hämorrhagischer Schock

5.2.3.1 Makrohämodynamik

Aufgrund der unterschiedlichen Ausgangswerte von Hämatokrit und Körpergewicht wurden bei der Induktion des hämorrhagischen Schocks verschieden große Blutvolumina entzogen; die entzogene Menge Blut im Bezug auf des Körpergewicht zeigte aber keine signifikanten Unterschiede, so daß die Schockbedingungen in allen Gruppen als gleich angesehen werden können. Der Hämatokrit war außerdem in allen nicht mit autologem Blut behandelten Gruppen am Ende der Beobachtungszeit gleich, so daß nicht von einer beschleunigten Elimination einer der untersuchten Lösungen aus dem Gefäßbett ausgegangen werden kann. Durch die Wiederbelebung nach 45 Minuten Schockphase wurde bei den mit Eigenblut behandelten Tieren ein für Hamster regelrechter MAP erreicht. Um Effekte der Hypervolämie auszuschließen, erfolgte auch die Volumensubstitution mit Dextran 60 oder Ringer-Lösung in einfacher Menge des entzogenen Blutes. Ein für Hamster regelrechter MAP wurde so aber nicht erreicht, während die Anwendung der verschiedenen Hämoglobinlösungen erwartungsgemäß in einem Anstieg des MAP über das physiologische Niveau resultierte. Entsprechende Beobachtungen wurden bei der Behandlung von Ratten im hämorrhagischen Schock gemacht: durch Eigenblut kam es zu Wiederherstellung des vor Induktion des hämorrhagischen Schockes gemessenen MAP, bei Anwendung von Hämoglobinlösungen lagen die Werte über, bei Anwendung anderer Lösungen unter der Ausgangswerten (CHANG et VARMA, 1992). Bei Hunden, die nach 20 Minuten Herzstillstand durch äußere Herzdruckmassage reanimiert wurden, konnte durch Infusion von U-PBHb[®] über einen großlumigen zentralvenösen Katheter und aortale Gegenpulsation eine verbesserte aortocoronare Perfusion und ein wesentlich besseres Überleben der Versuchstiere erreicht werden, wobei dieser Effekt durch die Gegenpulsation alleine nicht erreicht werden konnte (PARADIS et al., 1994). In einem ähnlichen Modell mit Defibrillation nach Herzstillstand

konnte zudem nachgewiesen werden, daß die Wiederkehr der spontanen Herztätigkeit direkt von der applizierten Menge von U-PBHb[®] abhängig war (PARADIS, 1997). In einem weiteren Modell wurde bei Hunden ein hämorrhagischer Schock – wie in der vorliegenden Arbeit an Hamstern – innerhalb von fünf Minuten induziert und nach 45 Minuten durch Flüssigkeitszufuhr behandelt. Hier konnte schon durch geringe Mengen von U-PBHb[®] ein physiologischer MAP wieder erreicht werden, die zusätzliche Anwendung von hypertonischer Kochsalzlösung (NaCl 7,5 %) führte dort allerdings zu einer weiteren Verbesserung des Blutflusses (DE FIGUEIREDO et al., 2001). Die Volumentherapie mit DCLHb[®] nach hämorrhagischem Schock bei Ratten führte ebenfalls zum Ansteigen des MAP über das Ausgangsniveau (PRZYBELSKI et al., 1991). Außerdem wurde auch für DCLHb[®] an einem Modell mit septischem Schock ein dosisabhängiger Vasopressor-Effekt gezeigt, der jedoch keine Auswirkungen auf den Herzindex hatte (CRETEUR et al., 2000). Unter den Bedingungen einer induzierten relevanten Koronarstenose und eines hämorrhagischen Schockes konnte bei Hausschweinen durch die Behandlung mit DCLHb[®] ein vollständiges Überleben der Tiere erreicht werden, während die Hälfte der mit Humanalbumin behandelten Tiere innerhalb von 20 Minuten an Linksherzversagen verstarb (HABLER et al., 2000). Eine Verbesserung der linksventrikulären Pumpfunktion konnte hier allerdings auch nicht beobachtet werden (PAPE et al., 2001). Als Ursache des durch die Bindung von NO[•] an Hämoglobin vermittelten Blutdruckanstiegs kann das Vorhandensein von Hämoglobin-Tetrameren in den Lösungen gelten, da die Tetramere auch bei intaktem Endothel extravasieren können (KEIPERT et al., 1994). Bei einer intermolekular verknüpften Lösungen aus pyridoxyliertem humanem Hämoglobin wurden alle Tetramere aus der Präparation entfernt und kein Blutdruckanstieg beobachtet (GOULD et al., 1997; CHANG, 1997).

5.2.3.2 Mikrohämodynamik

Nach Induktion des hämorrhagischen Schockes wurde nur für eine Gruppe vor Beginn der jeweiligen Behandlung (in diesem Fall sollte U-PBHb[®] verabreicht werden) eine signifikante Verminderung des arteriolen Gefäßdurchmessers beobachtet. Durch die Behandlung wurde dieser Unterschied nivelliert, so daß insgesamt nicht von relevanten Veränderungen ausgegangen werden kann. In wie weit hier auch das Versuchsprotokoll Einfluß hat, wurde bereits diskutiert (siehe 5.2.2.2). Allerdings waren die beobachteten Blutdrucksteigerungen (siehe 5.2.2.1 und 5.2.3.1) jeweils von deutlich längerer Dauer als die beobachtete Konstriktion der Arteriolen (NOLTE et al., 1997a; VUYLSTEKE et al., 2001). Ein Überlegenheit

von DCLHb[®] gegenüber der Applikation von nicht hämoglobinhaltigen Lösungen wurde in der Wiederherstellung der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in postkapillären Venolen beobachtet. Wie nach Applikation von autologem Blut wurde 30 Minuten nach Wiederbelebung das Ausgangsniveau erreicht, was nach Behandlung mit U-PBHb[®] – ähnlich wie in einem Schockmodell an Hunden – nicht der Fall war (DE FIGUEIREDO et al., 2001).

5.2.3.3 Leukozyten/Endothel-Interaktion

Die Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel der postkapillären Venolen gilt – wie bereits erwähnt – als unabhängig von Blutflußgeschwindigkeit (SACK et al., 1987; LEHR et al., 1991a; MENGER et al., 1991; NOLTE et al., 1991a, 1991b) und mikrovaskulärem Hämatokrit (INTAGLIETTA, 1989). Die nach isovolämischer Hämodilution mit den untersuchten Lösungen beobachtete Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel der postkapillären Venolen bleibt also im Vergleich zu den Ausgangsbedingungen durch die Hämatokritveränderung selbst unbeeinflusst. Somit ist auch die nach hämorrhagischem Schock und Wiederbelebung durch Ringer-Lösung, Dextran 60 oder die untersuchten Hämoglobinlösungen beobachtete Interaktion der Leukozyten mit dem Endothel der postkapillären Venolen mit den Ausgangsbedingungen vergleichbar. Auch dem Vergleich mit den mit autologem Blut behandelten Tieren stehen weder der unterschiedliche Hämatokrit noch eventuell unterschiedliche Blutflußgeschwindigkeiten entgegen. Weder unter physiologischen noch unter pathophysiologischen Bedingungen konnte eine durch die Anwendung von Hämoglobinlösungen verstärkte Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel postkapillärer Venolen festgestellt werden. Die Zahl der nicht-adhärenenten Leukozyten war vielmehr zwei Stunden nach Wiederbelebung mit DCLHb[®] bei den entsprechenden Tieren signifikant geringer als bei jenen, welche mit Ringer-Lösung behandelt worden waren. Auch nach vierstündiger Ischämie und Applikation von DCLHb[®] 15 Minuten vor Beginn der Reperfusion wurde in dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell im Vergleich zur Applikation von physiologischer Kochsalzlösung eine verminderte Anzahl am Endothel postkapillärer Venolen entlangrollender und adhärenenten Leukozyten beobachtet (PICKELMANN et al., 1998). Ebenso wurde in der Mikrozirkulation des Pankreas nach Wiederbelebung von Ratten mit DCLHb[®] keine vermehrte Leukozyten/Endothel-Interaktion gefunden (VON DOBSCHUETZ et al., 1999). Die auch unter physiologischen Bedingung frei im Blutsrom zirkulierenden Leukozyten sind zu etwa 70 % polymorphkernige neutrophile Granulozyten, die, wie auch das Endothel der postkapillären Venolen, unter den Reizen von Trauma,

Infektion oder Entzündung sowie beim Eindringen von Fremdstoffen innerhalb von Sekunden Adhäsionsmoleküle exprimieren und am Gefäßendothel adhären können (SIMON et GOLDSMITH, 2002). Weiterhin wurde nachgewiesen, daß aus dem Gefäßbett emigrierte Leukozyten auch bei dem in der vorliegenden Arbeit verwendeten Modell wesentlich für die Schädigung postischämischen Gewebes mitverantwortlich sind (PICKELMANN et al., 1999). Eine Schädigung der beobachteten Hautmuskulatur durch die beobachteten Lösungen erscheint somit ausgeschlossen.

5.2.3.4 Mikrovaskuläre Permeabilität

Das Ausmaß der Gewebeschädigung korreliert mit dem Ausmaß des Verlustes der Barrierefunktion des ischämisch geschädigten Gefäßendothels für Makromoleküle, da sich im perivaskulären Gewebe ein Ödem ausbildet (HARRIS et al., 1997). Nach hämorrhagischem Schock und Wiederbelebung konnten keine durch die jeweilige Behandlung verursachten relevanten Unterschiede und somit keine für die Gewebeintegrität nachteilige Wirkung der untersuchten Hämoglobinlösungen festgestellt werden. Eine Überlegenheit der untersuchten Hämoglobinlösungen konnte jedoch selbst gegenüber der rasch aus dem Gefäßbett eliminierten Ringer-Lösung ebenfalls nicht nachgewiesen werden. Es sei darauf verwiesen, daß eine Über- oder Unterlegenheit von DCLHb[®] gegenüber physiologischer Kochsalzlösung hinsichtlich schwerwiegender Komplikationen wie Nierenversagen auch in einer Multicenter-Studie beim additiven Einsatz der Hämoglobinlösung im Rahmen des Volumenmanagements nach hämorrhagischem Schock nicht nachgewiesen werden konnte, allerdings fielen nach der Applikation von DCLHb[®] vermehrt Herzrhythmusstörungen auf. Eine geringe, jedoch statistisch nicht signifikante Überlegenheit der Hämoglobinlösung war allerdings bei der 72-Stunden-Überlebensrate aufgefallen (PRZYBELSKI et al., 1999). Trotz des schon erwähnten Zusammenhangs zwischen einer vermehrten Leukozyten/Endothel-Interaktion und dem Verlust der Barrierefunktion des geschädigten Gefäßendothels handelt es sich um getrennt zu beeinflussende Parameter, wie auch für das in der vorliegenden Arbeit verwendete Modell nachgewiesen werden konnte (NOLTE et al., 1999). Bei den zitierten (siehe 5.2.3.3) Untersuchungen zur Mikrozirkulation des Rattenpankreas wurde die unter den Bedingungen des hämorrhagischen Schocks übliche Zunahme der Lipidperoxidation durch die Applikation von DCLHb[®] ebenfalls nicht verstärkt (VON DOBSCHUETZ et al., 1999). Als Ausdruck erhaltener Integrität der Gehirnfunktion wiesen Ratten nach Behandlung eines hämorrhagischen Schocks mit DCLHb[®] im Vergleich zur Behandlung mit autologem Blut

bzw. Humanalbumin oder Ringer-Lösung keine Defizite bei Orientierung, Auffinden von Nahrung und koordinierter Bewegung auf (PRZYBELSKI et al., 1990; BAUMAN et al., 1991). Als weiterer Hinweis für durch Hämoglobinlösungen nicht wesentlich gestörte Gewebeintegrität kann der sichere Nachweis der fehlenden renalen Ausscheidung von U-PBHb[®] gelten, das im Übrigen einer Pharmakokinetik erster Ordnung unterliegt und vom Retikuloendothelialen System eliminiert wird (HUGHES et al., 1996). Beim der isolierten Perfusion von Nieren wurde zudem ein länger anhaltender Funktionserhalt erreicht als mit einer konventionellen Perfusionslösung (WILLINGER et al., 1995).

5.2.3.5 Funktionelle Kapillardichte

Der schon nach isovolämischer Hämodilution beobachtete Rückgang der funktionellen Kapillardichte erklärt sich auch nach hämorrhagischem Schock zum Teil aus der Definition des Parameters (NOLTE et al., 1995b). In identischen Versuchsprotokollen wurde für DCLHb[®] im Vergleich zu Dextran 60 eine Homogenisierung der Gewebeeröpfung nachgewiesen. Die im hämorrhagischen Schock eingetretene Hypoxie des Rückenhaulmuskels wurde durch die Hämoglobinlösung ebenso effektiv behandelt wie durch die Retransfusion autologen Blutes (NOLTE et al., 1997b). Schließlich stellt auch die Behandlung des Organs Muskel durch ein verbessertes Sauerstoffangebot nach Ischämie und Reperfusion eine klinisch relevante Maßnahme zu Therapie des postischämischen Reperfusionsschadens dar (SIRSIÖ et al., 1993). Bei der Volumetherapie eines hämorrhagischen Schocks von Ratten wurde mit Hilfe der Autoradiographie nach Applikation U-PBHb[®] eine im Vergleich zu physiologischen Bedingungen nur leicht verstärkte Heterogenität der Gehirndurchblutung beobachtet, eine Störung der Gehirndurchblutung oder der cerebralen Glucoseverwertung konnte nicht nachgewiesen werden (WASCHKE et al., 1994). Die Applikation von DCLHb[®] zur Behandlung einer durch Schädel-Hirn-Trauma und nachfolgende Unterbindung beider Aa. carotidae für 30 Minuten hervorgerufenen, posttraumatischen Hirnschwellung führte im Vergleich zur Behandlung mit Humanalbumin neben einer Steigerung des craniellen Perfusionsdruck zu einer Zunahme cerebralen Blutflusses (PIPER et al., 1998).

5.3 Weitere Ergebnisse und klinischer Einsatz

Aufgrund der vielfältigen positiven Ergebnisse, die mit den auch in der vorliegenden Arbeit untersuchten Hämoglobinlösungen erzielt worden waren, wurden klinische Studien der Phasen I bis III begonnen, wobei Nebenwirkungen wie der von DCLHb[®] vermittelte MAP-Anstieg klinisch z. B. zur kardiovaskulären Stabilisierung während der Operation von Bauchortenaneurysmata genutzt wurde (GARRIOCH et al., 1999). Außerdem konnte bei der elektiven Versorgung infrarenaler Bauchortenaneurysmata durch den Einsatz von U-PBHb[®] der Bedarf an Blutkonserven reduziert werden: 27 % der Patienten, die innerhalb der ersten vier Tage nach Einsetzen der Transfusionspflichtigkeit bis zu 150 g U-PBHb[®] erhalten hatten, benötigten keine zusätzlichen Erythrozytenkonzentrate. Außer einem moderaten MAP-Anstieg wurden keine anderen Nebenwirkungen als bei der konventionellen Behandlung mit humanen Erythrozytenkonzentraten beobachtet (LA MURAGILA et al., 2000). Bei Patienten mit kardiochirurgischen Eingriffen konnte der Transfusionsbedarf in 34% der Fälle (49 Patienten) ausschließlich mit U-PBHb[®] befriedigt werden (LEVY et al., 2002). Unter ähnlichen Bedingungen wurde dieser Effekt auch für DCLHb[®] bei 19 % von 104 Patienten nachgewiesen (LAMY et al., 2000). In Zaïre wurde U-PBHb[®] bei neun Kindern zur Therapie von Auswirkungen der Sichelzellanämie eingesetzt. Bei fünf Kindern mit aplastischer Krise konnte ein signifikanter hämatopoetischer Effekt erzielt werden, bei vier Kindern mit vasookklusiver Krise kam es zu einer raschen Besserung der Schmerzen (FEOLA et al., 1992). Erwachsene, denen ohne Sichelzell-Krise U-PBHb[®] infundiert worden war, fielen bei körperlicher Belastung durch einen geringeren Anstieg der Herzfrequenz auf als jene, die physiologische Kochsalzlösung behandelt wurden waren (GONZALEZ et al., 1997). Zudem konnte gezeigt werden, daß Chemotherapeutika unter Raumluftbedingungen bei gleichzeitiger Applikation von U-PBHb[®] – wohl aufgrund der durch die Hämoglobinlösung verbesserten Sauerstoffversorgung der ansonsten hypoxischen Tumoreareale – wesentlich effektiver sind (TEICHER et al., 1993, 1994).

Auch die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit stützen die Auffassung, daß ein Einsatz der untersuchten Hämoglobinlösungen an Patienten mit starkem Blutverlust in Folge eines Traumas oder eines elektiven Eingriffs sowie mit Krankheitsbildern, die mit Ischämie und Hypoxie von Geweben einhergehen, möglich sei. Beim Einsatz von DCLHb[®] zur Versorgung von polytraumatisierten Patienten hatte die Applikation geringer Mengen der Hämoglobinlösung keine der bekannten unerwünschten Wirkungen bis hin zum Nierenversagen dafür aber Herzrhythmusstörungen hervorgerufen (PRZYBELSKI et al., 1999). Die Applikation von bis zu 1.000 ml während der ersten Stunde der Krankenhausbehandlung resultierte in einer erhöhten Sterblichkeit (46 %) innerhalb der ersten 28 Tage gegenüber der Infusion von physiologischer Kochsalzlösung (17 %). Die mit der Hämoglobinlösung

behandelten Patienten entwickelten zudem zu 72 % häufiger ein Multiorganversagen (SLOAN et al., 1999a). Bei der Analyse dieser Ergebnisse stellte sich heraus, daß 24 % der mit DCLHb[®] Patienten, denen nach der TRISS-Methode (trauma and injury severity score) ein Überleben vorhergesagt worden war verstarben, während von den mit physiologischer Kochsalzlösung initial behandelten Patienten nur 3 % unerwartet verstarben. Ein ähnliches Ergebnis brachte die Aufarbeitung nach der PTOS-Methode (Pennsylvania trauma outcome study): 30 % unerwartetes Versterben nach Applikation von DCLHb[®] und 8 % unerwartetes Versterben nach Applikation von physiologischer Kochsalzlösung. Bei der Aufarbeitung der Krankenakten fiel allerdings auf, daß 72 % der Verstorbenen einen traumatischen Herzstillstand erlitten, bei Aufnahme einen Glasgow-Coma-Score von 3 Punkten oder einen Base-Exzess von mehr als 15 mEq/l aufgewiesen hatten. Von den Todesfällen wurden 94 % als klinisch gerechtfertigt eingestuft (SLOAN et al., 2002). Der Einsatz von nur für Studien zugelassenen Hämoglobinlösungen im Rahmen der Polytraumaversorgung ist zudem besonders schwierig, da das Einverständnis der Patienten vorausgesetzt werden muß und erst nach erfolgreicher Behandlung eingeholt werden kann (SLOAN et al., 1999b, 1999c, LEWIS et al., 2001). Auch wenn für U-PBHb[®] nach wie vor keine publizierten Daten aus Phase-III-Studien verfügbar sind (STANDL, 2000, 2001) konnten die untersuchten Lösungen letztendlich in Phase-III-Studien die in sie gesetzten Erwartungen nicht erfüllen. Hierfür findet sich in der Literatur insbesondere für das vielfältig untersuchte DCLHb[®] keine schlüssige Ursache (WINSLOW, 2000). Da beispielsweise in den Vereinigten Staaten von Amerika ein Drittel der jährlich transfundierten ca. 10 Millionen Blutkonserven unter Notfallbedingungen eingesetzt wird (COHN, 1997), erscheint die Entwicklung einer von den Gesundheitsbehörden zugelassenen, auf Hämoglobin basierenden Blutersatzlösung für die Behandlung polytraumatisierter Patienten nach wie vor wünschenswert und für die nähere Zukunft hoch wahrscheinlich (ARNOLDO et MINEI, 2001).

6. Bewertung

In der vorliegenden Studie wurde die Wirkung verschiedener Hämoglobinlösungen auf die Mikrozirkulation im quergestreiften Rückenhautmuskel des Syrischen Goldhamsters unter verschiedenen Bedingungen erfaßt. Während unter den physiologischen Bedingungen von hypervolämischer Infusion und isovolämischer Hämodilution keine einschneidenden Veränderungen der Mikrozirkulation beobachtet werden konnten, fielen die untersuchten Hämoglobinlösungen bei ihrem Einsatz zur Volumenersatztherapie unter den pathophysiologischen Bedingungen des rasch induzierten, hämorrhagischen Schocks insbesondere durch einen transienten Anstieg des MAP und auch durch eine Verminderung der funktionellen Kapillardichte auf. Während der Blutdruckanstieg von einigen Autoren auch als wünschenswerte therapeutische Wirkung angesehen wird (BOURA et al., 2003) und durch Modifikation der Hämoglobinmoleküle weitgehend verhindert werden kann (SAKAI et al., 2000), tritt die Verminderung der funktionellen Kapillardichte in ihrer Bedeutung hinter den Effekt der Homogenisierung der Gewebeoxygenierung zurück (STEINHAUSER, 1994; NOLTE et al., 1995b; NOLTE et al., 1997b; BOTZLAR et al., 2002). So erscheint auch bei zumindest gleichbleibendem Bedarf an Blutkonserven (siehe 2.2.2) die Weiterentwicklung und der angestrebte klinische Einsatz von hämoglobinbasierten Blutersatzlösungen sinnvoll und wünschenswert. An den in der vorliegenden Studie untersuchten Hämoglobinlösungen wurde – bei ähnlichen Ergebnissen im Bereich der Mikrozirkulation des quergestreiften Rückenhautmuskels – von den jeweiligen Hersteller-Unternehmen sehr unterschiedlich weitergearbeitet.

Im Mai 1998 wurde das Unternehmen Somatogen[®], das sich bis dahin mit der Entwicklung einer aus rekombinant – d. h. gentechnisch – vermehrtem, humanen Hämoglobin hergestellten Infusionslösung beschäftigt hatte, durch Baxter[®] Healthcare Corporation aufgekauft (POTTER, 1998). Die Entwicklung einer aus nicht weiter verwendbarem, gespendetem menschlichen Blut produzierten Hämoglobinlösung – und somit die Entwicklung des Produktes HemAssist[®] (DCLHb[®]) – wurde in der Folge eingestellt. Seit September 1998 wird von Baxter[®] Healthcare Corporation auf der Basis des für den Hersteller nun verfügbaren, gentechnisch

gewonnenen Hämoglobins weiter an der Entwicklung einer zulassungsfähigen Hämoglobinlösung gearbeitet (BAXTER[®], 2003).

Im Gegensatz dazu konnte die Biopure[®] Corporation, die bereits im Januar 1998 von der U. S. Food and Drug Administration für eine aus bovinem Hämoglobin hergestellte Hämoglobinlösung (Oxyglobin[®]) die veterinärmedizinische Marktzulassung zur Behandlung von Anämien jedweder Ursache bei Hunden erhalten hatte, im April 2001 in der Republik Südafrika durch den South Africa's Medicine Control Council die humanmedizinische Marktzulassung für U-PBHb[®] als Hemopure[®] zur Behandlung von perioperativen Anämien erreichen. Die Zulassung gibt ausdrücklich die Verzögerung, die Verminderung oder den Ersatz von Bluttransfusionen als Indikationen an. Am 31.07.2002 wurde schließlich die humanmedizinische Marktzulassung für diese Indikationen auch in den Vereinigten Staaten von Amerika bei der U. S. Food and Drug Administration beantragt; der Antrag wurde am 01.10.2002 zur Überprüfung zugelassen. Das in den Vereinigten Staaten von Amerika nach wie vor hohe öffentliche Interesse an einer bei Raumtemperatur und über große Zeiträume stabilen, sauerstofftragenden und Blutverluste ausgleichenden Infusionslösung zeigt sich neben den für den Hersteller in den Fiskaljahren 2002 und 2003 vom Kongress genehmigten staatlichen Zuwendungen auch in der finanziellen Unterstützung (U. S. Army Medical Research Acquisition Activity Grant DAMD17-02-1-0697) sowie in der Zusammenarbeit (Cooperative Research and Development Agreement; U. S. Naval Medical Research Center) mit militärischen Einrichtungen (BIOPURE[®], 2003).

7. Zusammenfassung

Für das Überleben eines Organismus ist die Versorgung mit Sauerstoff entscheidend, da Ischämie und Hypoxie durch Versagen der mikrovaskulären Perfusion zum Zelltod führen. Ein lange verfolgtes Ziel ist die Entwicklung sauerstofftragender Blutersatzlösungen, denen der klinische Erfolg aufgrund verschiedener Problemkreise wie Nephrotoxizität, systemischer Aktivierung der Komplementkaskade, Vasokonstriktion und anderen Nebenwirkungen bisher versagt geblieben war. Um die Unbedenklichkeit und Wirksamkeit der heute vorhandenen Lösungen nachzuweisen, bedarf es unter anderem der quantitativen Erfassung der Mikrozirkulation als einem entscheidenden Parameter für die Gewebeintegrität.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Rückenhautkammermodell des Hamsters verwendet, um die Effekte von bovinen und humanen Hämoglobinlösungen auf die Mikrozirkulation im quergestreiften Rückenhautmuskel mit Hilfe computer-gestützter Auswerteverfahren quantitativ zu analysieren. Dies geschah sowohl unter physiologischen Bedingungen durch eine hypervolämische Infusion von ca. 10 % des errechneten Blutvolumens bzw. durch isovolämische Hämodilution auf einen Hämatokrit von ca. 25 % als auch unter pathophysiologischen Bedingungen: als Stressmodell wurde durch unfraktionierten Entzug von 50 % des errechneten Blutvolumens innerhalb weniger Minuten ein hämorrhagischer Schock induziert, welcher durch Volumensubstitution mit den entsprechenden Lösungen behandelt wurde.

Unsere Ergebnisse zeigen, daß die Anwendung der untersuchten Hämoglobinlösungen unter physiologischen Bedingungen die Mikrozirkulation nicht beeinträchtigt. Unter pathophysiologischen Bedingungen bewirken sie gegenüber gebräuchlichem Volumenersatz mit Ringer-Lösung eine verbesserte Erholung des Blutflusses. Eine Gewebepерfusion, wie sie durch Retransfusion autologen Blutes erreicht werden kann, wurde mit den Hämoglobinlösungen jedoch nicht erzielt; dennoch wurde durch die spezifischen Eigenschaften der Hämoglobinlösungen eine ausreichende Gewebeatmung sichergestellt. Die untersuchten Hämoglobinlösungen konnten in der klinischen Erprobung zwar bei elektiven Eingriffen mit eingeplantem großen Blutverlust, nicht jedoch in der

Polytraumaversorgung erfolgreich eingesetzt werden. Die Entwicklung einer auch hierfür geeigneten sauerstofftragenden Blutersatzlösung wird weiterhin angestrebt.

8. Summary

Effects of stroma free hemoglobin solutions on microcirculation in the striated dorsal skin muscle of the hamster.

Since ischemia and hypoxia lead to cellular necrosis by failure of microvascular perfusion, oxygen delivery to the tissue is crucial for survival of the organism. For decades there was pursuit of developing oxygen carrying blood substitutes, but the breakthrough of stroma free hemoglobin solutions has failed due to different issues such as nephrotoxicity, systemic activation of complement cascade, vasoconstriction and other side effects. To prove the in vivo safety and efficiency of the solutions available to date, quantitative analysis of the microcirculation is needed as a crucial parameter of tissue integrity. In the present study, the skin fold chamber model of the hamster was used to investigate the effects of bovine and human hemoglobin solutions on the microcirculation of the striated dorsal skin muscle by means of computer assisted microcirculation analysis. This was done under physiologic conditions by a hypervolemic infusion of appr. 10 % of the calculated blood volume, and by an isovolemic hemodilution to a hematocrit of appr. 25 %, respectively. For pathophysiologic conditions a hemorrhagic shock as a stress model was induced by non-fractionated withdrawal of half the calculated blood volume within a few minutes, and treated by volume substitution with the respective solutions. Our results demonstrate that the application of the investigated hemoglobin solutions under physiologic conditions does not impair the microcirculation. Under pathophysiologic conditions they lead to an improved recovery of blood flow as compared to common volume substitutes. However, the level of tissue perfusion provided by retransfusion of autologous blood was not achieved by treatment with the hemoglobin solutions. Nevertheless, a sufficient tissue oxygenation was warranted by the specific properties of the hemoglobin solutions. In clinical trials the studied hemoglobin solutions were effective in elective surgery with expected major blood loss but not in trauma patients. The development of an oxygen carrying blood substitute suitable for trauma patients is still being pursued.

9. Literaturverzeichnis

AJISAKA, K., AND Y. IWASHITA. Modifaction of human hemoglobin with polethylene glycol: a new candidate for blood substitute. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 97: 1076-1081, 1980.

ALGIRE, G. H. An adaption of a transparent chamber-technique to the mouse. *J. Natl. Cancer Inst.* 4: 1-11, 1943.

ALGIRE, G. H., AND F. Y. LEGALLAIS. Growth rate of transplantable tumor in relation to latent period and host vascular reaction. *Cancer Res.* 7: 724-734, 1947.

ALGIRE, G. H., AND R. M. MERWIN. Vascular patterns in tissue after grafts within transparent chambers in mice. *Angiology* 6: 311-318, 1955.

ALTURA, B. M., B. T. ALTURA, A. CARELLA, P. D. TURLAPATY, AND J. WEINBERG. Vascular smooth muscle and general anesthetics. *Fed. Proc.* 39: 1584-1591, 1980.

AMBERSON, W. R., A. G. MULDER, F. R. STEGGERDA, J. FLEXNER, AND D. S. PANKRATZ. Mammalian life without red blood corpuscles. *Science* 78: 106, 1933.

AMBERSON, W. R. Blood substitutes. *Biol. Rev.* 12: 48-86, 1937.

AMBERSON, W. R., J. J. JENNINGS, C. M. RHODES. Clinical Experience with Hemoglobin-Saline Solutions. *J. Appl. Physiol.* 1: 469-489, 1949.

APPELGREEN, K. L., AND D. H. LEWIS. Capillary flow and capillary transport in dog skeletal muscle in hemorrhagic shock. *Eur. Surg. Res.* 4: 29-45, 1972.

ARNOLDO, B. D., AND J. P. MINEI. Potential of hemoglobin-based oxygen carriers in trauma patients. *Curr. Opin. Crit. Care* 7: 431-436, 2001.

ARNONE, A., R. E. BENESCH, AND R. BENESCH. Structure of human deoxyhemoglobin specifically modifies with pyridoxal compounds. *J. Mol. Biol.* 5: 627-642, 1977.

ASAISHI, K., B. ENDRICH, A. GOETZ, AND K. MESSMER. Quantitative analysis of microvascular structure and function in the amelanotic melanoma A-Mel-3. *Cancer Res.* 41: 1898-1904, 1981.

AUBUCHON, J. P., J. D. BIRKMEYER, AND M. P. BUSCH. Cost-effectiveness of expanded human immunodeficiency virus-testin protocols for donated blood. *Transfusion* 37: 45-51, 1997.

BALDINGER, V. Mikroangiodynamik und Gewebeoxygenierung bei normovolämischer Hämodilution mit kristalloiden und kolloidalen Lösungen. Eine Experimentelle Studie an der Rückenhautkammer des wachen Hamsters. Inauguraldissertation aus der Veterinärmedizinischen Fakultät, Universität Giessen, 1986.

BARROSO-ARANDA, J., AND G. W. SCHMID-SCHÖNBEIN. Transformation of neutrophils as indicator of irreversibility in hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol.* 257: H846- H852, 1989.

BAUMAN, R.A., R. J. PRZYBELSKI, AND M. J. BOUNDS. The effects of alpha-alpha cross-linked hemoglobin on the feeding and locomotor activity of rats. *Physiol. Behav.* 50: 205-211, 1991.

BAXTER[®] HEALTHCARE CORPORATION (BAXTER[®]). www.baxter.com, 2003.

BEHRINGER, R. R., T. M. RYAN, M. P. REILLY, T. ASAKURA, R. D. PALMITER, R. L. BRINSTER, AND T. M. TOWNES. Synthesis of functional human hemoglobin in transgenic mice. *Science* 245: 971-973, 1989.

BENESCH, R., AND R. E. BENESCH. Intracellular organic phosphates as regulators of oxygen release by haemoglobin. *Nature* 221: 618-622, 1969.

BENESCH, R. E., R. BENESCH, A. BANK, A. RENTHAL, AND B. A. BRAX. The preparation and properties of pyridoxalated hemoglobin. In: *Proc. 1st Inter-American Symp. Hemoglobins, Caracas 1969. Genetical, Functional and Physical Studies*. Karger, Basel, p. 134, 1971.

BENESCH, R. E., R. BENESCH, A. BANK, R. D. RENTHAL, AND N. MAEDA. Affinity labeling of the polyphosphate binding site of hemoglobin. *Biochemistry* 11: 3576-3582, 1972.

BENESCH R., R. E. BENESCH, S. YUNG, AND R. EDALJI. Hemoglobin covalently bridged across the polyphosphate binding site. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 63: 1123-1129, 1975.

BENESCH, R. E., AND R. BENESCH. Preparations and properties of hemoglobin modified with derivatives of pyridoxal. In: *Methods of Enzymology. Hemoglobins*, edited by E. Antonini, L. Rossi-Bernardi, and E. Chiancone. Academic Press, New York (NY), pp. 147-158, 1981.

BENESCH, R. E., R. BENESCH, AND S. KWONG. Labeling of hemoglobin with pyridoxal phosphate. *J. Biol. Chem.* 257: 1320-1324, 1982.

BEVILACQUA, M. P., AND R. M. NELSON. Selectins. *J. Clin. Invest.* 91: 379-387, 1993.

BIOPURE[®] CORPORATION (BIOPURE[®]). www.biopure.com, 2003.

BOHR, C., K. A. HASSELBALCH, AND A. KROGH. Über einen in biologischer Beziehung wichtigen Einfluß, den die Kohlensäurespannung des Blutes auf dessen Sauerstoffbindung übt. *Scand. Arch. Physiol.* 16: 402-412, 1904.

BOTZLAR A., P. STEINHAUSER, AND D. NOLTE. Effects of ultra-purified polymerized bovine hemoglobin on local tissue oxygen tension in striated skin muscle - an efficacy study in the hamster. *Eur. Surg. Res.* 34: 106-113, 2002.

BOURA, C., A. CARON, D. LONGROIS, P. M. MERTES, P. LABRUDE, AND P. MENU. Volume expansion with modified hemoglobin solution, colloids, or crystalloid after hemorrhagic shock in rabbits: effects in skeletal muscle oxygen pressure and use versus arterial blood velocity and resistance. *Shock* 19: 176-182, 2003.

BUCCHI, E., A. RAZYNSKA, B. URBAITIS, AND C. FRONTICELLI. Pseudo cross-link of human hemoglobin with mono-(3,5-dibromosalicyl)fumarate. *J. Biol. Chem.* 264: 6191-6195, 1989.

BUCHER, J. R., M. TIEN, AND S. D. AUST. The requirement for ferric in the initiation of lipidperoxidation by chelated ferrous iron. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 111: 777-784, 1983.

BUNN, H. F. Differences in the interaction of 2,3-diphosphoglycerate with certain mammalian hemoglobins. *Science* 172: 1049-1050, 1971.

BRYSON, G. L., A. LAUPACIS, AND G. A. WELLS. Does acute normovolemic hemodilution reduce perioperative allogenic transfusion? A meta-analysis. The International Study of Perioperative Transfusion. *Anesth. Analg.* 86: 9-15, 1998.

CHANG, T. M. S. Attempts to find a method to prepare artificial hemoglobin corpuscles. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 16: 1-9, 1988.

CHANG, T. M., AND R. VARMA. Effect of a single replacement of one of Ringer lactate, hyperoncotic saline/dextran, 7 g % albumin, stroma-free hemoglobin, o-raffinose polyhemoglobin or whole blood on the long term survival of unanesthetized rats with lethal hemorrhagic shock after 67 % acute blood loss. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 20: 503-510, 1992.

CHANG, T. M., C. LISTER, T. NISHIYA, AND R. VARMA. Immunological effects of hemoglobin, encapsulated hemoglobin, polyhemoglobin and conjugated hemoglobin using different immunization schedules. *Biomater. Artif. Cells Immobil. Biotechnol.* 20: 611-618, 1992.

CHANG, T. M. S. What are the present modified hemoglobin products being tested in clinical trials in patients? In: *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials – Volume I*, edited by T. M. S. Chang. Karger, Basel, pp. 73-82, 1997.

CHATTERJEE, R., E. V. WELTY, R. Y. WALDER, S. L. PRUITT, P. H. ROGERS, A. ARONE, AND J. A. WALDER. Isolation and Characterization of a New Hemoglobin Derivate Cross-linked between the α Chains (Lysin 99 α_1 \rightarrow Lysin 99 α_2). *J. Biol. Chem.* 261: 9929-9937, 1986.

CLARK E. L. Observations on changes in blood vascular endothelium in the living animal. *Am. J. Anat.* 57: 385-438, 1935.

CLARK, L. C., AND F. GOLLAN. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* 152: 1755-1756, 1966.

CLARK JR., L. C., E. P. WESSELER, S. KAPLAN, M. L. MILLER, C. BECKER, C. EMORY, L. STANLEY, F. BECATTINI, AND V. OBROCK. Emulsions of perfluorinated solvents for intravascular gas transport. *Fed. Proc.* 34: 1468-1477, 1975.

COGHLAN, D., G. JONES, K. A. DENTON, M. T. WILSON, B. CHAN, R. HARRIS, J. R. WOODROW, AND J. E. OGDEN. Structural and functional characterisation of recombinant haemoglobin A expressed in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur. J. Biochem.* 207: 931-936, 1992.

COHN, E. J. The separation of blood into fractions of therapeutic value. *Ann. Intern. Med.* 26: 341-352, 1947.

COHN, S. M. The current status of haemoglobin-based blood substitutes. *Ann. Med.* 29: 371-376, 1997.

COLANTUONI, A., S. BERTUGLIA, M. INTAGLIETTA, AND J. F. GROSS. Microangiodynamics in the artifact-free microcirculation. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 1: 265-266, 1982.

COLE, D. J., R. M. SCHELL, R. J. PRZYBELSKI, J. C. DRUMMOND, AND K. BRADLEY. Focal cerebral ischemia in rats – Effects of hemodilution with α - α cross-linked hemoglobin on CBF. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 12: 971-976, 1992.

COLE, D. J., R. M. SCHELL, C. DRUMMOND, AND L. REYNOLDS. Focal cerebral ischemia in rats – Effects of hypervolemic hemodilution with diaspirin cross-linked hemoglobin versus albumin on brain injury and edema. *Anesthesiology* 78: 335-342, 1993.

COLE, D. J., R. M. SCHELL, AND J. C. DRUMMOND. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb): effect of hemodilution during focal cerebral ischemia in rats. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 813-818, 1994.

COLLINS. P., J. BURMAN, H. I. CHUNG, AND K. FOX. Hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in human coronary arteries in vivo. *Circulation* 87: 80-85, 1993.

CONZEN, P. F., J. HOBBAHN, A. E. GOETZ, P. GONSCHIOR, G. SEIDL K. PETER, AND W. BRENDDEL. Regional blood flow and tissue oxygen pressures of the collateral-dependent myocardium during isoflurane anesthesia in dogs. *Anesthesiology* 70: 442-452, 1989 a.

CONZEN, P. F., J. HOBBAHN, A. E. GOETZ, H. HABAZETTL T. GRANETZNY K. PETER, AND W. BRENDDEL. Myocardial contractility, blood flow, and oxygen consumption in healthy dogs during anesthesia with isoflurane or enflurane. *J. Cardiothorac. Anesth.* 3: 70-77, 1989 b.

CRETEUR, J., H. ZHANG, D. DE BACKER, Q. SUN, AND J. L. VINCENT. Diaspirin cross-linked hemoglobin improves oxygen extraction capabilities in endotoxic shock. *J. Appl. Physiol.* 89: 1437-1444, 2000.

CURTIS, S. E., B. P. FUHRMAN, D. F. HOWLAND, M. DE FRANCISIS, AND E. K. MOTOYAMA. Cardiac output during liquid (perfluorocarbon) breathing in newborn piglets. *Crit. Care Med.* 19: 225-230, 1991.

DE FIGUEIREDO, L. F., R. J. CRUZ JR., A. C. NETO, M. M. YADA-LANGUI, AND M. ROCHA E SILVA. Initial management of severe hemorrhage with an oxygen-carrying hypertonic saline solution. *Artif. Organs* 25: 922-927, 2001.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (DHHS) – U.S. PUBLIC HEALTH SERVICE ADVISORY COMMITTEE ON BLOOD SAFETY AND AVAILABILITY. Eight Meeting. The reserve capacity of the nation's blood supply. <http://www.hhs.gov/bloodsafety>, 1999.

DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES (DHHS). Improving blood safety and supply in the U.S. <http://www.hhs.gov/news/press/2001pres/01fsbloodsafety.html>, 2001.

DE VENUTO. F., A. I. ZEGNA, AND K. R. BUSSE. Lyophilization of crystalline hemoglobin solution and exchange transfusions with lyophilized, reconstituted hemoglobin. *Surg. Gynecol. Obstet.* 148: 69-75, 1979.

DE VENUTO, F., AND A. I. ZENGA. Blood exchange with pyridoxalated and polymerized hemoglobin solution. *Surg. Gynecol. Obstet.* 155: 342-346, 1982.

DE VENUTO, F., AND A. I. ZENGA. Preparation and evaluation of pyridoxalated-polymerized human hemoglobin. *J. Surg. Res.* 34: 205-212, 1983.

DONAHUE, J. G., A. MUNOZ, P. M. NESS, D. E. BROWN, D. H. YAWN, H. A. MCALLISTER, B. A. REITZ, AND K. E. NELSON. The declining risk of post-transfusion hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* 327: 369-373, 1992.

DUNLAP, E., L. FARRELL, C. NIGRO, T. ESTEP, G. MARCHAND, AND K., BURHOP. Resuscitation with Diaspirin Crosslinked Hemoglobin in a pig model of hemorrhagic shock. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 23: 39-61, 1995.

DZIK, W. H. Mononuclear cell microchimerism and the immunomodulatory effect of transfusions. *Transfusion* 34: 1007-1012, 1994.

EBNET, K., AND D. VESTWEBER. Molecular mechanisms that control leukocyte extravasation: the selectins and the chemokines. *Histochem. Cell. Biol.* 112: 1-23, 1999.

ENDRICH, B., K. ASAISHI, A. GOETZ, AND K. MESSMER. Technical report - A new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res. Exp. Med.* 177: 125-134, 1980.

ENDRICH, B. Mikrozirkulation maligner Tumoren. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät, Universität Heidelberg, 1984.

ERNI, D., H. SAKAI, A. G. TSAI, A. BANIC, G. H. SIGURDSSON, AND M. INTAGLIETTA. Haemodynamics and oxygen tension in the microcirculation of ischaemic skin flaps after neural blockade and haemodilution. *Br. J. Plast. Surg.* 52: 565-572, 1999.

FAASSEN, A. E., S. R. SUNDBY, S. S. PANTER, R. M. CONDIE, AND B. E. HEDLUND. Hemoglobin: a lifesaver and oxidant. How to tip the balance. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 16: 93-104, 1988.

FANTL, W., L. R. MANNING, H. UENO, A. DI DONATO, AND J. M. MANNING. Properties of Carboxymethylated Cross-linked Hemoglobin A. *Biochemistry* 26: 5755-5761, 1987 a.

FANTL, W., A. DI DONATO, J. M. MANNING, AND P. H. ROGERS. Specifically Carboxymethylated Hemoglobin as an Analogue of Carbamino Hemoglobin. Solution & X-Ray Studies of Carboxymethylated Hemoglobin and X-Ray Studies of Carbamino Hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 262: 12700-12713, 1987 b.

FEOLA, M., H. GONZALES, P. C. CANIZARO, D. BINGHAM, AND P. PERIMAN. Development of a bovine stroma-free hemoglobin solution as a blood substitute. *Surg. Gynecol. Obstet.* 157: 399-408, 1983.

FEOLA, M., J. SIMONI, M. DOBKE, AND P. C. CANIZARO. Complement activation and the toxicity of stroma-free hemoglobin solution in primates. *Circ. Shock* 25: 275-290, 1988.

FEOLA, M., J. SIMONI, R. ANGELLINO, Z LUHRUMA, M. KABAKELE, M. MANZOMBI, AND K. KALUILA. Clinical trial of a hemoglobin based blood substitute in patients with sickle cell anemia. *Surg. Gynecol. Obstet.* 174: 379-386, 1992.

FLAIM, S. Perflubron-based emulsion: efficacy as temporary oxygen carrier. In: *Advances in Blood Substitutes: Industrial Opportunities and Medical Challenges*, edited by R. Winslow, K. Vandegriff, and M. Intaglietta. Birkhäuser, Boston (MA), pp. 91-132, 1997.

FRATANTONI, J. C. Points to consider the safety evaluation of hemoglobin-based oxygen carriers. *Transfusion.* 31: 369-371, 1991.

FRONTICELLI, C., E. BUCCI., AND C. ORTH Solvent regulation of oxygen affinity in hemoglobin. *J. Biol. Chem.* 259: 10841-10844, 1984.

FUNK, W. UND M. INTAGLIETTA. Spontane arterioläre Vasomotion. In: *Vasomotion und quantitative Kapillaroskopie*, herausgegeben von K. Messmer und F. Hammersen, Karger, Basel, pp. 74-93, 1983.

FUNK, W., B. ENDRICH, K. MESSMER, AND M. INTAGLIETTA. Spontaneous arteriolar vasomotion as a determinant of peripheral vascular resistance. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 2: 11-25, 1983.

GARRIOCH, M. A., J. H. MCCLURE, AND J. A. WILDSMITH. Haemodynamic effects of diaspirin crosslinked haemoglobin (DCLHb) given before abdominal aortic aneurysm surgery. *Br. J. Anaesth.* 83: 702-707, 1999.

GONZALEZ, P., A. C. HACKNEY, S. JONES, D. STRAYHORN, E. B. HOFFMAN, G. HUGHES, E. E. JACOBS, AND E. P. ORRINGER. A phase I/II study of polymerized bovine hemoglobin in adult patients with sickle cell disease not in crisis at the time of study. *J. Investig. Med.* 45: 258-264, 1997.

GOODALL, C. M., A. G. SANDERS, AND P. SHUBIK. Studies of vascular patterns in living tumors with transparent chambers inserted in hamster cheek pouch. *J. Natl. Cancer Inst.* 35: 497-521, 1965.

GOULD, S. A., A. L. ROSEN, L. R. SEHGAL, H. L. SEHGAL, AND G. S. MOSS. Polymerized pyridoxylated hemoglobin: Efficacy as an O₂ carrier. *J. Trauma* 26: 903-908, 1986.

GOULD, S. A., L. R. SEHGAL, H. L. SEHGAL, R. DEWOSKIN, AND G. S. MOSS. The clinical development of human polymerized hemoglobin. In: *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trial – Volume II*, edited by T. M. S. Chang. Karger, Basel, pp. 12-38, 1997.

GRANGER, D. N. Role of xanthinoxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 255: H1269-H1275, 1988.

GRANGER, D. N., J. N. BENOIT, M. SUZUKI, AND M. B. GRISHAM. Leukozyte adherence to venular endothelium during ischemia-reperfusion. *Am. J. Physiol.* 257: G683-G688, 1989.

GRISHAM, M. B., C. VON RITTER, B. F. SMITH, J. T. LAMONT, AND D. N. GRANGER. Interaction between oxygen radicals and gastric mucin. *Am. J. Physiol.* 253: G93-G96, 1987.

GULATI, A., AND A. C. SHARMA. Prazosin blocks the pressor but not the regional circulatory effects of diaspirin crosslinked hemoglobin. *Life Sci.* 55: 121-130, 1994.

GULATI, A., A. C. SHARMA, AND K. E. BURHOP. Effect of stroma-free hemoglobin and diaspirin cross-linked hemoglobin on the regional circulation and systemic hemodynamics. *Life Sci.* 55: 827-837, 1994.

GULATI, A., AND S. REBELLO. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb™): Involvement of adrenergic mechanisms in the pressor effect. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 603-612, 1994.

GULATI, A., G. SINGH, S. REBELLO, AND A. C. SHARMA. Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci.* 56: 1433-1442, 1995.

HABAZETTL, H., P. F. CONZEN, J. HOBBAHN, T. GRANETZNY, A. E. GOETZ, K. PETER, AND W. BRENDL. Left ventricular oxygen tensions in dogs during coronary vasodilation by enflurane, isoflurane and dipyridamole. *Anesth. Analg.* 68: 286-294, 1989.

HABLER, O. UND K. MESSMER. Verfahren zur Reduktion von Fremdbluttransfusionen in der operativen Medizin. *Anaesthesist* 46: 915-926, 1997.

HABLER, O., M. KLEEN, J. HUTTER, A. PODTSCHASKE, M. TIEDE, G. KEMMING, M. WELTE, C. CORSO, S. BATRA, P. KEIPERT, S. FAITHFULL, AND K. MESSMER. IV Perflubron emulsion versus autologous transfusion in severe normovolemic anemia: effects on left ventricular perfusion and function. *Res. Exp. Med.* 197: 301-318, 1998.

HABLER, O., M. KLEEN, A. PAPA, F. MEISNER, G. KEMMING, AND K. MESSMER. Diaspirin-crosslinked hemoglobin reduces mortality of severe hemorrhagic shock in pigs with critical coronary stenosis. *Crit. Care Med.* 28: 1889-1898, 2000.

HAMMERSEN, F., J. H. BARKER, A. GIDLÖF, M. D. MENGER, E. HAMMERSEN, AND K. MESSMER. The ultrastructure of microvessels and their contents following ischemia and reperfusion. *Prog. Appl. Microcirc.* 13: 1-26, 1989.

HARRINGER W., G. T. HODAKOWSKI, T. SVIZZERO, E. E. JACOBS JR., AND G. J. VLAHAKES. Acute effects of massive transfusion of a bovine hemoglobin blood substitute in a canine model of hemorrhagic shock. *Eur. J. Cardiothorac. Surg.* 6: 649-654, 1992.

HARRIS, A. G., R. LEIDERER, F. PEER AND K. MESSMER. Skeletal muscle microvascular and tissue injury after varying durations of ischemia. *Am. J. Physiol.* 271: H2388-H2398, 1996.

HARRIS, A. G., M. STEINBAUER, R. LEIDERER AND K. MESSMER. Role of leukocyte plugging and edema in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am. J. Physiol.* 273: H989-H996, 1997.

HARVEY, W. *Exercitatio Anatomica de Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus*. Leach, London, p. 86, 1653.

HEISS, M. M., P. FRAUNBERGER, C. DELANOFF, R. STETS, H. ALLGAYER, M. A. STROHLEIN, A. TARABICHI, E. FAIST, K. W. JAUCH, AND E. W. SCHILDBERG. Modulation of immune response by blood transfusion. Evidence for a differential effect of allogeneic and autologous blood in colorectal cancer surgery. *Shock* 8: 402-408, 1997.

HESS, J. R., V. W. MACDONALD, AND W. W. BRINKLEY. Systemic Pulmonary Hypertension after Resuscitation with Cell-Free Hemoglobin. *Appl. Physiol.* 74: 1769-1778, 1993.

HESS, J. R., V. W. MACDONALD, C. L. GOMEZ, AND V. G. COPPES. Increased vascular resistance with hemoglobin-based oxygen carriers. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 361-372, 1994.

HOLLINGSWORTH, M. W. Blood transfusion by Richard Lower in 1665. *Ann. Med. Hist.* 10: 213-225, 1928.

HOYT, D. B., A. G. GREENBURG, G. W. PESKIN, S. FORBES, AND H. REESE. Resuscitation with pyridoxalated stroma-free hemoglobin: tolerance to sepsis. *J. Trauma* 21: 938-942, 1981.

HSIA, C. J., S. S. ER, L. J. HRONOWSKI, K. PERSAUD, AND M. R. ANSARI. ATP-hemoglobin purification by ATP-agarose affinity chromatography. *J. Chromatogr.* 381: 153-157, 1986.

HUGHES, G. S. JR., E. J. ANTAL, P. K. LOCKER, S. F. FRANCOM, W. J. ADAMS, AND E. E. JACOBS JR.. Physiology and pharmacokinetics of a novel hemoglobin-based oxygen carrier in humans. *Crit. Care Med.* 24: 756-764, 1996.

INTAGLIETTA, M., AND W. R. TOMPKINS. Capillary video red blood cell velocimetry by cross-correlation and spatial filtering. *Microvasc. Res.* 34: 108-115, 1987.

INTAGLIETTA, M. Wiederherstellung der Mikrozirkulation nach Ischämie. In: *Ischämie und Reperfusion*, herausgegeben von F. Hammersen und K. Messmer. Karger, Germering, p. 28, 1989.

INTAGLIETTA, M. Arteriolar Vasomotion – Implications for Tissue Ischemia. *Blood Vessels* 28: 1-7, 1991.

IWASAKI, K., K. AJISAKA, AND Y. IWASHITA. Hemoglobin-inulin conjugate as an oxygen carrying blood substitute. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 113: 513-518, 1983.

JACKSON, J. C., T. A. STANDAERT, W. E. TRUOG, AND W. A. HODSON. Full-tidal liquid ventilation with perfluorocarbons for prevention of lung injury in newborn non-human primates. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 1121-32, 1994.

JESCH, F., B. ENDRICH, AND K. MESSMER. Oxygen transport and hemodynamics of stroma-free hemoglobin solutions. *Adv. Exp. Med. Biol.* 75: 105-112, 1976.

JESCH, F. Hämodynamische Veränderungen und Sauerstoffversorgung nach Blutersatz durch Stromafreie Hämoglobinlösungen. Habilitationsschrift, Medizinische Fakultät, Universität München, 1981.

JESCH, F. H., W. PETERS, J. HOBHAHN, M. SCHOENBERG, AND K. MESSMER. Oxygen-transporting fluids and oxygen delivery with hemodilution. *Crit. Care Med.* 10: 270-274, 1982.

JONES, H. W., AND MACKMUL, G. The influence of James Blundell on the development of blood transfusion. *Ann. Med. Hist.* 10: 242-248, 1928.

KEIPERT, P. E., A. J. ADENIAN, S. KWONG, AND R. E. BENESCH. Functional properties of a new crosslinked hemoglobin designed for use as a red cell substitute. *Transfusion* 29: 768-773, 1989.

KEIPERT, P.E., C. L. GOMEZ, A. GONZALES , V. W MACDONALD, J. R. HESS, AND R. M. WINSLOW. Diaspirin cross-linked hemoglobin: tissue distribution and long-term excretion after exchange transfusion. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 701-711, 1994.

KERGER, H., D. J. SALTZMAN, M. D. MENGER, K. MESSMER, AND M. INTAGLIETTA. Systemic and subcutaneous microvascular pO₂ dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am. J. Physiol.* 270: H827-836, 1996.

KERGER, H., A. G. TSAI, D. J. SALTZMAN, R. M. WINSLOW, AND M. INTAGLIETTA. Fluid resuscitation with O₂ vs. non-O₂ carriers after 2 h of hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am. J. Physiol.* 272: H525-537, 1997.

KERGER H., K. F. WASCHKE, K. VAN ACKERN, A. G. TSAI, AND M. INTAGLIETTA. Systemic and microcirculatory effects of autologous whole blood resuscitation in severe hemorrhagic shock. *Am. J. Physiol.* 276: H2035-H2043, 1999.

KESSLER, M., J. HÖPER, AND B. A. KRUMME. Monitoring of tissue perfusion and cellular function. *Anesthesiology* 45: 186-199, 1976.

KLEIN, H. G. Oxygen carriers and transfusion medicine. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22, 123-135, 1994.

KLEIN, H. G. Allogenic transfusion risks in the surgical patient. *Am. J. Surg.* 170: 21S-26S, 1995.

KLÖVEKORN, W. P., H. PICHLMAIER, E. OTT, H. BAUER, L. SUNDER-PLASSMANN UND K. MESSMER: Akute präoperative Hämodilution – Eine Möglichkeit zur autologen Bluttransfusion. *Chirurg* 45: 452-458, 1974.

KORTHUIS, R. J., D. N. GRANGER, M. I. TOWNSLEY, AND A. E. TAYLOR. The role of oxygen-derived free radicals in ischemia-induced increases in canine skeletal muscle vascular permeability. *Circ. Res.* 57: 599-609, 1985.

KOTHE, N., B. EICHENTOPF, AND K. BONHARD. Characterization of a modified, stroma-free hemoglobin solution as an oxygen-carrying plasma substitute. *Surg. Gynecol. Obstet.* 161: 563-569, 1985.

LA MURAGLIA, G.M., P. J. O'HARA, W. H. BAKER, T. C. NASLUND, E. J. NORRIS, J. LI, AND E. VANDERMEERSCH. The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution. *J. Vasc. Surg.* 31: 299-308, 2000.

LAKS, H., N. E. O'CONNOR, R. N. PILON, W. ANDERSON, J. R. MACCALLUM, W. P. KLÖVEKORN, AND F. D. MOORE. Acute normovolemic hemodilution: effects on hemodynamics, oxygen transport, and lung water in anesthetized man. *Surg. Forum.* 24: 201-202, 1973.

LAMY, M. L., E. K. DAILY, J. F. BRICHANT, R. P. LARBUISSON, R. H. DEMEYERE, E. A. VANDERMEERSCH, J. J. LEHOT, M. R. PARSLOE, J. C. BERRIDGE, C. J. SINCLAIR, J. F. BARON, AND R. J. PRZYBELSKI. Randomized trial of diaspirin 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.

LARSEN, R. W., M. D. CHAVEZ, M. R. ONDRIAS, S. H. COURTNEY, J. M. FRIEDMAN, M. J. LIN, AND R. E. HIRSCH. Dynamics and reactivity of HbXL99 α . A cross-linked hemoglobin derivative. *J. Biol. Chem.* 265: 4449-4454, 1990.

LAWRENCE, M. B., C. W. SMITH, S. G. ESKIN, AND L. V. MCINTIRE. Effect of venous shear stress on CD18-mediated neutrophil adhesion to cultured endothelium. *Blood* 75: 227-237, 1990.

LEE, R., N. ATSUMI, E. E. JACOBS JR., W. G. AUSTEN, AND G. J. VLAHAKES. Ultrapure, stroma-free, polymerized bovine hemoglobin solution: evaluation of renal toxicity. *J. Surg. Res.* 47: 407-411, 1989.

LEHR, H. A., C. HÜBNER, D. NOLTE, A. KOHLSCHÜTTER, AND K. MESSMER. Dietary fish oil blocks the microcirculatory manifestations of ischemia-reperfusion injury in striated muscle in hamsters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 88: 6726-6730, 1991 a.

LEHR, H. A., A. GUHLMANN, D. NOLTE, D. KEPPLER AND K. MESSMER. Leukotrienes as mediators in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model in the hamster. *J. Clin. Invest.* 87: 2036-2041, 1991 b.

LEHR, H. A., M. BECKER, S. L. MARKLUND, C. HÜBNER, K. E. ARFORS, A. KOHLSCHÜTTER, AND K. MESSMER. Superoxide-dependent stimulation of leukocyte adhesion by oxidatively modified LDL in vivo. *Arterioscler. Thromb.* 12: 824-829, 1992.

LEHR, H. A., M. KROBER, C. HÜBNER, P. VAJKOCZY, M. D. MENGER, D. NOLTE, A. KOHLSCHÜTTER, AND K. MESSMER. Stimulation of leukocyte/endothelium interaction by oxidized low-density lipoprotein in hairless mice. Involvement of CD11b/CD18 adhesion receptor complex. *Lab. Invest.* 68: 388-395, 1993 a.

LEHR, H. A., K. KAWASAKI, T. J. GALLA, D. NOLTE, AND K. MESSMER. Aggravation of ischemia-reperfusion injury in the striated muscle microcirculation by acute endotoxemia. In: *Host defense dysfunction in trauma, shock, and sepsis*, edited by E. Faist, J. L. Meakins, and F. W. Schildberg. Springer, Berlin, Heidelberg, pp. 449-452, 1993 b.

LEVY, J. H., L. T. GOODNOUGH, P. E. GREILICH, G. V. PARR, R. W. STEWART, I. GRATZ, J. WAHR, J. WILLIAMS, M. E. COMUNALE, D. DOBLAR, G. SILVAY, M. COHEN, J. S. JAHR, AND G. J. VLAHAKES. Polymerized bovine hemoglobin solution as a replacement for allogeneic red blood cell transfusion after cardiac surgery: results of a randomized, double-blind trial. *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 124: 35-42, 2002.

LEWIS, R. J., D. A. BERRY, H. CRYER^{3RD}, N. FOST, R. KROME, G. R. WASHINGTON, J. HOUGHTON, J. W. BLUE, R. BECHHOFFER T. COOK, AND M. FISHER. Monitoring a clinical trial conducted under the Food and Drug Administration regulations allowing a waiver of prospective informed consent: the diaspirin cross-linked hemoglobin traumatic hemorrhagic shock efficacy trial. *Ann. Emerg. Med.* 38: 397-404, 2001.

LEY, K., E. LUNDGREN, E. BERGER, AND K. E. ARFORS. Shear-dependent inhibition of granulocyte adhesion to cultured endothelium. *Blood* 73: 1324-1330, 1989.

LEY, K., M. ALLIETTA, D. C. BULLARD, AND S. MORGAN. Importance of E-selectin for firm leukocyte adhesion in vivo. *Circ. Res.* 83: 287-294, 1998.

LINNIK, M. D., AND T. J. LEE. Effect of hemoglobin on neurogenic responses and cholinergic parameters in porcine cerebral arteries. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 9: 219-225, 1989.

LINNIK, M. D., AND T. J. F. LEE. Effect of Hemoglobin on Sympathetic Neurovascular Transmission in the Porcine Cerebral Circulation. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 21: 615-620, 1993.

LONGNECKER, D. E., AND P. D. HARRIS. Microcirculatory actions of general anesthetics. *Fed. Proc.* 39: 1580-1583, 1980.

LOUTIT, J. F., AND P. L. MOLLISON. Advantages of a disodium-citrate-glucose mixture as a blood preservative. *Brit. Med. J.* 2: 744-745, 1943.

MACDONALD, R. L., AND B. K. WEIR. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke* 22: 971-1082, 1991.

MACDONALD, V. W., AND R. MOTTERLINI. Vasoconstrictor effects in isolated rabbit heart perfused with bis(3,5-dibromosalicyl)fumarate cross-linked hemoglobin (aaHb). *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 565-575, 1994.

MACHI, T., D. STEWART, N. F. KASSELL, Y. COMAR, H. NIHEI, AND Y. TANAKA. Hemoglobin enhances release of endothelin from cultured endothelial cells. In: *Cerebral vasospasm*, edited by K. Sano, K. Takakura, N. F. Kassell, and T. Sasaki. University of Tokyo Press, Tokyo, pp. 262-265, 1991.

MALCOLM, D. S., I. N. HAMILTON, S. C. SCHULTZ, F. COLE, AND K. BURHOP. Characterization of hemodynamic response to intravenous diaspirin crosslinked hemoglobin in rats. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 91-107, 1994.

- MANNING, J. M. Preparation of hemoglobin carbamylated at specific NH₂-terminal residues. In: *Methods of Enzymology. Hemoglobins*, edited by E. Antonini, L. Rossi-Bernardi, and E. Chiancone. Academic Press, New York (NY), pp. 159-167, 1981.
- MARKS, D. H., G. L. MOORE, F. MEDINA, G. BOSWELL, L. R. ZIESKE, B. R. BOLIN, AND A. I. ZENGA. Optimization and synthesis of pyridoxalated polymerized stroma-free hemoglobin solution. *Mil. Med.* 153: 44-49, 1988.
- MARTIN, W., G. M. VILLANI, D. JOTHIANANDAN, AND R. F. FURCHGOTT. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induced relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 232: 708-716, 1985.
- MARZI, I. UND W. MUTSCHLER. Pathophysiologie des Traumas. In: *Praxis der Unfallchirurgie*, herausgegeben von W. Mutschler und N. Haas. Georg Thieme, Stuttgart, New York (NY), pp. 16-54, 1999.
- MATSUSHITA, M., A. YABUKI, P. S. MALCHESKY, H. HARASAKI, AND Y. NOSE. In vivo evaluation of a pyridoxalated-hemoglobin-polyoxyethylene conjugate. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 16: 247-260, 1988.
- MAZZONI, M. C., P. BORGSTRÖM, K. E. ARFORS, AND M. INTAGLIETTA. Dynamic fluid redistribution in hyperosmotic resuscitation of hypovolemic hemorrhage. *Am. J. Physiol.* 255: H629-H637, 1988.
- MAZZONI, M. C., P. BORGSTRÖM, M. INTAGLIETTA, AND K. E. ARFORS. Luminal narrowing and endothelial cell swelling in skeletal muscle capillaries during hemorrhagic shock. *Circ. Shock* 29: 27-39, 1989.
- MCCORD, J. M. Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N. Engl. J. Med.* 312: 159-163, 1985.
- MCGARRITY, M. J., S. S. ER, K. A. NIGHTINGALE, AND J. C. HSIA. Isolation and partial characterization of Pyridoxal-5-phosphate hemoglobins by high-performance liquid chromatography as a quality-control method for hemoglobin-based blood substitutes. *J. Chromatogr.* 413: 53-63, 1987.

McLOUGHLIN, T. M., J. L. FONTANA, B. ALVING, P. D. MONGAN, AND R. BÜNGER. Profound normovolemic hemodilution: hemostatic effects in patients and in a porcine model. *Anesth. Analg.* 83: 459-465, 1996.

MEISNER, F. G., G. I. KEMMING, O. P. HABLER, M. S. KLEEN, J. H. TILLMANN, J. W. HUTTER, D. A. BOTTINO, E. THEIN, J. M. MEIER, C. J. WOJTCZEK, A. PAPE, AND K. MESSMER. Diaspirin crosslinked hemoglobin enables extreme hemodilution beyond the critical hematocrit. *Crit. Care Med.* 29: 829-838, 2001.

MENGER, M. D., F.-U. SACK, J. H. BARKER, G. FEIFEL, AND K. MESSMER. Quantitative analysis of microcirculatory disorders after prolonged ischemia in skeletal muscle. Therapeutic effects of prophylactic isovolemic hemodilution. *Res. Exp. Med.* 188: 151-165, 1988.

MENGER, M. D., F.-U. SACK, F. HAMMERSEN, AND K. MESSMER. Tissue oxygenation after prolonged ischemia in skeletal muscle: therapeutic effect of prophylactic isovolemic hemodilution. *Adv. Exp. Med. Biol.* 248: 387-395, 1989 a.

MENGER, M. D., F. HAMMERSEN, J. H. BARKER, G. FEIFEL UND K. MESSMER. Ischämie und Reperfusion des Skelettmuskels: Experimentelle Tourniquet-Ischämie im wachen syrischen Goldhamster. In: *Ischämie und Reperfusion*, herausgegeben von K. Messmer und F. Hammersen. Karger, Basel, pp. 99-115, 1989 b.

MENGER, M. D., S. JÄGER, P. WALTER, F. HAMMERSEN, AND K. MESSMER. A novel technique for studies on the microvasculature of transplanted islets of Langerhans in vivo. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 9: 103-117, 1990.

MENGER, M. D., H. A. LEHR, AND K. MESSMER. Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury. *Klin. Wochenschr.* 69: 1050-1055, 1991.

MENGER, M. D., C. THIERJUNG, F. HAMMERSEN, AND K. MESSMER. Dextran vs hydroxyethylstarch in inhibition of postischemic leukocyte adherence in striated muscle. *Circ. Shock* 41: 248-255, 1993.

MESSMER, K., L. GÖRNANDT, E. SINAGOWITZ, L. SUNDER-PLOSSMANN, F. JESCH AND K. KESSLER. Local oxygen tension in tissue of different organs during limited normovolemic hemodilution. *Bibl. Anat.* 12: 327-332, 1973.

MESSMER, K. Hemodilution. *Surg. Clin. North Amer.* 55: 659-678, 1975.

MESSMER, K., AND L. SUNDER-PLOSSMANN. Microcirculatory changes in shock. In: *Current Topics in Critical Care Medicine*, edited by W. C Shoemaker and B. M Travares. Karger, Basel, p. 16, 1976.

MESSMER, K., F. JESCH, W. PETERS, B. ENDRICH, J. HOBBAHN, AND M. SCHOENBERG. Tissue pO₂ during reanimation with hemoglobin solution. *Eur. Surg. Res.* 11: 161-171, 1979.

MESSMER, K., UND M. INTAGLIETTA. Die physiologische Bedeutung der arteriölen Vasomotion. In: *Konservative Therapie arterieller Durchblutungsstörungen*, herausgegeben von G. Trübestein. Georg Thieme, Stuttgart, p. 10, 1986.

MESSMER, K., U. KREIMEIER, AND M. INTAGLIETTA. Present state of Intentional Hemodilution. *Eur. Surg. Res.* 18: 254-263, 1986.

MESSMER, K., U. P. VERAGUT, AND U. F. GRUBER. Schock. In: *Klinische Pathophysiologie*, herausgegeben von W. Siegenthaler. 6. Auflage, Georg Thieme, Stuttgart, p. 698, 1987.

MESSMER, K., AND U. KREIMEIER. Microcirculatory therapy in shock. *Resuscitation* 18: S51-S61, 1989.

MILLER, L. S., Y. MORITA, U. RANGAN, S. KONDO, M. G. CLEMENS, AND G. B. BULKLEY. Suppression of cytokine-induced neutrophil accumulation in rat mesenteric venules in vivo by general anesthesia. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 16: 147-154, 1996.

MIRHASHEMI, S., K. MESSMER, AND M. INTAGLIETTA. Tissue perfusion improvement during normovolemic hemodilution exhibited by a hydraulic model of cardiovascular. *Microvasc. Res.* 29: 240-241, 1985.

MOK, W., D. E. CHEN, AND A. MAZUR. Cross-linked hemoglobins as potential plasma protein extenders. *Fed. Proc.* 34: 1458-1460, 1975.

NAITO, R., AND K. YOKOYAMA. Perfluorochemical blood substitutes Fluosol-43, Fluosol-DA 20% and 35%. Technical Information Series No. 5. The Green Cross Corporation, Osaka, Japan, 1978.

NAKAI, K., N. MATSUDA, M. AMANO, T. OHTA, S. TOKUYAMA, K. AKAMA, Y. KAWAKAMI, E. TSUCHIDA, AND S. SEKIGUCHI. Acellular and cellular hemoglobin solutions as vasoconstrictive factor. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 559-564, 1994.

NELSON, D. J. Blood and HemAssist™ (DCLHb): potentially a complementary therapeutic team. In: *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trials – Volume II*, edited by T. M. S. Chang. Karger, Basel, pp. 39-61, 1997.

NOLTE, D., H. A. LEHR, AND K. MESSMER. Adenosine inhibits postischemic leukocyte-endothelium interaction in postcapillary venules of the hamster. *Am. J. Physiol.* 261: H651-H655, 1991 a.

NOLTE, D., H. A. LEHR, AND K. MESSMER. Dextran and Adenosine-Coupled Dextran Reduce Postischemic Leukocyte Adhesion in Postcapillary Venues of the Hamster. *Prog. Appl. Microcirc.* 18: 103-111, 1991 b.

NOLTE, D., A. LORENZEN, H. A. LEHR, F. J. ZIMMER, K. N. KLOTZ, AND K. MESSMER. Reduction of postischemic leukocyte-endothelium interaction by adenosine via A2 receptor. *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 346: 234-237, 1992 a.

NOLTE, D., M. BAYER, H. A. LEHR, M. BECKER, F. KROMBACH, U. KREIMEIER, AND K. MESSMER. Attenuation of postischemic microvascular disturbances in striated muscle by hyperosmolar saline dextran. *Am. J. Physiol.* 263: H1411-H1416, 1992 b.

NOLTE, D., A. BOTZLAR, R. HECHT, C. CSAPÓ, M. D. MENGER, AND K. MESSMER. Diaspirin crosslinked hemoglobin: Evaluation of effects on the microcirculation of striated muscle. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 587-592, 1994.

- NOLTE, D., M. D. MENGER, AND K. MESSMER. Microcirculatory models of ischemia-reperfusion in skin and striated muscle. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 15 Supp 1: 9-16, 1995 a.
- NOLTE D., H. ZEINTL, M. STEINBAUER, S. PICKELMANN, AND K. MESSMER. Functional capillary density: an indicator of tissue perfusion? *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 15: 244-249, 1995 b.
- NOLTE, D., A. BOTZLAR, S. PICKELMANN, E. BOUSKELA, AND K. MESSMER. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J. Lab. Clin. Med.* 130: 314-327, 1997 a.
- NOLTE, D., P. STEINHAUSER, S. PICKELMANN, S. BERGER, R. HÄRTL, AND K. MESSMER. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on local tissue oxygen tension in striated skin muscle: an efficacy study in the hamster. *J. Lab. Clin. Med.* 130: 328-338, 1997 b.
- NOLTE, D., S. PICKELMANN, M. MOLLMANN, E SCHÜTZE W. KÜBLER, R. LEIDERER, AND K. MESSMER. Effects of the phlebotropic drug Daflon 500 mg on postischemic microvascular disturbances in striated skin muscle: an intravital microscopic study in the hamster. *J. Lab. Clin. Med.* 134: 526-535, 1999.
- OGDEN, J. E., D. COGLAN, G. JONES, K. A. DENTON, R. HARRIS, B. CHAN, J. WOODROW, AND M. T. WILSON. Expression and assembly of functional hemoglobin in *S. Cerevisiae*. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 20: 473-475, 1992.
- O'HARA, J. F. JR., W. A. COLBURN, J. F. TETZLAFF, A. C. NOVICK, K. W. ANGERMEIER, AND A. SCHUBERT. Hemoglobin and methemoglobin concentrations after large-dose infusions of diaspirin cross-linked hemoglobin. *Anesth. Analg.* 92: 44-48, 2001.
- OPELZ, G., D. G. SENGAR, M. R. MICKEY, AND P. I. TERASAKI. Effect of blood transfusion on subsequent kidney transplants. *Transplant. Proc.* 5: 253-259, 1973.
- PALLER, M. S. Hemoglobin- and myoglobin-induced acute renal failure in rats: role of iron in nephrotoxicity. *Am. J. Physiol.* 255: F539-F544, 1988.

PALMER, R. M., A. G. FERRIGE, AND S. MONCADA. Nitric oxide release accounts for the biological activity of endothelium-derived relaxing factor. *Nature* 327:524-526, 1987.

PAPE, A., G. KEMMING, F. MEISNER, M. KLEEN, AND O. HABLER. Diaspirin cross-linked hemoglobin fails to improve left ventricular diastolic function after fluid resuscitation from hemorrhagic shock. *Eur. Surg. Res.* 33: 318-326, 2001.

PAPENFUSS, H. D., J. F. GROSS, M. INTAGLIETTA, AND F. A. TREESE. A transparent access chamber for the rat dorsal skin fold. *Microvasc. Res.* 18: 311-318, 1979.

PARADIS, N. A., M. I. ROSE, AND M. S. GAWRYL. Selective aortic perfusion and oxygenation: an effective adjunct to external chest compression-based cardiopulmonary resuscitation. *J. Am. Coll. Cardiol.* 23: 497-504, 1994.

PARADIS, N. A. Dose-response relationship between aortic infusions of polymerized bovine hemoglobin and return of circulation in a canine model of ventricular fibrillation and advanced cardiac life support. *Crit. Care Med.* 25: 476-483, 1997.

PARKS, D.A., AND D. N. GRANGER. Ischemia-reperfusion injury: a radical view. *Hepatology.* 8: 680-682, 1988.

PEARCE, L. B., AND M. S. GAWRYL. Overview of preclinical and clinical efficacy of Biopure's HBOCs. In: *Blood Substitutes: Principles, Methods, Products and Clinical Trial – Volume II*, edited by T. M. S. Chang. Karger, Basel, pp. 82-100, 1997.

PINCEMAIL, J., O. DETRY, C. PHILIPPART, J. O. DEFRAIGNE, C. FRANSSEN, K. BURHOP, C. DEBY, M. MEURISSE, AND M. LAMY. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb): absences of increased free radical generation following administration in a rabbit model of renal ischemia and reperfusion. *Free Radic. Biol. Med.* 19: 1-9, 1995.

PICKELMANN, S., D. NOLTE, R. LEIDERER, E. SCHÜTZE, AND K. MESSMER. Attenuation of postischemic reperfusion injury in striated skin muscle by diaspirin-cross-linked Hb. *Am. J. Physiol.* 275: H361-H368, 1998.

- PICKELMANN, S., D. NOLTE, R. LEIDERER, M. MOLLMANN, E. SCHÜTZE, AND K. MESSMER. Effects of the phlebotropic drug Daglon 500 mg on postischemic reperfusion injury in striated skin muscle: a histomorphologic study in the hamster. *J. Lab. Clin. Med.* 134: 536-545, 1999.
- PIPER, I. R., M. A. GARRIOCH, M. J. SOUTER, P. J. ANDREWS, AND D. THOMSON. Effects of diaspirin cross-linked haemoglobin on post-traumatic cerebral perfusion pressure and blood flow in a rodent model of diffuse brain injury. *Br. J. Anaesth.* 80: 639-643, 1998.
- POHL, U., AND R. BUSSE. Hypoxia stimulates release of endothelium derived relaxant factor. *Am. J. Physiol.* 256: H1595-H1600, 1989.
- POPE, A., G. FRENCH, AND D. E. LONGNECKER. Fluid Resuscitation. State of the Science for Treating Combat Casualties and Civilian Injuries. National Academy Press, Washington (DC), 1999.
- POTTER, B. Baxter's purchase of Somatogen may push hemoglobin technology. In: *The Boulder County Business Report*. <http://www.bcbr.com/mar98/somatog.htm>, 1988.
- POSEY, D. H. J. Blood transfusion: uses, abuses, and hazards. *J. Natl. Med. Assoc.* 81: 793-796, 1989.
- PRZYBELSKI, R. J., G. J. KANT, M. J. BOUND, M. V. SLAYTER, AND R. M. WINSLOW. Rat maze performance after resuscitation with crosslinked hemoglobin solution. *J. Lab. Clin. Med.* 115: 579-588, 1990.
- PRZYBELSKI, R. J., D. S. MALCOLM, D. G. BURRIS, AND R. M. WINSLOW. Cross-linked hemoglobin solution as a resuscitative fluid after hemorrhage in the rat. *J. Lab. Clin. Med.* 117: 143-151, 1991.
- PRZYBELSKI, R. J., E. K. DAILY, J. MICHEELS, E. SLOAN, P. MOLS, L. CORNE, M. D. KOENIGSBERG, W. H. BICKELL, D. R. THOMPSON, J. D. HARVIEL AND S. M. COHN. A safety assessment of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of hemorrhagic, hypovolemic shock. *Prehospital Disaster Med.* 14: 251-264, 1999.

- RABINER, S. F., J. R. HELBERT, H. LOPAS, AND L. H. FRIEDMAN. Evaluation of a stroma-free hemoglobin solution for use as a plasma expander. *J. Exp. Med.* 126: 1127-1142, 1967.
- RABINOVICI, R., A. S. RUDOLPH, AND G. FEUERSTEIN. Characterization of hemodynamic, hematologic, and biochemical responses to administration of liposome-encapsulated hemoglobin in the conscious, freely moving rat. *Circ. Shock* 29: 115-132, 1989.
- RABINOVICI, R., A. S. RUDOLPH, F. S. LIGLER, T. L. YUE, AND G. FEUERSTEIN. Liposome-encapsulated hemoglobin: an oxygen-carrying fluid. *Circ. Shock* 32: 1-17, 1990.
- RABINOVICI, R., L. F. NEVILLE, A. S. RUDOLPH, AND G. FEUERSTEIN. Hemoglobin-based oxygen-carrying resuscitation fluids. *Crit. Care Med.* 23: 801-804, 1995.
- RIGGERT, J., D. W. M. SCHWARZ, A. UY, G. SIMSON, H. FABRITZ, W. R. MAYR, AND M. KÖHLER. Risk of hepatitis C virus (HCV) transmission by anti-HCV-negative blood components in Austria and Germany. *Ann. Hematol.* 72: 35-39, 1996.
- ROSEN, A. L., S. A. GOULD, L. R. SEHGAL, H. L. SEHGAL, C. L. RICE, D. RUSHING, AND G. S. MOSS. Hemoglobin solutions as red cell substitutes. *Crit. Care Med.* 10: 275-278, 1982.
- RUBANYI, G. M., AND M. A. POLOKOFF. Endothelins: molecular biology, biochemistry, pharmacology, physiology, and pathophysiology. *Pharmacol. Rev.* 46: 325-415, 1994.
- SACK, F.-U., W. FUNK, F. HAMMERSEN, AND K. MESSMER. Microvascular injury of skeletal muscle and skin after different periods of pressure induced ischemia. *Prog. Appl. Microcirc.* 12: 282-288, 1987.
- SADRZADEH, S. M., E. GRAF, S. S. PANTER, P. E. HALLAWAY, AND J. W. EATON. Hemoglobin. A biologic fenton reagent. *J. Biol. Chem.* 259: 14354-14356, 1984.
- SAKAI, H., H. HARA, M. YUASA, A. G. TSAI, S. TAKEOKA, E. TSUCHIDA, AND M. INTAGLIETTA. Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 279: H908-915, 2000.

- SANDERS, A. G. Microcirculation in grafts of normal and malignant tissue. *J. Anat.* 97: 631-632, 1963.
- SANDERS, A. G., AND P. SHUBIK. A transparent window for use in Syrian hamster. *Isr. J. Exp. Med.* 11: 118, 1964.
- SANDISON, J. C. A new model for the microscopic study of living growing tissues by the introduction of a transparent chamber in the rabbit's ear. *Anat. Rec.* 28: 281-287, 1924.
- SANDISON, J. C. Observations on growth of blood vessels as seen in transparent chamber introduced into rabbit's ear. *Am. J. Anat.* 41: 475-496, 1928.
- SCANNON, P. J. Molecular modifications of hemoglobin. *Crit. Care Med.* 10: 261-265, 1982.
- SCHMIDT, K. Polyvinylpyrrolidon-gebundenes Hämoglobin als ein Sauerstoff übertragender Blutersatzstoff. *Klin. Wochenschr.* 57: 1169-1175, 1979.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, H., AND H. RIEGER. Why hemodilution in low flow states? *Bibl. Haematol.* 47: 99-121, 1981.
- SCHMID-SCHÖNBEIN, G. W. Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *Fed. Proc.* 46: 2397-2401, 1987.
- SCHREIBER, G. B., M. P. BUSCH, S. H. KLEINMANN AND J. J. KORELITZ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The retrovirus epidemiology donor study. *N. Engl. J. Med.* 334: 1685-1690, 1996.
- SCHULTZ, S. C., B. GRADY, F. COLE, I. HAMILTON, K. BURHOP, AND D. S. MALCOLM. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to dapsirin cross-linked hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 122: 301-308, 1993.
- SCHWARZ, D. W. M., G. SIMSON, K. BAUMGARTEN, H. FABRITZ, J. RIGGERT, H. NEUMEYER, W. R. MAYR, AND M. KÖHLER. Risk of human immunodeficiency virus (HIV) transmission by anti-HIV-negative blood components in Germany and Austria. *Ann. Hematol.* 70: 209-213, 1995.

SEHGAL, L. R., A. L. ROSEN, AND S. A. GOULD. Preparation and in vitro characteristics of polymerized pyridoxylated hemoglobin. *Transfusion* 23: 158-162, 1983.

SEHGAL, L. R., S. A. GOULD, A. L. ROSEN, H. L. SEHGAL, AND G. S. MOSS. Polymerized pyridoxylated hemoglobin: A red blood cell substitute with normal oxygen capacity. *Surgery* 95: 433-438, 1984.

SEHGAL, L. R., H. L. SEHGAL, A. L. ROSEN, S. A. GOULD, R. DE WOSKIN, AND G. S. MOSS. Characteristics of polymerized pyridoxylated hemoglobin. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs* 16: 173-183, 1988.

SELLARDS A. W., AND MINOT G. R. Injection of hemoglobin in man and its relation to blood destruction, with especial reference to the anemias. *J. Med. Res.* 43: 469-494, 1916.

SEWELL, I. A. Studies of the microcirculation using transparent observation chambers inserted in the hamster cheek pouch. *J. Anat.* 100: 839-856, 1966.

SHARMA, A. C., AND A. GULATI. Effect of dapsirin crosslinked hemoglobin and norepinephrine on systemic hemodynamics and regional circulation in rats. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 299-308, 1994.

SHARMA, A. C., AND A. GULATI. Yohimbine modulates dapsirin crosslinked hemoglobin-induced systemic hemodynamic and regional circulatory effects. *Crit. Care Med.* 23: 874-884, 1995.

SIMON, S. I., AND H. L. GOLDSMITH. Leukocyte adhesion dynamics in shear flow. *Ann. Biomed. Eng.* 30: 315-332, 2002.

SIMONI, J., G. SIMONI, C. D. LOX, S. D. PRIEN, AND G. T. SHIRES. Evidence for the direct inhibition of endothelin-1 secretion by hemoglobin in human endothelial cells. *ASAIO J.* 41: M641-M651, 1995.

SIRSIÖ, A., H. A. LEHR, D. NOLTE, T. HAAPANIEMI, D. H. LEWIS, G. NYLANDER, AND K. MESSMER. Hyperbaric oxygen treatment enhances the recovery of blood flow and functional capillary density in postischemic striated muscle. *Circ. Shock* 40: 9-13, 1993.

SLOAN, E. P., M. KOENIGSBERG, D. GENS, M. CIPOLLE, J. RUNGE, M. N. MALLORY, AND G. RODMAN JR.. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *JAMA* 282: 1857-1864, 1999 a.

SLOAN, E. P., M. KOENIGSBERG, J. HOUGHTON, D. GENS, M. CIPOLLE, J. RUNGE, M. N. MALLORY, AND G. RODMAN JR.. The informed consent process and the use of the exception to informed consent in the clinical trial of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in severe traumatic hemorrhagic shock. DCLHb Traumatic Hemorrhagic Shock study group. *Acad. Emerg. Med.* 6: 1203-1209, 1999 b.

SLOAN, E. P., K. NAGY, AND J. BARRETT. A proposed consent process in studies that use an exception to informed consent. *Acad. Emerg. Med.* 6: 1283-1291, 1999 c.

SLOAN, E. P., M. KOENIGSBERG, P. H. BRUNETT, R. P. BYNOE, J. A. MORRIS, G. TINKOFF, W. C. DALSEY, AND M. G. OCHSNER. Post hoc mortality analysis of the efficacy trial of diaspirin cross-linked hemoglobin in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. *J. Trauma* 52: 887-895, 2002.

SMITH, J. K., M. B. GRISHAM, D. N. GRANGER, AND R. J. KOTHUIS. Free radical defense mechanisms and neutrophil infiltration in postischemic skeletal muscle. *Am. J. Physiol.* 256: H789-H793, 1989.

SNYDER, S. R., E. V. WELTY, R. Y. WALDER, L. A. WILLIAMS, AND J. A. WALDER. HbXI99 α : A hemoglobin derivate that is cross-linked between the α subunits is useful as a blood substitute. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 7280-7284, 1987.

SPEER, D. P., M. CHVAPIL, C. D. ESKELSON, AND J. ULREICH. Biological effects of residual glutaraldehyde in glutaraldehyde-tanned collagen biomaterials. *J. Biomed. Mater. Res.* 14: 753-764, 1980.

SPRUNG, J., J. D. KINDSCHER, J. A. WAHR, J. H. LEVY, T. G. MONK, M. W. MORITZ, AND P. J. O'HARA. The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure[®]) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Anesth. Analg.* 94: 799-808, 2002.

STANDL, T. Artificial Oxygen Carriers as Red Blood Cell Substitutes – Perfluorocarbons and Cell-Free Hemoglobin. *Infusionsther. Transfusionsmed.* 27: 128-137, 2000.

STANDL, T. Haemoglobin-based erythrocyte transfusion substitutes. *Expert. Opin. Biol. Ther.* 1: 831-843, 2001.

STEINBAUER, M., A. G. HARRIS, C. ABELS, AND K. MESSMER. Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch. Surg.* 385: 290-298, 2000.

STEINHAUSER, P. Effekte stromafreier Hämoglobin-Lösungen auf die Gewebeoxygenierung im quergestreiften Muskel beim Hamster. Inauguraldissertation, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität München, 1994.

STÜCKER, O., R. TROUVÉ, E. VICAUT, O. CHARANSONNEY, B. TEISSEIRE, M. DURUBLE, AND M. DUVELLEROY. Effects of different hematocrits on the isolated working rabbit heart reperfused after ischemia. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 2: 325-335, 1983.

SUNDER-PLOSSMANN, L., AND K. MESSMER. Die Dynamik der Mikrozirkulation im Schock: Hämorheologische und hämodynamische Veränderungen. *Z. Prakt. Anaesth.* 7: 95-106, 1972.

SUNDER-PLOSSMANN, L., F. JESCH, P. W. KLOEVEKORN, AND K. MESSMER. Limited hemodilution in hemorrhagic shock in dogs: effects on central hemodynamics and the microcirculation in skeletal muscle. *Res. Exp. Med.* 159: 167-182, 1973.

SUNDER-PLOSSMANN, L., R. DIETERLE, J. SEIFERT, F. JESCH, AND K. MESSMER. Stroma-free hemoglobin solution as a blood replacement fluid. Actual state and problems. *Europ. J. Intensive Care Medicine* 1: 37-42, 1975.

SVENSIÖ, E., K. E. ARFORS, G. ARTURSON, G. RUTILI. The hamster cheek pouch preparation as a model for studies of macromolecular permeability of the microvasculature. *Ups. J. Med. Sci.* 83: 71-79, 1978.

SZCZESNY, G., A. VEIHELMANN, D. NOLTE AND K. MESSMER. Changes in the local blood and lymph microcirculation in response to direct mechanical trauma applied to leg: in vivo study in an animal model. *J. Trauma* 51: 508-517, 2001.

SZEBENI, J., H. HAUSER, C. D. ESKELSON AND K. H. WINTERHALTER. Factors influencing the in vitro stability of artificial red blood cells based on hemoglobin containing liposomes. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organ.* 16: 301-312, 1988.

TAM, S. C., J. BLUMENSTEIN, AND J. T. WONG. Soluble dextran-hemoglobin complex as a potential blood substitute. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73: 2128-2132, 1976.

TEICHER, B. A., S. A. HOLDEN, K. MENON, R. E. HOPKINS, AND M. S. GAWRY. Effect of hemoglobin solution on the response of intracranial and subcutaneous 9L tumors to antitumor alkylating agents. *Cancer Chemother. Pharmacol.* 33: 57-62, 1993.

TEICHER, B. A., S. A. HOLDEN, N. P. DUPUIS, T. KUSOMOTO, M. LIU, F. LIU, AND K. MENON. Oxygenation of the rat 9L gliosarcoma and the rat 13672 mammary carcinoma with various doses of a hemoglobin solution. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 22: 827-833, 1994.

TODA, N. Mechanisms of contracting action of oxyhemoglobin in isolated monkey and dog cerebral arteries. *Am. J. Physiol.* 258: H57-H63, 1990.

TSUCHIDA, E. Synthesis and characterization of arterial red cell (ARC). *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 20: 337-344, 1992.

TSAI, A. G. Influence of cell-free Hb on local tissue perfusion and oxygenation in acute anemia after isovolemic hemodilution. *Transfusion* 41: 1290-1298, 2001.

TYE, R. W., F. MEDINA, R. B. BOLIN, G. L. KNOPP, G. S. IRION, AND S. K. MCLAUGHLIN. Modification of hemoglobin - tetrameric stabilization. *Prog. Clin. Biol. Res.* 122: 41-49, 1983.

URBAITIS, B. K., A. RAZYNSKA, Q. CORTEZA, C. FRONTICELLI, AND E. BUCCI. Intravascular retention and renal handling of purified natural and intramolecularly cross-linked hemoglobins. *J. Lab. Clin. Med.* 117: 115-121, 1991.

USUBA, A., R. MOTOKI, K. SUZUKI, K. SAKAGUCHI, AND A. TAKAHASHI. Study of effect of the newly developed artificial blood "neo red cells" (NRC) on hemodynamics and blood gas transport in canine hemorrhagic shock. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 20: 531-535, 1992.

VANDEGRIFF, K. D., F. MEDINA, M. A. MARINI, AND R. M. WINSLOW. Equilibrium oxygen binding to human hemoglobin cross-linked between the alpha chains by bis-(3,5-dibromosalicyl)-fumarate. *J. Biol. Chem.* 264: 17824-17833, 1989.

VAN DER PLAS, J., A. DE VRIES VAN ROSSEN, J. B. DAMM, AND J. C. BAKKER. Preparation and physical characteristics of a hemoglobin solution modified by coupling to 2-nor-2-formylpyridoxal-5-phosphate. *Transfusion* 27: 425-430, 1987.

VANE, J. R., AND R. M. BOTTING. The role of chemical mediators released by the endothelium in the control of the cardiovascular system. *Int. J. Tissue React.* 14:55-64, 1992.

VARKI A. Selectin ligands: will the real ones please stand up? *J. Clin. Invest.* 99: 158-162, 1997.

VESTWEBER, D., AND J. E. BLANKS. Mechanisms that regulate the function of the selectins and their ligands. *Physiol. Rev.* 79: 181-213, 1999.

VICAUT, E., R. TROUVÉ, O. STÜCKER, M. DURUBLE, AND M. DUVELLEROY. Effects of changes in hematocrit on red cell flows at capillary bifurcations. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 4: 351-362, 1985.

VOGEL, W. M., R. C. DENNIS, G. CASSIDY, C. S. APSTEIN, AND C. R. VALERI. Coronary constrictor effects of stroma-free hemoglobin solutions. *Am. J. Physiol.* 251: H413-H420, 1986.

VOLLRATH, B., B. K. A. WEIR, AND D. A. COOK. Hemoglobin causes release of inositol triphosphate from vascular muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 171: 506-511, 1990.

VON DOBSCHUETZ, E., T. HOFFMANN, AND K. MESSMER. Diaspirin cross-linked hemoglobin effectively restores pancreatic microcirculation failure in hemorrhagic shock. *Anesthesiology* 91: 1754-1762, 1999.

VON SANDERSLEBEN J. Kreislaufstörungen. In: *Allgemeine Pathologie für Tierärzte und Studierende der Tiermedizin*, herausgegeben von H. Stünzi und E. Weiss. 8. Auflage, Paul Parey, Berlin, Hamburg, p. 226, 1990.

VON STARK, G. Die Resorbierbarkeit des Hämatins und die Bedeutung der Hämoglobin-Präparate. *Deutsche Med. Wochenschr.* 24: 805-808, 1898.

VUYLSTEKE A., H. J. DAVIDSON, W. S. HO, A. J. RITCHIE, B. A. CALLINGHAM, R. WHITE, AND C. R. HILEY. Effect of the blood substitute diaspirin crosslinked hemoglobin in rat mesenteric and human radial collateral arteries. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 37: 394-405, 2001.

WANGENSTEEN, O. H., H. HALL, A. KREMEN, AND B. STENVENS. Intravenous administration of bovine and human plasma to man: proof of utilization. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 43: 616-621, 1940.

WASCHKE, K., H. SCHRÖCK, D. M. ALBRECHT, K. VAN ACKERN, AND W. KUSCHINSKY. Local cerebral blood flow and glucose utilization after blood exchange with a hemoglobin-based O₂ carrier in conscious rats. *Am. J. Physiol.* 265: H1244-H1248, 1993.

WASCHKE, K. F., D. M. ALBRECHT, K. VAN ACKERN, AND W. KUSCHINSKY. Autoradiographic determination of regional blood flow and metabolism in conscious rats after fluid-resuscitation from haemorrhage with a haemoglobin-based oxygen carrier. *Br. J. Anaesth.* 73: 522-528, 1994.

WHITE, C. T., A. J. MURRAY, D. J. SMITH, J. R. GREENE AND R. B. BOLIN. Synergistic toxicity of endotoxin and hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 108: 121-131, 1986.

WILLIAMS, R. G. An adaption of the transparent chamber technique to the skin of the body. *Anat. Rec.* 60: 487-491, 1934.

WILLINGER, C. C., H. SCHRAMEK, K. PFALLER, W. PFALLER, AND P. DEETJEN. Ultrapure polymerized bovine hemoglobin (UPPBHb) improves integrity of the isolated perfused rat kidney (IPRK): effects on function and structure. *Clin. Nephrol.* 44: 32-43, 1995.

WINSLOW, R. M. Blood substitutes - Minireview. In: *The Red Cell: Seventh Ann Arbor Conference*. A. R. Liss, Inc. pp. 305-323, 1989.

WINSLOW, R. M. Hemoglobin-Based Red Cell Substitutes. Blood Research Division – Letterman Army Institute of Research, San Francisco, CA, USA, 1991.

WINSLOW, R. M. Blood substitutes: Refocusing an elusive Goal - Review. *Br. J. Haematol.* 111: 387-396, 2000.

YAMURA, H., M. SUZUKI, AND H. SATO. Transparent chamber in the rat skin for studies on microcirculation in cancer tissue. *Gann.* 62: 177-185, 1971.

YAKUBI, A., K. YAMAJI, H. OHKI, AND Y. IWASHITA. Characterization of pyridoxalated hemoglobin-polyethylene conjugate as a physiologic oxygen carrier. *Transfusion* 30: 516-520, 1990.

ZEINTL, H., F.-U. SACK, M. INTAGLIETTA, AND K. MESSMER. Computer assisted leukocyte velocity measurement in intravital microscopy. *Int. J. Microcirc. Clin. Exp.* 8: 293-302, 1989.

ZWEIFACH, B. W. Microvascular aspects of the tissue injury. In: *The Inflammatory Process*, edited by B. W. Zweifach, L. Grant, and R. T. McCluskey. Academic, New York (NY), pp. 3-46, 1973.

10. Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer danke ich sehr herzlich für die Überlassung des Themas und die Bereitstellung des Arbeitsplatzes sowie für die Unterstützung während der experimentellen Arbeit und der gesamten Zeit der Abfassung des Manuskriptes.

Meinem Betreuer Herrn Priv. Doz. Dr. med. D. Nolte gilt mein besonderer Dank für das Vertrauen, das er in mich setzte, und seine Diskussionsbereitschaft während der gesamten Zeit meiner Promotion.

Meinen Eltern, die mir das Studium der Humanmedizin sowie die Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben, danke ich von ganzem Herzen für ihre großzügige Unterstützung und liebevolle Geduld.

11. Lebenslauf

Name	Botzlar, Andreas	
Geburtsdatum	24. November 1967 in Passau	
Religion	römisch-katholisch	
Eltern	Dipl.-Hdl. Heinz-Jürgen Botzlar, Oberstudiendirektor i. R. Dipl.-Hdlin. Renate Botzlar, geb. Wagner, Studiendirektorin i. R.	
Schulausbildung	1973 – 1977	Grundschule Passau-Innstadt
	1977 – 1986	Gymnasium Leopoldinum Passau
	Abschluß:	Allgemeine Hochschulreife am 27. Juni 1986
Grundwehrdienst	1986 – 1987	Gebirgspanzeraufklärungsbataillon 8 in Freyung
Studium	1987 – 1988	Studium des Maschinenbaus an der TU München
	1988 – 1995	Studium der Humanmedizin an der LMU München
	Abschluß:	3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 18. Mai 1995 vorläufige Approbation am 23. Mai 1995 Approbation am 01. Januar 1997
Promotion	1991 – 2003	Institut für Chirurgische Forschung, LMU München (bis 08/2002 Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer, seit 09/2002 komm. Prof. Dr. med. A. Baethmann)
Berufstätigkeit	1995 – 1996	Arzt im Praktikum am Institut für Chirurgische Forschung, LMU München (Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. K. Meßmer)
	seit 1997	Arzt an der Chirurgischen Klinik und Poliklinik – Innenstadt, Klinikum der Universität, LMU München (bis 04/1999 Prof. Dr. med. L. Schweiberer, seit 05/1999 Prof. Dr. med. W. Mutschler)