

Die Effekte der rekombinanten Hämoglobinlösung rHb2.0
auf Makrohämodynamik und Mikrozirkulation
bei Volumenersatz nach hämorrhagischem Schock

Jörg Hermann

Aus dem
Institut für chirurgische Forschung
der Ludwig-Maximilians-Universität München
(Kommissarischer Vorstand: Prof. Dr. U. Pohl)

Die Effekte der rekombinanten Hämoglobinlösung rHb2.0
auf Makrohämodynamik und Mikrozirkulation
bei Volumenersatz nach hämorrhagischem Schock

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

vorgelegt von
Jörg Wolfgang Hermann
aus Kaiserslautern / Rheinlandpfalz

2007

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät

Der Universität München

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

Mitberichterstatter: Prof. Dr. U. Kreimeier

Prof. Dr. H. Schad

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter:

Dekan: Prof. Dr. med. D. Reinhardt

Tag der mündlichen Prüfung: 19. 07. 2007

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	6
1.1	Rationale zur Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger	6
1.2	Geschichte	9
1.2.1	Hämolysate und stromafreie Hämoglobinlösungen	9
1.2.2	Chemisch modifizierte Hämoglobinlösungen	10
1.3	Vasoaktivität von Hämoglobinlösungen und NO-Scavenging	12
1.4	Wege zur Reduktion des NO-Scavenging	15
1.4.1	Nanoenkapsulierung	15
1.4.2	Polymerisation	15
1.4.3	Rekombinante Hämoglobinlösungen	16
2	FRAGESTELLUNG	20
3	MATERIAL UND METHODIK	21
3.1	Versuchstiere	21
3.2	Modell der Rückenhautkammer	21
3.3	Vorbereitung der Versuchstiere	24
3.3.1	Implantation der Rückenhautkammer	24
3.3.2	Implantation der Katheter	28
3.4	Versuchsaufbau	30
3.5	Versuchsprotokoll	33
3.6	Therapiegruppen	36
3.7	Parameter	37
3.7.1	Makrohämodynamik und Laborparameter	37
3.7.2	Mikrozirkulation	37
3.7.3	Statistik	39
4	ERGEBNISSE	40
4.1	Makrohämodynamik und Laborparameter	40
4.1.1	Schockinduktion und -aufrechterhaltung	40
4.1.2	Mittlerer arterieller Blutdruck	41

4.1.3	Herzfrequenz	43
4.1.4	Hämatokrit und Hämoglobinkonzentration	45
4.1.5	Arterielle Blutgase und Atemfrequenz.....	47
4.1.6	Arterielle Laktatkonzentration	49
4.1.7	Basendefizit	51
4.2	Mikrozirkulation.....	53
4.2.1	Arteriolen und Venolen.....	53
4.2.2	Erythrozytenfließgeschwindigkeit.....	55
4.2.3	Extravasation	57
4.2.4	Leukozyten–Endothelzell–Interaktion	59
4.2.5	Funktionelle Kapillardichte.....	61
5	DISKUSSION	63
5.1	Einleitung.....	63
5.1.1	Epidemiologie des hämorrhagischen Schocks.....	63
5.1.2	Klinische Einteilung	63
5.1.3	Stadien des Schocks.....	65
5.1.4	Therapie und Prognose.....	66
5.2	Diskussion der Methodik	69
5.2.1	Modell der Rückenhautkammer.....	69
5.2.2	Modell des hämorrhagischen Schocks	72
5.2.3	Methode der intravitalem Fluoreszenzmikroskopie	75
5.3	Diskussion der Ergebnisse.....	78
5.3.1	Schock.....	78
5.3.2	Volumenersatz	83
5.3.3	Nachbeobachtung	85
6	ZUSAMMENFASSUNG.....	100
7	LITERATURVERZEICHNIS	104
8	LEBENS LAUF.....	129
9	DANKSAGUNG.....	131

1 Einleitung

1.1 Rationale zur Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger

Das Ziel bei der Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger ist es, die Sauerstofftransportkapazität des Blutes zu steigern, um dadurch unter kritischen Bedingungen die Sauerstoffversorgung der Gewebe verbessern zu können. Die häufig verwendete Bezeichnung „Kunstblut“ ist aber insofern unpassend, als dass diese Lösungen lediglich darauf ausgelegt sind, Sauerstoff zu transportieren und die anderen Funktionen des Blutes im Bereich der Hämostase oder des Immunsystems weder ersetzen können noch sollen.

Die Entwicklung künstlicher Sauerstoffträger wurde ursprünglich vor allem für die präklinische Therapie von Traumapatienten gefordert. Allein in Deutschland versterben jährlich ca. 25 000 Menschen am hämorrhagisch-traumatischen Schock, womit dieser die häufigste Todesursache in der Bevölkerungsgruppe zwischen 15 und 45 Jahren darstellt (100). Eine schnelle und effiziente Therapie gerade in der Frühphase des Schocks ist von entscheidender Bedeutung für das Überleben (26). Durch Volumentherapie kann zwar die akute Hypovolämie behoben werden, ab einem bestimmten Punkt wird jedoch die Verdünnungsanämie zum limitierenden Faktor für die Gewebeoxygenierung. Dann wären Erythrozytenkonzentrate die Therapie der Wahl, diese sind jedoch im präklinischen Zeitraum nicht verfügbar. Hier könnten künstliche Sauerstoffträger auf Hämoglobinbasis zum Einsatz kommen. Sie sind gut lagerungsfähig und können unabhängig von der Blutgruppe des Patienten verabreicht werden, da sie keine Antigene aufweisen.

Zusätzlich könnte der Einsatz hämoglobinbasierter Sauerstoffträger helfen, perioperative Fremdblut-Transfusionen zu vermeiden. Die transfusionsassoziierten Risiken konnten zwar in den Industrieländern durch hohe Qualitätsstandards und verbesserte Testmöglichkeiten stark reduziert, aber nicht beseitigt werden (Tabelle 1-1).

Risiken	Häufigkeit	Todesfälle/ 1 Million EKs
Infektionen		
viral		
Hepatitis A	1/1.000.000	0
Hepatitis B	1/30.000 - 1/250.000	0 - 0,14
Hepatitis C	1/30.000 - 1/150.000	0,5 - 17
HIV	1/200.000 - 1/2.000.000	0,5 - 5
HTLV Typ I und II	1/250.000 - 1/2.000.000	0
Parvovirus B 19	1/10.000	0
Bakteriell	1/500.000	0,1 - 0,25
Akute hämolytische Reaktionen	1/250.000 - 1/1.000.000	0,67
Verzögerte hämolytische Reaktionen	1/1.000	0,4
transfusionsassoziiertes ARDS	1/5.000	0,2

Tabelle 1-1: Transfusionsassoziierte Risiken in den USA (nach Goodnough et al. (68))

Nach wie vor besteht die Gefahr einer transfusionsbedingten Virusinfektion, wenngleich die Wahrscheinlichkeit dafür durch die Screeningverfahren wie zum Beispiel der Testung auf HIV-, p24- oder HCV-Antikörper seit den 80-er Jahren um mehrere Zehnerpotenzen verringert werden konnte (13). Ein weiteres Risiko geht von der bakteriellen Kontamination aus, die zumeist durch Yersinien verursacht wird. Die Häufigkeit hierfür nimmt proportional zur Lagerungsdauer der Erythrozytenkonzentrate zu (1; 2). Ungefähr die Hälfte aller Todesfälle bei akuten hämolytischen Reaktionen ist auf AB0-Inkompatibilitäten infolge falscher Zuordnung von Konserve zu Empfänger zurückzuführen (116), weshalb der Bedside-Test vor jeder Erythrozytentransfusion zwingend vorgeschrieben ist. Kaum vermeidbar dagegen ist das Auftreten verzögerter hämolytischer Reaktionen infolge einer Alloimmunisierung auf seltenere, im routinemäßigen

Antikörpersuchtest nicht zu detektierende Blutgruppenantigene (149). In seiner Pathogenese noch weitgehend ungeklärt ist das Auftreten von transfusionsassoziierten akuten Lungenschäden (TRALI), die sich in den ersten vier Stunden nach Transfusion in Form eines nicht - kardiogenen Lungenödems mit Atemnot und Dyspnoe manifestieren (159). Darüber hinaus scheinen Bluttransfusionen eine durch Spenderleukozyten verursachte Immunsuppression beim Empfänger zu bewirken (155). Während widersprüchlich diskutiert wird, ob die Hemmung des Immunsystems durch Bluttransfusionen für eine erhöhte Rate postoperativer Infektionen und frühzeitige Tumorrezidive verantwortlich ist (206), gibt es Hinweise darauf, dass sie einen unabhängigen Risikofaktor für posttraumatisches Multiorganversagen darstellen (146). Aufgrund der zuletzt genannten Erkenntnisse wurde im Jahre 2001 in Deutschland eine standardmäßige Leukozytendepletion für Erythrozytenkonzentrate vorgeschrieben (3).

Unabhängig von den transfusionsassoziierten Risiken führt die epidemiologische Entwicklung in den Industrienationen zu einer zunehmenden Verknappung des „Rohstoffes Blut“: Der abnehmenden Spendenbereitschaft in der Bevölkerung und der Einschränkung des Spenderkollektivs durch Screening-Untersuchungen auf der einen Seite steht der medizinische Fortschritt gegenüber, der im Rahmen der Maximalversorgung immer größere Operationen bei immer älteren Patienten möglich werden lässt. Dementsprechend sagen Hochrechnungen für das Jahr 2030 einen Fehlbestand von 4 Millionen Blutkonserven in den USA voraus (205; 207).

1.2 Geschichte

1.2.1 Hämolysate und stromafreie Hämoglobinlösungen

Bereits in der ersten Hälfte des letzten Jahrhunderts wurden durch die Lyse von Erythrozyten und anschließende Aufreinigungsschritte die ersten Hämoglobinlösungen hergestellt und im Tierversuch getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass Hämoglobinlösungen prinzipiell in der Lage sind, Sauerstoff zu transportieren (8). Im Jahre 1949 publizierten Amberson et al. erstmals Erfahrungen über den Einsatz von Hämoglobinlösungen beim Menschen (7). Als wichtigste Nebenwirkungen wurden eine Steigerung des arteriellen Blutdruckes und in Abfall der Herzfrequenz beobachtet, zudem wurde eine Beeinträchtigung der Nierenfunktion durch die Verabreichung der Hämoglobinlösung vermutet. Besonders Aufsehen erregend war der Fall einer 22-jährigen Patientin, die nach schweren postpartalen Blutungen durch die Infusion von insgesamt 2,3 Litern Hämoglobinlösung (250 g Hb) zwar zunächst stabilisiert wurde, jedoch 9 Tage später im Nierenversagen verstarb. Als Ursache hierfür wurde neben der Schädigung der Niere durch den Schock eine zusätzliche Beeinträchtigung der Organfunktion durch eine Verunreinigung der Hämoglobinlösungen mit Stroma-Resten gesehen (29; 143).

Die weitere Entwicklung fokussierte sich auf die Herstellung stromafreier Hämoglobinlösungen (166), aber auch diese verursachten bei gesunden Testpersonen ausgeprägte Nebenwirkungen, und zwar wiederum einen Blutdruckanstieg in Begleitung von Bradykardie, Bauchschmerzen und eine passagere Verschlechterung der Nierenfunktion in Kombination mit Hämaturie (181). Da nun Stroma-Reste als Ursache für die Nebenwirkungen ausgeschlossen werden konnten, richtete sich der Fokus weiterer Untersuchungen auf das Verhalten von freiem Hämoglobin im Kreislauf. Dabei identifizierte man vor allem drei weitere Probleme, die einem Einsatz stromafreier Hämoglobinlösungen am Menschen im Wege stehen: Außerhalb der Erythrozyten dissoziiert das Hämoglobin-Tetramer rasch in Di- und Monomere, welche dann renal eliminiert werden. Dies bedingt einerseits eine relativ kurze intravasale Halbwertszeit von etwa 60 Minuten (7) andererseits

führt das glomerulär filtrierte Hämoglobin zu einer Schädigung der Nierentubuli, vergleichbar mit dem Bild einer Crush-Niere (29; 143).

Zudem fehlt außerhalb der Erythrozyten der allosterische Effektor 2,3-BPG, der die Sauerstoff-Affinität von Hämoglobin bei ca. 27 mmHg einregelt. Ohne ihn liegt die Sauerstoffaffinität von Hämoglobin bei nur etwa 12 mmHg, was die Sauerstoffabgabe in den peripheren Geweben stark beeinträchtigt.

1.2.2 Chemisch modifizierte Hämoglobinlösungen

Durch chemische Modifikation gelang Walder und Mitarbeitern (217) die Herstellung einer neuartigen Hämoglobinlösung, die in den Neunziger Jahren unter dem Namen Diaspirin-Cross-Linked Hemoglobin (DCLHb) zu einem der größten Hoffnungsträger unter den HBOC wurde. Bei diesem Molekül verhindert die kovalente Verbindung der beiden α -Untereinheiten ($\alpha\alpha$ -crosslinking) über eine bis(3,5-Dibromosalicyl)-Fumarat-Brücke die Dissoziation und senkt gleichzeitig die Sauerstoff-Affinität in den physiologischen Bereich (33 mmHg) (208).

In präklinischen Studien zeigte DCLHb trotz der Modifikation keine Immunogenität (59). Durch das $\alpha\alpha$ -crosslinking wird das Tetramer nicht mehr so schnell renal eliminiert, wodurch die intravasale Verweildauer gesteigert wurde (81) und auch das Problem der Nephrotoxizität beseitigt werden konnte (82; 204).

Die Effektivität zur Therapie des hämorrhagischen Schocks konnte in verschiedenen Tiermodellen belegt werden (38; 40; 49; 55; 72; 74; 82; 150; 152; 161; 164; 185), wobei sich auch hier über den reinen Volumeneffekt hinaus eine zusätzliche Blutdrucksteigerung durch arterioläre Vasokonstriktion nachweisen ließ, wie sie schon von den stromafreien Hämoglobinlösungen her bekannt war. Auch in einer klinischen Phase I - Studie an gesunden Probanden wurden eine

dosisabhängige Blutdrucksteigerung und gastrointestinale Beschwerden als wichtigste Nebenwirkungen bei der Verabreichung von DCLHb festgestellt (162).

In den folgenden Jahren durchlief DCLHb erfolgreich klinische Phase II – Studien (163) und wurde dabei auch für Indikationen wie Sepsis (169), apoplektischen Insult (182) oder kardiale Bypassoperationen (105) untersucht. Als erste Hämoglobinlösung überhaupt wurde es schließlich in zwei groß angelegten Phase III – Studien für die Therapie des hämorrhagischen Schocks getestet (96; 193).

Bei einer dieser Studien stellte sich jedoch heraus, dass die Mortalität in der DCLHb-behandelten Gruppe signifikant höher war als die der konventionell therapierten Kontrollgruppe (193). Dies führte nicht nur zum frühzeitigen Abbruch der besagten Studie, sondern auch zur Einstellung des gesamten DCLHb-Programmes durch die Firma Baxter.

Zwar wurden auch Fehler bei der Planung und Durchführung der Studie für das Scheitern mitverantwortlich gemacht (173; 193), aber offensichtlich lag es auch an den Nebenwirkungen von DCLHb, dass der Vorteil der zusätzlichen Sauerstofftransportkapazität nicht in ein besseres Überleben der Patienten umgesetzt werden konnte (222).

1.3 Vasoaktivität von Hämoglobinlösungen und NO-Scavenging

Schon 1920 war berichtet worden, dass die Infusion von Hämoglobinlösungen zu arterieller Hypertension führt (23) und bereits Amberson et al. forderten als Ursache dafür einen chemischen Pressoreffekt (7). Es sollte jedoch noch Jahrzehnte dauern, bis die verantwortlichen Mechanismen für die Vasoaktivität von Hämoglobinlösungen entdeckt wurden. Ein Meilenstein hierbei waren die Forschungen von Furchgott, Ignarro und Murad (Nobelpreis 1998), die nachgewiesen haben, dass der bis dahin postulierte endothelium-derived relaxing factor (EDRF) nichts anderes ist als das in freier Form extrem kurzlebige Stickstoffmonoxid (NO). Stickstoffmonoxid wird im Körper von verschiedenen Isoformen der NO-Synthase durch Abspaltung des terminalen Stickstoff-Atoms aus der Aminosäure L-Arginin gebildet. Nach der Identifizierung der NO-Synthase in Aortenringen von Kaninchen durch Furchgott 1980 wurden die verschiedenen Unterformen der NO-Synthase eingeteilt in

- die neuronale NO-Synthase (nNOS), welche NO in den Neuronen des zentralen und auch peripheren Nervensystems synthetisiert und so eine wichtige Rolle bei der zellulären Kommunikation spielt
- die induzierbare NO-Synthase (iNOS), welche im Immunsystem aber auch im kardiovaskulären System vorkommt und eine Rolle bei Entzündungs- und Abwehrreaktionen spielt
- die endotheliale NO-Synthase (eNOS), welche unter anderem in Abhängigkeit von den Scherkräften am Endothel NO produziert, welches von dort aus in die glatten Muskelzellen der Gefäßwand diffundiert und dort über einen Guanylatcyclase-abhängigen Mechanismus zur Vasodilatation führt. Diese mehr oder weniger konstante, strömungsabhängige NO-Produktion und -Diffusion ist einer der Hauptmechanismen bei der lokalen Autoregulation der Gewebedurchblutung.

NO zählt zu den freien Radikalen, daher ist es ein sehr reaktionsfreudiges und instabiles Molekül. Diffundiert NO aus dem Endothel in das Gefäß-Lumen, so kann es dort über eine Vielzahl verschiedener Reaktionen mit Hämoglobin interagieren. Allerdings reduzieren der Plasmasaum zwischen Endothel und Erythrozyt (110) und die Erythrozytenmembran selbst (86; 102; 119) die Diffusion von NO zum Hämoglobin und begrenzen dadurch das Ausmaß der Reaktionen (86; 119; 210; 211). Eine Met-Hb-Reduktase schützt das Hämoglobin im Erythrozyten effektiv vor der Oxidation zu Methämoglobin und Nitrat (56; 119).

In letzter Zeit wurde entdeckt, dass Hämoglobin in der Lage ist, NO in Form von S-nitroso-Hämoglobin zu binden und im Kreislauf zu transportieren (69; 91; 196). Hierbei scheint – ähnlich wie beim Sauerstofftransport – ein allosterischer Effekt die Bindung von NO in sauerstoffreicher Umgebung zu begünstigen, wohingegen bei Erreichen eines sauerstoffärmeren Umfeldes die NO-Abgabe erleichtert wird (91; 196). Dementsprechend wurde postuliert, dass NO zusätzlich zur lokalen Autoregulation auch eine wichtige Rolle bei der systemischen Anpassung des Blutflusses an den metabolischen Bedarf der einzelnen Gewebe spielt (67; 71; 191).

Liegt Hämoglobin nicht intraerythrozytär, sondern frei im Plasma gelöst vor, so sind die Reaktionen zwischen NO und Hämoglobin nur noch durch die Diffusion des Moleküls in die Häm-Tasche limitiert und finden „nahezu mit Lichtgeschwindigkeit“ statt (67). Aufgrund veränderter Reaktionsbedingungen kommt es hierbei primär zu einer Inaktivierung von NO, was man als „NO-Scavenging“ bezeichnet: Reagiert NO mit Oxy-Hämoglobin, so bildet sich Met-Hämoglobin und Nitrat, reagiert es mit Deoxy-Hämoglobin, entsteht Nitrosyl-Hämoglobin (154; 219). Durch diese Reaktionen wird NO in Hämoglobinlösungen bis zu 650-fach schneller abgebaut als in einer Erythrozytensuspension mit vergleichbarem Hämoglobingehalt (119). Gleichzeitig bedeutet die Bildung von Met-Hämoglobin auch eine funktionelle Inaktivierung des Hämoglobins für den Sauerstofftransport (107; 153).

Nach heutigem Verständnis ist NO-Scavenging der hauptverantwortliche Mechanismus für die Vasoaktivität und den blutdrucksteigernden Effekt von Hämoglobinlösungen wie zum Beispiel DCLHb (50; 200). Eine Steigerung des Blutdruckes kann unter hypotensiven Bedingungen wie beim hämorrhagischen Schock durchaus erwünscht sein. Einen wirklichen Vorteil bringt die Blutdrucksteigerung allerdings erst dann, wenn sie auch zu einem erhöhten Blutfluss in den Geweben führt. Wird die Steigerung des Blutdruckes hingegen lediglich durch eine Konstriktion der Widerstandsgefäße erreicht, so kann es distal der Konstriktion sogar zu einem Abfall der Gewebepfusion kommen. Dies würde bedeuten, dass bei Verwendung von DCLHb für die Therapie des hämorrhagischen Schocks die Stabilisierung des Kreislaufes möglicherweise nur auf Kosten der Gewebedurchblutung erreicht wurde.

Im Modell der Rückenhautkammer am syrischen Goldhamster konnte in unserem Institut gezeigt werden, dass der Volumenersatz nach hämorrhagischem Schock mit DCLHb zwar den Blutdruck wieder vollständig herzustellen kann, dass dabei die Kapillarperfusion aber signifikant schlechter wiederhergestellt wird als durch autologes Blut oder 6% Dextran 60 (150). Hess et al. unterzogen dehydrierte Schweinen einem hämorrhagischen Schock und beobachteten, dass die Therapie mit einem DCLHb-Analogon zu ausgeprägter Hypertension führte, das Herzzeitvolumen reduzierte und sowohl den systemischen als auch den pulmonal-arteriellen Widerstand verdoppelte (82). Unter diesen Bedingungen führte der hohe Gefäßwiderstand zu einer Perfusionsstörung der Gewebe. Dadurch wurde der Nutzen der zusätzlichen Sauerstofftransportkapazität vollständig aufgehoben und bezüglich der Sauerstoffversorgung der Gewebe zeigte sich kein Vorteil mehr gegenüber der Therapie mit Ringer-Laktat oder 5% Albuminlösung (82).

1.4 Wege zur Reduktion des NO-Scavenging

Wegen der dieser Problematik und weiterer potentiell schädlicher Nebenwirkungen durch das NO-Scavenging zielt die aktuelle Forschung darauf ab, Hämoglobinlösungen mit deutlich reduzierter NO-Scavenging-Kapazität herzustellen. Hierzu werden im Wesentlichen drei verschiedene Ansätze verwendet, nämlich Nanoenkapsulierung, Polymerisation und gentechnische Modifikation.

1.4.1 Nanoenkapsulierung

Durch Nanoenkapsulierung in Liposomen kann man – in Nachahmung der physiologischen Verhältnisse - das Hämoglobin räumlich vom Plasmakompartiment trennen. Solche hämoglobingefüllte Liposomen werden daher auch als Neo-Red-Cells bezeichnet. Erste Versuche mit Neo-Red-Blood-Cells wurden bereits im Jahre 1957 durchgeführt (36), scheiterten allerdings lange Zeit an der raschen Phagozytose dieser Vesikel durch das retikulo-endotheliale System (167). Durch verbesserte Techniken der Nanoenkapsulierung konnte die Halbwertszeit in der Zirkulation inzwischen auf über 24 h verlängert werden und verschiedene Typen von Neo-Red-Blood-Cells befinden sich inzwischen in präklinischer Testung (37).

1.4.2 Polymerisation

Durch die Polymerisation von Hämoglobin oder/und die Bindung an Makromolekülen wie z.B. Polyethylen-Glykol (129; 147) kann der Molekül-Durchmesser gesteigert werden. Dies führt vermutlich aufgrund der verlängerten Diffusionsstrecken und der geringeren Extravasationstendenz zu einer Reduktion der vasoaktiven Nebenwirkungen (127; 180). Einige dieser Hämoglobinlösungen wurden zwar erfolgreich in klinischen Studien getestet (39; 196), allerdings ist nach wie vor bislang kein Vertreter dieser Gruppe in den USA oder Europa für die Therapie des hämorrhagischen Schocks zugelassen (195).

1.4.3 Rekombinante Hämoglobinlösungen

Durch die Fortschritte der letzten Jahre im Bereich der Biotechnologie ist es möglich geworden, das Hämoglobin-Gen gentechnisch zu modifizieren, dadurch gezielte sterische Veränderungen am Hämoglobinmolekül selbst vorzunehmen und somit die Bindungs- und Reaktionseigenschaften für Sauerstoff und Stickstoffmonoxid selektiv zu verändern.

Hierfür wurden die gewünschten, gentechnisch modifizierten Gensequenzen zu einem Operon kombiniert und mit einem Promotor versehen. Das so entstandene Expressionsplasmid wurde in *E.coli* eingebracht und die Bakterienstämme in einem Fermenter vermehrt. Nach Induktion der Kultur kommt es zur Expression der modifizierten α - und β -Untereinheiten, welche in den Bakterien akkumulieren und sich bereits intrazellulär zum fertigen Hb-Tetramer zusammenlagern. Im Anschluss daran werden die Bakterien lysiert und das rekombinante Hb isoliert, aufgereinigt und in eine Trägerlösung gegeben (50; 123).

1.4.3.1 *rHb1.1*

Eine der ersten auf diesem Wege hergestellten Hämoglobinlösungen war das rekombinante Hämoglobin 1.1 (*rHb1.1*). Bei *rHb1.1* wurden die beiden α -Ketten des Hämoglobinmoleküls über eine Glycinbrücke zwischen dem C-terminalen Arginin der einen und dem N-terminalen Valin der anderen Kette fusioniert. Um eine physiologische Sauerstoffaffinität zu erreichen, musste zudem eine Asn-108 β ->Lys-Mutation eingeführt werden, wie sie auch in der natürlich vorkommenden Presbyterian-Variante von Hämoglobin zu finden ist (123).

Die Häm-Tasche von *rHb1.1* wurde nicht weiter modifiziert, weshalb die NO-Scavenging-Kapazität ähnlich hoch wie die von DCLHb ist. Bei *rHb1.1* handelt es sich also um ein rekombinant hergestelltes $\alpha\alpha$ -crosslinked Hämoglobin, welches nach wie vor ein Vertreter der vasoaktiven Hämoglobinlösungen ist (siehe Tabelle 3-2).

In Tierversuchen gewährleistete rHb1.1 selbst nach vollständigem Blutaustausch (Hkt < 3%) eine suffiziente Gewebeoxygenierung (190). Es ist in der Lage, nach hämorrhagischem Schock die Makrohämodynamik effizient wieder herzustellen (122; 188). Bei klinischen Phase-I-Studien zur Verträglichkeit zeigte sich kein Hinweis auf Nephrotoxizität (213), nach wie vor fanden sich aber die typischen Nebenwirkungen vasoaktiver Hämoglobinlösungen: Nach Verabreichung kam es zu einem transienten Blutdruckanstieg (78; 213) und die Probanden berichteten über gastrointestinale Beschwerden (Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Durchfall), wie sie auch von DCLHb bekannt waren (213). Zudem kam es im Blut zu einem leichten Anstieg der Bilirubinwerte und zu einer leichten Erhöhung der Pankreasenzyme Amylase und Lipase (78).

Inzwischen ist bekannt, dass auch die gastrointestinalen Nebenwirkungen von rHb1.1 auf NO-Scavenging zurückgeführt werden können. Durch die Verringerung von NO im Gastrointestinaltrakt kommt es über nicht-adrenerge, nicht-cholinerge (NANC) Neuronen zu Peristaltikstörungen und einer Relaxationsstörung gastrointestinaler Sphinkter, zum Beispiel am Ösophagus (43; 148), am Sphinkter Oddi (45) oder dem Analsphinkter (168). Die transiente Erhöhung der Pankreasenzyme wurde dementsprechend im Zusammenhang mit einer Stauungspankreatitis diskutiert, wohingegen die erhöhten Bilirubinwerte als eine Folge des gesteigerten Hämoglobin-Metabolismus gesehen werden können (213).

In der oben genannten Verträglichkeitsstudie klagten die Patienten teilweise über grippeähnliche Symptome wie Fieber, Myalgien, Schüttelfrost, Kopf- und Rückenschmerzen; bei einem Patienten musste die Infusion sogar wegen einer anaphylaktoiden Reaktion abgebrochen werden (213). Obwohl es sich bei rHb1.1 um ein bakteriell synthetisiertes Produkt handelt, kann eine Verunreinigung der Hämoglobinlösung durch pyrogene Bestandteile mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden, zumal in der verabreichten Lösung kein Endotoxin messbar war. Es gibt jedoch tierexperimentelle Befunde, die belegen, dass der Effekt von Endotoxin durch vasoaktive Hämoglobinlösungen potenziert wird, sodass normalerweise subletale Dosen eine letale Wirkung

entfalten können (224). Vor diesem Hintergrund könnte man die oben beschriebenen grippeähnlichen Symptome als eine Sensibilisierung auf bereits zirkulierende Pyrogene interpretieren. Bereits 1995 wurden daher Bedenken vor möglicherweise fatalen Effekten beim Einsatz vasoaktiver Hämoglobinlösungen an septischen Patienten geäußert (70).

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass rHb1.1 als erster Vertreter einer rekombinanten Hämoglobinlösung zwar seine prinzipielle Eignung für den Transport von Sauerstoff unter Beweis stellen konnte, dabei jedoch nach wie vor mit den möglicherweise schädlichen Eigenschaften vasoaktiver Hämoglobinlösungen behaftet ist.

1.4.3.2 rHb2.0

Aufgrund der Tatsache, dass die meisten der beobachteten Nebenwirkungen vasoaktiver Hämoglobinlösungen auf NO-Scavenging zurückgeführt werden können (50), war es das erklärte Ziel bei der Entwicklung von rHb2.0, die NO-Scavenging-Kapazität zu minimieren.

Durch den Austausch zweier Aminosäuren, die in die Häm-Tasche hineinragen und dort die Bindung von Sauerstoff bzw. Stickstoffmonoxid sterisch beeinflussen, konnte selektiv die Reaktionsrate zwischen dem Hämoglobin und Stickstoffmonoxid reduziert werden, ohne dabei die Sauerstoffaffinität wesentlich zu beeinträchtigen (31). Zusätzlich wurden bei rHb2.0 die Hämoglobinmoleküle untereinander polymerisiert und so das durchschnittliche Molekulargewicht auf 128–256 kD erhöht (31), was einerseits die intravasale Verweildauer erhöht und andererseits die Vasoaktivität nochmals reduziert (51). Durch diese Veränderungen konnte die Reaktionsrate von NO mit Oxy-Hämoglobin ($k'_{\text{NO,OX}}$) von $60 \mu\text{Mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (rHb1.1) auf $2,5 \mu\text{Mol}^{-1}\text{s}^{-1}$ (rHb2.0), also fast um den Faktor 30 vermindert werden (siehe Tabelle 3-2).

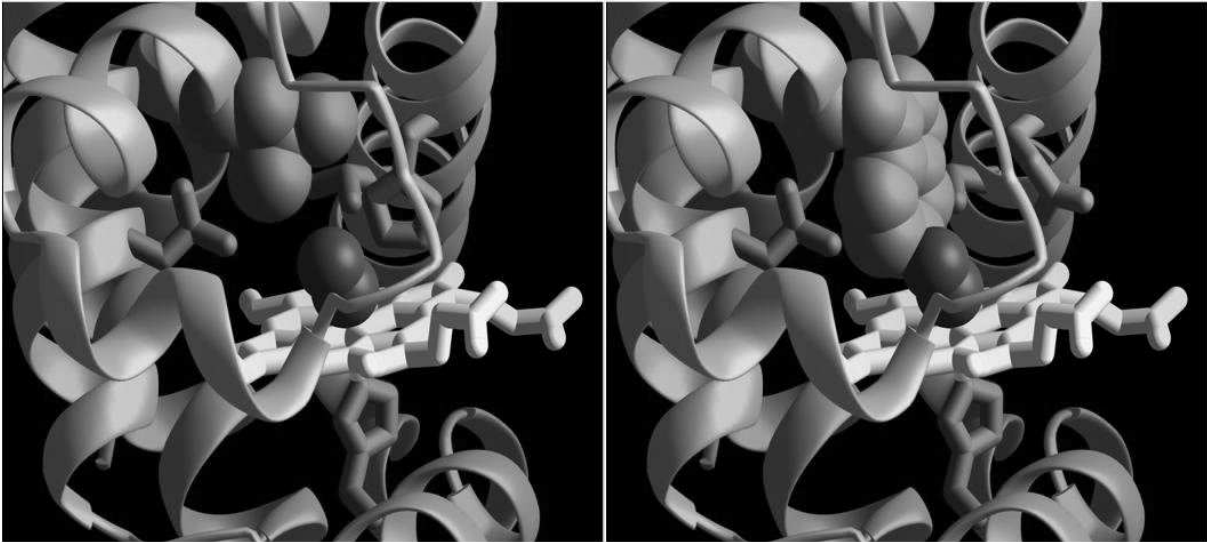


Abbildung 1-1: Modelle der Häm-Taschen von rHb1.1 und rHb2.0. Der Austausch zweier Aminosäurereste, die in die Häm-Tasche hineinragen und dort die Bindung von O_2 bzw. NO beeinflussen, führt zu einer Reduktion der $k'_{NO,OX}$ um den Faktor 30, ohne dabei die Sauerstoffaffinität wesentlich zu beeinträchtigen (Baxter Hemoglobin Therapeutics, Boulder, USA)

2 Fragestellung

Ziel dieser experimentellen Arbeit war es, im Tiermodell die Effekte der rekombinanten Hämoglobinlösung rHb2.0 bei Volumenersatz nach hämorrhagischem Schock zu untersuchen und dabei festzustellen, in wieweit die Reduktion der NO-Scavenging-Kapazität das Verhalten der Mikrozirkulation, aber auch Makrozirkulation und ausgewählte Laborparameter beeinflusst.

Zur besseren Beurteilung der Effektivität wurden der rHb2.0-Gruppe zwei weitere Versuchsgruppen zur Seite gestellt, die nach dem gleichen Protokoll entweder mit der kolloidalen Kontrolllösung 6% Dextran 60 oder mit der rekombinanten Hämoglobinlösung rHb1.1 als Vertreter einer vasoaktiven Hämoglobinlösung mit normaler NO-Scavenging-Kapazität behandelt wurden.

3 Material und Methodik

3.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 4-6 Wochen alte männliche Syrische Goldhamster (*Mesocricetus auratus*; Charles River Wiga, Sulzfeld, BRD) mit einem Körpergewicht zwischen 50 und 70 g. Die Tiere wurden bei 12-stündigem Hell-Dunkel-Rhythmus, 22°C Raumtemperatur und 40% Luftfeuchtigkeit in Sammelkäfigen mit Sägespäne-Einstreu gehalten. Nach der Implantation der Rückenhautkammer wurden sie zur Vorbeugung von Verletzungen in Einzelkäfige umgesetzt. Sie hatten stets freien Zugang zu Futter (Vit.A 15000 IE; Vit.D3 1000 IE; Vit.E 100 mg; Sniff Spezialdiäten, Soest, BRD) und Wasser.

Die Experimente wurden zwischen August 2000 und September 2001 mit der Genehmigung der Regierung von Oberbayern am Institut für Chirurgische Forschung der LMU München (ICF) durchgeführt. Das experimentelle Protokoll entsprach den Vorschriften des deutschen Tierschutzgesetzes (TierSchG; Fassung 1.6.1998) und den Empfehlungen des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ (Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Sciences, National Research Council; National Academy Press, Washington D.C. 1996, USA).

3.2 Modell der Rückenhautkammer

Ausgehend von der Algire-Kammer (6) wurde das Modell der Rückenhautkammer von Endrich et al. am ICF weiterentwickelt und für den Syrischen Hamster etabliert (57). Es erlaubt die fluoreszenzmikroskopische Untersuchung der Mikrozirkulation im quergestreiften Rückenhautmuskel des Hamsters in Abwesenheit von chirurgischem Trauma und Einflüssen durch Anästhetika.

Die Rückenhautkammer (Laborwerkstatt Institut für Chirurgische Forschung, München, BRD) besteht aus zwei symmetrischen Kammerhälften aus Titanblech (leichtgewichtig, biologisch inert

und wenig thermokonduktiv), in deren Mitte jeweils eine kreisrunde Mikroskopieröffnung ausgespart ist. In einer der Öffnungen ist ein dünnes Deckglas von 11,8 mm Durchmesser eingelegt und mittels Sprengring fixiert. Die beiden Kammerhälften werden über drei Schrauben so miteinander verbunden, dass über Distanzmuttern und Unterlegscheiben entsprechend der Dicke der Muskelpräparation eine Spalte von ca. 0,45 mm erhalten bleibt.

Das Modell der Rückenhautkammer erlaubt die intravitalmikroskopische Untersuchung der Mikrozirkulation in einem quergestreiften Rückenhautmuskel, dem *Musculus cutaneus maximus*. Dieser quergestreifte Muskel liegt direkt unter der Haut auf einem anderen Muskel (*Musculus retraktor*), welcher seinerseits der lumbalen Haut vor der Flankendrüse entspringt und zum kaudalen Ende der Backentaschen zieht. Der *Musculus cutaneus maximus* zeichnet sich dadurch aus, dass er zwar großflächig, aber sehr dünn ist, sodass das versorgende Kapillarbett nur aus ein bis zwei Ebenen besteht und nahezu planar angelegt ist.

Die von Zweifach und Metz (225) 1955 eingeführte Nomenklatur für die Gefäße der Mikrozirkulation in der Rückenhaut des Hamsters wurde aufgrund der weiten Verbreitung des Modells 1986 von Funk und Meßmer überarbeitet (66).

Die Versorgung des Rückenhautmuskels findet über dorsale Rami cutanei der Arteriae intercostales statt. Hebt man die Rückenhaut an, so sieht man je einen kranialen Ast auf Höhe der Scapula und einen zweiten Ast ca. 3 cm kaudal davon in die Falte aufsteigen (A_0 -Gefäße, Durchmesser ca. 150 μm , siehe Abbildung 3-2). Diese zweigen sich Y- oder T-förmig auf und bilden die in der Subcutis gelegenen Gefäßarkade (A_1 -Arteriolen, ca. 50-80 μm), die den Rückenhautmuskel bogenförmig umschließt und mit der jeweils anderen A_0 -Arterie anastomosiert.

Die Gefäßarkade gibt weitere Äste ab (A_2 -Arteriolen, ca. 30-70 μm), die ebenfalls in der Subcutis zum Muskel ziehen und in ihn mit mehreren A_3 -Arteriolen (12-25 μm) eintreten. Diese teilen sich zu jeweils 3-8 A_4 -Arteriolen (6-15 μm) auf, welche schließlich die parallel zu den Muskelfasern

verlaufenden Kapillarfelder perfundieren. Die Kapillaren drainieren in kleine Sammelvenolen (8 – 25 μm), welche sich über weitere Venolen (25 – 80 μm) zu zwei kleinen Venen vereinigen, die parallel zu den Arterien in der Subcutis wieder zu den Vv. intercostales ziehen.

3.3 Vorbereitung der Versuchstiere

3.3.1 Implantation der Rückenhautkammer

Zur Kammerimplantation wurden die Hamster mit einer intraperitonealen Injektion von jeweils einem Drittel Xylazinhydrochlorid (Rompun 2%; Bayer Vital GmbH, Leverkusen, BRD), Ketaminhydrochlorid (Ketavet 100 mg/ml; Pharmacia & Upjohn GmbH, Erlangen, BRD) und isotoner Kochsalzlösung (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, BRD) in einer Dosierung von 3,3 ml/kg KG narkotisiert.

Nach Einsetzen der Anästhesie wurden die Augen mit einer Salbe (Bepanthen Roche, Hoffmann-La Roche AG, Grenzach-Wyhlen, BRD) vor dem Austrocknen geschützt. Der Rücken der Hamster wurde zunächst mit einem Langhaarschneider (GT 104/GH204, Aesculap, Tuttlingen, BRD) geschoren, die Haarreste mit Hilfe einer keratolytischen Creme (Pilca Med, ASID BONZ, Böblingen, BRD) entfernt und anschließend die Rückenhaut mit Cutasept F (Bode Chemie, Hamburg, BRD) desinfiziert.

Anschließend wurde der Hamster in Bauchlage auf eine auf 37 °C vorgewärmte Kleintieroperationsplattform (IFB, Hiddenhausen, BRD) unter ein stereoptisches Operationsmikroskop (Wild M650, Wild-Heerbrugg AG, Heerbrugg, Schweiz) gelegt. Die Kammerimplantation wurde unter sterilen Bedingungen mit Mundschutz und Einmalhandschuhen durchgeführt. Entlang der thorakolumbalen Wirbelsäule wurde eine ca. 5 cm lange Hautfalte um 3 cm angehoben und die durch Gegenlicht sichtbar gemachten Gefäßarkaden der beiden Hautseiten zur Deckung gebracht. In dieser Position wurde die Hautfalte an zwei Nahtfäden (Ethibond Excel 5/0, Ethicon GmbH, Norderstedt, BRD) kranial und kaudal der Arkadengefäße aufgehängt.

Die mit Schrauben und Distanzmuttern bestückte Kammerhälfte wurde auf der dem Präparationsareal abgewandten Seite der Hautfalte angehalten und unter Gegenlichtkontrolle so positioniert, dass die kreisrunde Aussparung im kranialen Teil der Gefäßarkade über dem quergestreiften Hautmuskel zu liegen kam. Dort wurde mit zwei Einzelknopfnähten der Oberrand

der Kammer am Scheitel der Hautfalte festgenäht. Während die obere der drei Schrauben über den Scheitel der Hautfalte ragte, wurde für die beiden an der Basis liegenden Schrauben mit einer 13 G Infusionsnadel (Abbott GmbH, Wiesbaden, BRD) ein Loch durch die Hautfalte gestochen, die Gewinde im Katheter auf die Seite der Präparation gezogen und dort mit Baby-Moskito-Klemmen gesichert.

Die anschließende Präparation des Hautmuskels wurde in Seitenlage des Hamsters bei weiterhin aufgespannter Hautfalte unter dem Operationsmikroskop durchgeführt. Unter 25-facher Vergrößerung wurde in einem kreisrunden Areal von ca. 15 mm Durchmesser die oben liegende Hauthälfte mit Cutis, Subcutis und quergestreiftem Hautmuskel abgetragen, zusätzlich wurden beide Schichten des durch das Präparationsareal ziehenden, flächigen Retraktormuskels entfernt. Dadurch wurde der quergestreifte Hautmuskel der unteren Hautschicht dargestellt und in einem letzten Arbeitsgang unter Befeuchtung mit isotoner Kochsalzlösung (Delta-Pharma GmbH, Pfullingen, BRD) von Bindegewebsresten befreit. Im Präparationsareal blieben somit nur der quergestreifte Hautmuskel sowie die Subcutis und Cutis der unteren Hautfalte erhalten.

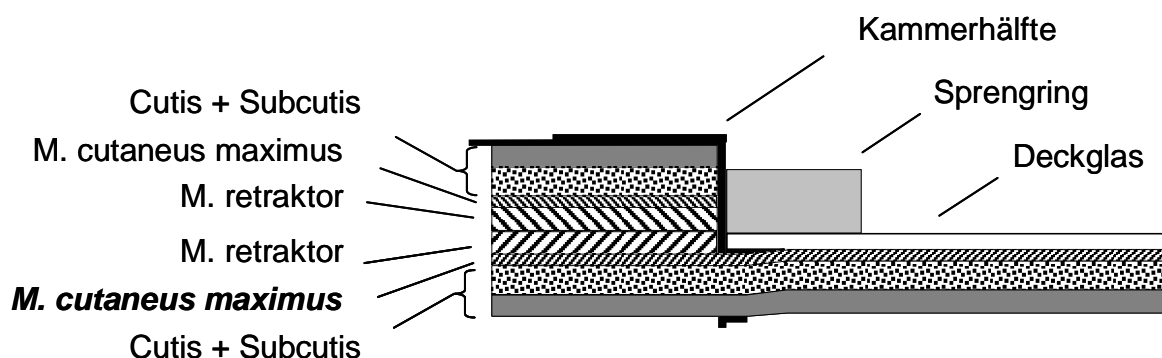


Abbildung 3-1: Querschnitt durch eine Rückenhaulfalte mit Kammerpräparation; fett kursiv beschriftet die untersuchte Schicht des *M. cutaneus maximus*.

Nach Kontrolle der Blutungsstillung und Reinigung der Präparation mit Kochsalzlösung wurde die zweite, mit dem Glasfenster bestückte Kammerhälfte auf das Präparationsareal gelegt und druckfrei mit der unteren Kammerhälfte verschraubt. Abschließend wurde die Hautfalte mit zwei weiteren Einzelknopfnähten am oberen Kammerrand befestigt und die anfangs eingebrachte Haltenaht entfernt. Zum Schutz vor Verunreinigung wurde der obere Spalt zwischen den Kammerhälften und die der Präparation abgewandte Mikroskopieröffnung mit Klebestreifen verschlossen. Nach Implantation der Rückenhautkammer wurde den Hamstern eine Erholungspause von mindestens zwei Tagen gewährt.

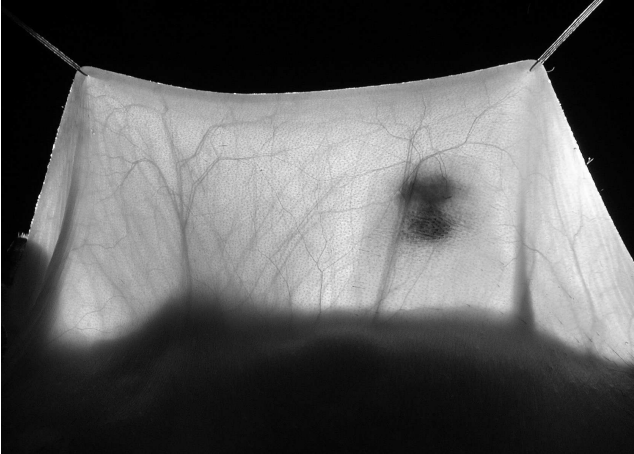


Abbildung 3-2: Die angehobene Rückenhautfalte ist an Fäden fixiert. Im Gegenlicht erkennt man die paarig aufsteigenden Gefäßhauptstämme (A_0), aus denen die Arkadengefäße (A_1) hervorgehen. Im kranialen Drittel zeichnet sich der flächig einstrahlende *M. retraktor* ab, neben den kaudalen Gefäßhauptstämmen befindet sich die Flankendrüse

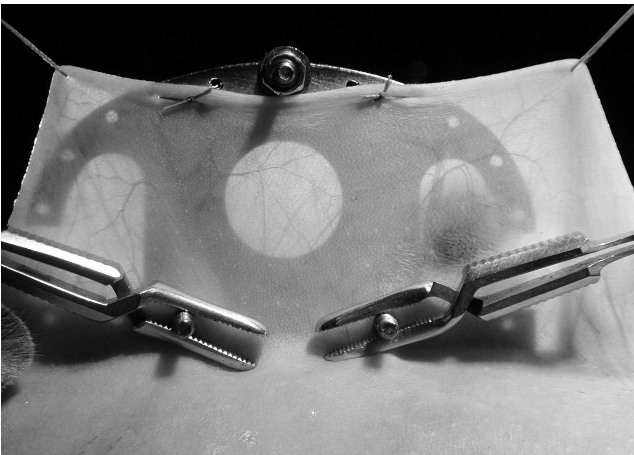


Abbildung 3-3: Die Rückenhautkammer wird hinter den kranialen Gefäßhauptstämmen über dem *M. retraktor* positioniert. Der Oberrand der Hautfalte wird mit Nähten am Kammerrand befestigt, an der Basis werden die Fixierungsschrauben durch die Hautfalte getunnelt und mit Baby-Moskito-Klemmen fixiert

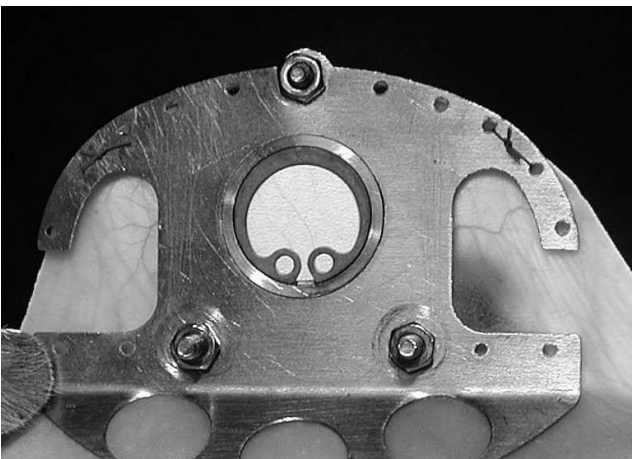


Abbildung 3-4: Nach der Präparation des *M. cutaneus maximus* wird die zweite Hälfte der Rückenhautkammer aufgelegt und verschraubt. In die Mikroskopieröffnung wird ein Deckglas eingelegt und mit Sprengring fixiert. Distanzmuttern zwischen den Kammerhälften verhindern die Kompression des Gewebes

3.3.2 Implantation der Katheter

War die Rückenhautkammer nach diesem Zeitraum makroskopisch entzündungsfrei, so wurden die Arteria carotis communis und die Vena jugularis externa katheterisiert. Die Tiere wurden hierfür wie zur Kammerimplantation anästhesiert, in der vorderen Halsregion mit keratolytischer Creme enthaart und mit dem Rücken so auf zwei Plexiglasblöcke (ca. 20 x 10 x 5 cm) gelegt, dass die Kammer senkrecht zwischen den beiden Blöcken nach unten hing. Die Haut wurde desinfiziert und unter dem Operationsmikroskop rechts paramedian vom Winkel der Mandibula bis zur Clavikula inzidiert. Nach Eröffnung der Halsfaszie wurde die Glandula submandibularis mobilisiert und seitlich ausgelagert.

Anschließend wurde der Hamster auf die linke Seite gelegt. Vom seitlichen Halsdreieck aus wurde eine 13G-Abbocath-Kanüle (Abott Ireland, Sligo, Irland) unter der Haut über die rechte Scapula bis zur Basis des kranialen Kammerrandes vorgeschoben. Dort wurde die Haut durchstoßen und der Mandrin zurückgezogen. Über die verbliebene Plastikkanüle wurden zwei sterile, mit heparinisierter Kochsalzlösung (1:1000 Heparin-Natrium 5000 IE/ml; Braun Melsungen AG, Melsungen, BRD) gefüllte Polyethylen-Katheter (Länge ca. 40 cm, Innendurchmesser 0,28 mm, Portex Ltd., Lyhe, Kent, England) von der Kammer aus in den Operationssitus vorgeschoben. Die Kanüle wurde entfernt und der Hamster wieder in Rückenlage gebracht.

Unter 25-facher Vergrößerung wurde nun die rechte Vena jugularis externa oberhalb der Clavikula dargestellt, ligiert (Perma-Hand Seide 7-0, Ethikon, Norderstedt, BRD) und kaudal der Ligatur mit einer Gefäßschere eingeschnitten. Über den Schnitt wurde ein Katheter bis in die Vena subclavia vorgeschoben und nach Lagekontrolle durch Aspiration mit zwei Ligaturen in der Vena jugularis externa fixiert.

Analog wurde die rechte Arteria carotis communis im Trigonum caroticum unter Schonung des Nervus vagus und des Nervus phrenicus präpariert und kranial ligiert. Um größere Blutverluste zu vermeiden, wurden proximal der ersten Ligatur zwei weitere Ligaturen vorgelegt und die Arterie

nochmals proximal mit einer Yasargil-Gefäßklemme abgeklemmt. Nach Inzision und Einbringen des Katheters in das Lumen der Arterie wurden die vorgelegten Ligaturen gestrafft, die Klemme entfernt und der Katheter über den Truncus brachiocephalicus in den Aortenbogen vorgeschoben. In dieser Position wurde er nach Lagekontrolle durch Aspiration mit den Ligaturen fixiert.

Beide Katheter wurden mit einer Einzelknopfnahrt an der Glandula submandibularis gesichert und dann soweit zurückgezogen, dass sie in einer lockeren Schleife in der Subcutis in Richtung Rückenhautkammer zogen. Abschließend wurde der Operationssitus mit Kochsalzlösung gespült und mit einer fortlaufenden Naht (Ethibond Excel 5/0) verschlossen. Die Katheter wurden nochmals auf Durchgängigkeit getestet, mit heparinierter Kochsalzlösung geblockt und die am freien Enden mit Knoten verschlossen. Zur sicheren Verstaung wurden sie am Eintrittspunkt in die Rückenhaut mit Einzelknopfnähten zwischen den Kammerrahmen fixiert, der Rest wurde aufgewickelt und unter einem Verband aus Klebestreifen an der Kammer befestigt. Nach der Katheterimplantation wurde den Hamstern nochmals eine zweitägige Erholungspause gewährt, um einen Einfluss von Narkose und chirurgischer Interventionen auf den Versuch auszuschließen.

3.4 Versuchsaufbau

Zur Versuchsdurchführung wurden die Hamster in einer frontal verschlossenen Plexiglasröhre (Länge 21 cm, Durchmesser 4 cm, Laborwerkstatt ICF) immobilisiert. Diese Röhre war mit Atemlöchern und einem ca. 0,5 cm breiten Schlitz für die Aufnahme der Rückenhautkammer versehen. Für die Versuche wurden die Hamster mit der Röhre auf die rechte Seite gelegt und in einer Halterung auf dem Mikroskopiertisch fixiert, sodass die Mikroskopieröffnung der Rückenhautkammer horizontal unter dem Okular des Mikroskops zu liegen kam. Das Intravitalmikroskopische Setup basierte auf einem AxioTech-Mikroskop (Zeiss, Oberkochen, BRD) mit einem 1,25-fach vergrößernden Projektionsokular, welches über eine Führungsschiene an einer vertikalen Gewindestange aufgehängt war und über einen Elektromotor als Ganzes angehoben und abgesenkt werden konnte. Die Fokussierung fand manuell über den Grob- und Feintrieb des Mikroskops statt. Auch die Untersuchungsplattform, auf die die Hamster in der Röhre für die Untersuchung gelegt wurden, war auf Führungsschienen gelagert und konnte von einem Computer aus über elektrische Schrittmotoren angesteuert und in einem horizontalen Koordinatensystem millimetergenau ausgerichtet werden.

Die eingehende Beurteilung der Kammerpräparation und eine Vorauswahl der Untersuchungsareale fand unter Durchleuchtung (Transillumination) mit einem 10x / 0,3 W Archoplan-Objektiv (Zeiss) und einer externen, regulierbaren Lichtquelle (KL 1500 electronic, Zeiss) mit zwischengeschaltetem Blaufilter statt. Die x/y-Koordinaten der ausgewählten Kammerareale wurden mit einem digitalen Bildverarbeitungsprogramm (Optimas 5.2, Optimas Corp., Boston, USA) im Steuerungsrechner gespeichert, sodass sie zu den einzelnen Messzeitpunkten des Versuches wieder aufgerufen und über die Schrittmotoren exakt eingestellt werden konnten.

Die Untersuchung der Mikrozirkulation während des Versuches wurde mit einem 20x / 0,5 W Archoplan-Wasserimmersionsobjektiv (Zeiss) in Auflichttechnik (Epiillumination) vorgenommen.

Hierfür wurde das Blutplasma der Hamster mit 70µl des Fluoreszenzfarbstoffes 0,5 % FITC-Dextran 150 i.v. (Sigma Chemicals, Deisenhofen, BRD) angefärbt und mit einer 12V / 100W Xenonlampe (Zeiss) in Kombination mit einem I 2/3 - Filterblock visualisiert. Zur Beurteilung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion wurden die Leukozyten mit 70 µl 0,05% Rhodamin 6G i.v. (Sigma Chemicals) markiert und mit einer 100W Quecksilber-Kurzbogenlampe und einem N2 – Filterblock dargestellt. Durch Einschieben der entsprechenden Filterblöcke und Umschalten der Lichtquelle konnte problemlos zwischen dem FITC - und dem Rhodamin-Modus gewechselt werden (siehe Abbildung 3-5).

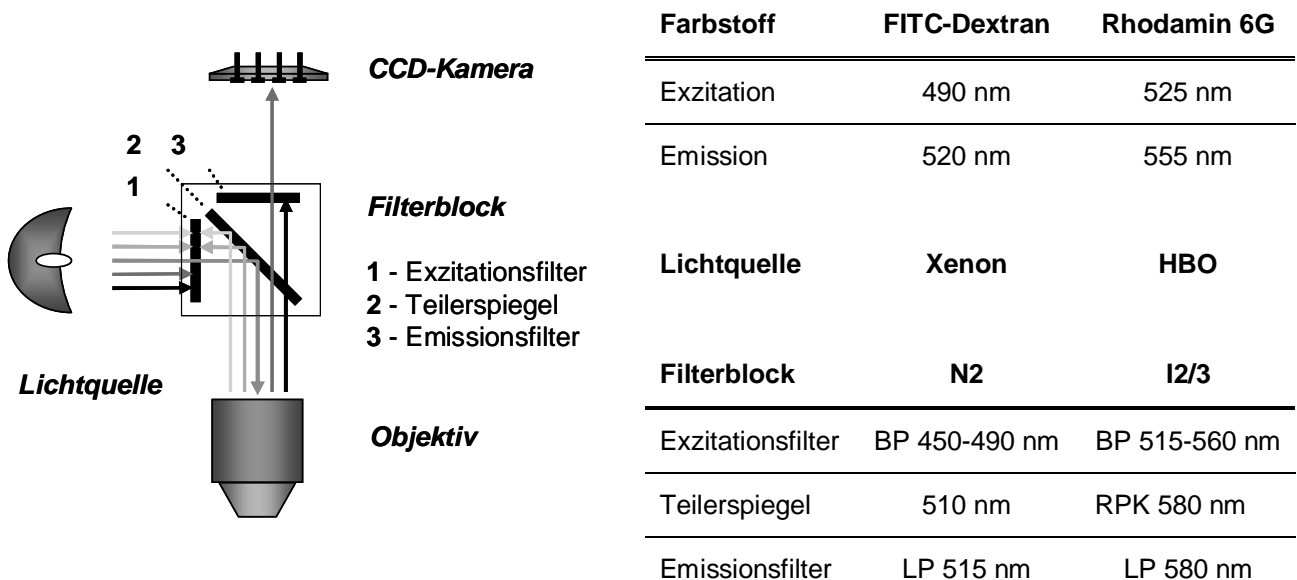


Abbildung 3-5: Schematisierte Darstellung des Prinzips der Videofluoreszenzmikroskopie in Epiillumination. Entsprechend dem verwendeten Fluoreszenzfarbstoff wurden verschiedene Sets von Lichtquellen und Filterblöcken verwendet

Die Mikrozirkulation der Rückenhautkammer wurde mit einer in das Mikroskop integrierten CCD-Kamera (Charge Coupled Device, FK6990 IQ-S, Lichtempfindlichkeit 0,02 Lux, 699 x 581 Pixel, Pieper, Schwerte, BRD) gefilmt. Die Bilder wurden durch einen Videotimer (VT 633, Fora Company Ltd, Tokio, Japan) mit Datum und Uhrzeit versehen und in Echtzeit sowohl auf einen

Videomonitor (PVM 2043 MD, Sony, Köln, BRD) als auch auf einen Computermonitor mit dem Optimas-Bildverarbeitungsprogramm übertragen. Auf dem Videomonitor wurden die Auswahl der Areale, die Feinfokussierung und Beleuchtungsintensität überwacht, während mit dem Bildverarbeitungsprogramm ein SVHS-Videorecorder (SVO-9500 MDP, Sony Corporation, Köln, BRD) angesteuert wurde, der die ausgewählten Sequenzen der Mikrozirkulation auf Videokassetten (H471S; Fuji Magnetics GmbH, Kleve, BRD) aufzeichnete. Eine detaillierte Beschreibung des Versuchsaufbaus ist von Harris et al. publiziert worden (76).

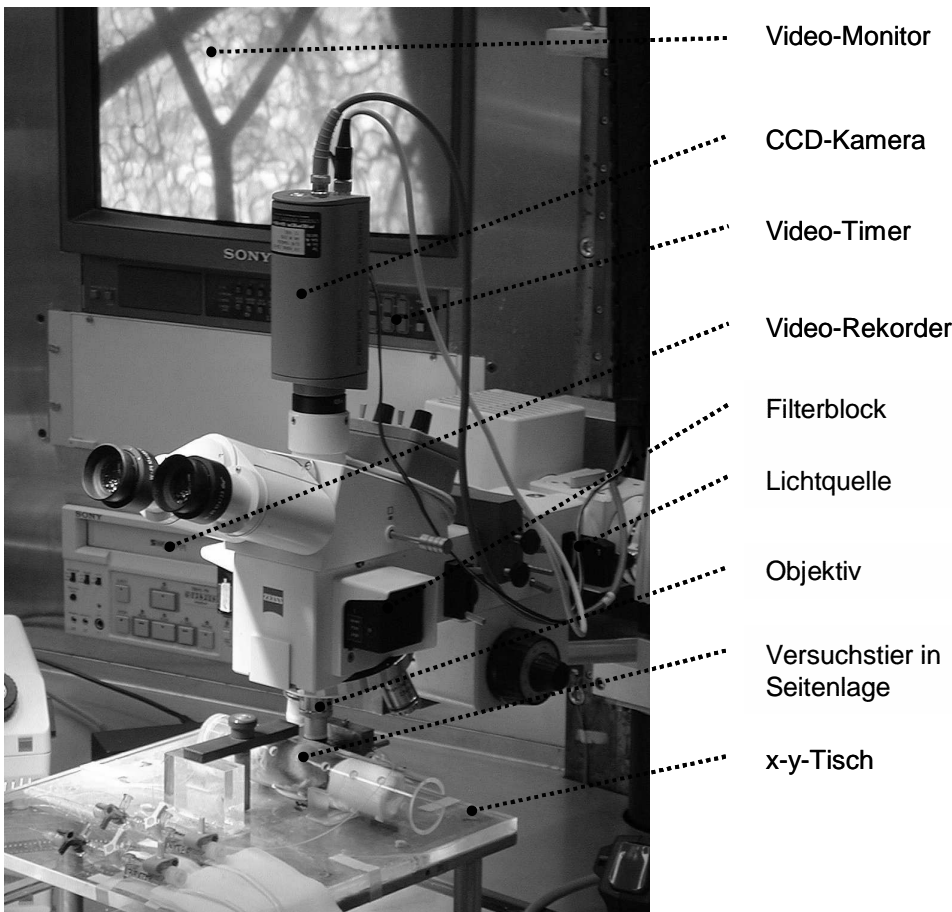


Abbildung 3-6: Versuchsaufbau der vorliegenden Studie. Das Versuchstier befindet sich in der perforierten Plastikröhre in Rechts-Seitenlage immobilisiert, sodass die Rückenhautkammer horizontal unter dem Objektiv zu liegen kommt. Der x-y-Tisch wird über das Bildbearbeitungsprogramm angesteuert

3.5 Versuchsprotokoll

Die Versuche wurden ausschließlich mit Hamstern durchgeführt, deren Körpergewicht zwischen 50g und 70g lag, die sich in gutem Allgemeinzustand befanden und die normales Ess- und Trinkverhalten zeigten. Die Präparation des Rückenhautmuskels musste eine ungestörte Mikrozirkulation aufweisen und frei von Entzündungszeichen, Ödem oder Einblutung sein. Als Entzündungszeichen wurden unregelmäßige Gefäßdurchmesser, korkenzieherartige Schlingelung der Gefäße, Neovaskularisation oder verstärkte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion gewertet. Beide Katheter mussten durchgängig sein und sowohl die Makrohämodynamik als auch die Laborparameter mussten für Hamster physiologische Werte aufweisen. Eine Zusammenstellung der Einschlusskriterien findet sich in Tabelle 3.1.

Zu Beginn des Experimentes wurden Blutplasma und Leukozyten mit den oben genannten Fluoreszenzfarbstoffen angefärbt. Die Ausgangssituation der Mikrozirkulation wurde mit der Videofluoreszenzmikroskopie aufgezeichnet, die Ausgangswerte der Makrozirkulation wurden erhoben und eine arterielle Blutanalyse durchgeführt.

Waren alle Einschlusskriterien erfüllt, so wurde der Schock induziert. Hierfür wurde über eine Perfusorpumpe (33 Syringe Pump; Harvard Apparatus GmbH, March-Hugstetten, BRD) so lange mit einer Rate von 0,4 ml/min Blut über den arteriellen Katheter entnommen, bis der mittlere arterielle Blutdruck auf Werte zwischen 30 mmHg und 35 mmHg gefallen war. Hierfür wurden initial entsprechend der Erfahrungen durch die Vorversuche etwa 33 ml/kg KG Blut entnommen, was ungefähr der Hälfte des Blutvolumens der Hamster entsprach.

Über die folgenden 30 min wurde der Blutdruck in diesem Bereich gehalten, indem bei Bedarf weitere kleine Mengen arteriellen Blutes entnommen bzw. zurückgegeben wurden. Zum Ende der Schockperiode wurden erneut Messungen durchgeführt.

Makrozirkulation

MAP	79-95 mmHg
HF	> 350 /min

Laborparameter

p _a O ₂	> 70 mmHg
p _a CO ₂	35-45 mmHg
Hkt	> 40 %
Laktatkonzentration im arteriellen Blut	< 2mmol/l

Mikrozirkulation

- kein Anhalt für Inflammation, geringe Leukozyten-Endothelzell-Interaktion
- mindestens 6 Kapillarfelder mit ausreichend hoher FKD

Table 3-1: Einschlusskriterien der vorliegenden Studie; MAP = mittlerer arterieller Blutdruck; HF = Herzfrequenz; p_aO₂ = arteriöler Sauerstoffpartialdruck; p_aCO₂ = arteriöler Kohlendioxidpartialdruck; Hkt = Hämatokritwert; FKD = Funktionelle Kapillar-Dichte, Länge der erythrozytenperfundierten Kapillaren pro Fläche [cm/cm²]

Nach der Randomisierung wurden die Tiere einer der drei Therapiegruppen zugeteilt. Dann wurde das entnommene Blutvolumen durch das gleiche Volumen in Form von Dex60, rHb1.1 oder rHb2.0 ersetzt. Die Lösungen waren vor der Verabreichung auf 37 °C vorgewärmt worden und wurden über die Perfusor-Pumpe mit 0,2 ml/min über den venösen Katheter appliziert. Wegen der Blutverdünnung durch Schock und Volumenersatz wurden für die nun beginnende Nachbeobachtungszeit erneut je 50µl der Fluoreszenzfarbstoffe verabreicht und anschließend die Parameter der Makrozirkulation erhoben.

In der folgenden Nachbeobachtungszeit von einer Stunde wurden weitere Messungen je 15 min, 30 min und 60 min nach Volumenersatz durchgeführt. Nach dem Ende des Versuches wurden die Hamster mit Pentobarbital (Narcoren, Merial GmbH, Hallbergmoos, BRD) i.v. eingeschläfert und Blutplasma sowie Gewebeproben für die histologische, immunhistochemische und elektronenmikroskopische Aufarbeitung asserviert.

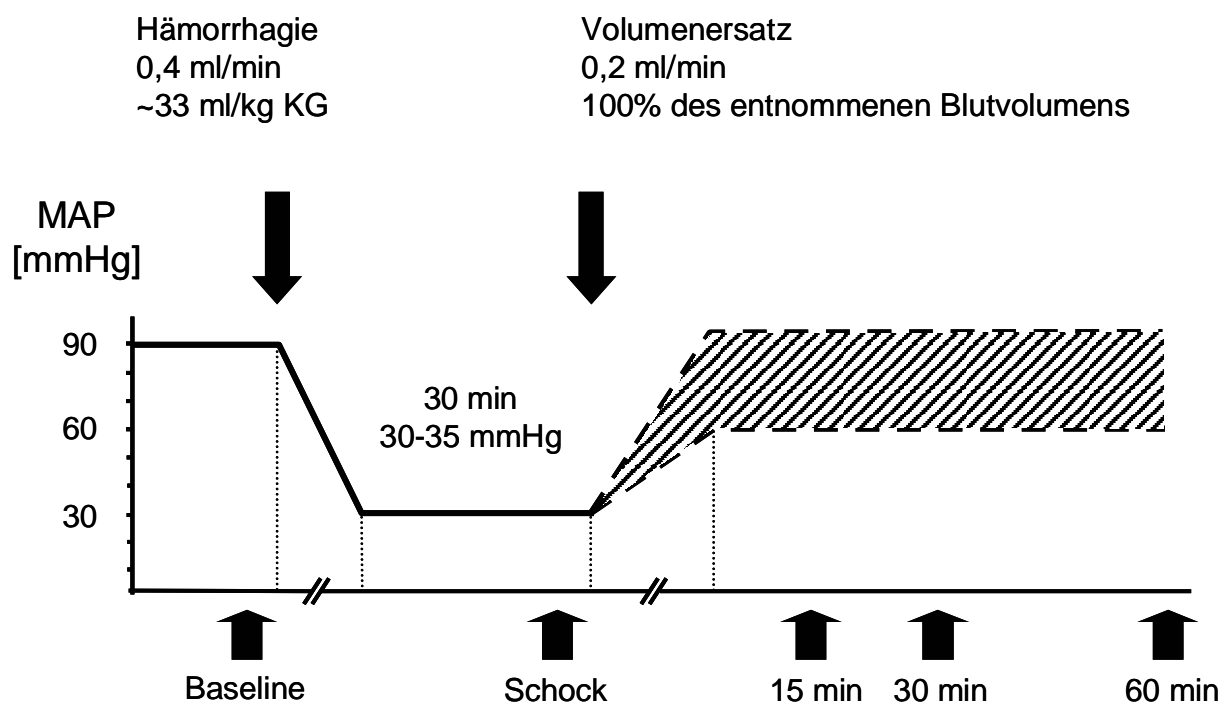


Abbildung 3-7: Experimentelles Protokoll der Studie: 30-minütiger, blutdruckkontrollierter hämorrhagischer Schock mit anschließendem Ersatz des entzogenen Blutvolumens durch Dex60, rHb1.1 bzw. rHb2.0 und 60-minütiger Nachbeobachtungszeit.

3.6 Therapiegruppen

Zum Ende der Schockperiode wurden die Versuchstiere nach Randomisierung einer der drei folgenden Versuchsgruppen (n = 9) zugeteilt:

1. 6% Dextran 60, (Pharmalink, Uppsala, Schweden)
2. rHb1.1 (Baxter Hemoglobin Therapeutics, Boulder, USA)
3. rHb2.0 (Baxter Hemoglobin Therapeutics, Boulder, USA)

Die Eigenschaften der verwendeten Lösungen sind in Tabelle 3-2 zusammengefasst.

	Dex60	rHb1.1	rHb2.0
Hb [g/dl]	-	10,5	10,3
P ₅₀ [mmHg]	-	29-32	31-33
Hill-Koeffizient	-	2,5	1,1
k' _{NO,OX} [$\mu\text{Mol}^{-1}\text{s}^{-1}$]	-	60	2,5
Molekulargewicht [kD]	60	64	128 – 250
pH	4,0 – 7,0	7,3	7,0
Osmolarität [mosm/l]	308	280	303
Onkotischer Druck [mmHg]	39	42	63-68
Viskosität [cP]	2,88	1,9	2,1-2,4
Na ⁺ /Cl ⁻ /K ⁺ [mmol/l]	154/154/-	143/121/4,1	151/119/4,1

Tabelle 3-2: Eigenschaften von Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Dex60 = 6% Dextran 60 entsprechend der Begleitpapiere und Burhop und Doyle (31); Hb = Hämoglobin; P₅₀ = Sauerstoffpartialdruck bei 50 % Hämoglobinsättigung; k' _{NO,OX} = Reaktionsrate zwischen Oxy-Hämoglobin und Stickstoffmonoxid

3.7 Parameter

3.7.1 Makrohämodynamik und Laborparameter

Die arterielle und zentralvenöse Druckkurve wurden über Druckwandler (DTX Plus, Becton Dickinson GmbH, Heidelberg, BRD) abgeleitet und mit einem speziellen Messwerterfassungsprogramm (DASYLab, Datalog GmbH, Mönchenglattbach, BRD) auf einem separaten Rechner dargestellt und kontinuierlich aufgezeichnet. Aus den Pulskurven wurden von dem Programm der mittlere arterielle Druck (MAP; [mmHg]) und der zentralvenöse Druck (ZVD; [mmHg]) sowie die Herzfrequenz (HF; [min⁻¹]) berechnet. Zusätzlich wurde zu den Messzeitpunkten mit Hilfe einer Stoppuhr die Atemfrequenz (AF; [min⁻¹]) über 30 sec ausgezählt und notiert.

Zu jedem Messzeitpunkt wurde über den arteriellen Katheter jeweils 100 µl Blut entnommen und mit einem Blutgasanalysator (Chiron 860, Chiron Diagnostics GmbH, Fernwald, BRD) und einem Zell-Zähler (Coulter AC T8 Hematology Analyzer, Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA) analysiert. Mit dem Blutgasanalysator wurden der arterielle Sauerstoff- und Kohlendioxid-Partialdruck (p_{aO_2} und p_{aCO_2} ; [mmHg]), der pH-Wert (pH), der Basenüberschuss (BE; [mmol/l]) und die arterielle Laktatkonzentration (Laktat; [mmol/l]) gemessen. Mit dem Coulter-Zell-Zähler wurden der Hämatokrit (Hkt; [%]) und der Hämoglobingehalt (Hb; [g/dl]) bestimmt.

3.7.2 Mikrozirkulation

Im Rahmen der initialen Beurteilung der Kammerpräparation wurden zu Versuchsbeginn die zu untersuchenden Areale nach folgenden Kriterien festgelegt:

- 4 Ausschnitte, die Arteriolen mit Durchmessern zwischen 8 µm und 60 µm enthielten,
- 6 Ausschnitte, die Venolen mit Durchmessern zwischen 15 µm und 60 µm enthielten und
- 6 Ausschnitte mit Kapillarfeldern, bestehend aus etwa 5 bis 10 Kapillaren

Bei der Auswahl der Arteriolen und Venolen wurden bevorzugt Gefäßgabeln gewählt und es wurde darauf geachtet, dass ein möglichst breites Spektrum an Gefäßdurchmessern vertreten ist. Zur

Beurteilung der Kapillarperfusion wurden dichte, möglichst homogen perfundierte Areale gewählt. Alle Videoaufzeichnungen der Mikrozirkulation wurden nach Beendigung der Versuche vom selben Untersucher ohne Kenntnis der jeweiligen Versuchsgruppe analysiert. Mit Hilfe eines Mikrozirkulations-Analyse-Programmes (CapImage 6.01, Zeintl, Heidelberg, BRD) wurden hierfür die festgelegten Areale zu den jeweiligen Messzeitpunkten aufgesucht und im Hinblick auf folgende Parameter ausgewertet (98):

- arterioläre und venuläre Gefäßdurchmesser [μm], berechnet als der Mittelwert von 5 im selben Gefäßsegment direkt nebeneinander vorgenommenen Einzelmessungen
- arterioläre und venuläre Extravasation, berechnet als Quotient aus der intravasalen und der direkt paravasalen Fluoreszenz-Intensität des Plasmamarkers FITC-Dextran
- venuläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit [mm/s], gemessen im Zentralstrom der Gefäße anhand von Line-Shift-Diagrammen
- am venulären Endothel rollende Leukozyten [n/s], errechnet aus der Anzahl an Leukozyten, die eine senkrecht zur Gefäßachse verlaufende Linie im Zeitraum von 30 s signifikant langsamer passieren, als frei im Zentralstrom fließende Leukozyten
- am venulären Endothel adhärenente Leukozyten [n/mm^2], errechnet aus der Anzahl an Leukozyten, die in einem definierten Gefäßabschnitt über einen Zeitraum von mindestens 30 s trotz vorhandenem Blutfluss fest am Endothel haften
- Funktionelle Kapillar-Dichte (FKD; [cm/cm^2]), errechnet aus der Länge der mit Erythrozyten perfundierten Kapillaren pro Beobachtungsfeld

3.7.3 Statistik

Alle Rohdaten wurden in einem Tabellen-Kalkulations-Programm (Excel 2000; Microsoft GmbH, Unterschleißheim, BRD) zusammengeführt und mit einem Statistik-Programm (SigmaStat 2.0, Jandel Corp., Erkarth, BRD) bezüglich der Unterschiede zwischen den Gruppen zu den einzelnen Messzeitpunkten analysiert. Von einer Nicht-Normalverteilung ausgehend wurden die Daten mit dem Kruskal-Wallis One Way Analysis of Variance on Ranks auf Signifikanz getestet. Lag diese vor, so wurde ein Zwischen-Gruppen-Vergleich nach der Student-Newman-Keuls-Methode durchgeführt.

Alle Ergebnisse werden im Folgenden als Mittelwert \pm Standardabweichung dargestellt. Die Signifikanzzeichen beziehen sich auf Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu den jeweiligen Messzeitpunkten, wobei das Signifikanz-Niveau wurde auf $p < 0,05$ festgelegt wurde.

4 Ergebnisse

Für die Darstellung der Ergebnisse darf vorweggenommen werden, dass weder unter Ausgangsbedingungen noch im Schock bei den untersuchten Parametern signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden konnten.

4.1 Makrohämodynamik und Laborparameter

4.1.1 Schockinduktion und -aufrechterhaltung

Um den Blutdruck über einen Zeitraum von 30 min auf den Zielbereich von 30 - 35 mmHg abzusenken, wurden den Tieren durchschnittlich $2,8 \pm 0,3$ ml Blut (entsprechend $42,3 \pm 3,6$ ml/kg KG) entzogen. Bei einem Gesamtblutvolumen des Hamsters von 65 ml/kg KG entspricht dies einer Reduktion des zirkulierenden Blutvolumens um ca. 60 %. Hierbei entfielen auf die Schockinduktion 33 ml/kg KG, das restliche Blutvolumen wurde in 100 μ l-Schritten während der Schockperiode abgenommen, wenn der Blutdruck aufgrund von Kompensationsmechanismen auf Werte über 35 mmHg anstieg (siehe Tabelle 4-1).

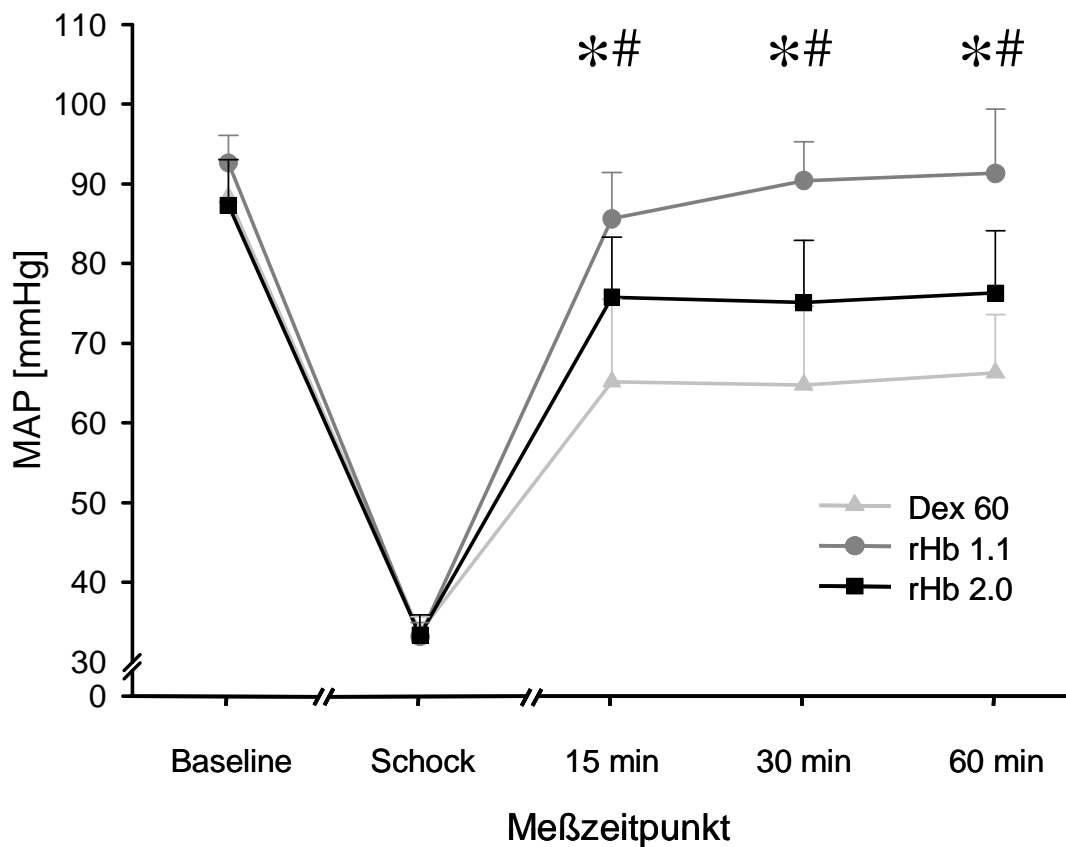
	Körpergewicht [g]	Blutentnahme [ml]	Blutentnahme [ml/kg KG]	Blutentnahme [% Blutvolumen]
Dex60 (n=9)	69,1 \pm 1,6	2,7 \pm 0,3	42,9 \pm 3,7	60,2 \pm 5,1
rHb1.1 (n=9)	72,0 \pm 3,3	2,8 \pm 0,2	43,0 \pm 3,2	60,6 \pm 4,5
rHb2.0 (n=9)	71,7 \pm 4,2	2,7 \pm 0,4	41,1 \pm 4,1	57,9 \pm 6,0

Tabelle 4-1: Mittelwerte von Körpergewicht und entzogenem Blutvolumen in den einzelnen Versuchsgruppen (n=9)

4.1.2 Mittlerer arterieller Blutdruck

Entsprechend den Einschlusskriterien wurden nur Tiere in die Studie eingeschlossen, deren Ausgangs-MAP zwischen 75 mmHg und 95 mmHg lag. Der durchschnittliche MAP aller drei Gruppen unter Ausgangsbedingungen lag bei $89,4 \pm 5,1$ mmHg. Im Schock wurde der Blutdruck auf 30-35 mmHg abgesenkt, zum Ende der 30-minütigen Schockperiode lag der durchschnittliche Blutdruck aller drei Gruppen bei $33,6 \pm 2,0$ mmHg.

Nach Volumenersatz erreichte der MAP in der rHb1.1-Gruppe wieder Werte von $91,3 \pm 3,8$ mmHg, in der rHb2.0-Gruppe stabilisierte er sich bei $76,3 \pm 7,8$ mmHg und in der Dex-Gruppe bei $66,3 \pm 7,3$ mmHg. Die Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen waren jeweils signifikant.



Mittlerer arterieller Blutdruck [mmHg]

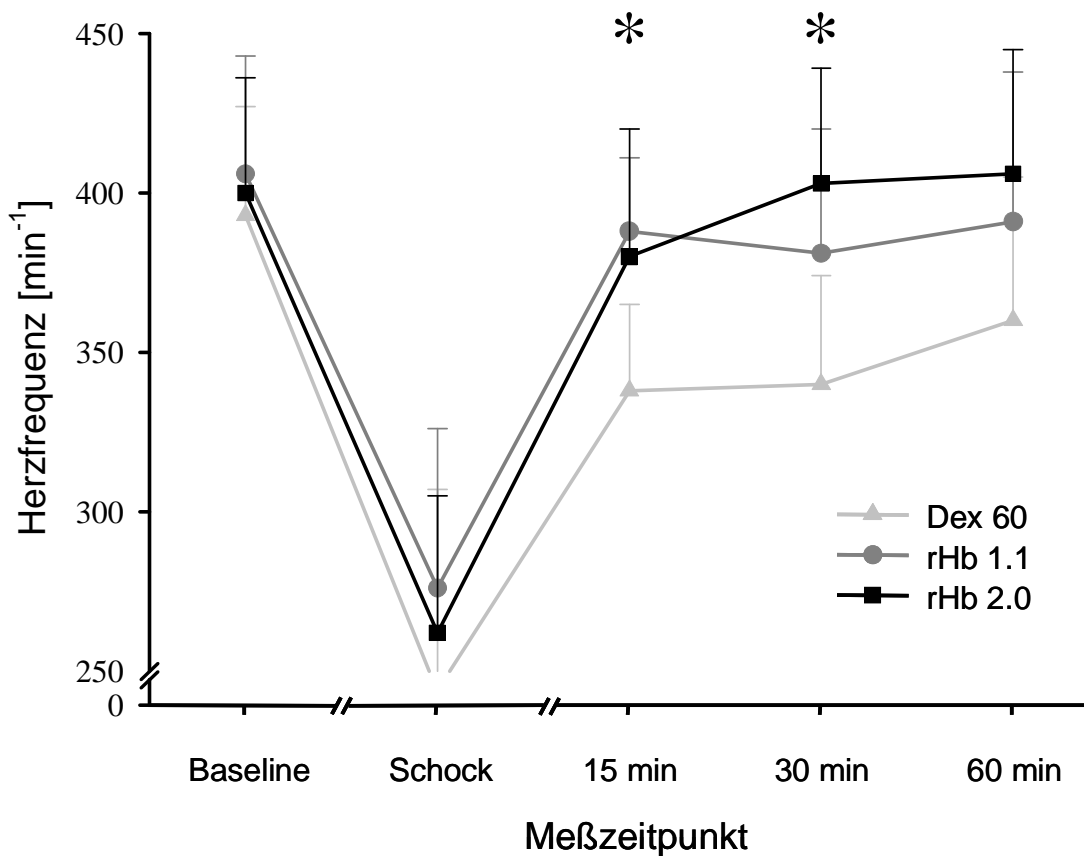
	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=9)	88 ± 5	34 ± 2	65 ± 10	65 ± 10	66 ± 7
rHb1.1 (n=9)	93 ± 4	33 ± 2	86 ± 6*	90 ± 5*	91 ± 8*
rHb2.0 (n=9)	87 ± 6	33 ± 3	76 ± 7*#	75 ± 8*#	76 ± 8*#

Abbildung 4-1: Mittlerer arterieller Blutdruck unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0; # $p < 0,05$ rHb2.0 vs rHb1.1

4.1.3 Herzfrequenz

Unter Ausgangsbedingungen lag die Herzfrequenz bei $400 \pm 34 \text{ min}^{-1}$. Nach Schockinduktion wurden in einigen Fällen intermittierende, bradykarde Rhythmusstörungen beobachtet werden, welche aber nach wenigen Minuten spontan wieder verschwanden. Zum Ende der Schockperiode fanden sich in allen Gruppen deutlich reduzierte Herzfrequenzen von $263 \pm 50 \text{ min}^{-1}$.

Der Volumenersatz führte in der rHb1.1- und der rHb2.0-Gruppe zur Wiederherstellung der Herzfrequenz im Bereich der Ausgangswerte, wohingegen die Herzfrequenz in der Dex-Gruppe bis 30 min nach Volumensubstitution signifikant erniedrigt blieb und auch zu Versuchsende mit $360 \pm 45 \text{ min}^{-1}$ noch leicht unter den Werten der beiden anderen Gruppen lag.



Herzfrequenz [min⁻¹]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=9)	393 ± 34	252 ± 61	338 ± 27	340 ± 34	360 ± 45
rHb1.1 (n=9)	406 ± 37	276 ± 50	388 ± 23*	381 ± 39*	391 ± 47
rHb2.0 (n=9)	400 ± 36	262 ± 43	380 ± 40*	403 ± 36*	406 ± 39

Abbildung 4-2: Herzfrequenz unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. *p < 0,05 Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0

4.1.4 Hämatokrit und Hämoglobinkonzentration

Der Hämatokrit wurde ausgehend von Werten um $46,2 \pm 2,0$ % bereits im Schock durch den „fluid shift“ auf Werte um $27,0 \pm 2,6$ % gesenkt. Durch Volumenersatz kam es zu einer weiteren Reduktion, sodass in der Nachbeobachtungszeit in allen Gruppen ein Hämatokrit von 13 - 15 % gemessen wurde, wobei sich keine signifikanten Unterschiede zeigten.

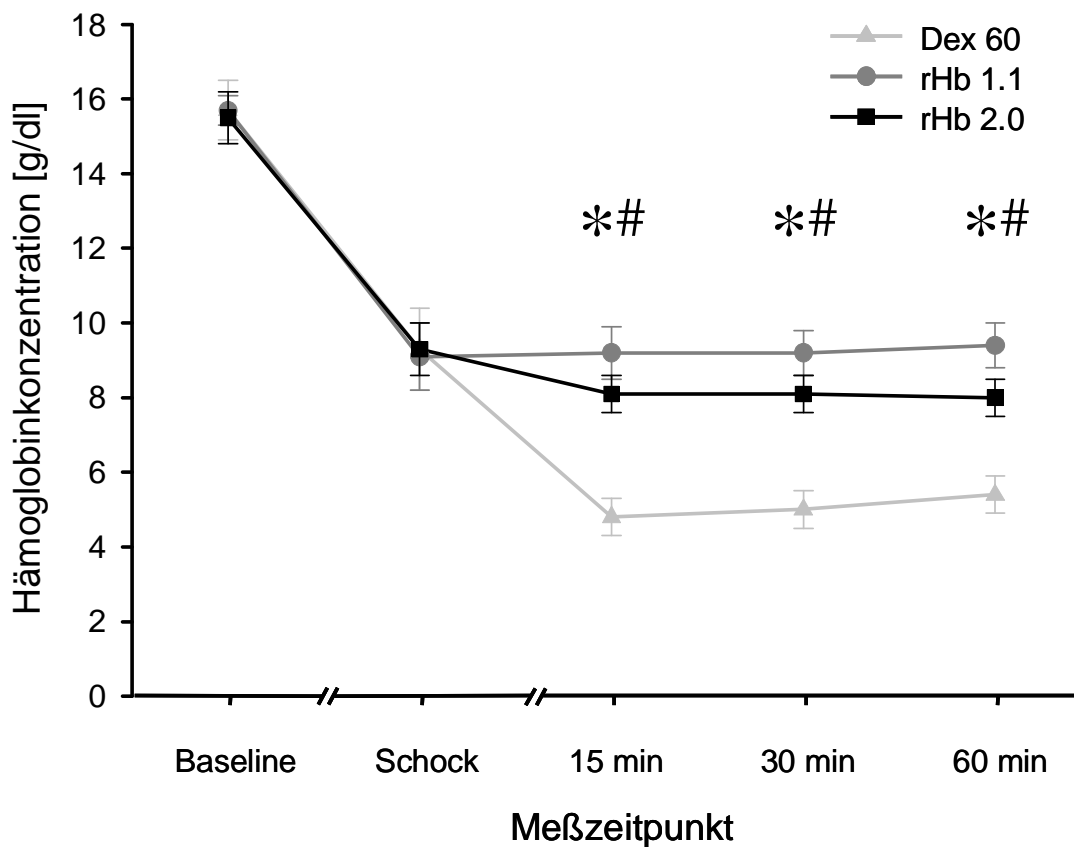
Auch die Hämoglobinkonzentration fiel bereits im Schock von $15,6 \pm 0,6$ g/dl deutlich ab auf $9,2 \pm 0,9$ g/dl. Durch den Volumenersatz mit Dex60 wurde sie nochmals um ca. 50 % auf $4,8 \pm 0,5$ g/dl abgesenkt. Bis zum Ende der Nachbeobachtungszeit stieg sie wieder leicht an auf $5,4 \pm 0,5$ g/dl.

Der Volumenersatz mit den Hämoglobinlösungen führte zu keiner wesentlichen Absenkung oder Steigerung des gemessenen Hämoglobingehaltes, sodass die Hämoglobinwerte von Beginn der Nachbeobachtungszeit an Werten um 9 g/dl (rHb1.1) bzw. 8 g/dl (rHb2.0) lagen. Damit waren die Hb-Werte in den beiden rHb-Gruppen zu jedem Messzeitpunkt deutlich höher als die der Dex60-Gruppe, aber auch zwischen den beiden Hämoglobingruppen zeigte sich von Beginn an ein signifikanter Unterschied.

Hämatokrit [%]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=9)	47 \pm 2	27 \pm 3	13 \pm 2	14 \pm 2	15 \pm 2
rHb1.1 (n=9)	46 \pm 2	26 \pm 3	13 \pm 3	14 \pm 2	15 \pm 2
rHb2.0 (n=9)	46 \pm 2	27 \pm 2	13 \pm 2	14 \pm 2	14 \pm 2

Tabelle 4-2: Hämatokrit unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert \pm Standardabweichung.



Hämoglobinkonzentration [g/dl]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=9)	15.7 ± 0.8	9.3 ± 1.1	4.8 ± 0.5	5.0 ± 0.5	5.4 ± 0.5
rHb1.1 (n=9)	15.7 ± 0.4	9.1 ± 0.9	9.2 ± 0.7*	9.2 ± 0.6*	9.4 ± 0.6*
rHb2.0 (n=9)	15.5 ± 0.7	9.3 ± 0.7	8.1 ± 0.5*#	8.1 ± 0.5*#	8.0 ± 0.5*#

Abbildung 4-3: Hämoglobinkonzentration unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0; # $p < 0,05$ rHb2.0 vs rHb1.1

4.1.5 Arterielle Blutgase und Atemfrequenz

In allen drei Gruppen zeigte sich im Schock eine ausgeprägte Hyperventilation, wobei der p_aO_2 von 77 ± 7 auf 132 ± 10 mmHg anstieg und gleichzeitig der p_aCO_2 von 40 ± 3 auf 31 ± 7 mmHg abfiel.

Durch Volumenersatz mit Dex60 konnte die Hyperventilation nicht wesentlich reduziert werden, sodass die Tiere zum Ende des Versuches immer noch erhöhte p_aO_2 -Drücke aufwiesen. Der Volumenersatz mit rHb2.0 führte zu einem schnelleren Abfall des p_aO_2 auf signifikant niedrigere Werte, am ausgeprägtesten war die Erholungstendenz des p_aO_2 aber in der rHb1.1-Gruppe, signifikant sowohl gegenüber der rHb2.0- als auch der Dex60-Gruppe.

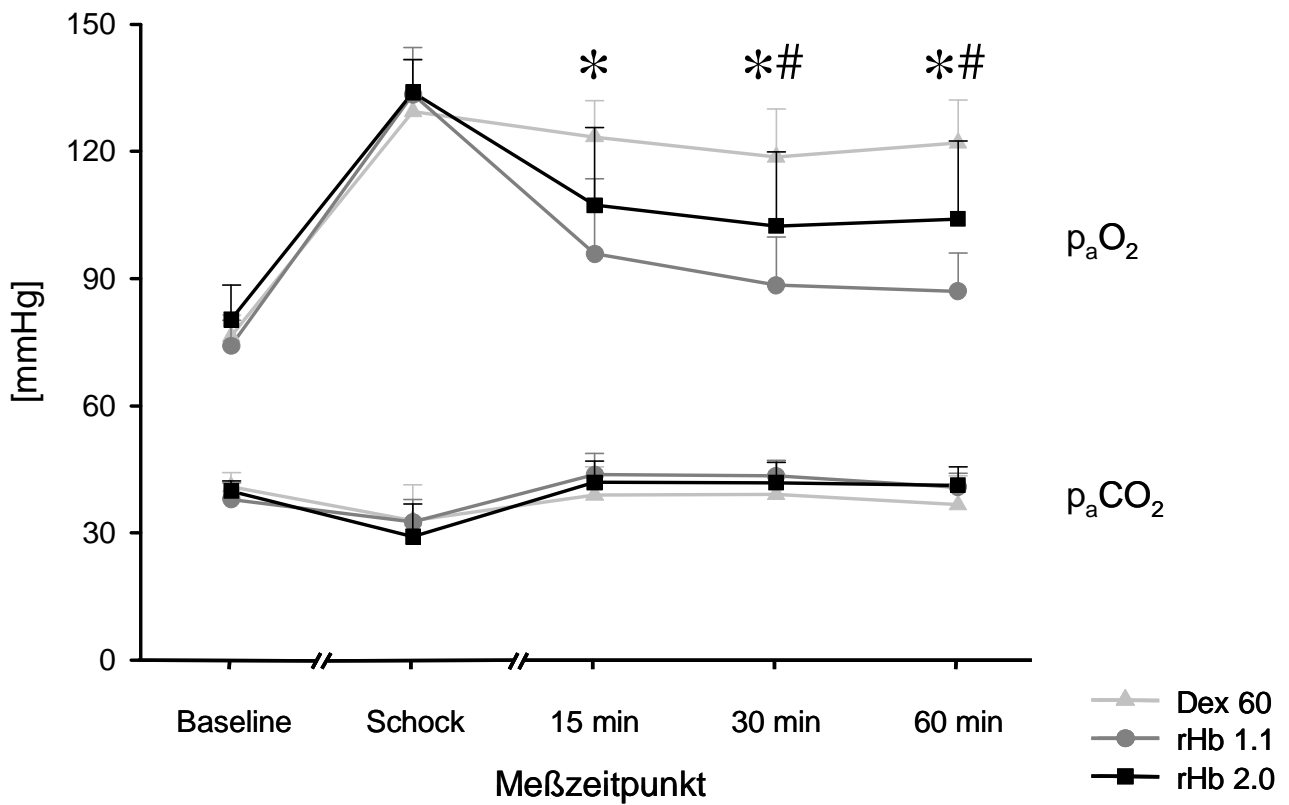
Bezüglich der Atemfrequenz zeigten sich nach dem Schock zu keinem der Messzeitpunkte signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen.

Atemfrequenz [min^{-1}]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=9)	127 \pm 16	139 \pm 19	139 \pm 17	145 \pm 15	147 \pm 13
rHb1.1 (n=9)	120 \pm 12	142 \pm 17	148 \pm 14	141 \pm 9	134 \pm 8
rHb2.0 (n=9)	123 \pm 10	134 \pm 18	145 \pm 16	148 \pm 17	144 \pm 13

Tabelle 4-3: Hämatokrit unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert \pm Standardabweichung.

Abbildung 4-4 (gegenüberliegende Seite): p_aO_2 und p_aCO_2 unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert \pm Standardabweichung. * $p < 0,05$ Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0; # $p < 0,05$ rHb2.0 vs rHb1.1



p_aO_2 [mmHg]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=9)	76 ± 5	129 ± 12	123 ± 9	119 ± 11	122 ± 10
rHb1.1 (n=9)	74 ± 6	133 ± 11	96 ± 18*	88 ± 11*	87 ± 9*
rHb2.0 (n=9)	80 ± 8	134 ± 8	107 ± 18*	102 ± 17*#	104 ± 18*#

p_aCO_2 [mmHg]

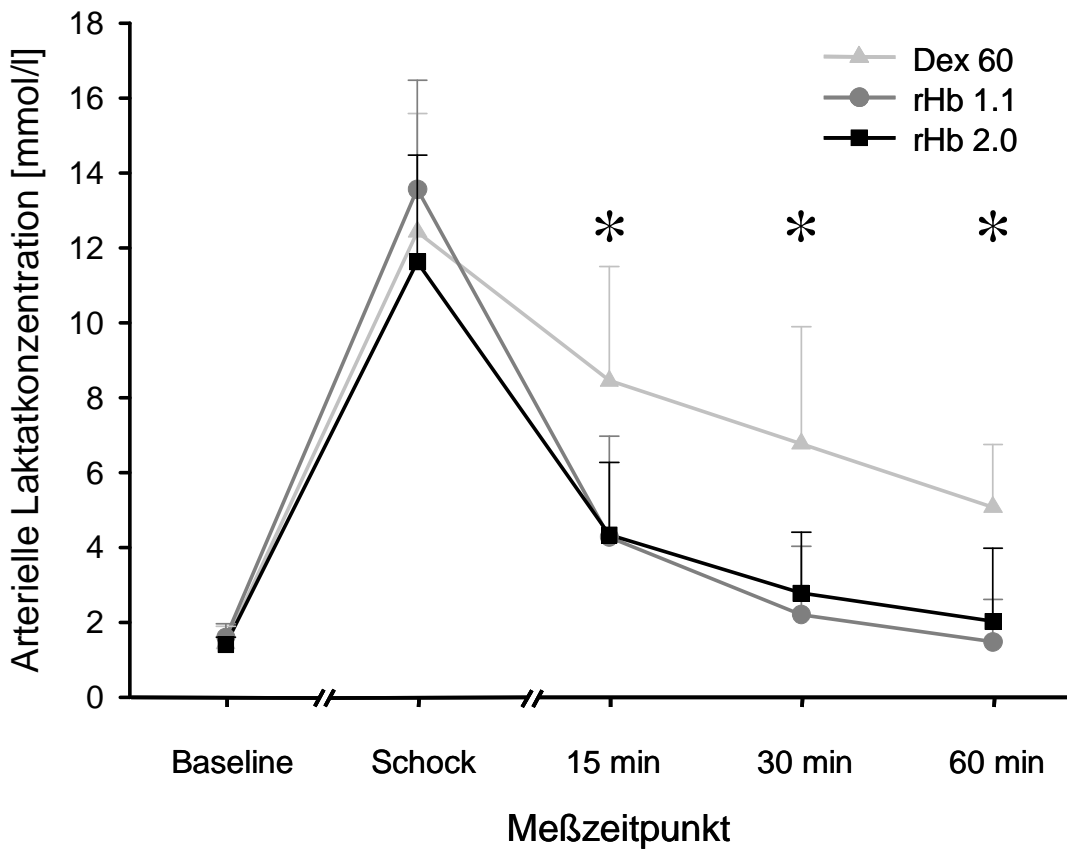
	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=9)	41 ± 3	33 ± 8	39 ± 7	39 ± 8	37 ± 7
rHb1.1 (n=9)	38 ± 4	33 ± 5	44 ± 5	43 ± 4	41 ± 3
rHb2.0 (n=9)	40 ± 2	29 ± 8	42 ± 5	42 ± 5	41 ± 4

4.1.6 Arterielle Laktatkonzentration

Die arterielle Laktatkonzentration stieg ausgehend von Ausgangswerten unter 2 mmol/l im Schock im Mittel aller Gruppen auf Werte von $12,7 \pm 2,9$ mmol/l an.

15 min nach Volumenersatz mit rHb1.1 und rHb2.0 war die bereits Laktatkonzentration deutlich abgefallen und erreichte zu Versuchsende in beiden Gruppen wieder annähernd Normalwerte.

Im Gegensatz dazu fiel die Laktatkonzentration in der Dex60-Gruppe in der Nachbeobachtungszeit deutlich langsamer und war auch zum Versuchsende gegenüber den beiden rHb-Gruppen noch um mehr als das Zweifache erhöht.



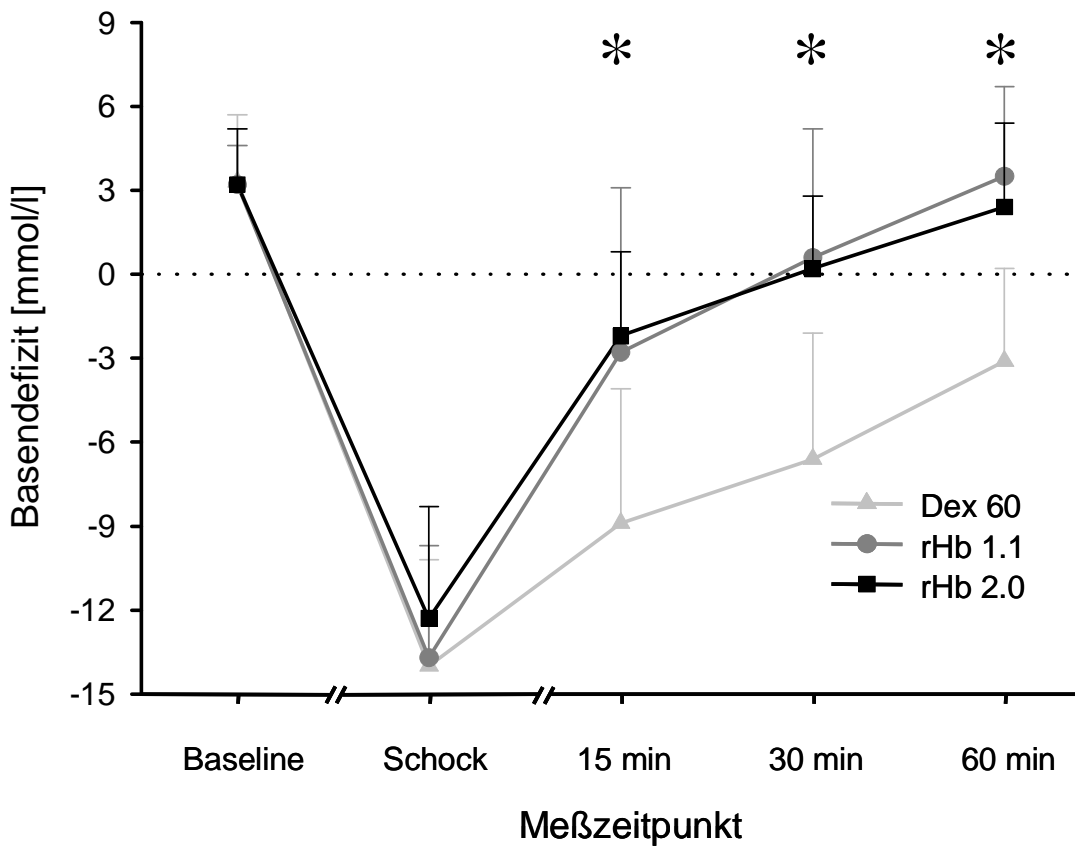
Arterielle Laktatkonzentration [mmol/l]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=9)	1.4 ± 0.4	12.9 ± 2.9	8.5 ± 3.1	6.8 ± 3.1	5.1 ± 1.7
rHb1.1 (n=9)	1.6 ± 0.4	13.6 ± 2.9	4.3 ± 2.7*	2.2 ± 1.8*	1.5 ± 1.1*
rHb2.0 (n=9)	1.4 ± 0.2	11.6 ± 2.9	4.3 ± 1.9*	2.8 ± 1.6*	2.0 ± 2.0*

Abbildung 4-5: Laktatkonzentration im arteriellen Blut unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0

4.1.7 Basendefizit

Die Entwicklung des Basendefizites zeigte eine deutliche Korrelation zu den Laktatwerten ($r^2 = 0,58$). Im Schock stieg der Mittelwert aller Tiere auf $-13,3 \pm 3,8$ mmol/l an. Nach Volumenersatz normalisierte er sich in den beiden rHb-Gruppen innerhalb der Nachbeobachtungszeit, wohingegen er in der Dex60-Gruppe deutlich langsamer rückläufig war und auch zum Versuchsende noch im negativen Bereich lag.



Basendefizit [mmol/l]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=9)	3 ± 2	-14 ± 4	-9 ± 5	-7 ± 4	-3 ± 3
rHb1.1 (n=9)	3 ± 1	-14 ± 4	-3 ± 6*	1 ± 5*	4 ± 3*
rHb2.0 (n=9)	3 ± 2	-12 ± 4	-2 ± 3*	0 ± 3*	2 ± 3*

Abbildung 4-6: Basendefizit unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. *p < 0,05 Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.

4.2 Mikrozirkulation

4.2.1 Arteriolen und Venolen

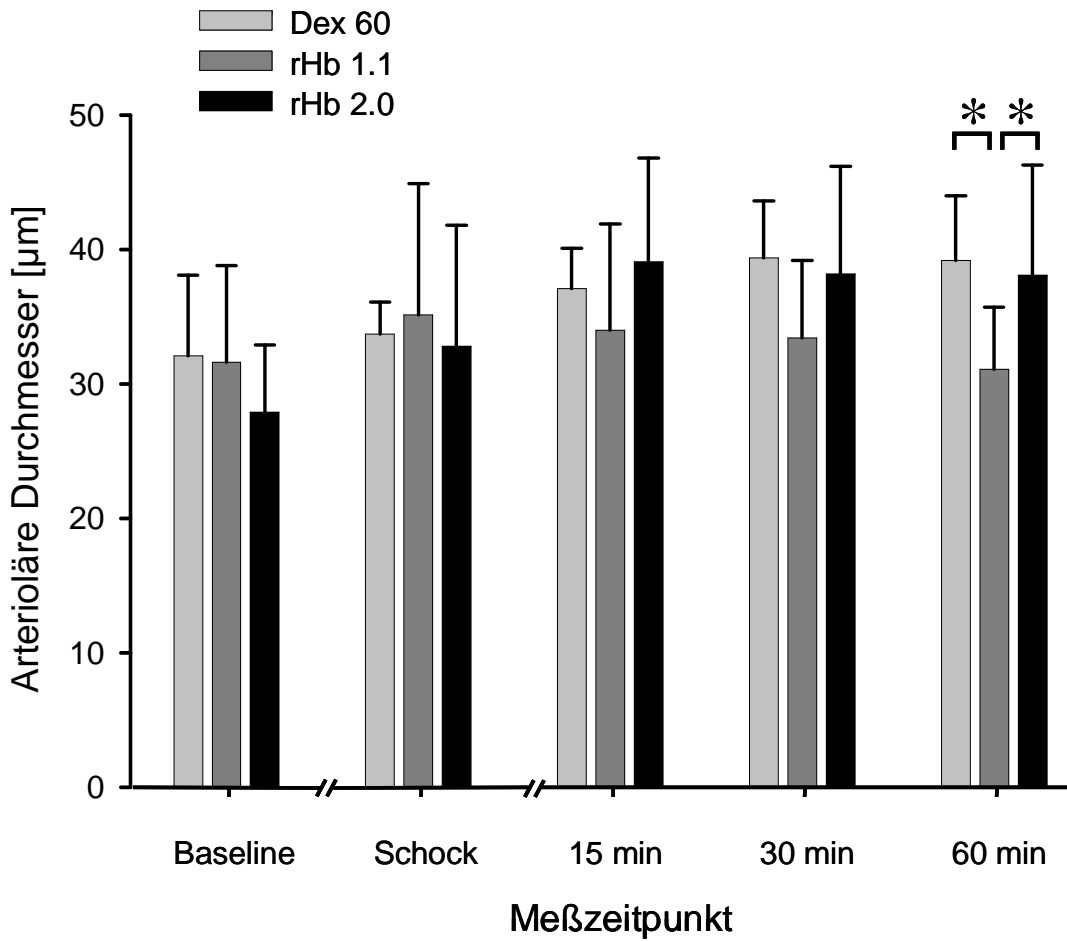
Bei der Analyse der Arteriolen fanden sich 60 min nach Volumenersatz mit rHb1.1 gegenüber den beiden anderen Gruppen signifikant verringerte Durchmesser, wohingegen sich die Werte zwischen der rHb2.0- und der Dex60-Gruppe nicht voneinander unterschieden ($31,1 \pm 4,6 \mu\text{m}$ vs. $38,1 \pm 3,2$ bzw. $39,2 \pm 4,8 \mu\text{m}$; $p < 0,05$).

Bezüglich der venulären Gefäßdurchmesser zeigte sich in allen Gruppen während des Schocks lediglich eine leichte Tendenz zur Verengung. Nach Volumenersatz konnten keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Venuläre Durchmesser [μm]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=52)	25 \pm 5	22 \pm 6	24 \pm 5	25 \pm 5	23 \pm 5
rHb1.1 (n=52)	26 \pm 5	22 \pm 5	25 \pm 6	26 \pm 6	26 \pm 6
rHb2.0 (n=54)	24 \pm 4	21 \pm 6	26 \pm 5	26 \pm 5	26 \pm 5

Tabelle 4-4: Venuläre Durchmesser unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert \pm Standardabweichung.)



Arteriöläre Durchmesser [µm]

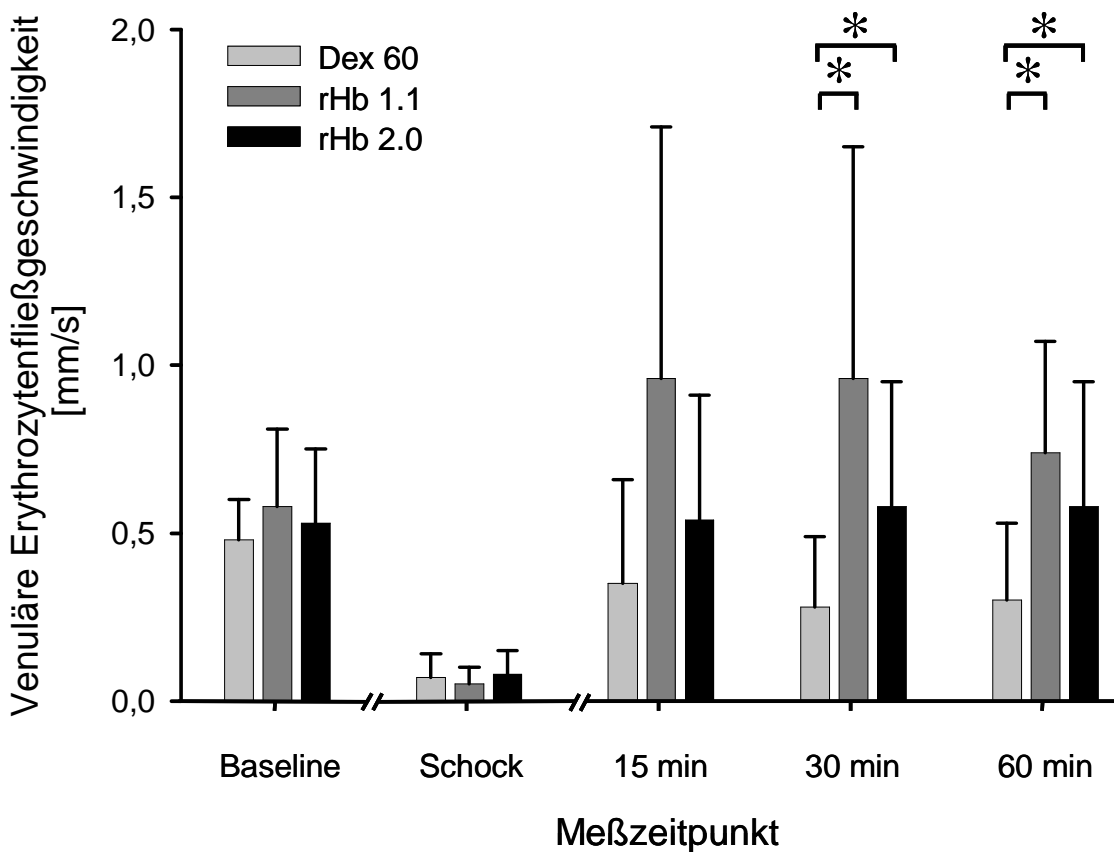
	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=33)	32 ± 6	34 ± 2	37 ± 3	39 ± 4	39 ± 5
rHb1.1 (n=34)	32 ± 7	35 ± 10	34 ± 8	33 ± 6	31 ± 5*
rHb2.0 (n=35)	28 ± 5	33 ± 9	39 ± 8	38 ± 8	38 ± 8#

Abbildung 4-7: Arteriöläre Durchmesser unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0; # $p < 0,05$ rHb2.0 vs rHb1.1

4.2.2 Erythrozytenfließgeschwindigkeit

Die arteriölen Erythrozytenfließgeschwindigkeiten lagen unter Ausgangsbedingungen und nach Schock großteils über 2 mm/sec. Aufgrund von Limitationen der Line-Shift-Technik ist in diesem Bereich keine genaue Bestimmung der Fließgeschwindigkeiten mehr möglich, weshalb auf eine weitere statistische Verwertung dieser Daten verzichtet wurde. Allerdings lag der Anteil der Arteriolen, in denen 60 min nach Volumenersatz Fließgeschwindigkeiten über 2 mm/s gemessen wurden, in der rHb1.1-Gruppe mit 18/34 (53 %) höher als in der rHb2.0-Gruppe mit 11/35 (31 %) und in der Dex60-Gruppe mit 3/33 (9 %) der untersuchten Gefäßen.

Die venuläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit fiel im Schock in allen Gruppen um 90 % ab. Nach Volumenrückgabe lagen nur die in der rHb2.0-Gruppe gemessenen Werte im Bereich der ursprünglichen Fließgeschwindigkeiten. Dagegen lagen die Werte in der rHb1.1-Gruppe über dem Niveau der Ausgangswerte und die der Dex60-Gruppe darunter. Sowohl 30 min als auch 60 min nach Volumenersatz lag die Fließgeschwindigkeiten in der Dex60-Gruppe mit $0,3 \pm 0,23$ mm/s signifikant unter denen der beiden Hämoglobin-Gruppen ($0,73 \pm 0,33$ mm/s bzw. $0,58 \pm 0,37$ mm/s)



Venuläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit [mm/s]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=52)	0.48 ± 0.12	0.05 ± 0.06	0.35 ± 0.31	0.28 ± 0.21	0.30 ± 0.23
rHb1.1 (n=52)	0.56 ± 0.21	0.05 ± 0.05	0.88 ± 0.61	0.91 ± 0.59*	0.73 ± 0.33*
rHb2.0 (n=54)	0.53 ± 0.22	0.08 ± 0.07	0.54 ± 0.37	0.58 ± 0.37*	0.58 ± 0.37*

Abbildung 4-8 Venuläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0

4.2.3 Extravasation

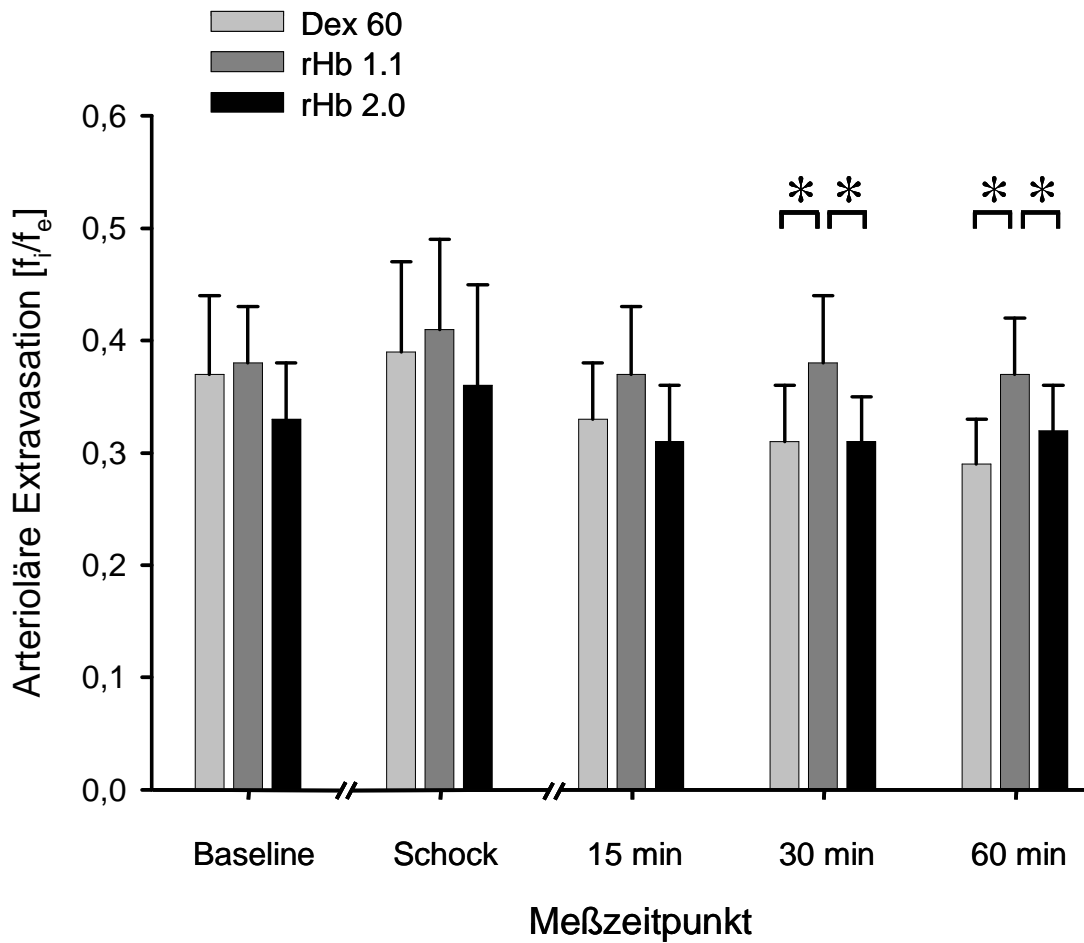
Die Messung der arteriölen Extravasation ergab 30 min und 60 min nach Volumenersatz mit rHb1.1 im Vergleich zu den beiden anderen Gruppen signifikant erhöhte Werte.

Im Gegensatz zu den Arteriolen fanden sich während des gesamten Experimentes bei den Venolen keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Extravasation.

Venuläre Extravasation [f_i/f_e]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=52)	0.37 ± 0.07	0.39 ± 0.07	0.36 ± 0.05	0.34 ± 0.09	0.36 ± 0.06
rHb1.1 (n=52)	0.39 ± 0.03	0.43 ± 0.06	0.39 ± 0.05	0.39 ± 0.06	0.39 ± 0.09
rHb2.0 (n=54)	0.33 ± 0.04	0.40 ± 0.06	0.35 ± 0.05	0.33 ± 0.04	0.36 ± 0.05

Tabelle 4-5: Venuläre Extravasation als Quotient der intravasalen / extravasalen Fluoreszenz [f_i/f_e] unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung.



Arteriöläre Extravasation [f_i/f_e]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=33)	0.37 ± 0.07	0.39 ± 0.08	0.33 ± 0.05	0.31 ± 0.05	0.29 ± 0.04
rHb1.1 (n=34)	0.38 ± 0.05	0.41 ± 0.08	0.37 ± 0.06	0.38 ± 0.06*	0.37 ± 0.05*
rHb2.0 (n=35)	0.33 ± 0.05	0.36 ± 0.09	0.31 ± 0.05	0.31 ± 0.04#	0.32 ± 0.04#

Abbildung 4-9: Arteriöläre Extravasation als Quotient der intravasalen / extravasalen Fluoreszenz [f_i/f_e] unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. *p < 0,05 Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0; # p < 0,05 rHb2.0 vs rHb1.1

4.2.4 Leukozyten–Endothelzell–Interaktion

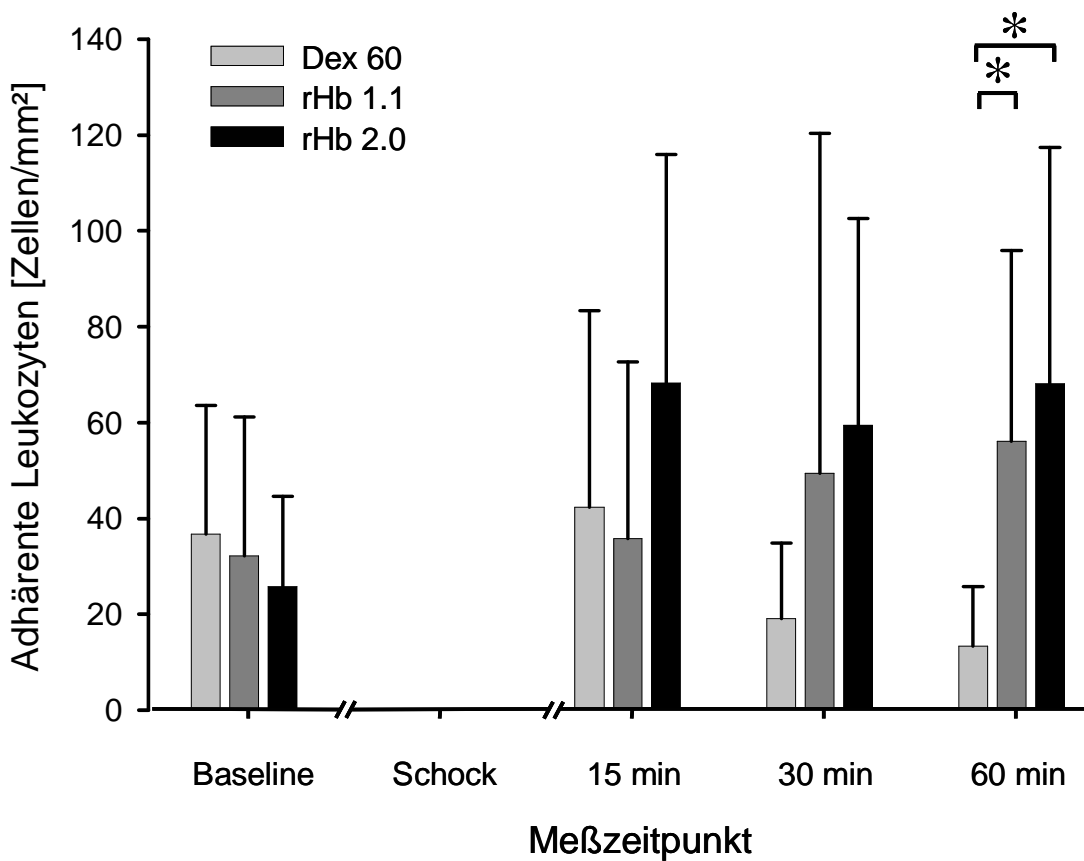
Am Endothel der postkapillären Venolen zeigten sich in allen Gruppen sowohl für rollende als auch für adhärenente Leukozyten normale Ausgangsverhältnisse. Im Schock war die Bestimmung der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion aufgrund der geringen Fließgeschwindigkeiten nicht möglich.

Hinsichtlich der rollenden Leukozyten bestand post Schock kein signifikanter Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Bei den adhärenenten Leukozyten dagegen zeigte sich 60 min nach Volumenersatz bei insgesamt großer Streuung ein signifikanter Unterschied zwischen Dex60 und den beiden rHb-Gruppen.

Venulär rollende Leukozyten [n/30 sec]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=52)	7.3 ± 2.8	-	11.3 ± 16.5	9.9 ± 12.0	9.0 ± 10.6
rHb1.1 (n=52)	6.6 ± 3.8	-	6.0 ± 6.1	7.9 ± 7.3	7.1 ± 5.2
rHb2.0 (n=54)	6.1 ± 2.2	-	7.1 ± 6.0	8.1 ± 5.5	10.5 ± 9.1

Tabelle 4-6: Venulär rollende Leukozyten unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung.



Venulär adhäreente Leukozyten [n/mm²]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=52)	36.7 ± 26.9	-	42.4 ± 40.9	19.1 ± 15.8	13.3 ± 12.5
rHb1.1 (n=52)	32.2 ± 28.9	-	35.8 ± 36.8	49.4 ± 70.9	56.1 ± 39.8*
rHb2.0 (n=54)	25.7 ± 18.9	-	68.2 ± 47.7	59.4 ± 43.1	68.1 ± 49.3*

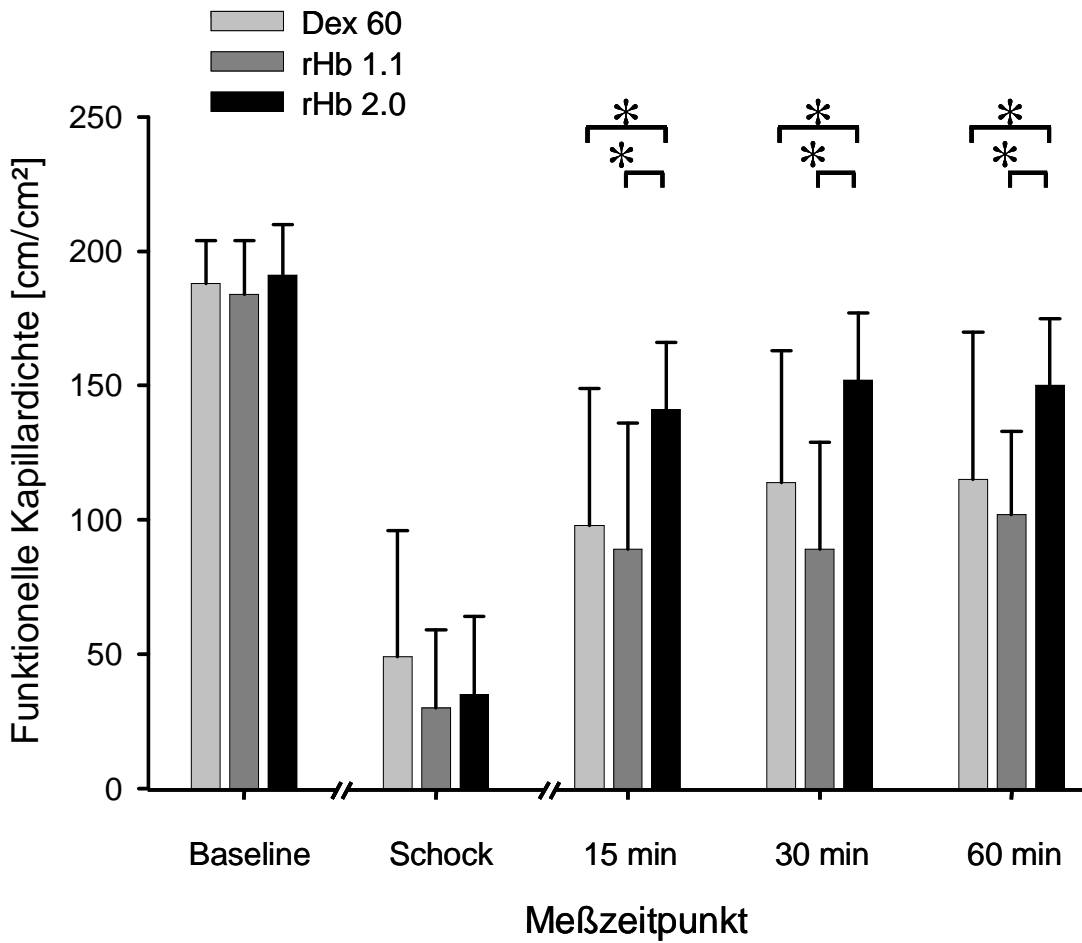
Abbildung 4-10: Adhärente Leukozyten unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60,

rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0

4.2.5 Funktionelle Kapillardichte

Im Mittel aller Tiere lag die funktionelle Kapillardichte unter Ausgangsbedingungen bei 188 ± 18 cm/cm^2 und wurde durch den Schock auf durchschnittlich 38 ± 36 cm/cm^2 , also um ungefähr 80 % reduziert.

Der Volumenersatz mit rHb1.1 und mit Dex60 führte zu einem Anstieg der FKD um 66 cm/cm^2 bzw. 72 cm/cm^2 . Im Gegensatz dazu fand sich nach Volumensubstitution mit rHb2.0 eine deutlich stärkere Zunahme der funktionellen Kapillardichte, nämlich 115 cm/cm^2 , wodurch zu Versuchsende signifikant mehr, und zwar über $\frac{3}{4}$ aller Kapillaren wieder von Erythrozyten perfundiert wurden.



Funktionelle Kapillardichte [cm/cm²]

	Ausgangswert	Schock	15 min	30 min	60 min
Dex60 (n=51)	188 ± 16	49 ± 47	98 ± 51	114 ± 49	115 ± 55
rHb1.1 (n=50)	184 ± 20	30 ± 29	89 ± 47	89 ± 40	102 ± 31
rHb2.0 (n=50)	191 ± 19	35 ± 29	141 ± 25*#	152 ± 25*#	150 ± 25*#

Abbildung 4-11: Funktionelle Kapillardichte unter Ausgangsbedingungen, im Schock und nach Volumenersatz mit Dex60, rHb1.1 und rHb2.0. Mittelwert ± Standardabweichung. * $p < 0,05$ Dex60 vs rHb1.1 & rHb2.0; # $p < 0,05$ rHb2.0 vs rHb1.1

5 Diskussion

5.1 Einleitung

5.1.1 Epidemiologie des hämorrhagischen Schocks

Unfälle sind die häufigste Todesursache in der Bevölkerung unter 45 Jahren (100). Die Mortalität weist hierbei im Zeitverlauf eine dreigipflige Verteilung auf (17):

- In der Frühphase ist die Todesursache meist eine direkte Verletzung von Herz, Aorta oder dem zentralen Nervensystem.
- In den zweiten Häufigkeitsgipfel fallen Patienten, die innerhalb der ersten Stunden den schockauslösenden Verletzungen wie Hämatothorax, Abdominaltrauma oder Beckenfrakturen erliegen.
- In den folgenden Tagen ergibt sich ein dritter Mortalitätsgipfel, der durch inflammatorische Komplikationen wie akutes Lungenversagen, Multiorganversagen und Sepsis bedingt wird.

5.1.2 Klinische Einteilung

Unter „Schock“ versteht man im medizinische Sinne eine akute, generalisierte Minderversorgung lebenswichtiger Körpergewebe mit Sauerstoff, die auf einem Missverhältnis zwischen dem Sauerstoffangebot durch das Herz-Kreislauf-System auf der einen und dem Sauerstoffbedarf der einzelnen Gewebe auf der anderen Seite beruht.

Der Schock ist auch heute noch eine rein klinische Diagnose, weil es keine apparative Diagnostik und keinen einzelnen Laborparameter gibt, der das Vorliegen eines Schocks zuverlässig anzeigen könnte. Da die Prognose aber wesentlich von einem schnellen und effizienten Therapiebeginn abhängt, stellt die Diagnose Schock sehr hohe Anforderungen an das präklinisch und klinisch tätige medizinische Personal.

Anhand des geschätzten Blutverlustes und einfach zu erhebender Parameter schlägt das American College of Surgeons folgende Einteilung des Schocks in verschiedene Schweregrade vor (9) (siehe Tabelle 5-1):

	Klasse I	Klasse II	Klasse III	Klasse IV
Blutverlust [ml]	< 750	750 – 1500	1500 – 2000	> 2000
Blutverlust [%]	< 15%	15% - 30%	30% - 40%	> 40%
HF [min⁻¹]	< 100	> 100	> 120	>140
RR [mmHg]	Normal	Normal	Erniedrigt	Erniedrigt
Pulsdruck	Normal	Erniedrigt	Erniedrigt	Erniedrigt
AF [min⁻¹]	14 – 20	20 – 30	30 – 40	> 35
Urin [ml/h]	> 30	20 – 30	5 – 15	< 5
Bewusstsein	leicht ängstlich	Ängstlich	ängstlich-verwirrt	verwirrt-lethargisch

Tabelle 5-1: Einteilung des Schweregrades anhand des geschätzten Blutverlustes und klinischer Parameter nach dem American College of Surgeons (9)

Ein Blutverlust von bis zu 15 % (Klasse I) verursacht nur minimale Veränderungen des klinischen Zustandes. Blutverluste von 15 % bis 30 % (Klasse II) verursachen eine leichte Tachykardie und eine Verringerung des Pulsdruckes. Erst bei Blutverlusten von 30 % bis 40 % (Klasse III) finden sich die klassischen Schocksymptome wie Tachykardie, Tachypnoe, eine Reduktion des Bewusstseins sowie ein verringerter Blutdruck. Ein Blutverlust von mehr als 40 % (Klasse IV) stellt eine akute Lebensbedrohung dar. Man findet eine ausgeprägte Hypotonie, der diastolische Blutdruck ist unter Umständen nicht mehr messbar. Der Bewusstseinszustand geht von Ängstlichkeit und Agitiertheit zur Lethargie über, weil der niedrige zerebrale Perfusionsdruck bereits zu einer Beeinträchtigung der höheren Funktionen des zentralen Nervensystems führt.

5.1.3 Stadien des Schocks

Anhand folgender Grafik sollen die Auswirkungen eines akuten Blutverlustes auf das weitere Verhalten des Kreislaufes dargestellt werden (Abbildung 5-1):

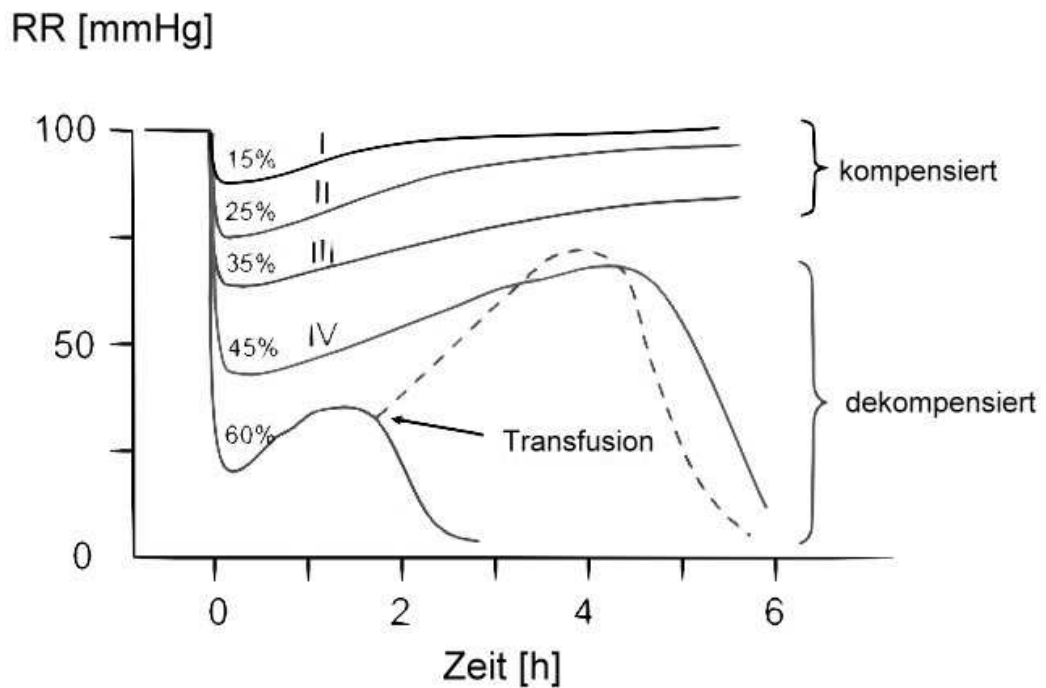


Abbildung 5-1: Auswirkungen eines akuten Blutverlustes auf den mittleren arteriellen Blutdruck; nach Guyton u. Crowell (73)

In einer Studie an Hunden haben Guyton und Crowell (73) den MAP durch Blutentzug auf unterschiedliche Niveaus abgesenkt. Sie stellten fest, dass sich bei den Tieren, deren Blutdruck initial über 45 mmHg lag (Gruppen I, II und III), der Kreislauf ohne weitere Intervention von selbst wieder stabilisierte. Je stärker der Blutdruck abgesenkt worden war, umso langsamer erfolgte die Erholung, aber bei allen drei Gruppen reichten die körpereigenen Kompensationsmechanismen

offensichtlich aus, um ohne fremde Hilfe eine weitere Verschlechterung der Kreislaufsituation zu verhindern.

War der Blutverlust dagegen so groß, dass der Blutdruck initial auf Werte unter 45 mmHg abfiel, verstarben früher oder später alle Versuchstiere. Auch wenn zunächst eine teilweise Kompensation der Makrohämodynamik erfolgte, so war der Schock doch offensichtlich progressiv. Die Kreislauforgane waren so stark in ihrer Funktion beeinträchtigt, dass ein Circulus vitiosus begann, welcher die Kreislaufsituation zunehmend verschlechterte. Erfolgte in dieser Situation keine suffiziente Therapie, dann wurde der progressive Schock ab einem bestimmten Punkt zum irreversiblen Schock, bei dem dann selbst die maximale Therapie zwar eine vorübergehende Verbesserung der Makrohämodynamik bewirkte, aber einen letalen Ausgang nicht mehr abwenden konnte (73). Da der Punkt der Unumkehrbarkeit nicht anhand harter Kriterien diagnostiziert werden kann und vermutlich auch interindividuell stark variiert, kann die Irreversibilität eines Schocks erst nach dem Scheitern aller therapeutischen Bemühungen, also ex post festgestellt werden.

5.1.4 Therapie und Prognose

Die Therapie des hämorrhagischen Schocks beginnt mit der Diagnosestellung. Die ersten Schritte bestehen in der Stillung lebensbedrohlicher Blutungen, dem Verbringen des Patienten in die Trendelenburg-Lagerung und der Anlage von mindestens zwei großlumigen Zugängen für die Volumentherapie.

Sowohl über die Art als auch über das Ausmaß der Volumengabe wird seit Jahren kontrovers diskutiert. Während im angloamerikanischen Sprachraum aufgrund der guten Verfügbarkeit und der niedrigen Herstellungskosten empfohlen wird, den Volumenersatz mit Kristalloiden in der dreifachen Menge des geschätzten Blutverlustes durchzuführen (20), wird in der deutschsprachigen Literatur empfohlen, aufgrund des bessern Volumeneffektes und der längeren intravasalen Verweildauer Kristalloide und Kolloide im Verhältnis 2:1 zu verabreichen (139). Das in den letzten

Jahren entwickelte Konzept der „small-volume-resuscitation“ propagiert zudem die initiale Gabe von hyperton-hyperonkotischen Lösungen, um den hypoxisch geschwollenen Endothelzellen Flüssigkeit zu entziehen und dadurch die Wiederherstellung der Mikrozirkulation zu fördern (101).

Das ideale Ausmaß des Volumenersatzes ist in letzter Zeit erneut in die Diskussion geraten. Während man bis vor einigen Jahren dazu tendierte, im Falle einer akuten Blutung eher großzügigen Volumenersatz zu betreiben, wird auch dies in den letzten Jahren zunehmend hinterfragt. In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass vor allem im Falle einer unkontrollierten Blutung eine frühzeitige und zu aggressive Volumentherapie die Gerinnung beeinträchtigt, mit dem Blutdruck auch die Blutverluste steigert und dadurch zu einer erhöhten Mortalität führen kann (34; 99). Es gibt auch größer angelegte Studien, welche die Vorteile einer restriktiven Volumengabe bei Patienten mit penetrierenden Verletzungen in der präoperativen Phase belegen (24; 126), insgesamt scheint die Datenlage jedoch noch nicht solide genug, um daraus allgemein gültige Richtlinien abzuleiten (171; 176).

Zusätzlich zur Volumentherapie für die Wiederherstellung der Makrohämodynamik muss die Therapie des hämorrhagischen Schocks darauf ausgerichtet sein, wieder eine ausreichende Oxygenierung der Körpergewebe zu etablieren. Das Sauerstoffangebot DO_2 (oxygen delivery) an den Organismus ist hierbei definiert als das Produkt aus Herzminutenvolumen HMV und dem Sauerstoffgehalt c_aO_2 des arteriellen Blutes:

$$DO_2 = HMV \cdot c_aO_2$$

wobei gilt: (a) $HMV = HF \cdot SV$

und: (b) $c_aO_2 = (1,34 \cdot Hb \cdot s_aO_2) + (0,003 \cdot p_aO_2)$

Durch die Volumentherapie wird beim hämorrhagischen Schock die akute Hypovolämie behoben und in eine normovoläme Verdünnungsanämie umgewandelt. Dies ermöglicht zwar ein höheres

HMV und dadurch eine Steigerung des Blutdruckes und eine Verbesserung der Gewebepfusion. Die Möglichkeiten einer reinen Volumentherapie jedoch sind zwangsläufig begrenzt, solange die zweite Determinante des Sauerstofftransportes, nämlich die Menge an zirkulierendem Hämoglobin, unverändert bleibt. Dementsprechend wird ab einer bestimmten Grenze der Hämoglobingehalt des Blutes zum limitierenden Faktor.

Zwar ist bei gesunden Probanden selbst bei einem Hb von unter 5 g/dl noch eine suffiziente Sauerstoffversorgung der Gewebe gewährleistet (111), beim traumatisch-hämorrhagischen Schock ist aber allein schon wegen der Unkenntnis der Vorerkrankungen und der Schwere der Verletzungen ein höherer Hb-Wert wünschenswert, damit nicht nur eine suffiziente, sondern möglichst eine optimale Sauerstoffversorgung gewährleistet werden kann (68).

Wenngleich das Anstreben von „supranormalen“ Werten bei Herzminutenvolumen oder DO₂ für das Überleben keinen signifikanten Vorteil zu bieten scheint (83; 212), so konnte doch gezeigt werden, dass sowohl prolongierte Hypotension (79) als auch das Persistieren einer okkulten Hypoperfusion nach Krankenhausaufnahme mit einem gesteigerten Risiko für das Auftreten von akutem Lungenversagen, Multiorganversagen und Tod korrelieren (26). Es gibt Hinweise darauf, dass bei bis zu 85% der Traumapatienten auf Intensivstationen trotz Normalisierung von Blutdruck, Herzfrequenz und Urinausscheidung eine okkulte Hypoperfusion persistiert (4; 183).

Anders als bei der Rückenhautkammer im Tiermodell ist die okkulte Hypoperfusion jedoch unter klinischen Bedingungen nur schwer zu detektieren, sodass man sich hierfür mit den einfacher zu bestimmenden Surrogat-Parametern Laktat und Basendefizit behelfen muss. Sie korrelieren eng miteinander (46), sind gut etabliert und lassen Rückschlüsse sowohl auf die Schwere des Schocks als auch auf den Erfolg der Therapie und die weitere Prognose zu (5; 11; 30; 175; 178; 188; 214). Diese beiden Parameter wurden in der vorliegenden Studie ergänzend zu den intravitalmikroskopischen Untersuchungen der Mikrozirkulation erfasst und ausgewertet.

5.2 Diskussion der Methodik

5.2.1 Modell der Rückenhautkammer

Das Modell der Rückenhautkammer wurde von Algire im Jahre 1943 zunächst für die Maus entwickelt (6) und von Endrich et al. im Jahre 1980 am Institut für Chirurgische Forschung für den syrischen Goldhamster etabliert (57). Seitdem hat es sich über Jahrzehnte in verschiedenen Forschungsgruppen bewährt, insbesondere zur Untersuchung der Mikrozirkulation unter besonderen Bedingungen wie z.B. bei Hämodilution, Sepsis oder Ischämie-Reperfusion (136). Da das untersuchte Gewebe zur quergestreiften Muskulatur zählt, sind die dort erhobenen Befunde repräsentativ für einen hohen prozentualen Anteil der Körpermasse.

Ein wichtiger Vorzug gegenüber den meisten anderen Modellen ist die geringe Dicke des untersuchten Muskels, welche bei schonendem Vorgehen mit einer Dicke von 200 – 400 µm eine hervorragende Darstellung der Mikrozirkulation sowohl in der Durchlicht- als auch in der Auflichtmikroskopie ermöglicht (57). Gegenüber anderen Nagern (Maus, Ratte) bietet sich der Hamster vor allem deshalb an, weil der Muskel nur locker in das umgebende Bindegewebe eingewachsen ist und deutlich weniger Gefäßverbindungen zwischen den einzelnen Schichten bestehen. Dadurch eine besonders schonende Präparation ohne Beeinträchtigung des umgebenden Gewebes möglich, welche über einen Zeitraum von bis zu vier Wochen Untersuchungen der Mikrozirkulation ermöglicht (57).

Für die Untersuchung der Mikrozirkulation am quergestreiften Muskel existiert eine Vielzahl weiterer Modelle, z.B. das des M. sartorius oder M. tenuissimus der Katze (32; 64), des M. cremaster, M. gracilis oder Diaphragmas der Ratte (15; 80; 27) oder das der Backentasche des Hamsters (186). Als so genannte Akutmodelle erfordern all diese Modelle jedoch die Präparation des Muskels unmittelbar vor dem Versuch. Dies wiederum impliziert die Narkotisierung des

Versuchstieres vor und während des Experimentes. Sowohl die chirurgische Manipulation als auch die Anästhesie haben aber nachweislich erheblichen Einfluss auf die Mikrozirkulation im quergestreiften Muskel.

Durch Narkose und kontrollierte Beatmung der Versuchstiere werden wichtige Kompensationsmöglichkeiten des Organismus bei hämorrhagischem Schock eingeschränkt. Die kontrollierte Beatmung entspricht nicht den physiologischen Gegebenheiten (192) und lässt keine Hyperventilation zu, welche die natürliche Reaktion auf den Schock darstellen würde und eine wichtige Rolle bei der Kompensation der metabolischen Azidose spielt.

Zudem führen Narkotika, wie das in tierexperimentellen Studien häufig verwendete Phenobarbital, zu einer kardiovaskulären Depression (209; 223) und hemmen die sympathikoadrenerge Gegenreaktion (22; 128). Sowohl Inhalations- (25), als auch Injektionsnarkotika (97) interferieren mit dem NO-Metabolismus (121) und können zu einer Störung der Vasomotion (61), zur Vasodilatation (41), zu der Öffnung von arterio-venösen Shunts und zu einer Beeinträchtigung der FKD führen (62).

Durch die Exposition des Muskels im Rahmen der Präparation kommt es zu einer abrupten Steigerung des pO_2 von 10 mmHg (Gewebe) auf 150 mmHg (Raumluft). Allein dies führt zu einer deutlichen Reduktion der Kapillarperfusion (114) und einem Abfall der Muskeldurchblutung auf etwa ein Drittel des Ausgangswertes (115). Die chirurgische Manipulation verursacht in Arteriolen einen vorübergehenden Vasospasmus bis hin zum Sistieren des Blutflusses (216) und anschließend kommt es zu einer reaktiven Hyperämie mit verringerter Vasoreagibilität, die über einen Zeitraum von Minuten bis zu Tagen andauern kann (57; 113; 115). Unabhängig davon konnte gezeigt werden, dass die mechanische Reizung im Rahmen der Präparation zu einer Steigerung der Leukozytenadhäsion in den postkapillären Venolen führt (115).

Zusammenfassend lässt sich also feststellen, dass für die Untersuchung einer ungestörten Mikrozirkulation ein ausreichender zeitlicher Abstand zur chirurgischen Präparation sichergestellt sein muss, und dass nur die Untersuchung am wachen Tier eine physiologische Reaktion auf Schock und anschließende Therapie erwarten lässt.

Wenn sich bis zum Zeitpunkt des Versuches in der Rückenhautkammer keine morphologischen Korrelate im Sinne einer Inflammation entwickelt haben und somit die strengen Einschlusskriterien erfüllt sind, kann von intakten, physiologischen Verhältnissen in der Mikrozirkulation ausgegangen werden: So konnte im Vergleich zu Kontrolltieren ohne Rückenhautkammer kein Unterschied der globalen Parameter MAP, ZVD, Hkt, p_aO_2 , p_aCO_2 , oder pH gefunden werden (18). In der Rückenhautkammer selbst kann eine physiologische Vasomotion beobachtet werden (65) und es kommt zu keiner gesteigerten Expression von entzündungsspezifischen Adhäsionsmolekülen (151). Auch elektronenmikroskopisch lässt sich kein Unterschied bezüglich der Ultrastruktur von Skelettmuskel, subkutanem Gewebe, Gefäßendothel und Gewebemastzellen detektieren (57; 65).

5.2.2 Modell des hämorrhagischen Schocks

5.2.2.1 Experimentelle Modelle in der Literatur

Studien zum hämorrhagischen Schock basieren im Allgemeinen auf einem der drei folgenden Modelle:

- Der *hämorrhagische Schock mit unkontrollierter Blutung* (34) ist zwar sehr realitätsnah, aber durch die unkontrollierte Blutung kommt es zu großen interindividuellen Unterschieden in der Schocktiefe. Dementsprechend sind bei diesem Modell für das Erreichen statistisch signifikanter Ergebnisse relativ große Versuchsgruppen nötig.
- Beim *volumenkontrollierten hämorrhagischen Schock* (44) schafft man eine gut vergleichbare Ausgangssituation, jedoch kann auch hier die Schocktiefe aufgrund unterschiedlicher Kompensationsfähigkeit der einzelnen Tiere erheblich variieren.
- Bei einem *druckkontrollierten hämorrhagischen Schock* (104) gleichen sich die Unterschiede in der individuellen Kompensationsfähigkeit größtenteils aus, daher sind in diesem Modell statistische Aussagen bereits mit vergleichsweise geringer Gruppengröße möglich.

Eine Sonderform des druckkontrollierten hämorrhagischen Schocks stellt das Modell nach Wiggers dar, bei dem die Volumensubstitution nicht nach einer festgelegten Schockdauer begonnen wird, sondern bei beginnender Dekompensation, also bei weiterem Abfall des Blutdruckes unter ein zuvor festgelegtes Druckniveau passiv über den Rückstrom des entnommenen Blutes erfolgt (220).

5.2.2.2 Das Schockmodell der vorliegenden Studie

Ausgangspunkt für das Versuchsprotokoll der vorliegenden Studie war ein blutdruckkontrolliertes Schockmodell, welches von Nolte et al. am Institut für Chirurgische Forschung für den syrischen Goldhamster etabliert wurde (150) und für das bereits eine solide Datenbasis besteht. Bei diesem Modell wurden 33 ml/kg KG Blut mit einer Rate von 400 μ l/min zur Induktion des Schocks entnommen. Dadurch wurde dem Kreislauf innerhalb von ca. 5 min etwa die Hälfte des Blutvolumens entzogen und der MAP auf ca. 30 mmHg gesenkt. Über die folgenden 45 min wurde der MAP bei 30 ± 5 mmHg durch weitere Blutentnahme bzw. -rückgabe stabilisiert und anschließend das Volumen des entnommenen Blutes mit einer Rate von 400 μ l/min über den venösen Katheter ersetzt. Die Messungen wurden 10 min, 30 min, 60min und 120 min nach Abschluss der Volumensubstitution durchgeführt.

Ausgehend von den im Nolte-Modell gewonnenen Erfahrungen wurde das Protokoll für diese Studie in einigen Punkten modifiziert. So wurde die Bestimmung von Laborparametern als dritte Säule neben der Erfassung der Makrohämodynamik und der Analyse der Mikrozirkulation eingeführt. Dies ermöglichte die Messung von Hb und Hkt, die Beurteilung der respiratorischen Kompensation (p_aO_2 , p_aCO_2) und vor allem eine Abschätzung der metabolischen Situation (pH, Laktat, BE) zur genaueren Quantifizierung der Schocktiefe.

Im Rahmen eigener Vorversuche zeigte sich, dass im Schockmodell von Nolte et al. (150) der Blutdruckkorridor mit 30 ± 5 mmHg relativ weit gesteckt war: Während ein MAP unter 30 mmHg innerhalb weniger Minuten zum Tode führt (eigene Versuche und (156)), werden Blutdruckwerte über 35 mmHg auch über deutlich längere Zeiten toleriert, was aus einer deutlich verzögerten Akkumulation saurer Metabolite ersichtlich ist (eigene Vorversuche und (93)). Wie eng die Blutdruckgrenzen mit dem Überleben im Schock korrelieren, zeigt die Tatsache, dass im Modell

von Nolte (150) (MAP 30 ± 5 mmHg) alle nicht therapierten Tiere nach spätestens 60 min starben, wohingegen die Hamster einer anderen Studie MAP-Werten um 40 mmHg über 120 min zu 81 % und über 240 min immerhin noch zu 68 % überlebten (95).

Gegen ein Modell mit längerer Schockdauer bei 40 mmHg sprach jedoch die Überlegung, dass mit zunehmender Schockdauer die individuell unterschiedliche Kompensationsfähigkeit der Tiere verstärkt zum Tragen kommt: So unterzogen Kerger et al. 66 Hamster einem hämorrhagischen Schock von 40 mmHg MAP über 240 min und stellten fest, dass 24h nach Retransfusion des entzogenen Blutvolumens 44,4 % der Hamster verstorben waren, während 23,8 % den gleichen Schock in schlechtem und 31,8% sogar in gutem Allgemeinzustand überlebten (93). Die Unterschiede bezüglich des Überlebens ließen sich bereits zum Ende des Schocks anhand der Blutgase und der FKD prognostizieren. In der vorliegenden Studie wurde der Schock daher bewusst kürzer gehalten, dafür aber der Blutdruck in einen engeren Korridor als bei Nolte et al. eingestellt (30-35 mmHg statt 30 ± 5 mmHg). Bei Einhaltung dieses MAP stieg die arterielle Laktatkonzentration in 30 min auf $12,7 \pm 2,9$ mmol/l und der BE fiel auf $-13,3 \pm 3,8$ mmol/l, womit es sich nach der aktuellen Literatur zumindest um einen schweren hämorrhagischen Schock, vermutlich sogar um einen Schock nahe an der Grenze zur Dekompensation handelt (93, 94, 187).

Als weitere Modifikation gegenüber dem Modell von Nolte et al. wurde die Geschwindigkeit des Volumenersatzes reduziert. Die Infusion von 400 μ l/min entspräche einer Zufuhr von ca. 10 % des totalen Blutvolumens pro Minute. In einzelnen Vorversuchen wurden bei dieser Rate teilweise starke ZVD-Anstiege ohne adäquate Erholung des MAP beobachtet, was als Hinweis darauf gewertet werden kann, dass das schockgeschädigte Myokard durch die schnelle Volumenzufuhr überlastet wurde. Als Konsequenz wurde die Infusionsrate für den Volumenersatz in der vorliegenden Studie von 400 μ l/min auf 200 μ l/min reduziert, woraufhin während der weiteren Versuche keine übermäßigen ZVD-Anstiege mehr auftraten.

5.2.3 Methode der intravitale Fluoreszenzmikroskopie

Zur Bestimmung der Gewebepfusion bieten sich prinzipiell mehrere unterschiedliche Verfahren an, wie zum Beispiel die Injektion radioaktiver oder fluoreszierender Mikrosphären (84, 85), die Laser-Doppler-Flowmetrie (194) oder die Positronen-Emissions-Tomographie (177). Die genannten Verfahren sind kaum invasiv und erlauben die Beurteilung mehrerer verschiedener Gewebe gleichzeitig. Diese Verfahren bieten jedoch lediglich eine geringe räumliche und / oder zeitliche Auflösung.

Im Gegensatz dazu erlaubt die intravitale Fluoreszenzmikroskopie eine direkte quantitative Analyse der Mikrozirkulation. Hierbei ist die Bestimmung von Durchmesser und Fließgeschwindigkeiten bestimmter Gefäßklassen von besonderer Bedeutung, weil Hämoglobinlösungen differenziert auf die verschiedenen Abschnitte der Mikrozirkulation einwirken. Zudem ermöglicht die Fluoreszenzmikroskopie eine exakte Quantifizierung der nutritiven Organperfusion durch die Bestimmung der FKD sowie eine Abschätzung der Endothelzellintegrität anhand der Extravasation von FITC-Dextran. Die Analyse der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion in ausgewählten Gefäßabschnitten (57, 14) gibt einerseits Aufschluss über den schockbedingten Ischämie-Reperfusionsschaden, andererseits kann im Gruppenvergleich auf Leukozyten- und Endothelzellaktivierung durch die jeweils verabreichte Substanz geschlossen werden.

Die wichtigste Limitation der intravitale Fluoreszenzmikroskopie besteht in der potentiellen Phototoxizität sowohl durch die direkte Erwärmung des Gewebes, als auch indirekt durch die Bildung von freien Sauerstoffradikalen, die auf chemischem Wege sowohl Gefäße als auch das umgebende Gewebe schädigen können (158). Somit ist eine artifizielle Verstärkung des I/R-Schadens prinzipiell denkbar (63).

Das Ausmaß der Phototoxizität hängt ab von der Konzentration des Fluoreszenzfarbstoffes im untersuchten Gewebe und von der verwendeten Lichtdosis. Hierbei ist die Lichtdosis H [J/cm^2] das

Produkt aus Bestrahlungsintensität E [W/cm^2] und der Bestrahlungsdauer t [s]. Die Bestrahlungsintensität ist wiederum die Strahlungsleistung P [W] pro Fläche A [cm^2].

In der vorliegenden Studie wurden für die Untersuchungen im FITC-Modus eine 100W Xenon-Lampe auf Stufe 10 von 12 mit einem I2/3 - Filterblock und einem 20x-Objektiv verwendet, diese Kombination ergibt eine Strahlungsleistung von ca. 0,4 mW . Die Untersuchungen im Rhodamin-Modus wurden mit einer 100 W Quecksilber-Kurzbogenlampe auf ca. 50 % der Maximalintensität mit einem N2 – Filterblock und einem 20x-Objektiv durchgeführt, entsprechend einer Strahlungsleistung von ca. 13,6 mW.

Die lichtexponierte Fläche der Rückenhautkammer beträgt ca. $1,04 \text{ mm}^2$ (197). Dementsprechend wurden während der Experimente pro untersuchtem Areal etwa folgende Lichtdosen appliziert:

- Arteriolen:

$$(5 \cdot 20 \text{ s}) \cdot 0,4 \text{ mW} = 40 \text{ mWs} = 40 \text{ mJ};$$

$$40 \text{ mJ} / 1,04 \text{ mm}^2 = 3,846 \text{ J}/\text{cm}^2;$$

- Venolen:

$$((5 \cdot 30 \text{ s}) \cdot 0,4 \text{ mW}) + ((5 \cdot 30 \text{ s}) \cdot 13,6 \text{ mW}) = 60 \text{ mWs} + 2040 \text{ mWs} = 2100 \text{ mWs} = 2,1 \text{ J};$$

$$2,1 \text{ J} / 1,04 \text{ mm}^2 = 201,923 \text{ J}/\text{cm}^2$$

- Kapillaren:

$$(5 \cdot 30 \text{ s}) \cdot 0,4 \text{ mW} = 60 \text{ mWs} = 60 \text{ mJ};$$

$$40 \text{ mJ} / 1,04 \text{ mm}^2 = 3,846 \text{ J}/\text{cm}^2$$

Eine Untersuchung von Steinbauer et al. am syrischen Goldhamster mit Rückenhautkammer verwendete den gleichen Versuchsaufbau, die gleiche FITC-Dosis, und eine ungefähr vierfache Rhodamin-Dosis (197). Unter 60 min kontinuierlicher Bestrahlung im FITC-Modus mit 10,6 mW (Lichtdosis $3780 \text{ J}/\text{cm}$) kam es zu einer Erwärmung der Präparation um ca. $0,02 \text{ }^\circ\text{C}/\text{min}$. In der

vorliegenden Studie mit insgesamt ca. 10 min Aufnahmezeit pro Messzeitpunkt hätte die Erwärmung der Kammer selbst bei maximaler Strahlungsintensität also 0,5 °C nicht überschritten. In den Versuchen von Steinbauer et al. zeigte sich eine signifikant erhöhte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (5/11) und venulärer No-flow (6/11) bei Lichtdosen größer 500 J/cm² sowie eine erhöhte Inzidenz von Vasospasmen (3/6) und arteriellem No-flow (1/6) bei Lichtdosen über 1400 J/cm². Eine signifikant verringerte FKD fand sich erst ab 1890 J/cm²(197). Auch bei 10-fach erhöhter Dosis von FITC-Dextran bzw. Durchführung der Versuche nach 4 h Druck-Ischämie traten erst bei einem Vielfachen der von uns verwendeten Lichtdosis signifikante Veränderungen der Mikrozirkulation durch Phototoxizität auf (197).

Eine Beeinträchtigung der Untersuchungsergebnisse durch Phototoxizität kann bei dem von uns verwendeten Versuchsprotokoll daher mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

5.3 Diskussion der Ergebnisse

5.3.1 Schock

5.3.1.1 Makrohämodynamik und Laborparameter

Bis zur Volumensubstitution am Ende der Schockperiode war das Vorgehen für alle in die Studie eingeschlossenen Hamster identisch und es fanden sich bei keinem der gemessenen Parameter signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen. Daher können die beobachteten Veränderungen im Schock für alle drei Gruppen im Folgenden gemeinsam diskutiert werden.

Mit der Induktion des Schocks kam es bei den Versuchstieren zu einem signifikanten Abfall der Herzfrequenz und teilweise auch zu bradykarden Herzrhythmusstörungen. Beides ist – anders als beim Menschen – eine beim Nager relativ häufig zu beobachtende Reaktion auf die Hypotonie und wurde auch für den Hamster in anderen Studien beschrieben (93). Die Bradykardie ist offensichtlich primär vagal vermittelt. Sie kann durch Vorbehandlung mit Atropin verhindert bzw. durch Vagotomie aufgehoben werden. Besondere Bedeutung scheint hierbei den afferenten C-Fasern zuzukommen, die die Information von kardialen Dehnungs-Rezeptoren zum Nucleus solitarius weiterleiten. So weisen Ratten, bei denen diese Neuronen durch eine Capsicainbehandlung teilweise zerstört wurden, nur noch eine verringerte bradykarde Reaktion bei Hämorrhagie auf (118).

Durch die metabolische Azidose sowie die gesteigerte Sympathikusaktivität kam es bei allen Versuchstieren zu einem deutlichen Anstieg der Atemfrequenz und Veränderungen der Blutgase im Sinne einer Hyperventilation, wie dies auch in anderen Studien beschrieben wurde (93). Trotz dieser respiratorischen Kompensation entwickelte sich im Verlauf eine ausgeprägte Azidose mit deutlichem Anstieg von Laktat und Basendefizit. Beide Parameter sind etablierte Indikatoren für

die Schwere eines hämorrhagischen Schocks. Sie reflektieren die eingegangene Sauerstoffschuld und steigen proportional zum Ausmaß und der Dauer der schockbedingten Hypoperfusion (87). Dementsprechend korrelieren sie eng mit der Mortalität im Schock (11; 30; 54) und sind darüber hinaus auch als Prädiktor für das Überleben etabliert (54; 175; 189; 214).

In der vorliegenden Studie entwickelten die Versuchstiere innerhalb von 30 min einen Laktatspiegel von 12,7 mmol/l und ein Basendefizit von 13,3 mmol/l. Für Ratten wurde der Beginn der Dekompensation (definiert als der Punkt des volume uptakes in einem 40 mmHg Schockmodell nach Wiggers) bei einem Laktat 14 mmol/l und einem Basendefizit von ca. 16 mmol/l festgestellt (187). Kerger et al. berichten, dass die Hamster, die in ihren Versuchen während eines druckkontrollierten Schocks (MAP 40 mmHg über 120 min bzw. 240 min) verstarben, bei 30 min ein ähnlich großes Basendefizit aufwiesen (ca. 11 mmol/l bzw. 14 mmol/l), wie die Versuchstiere der vorliegenden Studie (93, 94). Aufgrund der von Nolte et al. (150) publizierten Befunde kann man davon ausgehen, dass alle Tiere ohne Therapie nach spätestens 60 min verstorben wären, was bedeutet, dass sie sich zum Zeitpunkt des Volumenersatzes in einem schweren progressiven Schock und vermutlich kurz vor der Dekompensation befanden.

5.3.1.2 *Mikrozirkulation*

Die terminale Dekompensation des hämorrhagischen Schocks ist eine Folge von Veränderungen im Bereich der Mikrozirkulation. Insbesondere der Verlust der Konstriktionsfähigkeit im Bereich der arteriolären Widerstandsgefäße führt zu einem Abfall des totalen peripheren Widerstandes und somit auch des arteriellen Blutdruckes. Bis dahin ist die Reaktion der Mikrozirkulation insgesamt heterogen: Während sich die Widerstandsgefäße, also die kleinen Arterien und die größeren Arteriolen kontrahieren, kommt es bei den kleineren Arteriolen zu einer Vasodilatation um bis zu 75 % (42; 179).

Dies ist bedingt durch Unterschiede in der sympathischen Innervation der einzelnen Gefäßklassen: unabhängig von der Größe lassen sich in allen Gefäßen der Mikrozirkulation α_2 -Rezeptoren nachweisen, α_1 -Rezeptoren kommen dagegen lediglich in den größeren Arteriolen und Venolen vor (60). Zum anderen verlaufen die kleineren Gefäße direkt im Muskelgewebe eingebettet und unterliegen daher stärker als die größeren Gefäße der lokalen metabolischen Situation. Diese ist im Schock geprägt durch vasodilatierende Faktoren wie Hypoxie (108), Laktatakkumulation, Azidose (133) und ein reduziertes Membranpotential der Muskelzellen (12).

Methodikbedingt waren die Widerstandsgefäße in der vorliegenden Studie einer direkten Beobachtung nicht zugänglich. Bei den untersuchten kleineren Arteriolen ($30,3 \pm 15,8 \mu\text{m}$) konnte lediglich die oben beschriebene Vasodilatation beobachtet werden. Der drastische Abfall der erythrozytären Fließgeschwindigkeit um 90 % kann jedoch als direkter Hinweis auf die Konstriktion stromaufwärts gelegener, größerer Widerstandsgefäße gewertet werden, zumal er durch eine alleinige Verringerung des Herzzeitvolumens nicht zu erklären wäre (42, 179).

In der Studie von Nolte et al. führte der 45-minütige Schock bei MAP von 30 ± 5 mmHg zu einem Abfall der FKD um 63 %. Parallel zu der intravitalmikroskopischen Studie wurde in einer anderen Gruppe von Versuchstieren die Gewebeoxygenierung in der Rückenhautkammer untersucht. Dabei wurden zum Ende des Schocks im Muskelgewebe Sauerstoffpartialdrücke um 4 mmHg gemessen (152). Kerger et al. (93) unterzogen in einem ähnlichen Modell Hamster mit Rückenhautkammer einem 4-stündigen hämorrhagischen Schock mit MAP 40 mmHg und untersuchten mit Hilfe der Phosphorescence Quenching-Methode den Sauerstoffpartialdruck an verschiedenen Stellen des Kreislaufes. Hierbei fanden sie bei den Tieren, die den Schock überlebten (45 von 66 Tieren), dass der p_{aO_2} von hyperventilationsbedingt erhöhten Werten um 110 mmHg herznah bereits in den größeren Arteriolen auf Werte unter 40 mmHg abgefallen war und im Gewebe nach 30 min Schock trotz einer FKD von 50 % bei unter 5 mmHg lag (siehe Abbildung 5-2). Noch ausgeprägter waren die Befunde bei den Tieren, welche während des Schocks verstarben.

In der vorliegenden Studie lag die Schockdauer bei 30 min, dabei war aber der Blutdruck niedriger und daher der Abfall der FKD deutlich ausgeprägter, sodass davon ausgegangen werden kann, dass sich auch hier eine ausgeprägte Gewebhypoxie entwickelt hat. Soweit anhand der Extravasation des Plasma-Markers FITC-Dextran beurteilbar, fanden sich zum Ende der Schockperiode zwar noch keine Anzeichen für eine signifikante Störung der Endothelzellintegrität, dies steht aber im Einklang mit anderen Untersuchungen, wonach eine Permeabilitätsstörung erst nach einer längeren Zeit im Schock auftritt (75).

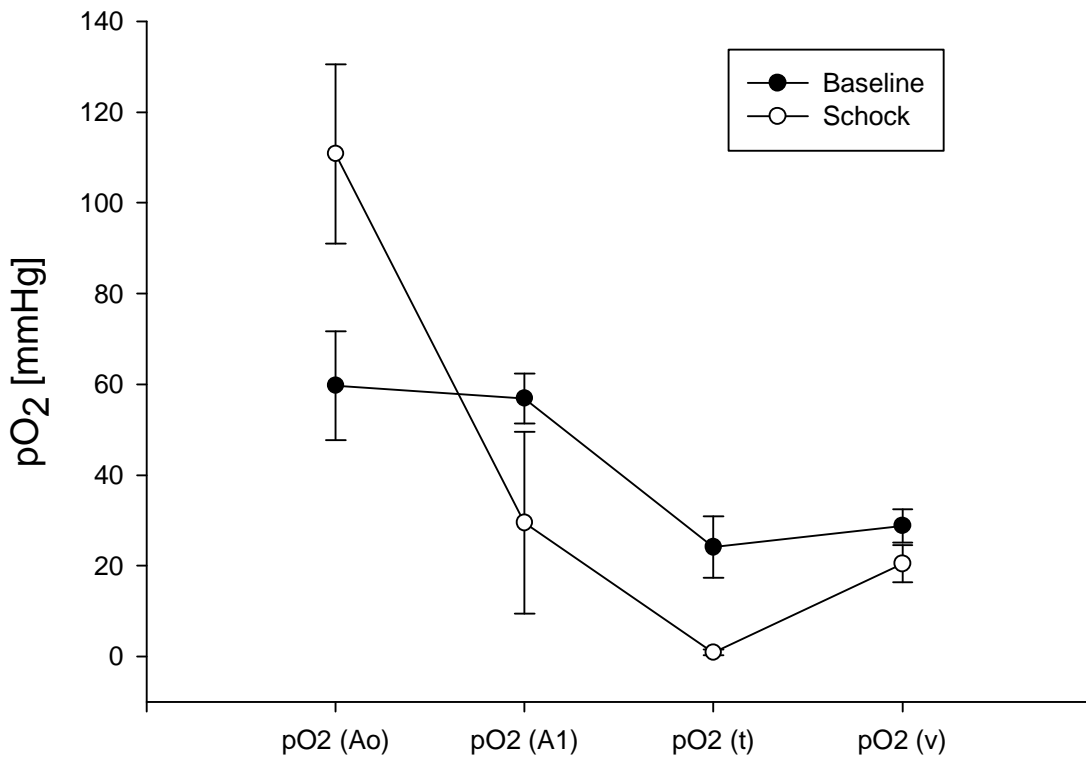


Abbildung 5-2: Sauerstoffpartialdrücke (pO_2) unter Normalbedingungen bzw. im Schock: herznah (A. carotis; Ao), in den Arteriolen (A1), dem Gewebe (t) sowie den Venolen (v) der Rückenhautkammer. Mittelwert \pm Standardabweichung. Nach Kerger et al. (93)

Zusammenfassend kann man feststellen, dass sich die Hamster in der vorliegenden Studie zum Zeitpunkt des Volumenersatzes nach den metabolischen Parametern im progressiven Schock nahe der Dekompensation befanden und dass auch im Bereich der Mikrozirkulation die typischen Veränderungen eines schweren hämorrhagischen Schocks zu beobachten waren.

5.3.2 Volumenersatz

In der vorliegenden Studie wurde zur Therapie des hämorrhagischen Schocks die Menge des zur Induktion und Aufrechterhaltung des Schocks entnommenen Blutvolumens zu 100 % in Form von Dex60, rHb1.1 oder rHb2.0 ersetzt. Dadurch wurde die Hypovolämie behoben und vermutlich eine Hypervolämie erzeugt, was anhand folgender Modellrechnung veranschaulicht werden soll:

Bei einem mittleren Körpergewicht von 65,9 g und einem angenommenen Blutvolumen von 65 ml/kg KG ergibt sich für die Versuchstiere ein durchschnittliches Gesamtblutvolumen von 4,22 ml. Zur Induktion und Aufrechterhaltung des Schocks wurden im Mittel 2,75 ml/kg KG Blut entnommen, entsprechend 65 % des Gesamtblutvolumens der Hamster. Ohne Flüssigkeitsverschiebungen wäre der Ausgangs-Hämatokrit unverändert geblieben und das Blutvolumen der Hamster im Schock hätte im Mittel $(4,22 - 2,75 =) 1,47$ ml betragen.

Im hämorrhagischen Schock kommt es durch den erniedrigten hydrostatischen Druck im Gefäßsystem zu einem „fluid shift“, also einer kompensatorischen Flüssigkeitsverschiebung in den Intravasalraum. In der vorliegenden Studie führte dies zu einer Reduktion des Hämatokritwertes von 46,2 % auf 26,9 % zum Ende des Schocks.

Über einen Dreisatz kann man das Blutvolumen inklusive fluid-shift im Schock also mit $[(1,47 \text{ ml} \cdot 0,462)/0,269] = 2,52$ ml berechnen. Hierbei bleibt allerdings die zeitliche Komponente unberücksichtigt, da bereits während der Schockinduktion ein fluid-shift stattfindet und somit zunehmend verdünntes Blut abgenommen wurde. Diese Berechnung unterschätzt also das tatsächlich zirkulierende Blutvolumen.

Ein anderer Ansatz ergibt sich daraus, dass durch den Ersatz des entnommenen Blutvolumens mit (erythrozytenfreiem) Dex60, rHb1.1 oder rH2.0 der Hämatokritwert von 26,9 % ziemlich genau auf die Hälfte, nämlich auf 13,4 % abgesenkt wurde. Das bedeutet, dass die zum Ende des Schocks

zirkulierende Blutmenge in etwa dem zurückgegebenen Volumen von 2,75 ml entsprechen haben muss.

Nimmt man also an, dass im Schock das tatsächlich zirkulierende Blutvolumen zwischen 2,52 und 2,75 ml lag, so lässt sich der fluid-shift abschätzen: Er läge bei $(\sim 2,65 - 1,47) \sim 1,18$ ml und wäre damit immerhin für fast die Hälfte des im Schock zirkulierenden Volumens verantwortlich. Unter Berücksichtigung des fluid-shift läge das Blutvolumen der Versuchstiere nach dem Volumenersatz um ca. 25 % über den Werten zu Versuchsbeginn.

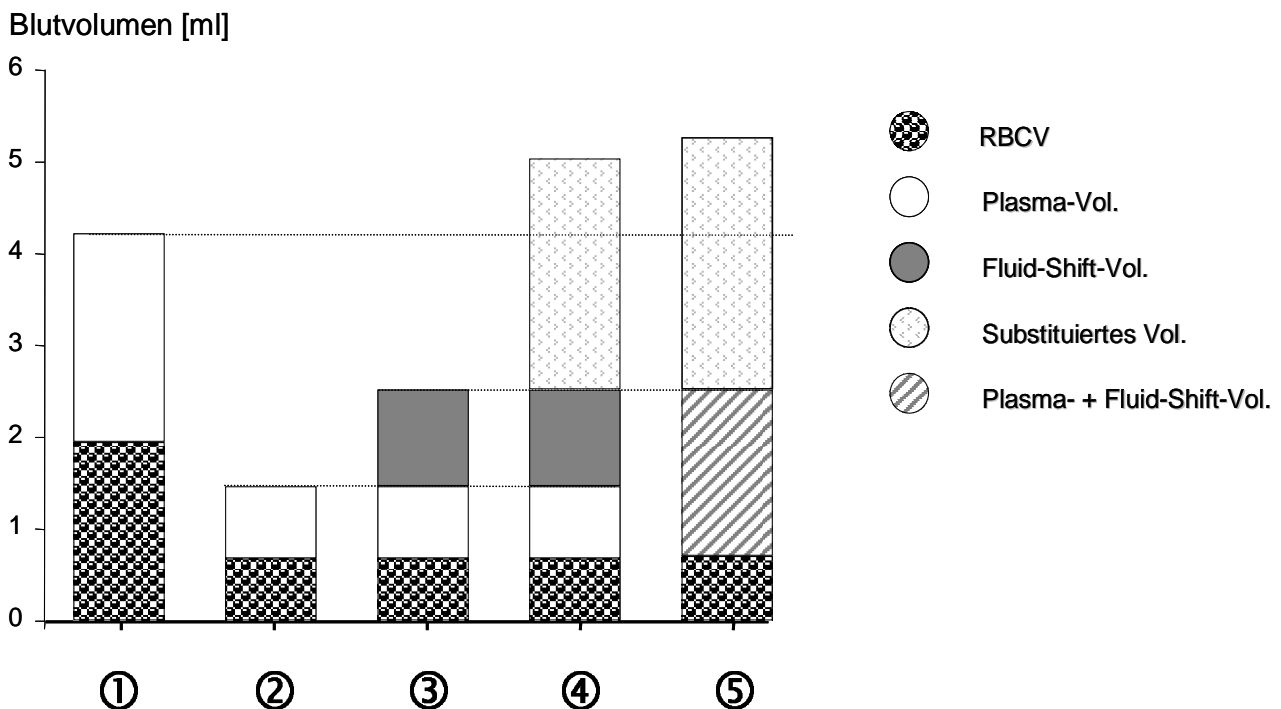


Abbildung 5-3: Modellrechnung zu den angenommenen Volumenverhältnissen vor, während und nach Schock: ① Blutvolumen unter Ausgangsbedingungen: $BV = 65,9 \text{ g} \cdot 65 \text{ ml/kg} = 4,22 \text{ ml}$; ② theoretisches Blutvolumen im Schock (ohne fluid-shift): $BV = 4,22 \text{ ml} - 2,75 \text{ ml} = 1,47 \text{ ml}$; ③ Blutvolumen im Schock (mit fluid-shift): $BV = [(1,47 \text{ ml} \cdot 0,462) / 0,269] = 2,52 \text{ ml}$; ④ Blutvolumen nach Volumenersatz = Blutvolumen im Schock + substituiertes Volumen ⑤ Blutvolumen nach Volumenersatz = Verdopplung des Schockvolumens (entspricht einer Halbierung des Hb)

5.3.3 Nachbeobachtung

5.3.3.1 Makrohämodynamik und Laborparameter

Einer der wichtigsten Befunde der vorliegenden Studie ist, dass durch Volumenersatz mit den beiden rekombinanten Hämoglobinlösungen rHb1.1 und rHb2.0 die Makrohämodynamik besser wiederhergestellt und die Laborparameter schneller normalisiert wurden, als durch den Volumenersatz mit der kolloidalen Kontrolllösung Dex60.

Prinzipiell ermöglicht die Korrektur der Hypovolämie durch Kolloide über die Steigerung der Vorlast ein höheres Schlag- und somit auch Herzzeitvolumen. Gleichzeitig sinkt aufgrund der reduzierten Blutviskosität die Nachlast. Beides verbessert die Gewebepерfusion.

Mit zunehmender Verdünnung sinkt aber auch die Sauerstofftransportkapazität des Blutes. Bei isovolämer Hämodilution auf bis zu 50 % des Ausgangs-Hb kommt es dabei noch nicht zur Beeinträchtigung der Gewebeoxygenierung. Aufgrund der erniedrigten Blutviskosität ist sogar zunächst eine Verbesserung der Sauerstoffversorgung möglich (140; 145), zumal der kapilläre Hämatokrit über einen weiten Bereich nahezu unverändert bleibt (112; 117; 144).

Bei weiterer Hämodilution entwickelt sich jedoch ab einem gewissen Punkt, dem so genannten kritischen Hämatokrit, eine „supply-demand-dependency“, also die Limitierung des Sauerstoffverbrauches durch das Sauerstoff-Angebot (141). Der kritische Hämatokrit ist hierbei keine Konstante, sondern der Wert, bei dessen Unterschreiten die ersten Zeichen einer Gewebehypoxie auftreten. Hämodilutionsversuche an gesunden Probanden haben gezeigt, dass dieser Wert für Menschen, die Raumluft atmen, bei Hämoglobinwerten unter 4,8 g/dl liegt (111).

Auch die experimentellen Rahmenbedingungen haben Einfluss auf den kritischen Hämatokrit. Er kann zum Beispiel bei Narkotisierung des Versuchstieres oder bei einer hohen inspiratorischen Sauerstoffkonzentration noch niedriger liegen (134). So traten erste Ischämiezeichen beim

anästhesierten Schwein unter Beatmung mit Raumluft (F_{iO_2} 0,21) ab einem Hb von 2,3 g/dl auf, wohingegen sie sich bei Beatmung mit reinem Sauerstoff (F_{iO_2} 1,0) erst bei einem Hb von 1,2 g/dl zeigten (134).

In Hämodilutionsversuchen am wachen, Raumluft atmenden Hamster konnten wir zeigen, dass das Basendefizit und der Laktatspiegel bis zu einem Hämatokrit von 20 % (Hb $6,8 \pm 0,6$ g/dl) gegenüber den Ausgangswerten unverändert bleiben, wohingegen diese Werte bei weiterer Hämodilution auf einen Hämatokrit von 10 % (Hb $3,5 \pm 0,4$ g/dl) bereits signifikant erhöht waren (Basendefizit $3,5 \pm 4,5$ mmol/l, Laktat $6,1 \pm 3,3$ mmol/l) (89). Der Hämoglobinwert der Dex60-Gruppe in der vorliegenden Studie lag mit 5 g/dl zwischen diesen beiden Werten. Sowohl Basendefizit als auch Laktat waren jedoch in der Nachbeobachtungszeit rückläufig. Die Werte fielen zwar nicht so schnell wie die der rHb-Gruppen und auch die Hyperventilation persistierte bis zum Versuchsende, dennoch darf davon ausgegangen werden, dass trotz des niedrigen Hb-Wertes eine Regeneration nach Schock möglich war und auch stattgefunden hat.

Ebenso fand offensichtlich auch die Erholung der Herzfunktion, gemessen an MAP und HF, nur verzögert statt, wobei auch in diesem Falle der niedrige Hb eine schnellere Erholung der Herzfunktion limitiert haben könnte (135). Als konkreter Hinweis auf die Belastung des Myokards nach dem Volumenersatz mit Dextran können auch die übermäßigen ZVD-Anstiege gewertet werden, die im Rahmen der Vorversuche bei der höheren Infusionsrate von 400 μ l/min aufgefallen waren.

Die meisten Hämoglobinlösungen der ersten Generation waren in präklinischen Studien in der Lage, sowohl die globale Hämodynamik als auch die metabolischen Parameter schneller und effektiver wiederherzustellen, als Kristalloide oder Kolloide (28; 74; 122; 150; 185; 188). Man kann davon ausgehen, dass neben der zusätzlichen Sauerstofftransportkapazität auch die Vasoaktivität zu der schnellen Wiederherstellung beigetragen hat.

So haben Habler et al. in einer Studie an Schweinen gezeigt, dass die Vasoaktivität den koronaren Perfusionsdruck erhöht, was insbesondere bei kritischer Versorgungssituation des Herzmuskels die Koronarperfusion verbessern und dementsprechend die Überlebensrate der Versuchstiere erhöhen kann (74). Vor diesem Hintergrund kann man annehmen, dass auch in der vorliegenden Studie die Kombination aus Volumenersatz, Sauerstofftransportkapazität und Vasoaktivität in der rHb1.1-Gruppe eine bessere Erholung der Herzfunktion und damit der Makrohämodynamik ermöglichte, als dies durch den reinen Volumeneffekt in der Dex60-Gruppe der Fall war.

Weil rHb2.0 keine nennenswerte arterioläre Vasokonstriktion hervorruft, kommt es anders als bei rHb1.1 nach der Verabreichung auch nicht mehr zu hypertensiven Blutdruckwerten (50; 165; 215). Der vergleichsweise niedrige total-periphere Widerstand erlaubt jedoch anders als bei rHb1.1 ein höheres Herzzeitvolumen nach hämorrhagischem Schock (124). Dies kann in der vorliegenden Studie insofern nachvollzogen werden, als dass in der rHb2.0-Gruppe trotz des relativ niedrigen MAP die beste Gewebepfusion beobachtet werden konnte.

Zusammenfassend wurde also in beiden Hämoglobin-Gruppen die Herzleistung vermutlich durch die zusätzlich bereitgestellte Sauerstoff-Transportkapazität unterstützt, was das bessere Abschneiden dieser beiden Gruppen gegenüber der Dex60-Gruppe erklärt. Aber nur in der rHb2.0-Gruppe konnte diese aufgrund der fehlenden arteriolären Vasokonstriktion auch in eine Verbesserung der Gewebepfusion umgesetzt werden.

Die Menge an Hämoglobin, die den Tieren zur Therapie des hämorrhagischen Schocks verabreicht wurde, war in beiden Versuchsgruppen gleich. Dennoch wurden danach in der rHb1.1-Gruppe signifikant höhere Hämoglobinwerte als in der rHb2.0-Gruppe gemessen. Dieser Befund steht im Einklang mit bislang publizierten Daten (165) und lässt sich durch zwei mögliche Ansätze erklären:

Einerseits durch die oben beschriebene Volumenkonzentrierung als Nebenwirkung der vasoaktiven Hämoglobinlösung rHb1.1, zum anderen durch den mit 63 mmHg um ca. 50 % höheren kolloidosmotischen Druck bei rHb2.0 im Vergleich zu rHb1.1 (42 mmHg), was einen stärkeren Volumeneffekt und somit einen niedrigeren Hb zur Folge haben kann.

Die beiden metabolischen Parameter Laktat und Basendefizit spiegeln die im Schock eingegangene Sauerstoffschuld wider und gelten als zuverlässige Prädiktoren für das Überleben nach hämorrhagischem Schock (54; 175; 189; 214). Rutherford et al. haben gezeigt, dass ein Basendefizit über 11,8 mmol/l zum Zeitpunkt der Einlieferung ins Krankenhaus bei Schockpatienten mit einer bis zu 50 %-igen Mortalität assoziiert ist (178).

Im weiteren Verlauf haben die beiden Parameter einen festen Stellenwert für die Kontrolle des Therapieerfolges. Sie sind zuverlässige Indikatoren für ein persistierendes Volumendefizit (47; 48), welches mit okkulter Hypoperfusion und einer gesteigerten Mortalität assoziiert ist (26; 160). Die Früherkennung eines Volumendefizites und eine Therapie bis zur Normalisierung des Laktatwertes innerhalb der ersten 24 h des Krankenhausaufenthaltes reduzieren die Komplikationsrate und verbessern das Überleben (125; 26).

In der vorliegenden Studie waren beide Hämoglobinlösungen im Gegensatz zu Dex60 in der Lage, die metabolischen Parameter Laktat und Basendefizit innerhalb der 60-minütigen Nachbeobachtungszeit wieder fast auf Ausgangsniveau zu reduzieren. Ähnliche Ergebnisse wurden bereits für andere Hämoglobinlösungen der ersten Generation publiziert (28; 74; 122; 150; 185; 188). Dementsprechend war die Sauerstofftransportkapazität in beiden rHb-Gruppen offensichtlich groß genug, um die Rückkehr zum aeroben Stoffwechsel zu ermöglichen.

Dies ist insbesondere deshalb interessant, weil die metabolischen Parameter in beiden rHb-Gruppen gleichschnell rückläufig waren, obwohl die rHb1.1-Gruppe eine signifikant niedrigere funktionelle Kapillardichte hatte. Für diese Divergenz zwischen guter metabolischer Erholung auf der einen

Seite und niedriger FKD auf der anderen bieten sich verschiedene Erklärungsansätze an, welche weiter unten diskutiert werden.

5.3.3.2 Mikrozirkulation

Die Mikrozirkulation nach der Initialtherapie des hämorrhagischen Schocks ist gekennzeichnet durch einen mehr oder weniger stark ausgeprägten Ischämie-Reperfusionsschaden, welcher eine vollständige Wiederherstellung der Kapillarperfusion auch noch Stunden nach dem Schock erschwert bzw. verhindert (10; 137). Mehrere Mechanismen wurden für dieses so genannte „no-reflow“-Phänomen verantwortlich gemacht, vor allem persistierende Vasokonstriktion, Endothelzellschwellung, die Ausbildung eines interstitiellen Ödems und die durch inflammatorische Prozesse gesteigerte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (137; 138).

5.3.3.2.1 Arteriolen, Venolen

Sowohl während des Schocks als auch nach Volumenersatz spielen die kleinen Arterien und die größeren Arteriolen eine zentrale Rolle bei der Regulierung des peripheren Widerstandes und der Verteilung des Herzminutenvolumens (221). Eine über die Reperfusion hinaus persistierende Vasokonstriktion gilt als wichtige Komponente des „no-reflow“-Phänomens (88), aufgrund der schlechten Zugänglichkeit für hämodynamische Messungen wurde dieses Thema bislang jedoch nur wenig untersucht (157; 179).

In einem modifizierten Modell der Rückenhautkammer am Hamster fanden Sakai et al. (179), dass die Regulierung des Blutflusses vor allem auf Ebene der A_0 -Arterien ($156 \pm 23 \mu\text{m}$) und V_0 -Venolen ($365 \pm 64 \mu\text{m}$) stattfindet und dass diese Gefäße auch 2 h nach Schock und sogar nach Volumenersatz mit Vollblut noch signifikant verengt blieben. Im Gegensatz dazu zeigte sich in den kleineren, nachgeschalteten A_2 - und A_3 -Arteriolen ($25,6 \pm 6,4 \mu\text{m}$ und $10,2 \pm 2,5 \mu\text{m}$) eine Vasodilatation, während bei den A_4 -Arteriolen ($8,6 \pm 1,8 \mu\text{m}$) und den V_C und V_L -Venolen ($25,9 \pm$

4,6 μm und $79,9 \pm 15,3 \mu\text{m}$) keine spezifischen Änderungen auftraten. Der Volumenersatz mit Albumin führte zu einer noch ausgeprägteren Persistenz der Vasokonstriktion bei den großen Gefäßen und wiederum zu einer Dilatation der stromabwärts gelegenen Arteriolen.

Vom Muster her ähnelten die Veränderungen der Gefäßdurchmesser nach Volumenersatz stark den im Schock beobachteten Vorgängen, wobei das Ausmaß der Persistenz (Albumin > Vollblut) direkt mit einer schlechteren Wiederherstellung der FKD korrelierte (179). Als Grund für die schlechtere Erholung der Mikrozirkulation nach Volumenersatz mit Albumin machen die Autoren neben der niedrigeren Sauerstofftransportkapazität vor allem die niedrigere Viskosität verantwortlich. Dadurch treten geringere Scherkräfte am Endothel auf, was über eine reduzierte NO-Produktion eine stärkere Vasokonstriktion der Widerstandsgefäße hervorruft (179). Distal der Widerstandsgefäße führt dies zu einem Abfall Flussgeschwindigkeiten, zu verringerten Scherkräften und dementsprechend zu einer Vasodilatation der kleineren Arteriolen.

Die benefiziellen Effekte einer hohen Viskosität für die Mikrozirkulation bei Hb-Werten im Bereich des kritischen Hämatokrit wurde in letzter Zeit in Arbeiten derselben Gruppe diskutiert und experimentell belegt (33; 202; 203).

Im Gegensatz zu den zitierten Studien waren bei uns die Unterschiede bezüglich der Viskosität jedoch gering und die Lösungen mit der niedrigsten und der höchsten Viskosität (rHb1.1; 1,9 cP bzw. Dex60; 2,8 cP) konnten die Kapillarperfusion nicht so gut wiederherstellen, wie der Volumenersatz mit rHb2.2 (2,1 - 2,4 cP). Deshalb kann anhand der vorliegenden Studie keine Aussage über den Einfluss der Viskosität getroffen werden. Insgesamt stimmen die Ergebnisse von Sakai et al. (179) jedoch sehr gut mit unseren Daten überein, denn in der Dex60-Gruppe der vorliegenden Studie zeigte sich bei den beobachteten Arteriolen, die vom Durchmesser her A₂-, A₃- und A₄-Arteriolen entsprachen, ebenfalls eine Tendenz zur Dilatation und die venulären Fließgeschwindigkeiten waren in dieser Gruppe nach Schock deutlich verlangsamt.

Nimmt man die Daten der Dex60-Gruppe als Referenz, so zeigte sich im Bereich der kleineren Arteriolen nach Volumenersatz mit rHb1.1 eine signifikante Vasokonstriktion. Dieser Befund kann auf den vasoaktiven Effekt von rHb1.1 zurückgeführt werden, welcher –wie in der Einleitung beschrieben- vor allem auf dem Mechanismus des NO-Scavenging beruht, wie von Rioux et al. exemplarisch an Aortenringen nachgewiesen wurde (174).

Im Gegensatz zu den Arteriolen blieben die Durchmesser der Venolen gegenüber der Dex60-Gruppe unverändert. Interessant ist jedoch die Tatsache, dass in der rHb1.1-Gruppe trotz der arteriolen Vasokonstriktion eine signifikant höhere venuläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit gemessen wurde, als in der Dex60-Gruppe. Eine ähnliche Beobachtung wurde - ebenfalls am Hamster mit Rückenhautkammer - in früheren Versuchen am Institut für Chirurgische Forschung von Nolte et al. (150) für den Volumenersatz nach Schock mit DCLHb publiziert.

Es ist bekannt, dass rHb1.1 ähnlich wie andere vasoaktive Hämoglobinlösungen den systemischen Widerstand erhöht und dadurch zu einem Abfall des Herzminutenvolumens führen kann (51). Mit Hilfe von Mikrosphären konnte aber an anästhesierten Ratten gezeigt werden, dass die einzelnen Gewebe unterschiedlich auf die Vasoaktivität reagieren, wodurch es zu einer Umverteilung des Herzzeitvolumens kommt (31; 120; 122). Während bei allen Geweben die Durchblutung gegenüber den Ausgangsbedingungen zurückging, war die Muskulatur neben dem linken Ventrikel das einzige Gewebe, welches davon nicht betroffen war (31).

Eine entsprechende Untersuchung nach Schock und Volumenersatz konnte zwar keinen signifikanten Unterschied zwischen Kristalloid und rHb1.1 bezüglich der Muskeldurchblutung feststellen. Dafür zeigte sich ein gegenüber dem Kristalloid signifikant erhöhter Blutfluss zu Herz, Haut, Niere, Milz und Leber (122).

Berücksichtigt man die große Kontaktfläche und die geringe Dicke des von uns untersuchten Muskels, so könnte die gesteigerte Durchblutung der Haut einen Erklärungsansatz für die erhöhten Blutflussgeschwindigkeiten in den Venolen der rHb1.1-Gruppe bieten, zumal Gefäßverbindungen aufgrund ihres Verlaufes orthogonal zum untersuchten Gewebe nur schwer zu detektieren wären.

In der rHb2.0-Gruppe verhielten sich die Durchmesser der Arteriolen genauso wie die der Dex60-Gruppe, was als Hinweis auf die fehlende bzw. deutlich reduzierte Vasoaktivität von rHb2.0 gewertet werden darf und im Einklang mit den Resultaten aller anderen zu rHb2.0 veröffentlichten Studien steht (31; 50; 124; 170; 215). Dementsprechend ist der systemische Widerstand nach Schock und Volumenersatz mit rHb2.0 signifikant niedriger als nach Volumenersatz mit rHb1.1 (165), was in unserer Studie den Effekt hatte, dass die venuläre Blutflussgeschwindigkeit trotz des signifikant niedrigeren MAP ebenso hoch wie die der rHb1.1-Gruppe war, und damit signifikant höher als die der Dex60-Gruppe.

5.3.3.2.2 *Extravasation*

In der Frühphase des hämorrhagischen Schocks findet zunächst - wie oben beschrieben - ein fluid-shift vom Interstitium in den Intravasalraum statt. Mit fortschreitender Schockdauer kommt es jedoch hypoxiebedingt zu einer Schwellung der Endothelzellen und zu einer Störung der Barrierefunktion mit gesteigerter mikrovaskulärer Permeabilität (130). Dies begünstigt den Austritt von Flüssigkeit und die Ausbildung von interstitiellen Ödemen, was wiederum den intravasalen Volumenmangel verstärkt und vor allem durch die Einengung der Kapillarlumina eine effektive Reperfusion nachhaltig erschweren kann.

Das Phänomen einer endothelialen Permeabilitätsstörung tritt nicht nur im Rahmen der Mikrozirkulationsstörung bei Schockzuständen auf, sondern kann sich auch erst nach dem Volumenersatz manifestieren.

Zudem haben Untersuchungen am Mesenterium der Ratte gezeigt, dass die Verabreichung von vasoaktiven Hämoglobinlösungen per se – also auch ohne vorherige Ischämie/Reperfusion – durch eine Störung der Endothelzellintegrität eine gesteigerte mikrovaskuläre Permeabilität für den Plasmamarker FITC-Albumin hervorrufen kann (19). Vasoaktive Hämoglobinlösungen können über die Bildung von Aktin-Stressfasern Veränderungen im Zytoskelett verursachen. Diese führen

zur Bildung von Endothelzell-Lücken, was wiederum die Extravasation der Hämoglobinmoleküle verstärken kann, ein Prozess, den Dull et al. als “Hb-induced Hb permeability” bezeichnen (53).

Dies wiederum impliziert zwei Aspekte: Zum einen kann die Extravasation von vasoaktivem Hämoglobin in die Gefäßwand die Vasokonstriktion verstärken (92), zum anderen kann es zu einer Verringerung des Blutvolumens kommen, wie sie für die Hämodilution von Caron et al. beschrieben wurde (35).

Auch in der vorliegenden Studie findet sich eine gesteigerte Permeabilität der arteriellen Gefäße für den Plasmamarker FITC-Dextran, und zwar nur nach der Verabreichung der vasoaktiven Hämoglobinlösung rHb1.1. Am Beispiel von rHb1.1 konnten Doyle et al. zeigen, dass die Polymerisierung von Hämoglobinmolekülen ihre Tendenz zur Extravasation verringert (51). Abgesehen von der Polymerisierung zeichnet sich rHb2.0 gegenüber dem in der vorliegenden Studie unpolymerisierten rHb1.1 durch eine deutlich reduzierte NO-Scavenging-Kapazität aus. Dementsprechend dürfte diese Hämoglobinlösung eine deutlich geringere Endothelzellkontraktion hervorrufen und einen wesentlich geringeren Einfluss auf die Gefäßpermeabilität haben. Zudem konnte gezeigt werden, dass rHb2.0, selbst wenn es extravasieren würde, wegen seiner niedrigen NO-Scavenging-Kapazität keinen nennenswerten Einfluss auf die NO-Konzentration in der Gefäßwand hätte (92).

Die genannten Untersuchungen können durch die Ergebnisse unserer Studie bestätigt werden, weil sich auch bei uns weder ein Hinweis auf Vasoaktivität noch eine gesteigerte Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran in der rHb2.0-Gruppe feststellen ließ.

5.3.3.2.3 *Leukozyten-Endothelzell-Interaktion*

Infolge des Ischämie-Reperfusionsschadens kommt es nach Schock zu einer gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion, welche wesentlichen Anteil am „no-reflow“-Phänomen hat. Hierbei läuft die Leukozytenaktivierung im Allgemeinen im Rahmen einer festen, mehrstufigen Kaskade ab:

Auslöser ist unter anderem die Verringerung der endothelialen NO-Produktion, was 10-20 min nach Reperfusion zu einer Hochregulierung von zellulären Adhäsionsmolekülen, insbesondere von P-Selektin führt (109). Die Interaktion zwischen dem endothelialen Selektin und Mucin-ähnlichen Molekülen auf den Leukozyten führt zum mikroskopisch sichtbaren „Rolling“ der Leukozyten an der Gefäßwand (106). Chemotaktische Substanzen steigern leukozytäre Integrin-Adhäsivität, wodurch es zu einer Verlangsamung des Rollens kommt. Bei weiterer Aktivierung kommt es schließlich zur Verankerung der Leukozyten am Endothel durch die Wechselwirkung zwischen endothelialen Adhäsionsmolekülen aus der Immunglobulin-Superfamilie (IgSF) und Integrinen auf der Leukozytenoberfläche, Korrelat ist das „Sticking“ der Leukozyten an der Gefäßwand, welches der Leukozytenemigration in das umliegende Gewebe vorausgeht.

Die Bedeutung der Leukozytenaktivierung für den Ischämie-Reperfusionsschaden kann man daraus ersehen, dass neutropenische Ratten deutlich weniger „no-reflow“ und dadurch ein signifikant besseres Outcome nach hämorrhagischem Schock zeigen, als Ratten mit normaler Neutrophilen-Zahl (21). Ebenso konnte durch die Inhibition von Adhäsionsmolekülen mit monoklonalen Antikörpern den Reperfusionsschaden nach Schock verringert werden (142; 172). Es gibt Hinweise darauf, dass die Leukozytenadhäsion eng mit Zellkernschäden im umgebenden Muskel korreliert (77).

Der Reperfusionsschaden durch aktivierte Leukozyten hat sowohl eine rheologische als auch eine biochemische Komponente: So verursacht die Verlegung von Kapillaren durch Leukozyten ein

persistierendes Perfusions-Defizit (16; 58; 184) und die Leukozyten-Akkumulation am Endothel postkapillärer Venolen steigert den hydraulischen Widerstand der Abstrombahn, was ebenfalls eine effektive Reperfusion verhindert (130). Die biochemische Komponente umfasst unter anderem die Bildung reaktiver Sauerstoffradikale (132) und die Freisetzung von Proteasen, welche den Reperfusionsschaden weiter verstärken (218).

Um auf die vorliegende Studie zurückzukommen, muss nach Schock also von einer reduzierten endothelialen NO-Produktion und infolgedessen von einer gesteigerten Leukozyten-Endothelzell-Interaktion ausgegangen werden (109). Zudem müsste das NO-Scavenging durch rHb1.1 die Verfügbarkeit von NO am Endothel weiter reduzieren, was eine weitere Steigerung der Leukozytenaktivität in dieser Gruppe zur Folge hätte. Entgegen dieser Erwartungen zeigt sich jedoch in der Nachbeobachtungszeit bei insgesamt großer Streuung kein Unterschied zwischen den beiden rHb-Gruppen. Lediglich 60 min nach Volumenersatz findet sich ein signifikanter Unterschied in der Leukozytenadhärenz zwischen Dex60 und den beiden rHb-Lösungen. Dieser scheint aber weniger auf einer Leukozytenaktivierung durch die Hämoglobinlösungen als vielmehr auf der Reduktion der Leukozytenadhärenz durch Dextran zu beruhen, wie sie an unserem Institut von Steinbauer et al. am Hamster mit Rückenhautkammer beobachtet wurde (198; 199).

5.3.3.2.4 Funktionelle Kapillardichte

Die Funktionelle Kapillardichte ist ein sehr gut etablierter Parameter für die nutritive Organperfusion und ein Schlüsselfaktor für die Vitalität der Gewebe. Voraussetzungen für eine Erholung der FKD nach Schock sind neben ausreichendem Perfusionsdruck eine möglichst weitgehende Beseitigung von arteriöler Vasokonstriktion, Endothelzell-Ödem, interstitiellem Ödem, Leukozytenaktivierung und anderen rheologischen Hindernissen. Auf Ebene der Mikrozirkulation stellt die Wiederherstellung der FKD somit die gemeinsame Endstrecke aller therapeutischen Bemühungen dar.

In der vorliegenden Studie wurde die FKD durch rHb2.0 signifikant besser wiederhergestellt, als durch rHb1.1 oder Dex60. Hierbei hat die unvollständige Erholung in der Dex60- und der rHb1.1-Gruppe vermutlich unterschiedliche Ursachen: Die Verabreichung der (nicht vasoaktiven) Dex60-Lösung führte im Vergleich zur rHb1.1-Gruppe zu einer signifikant schlechteren Wiederherstellung des MAP. Andererseits führt das Fehlen von arteriöler Vasokonstriktion dazu, dass der MAP mehr oder weniger direkt mit der FKD korreliert und diese dementsprechend proportional zum MAP angehoben wird (siehe Abbildung 5-3). Allerdings dürfte der relativ niedrige MAP von $66,3 \pm 7,3$ mmHg für eine weitere Steigerung der FKD limitierend gewesen sein.

Im Gegensatz dazu lag nach Volumenersatz mit rHb1.1 der MAP im Bereich der Ausgangswerte vor Schock. Allerdings waren aufgrund der Vasoaktivität die arteriölen Durchmesser signifikant erniedrigt. Somit kann man davon ausgehen, dass in der rHb1.1-Gruppe der Druckabfall an den präkapillären Widerstandsgefäßen dazu geführt hat, dass die FKD nicht mehr mit dem MAP korreliert und sogar schlechter als in der Dex60-Gruppe wiederhergestellt wurde (siehe Abbildung 5-3). Diese Befunde passen zu früheren Beobachtungen von Botzlar et al. (28) und Nolte et al. (150) in einem ähnlichen Schockmodell: Sie fanden einen niedrigen MAP und eine niedrige FKD

nach Volumenersatz mit Dex60, wohingegen die untersuchte Hämoglobinlösung der ersten Generation (UPBHb bzw. DCLHb) zwar jeweils eine deutliche Steigerung des MAP bewirkte, aber bezüglich der Kapillarperfusion keine Verbesserung brachte.

Der Volumenersatz mit rHb2.0 führte zu einer suffizienten Wiederherstellung des MAP, ohne dass dabei Anzeichen von Vasoaktivität beobachtet werden konnten. Die Durchmesser von Arteriolen und Venolen unterschieden sich zu keinem Zeitpunkt von denen der Dex60-Gruppe, wobei jedoch die venuläre Erythrozytenfließgeschwindigkeit signifikant höher lag. Durch die Abwesenheit von arteriöler Vasokonstriktion korrelierte die FKD direkt mit dem MAP oder anders ausgedrückt: der MAP konnte ohne größere Widerstandsverluste in eine Verbesserung der FKD umgesetzt werden, weshalb sich in dieser Gruppe die höchsten FKD-Werte beobachten ließen.

In der vorliegenden Studie waren beide Hämoglobinlösungen im Gegensatz zu Dex60 in der Lage, sowohl das Basendefizit als auch das Laktat bereits in der 60-minütigen Nachbeobachtungszeit annähernd zu normalisieren. Dies ist vor allem deshalb interessant, weil die metabolischen Parameter gleichschnell rückläufig waren, obwohl die funktionelle Kapillardichte der rHb1.1-Gruppe deutlich niedriger war als die der rHb2.0-Gruppe.

Ein möglicher Erklärungsansatz für diesen Befund soll im Folgenden dargelegt werden:

Nach der allgemeinen Vorstellung, basierend auf dem Krogh'schen Modell, findet die Sauerstoffabgabe an das Gewebe in den Kapillaren statt (103). Untersuchungen von Duling et al. aus dem Jahre 1970 konnten allerdings mit Hilfe von Mikrokathoden zeigen, dass Sauerstoff zu einem großen Teil bereits präkapillär, also auf Ebene der Arteriolen, in das umgebende Gewebe diffundiert (52). Diese Befunde konnten in letzter Zeit mit Hilfe der Phosphoreszenz Quenching-Methode durch Intaglietta und Mitarbeiter bestätigt werden (90; 201). Zudem wird vermutet, dass

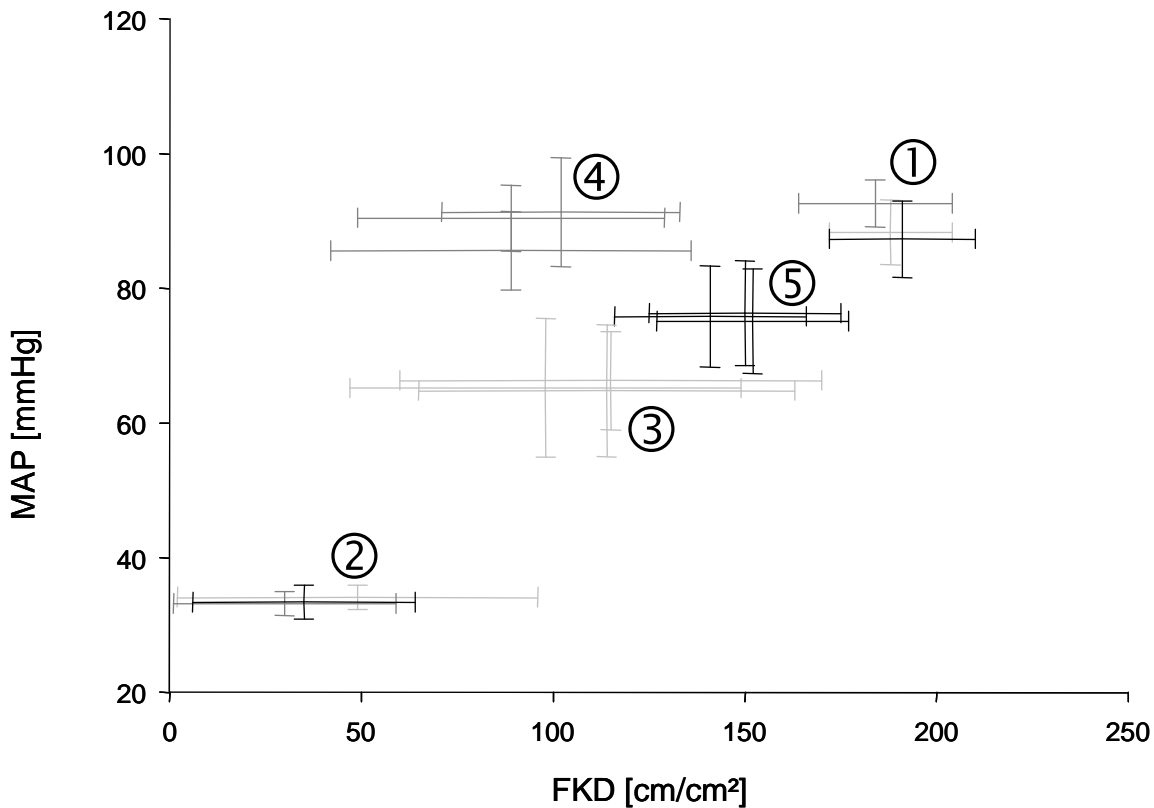


Abbildung 5-4: funktionelle Kapillardichte in Abhängigkeit vom mittleren arteriellen Druck. Bei ① und ② steht jeder Mittelwert für eine Gruppe (n=9); bei ③,④,⑤ repräsentiert jeder Wert einen Messzeitpunkt nach Volumenersatz (15min, 30min, 60min); ① Ausgangswerte alle Gruppen; ② Schock alle Gruppen; ③ Volumenersatz mit Dex60; ④ Volumenersatz mit rHb1.1; ⑤ Volumenersatz mit rHb2.0. Die Werte bei ①, ②, ③ und ⑤ scheinen linear miteinander zu korrelieren, wohingegen bei den Werten ④ (Volumenersatz mit rHb1.1) der erhöhte mittlere arterielle Druck nicht mit einer gesteigerten funktionellen Kapillardichte einhergeht. Mittelwert \pm Standardabweichung.

Hämoglobinlösungen neben ihrer reinen Sauerstofftransport-Funktion zusätzlich die Sauerstoff-Diffusion vom Erythrozyten durch den Plasmasaum zum Gewebe erleichtert (131).

Man könnte also annehmen, dass aufgrund dieser Mechanismen eine ausreichende Oxygenierung des Gewebes trotz reduzierter Kapillarperfusion möglich ist. In der Tat kann man diese Hypothese mit Befunden von Nolte et al stützen., die in einer ähnlichen Studie nach Schock und

Volumenersatz mit DCLHb im Vergleich zu Dex60 eine signifikant schlechtere FKD, aber zugleich einen deutlich besseren Gewebe-pO₂ beobachteten (150; 152). Leider wurden in der genannten Studie weder Laktat noch Basendefizit bestimmt, sodass offen bleibt, ob unter diesen Bedingungen auch eine Normalisierung der metabolischen Parameter stattgefunden hätte.

Kerger et al. untersuchten am Hamster mit Rückenhautkammer nach Schock und Volumenersatz mit einer vasoaktiven Hämoglobinlösung (Hemolink™) die Sauerstoffpartialdrücke in verschiedenen Gefäßkategorien sowie im Gewebe und kamen zu dem Ergebnis, dass trotz Normalisierung der systemischen Parameter im Bereich der Mikrozirkulation nach wie vor eine deutliche Störung der Perfusion und der Sauerstoffpartialdrücke persistierte (93). Diese Feststellung auch deshalb so bedeutend, weil – ebenfalls am Modell des Hamsters mit Rückenhautkammer - gezeigt werden konnte, dass die Erholung der FKD nach Schock den höchsten prädiktiven Wert für das Langzeitüberleben der Tiere hatte (95).

Dies unterstreicht also nochmals die Tatsache, dass eine gesamtheitliche Beurteilung der Effizienz in der Therapie des hämorrhagischen Schocks nur unter Berücksichtigung aller drei Säulen, nämlich der Makrohämodynamik, der Laborwerte und der Mikrozirkulation erfolgen kann.

6 Zusammenfassung

Die Therapie des akuten hämorrhagischen Schocks durch die Transfusion von Erythrozyten-Konzentraten ist meist nur mit zeitlicher Verzögerung möglich und mit einem hohen logistischen Aufwand verbunden. Zudem ist epidemiologisch bedingt in Zukunft mit einem zunehmenden Missverhältnis zwischen der Menge von Spenderblut und dem Bedarf an Blutkonserven zu rechnen.

Die Entwicklung künstlicher Blutersatzstoffe wird daher weltweit mit großem Engagement und auf höchstem Niveau vorangetrieben. Bislang konnte wegen des potentiell schädlichen Nebenwirkungsprofils noch kein Produkt den für die Marktreife in Europa oder den USA erforderlichen Anforderungen gerecht werden. Die meisten der bisher untersuchten Hämoglobinlösungen vereinen nämlich die Vorteile von Volumeneffekt und Sauerstofftransportkapazität mit vasoaktiven Eigenschaften, welche zwar die Wiederherstellung der Makrohämodynamik begünstigen, aber möglicherweise die Wiederherstellung der mikrovaskulären Perfusion gefährden.

Die durch Hämoglobin hervorgerufene Vasokonstriktion findet hauptsächlich über den Mechanismus des NO-Scavenging statt. Mit der Entwicklung der rekombinanten Hämoglobinlösung rHb2.0 gelang es erstmals, durch genetische Modifikation der Häm-Tasche ein Hämoglobinmolekül mit deutlich reduzierter NO-Scavenging-Kapazität herzustellen.

Ziel dieser experimentellen Studie war es, die Effekte dieser Hämoglobinlösung auf die Mikrozirkulation bei der Therapie des hämorrhagischen Schocks zu untersuchen und mit denen einer vasoaktiven Hämoglobinlösung und einer kolloidalen Kontroll-Lösung zu vergleichen.

Hierfür wurden wache, Syrische Goldhamster mit Rückenhautkammer und zentralem arteriellen und venösen Katheter ausgestattet und einem 30-minütigen hämorrhagischen Schock mit einem

mittleren arteriellen Blutdruck von 30-35 mmHg unterzogen. Zum Ende der Schockperiode wurden die Tiere je einer der drei Versuchsgruppen (n=9) nach Randomisierung zugeteilt und der Volumenersatz in der Menge des entzogenen Blutvolumens entweder mit 6% Dextran 60, mit der rekombinanten Hämoglobinlösung rHb1.1 (10 g/dl, normale NO-Scavenging-Kapazität) oder mit rHb2.0 (10 g/dl, reduzierte NO-Scavenging-Kapazität) durchgeführt.

Die makrohämodynamischen Parameter Blutdruck und Herzfrequenz wurden kontinuierlich aufgezeichnet, zudem wurden unter Ausgangsbedingungen, zum Ende der Schockperiode sowie 15 min, 30 min und 60 min nach Volumenersatz arterielle Blutproben analysiert und mit Hilfe der Videofluoreszenzmikroskopie die Mikrozirkulation im quergestreiften Muskel der Rückenhautkammer untersucht.

Die dabei gewonnenen Erkenntnisse lassen sich wie folgt zusammenfassen:

1) Der hämorrhagische Schock führte trotz respiratorischer Kompensation zu einer deutlichen metabolischen Azidose mit ausgeprägtem Anstieg von Laktat und Basendefizit. Im Bereich der kleinen Arteriolen kam es zu keiner relevanten Vasokonstriktion, dennoch verursachte die Zentralisierung des Kreislaufes einen Abfall des Blutflusses in der Kammer um ca. 90 % sowie eine Reduktion der Kapillarperfusion um ca. 80 %.

2) Die Therapie des Schocks mit Dex60 behob zwar die Hypovolämie, reduzierte aber auch nochmals den Hämoglobingehalt des Blutes. Durch Volumenersatz mit Dex60 wurde die Makrohämodynamik nur unzureichend wiederhergestellt, möglicherweise weil die Anämie eine schnellere die Erholung der Herzfunktion nicht zuließ. Dementsprechend fanden sich in dieser Gruppe in der Nachbeobachtungszeit die niedrigsten Fließgeschwindigkeiten und die niedrigste funktionelle Kapillardichte.

3) Der Volumenersatz mit rHb1.1 führte zu einer vollständigen Wiederherstellung der Makrohämodynamik sowie zu einer Normalisierung der metabolischen Parameter innerhalb der Nachbeobachtungszeit. Allerdings zeigte sich vermutlich aufgrund der hohen NO-Scavenging-Kapazität eine signifikante Vasokonstriktion im Bereich der Arteriolen, was eine unzureichende Erholung der funktionellen Kapillardichte zur Folge hatte. Gleichzeitig fand sich eine signifikant gesteigerte Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran als Hinweis auf eine Störung der Endothelzellintegrität.

4) Durch die Therapie des Schocks mit rHb2.0 wurde der MAP stärker angehoben als in der Dex60-Gruppe, aufgrund der fehlenden vasoaktiven Effekte aber nicht so stark wie in der rHb1.1-Gruppe. Ebenso wie in der rHb1.1-Gruppe wurden die metabolischen Parameter in der Nachbeobachtungszeit normalisiert. Die arteriolen Durchmesser zeigten keinen Hinweis auf Vasokonstriktion, was auf die deutlich reduzierte NO-Scavenging-Kapazität zurückgeführt werden kann. Dies ermöglichte eine deutlich effektivere Wiederherstellung der funktionellen Kapillardichte als in den beiden anderen Gruppen. In der rHb2.0-Gruppe fand sich keine gesteigerte Extravasation des Plasmamarkers FITC-Dextran und somit kein Hinweis auf eine Störung der Endothelzellintegrität.

5) Trotz der unterschiedlichen NO-Scavenging-Kapazität der beiden Hämoglobinlösungen zeigten sich keine signifikanten Unterschiede bezüglich der Leukozyten-Endothelzell-Interaktion. Die zu Versuchsende signifikant niedrigere Leukozytenadhärenz in der Dex60-Gruppe ist am ehesten eine Folge der bekannten adhärenzmindernden Effekte von Dextran-Lösungen.

Schlussfolgerung:

In unserem experimentellen Modell war die rekombinante Hämoglobinlösung rHb2.0 aufgrund der deutlich reduzierten NO-Scavenging-Kapazität als einzige der drei Testlösungen in der Lage, die makrohämodynamischen Parameter nach hämorrhagischem Schock suffizient wiederherzustellen und diese Verbesserung auch in eine deutliche Verbesserung der mikrovaskulären Perfusion umzusetzen. Die Minimierung ihrer vasoaktiven Nebenwirkungen dürfte somit einen Schlüsselfaktor für die Entwicklung effizienter und sicherer Hämoglobinlösungen darstellen.

7 Literaturverzeichnis

1. From the Centers for Disease Control and Prevention. Red blood cell transfusions contaminated with *Yersinia enterocolitica*-United States, 1991-1996, and initiation of a national study to detect bacteria-associated transfusion reactions. *JAMA* 278: 196-197, 1997.
2. Red blood cell transfusions contaminated with *Yersinia enterocolitica* - United States 1991-1996, and initiation of a national study to detect bacteria-associated transfusion reactions. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 553-555, 1997.
3. Bekanntmachung des Paul-Ehrlich-Instituts über die Ergebnisse des Stufenplanverfahrens zur Einführung der Leukozytendepletion von zellulären Blutprodukten zur Transfusion. *Bundesanzeiger* 18396, 2001.
4. **Abou-Khalil B, Scalea TM, Trooskin SZ, Henry SM and Hitchcock R.** Hemodynamic responses to shock in young trauma patients: need for invasive monitoring. *Crit Care Med* 22: 633-639, 1994.
5. **Abramson D, Scalea TM, Hitchcock R, Trooskin SZ, Henry SM and Greenspan J.** Lactate clearance and survival following injury. *J Trauma* 35: 584-588, 1993.
6. **Algire G.H.** The adaption of the transparent chamber technique to the mouse. *J Natl Cancer Inst* 4: 1-11, 1943.
7. **Amberson WR, Joye JJ and Rhode CM.** Clinical Experience with Hemoglobin-Saline Solutions. *J Appl Physiol* 1: 469-489, 1949.
8. **Amberson WR, Mulder AG and Steggerda FR.** Mammalian life without red blood corpuscles. *Science* 106-107, 1933.
9. **American College of Surgeons.** Shock. In: Advanced Trauma Life Support Manual, edited by the American College of Surgeons: 87-107, Chicago, 1997.

10. **Ames A, III, Wright RL, Kowada M, Thurston JM and Majno G.** Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am J Pathol* 52: 437-453, 1968.
11. **Amundson B and Haljamae H.** Skeletal muscle metabolites as possible indicators of imminent death in acute hemorrhage. *Eur Surg Res* 8: 311-320, 1976.
12. **Amundson B, Jennische E and Haljamae H.** Correlative analysis of microcirculatory and cellular metabolic events in skeletal muscle during hemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand* 108: 147-158, 1980.
13. **AuBuchon JP, Birkmeyer JD and Busch MP.** Safety of the blood supply in the United States: opportunities and controversies. *Ann Intern Med* 127: 904-909, 1997.
14. **Baatz H, Steinbauer M, Harris AG and Krombach F.** Kinetics of white blood cell staining by intravascular administration of rhodamine 6G. *Int J Microcirc Clin Exp* 15: 85-91, 1995.
15. **Baez S.** An open cremaster muscle preparation for the study of blood vessels by in vivo microscopy. *Microvasc Res* 5: 384-394, 1973.
16. **Bagge U, Amundson B and Lauritzen C.** White blood cell deformability and plugging of skeletal muscle capillaries in hemorrhagic shock. *Acta Physiol Scand* 108: 159-163, 1980.
17. **Baker CC, Oppenheimer L, Stephens B, Lewis FR and Trunkey DD.** Epidemiology of trauma deaths. *Am J Surg* 140: 144-150, 1980.
18. **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. (Dissertation). Universität Giessen, 1986.
19. **Baldwin AL.** Modified hemoglobins produce venular interendothelial gaps and albumin leakage in the rat mesentery. *Am J Physiol* 277: H650-H659, 1999.

20. **Barber AE and Shires GT.** Shock. In: Principles of Surgery, edited by Schwartz SI, Shires GT and Spencer FC. New York: McGraw-Hill, 1999.
21. **Barroso-Aranda J, Schmid-Schonbein GW, Zweifach BW and Engler RL.** Granulocytes and no-reflow phenomenon in irreversible hemorrhagic shock. *Circ Res* 63: 437-447, 1988.
22. **Baum D, Halter JB, Taborsky GJ, Jr. and Porte D, Jr.** Pentobarbital effects on plasma catecholamines: temperature, heart rate, and blood pressure. *Am J Physiol* 248: E95-100, 1985.
23. **Bayliss W.** Is haemolysed blood toxic? *Br J exp Pathol* 1-8, 1920.
24. **Bickell WH, Wall MJ, Jr., Pepe PE, Martin RR, Ginger VF, Allen MK and Mattox KL.** Immediate versus delayed fluid resuscitation for hypotensive patients with penetrating torso injuries. *N Engl J Med* 331: 1105-1109, 1994.
25. **Blaise G, Guy C, To Q and Sauve R.** Do enflurane and isoflurane interfere with the release, action, or stability of endothelium-derived relaxing factors? *Can J Anaesth* 44: 550-558, 1997.
26. **Blow O, Magliore L, Claridge JA, Butler K and Young JS.** The golden hour and the silver day: detection and correction of occult hypoperfusion within 24 hours improves outcome from major trauma. *J Trauma* 47: 964-969, 1999.
27. **Boczkowski J, Vicaut E and Aubier M.** A preparation for in vivo study of the diaphragmatic microcirculation in the rat. *Microvasc Res* 40: 157-167, 1990.
28. **Botzlar A, Nolte D and Messmer K.** Effects of ultra-purified polymerized bovine hemoglobin on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster. *Eur J Med Res* 1: 471-478, 1996.

29. **Brandt JL, Frank NR and Lichtman HC.** The effects of hemoglobin solutions on renal functions in man. *Blood* 6: 1152-1158, 1951.
30. **Broder G and Weil MH.** Excess lactate: an index of reversibility of shock in human patients. *Science* 143: 1457, 1964.
31. **Burhop KE and Doyle MP.** The Development and Preclinical Testing of a Second-Generation Recombinant Hemoglobin Solution, rHb2.0 for Injection. In: Messmer, K., Burhop KE, and Hutter J. (eds): *Progress in Applied Microcirculation 25: Microcirculatory Effects of Hemoglobin Solutions*: 48-64. Basel, Karger, 2004.
32. **Burton KS.** Cat sartorius muscle: an isolated perfused skeletal muscle preparation for microvascular research. *Microvasc Res* 5: 401-409, 1973.
33. **Cabrales P, Tsai AG and Intaglietta M.** Hyperosmotic-hyperoncotic versus hyperosmotic-hyperviscous: small volume resuscitation in hemorrhagic shock. *Shock* 22: 431-437, 2004.
34. **Capone AC, Safar P, Stezoski W, Tisherman S and Peitzman AB.** Improved outcome with fluid restriction in treatment of uncontrolled hemorrhagic shock. *J Am Coll Surg* 180: 49-56, 1995.
35. **Caron A, Mayer JC, Menu P, Alayash A, Marie PY and Vigneron C.** Measurement of blood volume after haemodilution with haemoglobin-based oxygen carriers by a radiolabelled-albumin method. *Transfus Med* 11: 433-442, 2001.
36. **Chang TM.** "Attempts to find a method to prepare artificial hemoglobin corpuscles". *Biomater Artif Cells Artif Organs* 16: 1-9, 1988.
37. **Chang TM, D'Agnillo F, Yu WP and Razack S.** Two future generations of blood substitutes based on polyhemoglobin-SOD-catalase and nanoencapsulation. *Adv Drug Deliv Rev* 40: 213-218, 2000.

38. **Chappell JE, McBride WJ and Shackford SR.** Diaspirin cross-linked hemoglobin resuscitation improves cerebral perfusion after head injury and shock. *J Trauma* 41: 781-788, 1996.
39. **Cheng DC.** Safety and efficacy of o-raffinose cross-linked human hemoglobin (Hemolink) in cardiac surgery. *Can J Anaesth* 48: S41-S48, 2001.
40. **Cohn SM and Farrell TJ.** Diaspirin cross-linked hemoglobin resuscitation of hemorrhage: comparison of a blood substitute with hypertonic saline and isotonic saline. *J Trauma* 39: 210-216, 1995.
41. **Colantuoni A, Bertuglia S and Intaglietta M.** Effects of anesthesia on the spontaneous activity of the microvasculature. *Int J Microcirc Clin Exp* 3: 13-28, 1984.
42. **Colantuoni A, Bertuglia S and Intaglietta M.** Microvessel diameter changes during hemorrhagic shock in unanesthetized hamsters. *Microvasc Res* 30: 133-142, 1985.
43. **Conklin JL, Murray J, Ledlow A, Clark E, Hayek B, Picken H and Rosenthal G.** Effects of recombinant human hemoglobin on motor functions of the opossum esophagus. *J Pharmacol Exp Ther* 273: 762-767, 1995.
44. **Crippen D, Safar P, Snyder C and Porter L.** Dying pattern in volume-controlled hemorrhagic shock in awake rats. *Resuscitation* 21: 259-270, 1991.
45. **Cullen JJ, Conklin JL, Murray J, Ledlow A and Rosenthal G.** Effects of recombinant human hemoglobin on opossum sphincter of Oddi motor function in vivo and in vitro. *Dig Dis Sci* 41: 289-294, 1996.
46. **Davis JW.** The relationship of base deficit to lactate in porcine hemorrhagic shock and resuscitation. *J Trauma* 36: 168-172, 1994.
47. **Davis JW, Shackford SR and Holbrook TL.** Base deficit as a sensitive indicator of compensated shock and tissue oxygen utilization. *Surg Gynecol Obstet* 173: 473-476, 1991.

48. **Davis JW, Shackford SR, Mackersie RC and Hoyt DB.** Base deficit as a guide to volume resuscitation. *J Trauma* 28: 1464-1467, 1988.
49. **DeAngeles DA, Scott AM, McGrath AM, Korent VA, Rodenkirch LA, Conhaim RL and Harms BA.** Resuscitation from hemorrhagic shock with diaspirin cross-linked hemoglobin, blood, or hetastarch. *J Trauma* 42: 406-412, 1997.
50. **Doherty DH, Doyle MP, Curry SR, Vali RJ, Fattor TJ, Olson JS and Lemon DD.** Rate of reaction with nitric oxide determines the hypertensive effect of cell-free hemoglobin. *Nat Biotechnol* 16: 672-676, 1998.
51. **Doyle MP, Apostol I and Kerwin BA.** Glutaraldehyde modification of recombinant human hemoglobin alters its hemodynamic properties. *J Biol Chem* 274: 2583-2591, 1999.
52. **Duling BR and Berne RM.** Longitudinal gradients in periarteriolar oxygen tension. A possible mechanism for the participation of oxygen in local regulation of blood flow. *Circ Res* 27: 669-678, 1970.
53. **Dull RO, DeWitt BJ, Dinavahi R, Schwartz L, Hubert C, Pace N and Fronticelli C.** Quantitative assessment of hemoglobin-induced endothelial barrier dysfunction. *J Appl Physiol* 97: 1930-1937, 2004.
54. **Dunham CM, Siegel JH, Weireter L, Fabian M, Goodarzi S, Guadalupi P, Gettings L, Linberg SE and Vary TC.** Oxygen debt and metabolic acidemia as quantitative predictors of mortality and the severity of the ischemic insult in hemorrhagic shock. *Crit Care Med* 19: 231-243, 1991.
55. **Dunlap E, Farrell L, Nigro C, Estep T, Marchand G and Burhop K.** Resuscitation with Diaspirin Crosslinked Hemoglobin in a pig model of hemorrhagic shock. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 23: 39-61, 1995.

56. **Eich RF, Li T, Lemon DD, Doherty DH, Curry SR, Aitken JF, Mathews AJ, Johnson KA, Smith RD, Phillips GN, Jr. and Olson JS.** Mechanism of NO-induced oxidation of myoglobin and hemoglobin. *Biochemistry* 35: 6976-6983, 1996.
57. **Endrich B, Asaishi K, Götz A and Messmer K.** Technical report-a new chamber technique for microvascular studies in unanesthetized hamsters. *Res Exp Med (Berl)* 177: 125-134, 1980.
58. **Engler RL, Schmid-Schonbein GW and Pavelec RS.** Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Am J Pathol* 111: 98-111, 1983.
59. **Estep TN, Gonder J, Bornstein I and Aono F.** Immunogenicity of diaspirin cross-linked human hemoglobin solutions. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 20: 603-609, 1992.
60. **Faber JE.** In situ analysis of alpha-adrenoceptors on arteriolar and venular smooth muscle in rat skeletal muscle microcirculation. *Circ Res* 62: 37-50, 1988.
61. **Franke N and Endrich B.** [Effects of halothane and enflurane on the microcirculation]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 18: 285-290, 1983.
62. **Franke N, Endrich B, Laubenthal H, Peter K and Messmer K.** [The effect of pentobarbital on the microcirculation of skeletal muscles and the subcutis. An animal-experimental study]. *Anasth Intensivther Notfallmed* 17: 11-14, 1982.
63. **Friesenecker B, Tsai AG and Instaglietta M.** Capillary perfusion during ischemia-reperfusion in subcutaneous connective tissue and skin muscle. *Am J Physiol* 267: H2204-H2212, 1994.
64. **Fronek K and Zweifach BW.** Microvascular blood flow in cat tenuissimus muscle. *Microvasc Res* 14: 181-189, 1977.

65. **Funk W, Endrich B, Messmer K and Intaglietta M.** Spontaneous arteriolar vasomotion as a determinant of peripheral vascular resistance. *Int J Microcirc Clin Exp* 2: 11-25, 1983.
66. **Funk W and Messmer K.** Topography and Morphometry of the microcirculation in the hamster skin fold. *Int J Microcirc Clin Exp* 5: 89, 1986.
67. **Gladwin MT, Lancaster JR, Jr., Freeman BA and Schechter AN.** Nitric oxide's reactions with hemoglobin: a view through the SNO-storm. *Nat Med* 9: 496-500, 2003.
68. **Goodnough LT, Brecher ME, Kanter MH and AuBuchon JP.** Transfusion medicine. First of two parts--blood transfusion. *N Engl J Med* 340: 438-447, 1999.
69. **Gow AJ and Stamler JS.** Reactions between nitric oxide and haemoglobin under physiological conditions. *Nature* 391: 169-173, 1998.
70. **Griffiths E, Cortes A, Gilbert N, Stevenson P, MacDonald S and Pepper D.** Haemoglobin-based blood substitutes and sepsis. *Lancet* 345: 158-160, 1995.
71. **Gross SS.** Vascular biology. Targeted delivery of nitric oxide. *Nature* 409: 577-578, 2001.
72. **Gulati A and Sen AP.** Dose-dependent effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on regional blood circulation of severely hemorrhaged rats. *Shock* 9: 65-73, 1998.
73. **Guyton AC and Cowell JW.** Dynamics of the heart in shock. *Fed Proc* 20 (Suppl 9): 51-60, 1961.
74. **Habler O, Kleen M, Pape A, Meisner F, Kemming G and Messmer K.** Diaspirin-crosslinked hemoglobin reduces mortality of severe hemorrhagic shock in pigs with critical coronary stenosis. *Crit Care Med* 28: 1889-1898, 2000.
75. **Haljamae H.** Microcirculation and hemorrhagic shock. *Am J Emerg Med* 2: 100-107, 1984.

76. **Harris AG, Hecht R, Peer F, Nolte D and Messmer K.** An improved intravital microscopy system. *Int J Microcirc Clin Exp* 17: 322-327, 1997.
77. **Harris AG and Skalak TC.** Effects of leukocyte capillary plugging in skeletal muscle ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 271: H2653-H2660, 1996.
78. **Hayes JK, Stanley TH, Lind GH, East K, Smith B and Kessler K.** A double-blind study to evaluate the safety of recombinant human hemoglobin in surgical patients during general anesthesia. *J Cardiothorac Vasc Anesth* 15: 593-602, 2001.
79. **Heckbert SR, Vedder NB, Hoffman W, Winn RK, Hudson LD, Jurkovich GJ, Copass MK, Harlan JM, Rice CL and Maier RV.** Outcome after hemorrhagic shock in trauma patients. *J Trauma* 45: 545-549, 1998.
80. **Henrich HN and Hecke A.** A gracilis muscle preparation for quantitative microcirculatory studies in the rat. *Microvasc Res* 15: 349-356, 1978.
81. **Hess JR, Fadare SO, Tolentino LS, Bangal NR and Winslow RM.** The intravascular persistence of crosslinked human hemoglobin. *Prog Clin Biol Res* 319:351-7; discussion 358-60.: 351-357, 1989.
82. **Hess JR, MacDonald VW and Brinkley WW.** Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol* 74: 1769-1778, 1993.
83. **Heyland DK, Cook DJ, King D, Kernerman P and Brun-Buisson C.** Maximizing oxygen delivery in critically ill patients: a methodologic appraisal of the evidence. *Crit Care Med* 24: 517-524, 1996.
84. **Heymann MA, Payne BD, Hoffman JI and Rudolph AM.** Blood flow measurements with radionuclide-labeled particles. *Prog Cardiovasc Dis* 20: 55-79, 1977.
85. **Hoffman JI, Heymann MA, Rudolph AM and Payne BD.** Uses and abuses of the radioactive microsphere method of measuring regional blood flow. *Bibl Anat* 20-23, 1977.

86. **Huang KT, Han TH, Hyduke DR, Vaughn MW, Van Herle H, Hein TW, Zhang C, Kuo L and Liao JC.** Modulation of nitric oxide bioavailability by erythrocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 11771-11776, 2001.
87. **Huckabee WE.** Abnormal resting blood lactate: I Significance of hyperlactemia in hospitalized patients; II Lactic acidosis. *Am J Med* 30: 836-848, 1961.
88. **Hutchins PM, Goldstone J and Wells R.** Effects of hemorrhagic shock on the microvasculature of skeletal muscle. *Microvasc Res* 5: 131-140, 1973.
89. **Hutter, J, Sinitsina, I, Hermann, J, and Messmer, K.** Total Blood Exchange with Diaspirin Cross-Linked Hemoglobin Is Compatible with Long-Term Survival. In: Messmer, K., Burhop KE, and Hutter, J. (eds): *Progress in Applied Microcirculation 25: Microcirculatory Effects of Hemoglobin Solutions*: 39-47. Basel, Karger, 2004.
90. **Intaglietta M, Johnson PC and Winslow RM.** Microvascular and tissue oxygen distribution. *Cardiovasc Res* 32: 632-643, 1996.
91. **Jia L, Bonaventura C, Bonaventura J and Stamler JS.** S-nitrosohaemoglobin: a dynamic activity of blood involved in vascular control. *Nature* 380: 221-226, 1996.
92. **Kavdia M, Tsoukias NM and Popel AS.** Model of nitric oxide diffusion in an arteriole: impact of hemoglobin-based blood substitutes. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 282: H2245-H2253, 2002.
93. **Kerger H, Saltzman DJ, Menger MD, Messmer K and Intaglietta M.** Systemic and subcutaneous microvascular pO₂ dissociation during 4-h hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am J Physiol* 270: H827-H836, 1996.
94. **Kerger H, Tsai AG, Saltzman DJ, Winslow RM and Intaglietta M.** Fluid resuscitation with O₂ vs. non-O₂ carriers after 2 h of hemorrhagic shock in conscious hamsters. *Am J Physiol* 272: H525-H537, 1997.

95. **Kerger H, Waschke KF, Ackern KV, Tsai AG and Intaglietta M.** Systemic and microcirculatory effects of autologous whole blood resuscitation in severe hemorrhagic shock. *Am J Physiol* 276: H2035-H2043, 1999.
96. **Kerner T, Ahlers O, Veit S, Riou B, Saunders M and Pison U.** DCL-Hb for trauma patients with severe hemorrhagic shock: the European "On-Scene" Multicenter Study. *Intensive Care Med* 29: 378-385, 2003.
97. **Kessler P, Kronemann N, Hecker M, Busse R and Schini-Kerth VB.** Effects of barbiturates on the expression of the inducible nitric oxide synthase in vascular smooth muscle. *J Cardiovasc Pharmacol* 30: 802-810, 1997.
98. **Klyszcz T, Jünger M, Jung F and Zeintl H.** Cap image-ein neuartiges computerunterstütztes Videobildanalysesystem für die dynamische Kapillarmikroskopie. *Biomed Tech (Berl)* 42: 168-175, 1997.
99. **Kowalenko T, Stern S, Dronen S and Wang X.** Improved outcome with hypotensive resuscitation of uncontrolled hemorrhagic shock in a swine model. *J Trauma* 33: 349-353, 1992.
100. **Kreimeier U and Messmer K.** Prähospitaler Flüssigkeitstherapie. *Anaesthesist* 884-899, 1996.
101. **Kreimeier U and Messmer K.** Small-volume resuscitation: from experimental evidence to clinical routine. Advantages and disadvantages of hypertonic solutions. *Acta Anaesthesiol Scand* 46: 625-638, 2002.
102. **Kreuzer F. and Yahr WZ.** Influence of red cell membranes on diffusion of oxygen. *J Appl Physiol* 15 (6): 1117-1122, 1960.
103. **Krogh A.** The Anatomy and Physiology of Capillaries. New York, Hafner, 1959.

104. **Lamson P.D. and De Turk W.E.** Studies on shock induced by haemorrhage. XI A method of the accurate control of blood pressure. *J Pharmacol Exp Ther* 250-252, 1945.
105. **Lamy ML, Daily EK, Brichant JF, Larbuisson RP, Demeyere RH, Vandermeersch EA, Lehot JJ, Parsloe MR, Berridge JC, Sinclair CJ, Baron JF and Przybelski RJ.** 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.
106. **Lawrence MB and Springer TA.** Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell* 65: 859-873, 1991.
107. **Lee R, Neya K, Svizzero TA and Vlahakes GJ.** Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J Appl Physiol* 79: 236-242, 1995.
108. **Leech CJ and Faber JE.** Differential sensitivity of venular and arteriolar alpha-adrenergic receptor constriction to inhibition by hypoxia. Role of receptor subtype and coupling heterogeneity. *Circ Res* 78: 1064-1074, 1996.
109. **Lefer AM and Lefer DJ.** The role of nitric oxide and cell adhesion molecules on the microcirculation in ischaemia-reperfusion. *Cardiovasc Res* 32: 743-751, 1996.
110. **Liao JC, Hein TW, Vaughn MW, Huang KT and Kuo L.** Intravascular flow decreases erythrocyte consumption of nitric oxide. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96: 8757-8761, 1999.
111. **Lieberman JA, Weiskopf RB, Kelley SD, Feiner J, Noorani M, Leung J, Toy P and Viele M.** Critical oxygen delivery in conscious humans is less than 7.3 ml O₂ x kg⁽⁻¹⁾ x min⁽⁻¹⁾. *Anesthesiology* 92: 407-413, 2000.
112. **Lindbom L, Mirhashemi S, Intaglietta M and Arfors KE.** Increase in capillary blood flow and relative haematocrit in rabbit skeletal muscle following acute normovolaemic anaemia. *Acta Physiol Scand* 134: 503-512, 1988.

113. **Lindbom L, Tuma R, Rutili G and Arfors KE.** Microvascular response of the tenuissimus muscle to manipulative trauma. *Bibl Anat* 506-507, 1977.
114. **Lindbom L, Tuma RF and Arfors KE.** Influence of oxygen on perfused capillary density and capillary red cell velocity in rabbit skeletal muscle. *Microvasc Res* 19: 197-208, 1980.
115. **Lindbom L, Tuma RF and Arfors KE.** Blood flow in the rabbit tenuissimus muscle. Influence of preparative procedures for intravital microscopic observation. *Acta Physiol Scand* 114: 121-127, 1982.
116. **Linden JV, Tourault MA and Scribner CL.** Decrease in frequency of transfusion fatalities. *Transfusion* 37: 243-244, 1997.
117. **Lipowsky HH and Firrell JC.** Microvascular hemodynamics during systemic hemodilution and hemoconcentration. *Am J Physiol* 250: H908-H922, 1986.
118. **Little RA.** 1988 Fitts lecture: heart rate changes after haemorrhage and injury--a reappraisal. *J Trauma* 29: 903-906, 1989.
119. **Liu X, Miller MJ, Joshi MS, Sadowska-Krowicka H, Clark DA and Lancaster JR, Jr.** Diffusion-limited reaction of free nitric oxide with erythrocytes. *J Biol Chem* 273: 18709-18713, 1998.
120. **Loeb A, McIntosh LJ, Raj NR and Longnecker D.** Regional vascular effects of rHb1.1, a hemoglobin-based oxygen carrier. *J Cardiovasc Pharmacol* 30: 703-710, 1997.
121. **Loeb AL, Godeny I and Longnecker DE.** Anesthetics alter relative contributions of NO and EDHF in rat cremaster muscle microcirculation. *Am J Physiol* 273: H618-H627, 1997.
122. **Loeb AL, McIntosh LJ, Raj NR and Longnecker DE.** Resuscitation after hemorrhage using recombinant human hemoglobin (rHb1.1) in rats: effects on nitric oxide and prostanoid systems. *Crit Care Med* 26: 1071-1080, 1998.

123. **Looker D, Abbott-Brown D, Cozart P, Durfee S, Hoffman S, Mathews AJ, Miller-Roehrich J, Shoemaker S, Trimble S, Fermi G and .** A human recombinant haemoglobin designed for use as a blood substitute. *Nature* 356: 258-260, 1992.
124. **Malhotra AK, Kelly ME, Miller PR, Hartman JC, Fabian TC and Proctor KG.** Resuscitation with a novel hemoglobin-based oxygen carrier in a Swine model of uncontrolled perioperative hemorrhage. *J Trauma* 54: 915-924, 2003.
125. **Manikis P, Jankowski S, Zhang H, Kahn RJ and Vincent JL.** Correlation of serial blood lactate levels to organ failure and mortality after trauma. *Am J Emerg Med* 13: 619-622, 1995.
126. **Martin RR, Bickell WH, Pepe PE, Burch JM and Mattox KL.** Prospective evaluation of preoperative fluid resuscitation in hypotensive patients with penetrating truncal injury: a preliminary report. *J Trauma* 33: 354-361, 1992.
127. **Matheson B, Kwansa HE, Bucci E, Rebel A and Koehler RC.** Vascular response to infusions of a nonextravasating hemoglobin polymer. *J Appl Physiol* 93: 1479-1486, 2002.
128. **Matsukawa K, Ninomiya I and Nishiura N.** Effects of anesthesia on cardiac and renal sympathetic nerve activities and plasma catecholamines. *Am J Physiol* 265: R792-R797, 1993.
129. **Matsushita M, Yabuki A, Malchesky PS, Harasaki H and Nose Y.** In vivo evaluation of a pyridoxylated-hemoglobin-polyoxyethylene conjugate. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 16: 247-260, 1988.
130. **Mazzoni MC, Borgström P, Intaglietta M and Arfors KE.** Luminal narrowing and endothelial cell swelling in skeletal muscle capillaries during hemorrhagic shock. *Circ Shock* 29: 27-39, 1989.

131. **McCarthy MR, Vandegriff KD and Winslow RM.** The role of facilitated diffusion in oxygen transport by cell-free hemoglobins: implications for the design of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biophys Chem* 92: 103-117, 2001.
132. **McCord JM.** Oxygen-derived free radicals in postischemic tissue injury. *N Engl J Med* 312: 159-163, 1985.
133. **McGillivray-Anderson KM and Faber JE.** Effect of acidosis on contraction of microvascular smooth muscle by alpha 1- and alpha 2-adrenoceptors. Implications for neural and metabolic regulation. *Circ Res* 66: 1643-1657, 1990.
134. **Meier J, Kemming G, Meisner F, Pape A and Habler O.** Hyperoxic ventilation enables hemodilution beyond the critical myocardial hemoglobin concentration. *Eur J Med Res* 10: 462-468, 2005.
135. **Meisner FG, Kemming GI, Habler OP, Kleen MS, Tillmanns JH, Hutter JW, Bottino DA, Thein E, Meier JM, Wojtczyk CJ, Pape A and Messmer K.** Diaspirin crosslinked hemoglobin enables extreme hemodilution beyond the critical hematocrit. *Crit Care Med* 29: 829-838, 2001.
136. **Menger MD, Laschke MW and Vollmar B.** Viewing the Microcirculation through the Window: Some Twenty Years Experience with the Hamster Dorsal Skinfold Chamber. *Eur Surg Res* 34: 83-91, 2002.
137. **Menger MD, Rücker M and Vollmar B.** Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock* 8: 2-7, 1997.
138. **Menger MD and Vollmar B.** In vivo analysis of microvascular reperfusion injury in striated muscle and skin. *Microsurgery* 15: 383-389, 1994.
139. **Messmer K and Frey L.** Schock und Traumareaktion. In: Siewert JR. (Hrsg.): Chirurgie: 129-116. Berlin, Springer, 2001.

140. **Messmer K, Lewis DH, Sunder-Plassmann L, Klövekorn WP, Mendler N and Holper K.** Acute normovolemic hemodilution. Changes of central hemodynamics and microcirculatory flow in skeletal muscle. *Eur Surg Res* 4: 55-70, 1972.
141. **Messmer K, Sunder-Plassmann L, Klövekorn WP and Holper K.** Circulatory significance of hemodilution: Rheological changes and limitations. *Adv Microcirc* 4: 1-44, 1972.
142. **Mileski WJ, Winn RK, Vedder NB, Pohlman TH, Harlan JM and Rice CL.** Inhibition of CD18-dependent neutrophil adherence reduces organ injury after hemorrhagic shock in primates. *Surgery* 108: 206-212, 1990.
143. **Miller JH and McDonald RK.** The effect of hemoglobin on renal function in the human. *J Clin Invest* 30: 1033-1040, 1951.
144. **Mirhashemi S, Breit GA, Chavez-Chavez RH and Intaglietta M.** Effects of hemodilution on skin microcirculation. *Am J Physiol* 254: H411-H416, 1988.
145. **Mirhashemi S, Ertefai S, Messmer K and Intaglietta M.** Model analysis of the enhancement of tissue oxygenation by hemodilution due to increased microvascular flow velocity. *Microvasc Res* 34: 290-301, 1987.
146. **Moore FA, Moore EE and Sauaia A.** Blood transfusion. An independent risk factor for postinjury multiple organ failure. *Arch Surg* 132: 620-624, 1997.
147. **Moss GS, Gould SA, Sehgal LR, Sehgal HL and Rosen AL.** Hemoglobin solution--from tetramer to polymer. *Surgery* 95: 249-255, 1984.
148. **Murray JA, Ledlow A, Launspach J, Evans D, Loveday M and Conklin JL.** The effects of recombinant human hemoglobin on esophageal motor functions in humans. *Gastroenterology* 109: 1241-1248, 1995.

149. **Ness PM, Shirey RS, Thoman SK and Buck SA.** The differentiation of delayed serologic and delayed hemolytic transfusion reactions: incidence, long-term serologic findings, and clinical significance. *Transfusion* 30: 688-693, 1990.
150. **Nolte D, Botzlar A, Pickelmann S, Bouskela E and Messmer K.** Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med* 130: 314-327, 1997.
151. **Nolte D, Schmid P, Jager U, Botzlar A, Roesken F, Hecht R, Uhl E, Messmer K and Vestweber D.** Leukocyte rolling in venules of striated muscle and skin is mediated by P-selectin, not by L-selectin. *Am J Physiol* 267: H1637-H1642, 1994.
152. **Nolte D, Steinhauser P, Pickelmann S, Berger S, Härtl R and Messmer K.** Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on local tissue oxygen tension in striated skin muscle: an efficacy study in the hamster. *J Lab Clin Med* 130: 328-338, 1997.
153. **O'Hara JF, Jr., Colburn WA, Tetzlaff JE, Novick AC, Angermeier KW and Schubert A.** Hemoglobin and methemoglobin concentrations after large-dose infusions of diaspirin cross-linked hemoglobin. *Anesth Analg* 92: 44-48, 2001.
154. **Oda H, Kusumoto S and Nakajima T.** Nitrosyl-hemoglobin formation in the blood of animals exposed to nitric oxide. *Arch Environ Health* 30: 453-456, 1975.
155. **Opelz G, Vanrenterghem Y, Kirste G, Gray DW, Horsburgh T, Lachance JG, Largiader F, Lange H, Vujaklija-Stipanovic K, Alvarez-Grande J, Schott W, Hoyer J, Schnuelle P, Descoedres C, Ruder H, Wujciak T and Schwarz V.** Prospective evaluation of pretransplant blood transfusions in cadaver kidney recipients. *Transplantation* 63: 964-967, 1997.
156. **Peitzman AB, Billiar TR, Harbrecht BG, Kelly E, Udekwu AO and Simmons RL.** Hemorrhagic shock. *Curr Probl Surg* 32: 925-1002, 1995.

157. **Pemberton M, Anderson G and Barker J.** In vivo microscopy of microcirculatory injury in skeletal muscle following ischemia/reperfusion. *Microsurgery* 15: 374-382, 1994.
158. **Penning LC and Dubbelman TM.** Fundamentals of photodynamic therapy: cellular and biochemical aspects. *Anticancer Drugs* 5: 139-146, 1994.
159. **Popovsky MA and Moore SB.** Diagnostic and pathogenetic considerations in transfusion-related acute lung injury. *Transfusion* 25: 573-577, 1985.
160. **Porter JM and Ivatury RR.** In search of the optimal end points of resuscitation in trauma patients: a review. *J Trauma* 44: 908-914, 1998.
161. **Powell CC, Schultz SC and Malcolm DS.** Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb): more effective than lactated Ringer's solution in restoring central venous oxygen saturation after hemorrhagic shock in rats. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 24: 197-200, 1996.
162. **Przybelski RJ, Daily EK, Kisicki JC, Mattia-Goldberg C, Bounds MJ and Colburn WA.** Phase I study of the safety and pharmacologic effects of diaspirin cross-linked hemoglobin solution. *Crit Care Med* 24: 1993-2000, 1996.
163. **Przybelski RJ, Daily EK, Micheels J, Sloan E, Mols P, Corne L, Koenigsberg MD, Bickell WH, Thompson DR, Harviel JD and Cohn SM.** A safety assessment of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of hemorrhagic, hypovolemic shock. *Prehospital Disaster Med* 14: 251-264, 1999.
164. **Przybelski RJ, Malcolm DS, Burris DG and Winslow RM.** Cross-linked hemoglobin solution as a resuscitative fluid after hemorrhage in the rat. *J Lab Clin Med* 117: 143-151, 1991.
165. **Raat NJ, Liu JF, Doyle MP, Burhop KE, Klein J and Ince C.** Effects of recombinant-hemoglobin solutions rHb2.0 and rHb1.1 on blood pressure, intestinal blood flow, and gut oxygenation in a rat model of hemorrhagic shock. *J Lab Clin Med* 145: 21-32, 2005.

166. **Rabiner SF, Helbert JR, Lopas H and Friedman LH.** Evaluation of a stroma-free hemoglobin solution for use as a plasma expander. *J Exp Med* 126: 1127-1142, 1967.
167. **Rabinovici R, Rudolph AS and Feuerstein G.** 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.
168. **Rattan S, Rosenthal GJ and Chakder S.** Human recombinant hemoglobin (rHb1.1) inhibits nonadrenergic noncholinergic (NANC) nerve-mediated relaxation of internal anal sphincter. *J Pharmacol Exp Ther* 272: 1211-1216, 1995.
169. **Reah G, Bodenham AR, Mallick A, Daily EK and Przybelski RJ.** Initial evaluation of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) as a vasopressor in critically ill patients. *Crit Care Med* 25: 1480-1488, 1997.
170. **Resta TC, Walker BR, Eichinger MR and Doyle MP.** Rate of NO scavenging alters effects of recombinant hemoglobin solutions on pulmonary vasoreactivity. *J Appl Physiol* 93: 1327-1336, 2002.
171. **Revell M, Greaves I and Porter K.** Endpoints for fluid resuscitation in hemorrhagic shock. *J Trauma* 54: S63-S67, 2003.
172. **Rhee P, Morris J, Durham R, Hauser C, Cipolle M, Wilson R, Luchette F, McSwain N and Miller R.** Recombinant humanized monoclonal antibody against CD18 (rhuMAb CD18) in traumatic hemorrhagic shock: results of a phase II clinical trial. Traumatic Shock Group. *J Trauma* 49: 611-619, 2000.
173. **Riou B, Landais P, Vivien B, Stell P, Labbene I and Carli P.** Distribution of the probability of survival is a strategic issue for randomized trials in critically ill patients. *Anesthesiology* 95: 56-63, 2001.

174. **Rioux F, Drapeau G and Marceau F.** Recombinant human hemoglobin (rHb1.1) selectively inhibits vasorelaxation elicited by nitric oxide donors in rabbit isolated aortic rings. *J Cardiovasc Pharmacol* 25: 587-594, 1995.
175. **Rixen D, Raum M, Holzgraefe B, Sauerland S, Nagelschmidt M and Neugebauer EA.** A pig hemorrhagic shock model: oxygen debt and metabolic acidemia as indicators of severity. *Shock* 16: 239-244, 2001.
176. **Roberts I, Evans P, Bunn F, Kwan I and Crowhurst E.** Is the normalisation of blood pressure in bleeding trauma patients harmful? *Lancet* 357: 385-387, 2001.
177. **Ruotsalainen U, Raitakari M, Nuutila P, Oikonen V, Sipila H, Teras M, Knuuti MJ, Bloomfield PM and Iida H.** Quantitative blood flow measurement of skeletal muscle using oxygen-15-water and PET. *J Nucl Med* 38: 314-319, 1997.
178. **Rutherford EJ, Morris JA, Jr., Reed GW and Hall KS.** Base deficit stratifies mortality and determines therapy. *J Trauma* 33: 417-423, 1992.
179. **Sakai H, Hara H, Tsai AG, Tsuchida E, Johnson PC and Intaglietta M.** Changes in resistance vessels during hemorrhagic shock and resuscitation in conscious hamster model. *Am J Physiol* 276: H563-H571, 1999.
180. **Sakai H, Hara H, Yuasa M, Tsai AG, Takeoka S, Tsuchida E and Intaglietta M.** Molecular dimensions of Hb-based O₂ carriers determine constriction of resistance arteries and hypertension. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279: H908-H915, 2000.
181. **Savitsky JP, Doczi J, Black J and Arnold JD.** A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther* 23: 73-80, 1978.
182. **Saxena R, Wijnhoud AD, Carton H, Hacke W, Kaste M, Przybelski RJ, Stern KN and Koudstaal PJ.** Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier, DCLHb, in acute ischemic stroke. *Stroke* 30: 993-996, 1999.

183. **Scalea TM, Maltz S, Yelon J, Trooskin SZ, Duncan AO and Sclafani SJ.** Resuscitation of multiple trauma and head injury: role of crystalloid fluids and inotropes. *Crit Care Med* 22: 1610-1615, 1994.
184. **Schmid-Schönbein GW.** Capillary plugging by granulocytes and the no-reflow phenomenon in the microcirculation. *Fed Proc* 46: 2397-2401, 1987.
185. **Schultz SC, Hamilton IN, Jr. and Malcolm DS.** Use of base deficit to compare resuscitation with lactated Ringer's solution, Haemaccel, whole blood, and diaspirin cross-linked hemoglobin following hemorrhage in rats. *J Trauma* 35: 619-625, 1993.
186. **Sewell IA.** Studies of the microcirculation using transparent tissue observation chambers inserted in the hamster cheek pouch. *J Anat* 100: 839-856, 1966.
187. **Shah NS, Kelly E, Billiar TR, Marshall HM, Harbrecht BG, Udekwu AO and Peitzman AB.** Utility of clinical parameters of tissue oxygenation in a quantitative model of irreversible hemorrhagic shock. *Shock* 10: 343-346, 1998.
188. **Siegel JH, Fabian M, Smith JA and Costantino D.** Use of recombinant hemoglobin solution in reversing lethal hemorrhagic hypovolemic oxygen debt shock. *J Trauma* 42: 199-212, 1997.
189. **Siegel JH, Rivkind AI, Dalal S and Goodarzi S.** Early physiologic predictors of injury severity and death in blunt multiple trauma. *Arch Surg* 125: 498-508, 1990.
190. **Sillerud LO, Caprihan A, Berton N and Rosenthal GJ.** Efficacy of recombinant human Hb by ³¹P-NMR during isovolemic total exchange transfusion. *J Appl Physiol* 86: 887-894, 1999.
191. **Singel DJ and Stamler JS.** Blood traffic control. *Nature* 430: 297, 2004.
192. **Skornik WA and Brain JD.** Breathing and lung mechanics in hamsters: effect of pentobarbital anesthesia. *J Appl Physiol* 68: 2536-2541, 1990.

193. **Sloan EP, Koenigsberg M, Brunett PH, Bynoe RP, Morris JA, Tinkoff G, Dalsey WC and Ochsner MG.** 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.
194. **Smits GJ, Roman RJ and Lombard JH.** Evaluation of laser-Doppler flowmetry as a measure of tissue blood flow. *J Appl Physiol* 61: 666-672, 1986.
195. **Sprung J, Kindscher JD, Wahr JA, Levy JH, Monk TG, Moritz MW and O'Hara PJ.** The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Anesth Analg* 94: 799-808, table, 2002.
196. **Stamler JS, Jia L, Eu JP, McMahon TJ, Demchenko IT, Bonaventura J, Gernert K and Piantadosi CA.** Blood flow regulation by S-nitrosohemoglobin in the physiological oxygen gradient. *Science* 276: 2034-2037, 1997.
197. **Steinbauer M, Harris AG, Abels C and Messmer K.** Characterization and prevention of phototoxic effects in intravital fluorescence microscopy in the hamster dorsal skinfold model. *Langenbecks Arch Surg* 385: 290-298, 2000.
198. **Steinbauer M, Harris AG, Leiderer R, Abels C and Messmer K.** Impact of dextran on microvascular disturbances and tissue injury following ischemia/reperfusion in striated muscle. *Shock* 9: 345-351, 1998.
199. **Steinbauer M, Harris AG and Messmer K.** Effects of dextran on microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle. *Am J Physiol* 272: H1710-H1716, 1997.
200. **Thompson A, McGarry AE, Valeri CR and Lieberthal W.** Stroma-free hemoglobin increases blood pressure and GFR in the hypotensive rat: role of nitric oxide. *J Appl Physiol* 77: 2348-2354, 1994.
201. **Torres F, I, Kerger H and Intaglietta M.** pO₂ measurements in arteriolar networks. *Microvasc Res* 51: 202-212, 1996.

202. **Tsai AG, Friesenecker B, McCarthy M, Sakai H and Intaglietta M.** Plasma viscosity regulates capillary perfusion during extreme hemodilution in hamster skinfold model. *Am J Physiol* 275: H2170-H2180, 1998.
203. **Tsai AG and Intaglietta M.** High viscosity plasma expanders: Volume restitution fluids for lowering the transfusion trigger. *Biorheology* 38: 229-237, 2001.
204. **Urbaitis BK, Razynska A, Corteza Q, Fronticelli C and Bucci E.** Intravascular retention and renal handling of purified natural and intramolecularly cross-linked hemoglobins. *J Lab Clin Med* 117: 115-121, 1991.
205. **Vamvakas EC.** Epidemiology of red blood cell utilization. *Transfus Med Rev* 10: 44-61, 1996.
206. **Vamvakas EC, Carven JH and Hibberd PL.** Blood transfusion and infection after colorectal cancer surgery. *Transfusion* 36: 1000-1008, 1996.
207. **Vamvakas EC and Taswell HF.** Epidemiology of blood transfusion. *Transfusion* 34: 464-470, 1994.
208. **Vandegriff KD, Medina F, Marini MA and Winslow RM.** 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.
209. **Vatner SF.** Effects of anesthesia on cardiovascular control mechanisms. *Environ Health Perspect* 26: 193-206, 1978.
210. **Vaughn MW, Huang KT, Kuo L and Liao JC.** Erythrocytes possess an intrinsic barrier to nitric oxide consumption. *J Biol Chem* 275: 2342-2348, 2000.
211. **Vaughn MW, Huang KT, Kuo L and Liao JC.** Erythrocyte consumption of nitric oxide: competition experiment and model analysis. *Nitric Oxide* 5: 18-31, 2001.

212. **Velmahos GC, Demetriades D, Shoemaker WC, Chan LS, Tatevossian R, Wo CC, Vassiliu P, Cornwell EE, III, Murray JA, Roth B, Belzberg H, Asensio JA and Berne TV.** Endpoints of resuscitation of critically injured patients: normal or supranormal? A prospective randomized trial. *Ann Surg* 232: 409-418, 2000.
213. **Viele MK, Weiskopf RB and Fisher D.** Recombinant human hemoglobin does not affect renal function in humans: analysis of safety and pharmacokinetics. *Anesthesiology* 86: 848-858, 1997.
214. **Vincent JL, Dufaye P, Berre J, Leeman M, Degaute JP and Kahn RJ.** Serial lactate determinations during circulatory shock. *Crit Care Med* 11: 449-451, 1983.
215. **von Dobschütz E, Hutter J, Hoffmann T and Messmer K.** Recombinant human hemoglobin with reduced nitric oxide-scavenging capacity restores effectively pancreatic microcirculatory disorders in hemorrhagic shock. *Anesthesiology* 100: 1484-1490, 2004.
216. **Wadstrom J, Lindbom L, Wik O and Gerdin B.** An in vivo method for studies of traumatic vasospasm. *Microsurgery* 11: 197-203, 1990.
217. **Walder JA, Zaugg RH, Walder RY, Steele JM and Klotz IM.** Diaspirins that cross-link beta chains of hemoglobin: bis(3,5-dibromosalicyl) succinate and bis(3,5-dibromosalicyl) fumarate. *Biochemistry* 18: 4265-4270, 1979.
218. **Welbourn CR, Goldman G, Paterson IS, Valeri CR, Shepro D and Hechtman HB.** Pathophysiology of ischaemia reperfusion injury: central role of the neutrophil. *Br J Surg* 78: 651-655, 1991.
219. **Westenberger U, Thanner S, Ruf HH, Gersonde K, Sutter G and Trentz O.** Formation of free radicals and nitric oxide derivative of hemoglobin in rats during shock syndrome. *Free Radic Res Commun* 11: 167-178, 1990.
220. **Wiggers C.J.** Physiology of Shock. New York: Commonwealth Fund, 1950, p. 121-146.

221. **Williams DA and Segal SS.** Feed artery role in blood flow control to rat hindlimb skeletal muscles. *J Physiol* 463:631-46.: 631-646, 1993.
222. **Winslow RM.** alphaalpha-crosslinked hemoglobin: was failure predicted by preclinical testing? *Vox Sang* 79: 1-20, 2000.
223. **Yakushiji T, Nakamura K, Hatano Y and Mori K.** Comparison of the vasodilator effects of thiopentone and pentobarbitone. *Can J Anaesth* 39: 604-609, 1992.
224. **Zuckerman SH, Evans GF and Bryan N.** Interactions of recombinant hemoglobin (rHb1.1) and endotoxin in vivo: effects on systemic tumor necrosis factor and interleukin-6 levels in lethal and sublethal murine models of endotoxemia. *J Lab Clin Med* 130: 427-435, 1997.
225. **Zweifach BW and Metz DB.** Selective distribution of blood through the terminal vascular bed of mesenteric structures and skeletal muscle. *Angiology* 6: 282-290, 1955.

8 Lebenslauf

Jörg Wolfgang Hermann

Geburtsdatum / -ort:	25. Juli 1976, Kaiserslautern
Eltern:	Dr. Heinz Wolfgang Hermann, Physiker Helge Hermann, Lehrerin
Schulbildung:	1982 – 1984 Grundschule Theodor Heuss, Kaiserslautern 1984 – 1986 Grundschule Inning 1986 – 1995 Rhabanus-Maurus-Gymnasium St. Ottilien Abschluss: Abitur am 30. Juni 1995
Wehrersatzdienst:	1995/96 Rettungsdienst beim BRK Landsberg
Studium:	1996 – 2003 Humanmedizin an der LMU München Abschluss 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung am 10. Juni 2003 Teilapprobation am 10. Juni 2003 Approbation am 1. Oktober 2004
Berufstätigkeit:	seit 10/2003 Arzt im Praktikum an der Klinik für Anästhesiologie der LMU München seit 10/2004 Assistenzarzt an der Klinik für Anästhesiologie der LMU München

Veröffentlichungen:

Abstracts:

Hutter J, Hermann J, Juri G, Messmer K. Progress in blood substitute research: Recombinant human hemoglobin with reduced NO scavenging capacity. *Eur Surg Res* 34:378-388, 2002.

Hutter J, Hermann J, Juri G, Messmer K. Topload infusion of a recombinant hemoglobin solution: no adverse effects on the microcirculation. *J Vasc Res* 39 (suppl. 1): 55, 2002.

Originalia:

Hutter J, Juri G, Hermann J, Messmer K. Hemodilution with a novel recombinant human hemoglobin solution does not elicit disturbances in the microcirculation. In: Siewert JR, Neugebauer E, Hartel W. (Hrsg.): *Chirurgisches Forum* 31:17-19, Springer, Berlin 2002.

Hutter J, Sinitsina I, Hermann J, Messmer K. Total blood exchange with Diaspirin Cross-linked Hemoglobin is compatible with long-term survival. In: Messmer K, Burhop KE, Hutter J (Eds): Microcirculatory effects of hemoglobin solutions. *Prog Appl Microcirc.* 25: 39-47, Basel, Karger, 2004.

Hutter J, Hermann J, Juri G, Messmer K. Moderate Hemodilution with rHb2.0 for Injection. In: Messmer K, Burhop KE, Hutter J (Eds): Microcirculatory effects of hemoglobin solutions. *Prog Appl Microcirc.* 25: 65-74, Basel, Karger, 2004.

Hermann J, Hutter J, Messmer K. rHb2.0 for Injection for Resuscitation from Hemorrhagic Shock. In: Messmer K, Burhop KE, Hutter J (Eds): Microcirculatory effects of hemoglobin solutions. *Prog Appl Microcirc.* 25: 75-85, Basel, Karger, 2004.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Dr. h. c. mult. Konrad Meßmer danke ich sehr herzlich für die freundliche Aufnahme am Institut für Chirurgische Forschung und für die Überlassung des Themas der Doktorarbeit. Seine kompetente und motivierende Betreuung während der gesamten Studie werden mir stets ein Vorbild sein.

Meinem Betreuer Dr. Jörg Hutter danke ich für die geduldige Unterweisung in den Techniken der Mikrochirurgie und die Unterstützung bei der Etablierung des Protokolles und der Durchführung der Experimente. Seine ständige Hilfsbereitschaft und sein weit überdurchschnittliches Engagement bildeten die Grundlage für die gute und erfolgreiche Realisierung dieser Studie.

Zuletzt gilt mein Dank allen anderen Mitarbeitern des Institutes für Chirurgische Forschung, die durch viele Anregungen und Gespräche zu einer angenehmen und motivierenden Arbeitsatmosphäre beigetragen haben.