ZENTRUM FÜR ANÄSTHESIOLOGIE UND INTENSIVMEDIZIN KLINIK UND POLIKLINIK FÜR ANÄSTHESIOLOGIE UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF DIREKTOR: PROF. DR. MED. ALWIN E. GOETZ

DIE BEEINFLUSSUNG DES REGIONALEN MYOKARDIALEN BLUTFLUSSES AM HERZMUSKEL DURCH DIE PROPHYLAKTISCHE ODER THERAPEUTISCHE GABE DES ZELLFREIEN BLUTERSATZSTOFFES HBOC-200

PROMOTION

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

> KARIM CHAMMAS AUS RAHDEN

> HAMBURG, 2008

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 13.06.2008

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende:	Prof. Dr. Thomas Standl
Prüfungsausschuss: 2. Gutachter:	PD Dr. Tim Strate
Prüfungsausschuss: 3. Gutachter:	PD Dr. André Gottschalk

1. Arbeitshypothese und Fragestellung5
2. Einleitung
2.1. Rückblick62.2. Die Studiensubstanz HBOC-20082.2.1. Substanz82.2.2. Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit HBOC-200/20182.2.3. Stand der Forschung und klinischer Ausblick82.2.4. Hypothese der Arbeit10
3. Material und Methodik11
3.1. Tierschutz 11 3.2. Operativer Versuchsablauf 11 3.2.1. Versuchsgruppen 11 3.2.2. Versuchstiere 12 3.2.2.1. Art. 12 3.2.2.2. Haltung 13 3.2.3. Studienmedikation 13 3.2.4. Narkose und Präparation 15 3.2.5. Intraoperative Messwerte 18 3.2.5.2. Hämodynamik 18 3.2.5.3. Blutgasanalysen, Elektrolyt- und Hämoglobinkonzentrationen 19 3.2.5.4. Körpertemperatur. 20 3.3. Organaufarbeitung 20 3.4. Regionaler myokardialer Blutfluss (RMBF) 21 3.4.1. Messprinzip 21 3.4.2. Messprotokoll 22 3.4.2.1. Messzeitpunkte 22 3.4.2.2. Mikrosphärenvorbereitung, Applikation und Gewinnung 22 3.4.2.3. Gewinnung der Gewebergoben Verarbeitung 22
der Proben
3.5. TTC-Färbung und "Area at Risk"
4. Ergebnisse
 4.1. Intraoperative Messwerte
4.1.3. Blutgasanalyseparameter284.1.4. Elektrolyte und Blutzuckerkonzentrationen284.1.5. Hämoglobinkonzentrationen284.2. "Area at Risk"294.3. Infarktareale304.4. Blutflussmessung mit Mikrosphärentechnik30
4.4.1. Mikropertusion "non Area"

INHALT

5.	Diskussion	33
5	5.1. Mikrozirkulation mittels Mikrosphärentechnik	33
5	5.2. Effekte von HBOC-200 auf das Infarktareal	36
5	5.3. Hämodynamische Wirkungen und Nebenwirkungen von HBOC	38
	5.3.1. Hämodynamik	38
	5.3.2. Kardiale Effekte	39
	5.3.3. Methämoglobin	39
5	5.4. Methodenkritik	40
	5.4.1. Tiespezies	40
	5.4.2. Ischämie und Reperfusionszeit	41
	5.4.3. "Area at Risk" und Infarktareale	41
	5.4.4. Blutflussmessung	42
	5.4.5. Ausblick	43
6.	Zusammenfassung	44
7.	Literatur	45
7.	Literatur	45
7. 8.	Literatur	45
7. 8.	Literatur	45 57
7. 8.	Literatur Anhang 8.1. Tabellen	45 57 57
7. 8.	Literatur Anhang 8.1. Tabellen. 8.1.1. Gewicht	45 57 57 57
7. 8.	Literatur Anhang 8.1. Tabellen 8.1.1. Gewicht 8.1.2. Hämodynamik und Körpertemperatur	45 57 57 57
7. 8.	Literatur Anhang 8.1. Tabellen 8.1.1. Gewicht 8.1.2. Hämodynamik und Körpertemperatur 8.1.3. Blutgasanalyse	45 57 57 57 60
7. 8.	Literatur Anhang 8.1. Tabellen 8.1.1. Gewicht 8.1.2. Hämodynamik und Körpertemperatur 8.1.3. Blutgasanalyse 8.1.4. Elektrolyt- und Blutzuckerkonzentrationen	45 57 57 57 60 61
7. 8.	Literatur Anhang 8.1. Tabellen 8.1.1. Gewicht 8.1.2. Hämodynamik und Körpertemperatur 8.1.3. Blutgasanalyse 8.1.4. Elektrolyt- und Blutzuckerkonzentrationen 8.1.5. Hämoglobinkonzentrationen	45 57 57 57 60 61 62
7. 8. {	Literatur Anhang 8.1. Tabellen 8.1.1. Gewicht 8.1.2. Hämodynamik und Körpertemperatur 8.1.3. Blutgasanalyse 8.1.4. Elektrolyt- und Blutzuckerkonzentrationen 8.1.5. Hämoglobinkonzentrationen 8.1.6. Mikroperfusion	45 57 57 57 60 61 62 64
7. 8.	Literatur Anhang 8.1. Tabellen. 8.1.1. Gewicht 8.1.2. Hämodynamik und Körpertemperatur. 8.1.3. Blutgasanalyse 8.1.4. Elektrolyt- und Blutzuckerkonzentrationen 8.1.5. Hämoglobinkonzentrationen 8.1.6. Mikroperfusion 8.2. Abkürzungsverzeichnis	45 57 57 57 60 61 62 64 65
7. 8. 8	Literatur Anhang 8.1. Tabellen. 8.1.1. Gewicht 8.1.2. Hämodynamik und Körpertemperatur. 8.1.3. Blutgasanalyse 8.1.4. Elektrolyt- und Blutzuckerkonzentrationen 8.1.5. Hämoglobinkonzentrationen 8.1.6. Mikroperfusion 3.2. Abkürzungsverzeichnis 3.3. Übersicht der laborchemischen Parameter.	45 57 57 57 60 61 62 64 65 66
7. 8. 8 8 8	Literatur Anhang 8.1. Tabellen. 8.1.1. Gewicht 8.1.2. Hämodynamik und Körpertemperatur. 8.1.3. Blutgasanalyse 8.1.4. Elektrolyt- und Blutzuckerkonzentrationen 8.1.5. Hämoglobinkonzentrationen 8.1.6. Mikroperfusion 3.2. Abkürzungsverzeichnis 3.3. Übersicht der laborchemischen Parameter. 3.4. Danksagung	45 57 57 6 0 61 62 62 65 66 67

1. Arbeitshypothese und Fragestellung

Kardiale Risikopatienten sind für die klinische Medizin eine große Herausforderung. In der Anästhesiologie sind sie in der perioperativen Phase, aber auch während und nach der Operation durch das gehäufte Vorkommen von Hypertension, Tachykardie und erhöhter sympathische Aktivität besonders anfällig für eine Myokardischämie. Da das Myokard bei diesen Patienten sehr vulnerabel ist, kommt es bei der durch die hyperdynamische kardiale Reaktion bedingten Störung der Balance zwischen myokardialer Sauerstoffversorgung und myokardialem Sauerstoffverbrauch schneller zu einer Prädisposition des Myokards für Ischämie. Komplikationen dieses Prozesses reichen von Rhythmusstörungen oder Angina pectoris bis hin zum Myokardinfarkt mit hoher Letalität [1-4].

Aufgrund der erwähnten Vulnerabilität für Ischämie kommt bei diesen Patienten zur möglichen Therapie die prophylaktische Gabe von anti-ischämischen Substanzen, die z.B. u.a. die myokardiale O₂-Versorgung verbessern, in Betracht [8]. Durch eigene Untersuchungen an Ratten konnte erstmalig eine signifikante Reduktion des Infarktareals innerhalb des infarktgefährdeten Gewebes mittels einer Prophylaxe mit der zellfreien bovinen Hämoglobinlösung HBOC-200 nachgewiesen werden [6]. Die Mechanismen sind dabei aber noch unklar. HBOC scheint neben der Gewebsoxygenierung einen weiteren gewebeprotektiven Effekt im Rahmen von Ischämie und Reperfusion am Myokard zu haben.

In der vorliegenden Arbeit sollte daher die Hypothese überprüft werden, ob eine Infarktvolumenreduktion durch HBOC-200 im Ischämie- und Reperfusionsmodell mit einem höheren regionalen myokardialen Blutfluss einhergeht.

2. Einleitung

2.1. Rückblick

1628 schrieb der britische Arzt WILLIAM HARVEY in seinem Werk Exercitatio Anatomica De Motu Cordis et Sanguinis in Animalibus:

"if we find the same blood in the arteries as in the veins, after having tied them in the same way, as I have myself repeatedly ascertained, both in the dead body and in living animals, we may fairly conclude that the arteries contain the same blood as the veins, and nothing but the same blood."

Er widersprach damit der gängigen Vorstellung seiner Zeitgenossen und gilt mit seiner Entdeckung des Blutkreislaufs als ein Begründer der modernen Physiologie. Mit der Erkenntnis, dass das Blut in einem Kreislauf aus Herz, Lunge, Arterien, Venen und Kapillaren zirkuliert, wuchs auch bald der Gedanke, diesen Kreislauf bei Bedarf mit von extern zugeführtem Volumen zu substituieren. Doch erst zu Beginn des 20. Jahrhunderts entdeckte LANDSTEINER das ABO-Blutgruppensystem und legte damit den Grundstein für die Bluttransfusion im heutigen Sinne. Trotz der teilweise gravierenden Fortschritte und Risikominimierung steht die Bluttransfusion auch heute noch vor einigen Problemen. Blutgruppeninkompatibilitäten sind immer noch ein Risiko, genauso wie transfusionsbedingte Infektionen mit z.B. HIV- oder Hepatitisviren. Auch die immerwährende Knappheit der Ressource Spenderblut bei zunehmend komplexeren operativen Eingriffen und den demographischen Veränderungen in der Gesellschaft ließen im Laufe der von HARVEY begründeten Entwicklung die Forschungsbemühungen auch in Richtung Blutersatzstoffe laufen. So führten SELLARDS und MINOT die ersten dokumentierten klinischen Studien mit zellfreien Hämoglobinlösungen bereits 1916 bei Freiwilligen und bei anämischen Patienten durch [120]. Doch auch die ersten Versuche mit Hämoglobinlösungen liefen nicht ohne, teilweise vital bedrohliche, Nebenwirkungen ab. Hierbei handelte es sich vorrangig um eine aktivierte intravasale Gerinnung sowie Fieber und Nierenversagen bei auftretenden Rückständen von Lipidmembranen der Erythrozyten [9/10]. Noch 1978 kam es in einer Studie zur Evaluierung der Sicherheit von Hämoglobinlösungen zu relevanten hämodynamischen und renalen Komplikationen [11]. Auch bei einer hochdosierten Transfusion von HBOC-200 im Jahr 2005 konnte eine renale Toxizität nicht vollkommen ausgeschlossen werden [132]. Wenngleich noch nicht endgültig aufgeklärt, scheint es sich bei der pathophysiologischen Grundlage der hypertensiven Nebenwirkungen von Hämoglobinlösungen um die Bindung von Stickstoffmonoxid (NO) an das freie Hämoglobinmolekül ("NO-Scavenging") zu handeln. Die aus der Bindung resultierende Inaktivierung der vasodilatatorischen Moleküle führt zu einem Anstieg des Blutdrucks [121]. Darüber hinaus kann es unter der Anwendung von

Hämoglobinlösungen zu einer erhöhten Freisetzung von Endothelin und zu einer Sensibilisierung von Adrenozeptoren kommen [13/14].

In jüngster Zeit wurde die Substanz Hemospan[®] in Phase-I- und –II-Studien getestet. Diese scheint weniger vasokonstriktorisch zu wirken [32/128-130].

Als weitere relevante klinische Nebenwirkung ist die Methämoglobinämie zu nennen. Die vermehrte Methämoglobinbildung resultiert aus dem Fehlen der Methämoglobinreduktase und weiterer Reduktionsenzyme in der zellfreien Hämoglobinlösung.

Relevant wird die Methämoglobinämie allerdings erst bei der Verabreichung größerer Hämoglobinmengen sowie bei der Überladung des makrozytär-phagozytären Systems (MPS) [15]. Die ursprünglich beobachtete renale Toxizität von Hämoglobinlösungen konnte durch die Einführung der Ultrapurifikation weitestgehend beseitigt werden.

Neben den überwiegend toxischen Nebenwirkungen ergaben sich weitere Probleme im Zusammenhang mit der kurzen intravasalen Verweildauer und der hohen Sauerstoffaffinität der entwickelten Hämoglobinlösungen. Außerdem resultierte aus der hohen Anzahl von Einzelmolekülen und Fraktionen des Hämoglobins (Hb) ein erhöhter kolloidosmotischer Druck (KOD). Aus diesem Grund werden die zurzeit zugelassenen bzw. in Phase-III-Studien befindlichen Hämoglobinlösungen chemisch modifiziert (Abbildung 1.1).

Durch die Polymerisation erhöht sich das mittlere Molekulargewicht, während sich die Molekülzahl reduziert. Eine verlängerte intravasale Verweildauer und ein erniedrigter kolloid-osmotischer Druck sind die Folge.

Abbildung 1.1 Übersicht über den Separations- und Purifikations-Prozess von modernen zellfreien Hämoglobinlösungen



2.2. Die Studiensubstanz HBOC-200

2.2.1 Substanz

Die in dieser Studie verwendete Substanz HBOC-200 ist eine zellfreie, ultragereinigte und polymerisierte Rinderhämoglobinlösung, die sich durch eine niedrige Sauerstoffaffinität und einen ausgeprägten Bohr-Effekt auszeichnet. Dadurch wird eine verbesserte Gewebsoxygenierung infolge der erleichterten Sauerstoffabgabe in der Peripherie erreicht. Das Molekulargewicht in Abhängigkeit vom jeweiligen Polymerisationsgehalt beträgt 64.000-500.000 Dalton. Die intravasale Halbwertzeit wird mit 16-24 Stunden angegeben [15]. Durch die Änderung des Ladungszustandes verschiebt sich die Sauerstoffbindungskurve im Sinne einer erleichterten Sauerstoffabgabe in der Peripherie nach rechts. Dies zeigt sich insbesondere in einem erhöhten P_{50} in Höhe von 36 mmHg gegenüber humanem an Erythrozyten gebundenen Hämoglobin mit einem P_{50} von 26 mmHg [15].

2.2.2 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mit HBOC-200/HBOC-201

Nach vielfältigen Untersuchungen wurde für weitergehende Untersuchungen zur möglichen Beeinflussung von myokardialen Ischämie- und Reperfusionschäden durch zellfreie Sauerstoffträger in den letzten Jahren ein Koronarischämiemodell an der Ratte etabliert. Im Rahmen der ersten Versuchsreihe konnte im Nachweis nach Patent-Blau-Injektion und Färbung mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) in der Kontrollgruppe eine Infarktgröße von 63±15 % innerhalb der "Area at Risk" erzeugt werden.

Die prophylaktische Applikation von HBOC-200 (0,4 g/kg) bewirkte eine signifikante Reduktion auf 46±9 % (p<0,025), während die therapeutische Applikation zehn Minuten nach Ischämieinduktion in der gleichen Dosierung keinen Unterschied zur Kontrollgruppe zeigen konnte [6].

2.2.3 Stand der Forschung und klinischer Ausblick

HBOC-200 ist seit dem Jahr 2000 als Oxygent® (Biopure, USA) für die veterinärmedizinische Anwendung in den USA zugelassen, während HBOC-201 als Hemopure® (Biopure, USA) zur Anwendung bei perioperativer Anämie bei Erwachsenen seit 2001 in Südafrika zugelassen ist. Daten über eine Anwendung seit der Zulassung liegen jedoch nicht vor. Eine Zulassung in Europa, Kanada oder den USA über Phase-III-Studien hinaus erfolgte bisher nicht [5/7/12/31]. Beide Hämoglobinlösungen zeichnen sich durch eine niedrige Sauerstoffaffinität und einen ausgeprägten Bohr-Effekt aus, das heißt, dass eine verbesserte Gewebsoxygenierung infolge der erleichterten Sauerstoffabgabe in der Peripherie zu erwarten ist. Bei HBOC kommt es auch unter Atmung von Raumluft (21 % O₂) zu einer nachweisbar besseren Abgabe von Sauerstoff im Gewebe [16/17].

Um den Effekt einer Augmentierung des Gewebe- pO_2 zu erreichen, ist nur eine geringe Menge an HBOC notwendig (0,4 g/kg) [18], d.h. es müssen lediglich 200-250 ml HBOC auf den Patienten übertragen werden.

Es ist bekannt, dass die Hauptursache des Herzinfarktes bei der überwiegenden Anzahl der Patienten ein akut auftretender Verschluss eines Herzkranzgefässes durch Plaqueruptur ist [19]. Die Ischämie des Herzmuskels führt letztendlich zu einer Diskrepanz zwischen Sauerstoffangebot im Herzmuskel und myokardialem Sauerstoffbedarf und wird beim Auftreten einer Tachykardie und hypertensiven oder kritischen hypotensiven Blutdruckwerten noch weiter verstärkt.

Zu der prognostischen Bedeutung perioperativer Myokardischämien liegen zahlreiche klinische Untersuchungen vor [2/3/61]. So konnten MANGANO et al. in einer Studie zur perioperativen kardialen Morbidität und Mortalität bei 474 nicht kardiochirurgischen Patienten mit nachgewiesener koronarer Herzkrankheit zeigen, dass bei 18 % dieser Patienten in der postoperativen Phase kardiale Komplikationen wie Herzinsuffizienz, instabile Angina pectoris, ventrikuläre Tachykardie, Myokardinfarkt oder plötzlicher Herztod auftraten [3]. Weiterhin kam es bei 20 % der Patienten präoperativ zu Myokardischämien, während diese intraoperativ bei 25 % und postoperativ bei 41 % aller untersuchten Patienten auftraten. Das unmittelbar postoperative Auftreten von Myokardischämien erhöhte das Risiko kurzfristig nachfolgender ischämischer Komplikationen wie Angina pectoris, Myokardinfarkt oder akutem Herztod um mehr als das neunfache. In Bezug auf die Langzeitprognose über zwei Jahre zeigt sich, dass kardiale Komplikationen mehr als doppelt so häufig auftraten, wenn perioperative Myokardischämien detektiert wurden [3]. BÖTTIGER stellte heraus, dass die schwersten myokardialen Ischämien am Ende des chirurgischen Eingriffs, bzw. im Rahmen der Ausleitung der Narkose zu erwarten sind [4].

Eine auch therapeutische Besonderheit perioperativer Myokardischämien liegt in der gewissen Vorhersagbarkeit der Ereignisse.

Dadurch, dass der operative Eingriff bei Patienten, die aufgrund von kardialen Vorerkrankungen als Hochrisikopatienten einzustufen sind, planbar ist, bieten sich gute Möglichkeiten für prophylaktische Interventionen an.

Eine mögliche prophylaktische Applikation von HBOC oder auch anderer künstlicher Sauerstoffträger bei kardialen Risikopatienten stellt somit einen neuartigen Ansatz zur perioperativen Risikoreduktion dar [8]. Neben der bei kardialen Hochrisikopatienten inzwischen weit verbreiteten perioperativen β -Blockade [20-22] könnte HBOC über einen völlig anderen Wirkmechanismus das Risiko perioperativer Myokardischämien bzw. deren Folgen reduzieren.

Die vorliegende tierexperimentelle Untersuchung zu den Auswirkungen einer prophylaktischen sowie einer therapeutischen Applikation von HBOC-200 bei Okklusion der linken Koronararterie mit nachfolgender Reperfusion stellt vor dem geschilderten Hintergrund möglicherweise einen weiteren Schritt für eine innovative klinische Behandlungsstrategie dar.

2.2.4 Hypothese der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit soll die Hypothese überprüft werden, ob die in früheren Studien gezeigte Infarktvolumenreduktion durch HBOC-200 im Ischämie- und Reperfusionsmodell mit einem höheren regionalen myokardialen Blutfluss einhergeht. Dieser soll mittels Mikrosphärentechnik bestimmt und ausgewertet werden.

3. Material und Methodik

3.1. Tierschutz

Der Tierversuch wurde auf der 1996 veröffentlichten Grundlage des "Guide For The Care And Use Of Laboratory Animals" des National Research Councils, Institute of Laboratory Animal Resources, Comission on Life Science, Washington, D.C., USA durchgeführt. Die Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales (BAGS) der Freien und Hansestadt Hamburg erteilte eine Genehmigung für diese Versuchsreihe (Antragsnummer 36/03) nach Begutachtung durch die entsprechende Kommission.

3.2. Operativer Versuchsablauf

3.2.1.Versuchsgruppen

Bei dem vorliegenden kardialen Ischämie- und Reperfusionsversuch wurden die Tiere nach Ischämie einer Reperfusionsdauer von 240 Minuten unterzogen. Die Einteilung der Tiere erfolgte entsprechend einer Randomisierungsliste in eine Negativ-Kontrollgruppe, eine Positiv-Kontrollgruppe, eine Therapie-Gruppe sowie eine Prophylaxe-Gruppe. Ein Schema des Versuchsablaufs in den jeweiligen Therapiegruppen ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

In der Negativ-Kontrollgruppe erhielten die entsprechenden Tiere nach Durchführung der Thorakotomie weder eine Koronararterienligatur noch wurde HBOC-200 appliziert. In der Positiv-Kontrollgruppen erfolgte eine Ischämie- und Reperfusionsphase ohne Applikation von HBOC-200. **Tabelle 3.1:** Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion mit HBOC-200:

Schema des Versuchsablaufes

Eintreffen des Tieres im OP						
Einleitung und Brängration (cg. 60 min)						
Stabilicierungsnbase (20 min)						
	Basi	swerterhebung				
Ventilation	Oxvgenierung Hämog	dynamik Temperatur: Messi	una kontinuierlich			
venenderony	Blutgasanalyse ur	d RMBF: vor Randomisierur				
	Gruppe	n-Randomisierung	5			
Gruppe 1: Sham Control	Gruppe 2-4:					
Keine Ischämie	30 min Ischämie / 24	40 min Reperfusion				
15 min vor Ligatur 1. Ap	plikation entsprechen	d erfolgter Randomisierung (der Gruppen 1-8			
1	2	3	4			
_ Negativ Kontrolle	– Positiv Kontrolle	HBOC-200 Therapie	HBOC-200 Prophylaxe			
n=5	N= 8	n= 8	n=8			
FiO ₂ : 0,3	FiO ₂ : 0,3	FiO ₂ : 0,3	FiO ₂ : 0,3			
NaCl 0.9%	NaCl 0.9%	NaCl 0.9%	HBOC-200			
20 ml	20 ml	20 ml	0,4 a/kaKG			
Ventilation,	Messung: Präisch Oxygenierung, Hämoo Blutgasa	ämie (post applicationem dynamik, Temperatur: Mess nalyse: nach 10 min	1) ung kontinuierlich			
Sham Control	Koronararterienlig	atur (fur 30 min):				
Keine Ischamie						
Ventilation,	Oxygenierung, Hämoo Blutgasa	dynamiepnase dynamik, Temperatur: Mess nalyse: nach 10 min	ung kontinuierlich			
Nach 10 min Ischämie 2	 Applikation entsprec 	hend erfolgter Randomisier	ing			
FiO ₂ : 0,3	FiO ₂ : 0,3	FiO ₂ : 0,3	FiO ₂ : 0,3			
NaCl 0,9%	NaCl 0,9%	HBOC-200	NaCl 0,9%			
20 ml	20 ml	0,4 g/kgKG	20 ml			
Ventilation,	Fortsetze Oxygenierung, Hämoo Blutgasanalys	ung Ischämiephase dynamik, Temperatur: Mess e und RMBF: nach 10 min	ung kontinuierlich			
Sham Control	Aufhebung der Lig	atur				
Reine Ischanne	min					
Ventilation, Oxygenierung, Hämodynamik, Temperatur: Messung kontinuierlich Blutgasanalyse: nach 5 und 240 min						
Koronararterienligatur						
Patent-Blau-Injektion						
Exitus letalis durch Überde	osis KCl					
Herzentnahme						
2mm Lamellierung						
TTC-Färbung						
Einscannen der TTC-Schni	Einscannen der TTC-Schnitte					
RMBF Analyse						

3.2.2. Versuchstiere

3.2.2.1. Art

Für den Versuch wurden Kaninchen der Art New Zealand White Rabbits mit einem Gewicht zwischen 2,0 und 3,5 kg verwendet, die über die Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vom Züchter Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld) bezogen wurden.

3.2.2.2. HALTUNG

Die Haltung der Tiere vor Versuchsbeginn erfolgte in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bei einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus sowie 50-60 %iger relativer Luftfeuchtigkeit. Die Ernährung bestand aus SNIFF Standarddiät und Wasser ad libitum. Die Kaninchen verblieben zur Gewöhnung mindestens 5 Tage in der Tierhaltung bevor unmittelbar vor Durchführung des Versuches der Transport in das Tierversuchslabor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie in einer gewärmten Transportbox erfolgte. Vor Beginn des Versuchs wurde eine 60-minütige Ruhezeit für die Tiere eingehalten.

3.2.3. Studienmedikation

Bei der eingesetzten zellfreien ultragereinigten Hämoglobinlösung HBOC-200 Oxyglobin[®] (Biopure, Cambridge, MA, USA) handelt es sich um einen "hemoglobin-based oxygen carrier" (HBOC) boviner Herkunft. Oxyglobin[®] besitzt bereits eine veterinärmedizinische Zulassung als Blutersatz bei Tieren.

Die durch Polymerisierung der Hämoglobintetramere mit Hilfe von Glutaraldehyd entstehenden Ketten bestehen aus durchschnittlich 15 Tetrameren, wobei Oxyglobin[®] sich in seiner Zusammensetzung nur unwesentlich, nämlich durch einen höheren Anteil von Molekülen mit niedrigem Molekulargewicht (MG <64.000 Dalton), von dem für den Menschen in Südafrika zugelassenen Hemopure[®] des gleichen Herstellers unterscheidet.

Bovines und humanes Hämoglobin unterscheiden sich lediglich durch 17 Aminosäuren in der Alpha-Kette und 24 Aminosäuren in der Beta-Kette. Durch die zentrale Lage dieser Aminosäuren in der Molekülstruktur wird eine antigene Wirkung sehr unwahrscheinlich. Ein relevanter Unterschied liegt allerdings in der Beta-Kette. Diese ist bei bovinem im Vergleich zu humanem Hämoglobin um eine Aminosäure kürzer, wodurch die Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität des Hämoglobins von der Konzentration an 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) wesentlich beeinflusst wird. Durch die verkürzte Beta-Kette wird die Sauerstoffaffinität von HBOC überwiegend durch Chlorid und nicht durch 2,3-DPG reguliert.

Da die Sauerstoffaffinität von HBOC-200 mit einem P_{50} von 36 mmHg im Vergleich zu humanem Hämoglobin deutlich erniedrigt ist, wird die Sauerstoffabgabe im Gewebe erleichtert. Insbesondere bei azidotischen Verhältnissen kann darüber hinaus durch die besondere Ausprägung des Bohr-Effekts leichter Sauerstoff abgegeben werden.

Da bei Oxyglobin[®] der Anteil an Polymeren mit einem Molekulargewicht unterhalb der Nierenschwelle (<32.000 Dalton) gering ist, kommt es zu einer verlängerten intravasalen Halbwertszeit. Es erfolgt nur eine sehr geringe renale Ausscheidung.

Gleichzeitig wird dadurch der kolloid-osmotische Druck auf einem dem humanem Plasma vergleichbarem Niveau gehalten. Weiterhin enthält HBOC-200 einen niedrigen Anteil an Polymeren, die größer als 500.000 Dalton sind. Dadurch wird die Substanz nur in geringen Mengen im Monozytär-Phagozytären System (MPS) gespeichert.

Zur Vermeidung einer Oxidation der Hämoglobinmoleküle mit nachfolgender Bildung von Methämoglobinbildung wurde die Studienlösung nach dem ersten Eröffnen unter sterilen Kautelen in einem mit Stickstoff gefluteten Vakuumbehältnis bei Raumtemperatur lichtabgeschirmt gelagert. Trotzdem wurde direkt vor Verwendung der Lösung im Rahmen des Versuches die Methämoglinkonzentration gemessen wobei bei einem Wert >5% die Lösung verworfen wurde. Unabhängig hiervon wurden jedoch nach jeweils zwei Versuchswochen angebrochene Restbestände verworfen.

Parameter	HBOC-200
	(Oxyglobin [®])
KOD (mmHg)	17
Viskosität 37º (mPa x s)	1,3
рН	7,6-7,9
Osmolalität (mOsm/kg)	290-310
Natrium (mmol/l)	145-160
Kalium (mmol/l)	3,5-5,5
Chlorid (mmol/l)	105-120
Calcium (mmol/l)	0,5-1,5
Hämoglobin (g/dl)	12,0±1
p50 (mmHg)	36
Endotoxin (EU/ml)	<0,02
Phospholipid (nM)	<3
Polymerisiertes Hämoglobin	
MGW>500.000 (%)	<15
MGW~65.000 (%)	<10
MGW<32.000 (%)	<5
Freies Glutaraldehyd (µg/ml)	<3,5
N-acetyl-L-cystein (%)	<0,2
Partikel	
>10µ	<50
>25µ	<5

Tabelle 3.2: Spezifika von HBOC-200 entsprechend Herstellerangaben

3.2.4. Narkose und Präparation

Die Allgemeinanästhesie der Versuchstiere (New Zealand White Rabbits / 2,0-3,5 kg) wurde vor Beginn des Versuches durch eine intramuskuläre Gabe von 15 mg/kg S-Ketamin (Pfizer, Karlsruhe) und 1,5 mg/kg Midazolam (Hoffmann-La Roche, Grenzach Wyhlen) erreicht. Nach Aussetzen der Abwehrbewegungen erfolgte die Lagerung der Tiere auf einen beheizbaren Kleintier-OP-Tisch (Heated Rodent Operating Table, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) in Rückenlage. Anschließend wurde unter Sauerstoffinsufflation, EKG-Ableitung, rektaler Temperaturmessung und pulsoximetrischer Überwachung der Sauerstoffsättigung eine periphere Vene am linken Ohr der Kaninchen punktiert.

Die Narkose wurde sodann als totale intravenöse Anästhesie mit 30 mg kg⁻¹ h⁻¹ Thiopental (Altana Pharma, Konstanz) und 40 µg kg⁻¹ h⁻¹ Fentanyl (Janssen-Cilag, Neuss) über den inzwischen gelegten zentralvenösen Katheter in die Vena jugularis interna links fortgeführt. Nach Applikation eines Fentanylbolus (7,5 µg/kg) und einer Infiltrationsanästhesie mit 0,5 ml Lidocain 1 % (AstraZeneca, Wedel) wurde bei den Tieren eine Tracheotomie durchgeführt, wobei die Tiere bei Bedarf bis zum Abschluss der Tracheotomie über einen nasopharyngealen Vygon Tubus (Vygon, Aachen) ventiliert wurden. Die kontrollierte Beatmung (Inspira Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus, Holliston, USA) erfolgte nach der Tracheotomie über einen Tubus mit einem Durchmesser von 3mm und einer FIO₂ von 1,0. Normocapnie, Normothermie und Normoglycämie wurden gewährleistet. Der CO₂-Partialdruck wurde kontinuierlich endexspiratorisch (Monitoreinheit mit Mainstream-Messung, Datex-Ohmeda, Helsinki, Finnland) und intermittierend arteriell (ABL 505, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark) bestimmt. Die Wärmung der Tiere erfolgte bei Bedarf ergänzend zum beheizbaren Kleintier-OP-Tisch (Heated Rodent Operating Table, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) mit einer Wärmelampe (Osram Siccatherm 280W). Zwei arterielle Zugänge in der rechten und linken Femoralarterie gewährleisteten die Durchführung von Blutgasanalysen, die kontinuierliche Messung des Blutdrucks sowie die Erhebung einer Referenzprobe zur Bestimmung der regionalen myokardialen Perfusion. Die FIO₂ betrug während der gesamten weiteren Präparationsphase 1,0 unter kontrollierter Beatmung. Um eine Atelektasenbildung zu vermeiden, wurde die Beatmung nach linksseitiger Thorakotomie zwischen dem vierten und fünften Interkostalraum mit positivendexspiratorischem Druck (5 mbar) fortgesetzt. Zur Darstellung der linken Arteria coronaria circumflexa wurde eine Perikardiotomie durchgeführt, um anschließend einen 4-0 Seidenfaden um den ersten Ast der linken Arteria coronaria circumflexa nahe des Ursprungs zu legen (Abb. 1a und b) [23]. Zum Schutz des Gefäßes wurden beide Fadenenden durch ein Filzplättchen (Meadox Dacron Felt) und anschließend durch ein etwa drei cm langes Wattestäbchen geführt. Somit konnte durch Fadenspannung eine Unterbindung des Gefäßes erfolgen [131].

Ein Katheter wurde in das linke Herzohr gelegt, um eine Injektion von farbmarkierten Mikrosphären zur Messung der regionalen myokardialen Durchblutung zu ermöglichen [116]. Nach Abschluss dieser Präparation wurde die FIO₂ auf 0,3 reduziert und eine Erholungsphase von 20 Minuten eingehalten. Erst zu diesem Zeitpunkt erfolgte die Randomisierung der Tiere in die jeweiligen Therapiegruppen.

Abb. 1 a und b: Durchführung des Herzstiches im Bereich des ersten Astes der Arteria circumflexa der linken Koronararterie



b)



Nach der 20-minütigen Stabilisierungsphase und Erhebung der Ausgangswerte wurden nun in den Prophylaxegruppen über 5 min 0,4 g/kg (10-15 ml ad 20 ml Gesamtvolumen, durch NaCl ergänzt) HBOC-200 intravenös verabreicht. Die anderen Gruppen erhielten zu diesem Zeitpunkt ein äquivalentes Volumen an NaCl 0,9 % (siehe Tabelle 3.1). Die Koronarligatur wurde 15 Minuten später für 30 Minuten zugezogen (Abb.2). Nach 10minütiger Ligatur erfolgte in der Therapiegruppe die Injektion von 0,4 g/kg (10-15 ml ad 20 ml NaCl) HBOC-200, während die Tiere der anderen Gruppen wiederum als Volumenausgleich ein äquivalentes Volumen an NaCl 0,9 % erhielten. Im Laufe des Versuches erfolgte eine kontinuierliche Messung von Hämodynamik und paSO₂. Weiterhin wurden wiederholt Blutgase, Hämoglobin- und Blutzucker-Konzentrationen bestimmt.

Abb. 2: Zuzug der Koronararterie, sichtbar wird ein Verblassen der distal der Okklusion gelegenen Areale des linken Ventrikels



Nach dem Öffnen der Ligatur folgte die 240-minütige Reperfusionsphase. Am Versuchsende wurde die Koronarligatur erneut zugezogen und 1 ml/kg Patent-Blau 2 % intravenös injiziert (Abb. 3).

Durch Injektion von 2 mmol/kg KCL wurde bei allen Tieren der Exitus letalis herbeigeführt. Darauf erfolgte die sofortige Entnahme des Herzens nach Absetzen an den großen Gefäßen. In einer speziellen Matrix (Heart Matrix For Rabbits, Harvard Apparatus, Holliston, MA, USA) wurden die Herzen in 2 mm dicke atrioventrikuläre, basisparallele Scheiben geschnitten. Sodann wurde von den entstandenen Gewebeschnitten jeweils die Herzspitze zur Bestimmung des Blutflusses entnommen. Anschliessend erfolgte dann unter dem Mikroskop eine Trennung des infarktgefährdeten vom nicht infarktgefährdeten (blau gefärbten) Gewebe, um den jeweiligen Blutfluss zu bestimmen. Sämtliche nachfolgende Untersuchungen erfolgten "verblindet". **Abb. 3:** Darstellung des Herzens nach erneuter Anlage der Koronarokklusion und Injektion von Patent-Blau 2 %. Die weiter perfundierten Areale stellen sich blau gefärbt dar, während die ischämischen Areale nicht angefärbt werden ("Area at Risk").



3.2.5. Intraoperative Messwerte

Die Zeitpunkte für die entsprechenden Messwerte sind Tabelle 3.2 zu entnehmen.

3.2.5.1. INSPIRATORISCHE SAUERSTOFFKONZENTRATION UND KAPNOMETRIE

Mittels einer Elektrode wurde in einem vor das Beatmungsgerät geschalteten Reservoir (Oxydig, Dräger, Lübeck) die inspiratorische Sauerstoffkonzentration gemessen. Die Kapnometrie wurde kontinuierlich durch einen Normocap[™] Monitor (Datex-Ohmeda, Helsinki, Finnland) gemessen und grafisch auf dem Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) dargestellt. Die erhobenen Daten wurden nicht ausgewertet, da eine quantitative Messung aufgrund der Verwendung eines ungeblockten Tubus beim Kleintier nicht möglich ist. Die mit der Kapnometrie erhobenen Daten wurden lediglich qualitativ genutzt, um frühzeitig eine Dislokation oder Verlegung des Beatmungstubus zu erkennen und den Verlauf der Kurve beurteilen zu können.

3.2.5.2. HÄMODYNAMIK

Herzfrequenz und arterieller Blutdruck

Über drei am Thorax der Tiere angebrachte Klebeelektroden für Neugeborene (Agilent 13953D, Agilent Technology, Andover, USA) erfolgte die kontinuierliche EKG-Ableitung sowie die Übertragung auf einen Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA). Hier wurde zu den jeweiligen Messzeitpunkten die Herzfrequenz abgelesen.

Durch den in der linken Femoralarterie angelegten arteriellen Zugang erfolgte die dauerhafte Ableitung des arteriellen Blutdruckes über einen elektromagnetischen Druckaufnehmer (Logical, Medex, Klein-Winternheim). Auch diese Daten wurden auf dem Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) durchgehend dargestellt und überwacht.

Rate-Pressure Product (RPP)

Das sogenannte Rate-Pressure Product (RPP) ist ein sensitiver, indirekter Index für den myokardialen Sauerstoffverbrauch (mVO₂) [25]. Dies gilt sowohl bei wachen Patienten, als auch während der Narkose [25]. WILKINSON et al. konnten nachweisen, dass die Sensitivität des RPP auch unter hämodynamisch instabilen Bedingungen weiterhin gegeben ist.

Das RPP errechnet sich nach folgender Formel:

RPP = Herzfrequenz x systolischer Blutdruck / 1000

Das RPP wurde im Rahmen unseres Versuches berechnet, da ein über längere Zeit bestehender erhöhter Sauerstoffverbrauch, z.B. durch Tachykardie und/oder Hypertension, bei eventuell durch Reperfusionsschäden bedingter Minderdurchblutung des Myokards zu einem Sauerstoffmangel in den Myokardzellen führen kann. Bereits dadurch kann das Infarktareal vergrößert werden.

Zentraler Venendruck

Der zentrale Venendruck (ZVD) wurde intermittierend über den zentralvenösen Zugang mittels des oben genannten Druckaufnehmers bestimmt.

3.2.5.3. BLUTGASANALYSEN, ELEKTROLYT- UND HÄMOGLOBINKONZENTRATIONEN

Über den arteriellen Zugang in der rechten Femoralarterie erfolgte die Entnahme von arteriellem Blut für Blutgasanalysen (BGA) sowie zur Bestimmung der Blutglukosekonzentration und der anderen laborchemischen Parameter, wobei hierfür jeweils ein Milliliter arterielles Blut abgezogen wurde. Die Bestimmung von pH, paO₂, paCO₂, ionisiertem Calcium, Kalium und Natrium erfolgte mittels Blutgasanalysator (ABL 505, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Weiterhin wurden folgende Parameter berechnet: Standard-Basenüberschuss (SBE) und Standard-Bikarbonat (SBc).

Außerdem wurden die Gesamthämoglobinkonzentration (tHb), Sauerstoffsättigung (SaO₂) sowie der Anteil an Oxyhämoglobin (HbO₂), Carboxyhämoglobin (COHb), Methämoglobin (MetHb) und "freiem", plasmatisch gelöstem Hämoglobin (fHb) bestimmt (OSM 3, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Das plasmatisch gelöste Hämoglobin wurde nach Zentrifugation (5 min bei 5000 rpm, Heraeus Sepatech, Kendro-Heraeus, Berlin) von 80 µl Blut aus dem Plasmaüberstand bestimmt.

Die Bestimmung der Blutzuckerkonzentration erfolgte mittels B-Glukose Analyzer (Hemocue, Angelholm, Schweden).

3.2.5.4. KÖRPERTEMPERATUR

Auf die Einhaltung der Normothermie der Tiere wurde sowohl bei der Präparation als auch im weiteren Versuchsablauf strikt geachtet. Hierfür wurde vor Beginn der Präparation bei jedem Kaninchen eine rektale Temperatursonde eingeführt und die Körpertemperatur kontinuierlich auf dem Monitor überwacht. Neben der Wärmung über den beheizbaren Operationstisch wurde bei Bedarf eine Wärmelampe (Osram Siccatherm 280W) eingesetzt.

3.3. Organaufarbeitung

Nach Absetzen an den großen Gefäßen wurde das Herz entnommen, mit kalter NaCl-Lösung gespült und gewogen. Danach wurde es in die zuvor bei -20° C vorgekühlte Matrix (Heart Matrix, Harvard Medical Instruments, Holliston, USA) hineingelegt, wobei es vorher mit Frischhaltefolie eingewickelt wurde, um Gefrierbrand zu vermeiden. Anschließend wurde es bei -20° C für 20 Minuten eingefroren, um das Lamellieren zu vereinfachen. Das Herz wurde dann in der gekühlten Matrix in 2 mm dicke Schnitte basisparallel lamelliert.

Zur Bestimmung des regionalen myokardialen Blutflusses wurde die Herzspitze zur Messung des Blutflusses in der "Area at Risk" und eine Gewebescheibe oberhalb der Ligatur zur Messung des Blutflusses in der "non-Area" entnommen. Die verbliebenen Schnitte wurden für die Bestimmung der "Area at Risk" und die TTC-Färbung verwendet (siehe 3.5.).

Messpunkt	Zeitpunkt	Messparameter
1 (M1)	Ruhephase + 20 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂
2 (M2)	Ruhephase + 25 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂
3 (M3)	Ruhephase + 30 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂ , BGA, Hb,
		fHb, COHb, ZVD, BZ, E-lyte
4 (A5)	Applikation 1 + 5 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂ , BGA, Hb,
		fHb, COHb, ZVD, BZ, E-lyte
5 (A15)	Applikation 1 + 15 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂
6 (A25)	Applikation 1 + 25 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂
7 (L5)	Ligatur + 5 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂ , BGA, Hb,
		fHb, COHb, ZVD, BZ, E-lyte
8 (A2)	Applikation 2	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂
	(= Ligatur + 15 min)	
9 (L20)	Ligatur + 20 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂ , BGA, Hb,
		fHb, COHb, ZVD, BZ, E-lyte
10 (L25)	Ligatur + 25 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂
11 (R2)	Reperfusion + 2 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂ , BGA, Hb,
		fHb, COHb, ZVD, BZ, E-lyte
12-34 (R10-	Reperfusion + jeweils	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂
R230)	10 min bis + 230 min	
35 (R240)	Reperfusion + 240 min	FIO ₂ , HF, MAP, Temp, SaO ₂ , BGA, Hb,
		fHb, COHb, ZVD, BZ, E-lyte

Tabelle 3.3: Übersicht der intraoperativen Messpunkte und der jeweiligen Parameter

3.4. Regionaler myokardialer Blutfluss (RMBF)

3.4.1. Messprinzip

Die Erhebung des regionalen myokardialen Blutflusses erfolgte mittels farbgekoppelter Mikrosphärentechnik. Diese Technik zeigte vergleichbare Ergebnisse zu herkömmlichen Messungen mittels radioaktiv markierter Mikrosphären [26]. Mit diesem Verfahren werden quantitative Angaben über die regionale Perfusion von "Area at Risk"-Arealen und nicht ischämischem Gewebe möglich. Das Prinzip der Mikrosphärentechnik beruht darauf, dass in den linken Vorhof injizierte Mikrosphären mit einem Durchmesser von etwa 15±1 µm frei mit dem Blutfluss zirkulieren, bis sie in einer Kapillare, deren Durchmesser geringer ist als der Durchmesser der Mikrosphären, stecken bleiben und diese somit verschließen. Die Anzahl der Mikrosphären, die in einer bestimmten Menge an Herzgewebe stecken bleibt, ist somit proportional zu dem diese Mikrosphären enthaltenden Blutvolumen, das eben dieses Gewebe perfundiert. Die Mirkosphären embolisieren zwar einen kleinen Teil der Kapillaren, aufgrund der hohen Anzahl der Kapillaren im Verhältnis zu den Mikrosphären hat dies jedoch keine relevanten hämodynamischen Auswirkungen. Eine Minute vor der Mikrosphären-Injektion wird mit der Entnahme einer arteriellen Referenzblutprobe begonnen, welche mit einer Rate von 2,0 ml/min über eine Minute nach Applikation fortgeführt wird. Um den Blutfluss zu verschiedenen Zeitpunkten messen zu können, ist die Verwendung von verschieden farbigen Mikrosphären mit demselben Durchmesser notwendig.

3.4.2. Messprotokoll

3.4.2.1. MESSZEITPUNKTE

In der vorliegenden Studie wurde zu vier unterschiedlichen Zeitpunkten der regionale myokardiale Blutfluss erfasst (Tabelle 3.4).

Mikrosphärenfarbe	Versuchszeitpunkt
Rot	Ruhephase + 30 min (Baseline)
Gelb	Ligatur + 5 min
Violett	Reperfusion + 2 min
Weiß	Reperfusion + 240 min

Tabelle 3.4: Zeitpunkte der Mikrosphäreninjektion

In der Negativ-Kontrollgruppe erfolgte die regionale myokardiale Blutflussbestimmung zu den entsprechenden Zeiten der jeweiligen Versuchseinheiten.

3.4.2.2. MIKROSPHÄRENVORBEREITUNG, APPLIKATION, GEWINNUNG DER REFERENZPROBE

Im Folgenden soll der Ablauf der Mikrosphärenapplikation, inklusive der Vorbereitung der Mikrosphären und deren Auswertung beschrieben werden.

Für jede Messung wurden etwa 750.000 markierte Mikrosphären eines Farbtons (gelbe, rote, violette oder weiße Polystyrene Mikrosphären der Firma Trinton Technology, San Diego, USA) mit einem Durchmesser von etwa $15\pm1~\mu$ m in den linken Vorhof als Bolus injiziert. Zuvor wurde eine Stammlösung der Mikrosphären angesetzt, die 750.000 Mikrosphären/ml enthielt. Diese Stammlösung, die sich kontinuierlich in einem Rotator befand, wurde eine Minute mit Hilfe eines Vortex (VF2, Jahnke und Kunkel, Staufen) bei geringer Drehzahl rotiert. Danach wurde die Stammlösung in einem Sonicator (Soniplus HD 2070, Bandelin electronics, Berlin) eine Minute lang durchmischt, um eine gleichmässige Verteilung der Mikrosphären in der Stammlösung zu erreichen. Sofort danach wurden 1000 μ l aus der Stammlösung pipettiert und in eine 2 ml Spritze umgefüllt. Diese wurde bis unmittelbar vor der Injektion mechanisch geschüttelt.

Um die notwendige Referenzprobe zu gewinnen, wurde die Rückzugspumpe (11plus, Harvard Medical Instruments, Holliston, MA, USA) unter Verwendung einer Perfusorleitung an den arteriellen Zugang des Kaninchens angeschlossen. Zum Rückzug des Blutes wurde eine 50 ml Perfusorspritze verwendet, die mit 60 mg EDTA gefüllt war, um eine Gerinnung des Blutes zu verhindern. Die Rückzugspumpe wurde dann mit einer Rate von 2 ml/min gestartet. Sobald eine Blutsäule in der Perfusorleitung sichtbar wurde, wurde mit der Injektion der Mikrosphären begonnen. Die Mikrosphären wurden über einen Zeitraum von einer halben Minute über den Katheter im linken Vorhof injiziert. Im Folgenden wurden die Injektionsspritze und der Vorhofkatheter mit insgesamt 4x2 ml NaCl 0,9 % gespült, um die Adhäsion der Mikrosphären an Spritze und Katheter möglichst zu vermeiden. Nach der Spülung wurde der Rückzug des Blutes über die Rückzugspumpe zwei Minuten fortgesetzt. Das so gewonnene Blut wurde dann in ein 50ml-Zentrifugenröhrchen umgefüllt. Die Perfusorspritze wurde daraufhin dreimal mit jeweils 6 ml/ 4 ml/ 3 ml 1 %igem TWEEN 80 gespült und die Spüllösung ebenso in das Zentrifugenröhrchen hinzugegeben.

Das Zentrifugenröhrchen wurde daraufhin mit BHR (Blood hemolysis reagent; 10 %iges Triton X-100) auf 45 ml aufgefüllt. Am Versuchsende wurden zu allen Zentrifugenröhrchen - d.h. sowohl denjenigen in denen sich die Referenzprobe befand, als auch denjenigen, die die Gewebeproben enthielten, sowie am Ende und am Anfang der Pipettierreihe in jeweils ein Röhrchen zur Verfahrenskontrolle - 5000 blaue Mikrosphären hinzugegeben. Diese Pipettierreihe wurde immer von derselben Person durchgeführt. Die Aufarbeitung der Gewebeproben erfolgte strikt nach Anweisung des Herstellers der Mikrosphären (Dye-Track Tissue Processing And Microsphere Recovery Procedure, Triton Technologies, San Diego, CA, USA).

3.4.2.3. GEWINNUNG DER GEWEBEPROBEN, VERARBEITUNG DER PROBEN

Nach Tötung des Versuchstieres, Entnahme des Herzens und Lamellierung des Gewebes, erfolgte an den Schnitten unter dem Mikroskop eine Trennung des infarktgefährdeten ("Area at Risk") vom nicht ischämischen (Patent-Blau gefärbten) Gewebe. Daraufhin wurden beide Gewebeportionen gewogen. Alle Gewebeproben der "Area at Risk" wurden gesondert von den entsprechenden Gewebeproben des nicht ischämischen Gewebes in Zentrifugenröhrchen verbracht. Zur Prozesskontrolle wurden jeweils auch die beiden Nieren der Tiere entnommen und nach Dreiteilung, Wiegen der Gewebestücke und Verbringen in ein Zentrifugenröhrchen entsprechend den Gewebeproben des Herzens behandelt. Danach wurde den Zentrifugenröhrchen jeweils 20 ml ADR (Alkaline Digestion Reagent; 1,0 M KOH) zugefügt, die Röhrchen danach über Nacht in ein Wärmebad bei 60° C verbracht. Über Nacht wurde das Gewebe, als auch die Referenzprobe durch ADR digestiert. Am nächsten Morgen wurden die Röhrchen aus dem Wasserbad entnommen, kurz auf dem Vortex geschüttelt, danach erfolgte die visuelle Kontrolle, ob das gesamte Gewebe digestiert wurde. War noch nicht das gesamte Gewebe homogenisiert, wurde die Digestion bis zur vollständigen Homogenisierung fortgesetzt. Die Röhrchen wurden dann 15 Minuten bei 1500 G zentrifugiert, der Überstand über den abgesetzten Mikrosphären wurde abgesaugt. Mit Hilfe des Sonicators (drei Minuten bei 50 %) wurden dann die Mikrosphären aus dem verbliebenen Geweberesten gelöst.

Um ein vollständiges Auslösen der Mikrosphären zu gewährleisten, musste die Lösung vor erneuter Behandlung mit dem Sonicator mit 10 % Triton X-100 Reagenz noch zweimal resuspendiert werden.

Nach fünfminütigem Zentrifugieren und Absaugen des Überstands wurden die letzten Schritte wiederholt, bis nach zweimaligem Resuspendieren nur noch eine kleines Pellet in dem Röhrchen verblieb, welches nur noch aus Mikrosphären bestand. Dieses Pellet wurde über Nacht im Wärmebad getrocknet, am nächsten Tag wurde entsprechend der Anweisung des Herstellers 200 µl des Lösungsmediums DMF (Dimethylformamid) hinzugefügt, um die Hüllen der Mikrosphären aufzulösen, die Farbstoffe wurden somit aus den Mikrosphären gelöst [124]. Die Röhrchen wurden erneut auf dem Vortex geschüttelt und zentrifugiert. Am Boden der Röhrchen befanden sich daraufhin nur die Hüllen der Mikrosphären, während sich der extrahierte Farbstoff im Überstand befand. Zur spectrophotometrischen Messung wurde der Überstand in eine 200 µl fassende Mikroküvette pipettiert und daraufhin die Absorption (AU) der Lösung gemessen.

3.4.2.4. BERECHNUNG DES BLUTFLUSSES

Die Berechnung des Blutflusses im Gewebe erfolgte mit Hilfe des Matrix Inversions Programmes (Triton Technologies, San Diego, CA, USA). Durch die mit Hilfe der spectrophotometrischen Messung gewonnenen Absorptionswerte für die einzelnen verwendeten Farbstoffe (rot, gelb, violett, weiß und blau als Parameter für die Genauigkeit der Messung), konnte die Anzahl der im Gewebe bzw. in der Referenzprobe enthaltenen Mikrosphären berechnet werden. Der regional myokardiale Blutfluss entspricht dem Verhältnis aus der Absorption der myokardialen Gewebeprobe zur Referenzblutprobe multipliziert mit der Rate der Referenzblutprobenentnahme. Der myokardiale Fluss wird in Beziehung zum ermittelten Probengewicht gesetzt und in Milliliter pro Minute pro Gramm Gewebe angegeben. Der Blutfluss im Gewebe wird daraufhin nach folgender Formel berechnet:

Blutfluss im Gewebe (ml g^{-1} min⁻¹): $A_G \times V_{ref} \times A_{ref}^{-1} \times W_G^{-1}$

$$A_G$$
 = Absorption für den jeweiligen Farbstoff im Gewebe

- V_{ref} = Rückzugsrate der Referenzprobe (2 ml/min)
- A_{ref} = Absorption der Referenzprobe
- W_G = Gewicht der jeweiligen Gewebeprobe

Auf der Grundlage dieser Formel lässt sich zu jedem Zeitpunkt, zu dem die unterschiedlich gefärbten Mikrosphären in dem Versuch eingesetzt wurden, der jeweilige Blutfluss im Gewebe berechnen.

3.5. TTC-Färbung und "Area at Risk"

Das Versorgungsareal des ligierten Gefässes, die sogenannte "Area at Risk", entspricht der nach der Injektion von Patent-Blau nicht angefärbten Fläche der Herzschnitte. Zur Vermeidung einer Unschärfe bei der Flächenberechnung durch ein Verwaschen der Patent-Blau-markierten Areale im Rahmen der weiteren Färbung wurden die Schnitte unmittelbar nach dem Schneiden beidseitig eingescannt. Die "Area at Risk" stellt sich in den Schnitten als ungefärbtes Myokard scharf abgegrenzt innerhalb des restlichen Gewebes des Herzens dar (Abb. 4). Erst danach erfolgte die Färbung der Gewebeschnitte mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC).

Zur Darstellung des Infarktareals innerhalb der Gewebeschnitte erfolgte entsprechend vorbeschriebener Technik [28] eine Färbung der Schnitte in Multilayers mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) in 0,2 mol Trispuffer (pH=7,8; Serva Biochemica, Heidelberg). Nach zehnminütiger Inkubation bei 37° C im Wasserbad wurde die Reaktion durch 6 %iges Formalin terminiert. Daraufhin wurden die Schnitte erneut von beiden Seiten eingescannt.

Die Anfärbung der Gewebeschnitte mittels TTC basiert auf einer Reduktion von Tetrazolium mit Öffnung der Ringstruktur und Umwandlung in das rote Formazan. Der Prozess erfolgt enzymabhängig durch an die Membran gebundene Oxidasen mit den Co-Enzymen NADH und NADPH, welche zu NAD bzw. NADP oxidiert werden. Die Färbung erfolgt nicht mehr, wenn die Konzentrationen von NADH/NADPH unter 80 pmol/mg Gewebe abfallen [29]. TTC weist somit einen Mangel an Co-Enzymen im infarzierten Myokard nach (Abb. 5). Die Ausdehnung der Infarkte ist nahezu identisch mit ultrastrukturellen Nachweisen der transmuralen Infarktausdehnung mittels Elektronenmikroskopie [29]. **Abb. 4:** Die "Area at Risk" stellt sich als durch TTC nicht angefärbtes, rötliches Areal dar.



Abb. 5: Die Infarktareale stellen sich in der Abbildung durch Anfärbung mit TTC weiß dar.



4. Ergebnisse

4.1. Intraoperative Messwerte

4.1.1. Gewicht der Tiere

Tabelle 8.1 im Anhang zeigt das Körpergewicht der Kaninchen. Im Gruppenvergleich konnten keine Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

4.1.2. Hämodynamische Parameter: Herzfrequenz, Blutdruck und rektale Körpertemperatur

Zwischen den Gruppen gab es bei den Ausgangsparametern von Herzfrequenz und arteriellem Blutdruck keinerlei Unterschiede. Im Vergleich zu der Positiv-Kontrolle kam es bei Applikation von HBOC sowohl in der Prophylaxe-, als auch in der Therapiegruppe zu einem signifikanten Abfall der Herzfrequenz. Dies blieb bis zum Versuchsende bestehen. Im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle kam es nur vereinzelt gegen Ende des Versuches zu signifikanten Unterschieden nach der Applikation von HBOC. Der Verlauf der Herzfrequenz ist als MW±SD in Tabelle 8.2 im Anhang dargestellt. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird auf die Darstellung jedes einzelnen Messzeitpunktes verzichtet.

Der mittlere arterielle Blutdruck stieg nach der prophylaktischen Applikation von HBOC im Vergleich zur Positiv-Kontrolle signifikant an. Dieser signifikante Unterschied war bis ca. 90 Minuten vor Versuchsende nachweisbar, danach waren die Unterschiede nicht mehr signifikant. Im Vergleich zur Negativ-Kontrolle konnten keine signifikanten Unterschiede festgestellt werden. Die therapeutische Applikation von HBOC führte im Gegensatz dazu zu keinem signifikanten Anstieg des arteriellen Mitteldruckes. Der Verlauf des mittleren arteriellen Blutdruckes ist als MW±SD in Tabelle 8.3 im Anhang dargestellt.

Trotz der oben geschilderten Veränderungen bei den hämodynamischen Parametern kam es - von einem Messpunkt abgesehen, bei dem das RPP in der Prophylaxegruppe signifikant niedriger war als in der Negativ-Kontrolle - im gesamten Versuchsablauf bei dem Rate-Pressure Product (RPP) zu keinen signifikanten Unterschieden zwischen den Gruppen.

Da ein Anstieg des arteriellen systolischen Blutdruckes durch die Applikation von HBOC-200 mit einem Abfall der Herzfrequenz einherging, glichen sich diese Veränderungen bei der Berechnung des RPP aus.

Somit kommt es während des Versuches durch die Applikation des bovinen Sauerstoffträgers HBOC-200 indirekt durch das RPP berechnet zu keinem Anstieg des myokardialen Sauerstoffverbrauches. Die einzelnen Werte sind in Tabelle 8.4 wiedergegeben.

Auch die rektal gemessene Körpertemperatur zeigte keinen Unterschied zwischen den verschiedenen Gruppen, wie man Tabelle 8.5 entnehmen kann.

4.1.3. Blutgasanalyseparameter

Hierbei wurden insbesondere die Parameter pH-Wert, arterieller CO₂- und O₂-Partialdruck, sowie Standardbikarbonat und Standardbasenüberschuss einer besonderen Betrachtung unterzogen. Weiterhin wurde die inspiratorische Sauerstoffsättigung und die mittels Blutgasanalyse bestimmte Sauerstoffsättigung ausgewertet Die einzelnen Parameter zu den verschiedenen sechs Messzeitpunkten sind in den Tabellen 8.6 bis 8.11 als MW±SD im Anhang dargestellt.

Die Ausgangswerte aller bestimmten Parameter zeigten keinen Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen. Auch im weiteren Versuchsablauf kam es sowohl nach Applikation von HBOC als auch während der Ischämie und Reperfusion zu keinerlei Unterschieden zwischen den Untersuchungsgruppen.

4.1.4. Elektrolyt- und Blutzuckerkonzentration

Bei den Ausgangsparametern gab es lediglich einen signifikant niedrigeren Kaliumwert in der Prophylaxegruppe im Vergleich zu der Positiv-Kontrolle. Im weiteren Verlauf des Versuches konnten jedoch bis zum Versuchsende keinerlei signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden.

Die Blutzuckerwerte unterschieden sich bei der Ausgangsmessung nicht zwischen den einzelnen Therapiegruppen. Im Verlauf des Versuches kam es in allen Gruppen zu einem Anstieg der Blutzuckerwerte, ohne dass dabei jedoch ein signifikanter Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden konnte.

Die Messwerte für die Elektrolyte sind im Anhang in den Tabellen 8.12 bis 8.14 wiedergegeben, die Blutzuckerwerte sind in der Tabelle 8.15 im Anhang dargestellt.

4.1.5. Hämoglobinkonzentrationen

In den Tabellen 8.16 bis 8.19 im Anhang sind sowohl die gesamte Hämoglobinkonzentration als auch das plasmatische Hämoglobin, das Carboxyhämoglobin, das Oxyhämoglobin, sowie das Methämoglobin dargestellt.

Die Ausgangswerte der einzelnen Parameter unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. Die gesamte Hämoglobinkonzentration zeigte auch im weiteren Versuchsablauf keinen Unterschied zwischen den Gruppen, obwohl in der Therapie als auch in der Prophylaxegruppe plasmatisch gelöstes, nicht zellgebundenes Hämoglobin in Form von HBOC hinzugefügt wurde. Die Applikation von HBOC in der Prophylaxe- als auch in der Therapiegruppe führte jedoch zu einem signifikanten Anstieg des plasmatischen Hämoglobins im Vergleich zu den nicht behandelten Gruppen.

Die prophylaktische Applikation von HBOC führte zu einem kurzfristigen signifikanten Anstieg des Methämoglobins im Vergleich zu der Positiv-Kontrolle. Dieser Unterschied konnte zumindest bis zum Beginn der Reperfusion nachgewiesen werde.

Nach 240-minütiger Reperfusion konnte wiederum kein Unterschied zwischen den einzelnen Gruppen festgestellt werden. Die Werte des Carboxyhämoglobins zeigten während des gesamten Versuchsablaufes keinen Unterschied zwischen den Gruppen. Hingegen waren die Werte des Oxyhämoglobins bei der Ausgangsmessung in der Negativ-Kontrollgruppe signifikant höher als in der Prophylaxegruppe, und während der beiden in der Reperfusion bestimmten Messwerte höher als in der Therapiegruppe.

4.2. "Area at Risk"

Mit Hilfe des am Versuchsende applizierten Patent-Blau wurden die Flächen der "Area at risk", d.h. der Areale in den Herzschnitten, die sich nach erneuter Anlage der Koronarokklusion nicht blau färbten, dargestellt.

In Abbildung 4.1 ist der jeweilige Durchschnittswert der "Area at Risk" in den einzelnen Gruppen als Prozentsatz der Fläche der linken Ventrikel dargestellt. Die "Area at Risk" war in den drei Gruppen, die sich einer 30-minütigen Ischämiezeit unterziehen mussten mit 20 bis 25 % nahezu identisch groß. Statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen konnten nicht festgestellt werden.

Wenngleich die Fläche der "Area at Risk" in der Negativ-Kontrollgruppe etwas kleiner erscheint, ergaben sich keinerlei signifikante Unterschiede in Bezug auf die anderen Tiergruppen.



Abb. 4.1: "Area at Risk" in Relation zur Fläche des linken Ventrikels (MW±SD)

4.3. Infarktareale

Die Infarktareale wurden mit Hilfe der TTC-Färbung markiert und am Monitor in Relation zu der "Area at Risk" ausgemessen. Die Größe der Infarktareale ist somit in Prozent der "Area at Risk" angegeben. In der Negativ-Kontrollgruppe wurde ein Infarktareal von 9 ± 10 % der "Area at Risk" dokumentiert und war somit signifikant kleiner als in der Positiv-Kontrollgruppe, in der eine Größe des Infarktareals von 48 ± 17 % der "Area at Risk" ausgemessen wurde (p=0,002). Auch in den beiden mit HBOC behandelten Gruppen konnte eine signifikante Reduktion des Infarktareals im Verhältnis zu der Positiv-Kontrollgruppe festgestellt werden.

Während die prophylaktische Applikation von HBOC zu einer Größe des Infarktareals von 25 ± 13 % der "Area at Risk" führte (p=0,026 vs. Positiv-Kontrolle), führte die therapeutische Applikation der bovinen Hämoglobinlösung mit einer Fläche von 22 ± 20 % der "Area at Risk" ebenfalls zu mehr als einer Halbierung des Infarktareals im Vergleich zu der Positiv-Kontrollgruppe (p=0,009 vs. Positiv-Kontrollgruppe). Die jeweilige Größe der Infarktareale im Verhältnis zur "Area at Risk" ist in Abbildung 4.2 wiedergegeben.

Abb. 4.2: Größe der Infarktareale in Relation zu der Größe der "Area at Risk" (*p<0,05 vs. Positiv-Kontrollgruppe)



4.4. Blutflussmessung mit Mikrosphärentechnik

4.4.1. Mikroperfusion "non Area"

Die Mikroperfusion in dem Gewebe der "non Area" ist in Abbildung 4.3 dargestellt. Die jeweiligen Messwerte finden sich im Anhang in Tabelle 8.20. Es wird deutlich, dass sich die Blutflusswerte in der "non Area" zwischen den einzelnen Gruppen nicht unterscheiden.

Abb. 4.3: Mikroperfusion im Gewebe der "non Area" zu den unterschiedlichen Zeitpunkten



4.4.2. Mikroperfusion "Area at Risk"

Die Mikroperfusion in dem Herzgewebe der "Area at Risk" ist in Abbildung 4.4 und in Tabelle 8.21 im Anhang wiedergegeben.

Abb. 4.4: Mikroperfusion "Area at Risk" zu den unterschiedlichen Zeitpunkten (* p<0,05 vs. Negativ-Kontrolle, # p<0,05 vs. Baseline)



Es zeigt sich während der Ischämie ein deutlicher Abfall der Mikroperfusion auf Werte um den Nullpunkt, wohingegen die Mikroperfusion in der Negativ-Kontrollgruppe nahezu unverändert bleibt. Direkt nach Reperfusion zeigt sich in allen Tiergruppen, die einer Koronarokklusion unterzogen wurden, eine Hyperperfusion, sowohl im Vergleich zu der Negativ-Kontrollgruppe, als auch im Vergleich zu den jeweiligen Ausgangswerten. Nach 240-minütiger Reperfusionszeit fällt die Mikroperfusion auf Werte im Bereich der Baseline ab.

5. Diskussion

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine prophylaktische und therapeutische Gabe von HBOC-200 im Ischämie- und Reperfusionsmodell am Kaninchen die Infarktgrösse signifikant reduziert. Vorhergegangene Versuche an der Ratte konnten diesen Effekt nur bei der prophylaktischen Gabe zeigen [6].

In der vorliegenden Arbeit sollte aber als Hauptziel die Hypothese überprüft werden, ob der nachgewiesene Effekt von HBOC-200 auf das Infarktareal mit einem erhöhten regionalen myokardialen Blutfluss einhergeht.

5.1. Mikrozirkulation mittels Mikrosphärentechnik

Als Standard zur Messung des regionalen mykardialen Blutflusses (RMBF) wurde in den 60er Jahren die Mikrosphärentechnik unter der Verwendung von radioaktiv markierten Mikrosphären etabliert und validiert [125-127]. Das Prinzip der Mikrosphären geht bis in das Jahr 1909 zurück, als die Pohlmann AG erste Versuche mit Partikeln aus Stärke unternahm. Das Prinzip der radioaktiv markierten Mikrosphären ist aber mit dem Nachteil der hohen Kosten für das durchführende Labor und strengen Sicherheitsvorgaben belastet. Weiterhin muss für die Messung der Radioaktivität eine entsprechende Gamma-Kamera angeschafft werden, was ebenfalls mit hohen Kosten verbunden ist. In jüngerer Zeit wurden deshalb farbgekoppelte Mikrosphären entwickelt und validiert [26]. Diese werden nach einem entsprechenden Protokoll des Herstellers aufgearbeitet, in dessen Verlauf die Arbeit des Labors durch Qualitätskontrollen überwacht werden kann. Die in diesem Versuch erzielten Messwerte für den regionalen myokardialen Blutfluss (RMBF) sind plausibel und nachvollziehbar.

Durch die Applikation von Patent-Blau konnte die Trennung der Gewebe in "Area at Risk" und "non Area" erfolgen. Anschließend konnten die Mikroperfusionsverhältnisse für beide Gewebeanteile getrennt dargestellt werden, wobei sich kein signifikanter Unterschied in den Mittelwerten der Mikroperfusion zeigte. Darüberhinaus blieb die Mikroperfusion in den nicht okkludierten Arealen stabil. Auch in der Negativ-Kontrollgruppe, d.h. der Gruppe, in der keine Koronarokklusion durchgeführt wurde, blieben die Werte der Mikroperfusion durchgehend stabil.

Entsprechend des Versuchssettings zeigten sich jedoch in der "Area at Risk" entsprechende Entwicklungen in der Mikroperfusion. Während der Koronarokklusion wurde in allen anderen Gruppen ein Abfall der Mikroperfusion auf Werte unter 0,2 ml g⁻¹ min⁻¹ beobachtet. Nach Öffnen der Stenose kam es im Verlauf der Reperfusion und einer Phase der Hyperperfusion zu einem Rückgang auf Werte, die im Bereich der Ausgangswerte liegen.

REFFELMANN und Mitarbeiter kommen in einem ähnlichen Modell auf vergleichbare Werte für den mit Hilfe der Mikrosphären ermittelten Blutfluss [33]. Der regionale myokardiale Blutfluss der Ausgangsmessung (RMBF) wird von REFFELMANN und Mitarbeitern in dem Bereich zwischen 1,76±0,13 und 2,44±0,19 ml g⁻¹ min⁻¹ angegeben. In unserem Versuch liegen die Werte zum Großteil leicht über den genannten Werten. Allerdings liegen die Ausgangswerte bei den Tieren, die entweder prophylaktisch oder therapeutisch mit HBOC-200 behandelt wurden, deutlich unter den von REFFELMANN angegebenen Werten. Im weiteren Ablauf zeigen jedoch auch die Werte in diesen Gruppen mit den Daten von REFFELMANN et al. vergleichbare Werte für den RMBF. So stellten auch REFFELMANN et al. nach dem definitionsgemäßen Abfall des regionalen myokardialen Blutflusses während der Koronarischämie nach zweiminütiger Reperfusion eine deutliche Hyperperfusion fest.

Im Gegensatz zu unseren Versuchsdaten fällt der RMBF jedoch in dem von REFFELMANN durchgeführten Versuch nach 120-minütiger und nach 480-minütiger Reperfusionszeit in der "Area at Risk" auf Werte ab, die bei ca. 50 % der Baselinewerte liegen. In unserem Versuch bewegen sich allerdings die Werte in einem Bereich, der ungefähr den Werten der Ausgangsmessung entspricht. Inwieweit diese bei den mit HBOC-200 behandelten Tieren niedrigen Werte für den RMBF hierauf einen Einfluss haben, ist rein spekulativ. Der Unterschied in den Infarktarealen, deren Größe von REFFELMANN mit 30-32 % angegeben wird, und die in unserem Versuch je nach durchgeführter Therapie zwischen 23 und 48 % liegen, kann sicherlich nicht für die Unterschiede des RMBF nach der Reperfusionszeit verantwortlich gemacht werden.

Zwar wurde von REFFELMANN et al. nach 240 Minuten keine Messung des RMBF durchgeführt, da allerdings die Messwerte nach 120 Minuten und nach 480 Minuten nahezu identisch waren, ist davon auszugehen, dass sich auch in der Zwischenzeit keine größeren Veränderungen ereignet haben.

Insgesamt gesehen stimmen die von uns gemessenen Werte für den RMBF mit den in der Literatur angegebenen Werten überein, was letztendlich eine Validierung unseres Modells darstellt.

Zielkriterium dieser Arbeit war die Frage, ob die Verkleinerung des Infarktareals mit einem erhöhten regionalen myokardialen Blutfluss einhergeht.

Obwohl Studien [34-49] nahelegen, dass dieser Effekt neben einem erhöhten Gewebesauerstoff-Partialdruck als ein möglicher Wirkmechanismus von Hämoglobinlösungen im Rahmen von Ischämie und Reperfusion in einer verbesserten Mikroperfusion durch Hemmung einer Interaktion von Leukozyten und Endothel liegt, konnte dies im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden. Trotz signifikant kleinerer Infarktareale in den mit HBOC-200 behandelten Gruppen, unterscheidet sich der gemessene Blutfluss nicht von der Kontrollgruppe.

Für die Hypothese der vorliegenden Versuchsreihe sprachen letztlich auch Befunde, die in tierexperimentellen Untersuchungen nach Induktion einer Pankreatitis nachgewiesen wurden. Nach experimentell induzierter Pankreatitis konnte im Rattenmodell durch die Applikation von HBOC-200 eine signifikante Reduktion von Nekrosen sowie eine Verbesserung der histologisch verifizierten Organintegrität und Funktion im Rattenmodell nachgewiesen werden [49-51].

Im Modell am Schwein konnte erstmals gezeigt werden, dass der pathologisch erniedrigte Gewebesauerstoff-Partialdruck im Pankreas nach medikamentös induzierter Pankreatitis unter therapeutischer Applikation von HBOC-200 in Kombination mit einer isovolämen Hämodilution ebenso wie die Mikrozirkulation auf das Ausgangsniveau angehoben werden konnte, während die alleinige Applikation von Hydroxyethylstärke oder Ringer-Lösung dies nicht vermochte [52/42]. Einschränkend muss jedoch hinzugefügt werden, dass es sich bei dem genannten Modell um kein Ischämie- und Reperfusionsmodell wie in unserem aktuellen Versuch handelt, d.h. trotz der induzierten Pankreatitis findet immer noch eine Perfusion in den Arealen der Pankreatitis statt. Aus diesem Grund könnte der Aspekt der verbesserten Oxygenierung hauptverantwortlich für die erzielten Effekte sein.

Nachdem wir in dem vorliegenden Versuch keine Verbesserung der Mikrozirkulation nachweisen konnten, muss davon ausgegangen werden, dass der besseren Verfügbarkeit von Sauerstoff im Gewebe nach Applikation von HBOC-200 eine besondere Bedeutung zukommt, d.h. weniger der konvektiven als vielmehr der diffusiven Sauerstoffverteilung postkapillär direkt im Gewebe.

Hierfür spricht auch eine Studie, in der SAETZLER et al. in einem Modell mit durch Zigarettenrauch induziertem Leukozyten-"Rolling" und Adhäsion an Endothelzellen nur nach Gabe eines polynitroxylierten HBOC eine signifikante Reduktion des "Rolling and Sticking" sowie von Leukozyten und Thrombozytenaggregaten nachweisen konnten [53]. Nicht polynitroxyliertes HBOC konnte diese Effekte allerdings nicht erreichen. Außerdem betonen die Autoren, dass trotz Änderungen beim "Rolling And Sticking" keine Veränderungen im Rahmen der Mikrozirkulation festgestellt werden konnten.

In zahlreichen zuvor durchgeführten tierexperimentellen Studien am Hund konnte eine verbesserte Gewebeoxygenierung durch Applikation der zellfreien Hämoglobinlösung verzeichnet werden [18/54/55/56/57]. Nach nahezu komplettem Blutaustausch mit HBOC-201 am Hund lagen die Sauerstoffpartialdrücke (tpO₂) im Skelettmuskel höher als in der Vergleichgruppe, die Hydroxyethylstärke erhielt, sowie im Vergleich zu den Ausgangswerten [54]. Im Vergleich zu Warmblut und drei Wochen alten autologen Erythrozytenkonzentraten errechnete sich anhand der gemessenen tpO₂-Werte im Skelettmuskel eine Oxygenierungpotenz für HBOC-201 von 3:1 [18].

Insbesondere sehr niedrige tpO_2 -Werte wurden durch die Gabe von HBOC-201 schneller und effektiver beseitigt als durch Erythrozytenkonzentrate [17].

Im Tiermodell zeigten sich nach isovolämer Anämie und nach einer akuten Stenosierung der Arteria poplitea 95 % höhere poststenotische tpO₂-Werte im Skelettmuskel sowohl bei prophylaktischer als auch nach therapeutischer Applikation von HBOC-201 im Kontrollgruppe, die Hydroxyethylstärke Vergleich zur erhielt [55]. Im Koronarstenosemodell des Hundes konnte die Aufrechterhaltung der myokardialen Sauerstoffspannung und Kontraktilität mit deutlicher Verminderung der histologischen Gewebsschäden im minderperfundierten Areal nach prophylaktischer Applikation von HBOC-200 vor Anlage einer 90 % igen Stenose der linken Koronararterie in Kombination mit einer akuten isovolämen Anämie mit einem Hb von 7±1 g/dl erreicht werden [58-Nach therapeutischer Applikation von HBOC-200 zeigte sich eine erfolgreiche 60]. Restitution des myokardialen tpO₂ und der Kontraktilität des linken Ventrikels auf Werte, die nur knapp unter den Ausgangswerten lagen. Diese positive Beeinflussung des tp02 konnte in einer anderen Studie am Hund auch in der Leber erreicht werden [30]. In dem jetzt vorliegenden Versuch konnte zwar sowohl durch die prophylaktische als auch durch die therapeutische Applikation von HBOC-200 eine signifikante Reduktion der Infarktareale nach 30-minütiger Ischämie und 240-minütiger Reperfusion nachgewiesen werden. Allerdings gelang es nicht, die von uns aufgestellte Hypothese, dass die Reduktion des Infarktareals auf einer Verbesserung der Mikrozirkulation beruht, zu bestätigen. Es zeigte sich in den beiden mit HBOC-200 behandelten Tiergruppen im Vergleich zu der Kontrollgruppe kein signifikanter Unterschied. Auf der Grundlage dieser Ergebnisse scheint das Oxygenierungpotential der Hämoglobinlösung in der Reduktion der Infarktareale eine nicht zu unterschätzende Rolle zu spielen.

5.2. Effekte von HBOC-200 auf das Infarktareal

Wie bereits oben geschildert ist es in dem vorliegenden Versuch gelungen, sowohl mit der prophylaktischen als auch mit der therapeutischen Applikation von HBOC-200 eine Reduktion der Größe der Infarktareale nachzuweisen. In einem zuvor an einem vergleichbaren Modell an der Ratte durchgeführten Versuch konnten wir diesen Effekt nur für die prophylaktische Applikation von HBOC-200 nachweisen [6]. Als mögliche Erklärungsversuche für diese unterschiedlichen Effekte gibt es verschiedene Ansatzpunkte. Einerseits wurden in dem jetzigen Versuch Kaninchen anstatt Ratten verwendet.

Ratten haben im Gegensatz zu Kaninchen ein relativ geringes Blutvolumen. Die Messung des Blutflusses mittels Mikrosphären erfordert jedoch zu jedem Messzeitpunkt die Abnahme einer Referenzprobe mit 2 ml. Eine Ursache dafür lag darin, dass wir, um die Mikrozirkulation mittels Mikrosphärentechnik durchführen zu können, zu jedem Messzeitpunkt, an dem Mikrosphären appliziert wurden, 2 ml Blut für die Referenzprobe entnehmen mussten. Weiterhin musste auch jeweils für die Bestimmung der Blutgasanalyse Blut abgenommen werden. Die Durchführung dieser mehrfachen Blutentnahmen könnte bei einem Kleintier wie der Ratte aufgrund des relativ geringen Blutvolumens bis zum Versuchende zu einer ausgeprägten Anämie führen.

Es bleibt weiterhin die Frage bestehen, wie es denn zu der Reduktion der Infarktareale in den beiden mit HBOC behandelten Tiergruppen kommt, insbesondere da in Bezug auf die Mikroperfusion in der Area at Risk keinerlei Unterschiede zwischen den Tiergruppen feststellbar waren. Eine mögliche Erklärung mag darin liegen, dass nach der Applikation von HBOC die Hämoglobinmoleküle ungebunden, d.h. nicht in einem Erythrozyten eingebunden, im Plasma gelöst sind. Um eine Abgabe des Sauerstoffes aus einem Erythrozyten zu gewährleisten, muss der Erythrozyt in den entsprechenden Kapillaren das den Sauerstoff benötigende Gewebe erreichen. Kommt es nun im Rahmen des Ischämie- und Reperfusionsschadens zu den bereits beschriebenen Veränderungen der Durchblutung in den Blutgefäßen durch Schwellung des Gefäßendothels etc. mit einer Einengung des Lumens des Gefässes, können die Erythrozyten, deren Durchmesser sich um einen mittleren Wert von 7,5 µm bewegt, ab einem gewissen Durchmesser der Gefäße diese nicht mehr passieren, obwohl sie bis zu einem gewissen Grad verformbar sind. Der Durchmesser eines Hämoglobintetramers liegt hingegen im Bereich von weniger als 10 nm, so dass es leicht vorstellbar ist, dass diese Moleküle auch maximal eingeengte Gefäße noch passieren können, solange ein Lumen vorhanden ist.

Über den soeben geschilderten Mechanismus hinaus spielt es sicherlich weiterhin eine Rolle, dass sich HBOC-200 durch eine niedrige Sauerstoffaffinität und einen ausgeprägten Bohr-Effekt auszeichnet, so dass eine verbesserte Gewebeoxygenierung infolge der erleichterten Sauerstoffabgabe in der Peripherie erreicht wird. Die Sauerstoffbindungskurve verschiebt sich somit in der Peripherie nach rechts. Dies zeigt sich insbesondere in einem erhöhten P50 in Höhe von 36 mmHg gegenüber humanem an Erythrozyten gebundenen Hämoglobin mit einem P50 von 26 mmHg [15]. Eine neuere Studie konnte zeigen, dass durch die spezifische Oxygenierungskapazität von HBOC in Verbindung mit dem kapillären pO_2 gezielt Einfluss auf die Abgabe von Sauerstoff zu einer Behandlung von unterversorgtem Gewebe genommen werden kann [12].

Im Vergleich zu Warmblut und drei Wochen alten autologen Erythrozytenkonzentraten errechnete sich nach nahezu komplettem Blutaustausch im Hundemodell anhand der gemessenen tpO₂-Werte im Skelettmuskel eine Oxygenierungspotenz für HBOC von 3:1 [17/18]. HBOC stellt nach unterschiedlich ausgeprägter Hypoxie die Versorgung des Muskels mit O₂ wieder her [27].

Diese geschilderten verbesserten Oxygenierungsbedingungen nach der Applikation von Hämoglobinlösungen könnten den entscheidenden Mechanismus der Reduktion der Infarktareale in unserem Modell darstellen.

5.3. Hämodynamische Wirkungen und Nebenwirkungen von HBOC

Die vorliegende Untersuchung war primär vom Studiendesign nicht darauf angelegt, Nebenwirkungen sowohl quantitativ als auch qualitativ zu erfassen.

Zu diesem Themenkomplex wurden in der Vergangenheit bereits zahlreiche Untersuchungen mit einem entsprechenden Studiendesign insbesondere auch Phase-IIund -III-Studien durchgeführt. Wichtig ist weiterhin, dass in der Vergangenheit bereits zahlreiche Studien an Menschen durchgeführt wurden, bei denen in Bezug auf das Körpergewicht weitaus größere Mengen, als von uns in dem jetzigen Versuch verwendet, appliziert wurden, ohne dass es zu schwerwiegenden Nebenwirkungen kam [62-66].

5.3.1. Hämodynamik

Wie aus den Tabellen 8.2 und 8.4 im Anhang zu entnehmen ist, kommt es durch die Applikation von HBOC-200 zu Änderungen der hämodynamischen Parameter. Einerseits kommt es wahrscheinlich durch das "NO-Scavenging" zu einem Anstieg des systemischen Blutdruckes. Gleichzeitig konnten wir jedoch feststellen, dass die Herzfrequenz in den Gruppen, die HBOC-200 erhalten haben, signifikant gegenüber der Positiv-Kontrollgruppe abfällt. Inwieweit diese Effekte nun Einfluss auf den myokardialen Sauerstoffverbrauch haben, bzw. es durch steigenden Sauerstoffbedarf eventuell gar zu hypoxischen Zuständen im Myokard aufgrund eines erhöhten Sauerstoffbedarfs bei gleichzeitig durch Reperfusionsschäden bedingtem erniedrigten Sauerstoffangebots kommt, sollte mit Hilfe der Berechnung des Rate-Pressure Product (RPP) überprüft werden. Infolge einer Untersuchung von WILKINSON et al. stellt das RPP sowohl beim wachen Patienten, als auch während der Narkose bei hämodynamisch instabilen Zuständen einen sensitiven indirekten Parameter für den myokardialen Sauerstoffverbrauch (mVO2) dar [25].

Wenngleich einige Studien existieren, die die Validität des Parameters RPP, bzw. eine gute Korrelation zum mVO2 gezeigt haben [66/67], gibt es auch Studien, die die Validität des Parameters anzweifeln [68]. Im Rahmen unserer Untersuchung kam es - von einer Ausnahme abgesehen, bei der der RPP in der Prophylaxegruppe signifikant kleiner war im Vergleich zu der Negativ-Kontrolle - im gesamten Studienverlauf während der 240-minütigen Reperfusion zu keinerlei Änderungen des RPP. Dies liegt insbesondere daran, dass sich beide Parameter durch die Applikation von HBOC-200 in entgegen gesetzter Richtung veränderten. Da das RPP durch das Produkt aus Herzfrequenz und systolischem Blutdruck gebildet wird, heben sich diese Effekte im Rahmen unserer Studie auf. Um den myokardialen Sauerstoffverbrauch exakt zu berechnen, wäre es notwendig die av-DO₂ aus dem Sauerstoffangebot in der Aorta, bzw. den Koronarien und dem Sinus coronarius zu berechnen. Hierzu ist es allerdings notwendig, in diese Gefäße jeweils Mikrokatheter einzuführen, um Blutentnahmen durchzuführen.

Aufgrund der Schwierigkeiten bei der Anlage der Katheter, bedingt durch die kleinen Gefäßstrukturen bei Nagetieren, haben wir im Rahmen des vorliegenden Versuches auf diese Berechnung verzichtet und haben lediglich das Rate-Pressure Product als indirekten Parameter für den myokardialen Sauerstoffverbrauch berechnet.

5.3.2. Kardiale Effekte

Einer der Effekte von HBOC kann ein Absinken des Herzzeitvolumens sein, was sowohl in den meisten tierexperimentellen Studien [69-71] als auch bei Untersuchungen am Menschen [72-74] beschrieben wurde. Jedoch scheint HBOC nicht direkt am Herzen zu wirken, sondern hauptsächlich über die Folge des durch "NO-Scavenging" gestiegenen systemischen Widerstandes und dem daraus resultierenden Absinken des Herzzeitvolumens.

Zu direkten Effekten am Herzen durch HBOC gibt es nur wenig Literatur. Im Tierversuch bewirkt unmodifizierte bovine Hämoglobinlösung bei direkter Perfusion keine Veränderungen der Kontraktilität [75]. Die Chronotropie wird direkt negativ beeinflusst, wobei die Polymerisation von HBOC diesen Effekt vermindern kann [76]. Darüber hinaus können Effekte am Herzen allerdings auch durch eine Vasokonstriktion der Koronararterien bewirkt werden.

MOTTERLINI et al. konnten eine Potenzierung der vasokonstriktiven Effekte von Acetylcholin im Tiermodell nachweisen [77]. Inwieweit diesem Effekt eine Relevanz zukommt ist noch nicht abschließend geklärt. Im Gegensatz dazu zeigen nämlich "in vivo"-Versuche am Hund keinerlei vasokonstriktorische Effekte an den Koronararterien unter Hämodilution mit einer "Stroma freien" Hämoglobinlösung [78]. CARLUCCI und Mitarbeiter konnten am isolierten Rattenherzen nach einer Anreicherung der kardioplegen Lösung mit HBOC nachweisen, dass der Energiehaushalt der Myokardzelle, gemessen anhand des Gehalts von ATP und dessen Metabolite, durch den Zusatz von HBOC deutlich verbessert wird [79/80]. Die Autoren schlussfolgern, dass HBOC auch bei niedrigen Temperaturen im Rahmen der Kardioplegie Sauerstoff liefert, den Energiehaushalt und anabole Reaktionen verbessert, ohne den oxidativen Stress zu vermindern. Insgesamt werden zum jetzigen Zeitpunkt jedoch die direkten und indirekten Effekte von HBOC auf die myokardiale Kontraktilität nicht eindeutig beurteilt und erfordern weitere Untersuchungen, bevor ein abschließendes Urteil gefällt werden kann.

5.3.3. Methämoglobin

Beim Methämoglobin ist das Eisen-Atom im Häm-Anteil des Hämoglobins oxidiert und kann somit Sauerstoff nicht mehr binden. In vivo gibt es beim Erythrozyten des Menschen das Enzym Met-Hb-Reduktase, das diesen Vorgang revidiert. Bei Hämoglobinlösungen gibt es dieses Enzym nicht, so dass es hier vermehrt zu einem persistierenden Anstieg der Konzentration von MetHb kommen kann. Untersuchungen ergaben jedoch, dass Konzentrationen von bis zu 10 % zu keiner signifikanten Reduktion der Gewebeoxygenierung führen [81]. Dennoch wurde im Rahmen dieser Studie der Anteil von MetHb jeweils untersucht, so dass eine erhöhte Konzentration vor der Applikation sicher ausgeschlossen werden konnte. Es kam zu keiner relevanten Zunahme des MetHb nach der Applikation von HBOC-200. Die Konzentrationen blieben kontinuierlich unterhalb von 1 %.

Diese Befunde stehen im Einklang mit den Resultaten bisher publizierter Studien mit HBOC, in denen weder tierexperimentell [54] noch beim Einsatz am Menschen [35/134] klinisch relevante Konzentrationen nachgewiesen wurden. Theoretisch kann man die Oxidation des Häms durch Enzymzusatz oder Enkapsulierung von HBOC zusätzlich vermindern, damit ein noch höherer Anteil des Hämoglobins anhaltend zum Sauerstofftransport zur Verfügung steht [82/83].

5.4. Methodenkritik

5.4.1. Tierspezies

Bei der Interpretation der vorliegenden Befunde ergibt sich eine grundsätzliche Einschränkung aus der Tatsache, dass es sich bei der durchgeführten Versuchsreihe um ein Tiermodell handelt. Die Übertragbarkeit der erzielten Ergebnisse auf den Menschen ist somit immer nur eingeschränkt möglich. Das von uns eingesetzte Modell der regionalen Myokardischämie durch Ligatur eines Astes der linken Koronararterie, in unserem Fall des ersten Astes der A. circumflexa, oder der linken Koronararterie selbst ist ein vielfältig eingesetztes experimentelles Design. Bevorzugt eingesetzte Versuchstiere sind dabei Hunde [26/84/85-87], Ratten [88/89-92] oder Kaninchen [24/93-97]. Kardiale Ischämiemodelle an Schweinen [98-100] oder Schafen und Primaten [101] stellen eher eine Ausnahme dar. Kaninchen und auch Ratten zeigen im Gegensatz zu Hunden einen einheitlichen Versorgungstyp des linken Ventrikels nahezu ohne relevante Kollateralversorgung, was insbesondere zur Gewährleistung eines möglichst einheitlichen Ischämieareals vorteilhaft ist. Dies spiegelt sich im Rahmen unserer Versuchsreihe insbesondere in der nahezu identischen Größe der "Area at Risk" in allen Untersuchungsgruppen wider. Von Nachteil ist allerdings, dass Menschen und in besonderem Maße Patienten mit einer chronischen koronaren Gefäßerkrankung über zahlreiche Kollateralen verfügen, die die Folgen eines Verschlusses eines Herzkranzgefäßes oft deutlich reduzieren können [19]. Hierbei wird auch bei Patienten mit rezidivierenden Angina-pectoris-Beschwerden von einem kardialen "Preconditioning" gesprochen, welches die Auswirkungen eines akuten Gefäßverschlusses deutlich reduzieren kann. Dennoch ist das Kaninchen im myokardialen Ischämie- und Reperfusionsmodell neben der Ratte das in vergleichbaren Studien am häufigsten verwendete Tier.

Bei den eingesetzten Tieren im Rahmen einer Versuchsreihe handelt es sich im übrigen um junge, gesunde Versuchstiere mit völlig unveränderten Koronararterien.

5.4.2. Ischämie und Reperfusionszeit

Die von uns im Rahmen der Versuchsreihe gewählte Ischämiedauer von 30 Minuten ist eine übliche Zeitdauer [16/117-119], die jedoch eher im unteren Bereich des in der Literatur angegebenen Bereiches von 20-90 Minuten für kardiale Ischämie- und Reperfusionsmodelle am Kleintier liegt [86/91/102-104]. In einem zuvor durchgeführten vergleichbaren Versuchsmodell an Ratten hatten wir - aufgrund einer relativ hohen Letalität der Versuchstiere und einer gegen Ende der 30 Minuten feststellbaren Verschlechterung der kardiozirkulatorischen Parameter - die zunächst ebenso auf 30 Minuten festgelegte Ischämiezeit auf 25 Minuten reduziert [6]. Da in dem nun durchgeführten Versuch Kaninchen verwendet wurden, haben wir die Ischämiezeit erneut auf 30 Minuten festgelegt, da wir davon ausgingen, dass durch die Größe der Tiere insbesondere auch die Präparationszeit verringert werden kann und kleinere Blutungen, sowie Blutentnahmen zu den jeweiligen Messpunkten geringere Auswirkungen auf diese Tiere haben und die Tiere somit eine deutlich geringere Letalität als die Ratten aufweisen. Die gewählte Reperfusionszeit von 240 Minuten überschreitet die in zahlreichen Studien publizierte Reperfusionszeit von 120 Minuten. Primär war der Infarktnachweis mittels TTC von FISHBEIN et al. bei Hunden nach unterschiedlicher Ischämiezeit jedoch ohne Reperfusion gegenüber dem histopathologischen Standard validiert worden [28]. Grundsätzlich wird angenommen, dass die mittels TTC bestimmte Infarktgröße von der Zeitdauer der Reperfusion abhängt [105]. In einer anderen Studie konnten REFFELMANN et al. allerdings weder in der Infarktgröße noch im regionalen myokardialen Blutfluss signifikante Unterschiede zwischen 120 Minuten und 180 Minuten Reperfusion nach einer 30-minütigen Ischämiephase in einem Modell am Kaninchen nachweisen [24]. Die längere Dauer der Reperfusion in unserem Versuch liegt darin begründet, dass wir im Vorversuch an der Ratte lediglich einen Effekt der prophylaktischen Gabe von HBOC nachweisen konnten. Im nun vorliegenden Versuch wurde eine Reperfusionszeit von 240 Minuten gewählt, um eventuelle Einflüsse der therapeutischen Applikation von HBOC, welches immerhin 30 Minuten nach der prophylaktischen Gabe von HBOC während der Ischämiezeit appliziert wurde, detektieren zu können.

5.4.3. "Area at Risk" und Infarktareale

Die Größe der "Area at Risk" als Anteil des linken Ventrikels lag mit Werten um die 30% eher im unteren Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte. Andere Autoren beschreiben insbesondere für vergleichbare Versuche an Kaninchen eine Größe der "Area at Risk" zwischen 30 und 40 % [16/106]. Es werden aber auch Größen von 50-55 % der Area am linken Ventrikel beschrieben [89/107].

Allerdings existieren auch Publikationen aus etablierten Arbeitgruppen, die eine zu unseren Ergebnissen vergleichbare Größe der "Area at Risk" erzielen konnten [33]. Die Größe der "Area at Risk" ist wahrscheinlich abhängig von dem Ort, an dem die Koronarstenose angelegt wird. Je weiter proximal die Koronarstenose angelegt wird, umso ausgedehnter fällt die "Area at Risk" aus. Allerdings dürfte eine deutliche Vergrößerung der "Area at Risk" mit einer Zunahme des Mortalitätsrisikos verbunden sein. Entsprechend den Modifikationen von YE et al. zur Senkung der Mortalität bei kardialen Ischämiemodellen an der Ratte [108] haben wir in dem vorliegenden Versuch den ersten Ast der A. circumflexa unterbunden, anstatt weiter proximal gelegene, größere Anteile der linksventrikulären Koronarien zu okkludieren. In Bezug auf die Größe der Infarktareale als Anteil an der "Area at Risk" liegen die von uns erzielten Ergebnisse, zumindest was die Positiv-Kontrollgruppe betrifft, mit einer Größe von ca. 50 % quantitativ in dem Bereich, der auch von anderen Autoren angegeben wird [24/33/89/106/109].

5.4.4. Blutflussmessung

Im Gegensatz zu der von uns durchgeführten direkten Messung der Mikroperfusion erfolgte die Wirksamkeit der Koronarunterbindung in zahlreichen vergleichbaren Studien lediglich durch die visuelle Kontrolle der Abblassung, bzw. lividen Verfärbung des Myokards [89/95/106/110]. Dementsprechend wurde in diesen Versuchen die Reperfusion auch nur rein visuell kontrolliert. Mit den nun durchgeführten Messungen, insbesondere mit der Injektion von farbgekoppelten Mikrosphären, waren wir in der Lage, objektiv sowohl die Ischämie nachweisen zu können, als auch die Reperfusion anhand der mit Hilfe der Mikrosphären ermittelten Blutflusswerte zu verifizieren. In einem zuvor durchgeführten Versuch an Ratten haben wir aufgrund der Größe der Tiere auf eine Messung des Blutflusses verzichtet, da die Blutflussmessung mit regelmäßigen Blutentnahmen verbunden ist. Wenngleich dieses Verfahren prinzipiell auch an der Ratte eingesetzt werden kann [111], erschien es uns für den jetzt durchgeführten Versuch angemessen, größere Versuchstiere zu verwenden, um das Entstehen einer Anämie oder Hypovolämie durch wiederholte Blutentnahmen zu verhindern. Die für die Blutflussmessung erforderlichen Blutentnahmen sowie die benötigte Menge an Myokard zur Aufarbeitung erscheint an Tieren wie Kaninchen [16/24/33] oder Hunden [87/112] uneingeschränkt möglich zu sein. Die Messung des regionalen myokardialen Blutflusses erlaubt wiederholte Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten während des Versuchsablaufs. Es gibt allerdings noch weitere Methoden, den Blutfluss zu bestimmen, die jedoch sehr aufwendig sind und neben entsprechend hohen Kosten auch sehr erfahrene Untersucher erfordern.

Beispielsweise sei an dieser Stelle nur die Kontrastechokardiografie genannt, die nach primärem Einsatz bei Hunden [113] inzwischen auch bei Kleintieren [114] zur Anwendung kommt. Aufgrund der genannten Probleme ist dieses Verfahren allerdings noch nicht als Standardverfahren etabliert. Dies gilt ebenso für Messungen mit SPECT (Single Photon Emission-Computed Tomography), die bei Hunden validiert wurden [115], sowie die PET (Positron-Emissions-Tomographie) an der Ratte [133].

5.4.5. Ausblick

Nachdem die vorliegende Untersuchung nun erstmalig am Kaninchenmodell eine Reduktion der myokardialen Gewebeschädigung nach Ischämie und Reperfusion sowohl durch die prophylaktische als auch durch die therapeutische Applikation der bovinen Hämoglobinlösung HBOC-200 nachweisen konnte, müssen nun weitere Untersuchungen erfolgen, um die zugrunde liegenden Mechanismen zu klären. Die von uns aufgestellte Hypothese, dass die Applikation von HBOC-200 zu einer Verbesserung der Mikroperfusion führt und über diesen Mechanismus die Infarktareale reduziert werden können, wird durch unsere Ergebnisse nicht bestätigt. Es konnte durch die Messung des regionalen myokardialen Blutflusses mit Hilfe von farbgekoppelten Mikrosphären keine verbesserte Mikroperfusion nach Applikation von HBOC-200 festgestellt werden.

Es erscheint uns unbedingt notwendig, den Einfluss von zellfreiem Hämoglobin auf die Oxygenierung im Rahmen von Ischämie und Reperfusion zu untersuchen.

Zu den weiterhin in Zukunft notwendigen wissenschaftlichen Ansätzen zählen bevorzugt die Evaluation der Auswirkungen von Hämoglobinlösungen auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und das Komplementsystem. Neuere Studien deuten an, dass eine Substitution von O₂-Trägern mit HBOC-200 keine relevanten Auswirkungen auf das Immunsystem hat [122/123] bzw. die Gabe von HBOC zwar eine Erhöhung von IgG Antikörpern im Blut bewirkt, diese aber in vitro keine Hämolyse auslösen [24]. Außerdem scheint die Untersuchung der Effekte auf die Entstehung von so genannten "heat shock Proteinen" (HSP) interessant zu sein. Hierbei spielen vor allem die (kardio)-protektiven Hämoglobins beteiligt sind und insbesondere beim Einsatz einer Hämoglobinlösung relevant sein könnten.

Weitere wichtige Ansatzpunkte ergeben sich aus den sowohl therapeutischen als auch prophylaktischen Effekten der Applikation von HBOC-200. Langfristig muss vor allen Dingen das Ziel verfolgt werden, Hämoglobinlösungen in multizentrischen klinischen Studien perioperativ bei Hochrisikopatienten mit koronarer Herzkrankheit und geplanten Risikoeingriffen einzusetzen und hiermit eventuell einen neuen Weg zur Reduktion von Mortalität und Morbidität bei diesem Patientenkollektiv zu beschreiten.

6. Zusammenfassung

Kardiale Risikopatienten sind in der perioperativen Phase besonders anfällig für eine Myokardischämie, da hier Hypertension, Tachykardie und erhöhte sympathische Aktivität gehäuft vorkommen. Da das Myokard bei diesen Patienten sehr vulnerabel ist, kommt es bei der durch die hyperdynamische kardiale Reaktion bedingte Störung der Balance zwischen myokardialer Sauerstoffversorgung und myokardialem Sauerstoffverbrauch schneller zu einer Prädisposition des Myokards für Ischämie. Hier könnte sich die prophylaktische Gabe von anti-ischämischen Substanzen positiv auf das Outcome auswirken und Komplikationen wie Rhythmusstörungen oder Angina pectoris bis hin zum Myokardinfarkt mit hoher Letalität verhindern oder zumindest vermindern.

In vorherigen Studien konnte gezeigt werden, dass eine prophylaktische Gabe der zellfreien Hämoglobinlösung HBOC-200 im Ischämie- und Reperfusionsmodell bei der Ratte zu einer signifikanten Reduktion des Infarktareals innerhalb des infarktgefährdeten Gebietes führt [6]. Die Mechanismen sind dabei aber noch unklar. HBOC scheint neben der Gewebsoxygenierung einen weiteren gewebeprotektiven Effekt im Rahmen von Ischämie und Reperfusion am Myokard zu haben.

In der vorliegenden Arbeit sollte nun im Kaninchenmodell die Hypothese überprüft werden, ob der nachgewiesene Effekt von HBOC-200 auf das Infarktareal mit einem erhöhten regionalen myokardialen Blutfluss einhergeht.

Es konnte gezeigt werden, dass sowohl die prophylaktische als auch die therapeutische Gabe von HBOC-200 zu einer signifikanten Reduzierung des Infarktareals innerhalb des infarktgefährdeten Gebietes führt. Dieser Effekt konnte in einer vorherigen Versuchsreihe an der Ratte nur bei der prophylaktischen Gabe festgestellt werden. Die Hypothese, dass dieser Effekt durch einen erhöhten myokardialen Blutfluss zu erklären ist, bestätigte sich jedoch nicht. Es konnte keine Erhöhung des regionalen myokardialen Blutflusses mittels Mikrosphärentechnik gemessen werden. Somit erscheinen weitere Untersuchungen notwendig, um den gezeigten Effekt von HBOC-200 auf das Infarktvolumen zu erklären.

7. Literatur

- Christopherson R, Beattie C, Frank SM, Norris EJ, Meinert CL, Gottlieb SO, Yates H, Rock P, Parker SD, Perler BA. Perioperative morbidity in patients randomized to epidural or general anesthesia for lower extremity vascular surgery. Perioperative Ischemia Randomized Anesthesia Trial Study Group [see comments]. *Anesthesiology.* 1993;79:422-34.
- Landesberg G, Luria MH, Cotev S, Eidelman LA, Anner H, Mosseri M, Schechter D, Assaf J, Erel J, Berlatzky Y. Importance of long-duration postoperative STsegment depression in cardiac morbidity after vascular surgery. *Lancet.* 1993;341:715-9.
- Mangano DT, Browner WS, Hollenberg M, London MJ, Tubau JF, Tateo IM. Association of perioperative myocardial ischemia with cardiac morbidity and mortality in men undergoing noncardiac surgery. The Study of Perioperative Ischemia Research Group. N Engl J Med. 1990;323:1781-8.
- 4. Böttiger BW, Martin E. Prävention perioperativer Myokardischämien ein Update. *Anaesthesist.* 2000;49:174-86.
- 5. Spahn DR, Kocian R. Artificial O2 carriers: Status in 2005. *Curr Pharm Des.* 2005;11(31):4099-114
- Burmeister M, Rempf C, Standl T, Rehberg S, Bartsch-Zwemke S, Krause T, Tuszynski S, Gottschalk A, Schulte am Esch J. Effects of prophylactic or therapeutic application of bovine haemoglobin HBOC-200 on ischaemiareperfusion injury following acute coronary ligature in rats. *Br J Anaesth.* 2005;95:737-745.
- 7. Pape A, Habler O. Alternatives to allogeneic blood transfusions. *Best Pract Res Clin Anaesthesiol.* 2007;21(2):221-39.
- Niquille M, Touzet M, Leblanc I, Baron JF. Reversal of intraoperative myocardial ischemia with a hemoglobin-based oxygen carrier. *Anesthesiology*. 2000;92:882-5.
- 9. Moss GS, DeWoskin R, Cochin A. Stroma-free hemoglobin. I. Preparation and observations on in vitro changes in coagulation. *Surgery*. 1973;74:198-203.
- 10. Friedman HI, DeVenuto F, Zuck TF, Mellick P, Lollini L. Histologic and ultrastructural effects of stroma-free hemoglobin solutions on rat liver, kidney, and brain. *Surg Forum.* 1977;28:3-5.
- 11. Savitsky JP, Doczi J, Black J, Arnold JD. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther.* 1978;23:73-80.
- Dimino ML, Palmer AF. Hemoglobin-Based O2 Carrier O2 Affinity and Capillary Inlet pO2 Are Important Factors That Influence O2 Transport in a Capillary. *Biotechnol Prog.* 2007;23(4):921-31. Epub 2007 Jun 8.

- Gulati A, Sharma AC, Singh G. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit Care Med.* 1996;24:137-47.
- 14. Gulati A, Singh G, Rebello S, Sharma AC. Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci.* 1995;56:1433-42.
- 15. Spence RPL, Swisher SN, Kleinman S. Blood substitutes. Clinical Practice of Transfusion Medicine. In. 3 ed. New York: *Churchill Livingstone;* 1996:967-84.
- Hale SL, Hammerman H, Kloner RA. Effect of two perfluorocarbon emulsions on reperfusion injury after coronary artery occlusion in rabbits. *Basic Res Cardiol.* 1995;90:404-9.
- 17. Standl T, Freitag M, Burmeister MA, Horn EP, Wilhelm S, Schulte Am Esch J. Hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 provides higher and faster increase in oxygen tension in skeletal muscle of anemic dogs than do stored red blood cells. *J Vasc Surg.* 2003;37:859-65.
- Standl T, Horn P, Wilhelm S, Greim C, Freitag M, Freitag U, Sputtek A, Jacobs E, Schulte am Esch J. Bovine haemoglobin is more potent than autologous red blood cells in restoring muscular tissue oxygenation after profound isovolaemic haemodilution in dogs. *Can J Anaesth.* 1996;43:714-23.
- 19. Hort W. Pathologie des akuten Herzinfarktes. *Internist.* 2001;42:631-40.
- 20. Mangano DT, Layug EL, Wallace A, Tateo I. Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *N Engl J Med.* 1996;335:1713-20.
- Wallace A, Layug B, Tateo I, Li J, Hollenberg M, Browner W, Miller D, Mangano DT. Prophylactic atenolol reduces postoperative myocardial ischemia. McSPI Research Group. *Anesthesiology*. 1998;88:7-17.
- 22. Poldermans D, Boersma E, Bax JJ, Thomson IR, Paelinck B, van de Ven LL, Scheffer MG, Trocino G, Vigna C, Baars HF, van Urk H, Roelandt JR. Bisoprolol reduces cardiac death and myocardial infarction in high-risk patients as long as 2 years after successful major vascular surgery. *Eur Heart J.* 2001;22:1353-8.
- 23. Ito WD, Schaarschmidt S, Klask R, Hansen S, Schafer HJ, Mathey D, Bhakdi S. Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J Mol Cell Cardiol.* 1997;29:2169-75.
- 24. Hamilton RG, Kickler TS. Bovine hemoglobin (glutamer-250, Hemopure)-specific immunoglobulin G antibody cross-reacts with human hemoglobin but does not lyse red blood cells in vitro. *Transfusion.* 2007;47(4):723-8.

- 25. Wilkinson PL, Moyers JR, Ports T, Chatterjee K, Ullyott D, Hamilton WK. Ratepressure product and myocardial oxygen consumption during surgery for coronary artery bypass. *Circulation*. 1979;60:170-3.
- 26. Hale SL, Alker KJ, Kloner RA. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation.* 1988;78:428-34.
- Patton JN, Palmer AF. Numerical simulation of oxygen delivery to muscle tissue in the presence of hemoglobin-based oxygen carriers. *Biotechnol Prog.* 2006;22(4):1025-49.
- 28. Fishbein MC, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J.* 1981;101:593-600.
- 29. Klein HH, Puschmann S, Schaper J, Schaper W. The mechanism of tetrazolium reaction in identifying experimental myocardial infarction. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol.* 1981;393:287-297.
- 30. Freitag M, Standl T, Gottschalk A, Burmeister MA, Rempf C, Horn EP, Strate T, Schulte Am Esch J. Enhanced central organ oxygenation after application of bovine cell-free hemoglobin HBOC-201. *Can J Anaesth.* 2005;52(9):904-14.
- Standl T. Autologous transfusion from euphoria to reason: clinical practice based on scientific knowledge (Part IV). Artificial oxygen carriers: cell-free hemoglobin solutions - current status 2004. *Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2005;40(1):38-45.
- 32. Standl T. A new oxygen transport agent. *Haematologica*. 2005;90(4):437-8
- 33. Reffelmann T, Kloner RA. Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:H1099-107.
- 34. Rezkalla SH, Kloner RA. No-reflow phenomenon. *Circulation.* 2002;105:656-62.
- 35. Summers WK, Jamison RL. The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Lab Invest.* 1971;25:635-43.
- Manciet LH, Poole DC, McDonagh PF, Copeland JG, Mathieu-Costello O. Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for noreflow phenomenon. *Am J Physiol.* 1994;266:H1541-50.
- 37. Gavin JB, Thomson RW, Humphrey SM, Herdson PB. Changes in vascular morphology associated with the no-reflow phenomenon in ischaemic myocardium. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1983;399:325-32.

- 38. Nellis SH, Roberts BH, Kinney EL, Field J, Ummat A, Zelis R. Beneficial effect of dexamethasone on the "no reflow" phenomenon in canine myocardium. *Cardiovasc Res.* 1980;14:137-41.
- Willerson JT, Powell WJ, Jr., Guiney TE, Stark JJ, Sanders CA, Leaf A. Improvement in myocardial function and coronary blood flow in ischemic myocardium after mannitol. *J Clin Invest.* 1972;51:2989-98.
- 40. Nolte D, Botzlar A, Pickelmann S, Bouskela E, Messmer K. Effects of diaspirincross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med.* 1997;130:314-27.
- 41. Pickelmann S, Nolte D, Leiderer R, Schutze E, Messmer K. Attenuation of postischemic reperfusion injury in striated skin muscle by diaspirin-cross-linked Hb. *Am J Physiol.* 1998;275:H361-8.
- 42. Strate T, Freitag M, Kleinhans H, Mann O, Schneider C, Yekebas E, Bloechle C, Standl T, Knoefel WT, Izbicki JR. Isovolemic hemodilution with HES and bovine hemoglobin improves pancreatic microcirculation, tissue oxygenation and survival in a porcine model of severe acute pancreatitis. *Pancreas.* 2003;27:413.
- 43. Tremper KK. Perfluorochemical "blood substitutes". *Anesthesiology*. 1999;91:1185-7.
- Spahn DR, van Brempt R, Theilmeier G, Reibold JP, Welte M, Heinzerling H, Birck KM, Keipert PE, Messmer K. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. European Perflubron Emulsion Study Group. *Anesthesiology*. 1999;91:1195-208.
- 45. Spahn DR, Waschke KF, Standl T, Motsch J, Van Huynegem L, Welte M, Gombotz H, Coriat P, Verkh L, Faithfull S, Keipert P, European Perflubron Emulsion in Non-Cardiac Surgery Study Group. Use of perflubron emulsion to decrease allogeneic blood transfusion in high-blood-loss non-cardiac surgery: results of a European phase 3 study. *Anesthesiology*. 2002;97:1338-49.
- 46. Spahn DR. Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit Care (Lond).* 1999;3:R93-R97.
- 47. Noveck RJ, Shannon EJ, Leese PT, Shorr JS, Flaim KE, Keipert PE, Woods CM. Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. II. Effects on immune function in healthy volunteers. *Anesth Analg.* 2000;91:812-22.
- 48. Leese PT, Noveck RJ, Shorr JS, Woods CM, Flaim KE, Keipert PE. Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. I. Effects on coagulation function in healthy volunteers. *Anesth Analg.* 2000;91:804-11.

- 49. Strate T, Kleinhans H, Mann O, Schneider C, Standl T, Izbicki JR, Bloechle C. Therapy of microcirculatory dysfunction in acute pancreatitis with i.v. application of bovine hemoglobin in the rat. *Gastroenterology*. 2000;118:A-302 (1677).
- 50. Strate T, Mann O, Kleinhans H, Schneider C, Knoefel WT, Yekebas E, Standl T, Bloechle C, Izbicki JR. Systemic intravenous infusion of bovine hemoglobin significantly reduces microcirculatory dysfunction in experimentally induced pancreatitis in the rat. *Ann Surg.* 2003;238:765-71.
- Strate T, Mann O, Standl T, Izbicki JR, Knoefel WT. Der Stellenwert von HBOC bei der akuten Pankreatitis. *Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 2001;36 Suppl 2:S119-20.
- 52. Freitag M, Standl T, Kleinhans H, Gottschalk A, Mann O, Rempf C, Bachmann K, Gocht A, Petri S, Izbicki JR, Strate T. Improvement of impaired microcirculation and tissue oxygenation by hemodilution with hydroxyethyl starch plus cell-free hemoglobin in acute porcine pancreatitis. *Pancreatology*. 2006:6(3):232-9.
- 53. Saetzler RK, Arfors KE, Tuma RF, Vasthare U, Ma L, Hsia CJ, Lehr HA. Polynitroxylated hemoglobin-based oxygen carrier: inhibition of free radicalinduced microcirculatory dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1-6.
- 54. Standl TG, Reeker W, Redmann G, Kochs E, Werner C, Schulte am Esch J. Haemodynamic changes and skeletal muscle oxygen tension during complete blood exchange with ultrapurified polymerized bovine haemoglobin. *Intensive Care Med.* 1997;23:865-72.
- 55. Horn EP, Standl T, Wilhelm S, Jacobs EE, Freitag U, Freitag M, Schulte am Esch J. Bovine hemoglobin increases skeletal muscle oxygenation during 95% artificial arterial stenosis. *Surgery.* 1997;121:411-8.
- Horn EP, Standl T, Wilhelm S, Jacobs EE, Freitag U, Freitag M, Schulte am Esch J. Bovines Hämoglobin: HBOC-201 verhindert eine Reduktion des Sauerstoffpartialdrucks im poststenotischen Skelettmuskel. *Anaesthesist.* 1998;47:116-23.
- 57. Horn EP, Standl T, Burmeister MA, Bangert K, Gottschalk A, Schulte am Esch J. Additional augmentation of liver tissue oxygen tension following hemodilution with bovine hemoglobin. *Anesth Analg.* 2000;90:427.
- 58. Burmeister M, Bangert K, Horn E, Arnold G, Standl T, Schulte am Esch J. Prophylaxe mit bovinem Hämoglobin reduziert den myokardialen tpO2-Abfall und Myokardschäden unter akuter Korornarstenose im Tiermodell. Anaesth Intensivmed. 2001;42: 473.
- Horn EP, Burmeister M. Gewebsoxygenierung unter bovinem Hämoglobin (HBOC-201) bei peripherer und koronararterieller Stenose nach Hämodilution. *Anaesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2001;36:S117-8.

- 60. Bangert K, Burmeister MA, Horn EP, Standl T, Jacobs EE, Schulte am Esch J. HBOC-201 verbessert das myokardiale Kontraktionsverhalten unter Anämie im Koronarstenosemodell bei dem Hund. *Anästh Intensivmed.* 2000;41:481.
- Fleisher LA, Nelson AH, Rosenbaum SH. Postoperative myocardial ischemia: etiology of cardiac morbidity or manifestation of underlying disease? *J Clin Anesth.* 1995;7:97-102.
- 62. Sprung J, Kindscher JD, Wahr JA, Levy JH, Monk TG, Moritz MW, O'Hara PJ. The use of bovine hemoglobin glutamer-250 (Hemopure) in surgical patients: results of a multicenter, randomized, single-blinded trial. *Anesth Analg.* 2002;94:799-808, table of contents.
- 63. Levy JH. The use of haemoglobin glutamer-250 (HBOC-201) as an oxygen bridge in patients with acute anaemia associated with surgical blood loss. *Expert Opin Biol Ther.* 2003;3:509-17.
- 64. Gonzalez P, Hackney AC, Jones S, Strayhorn D, Hoffman EB, Hughes G, Jacobs EE, Orringer EP. A phase I/II study of polymerized bovine hemoglobin in adult patients with sickle cell disease not in crisis at the time of study. *J Investig Med.* 1997;45:258-64.
- Standl T. Arificial Oxygen Carriers as Red Blood Cell Substitutes -Perfluorocarbons and Cell-Free Hemoglobin. *Infusionsther Transfusionsmed*. 2000;27:128-137.
- Hoeft A, Sonntag H, Stephan H, Kettler D. Validation of myocardial oxygen demand indices in patients awake and during anesthesia. *Anesthesiology*. 1991;75:49-56.
- 67. Kahles H, Dreyling M, Kaposciok J, Riegger AJ, Schanzenbacher P, Kromer EP, Maisch B, Kochsiek K. Validation of indirect myocardial parameters of oxygen consumption in patients with normal and pathologically changed ventricular function. *Z Kardiol.* 1989;78:285-93.
- 68. Moffitt EA, Sethna DH, Gray RJ, DeRobertis M, Matloff JM, Bussell JA. Ratepressure product correlates poorly with myocardial oxygen consumption during anaesthesia in coronary patients. *Can Anaesth Soc J.* 1984;31:5-12.
- 69. Hess JR, MacDonald VW, Brinkley WW. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol.* 1993;74:1769-78.
- 70. Ning J, Anderson PJ, Biro GP. Resuscitation of bled dogs with pyridoxalatedpolymerized hemoglobin solution. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1992;20:525-30.
- Krieter H, Hagen G, Waschke KF, Kohler A, Wenneis B, Bruckner UB, van Ackern K. Isovolemic hemodilution with a bovine hemoglobin-based oxygen carrier: effects on hemodynamics and oxygen transport in comparison with a nonoxygen-carrying volume substitute. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1997;11:3-9.

- 72. Standl T, Wilhelm S, Horn EP, Burmeister M, Gundlach M, Schulte am Esch J. Präoperative Hämodilution mit bovinem Hämoglobin: Akute hämodynamische Auswirkungen bei Patienten in der Leberchirurgie. *Anaesthesist.* 1997;46:763-70.
- 73. Kasper SM, Grune F, Walter M, Amr N, Erasmi H, Buzello W. The effects of increased doses of bovine hemoglobin on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg.* 1998;87:284-91.
- 74. Kasper SM, Walter M, Grune F, Bischoff A, Erasmi H, Buzello W. Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg.* 1996;83:921-7.
- 75. Kim HW, Feola M, Rowley BA, Roberts LA. Effects of hemoglobin perfusion on contractile function of the isolated ventricular septa. *Biomater Artif Cells Artif Organs.* 1988;16:331-45.
- 76. Walter SV, Chang TM. Chronotropic effects of in vitro perfusion with albumin, stroma-free hemoglobin, and polyhemoglobin solutions. *Biomater Artif Cells Artif Organs.* 1990;18:283-98.
- 77. Motterlini R, Macdonald VW. Cell-free hemoglobin potentiates acetylcholineinduced coronary vasoconstriction in rabbit hearts. *J Appl Physiol.* 1993;75:2224-33.
- 78. Hodakowski GT, Page RD, Harringer W, Jacobs EE, Jr., LaRaia PJ, Svizzero T, Guerrero JL, Austen WG, Vlahakes GJ. Ultra-pure polymerized bovine hemoglobin blood substitute: effects on the coronary circulation. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1992;20:669-72.
- 79. Carlucci F, Miraldi F, Barretta A, Marullo AG, Marinello E, Tabucchi A. Preservation of myocardial energy status by bovine hemoglobin solutions during ischemia. *Biomed Pharmacother.* 2002;56:247-53.
- 80. Marinello E, Tabucchi A, Miraldi F, Barretta A, Rosi F, Carlucci F. Role of bovine hemoglobin enriched cardioplegia in myocardial preservation. *Adv Exp Med Biol.* 2000;486:171-4.
- 81. Linberg R, Conover CD, Shum KL, Shorr RG. Hemoglobin based oxygen carriers: how much methemoglobin is too much? *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1998;26:133-48.
- 82. D'Agnillo F, Chang TM. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nat Biotechnol.* 1998;16:667-71.
- 83. Yang T, Olsen KW. Enzymatic protection from autoxidation for crosslinked hemoglobins. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22:709-17.

- 84. Ambrosio G, Weisman HF, Mannisi JA, Becker LC. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation.* 1989;80:1846-61.
- 85. Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 1974;54:1496-508.
- Virmani R, Kolodgie FD, Osmialowski A, Zimmerman P, Mergner W, Forman MB.
 Myocardial protection by perfluorochemical infusion during transient ischemia iproduced by balloon coronary occlusion. *Am Heart J*. 1988;116:421-31.
- 87. Rolf N, Meissner A, Van Aken H, Weber TP, Hammel D, Mollhoff T. The effects of thoracic epidural anesthesia on functional recovery from myocardial stunning in propofol-anesthetized dogs. *Anesth Analg.* 1997;84:723-9.
- 88. Takashi E, Ashraf M. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:209-24.
- 89. Okamura T, Miura T, Takemura G, Fujiwara H, Iwamoto H, Kawamura S, Kimura M, Ikeda Y, Iwatate M, Matsuzaki M. Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovasc Res.* 2000;45:642-50.
- 90. Ji LL, Fu RG, Waldrop TG, Liu KJ, Swartz HM. Myocardial response to regional ischemia and reperfusion in vivo in rat heart. *Can J Physiol Pharmacol.* 1993;71:811-7.
- 91. Schwarz ER, Somoano Y, Hale SL, Kloner RA. What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat? *J Thromb Thrombolysis.* 2000;10:181-7.
- 92. Vivaldi MT, Kloner RA, Schoen FJ. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol.* 1985;121:522-30.
- 93. Farb A, Kolodgie FD, Jenkins M, Virmani R. Myocardial infarct extension during reperfusion after coronary artery occlusion: pathologic evidence. *J Am Coll Cardiol.* 1993;21:1245-53.
- 94. Sterling DL, Thornton JD, Swafford A, Gottlieb SF, Bishop SP, Stanley AW, Downey JM. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo. *Circulation.* 1993;88:1931-6.
- 95. Currie RW, Tanguay RM, Kingma JG, Jr. Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation*. 1993;87:963-71.
- 96. Xuan YT, Tang XL, Qiu Y, Banerjee S, Takano H, Han H, Bolli R. Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H2360-71.

- 97. Krenz M, Cohen MV, Downey JM. The protective and anti-protective effects of ethanol in a myocardial infarct model. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:103-14.
- 98. Naslund U, Haggmark S, Johansson G, Reiz S. Quantification of myocardium at risk and detection of reperfusion by dynamic vectorcardiographic ST segment monitoring in a pig occlusion-reperfusion model. *Cardiovasc Res.* 1993;27:2170-8.
- 99. Naslund U, Haggmark S, Johansson G, Marklund SL, Reiz S. A closed-chest myocardial occlusion-reperfusion model in the pig: techniques, morbidity and mortality. *Eur Heart J.* 1992;13:1282-9.
- 100. Habler O, Kleen M, Pape A, Meisner F, Kemming G, Messmer K. Diaspirincrosslinked hemoglobin reduces mortality of severe hemorrhagic shock in pigs with critical coronary stenosis. *Crit Care Med.* 2000;28:1889-98.
- 101. Premaratne S, Harada RN, Chun P, Suehiro A, McNamara JJ. Effects of perfluorocarbon exchange transfusion on reducing myocardial infarct size in a primate model of ischemia-reperfusion injury: a prospective, randomized study. *Surgery*. 1995;117:670-6.
- 102. Schneider S, Chen W, Hou J, Steenbergen C, Murphy E. Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H499-508.
- 103. Lauerma K, Saeed M, Wendland MF, Derugin N, Yu KK, Higgins CB. Verapamil reduces the size of reperfused ischemically injured myocardium in hypertrophied rat hearts as assessed by magnetic resonance imaging. *Am Heart J.* 1996;131:14-23.
- 104. Richard V, Tron C, Blanc T, Thuillez C. Infarct size-limiting properties of Ro 40-5967, a novel nondihydropyridine calcium channel, in anesthetized rats: comparison with verapamil. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1995;25:552-7.
- 105. Arnold G, Kaiser C, Fischer R, Pedal I, Oehmichen M, Baroldi G, Stahl E, Reichenbach DD, Benditt EP, Hayakawa BN, Jorgensen AO, Gotlieb AI, Zhao MS, Liew CC, Milei J, Nunez RG, Rapaport M, Penttila A, Liesto K, Doran JP, Howie AJ, Townend JN, Bonser RS, Itoh G, Tamura J, Suzuki M, Suzuki Y, Ikeda H, Koike M, Nomura M, Jie T, Ito K, Salinas-Madrigal L, Bruk A, deMello DE, Hatt PY, Hohmann P, Siegel RJ, Fishbein MC, Kloner RA, Darsee JR, DeBoer LW, Carlson N, Holmbom B, Naslund U, Eriksson A, Virtanen I, Thornell LE, Edston E, Kawa K, Herscher LL, Said JW, Edwalds GM, Moran MM, Meerbaum S, Rit J, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Corday E, Ganz W. Myofibrillar degeneration a common type of myocardial lesion and its selective identification by a modified luxol fast blue stain. *Pathol Res Pract.* 1985;180:405-15.

- Rice HE, Virmani R, Hart CL, Kolodgie FD, Farb A. Dose-dependent reduction of myocardial infarct size with the perfluorochemical Fluosol-DA. *Am Heart J.* 1990;120:1039-46.
- 107. Fryer RM, Eells JT, Hsu AK, Henry MM, Gross GJ. Ischemic preconditioning in rats: role of mitochondrial K(ATP) channel in preservation of mitochondrial function. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:H305-12.
- 108. Ye J, Yang L, Sethi R, Copps J, Ramjiawan B, Summers R, Deslauriers R. A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality. *Mol Cell Biochem.* 1997;176:227-33.
- 109. Fryer RM, Hsu AK, Nagase H, Gross GJ. Opioid-induced cardioprotection against myocardial infarction and arrhythmias: mitochondrial versus sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294:451-7.
- 110. Yamashita N, Hoshida S, Otsu K, Taniguchi N, Kuzuya T, Hori M. Monophosphoryl lipid A provides biphasic cardioprotection against ischaemia-reperfusion injury in rat hearts. *Br J Pharmacol.* 1999;128:412-8.
- 111. Koerner JE, Terjung RL. Effect of physical training on coronary collateral circulation of the rat. *J Appl Physiol.* 1982;52:376-87.
- 112. Rolf N, Van de Velde M, Wouters PF, Mollhoff T, Weber TP, Van Aken HK. Thoracic epidural anesthesia improves functional recovery from myocardial stunning in conscious dogs. *Anesth Analg.* 1996;83:935-40.
- 113. Galiuto L, DeMaria AN, May-Newman K, Del Balzo U, Ohmori K, Bhargava V, Flaim SF, Iliceto S. Evaluation of dynamic changes in microvascular flow during ischemia-reperfusion by myocardial contrast echocardiography. J Am Coll Cardiol. 1998;32:1096-101.
- 114. Oshita A, Ohmori K, Yu Y, Kondo I, Takeuchi H, Takagi Y, Wada Y, Yukiiri K, Mizushige K, Kohno M. Myocardial blood flow measurements in rats with simple pulsing contrast echocardiography. *Ultrasound Med Biol.* 2002;28:459-66.
- 115. Rumsey WL, Kuczynski B, Patel B, Bauer A, Narra RK, Eaton SM, Nunn AD, Strauss HW. SPECT imaging of ischemic myocardium using a technetium-99mnitroimidazole ligand. *J Nucl Med.* 1995;36:1445-50.
- 116. Vetterlein F, Prange M, Lubrich D, Pedina J, Neckel M, Schmidt G. Capillary perfusion pattern and microvascular geometry in heterogeneous hypoxic Areas of hypoperfused rat myocardium. *Am J Physiol.* 1995;268:H2183-94.
- 117. Reffelmann T, Kloner RA. Effects of adenosine and verapamil on anatomic noreflow in a rabbit model of coronary artery occlusion and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43:580-8.
- 118. Hale SL, Dave RH, Kloner RA. Regional hypothermia reduces myocardial necrosis even when instituted after the onset of ischemia. *Basic Res Cardiol.* 1997;92:351-7.

- 119. Hale SL, Kloner RA. Effect of early coronary artery reperfusion on infarct development in a model of low collateral flow. *Cardiovasc Res.* 1987;21:668-73.
- 120. Sellards A, Minot G. Injection of Haemoglobin in man and its relation to blood destruction, with especial reference to the anaemias. *J Med Res.* 1916;34:469-494.
- 121. Schultz SC, Grady B, Cole F, Hamilton I, Burhop K, Malcolm DS. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med.* 1993;122:301-8.
- 122. Dong F, Hall CH, Golech SA, Philbin NB, Rice JP, Gurney J, Arnaud FG, Hammett M, Ma X, Flournoy WS, Hong J, Kaplan LJ, Pearce LB, McGwin G, Ahlers S, McCarron R, Freilich D. Immune effects of resuscitation with HBOC-201, a hemoglobin-based oxygen carrier, in swine with moderately severe hemorrhagic shock from controlled hemorrhage. *Shock.* 2006;25(1):50-5
- 123. Hall C, Malkevich N, Handrigan M, Vandermolen C, Aranaud F, Hong J, Dong F, Rice J, Philbin N, Ahlers S, McCarron R, Freilich D, McGwin G, Flournoy WS, Pearce LB. Innate immune responses in Swine resuscitated from severe traumatic hemorrhagic shock with hemoglobin-based oxygen carrier-201. Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol. 2007;35(3):259-74.
- 124. Kowallik P, Schulz R, Guth BD, Schade A, Paffhausen W, Gross R, Heusch G. Measurement of regional myocardial blood flow with multiple colored microspheres. *Circulation*. 1991;83:974-82.
- 125. Bartrum RJ, Jr., Berkowitz DM, Hollenberg NK. A simple radioactive microsphere method for measuring regional flow and cardiac output. *Invest Radiol.* 1974;9:126-32.
- 126. Utley J, Carlson EL, Hoffman JI, Martinez HM, Buckberg GD. Total and regional myocardial blood flow measurements with 25 micron, 15 micron, 9 micron, and filtered 1-10 micron diameter microspheres and antipyrine in dogs and sheep. *Circ Res.* 1974;34:391-405.
- 127. Hof RP, Wyler F, Stalder G. Validation studies for the use of the microsphere method in cats and young minipigs. *Basic Res Cardiol.* 1980;75:747-56.
- 128. Björkholm M, Fagrell B, Przybelski R, Winslow N, Young M, Winslow RM. A phase I single blind clinical trial of a new oxygen transport agent (MP4), human hemoglobin modified with maleimide-activated polyethylene glycol. *Haematologica*. 2005;90(4):505-15.
- 129. Olofsson C, Ahl T, Johansson T, Larsson S, Nellgård P, Ponzer S, Fagrell B, Przybelski R, Keipert P, Winslow N, Winslow RM. A multicenter clinical study of the safety and activity of maleimide-polyethylene glycol-modified Hemoglobin (Hemospan) in patients undergoing major orthopedic surgery. *Anesthesiology*. 2006;105(6):1153-63

- 130. Young MA, Malavalli A, Winslow N, Vandegriff KD, Winslow RM. Toxicity and hemodynamic effects after single dose administration of MalPEG-hemoglobin (MP4) in rhesus monkeys. *Transl Res.* 2007;149(6):333-42.
- 131. Reffelmann T, Hale SL, Li G, Kloner RA. Relationship between no reflow and infarct size as influenced by the duration of ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H766-72.
- 132. Agarwal YP, Freedman M, Szczepiorkowski ZM. Long-term transfusion of polymerized bovine hemoglobin in a Jehovah's Witness following chemotherapy for myeloid leukemia: a case report. *Transfusion.* 2005;45(11):1735-8.
- 133. Awasthi V, Yee SH, Jerabek P, Goins B, Phillips WT. Cerebral oxygen delivery by liposome-encapsulated hemoglobin: a positron-emission tomographic evaluation in a rat model of hemorrhagic shock. *J Appl Physiol.* 2007;103(1):28-38.
- Standl T, Burmeister MA, Horn EP, Wilhelm S, Knoefel WT, Schulte am Esch J. Bovine haemoglobin-based oxygen carrier for patients undergoing haemodilution before liver resection. *Br J Anaesth.* 1998;80(2):189-94.

8. Anhang

8.1. Tabellen

8.1.1. Gewicht

Tabelle 8.1: Darstellung des Körpergewichts der Versuchstiere (MW±SD)

	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Gewicht (kg)	3,05±0,1	3,09±0,1	3,13±0,1	3,12±0,1

8.1.2. Hämodynamik und Körpertemperatur

Tabelle 8.2: Darstellung der Herzfrequenz der Versuchstiere (MW±SD, 1/min, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)

HF (1/min)	Negativ-Kont.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	214±12	227±29	206±21	221±31
Applikation 1 + 5 min	215±14	226±20	212±23	217±35
Applikation 1 + 15 min	217±12	219±17	212±23	194±35
Applikation 1 + 25 min	223±5	228±14*	214±22	188±37
Ligatur + 5 min	225±4	221±37	221±24	196±36
Applikation 2	226±8	215±17	190±31	194±37
Ligatur + 20 min	221±25	233±26*	202±22	193±31
Ligatur + 25 min	224±24	241±24*#	196±27	203±33
Reperfusion + 2 min	229±13	238±24#	189±23	191±33
Reperfusion + 10 min	241±15*	232±30*	206±25	194±28
Reperfusion + 20 min	238±13	239±26#	195±27	203±36
Reperfusion + 30 min	234±18	242±20*#	202±28	203±30
Reperfusion + 40 min	228±16	243±16*#	203±27	199±24
Reperfusion + 50 min	227±14	245±20*#	207±22	207±22
Reperfusion + 60 min	233v12	249±19*#	205±27	209±22
Reperfusion + 90 min	229±24	255±26*#	202±19	213±21
Reperfusion + 120 min	240±18	240±32#	203±17	210±25
Reperfusion + 150 min	238±22*	245±29*#	207±22	201±21
Reperfusion + 180 min	237±20*	236±21*#	191±40	188±24
Reperfusion + 210 min	240±10	243±25#	214±24	210±21
Reperfusion + 240 min	235±19	244±23*	208±25	212±21

MAP (mmHg)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	65±7	56±9	62±7	62±10
Applikation 1 + 5 min	63±9	57±7	61±9	64±10
Applikation 1 + 15 min	62±4*	58±4*	60±6*	74±10
Applikation 1 + 25 min	60±6	61±8	59±5*	72±11
Ligatur + 5 min	61±6	59±7*	61±5	73±12
Applikation 2	63±5	56±7*	54±7*	72±12
Ligatur + 20 min	63±9	54±9	60±13	69±13
Ligatur + 25 min	61±4	54±6	61±11	69±11
Reperfusion + 2 min	58±2	51±8*	64±7	68±11
Reperfusion + 10 min	57±3	49±5*#	59±9	66±10
Reperfusion + 20 min	59±6	50±5*	60±8	65±12
Reperfusion + 30 min	57±5	49±5*	58±10	64±13
Reperfusion + 40 min	56±5	50±3	59±9	59±18
Reperfusion + 50 min	57±3	51±4*	58±5	65±13
Reperfusion + 60 min	56±3	52±4*	59±5	65±13
Reperfusion + 90 min	55±3	52±5*	57±6	65±11
Reperfusion + 120 min	56±3	51±6*	57±6	64±11
Reperfusion + 150 min	55±3	50±4*	57±9	61±8
Reperfusion + 180 min	54±4	50±5	54±9	61±10
Reperfusion + 210 min	51±8	48±4	57±14	58±12
Reperfusion + 240 min	55±	48±6	54±14	62±15

Tabelle 8.3: Darstellung der mittleren arteriellen Druckwerte (MW±SD, mmHg, *p<0,05 vs. Prophylaxe)

RPP (mmHg)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	23,1±2	24,5±3	23,0±3	25,5±6
Applikation 1 + 5 min	24,6±3	23,4±3	23,1±3	23,9±6
Applikation 1 + 15 min	24,5±2	24,7±3	23,5±3	23,3±7
Applikation 1 + 25 min	25,2±2	25,8±3	23,7±3	22,5±7
Ligatur + 5 min	24,1±2	24,5±5	23,8±4	22,9±7
Applikation 2	24,9±2	21,8±3	19,2±5	22,5±6
Ligatur + 20 min	24,8±3	25,3±4	22,3±5	21,6±5
Ligatur + 25 min	25,3±3	25,8±3	20,4±4	22,9±6
Reperfusion + 2 min	25,4±4	23,7±4	19,8±3	21,1±5
Reperfusion + 10 min	27,3±3*	23,6±3	22,1±4	21,4±4
Reperfusion + 20 min	25,7±2	22,9±4	20,3±3	22,1±6
Reperfusion + 30 min	24,9±4	23,7±3	21,6±4	22,2±5
Reperfusion + 40 min	24,9±1	24,4±3	21,6±4	22,6±4
Reperfusion + 50 min	24,4±1	24,3±3	22,1±4	22,6±4
Reperfusion + 60 min	25,1±2	24,9±3	21,5±3	23,1±5
Reperfusion + 90 min	24,8±4	25,5±3	21,4±3	24,2±4
Reperfusion + 120 min	25,6±3	24,0±3	21,4±3	24,2±4
Reperfusion + 150 min	25,4±3	24,5±3	21,7±2	22,6±2
Reperfusion + 180 min	25,1±2	24,2±3	20,1±5	21,7±4
Reperfusion + 210 min	25,5±3	24,9±3	22,4±3	24,1±3
Reperfusion + 240 min	23,9±5	23,8±3	22,5±5	23,6±5

Tabelle 8.4: Rate Pressure Product (RPP) (MW±SD, *p<0,05 vs. Prophylaxe)</th>

Tabelle 8.5: Rektale Körpertemperatur

°Celsius	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	38,2±0,3	38,2±0,6	37,9±0,6	38,0±0,6
Applikation 1 + 5 min	38,2±0,2	38,2±6	37,9±0,6	37,9±0,6
Ligatur + 5 min	38,2±0,2	38,1±0,2	37,9±0,5	37,9±0,5
Ligatur + 20 min	38,2±0,3	38,1±0,5	37,9±0,5	37,8±0,4
Reperfusion + 2 min	38,2±0,2	38,1±0,3	37,8±0,5	37,8±0,3
Reperfusion + 60 min	38,1±0,3	38,0±0,4	38,2±0,5	38,0±0,3
Reperfusion + 120 min	38,5±0,6	38,5±0,3	38,3±0,4	38,4±0,5
Reperfusion + 180 min	38,5±0,5	38,5±0,4	38,3±0,2	38,3±0,5
Reperfusion + 240 min	38,1±0,3	38,2±0,6	38,0±0,5	38,3±0,5

8.1.3. Blutgasanalyse

Tabelle 8.6: pH-Wert

рН	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	7,46±0,05	7,48±0,05	7,52±0,03	7,52±0,05
Applikation 1 + 5 min	7,46±0,04	7,47±0,05	7,51±0,04	7,46±0,06
Ligatur + 5 min	7,45±0,04	7,48±0,06	7,51±0,04	7,50±0,08
Ligatur + 20 min	7,45±0,04	7,43±0,07	7,46±0,05	7,49±0,07
Reperfusion + 2 min	7,45±0,05	7,42±0,08	7,43±0,07	7,49±0,07
Reperfusion + 240 min	7,41±0,1	7,43±0,04	7,43±0,05	7,45±0,06

 Tabelle 8.7:
 Arterieller Kohlendioxidpartialdruck (paCO₂)

$paCO_2$ (mmHq)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
pucc ₂ (J			• •
Ruhephase + 30 min	34±5	35±5	35±3	35±6
Applikation 1 + 5 min	34±5	35±5	36±4	41±5
Ligatur + 5 min	34±5	35±4	35±3	37±4
Ligatur + 20 min	34±2	36±6	38±5	36±2
Reperfusion + 2 min	34±3	35±5	34±3	35±2
Reperfusion + 240 min	37±6	38±3	39±3	38±6

 Tabelle 8.8:
 Arterieller
 Sauerstoffpartialdruck (paO2)

paO ₂ (mmHg)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	109±33	119±19	115±25	124±28
Applikation 1 + 5 min	126±33	117±24	106±22	113±26
Ligatur + 5 min	115±21	120±22	106±18	126±25
Ligatur + 20 min	111±21	180±126	140±63	165±97
Reperfusion + 2 min	112±24	109±20	104±20	146±50
Reperfusion + 240 min	162±99	137±34	165±110	141±29

SaO ₂ %	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	97±2	97,7±1	97,2±2	97,9±1
Applikation 1 + 5 min	98,3±1	97,3±1	97,1±1	96±1
Ligatur + 5 min	97,2±2	97,5±1	96,9±2	96,3±1
Ligatur + 20 min	97,2±2	97,5±1	94,7±6	97,3±1
Reperfusion + 2 min	98,2±1	96,6±1	94,2±3	97,2±1
Reperfusion + 240 min	98±1	97,3±1,3	94,9±1	97,4±2

Tabelle 8.9: Arterielle Sauerstoffsättigung (SaO₂)

Tabelle 8.10: Standardbikarbonat-Ion (HCO₃⁻)

HCO ₃ ⁻ (mmol/l)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	24±2	26±4	29±4	27±4
Applikation 1 + 5 min	24±2	25±4	29±5	29±5
Ligatur + 5 min	24±2	25±3	28±3	28±4
Ligatur + 20 min	24±2	23±4	26±3	27±4
Reperfusion + 2 min	24±2	23±4	26±3	27±4
Reperfusion + 240 min	25±3	24±2	25±3	25±3

Tabelle 8.11: Standardbasenüberschuss (SBE)

SBE (mmol/l)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	1±3	3±4	6±4	5±5
Applikation 1 + 5 min	1±2	2±4	5±4	5±5
Ligatur + 5 min	1±2	2±4	5±3	5±5
Ligatur + 20 min	1±2	0±4	3±4	4±4
Reperfusion + 2 min	0±2	0±4	2±3	3±4
Reperfusion + 240 min	1±4	1±2	2±3	2±3

8.1.4. Elektrolyt- und Blutzuckerkonzentrationen

Tabelle 8.12: Ionisiertes Natrium (Na⁺)

Na ⁺ (mmol/l)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	140±1	141±2	142±2	142±2
Applikation 1 + 5 min	140±1	142±2	142±1	141±3
Ligatur + 5 min	140±1	142±2	142±1	141±3
Ligatur + 20 min	140±1	141±2	142±2	141±2
Reperfusion + 2 min	140±1	141±2	142±2	142±2
Reperfusion + 240 min	140±2	142±2	142±2	141±2

K ⁺ (mmol/l)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	3,3±0,3	3,3±0,5	3,2±0,2	3,0±0,2
Applikation 1 + 5 min	3,1±0,2	3,1±0,5	3,1±0,2	3,0±0,3
Ligatur + 5 min	3,1±0,3	3,2±0,6	3,2±0,2	3,1±0,3
Ligatur + 20 min	3,0±0,2	3,1±0,5	3,2±0,2	2,9±0,3
Reperfusion + 2 min	3,1±0,2	3,1±0,5	3,1±0,2	2,9±0,3
Reperfusion + 240 min	3,3±0,2	3,7±0,6	3,8±0,3	3,5±0,3

 Tabelle 8.13:
 Ionisiertes
 Kalium (K⁺)

Tabelle 8.14: Ionisiertes Calcium (Ca⁺⁺)

Ca ⁺⁺ (mmol/l)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	1,38±0,08	1,4±0,08	1,43±0,1	1,39±0,1
Applikation 1 + 5 min	1,37±0,07	1,35±0,1	1,4±0,09	1,38±0,1
Ligatur + 5 min	1,36±0,08	1,35±0,1	1,39±0,1	1,4±0,2
Ligatur + 20 min	1,36±0,07	1,31±0,1	1,39±0,1	1,38±0,2
Reperfusion + 2 min	1,36±0,08	1,3±0,1	1,38±0,1	1,38±0,2
Reperfusion + 240 min	1,3±0,07	1,35±0,07	1,35±0,09	1,35±0,2

Tabelle 8.15: Blutzucker (BZ)

BZ (mg/dl)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	118±24	126±23	114±13	122±34
Applikation 1 + 5 min	117±19	130±9	121±10	138±43
Ligatur + 5 min	119±19	138±21	119±10	133±35
Ligatur + 20 min	118±23	177±60	172±58	135±37
Reperfusion + 2 min	132±20	165±67	171±71	131±39
Reperfusion + 240 min	172±72	167±31	174±29	174±51

8.1.5. Hämoglobinkonzentrationen

Tabelle 8.16:	Gesamthämoglobin	(tHb)
---------------	------------------	-------

tHb (g/dl)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	12,2±0,6	12,9±0,6	13±0,7	13,2±1
Applikation 1 + 5 min	11,7±0,5	11,9±1	12±1	12,4±0,8
Ligatur + 5 min	12±0,5	12±1	12,3±0,8	12,4±1
Ligatur + 20 min	11,7±0,5	11,5±1	12±0,4	12,2±1
Reperfusion + 2 min	10,8±0,9	11,3±1	11,8±0,7	11,9±1
Reperfusion + 240 min	10,3±1	11,4±0,8	11,4±1,2	11,2±1

HbO ₂ (%)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	95,5±2	96±1	95,4±2	96,2±1
Applikation 1 + 5 min	97,1±1#	95,6±1	94,9±2	94,4±1
Ligatur + 5 min	96,4±1	95,9±1	95±1	94,9±1
Ligatur + 20 min	95,8±1	95,9±1	93±6	95,5±1
Reperfusion + 2 min	96±2#	95±2	92±3	95,4±1
Reperfusion + 240 min	96,6±1#	95,7±1	93,2±3	95,6±2

 Tabelle 8.17:
 Oxyhämoglobin (HbO2) (#p<0,05 vs. Therapie)</th>

Tabelle 8.18: Carboxyhämoglobin (HbCO)

HbCO (%)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	0,9±0,2	1,1±0,3	1,2±0,2	1,1±0,3
Applikation 1 + 5 min	0,8±0,3	1±0,3	1±0,3	1±0,2
Ligatur + 5 min	0,9±0,2	1,1±0,3	1±0,3	1±0,2
Ligatur + 20 min	0,8±0,2	1±0,3	1±0,3	1,1±0,3
Reperfusion + 2 min	0,8±0,3	1±0,4	1±0,3	1±0,3
Reperfusion + 240 min	0,8±0,2	0,9±0,3	1±0,3	1±0,3

Tabelle 8.19: Plasmatisch gelöstes Hämoglobin (pHb, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)

pHb (g/dl)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	0±0	0±0	0±0	0±0
Applikation 1 + 5 min	0±0*	0±0*	0±0*	1,2±0,07
Ligatur + 5 min	0±0*	0±0*	0±0*	1,2±0,1
Ligatur + 20 min	0±0*#	0±0*#	1,1±0,09	1,1±0,08
Reperfusion + 2 min	0±0*#	0±0*#	1,1±0,09	1±0,09
Reperfusion + 240 min	0±0*#	0±0*#	0,8±0,09	0,8±0,1

MetHb (g/dl)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	0,7±0,08	0,6±0,2	0,6±0,09	0,7±0,1
Applikation 1 + 5 min	0,6±0,1	0,6±0,2	0,64±0,1	0,8±0,3
Ligatur + 5 min	0,6±0,1	0,6±0,2#	0,7±0,09	0,8±0,2
Ligatur + 20 min	0,7±0,08	0,6±0,1	0,8±0,2	0,8±0,2
Reperfusion + 2 min	0,6±0,1	0,6±0,04	0,7±0,2	0,8±0,2
Reperfusion + 240 min	0,6±0,08	0,8±0,13	0,7±0,07	0,7±0,2

Tabelle 8.20: Methämoglobin (MetHb, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)</th>

8.1.6. Mikroperfusion

Tabelle 8.21: Mikroperfusion "non Area" (MW±SD, ml/g x min)

RMBF (ml/g x min)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	2,8±2,3	2,3±1,2	1,6±0,3	2,1±1
Ligatur + 20 min	2,8±1	3,3±1,3	2,4±0,9	2,6±1
Reperfusion + 2 min	3,2±0,9	3,0±1,2	2,5±0,7	2,3±1,0
Reperfusion + 240 min	3,2±1,8	2,6±1,3	2,2±0,3	2,3±0,9

Tabelle 8.22: Mikroperfusion "Area at Risk" (MW±SD, ml/g x min)

RMBF (ml/g x min)	Negativ-Kontr.	Positiv-Kontr.	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	2,5±1,6	2,2±1,2	1,0±0,3	1,2±0,7
Ligatur + 20 min	2,1±0,8	0,05±0,01	0,1±0,06	0,05±0,04
Reperfusion + 2 min	2,5±1	2,9±1,4	2,8±0,5	3,2±1,4
Reperfusion + 240 min	2,5±1	1,3±0,6	0,8±0,4	1,4±0,8

8.2. Abkürzungsverzeichnis

BAGS	Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales
BGA	Blutgasanalyse
BZ	Blutglukosekonzentration
Ca ⁺⁺	ionisiertes Calcium
COHb	Carboxyhämoglobin
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKG	Elektrokardiogramm
E-Lyte	Elektrolyte
FIO ₂	Fraktion des inspirierten Sauerstoffs
Hb	Hämoglobin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HBOC	Hemoglobin Based Oxygen Carrier
HES	Hydroxyethylstärke
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
HZV	Herzzeitvolumen
IHD	Isovoläme Hämodilution
K ⁺	Kalium
KCL	Kaliumchlorid
КНК	Koronare Herzkrankheit
KOD	Kolloidosmotischer Druck
LAD	Left anterior descendend = Ramus interventricularis anterior
LV	linker Ventrikel
МАР	Mittlerer Arterieller Druck
MetHb	Methämoglobin
MGW	Molekulargewicht
MPS	Makrozytär-Phagozytäres System
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
р	Alphafehler
Р	Partialdruck
PaCO ₂	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PaO ₂	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAP	Pulmonalarterieller Druck
pHb	plasmatisch gelöstes Hämoglobin

P ₅₀	Halbsättigungspartialdruck des Hämoglobins
RMBF	Regionaler Myokardialer Blutfluss
RPP	Rate-Pressure Product
RV	Rechter Ventrikel
RW	Referenzwert
SaO ₂	Arterielle Sauerstoffsättigung
SBC	Standard Bicarbonat
SBE	Standard Basenüberschuss
SD	Standardabweichung
SVR	Systemisch Vaskulärer Widerstand
Temp	Temperatur
tHb	Gesamthämoglobin
tpO ₂	Gewebesauerstoff-Partialdruck
TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid
VES	Ventrikuläre Extrasystole
VF	Ventrikuläres Flimmern
VT	Ventrikuläre Tachykardie
ZVD	Zentralvenöser Druck
ZVK	Zentralvenöser Katheter

8.3. Übersicht der laborchemischen Parameter

Gemessene Parameter	BERECHNETE PARAMETER
рН	SBC
PaCO ₂	SBE
PaO ₂	
HCO ₃ -	
K ⁺	
Na ⁺	
Ca ⁺⁺	
SaO ₂	
OxyHb	
pHb	
tHb	
MetHb	
СОНЬ	

8.4. Danksagung

Mein Dank gilt dem ehemaligen Direktor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie, Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Jochen Schulte am Esch sowie seinem Nachfolger, Herrn Prof. Dr. Alwin E. Goetz für die Möglichkeit, in ihrer Klinik wissenschaftlich tätig zu sein.

Weiterhin möchte ich mich herzlich bei meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Thomas Standl bedanken. Seine Freundlichkeit und Ausgeglichenheit habe ich stets bewundert und sind mir ein Vorbild für künftige Tätigkeiten.

Ebenfalls zu großem Dank verpflichtet bin ich Herrn PD Dr. André Gottschalk, der mit seiner Ruhe und Freundlichkeit maßgeblich zum Erfolg dieser Versuchsreihe beigetragen hat. Weiterhin möchte ich Herrn Dr. Karsten Schenke, Frau Sonja Schuppart, Frau Monika Weber sowie Herrn Dr. Marco Wintruff für die angenehme Zusammenarbeit im Labor danken.

Ein ganz besonderer Dank gebührt jedoch Herrn Dr. Christian Rempf, ohne dessen unermüdlichen Einsatz diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre.

Weiterhin gilt mein großer Dank meiner Freundin Marie-Luise Schwarze sowie meinen Geschwistern, ganz besonders jedoch meinen Eltern, ohne deren Unterstützung ich nicht so weit gekommen wäre.

8.5. Lebenslauf

Karim Chammas geboren am 9. August 1977 in Rahden

BERUF

Seit 01 2008	Assistenzarzt Pädiatrie, Fachklinikum Borkum
08 2007 - 12 2007	Assistenzarzt Innere Medizin, Krankenhaus Lübbecke
STUDIUM	
25.06.2007	Approbation
06 2007	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
03 2003	Ärztliche Vorprüfung
ab 04 2001	Studium der Medizin an der Universität Hamburg
PRAKTISCHES JAHR	
10 2006 - 01 2007	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
08 2006 - 10 2006	Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf Station MRC12 [Pneumologie]
06 2006 - 08 2006	Inselspital Bern Notfallzentrum Medizin
02 2006 - 05 2006	Chris Hani Baragwanath Hospital, Johannesburg Department of Surgery
ZIVILDIENST	
07 1997 - 08 1998	Rettungssanitäter, Rettungswache Lübbecke
SCHULE	
06 1997	Abitur
1988 – 1997	Wittekind-Gymnasium Lübbecke
1984 - 1988	Grundschule Gehlenbeck

EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG:

(als letztes Blatt in die Promotion einzubinden)

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: