Zentrum für Anästhesiologie
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. habil. Alwin E. Goetz

Auswirkungen einer prophylaktischen und therapeutischen Gabe der zellfreien Hämoglobinlösung HBOC-200 auf die Ausprägung von „no-reflow“ und Infarktarealen nach akuter Koronararterienligatur im Tiermodell

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg vorgelegt von

Karsten Schenke

aus Hannover

Hamburg 2006

Meinen Eltern, Großmüttern und Anne in Liebe gewidmet

Angenommen vom Fachbereich
der Universität Hamburg am: 13. April 2007

Veröffentlicht mit der Genehmigung des Fachbereichs
Medizin der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Th. Standl

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: PD Dr. T. Strate

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. J. Schulte am Esch

Inhaltsverzeichnis

1 Studienziele **8**

1.1 Hauptzielkriterium: Perfusionsausfälle („no-reflow“-Areale) 8

1.2 Nebenzielkriterien 8

1.2.1 Myokardiales Infarktareal 8

1.2.2 Herzrhythmusstörungen 8

2 Einleitung **9**

2.1 Ansatz 9

2.2 Hämoglobinlösungen 10

2.2.1 Geschichte und Entwicklung von Hämoglobinlösungen 10

2.2.2 Aktueller Stand der Forschung 13

2.3 Myokardinfarkte und alternative Sauerstoffträger 14

2.4 Studien mit HBOC-200/HBOC-201 16

2.5 Das „no-reflow“-Phänomen 18

2.5.1 Definition und Auftreten des „no-reflow“-Phänomens 18

2.5.2 Pathophysiologische Ursachen des „no-reflow“-Phänomens 19

2.5.2.1 Leukozyten 19

2.5.2.2 Freie Sauerstoffradikale 21

2.5.2.3 Endothel und Vasoregulation 22

2.5.2.4 Mikrothromben und aktivierte intravasale Gerinnung 24

2.6 Das Auftreten Ischämie-induzierter ventrikulärer Arrhythmien 25

3 Material und Methodik **27**

3.1 Tierschutz 27

3.2 Statistik und Fallzahlberechnung 27

3.3 Operativer Versuchsablauf 28

3.3.1 Versuchsgruppen 28

3.3.2 Versuchstiere 29

3.3.2.1 Art 29

3.3.2.2 Haltung 29
3.3.3 Studienmedikation 29
3.3.4 Narkose und Präparation 32
3.3.5 Intraoperative Messwerte 37
3.3.5.1 Inspiratorische Sauerstoffkonzentration und Kapnometrie . . 37
3.3.5.2 Hämodynamik 38
3.3.5.3 Blutgasanalysen, Elektrolyt- und Hämoglobinkonzentrationen 39
3.3.5.4 Körpertemperatur 39
3.4 Organaufbereitung 40
3.5 Thioflavinfärbung 40
3.5.1 Ansetzen von Thioflavin-S 4% 40
3.5.2 Durchführung der Thioflavinfärbung und Auswertung 40
3.6 TTC-Färbung und „area at risk“ 41
3.6.1 Technik 41
3.6.2 Auswertung 43
3.7 Arrhythmieerfassung 45
3.7.1 Elektrokardiogramm 45
3.7.2 Auswertung 45

4 Ergebnisse 47
4.1 Reperfusionszeit 2 Minuten 47
4.1.1 Intraoperative Messwerte 47
4.1.1.1 Gewicht der Tiere 47
4.1.1.2 Hämodynamische Parameter: Herzfrequenz, Blutdruck sowie rektale Körpertemperatur 47
4.1.1.3 Blutgasanalyseparameter 48
4.1.1.4 Elektrolyte und Blutzuckerkonzentration 49
4.1.1.5 Hämoglobinkonzentration 50
4.1.2 „Area at risk“ 50
4.1.3 „No-reflow“-Areale 50
4.1.4 Infarktareale 51
4.1.5 Herzrhythmusstörungen 51
4.2 Reperfusionszeit 240 Minuten 52
4.2.1 Intraoperative Messwerte 52
4.2.1.1 Gewicht der Tiere 52

4.2.1.2 Hämodynamische Parameter: Herzfrequenz, Blutdruck sowie rektale Körpertemperatur . . . 53
4.2.1.3 Blutgasanalyseparameter . . . 55
4.2.1.4 Elektrolyte und Blutzuckerkonzentration . . . 56
4.2.1.5 Hämoglobinkonzentration . . . 56
4.2.2 „Area at risk“ . . . 57
4.2.3 „No-reflow“-Areale . . . 57
4.2.4 Infarktareale . . . 58
4.2.5 Herzrhythmusstörungen . . . 60

5 Diskussion **63**
5.1 Effekte von HBOC auf „no-reflow“-Areale . . . 63
5.2 Effekte von HBOC-200 auf das Infarktareal . . . 68
5.3 Effekte von HBOC-200 auf ventrikuläre Arrhythmien . . . 69
5.4 Hämodynamische Wirkungen und Nebenwirkungen von HBOC . . . 72
5.4.1 Hämodynamik . . . 72
5.4.2 Kardiale Effekte . . . 74
5.4.3 Methämoglobin . . . 75
5.4.4 Fazit . . . 75
5.5 Methodenkritik . . . 75
5.5.1 Tierspezies . . . 75
5.5.2 Ischämiedauer und Reperfusionszeit . . . 76
5.5.3 „Area at risk“ und Infarktareale . . . 77
5.5.4 „No-reflow“-Areale . . . 78
5.6 Ausblick . . . 78

6 Zusammenfassung **80**

7 Literaturverzeichnis **83**

8 Anhang **102**
8.1 Tabellen Reperfusionszeit 2 Minuten . . . 102
8.1.1 Gewicht . . . 102
8.1.2 Hämodynamik und Körpertemperatur . . . 102
8.1.3 Blutgasanalyse . . . 103
8.1.4 Elektrolyte und Blutzucker . . . 105
8.1.5 Hämoglobinkonzentrationen . . . 107

8.1.6 Flächenauswertung 108
8.2 Tabellen Reperfusionszeit 240 Minuten 109
8.2.1 Gewicht 109
8.2.2 Hämodynamik und Körpertemperatur 110
8.2.3 Blutgasanalyse 113
8.2.4 Elektrolyte und Blutzucker 115
8.2.5 Hämoglobinkonzentrationen 116
8.2.6 Flächenauswertung 118
8.2.7 Arrhythmiescore nach Lambeth 118
8.2.8 Dauer des Vorhofflimmerns 118
8.3 Abkürzungsverzeichnis 123
8.4 Übersicht der laborchemischen Parameter 125

9 Danksagung **126**

10 Lebenslauf **127**

11 Eidesstattliche Erklärung **129**

1 Studienziele

1.1 Hauptzielkriterium: Perfusionsausfälle („no-reflow“-Areale)

Im Rahmen dieser Studie wurde untersucht, welche Auswirkungen Applikation von HBOC-200 (Hemoglobin based oxgen carrier) im Ischämie-/Reperfusionsmodell am Kaninchenherzen hat. Hauptziel der Untersuchung war es zu überprüfen, ob eine prophylaktische und/oder therapeutische Applikation von HBOC-200 die Ausprägung von Arealen mit aufgehobener Perfusion („no-reflow“-Areale) in der „area at risk“ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nach 2-minütiger oder 240-minütiger Reperfusionszeit reduziert.

1.2 Nebenzielkriterien

1.2.1 Myokardiales Infarktareal

Als Nebenzielkriterium wurde untersucht, ob die prophylaktische oder die therapeutische Anwendung von HBOC-200 die Größe des Infarktareals in der „area at risk“ um mindestens 25% im Vergleich zur mit Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe im Nachweis mittels Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid reduziert.

1.2.2 Herzrhythmusstörungen

Des Weiteren wurde der Einfluss einer HBOC-200 Applikation auf Herzrhythmusstörungen während der kardialen Ischämiephase untersucht. Insbesondere die Inzidenz kardialer Arrhythmien wurde mittels des Arrhythmiescores nach Lambeth (siehe Tabelle 3.3) im Vergleich zur Kontrollgruppe untersucht.

2 Einleitung

2.1 Ansatz

Die koronare Herzkrankheit (KHK) ist die häufigste Todesursache in industrialisierten Ländern. Nahezu jeder zweite Mensch stirbt hier an den Folgen einer KHK. In den kommenden Jahren muss mit einer weiteren Zunahme der Anzahl der Patienten mit einer KHK gerechnet werden [118]. Der Bevölkerungsanteil der über 65-jährigen steigt voraussichtlich von 25% auf 35% und führt zusammen mit der Tatsache, dass die Prävalenz der KHK exponentiell mit dem Alter zunimmt, zu einer möglichen Verdoppelung der Zahl der Patienten mit KHK, die sich einem nicht-herzchirurgischen Eingriff unterziehen müssen [219].

Es wird geschätzt, dass von den etwa 100 Mio. Patienten, die weltweit chirurgisch versorgt werden müssen, ein Viertel eine manifeste KHK oder mehrere Risikofaktoren für eine KHK aufweisen. Schwerwiegende perioperative kardiovaskuläre Komplikationen wie Myokardinfarkt, instabile Angina pectoris, postoperative Herzinsuffizienz oder plötzlicher Herztod sind bei ca. 5 - 15% dieser Risikopatienten zu erwarten [118].

Bluthochdruck, Tachykardie und erhöhte sympathomimetische Aktivität treten während und vor allem nach dem chirurgischen Eingriff auf. Diese hyperdynamen Herzkreislaufreaktionen beeinflussen das fragile Gleichgewicht zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf des prädisponierten Myokards und erhöhen das Ischämierisiko [12, 25, 105, 119].

Um die Inzidenz perioperativer kardialer Komplikationen zu senken bzw. das postoperative Outcome zu verbessern, hat das American College of Physicians 1997 eine Empfehlung herausgegeben, nach der Patienten mit einer KHK – vorausgesetzt, es besteht kein Asthma oder eine bradykarde Herzrhythmusstörung – perioperativ β-blockiert werden sollten [3].

Ein weiterer möglicher, zur Zeit noch experimenteller Ansatz wäre die Gabe eines plasmatischen Sauerstoffträgers, der unter anderem die myokardiale O_2–Versorgung verbessern könnte. Durch unsere Arbeitsgruppe soeben fertiggestellte Untersuchungen an Ratten konnten erstmalig eine signifikante Reduktion des Infarktareals innerhalb des infarktgefährdeten Gewebes

durch eine Prophylaxe mit der Hämoglobinlösung HBOC-200 (Hemoglobin based oxgen carrier) nach 25-minütiger Ischämie und 120-minütiger Reperfusion nachweisen [18, 19]. Es ist zu vermuten, dass HBOC neben der verbesserten Gewebsoxygenierung einen weiteren gewebeprotektiven Effekt im Rahmen von Ischämie und Reperfusion am Myokard hat.

In der vorliegenden Untersuchung sollte der Frage nachgegangen werden, welchen Einfluss die prophylaktische oder therapeutische Applikation der zellfreien Glutaraldehyd-polymerisierten bovinen Hämoglobinlösung HBOC-200 auf die regionale Perfusionsverteilung des postischämischen und reperfundierten Myokards hat. Es sollte insbesondere die Hypothese überprüft werden, ob eine Infarktvolumenreduktion durch HBOC-200 mit einer Reduktion der Flächen mit aufgehobener Perfusion („no-reflow"-Areale) einhergeht. Dieser Hypothese liegt zu Grunde, dass die Applikation von HBOC zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation führt.

2.2 Hämoglobinlösungen

2.2.1 Geschichte und Entwicklung von Hämoglobinlösungen

Die Forschung nach alternativen Sauerstoffträgern, die im Rahmen von perioperativen oder traumatischen Blutverlusten verabreicht werden könnten, wurde mit dem Ziel vorangetrieben, die Abhängigkeit von homologen Erythrozytenkonzentraten (EK) zu verringern. Die Hauptrisiken einer Fremdbluttransfusion liegen in der Gefahr einer Blutgruppeninkompatibilität und in der Übertragung von Infektionen durch Hepatitis-Viren und HIV. Darüber hinaus erzwingt die demographische Entwicklung in den Industrienationen mit immer älter werdenden Patienten und komplexen operativen Eingriffen sowie in den Schwellenländern mit stark wachsender Bevölkerung, einem Mangel an Blutbanken und einer hohen Durchseuchung an humanpathogenen Erregern die Suche nach Alternativen zu Blutprodukten. Die ersten dokumentierten klinischen Studien mit zellfreien Hämoglobinlösungen führten bereits 1916 SELLARDS und MINOT bei Freiwilligen sowie bei anämischen Patienten durch [175].

Studien mit Hämoglobinlösungen in den siebziger Jahren des letzten Jahrhunderts führten häufig zu lebensbedrohlichen Nebenwirkungen in Form einer aktivierten intravasalen Gerinnung sowie zu Fieber, hämodynamischen Komplikationen und Nierenversagen [54, 128, 168]. Ursächlich hierfür waren Rückstände von Lipidmembranen der Erythrozyten, insbesondere

Phospholipide [45, 148]. Durch die Ultrapurifikation der Hämoglobinlösungen (siehe Abbildung 2.1) konnte die ursprünglich beobachtete renale Toxizität weitgehend beseitigt werden, ebenso wie die durch Endotoxine verursachte Komplementaktivierung, die wiederum zu Thrombopenie, Leukozytopenie und disseminierter intravasaler Koagulopathie bis hin zum Multiorganversagen führte [45].

Modernere chemisch modifizierte HBOC zeigen keine gravierenden Nebenwirkungen mehr. Allerdings führen auch sie zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Druckes [188]. Als pathophysiologische Grundlagen für diese hypertensiven Effekte von Hämoglobinlösungen werden verschiedene Faktoren angeführt:

1. Hämoglobin bindet den endothelial gebildeten Vasodilatator NO (endothelium derived relaxing factor, EDRF) und blockiert so dessen vasodilatatorische Aktivität (NO-Scavenging) [122]
2. Hämoglobin verursacht eine gesteigerte Ansprechbarkeit adrenerger Rezeptoren für Katecholamine [29, 64]
3. Hämoglobin induziert die Freisetzung des endothelial gebildeten Vasokonstriktors Endothelin-1 [114, 115, 116, 172]
4. Oxygeniertes Hämoglobin erhöht die intrazelluläre Konzentration von Inositol-Phosphaten, die als „second messengers“ bei der Kontraktion der glatten Muskelzellen von Blutgefäßen dienen [205]

Die Methämoglobinämie ist eine weitere klinische Nebenwirkung. 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) [182].

Die chemische Modifikation und die Polymerisation der Hämoglobinmoleküle kann den endogenen Zerfall des Hämoglobins in seine beiden $\alpha\beta$-Heterodimere verhindern. Diese führten durch ihre Nierengängigkeit zu schweren Nierenschäden bis hin zum Nierenversagen. Aus der hohen Anzahl von Einzelmolekülen und Fraktionen des stromafreien Hämoglobins resultierte ein erhöhter kolloidosmotischer Druck (KOD); auch dieses Problem wurde durch die Polymerisation weitestgehend gelöst (siehe Abbildung 2.2).

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

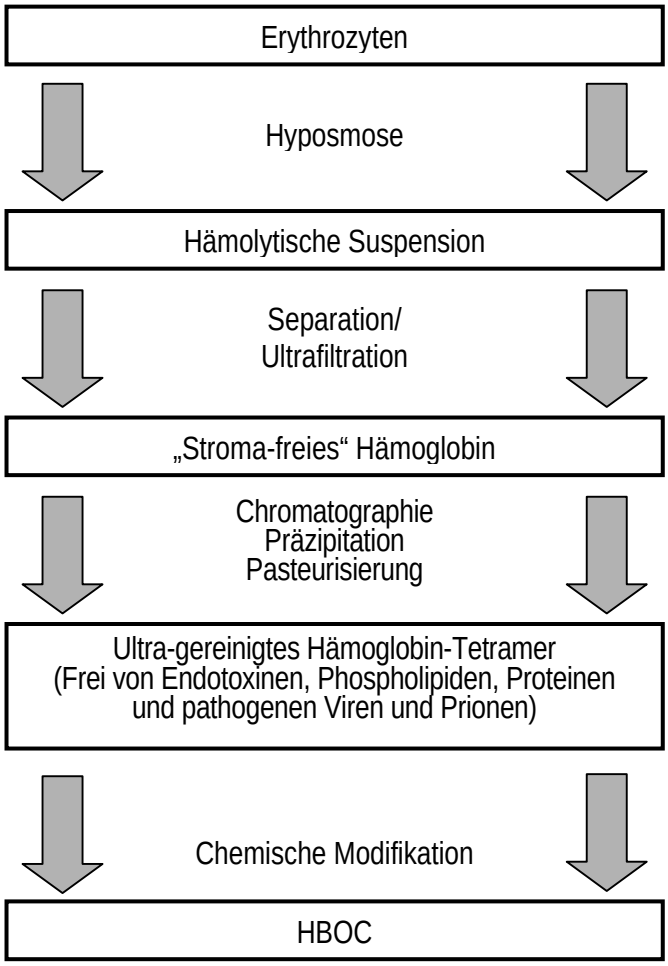


Abbildung 2.1: Übersicht über den Separations- und Purifikationsprozess von modernen zellfreien Hämoglobinlösungen (aus [185])

osmotischer Druck sind die Folge. Das in dieser Versuchsreihe eingesetzte HBOC-200 besitzt ein Molekulargewicht in Abhängigkeit vom jeweiligen Polymerisationsgehalt von 64.000 - 500.000 Dalton. Die intravasale Halbwertszeit wird mit 16 - 24 Stunden angegeben [182].

HBOC-200 ist eine zellfreie, ultragereinigte, polymerisierte Rinderhämoglobinlösung, die sich durch eine niedrige Sauerstoffaffinität und einen ausgeprägten Bohr-Effekt auszeichnet, so dass eine verbesserte Gewebsoxygenierung infolge der erleichterten Sauerstoffabgabe in der Peripherie erreicht wird. Durch die Änderung des Ladungszustands verschiebt sich die Sauerstoffbindungskurve im Sinne einer erleichterten Sauerstoffabgabe in der Peripherie nach rechts. Dies zeigt sich besonders in einem erhöhten P_{50} in Höhe von 36 mmHg gegenüber humanem, an Erythrozyten gebundenes Hämoglobin mit einem P_{50} von 26 mmHg [182]. Das HBOC-200

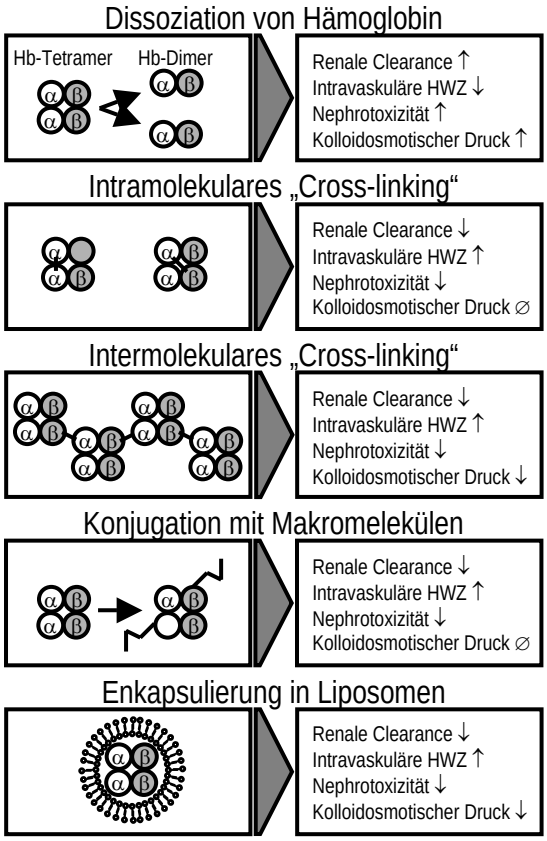


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Modifikationen von Hämoglobinmolekülen zur Verminderung toxischer Nebenwirkungen sowie zur Verlängerung der intravasalen Halbwertszeit (HWZ) (aus [185])

ist über intermolekulares Glutaraldehyd polymerisiert.

2.2.2 Aktueller Stand der Forschung

In den letzten Jahren wurden klinische Studien mit verschiedenen künstlichen Hämoglobinlösungen durchgeführt, die meisten mit Diaspirin-vernetztem Human-Hämoglobin (DClHb). Einige Lösungen zeigten negative Eigenschaften. In klinischen Studien mit HemAssist® bei Patienten mit traumatisch-hämorrhagischem Schock [177] bzw. zerebrovaskulärem Insult [169] zeigte sich eine erhöhte Mortalität im Vergleich zu der mit kristalloider Lösung behandelten Kontrollgruppe. Andere untersuchte Substanzen befinden sich in Phase-III-Studien oder sind in bestimmten Bereichen schon zugelassen.

Das in der vorliegenden Studie eingesetzte HBOC-200 ist seit 2001 als Oxygent® (Biopure,

USA) für die veterinärmedizinische Anwendung in den USA zugelassen. Seit dem gleichen Jahr ist HBOC-201 als Hemopure® (Biopure, USA) in Südafrika zur Anwendung bei perioperativer Anämie zugelassen. Beide Hämoglobinlösungen zeichnen sich durch eine niedrige Sauerstoffaffinität und einen ausgeprägten Bohr-Effekt aus, durch den eine verbesserte Gewebsoxygenierung infolge der erleichterten Sauerstoffabgabe in der Peripherie zu erwarten ist.

In verschiedenen Tiermodellen konnte gezeigt werden, dass künstliche Sauerstoffträger wie zum Beispiel Perfluorocarbone (PFC) die Ausbildung von Ischämie/Reperfusionsschäden am Myokard reduzieren können [8, 50, 51, 52, 98, 200]. In den aufgeführten Studien wurden überwiegend PFC-Lösungen mit einer geringen Sauerstofftransportkapazität therapeutisch (d. h. nach Eintritt der Ischämie) untersucht. Bei PFC handelt es sich um chemisch hergestellte halogenierte Perfluorocarbonmoleküle, die biologisch völlig inert sind und in denen sich große Mengen von Gasen, also auch von Sauerstoff physikalisch lösen können. Da sie nicht biologischen Ursprungs, billig zu produzieren und lange haltbar sind, sind sie als Blutersatzlösung interessant, jedoch sind Perfluorocarbone nicht mit wässrigen Lösungen vermischbar und bedürfen der Emulsion, um intravenös appliziert werden zu können.

PFC ist in den USA für die intrakoronare Applikation im Rahmen einer perkutanen transluminalen koronaren Angioplastie (PTCA) zugelassen. Der Nachteil selbst in der Anwendung von modernen PFC-Lösungen liegt in der Notwendigkeit, eine hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentration von 50 –100% verabreichen zu müssen, da nur dann eine ausreichende Menge Sauerstoff gelöst werden kann [68].

Im Gegensatz dazu liegt der Vorteil von HBOC darin, dass schon bei Raumluft (21% O_2) eine nachweisbare Menge an Sauerstoff gebunden und abgegeben wird und dass die HBOC Dosis, die für eine Augmentierung des Gewebs-pO_2 nötig ist, lediglich 0,4 g/kg beträgt [186, 191]. Für den Menschen ergibt sich also eine Dosis von nur 200 - 250 ml, so dass nur eine geringe zusätzliche kardiale Belastung durch das infundierte Volumen zu erwarten ist.

2.3 Myokardinfarkte und alternative Sauerstoffträger

Ein akut aufgetretener Verschluss eines Herzkranzgefäßes ist bei der überwiegenden Anzahl der Patienten die Ursache für einen Myokardinfarkt [81]. Die Ischämie des Herzmuskels führt letztendlich zu einer Diskrepanz zwischen Sauerstoffangebot im Herzmuskel und myokardialem Sauerstoffbedarf. Dieses Missverhältnis wird durch Tachykardie und hypertensive Blutdruckwerte noch weiter verstärkt.

Wie in Kapitel 2.2.2 geschildert wurde, konnten PFC-Lösungen in Tiermodellen zeigen, dass sie in der Lage sind, die Schäden durch Ischämie und Reperfusion am Myokard zu reduzieren. Da der Sauerstoff in der PFC-Lösung physikalisch gelöst ist, wird eine ausreichende Sättigung erst bei einer FiO_2 von 0,5 bis 1,0 erreicht. Diese Eigenschaft stellt ein großes Anwendungshindernis für PFC bei nicht intubierten, spontan atmenden Patienten dar. Wie oben erwähnt, zeichnet sich HBOC dadurch aus, dass es auch unter Atmung von Raumluft (21% O_2) zu einer nachweisbar besseren Abgabe von Sauerstoff im Gewebe kommt [191] und nur eine relativ geringe Dosis (0,4 g/kg) zu einer Erhöhung des Gewebs-pO_2 führt [186].

Zahlreiche klinische Studien konnten die prognostische Bedeutung perioperativer Myokardischämien nachweisen [48, 105, 119]. MANGANO et al. konnten 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 [119]. 20% der Myokardischämien traten präoperativ auf, 25% intraoperativ und 41% nach Abschluss der Operation.

Unmittelbar nach der Operation aufgetretene Myokardischämien erhöhen das Risiko kurzfristig nachfolgender ischämischer Komplikationen wie Angina pectoris, Myokardinfarkt oder akutem Herztod um mehr als das 9-fache. In der Langzeitprognose über 2 Jahre zeigte sich, dass kardiale Komplikationen mehr als doppelt so häufig auftraten, wenn perioperative Myokardischämien detektiert wurden [119]. BÖTTIGER wies in einer Übersichtsarbeit darauf hin, dass die schwersten myokardialen Ischämien am Ende des chirurgischen Eingriffs bzw. bei der Ausleitung der Narkose auftraten [12]. 90% der postoperativen Ischämien verlaufen klinisch stumm [219].

Die Besonderheit der perioperativen Herzinfarkte liegt in der gewissen Vorhersagbarkeit ihres Auftretens, die damit im Gegensatz zum spontanen, im Alltag auftretenden Myokardinfarkt einen guten präventiven Ansatzpunkt bietet. Viele Operationen von Patienten, die auf Grund ihrer kardialen Vorerkrankung als Hochrisikopatienten eingestuft sind, werden elektiv durchgeführt und bieten sich daher für prophylaktische Interventionen an. Die präoperative Gabe von HBOC oder anderen künstlichen Sauerstoffträgern ist somit ein neuartiger Ansatz zur perioperativen kardialen Risikoreduktion [136]. Alternativ oder zusätzlich zur inzwischen weit verbreiteten β-Blockade bei kardialen Hochrisikopatienten [3, 120, 145, 206] könnte HBOC über einen völlig anderen Wirkungsmechanismus 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 in Richtung einer innovativen klinischen Behandlungsstrategie dar.

2.4 Studien mit HBOC-200/HBOC-201

Die in früheren Studien mit Hämoglobinlösungen gefundenen Nebenwirkungen wie Nierenschäden, aktivierter intravasaler Gerinnung, Fieber oder hämodynamischen Komplikationen (siehe 2.2.1) und daraus resultierender Bedenken konnten durch die chemische Modifikationen moderner Lösungen reduziert werden. In Versuchen am Tier [77, 186, 187, 188] und am Menschen [13, 113, 189, 190] mit HBOC-200 und HBOC-201 (Hemopure, Oxyglobin®; Biopure® Cambridge USA) wurden erheblich weniger Nebenwirkungen beobachtet. Weder in Tierversuchen mit komplettem Blutaustausch durch eine ultragereinigte bovine Hämoglobinlösung [113, 187] noch im Rahmen klinischer Studien bei Patienten, die sich einer Leberteilresektion [190] unterzogen, konnten nephrotoxische oder Gerinnungsstörungen durch diese Substanz nachgewiesen werden. In derselben Studie und einer anschließenden Phase-III-Studie konnte gezeigt werden, dass eine klinisch relevante Methämoglobinbildung weder bei einfacher noch bei mehrfacher (bis zu 7 Einheiten à 250 ml HBOC-201) Transfusion auftrat [190].

Hämodynamisch zeigte sich jedoch eine Erhöhung des mittleren arteriellen Blutdrucks, der bei konstantem pulmonalvaskulären Druck auf eine Erhöhung des systemischen Gefäßwiderstandes um etwa 20% zurückzuführen ist [188]. Die pathophysiologischen Grundlagen konnten noch nicht endgültig geklärt werden; NO-Scavenging [122], also die Bindung und damit Inaktivierung des Vasodilatators NO an das Hämoglobin, wird neben anderen Faktoren [172] als Hauptursache gesehen.

In unterschiedlichen Tiermodellen konnte bewiesen werden, dass HBOC-Lösungen die Gewebeoxygenierung verbessern [77, 78, 79, 186, 188]. So lagen die Gewebs-O_2-Partialdrücke (tpO_2) im Skelettmuskel eines Hundes nach komplettem Blutaustausch mit HBOC-201 höher als in der mit Hydroxyethylstärke (HES) behandelten Vergleichsgruppe und insbesondere höher als in der Ausgangsmessung [188]. Dabei konnte für HBOC-201 eine Oxygenierungspotenz von 3:1 im Vergleich zu Warmblut und drei Wochen alten autologen Erythrozytenkonzentraten (EK) errechnet werden [186, 191]. Es zeigte sich, dass extrem niedrige tpO_2-Werte durch HBOC schneller und effektiver behandelt werden können als durch EK. In einer anderen

Studie am Hund mit einer 95%-igen Stenose der A.poplitea zeigte sich im nachgeschalteten Muskel sowohl bei prophylaktischer als auch bei therapeutischer Gabe von HBOC ein wesentlich höherer tpO_2-Wert als in der Kontrollgruppe (HES) [77, 78].

Weitere positive Wirkungen konnten für HBOC-201 im Rahmen eines kardialen Stenosemodells am Hund mit 90%-iger Stenose des Ramus interventricularis anterior (LAD) in Kombination mit einer akuten isovolämischen Anämie (Hb = 7± 0,5 g/dl) gezeigt werden [10, 17]. Sowohl die myokardiale Sauerstoffspannung als auch die Kontraktilität konnten im Versorgungsgebiet der LAD aufrechterhalten werden. Zusätzlich waren die histologischen Gewebsschäden und die DNA-Einzelstrangbrüche im ischämischen Areal vermindert. Durch die therapeutische Applikation von HBOC wurden die Werte des myokardialen tpO_2 und der Kontraktilität des linken Ventrikels im poststenotischen Areal fast bis auf die Ausgangswerte angehoben.

In einer Studie am Ratten-Modell konnte durch eine frühe und protrahierte Applikation von HBOC-201 eine signifikante Reduktion von Nekrosen und eine Verbesserung der histologisch verifizierten Organintegrität und Funktion nach einer medikamenteninduzierten Pankreatitis nachgewiesen werden [197]. In einer Studie am Schwein mit ebenfalls medikamenteninduzierter Pankreatitis wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass die therapeutische Applikation von HBOC-200 in Kombination mit einer isovolämischen Hämodilution den tpO_2 auf Ausgangsniveau anheben kann. Die Kontrollgruppen mit Hämodilution durch HES oder Ringerlösung waren in dieser Hinsicht nicht erfolgreich [53]. In diesem Experiment zeigten sich signifikant geringere histopathologische Veränderungen, geringere Anstiege der Pankreasenzyme und eine höhere Überlebensrate der HBOC Gruppe im Vergleich zur Therapie mit Ringerlösung.

In einem kardialen Ischämie/Reperfusionsmodell mit 25 Minuten Ischämie und 120-minütiger Reperfusion an der Ratte konnte durch eine prophylaktische Applikation von HBOC-200 eine signifikante Reduktion der Infarktgröße innerhalb der „area at risk“ im Vergleich mit der Kontrollgruppe erreicht werden. Die therapeutische Applikation in der gleichen Dosierung zehn Minuten nach Ligatur konnte keinen Unterschied zur Kontrollgruppe zeigen. Darüber hinaus war die Schwere der Herzrhythmusstörungen während der Ischämie erniedrigt [18, 19, 154].

Eine neue Untersuchung mit HBOC-201 im Ischämie/Reperfusionsmodell am Hund mit 90-minütiger Ischämie und 270-minütiger Reperfusion ergab für die Behandlungsgruppe mit prophylaktischer HBOC-Gabe eine signifikante Reduktion der Infarktfläche im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe [24]. In dieser Untersuchung, in der eine deutlich höhere HBOC-Dosierung gewählt wurde (10% des Blutvolumens) als in der vorliegenden Studie, zeigte

sich in der histologischen Aufarbeitung eine signifikant geringere Leukozyteninfiltration in das ischämische Gebiet in der Prophylaxe-Gruppe, während die mittels radioaktiv-markierter Mikrosphären bestimmte regionale Perfusionsverteilung als Maß für die Ausprägung des „no-reflow“-Phänomens keine Unterschiede ergab.

2.5 Das „no-reflow“-Phänomen

2.5.1 Definition und Auftreten des „no-reflow“-Phänomens

Infolge hinreichend lang anhaltender Ischämie und anschließender Reperfusion kann es zu einer ausgeprägten, teils irreversiblen Mikroperfusionsstörung kommen. Dieses Phänomen wurde erstmals von AMES et al. 1968 am Gehirn beschrieben [4], jedoch gelang es vielen Autoren, diesen Prozess auch an anderen Organen zu beobachten [95, 117, 134, 152, 156, 198]. Für diese charakteristische pathophysiologische Störung wurde der Begriff des “no-reflow“-Phänomens geprägt. Synonym wird auch der Begriff Reperfusionsversagen verwendet.

Dieses Reperfusionsversagen führt trotz Wiederherstellung eines globalen Blutflusses zu einer Mikroperfusionsstörung, in deren Folge es bei längerem Bestehen zum Untergang von bei Beendigung der Ischämie primär noch lebensfähiger Zellen kommt. Dieser Reperfusionsschaden tritt, und das ist eine Kernbedingung, trotz konstanter und ausreichend stabiler makrohämodynamischer Parameter auf.

In der Medizin kann das „no-reflow“-Phänomen in allen Bereichen beobachtet werden, in denen es zu einem temporären Stop der Durchblutung mit anschließendem Wiedereinsetzen des Blutflusses kommt [39]:

- In der Gefäßchirurgie nach embolischem oder traumatischem Gefäßverschluss mit anschließender Rekanalisation, zum Beispiel durch Angioplastie, Anastomosierung oder Bypassoperation
- In der Kardiologie nach PTCA
- In der Transplantationsmedizin, zum Teil als Abstoßungsreaktion imponierend
- In der Herzchirurgie nach aortocoronarer- Bypassoperation

Insbesondere der Rolle, die das „no-reflow“-Phänomen nach interventioneller Wiedereröffnung eines Koronargefäßes durch PTCA oder Thrombolyse spielt, wurde in den letzten Jahren ein erhöhter Stellenwert zugesprochen [83, 151, 165]. So beschreiben ITO et al. 1992 die

Tatsache, dass trotz Eröffnung eines verschlossenen Koronargefäßes, in dieser Studie durch Thrombolyse, in einem Viertel der Fälle keine ausreichende Mikroperfusion entsteht und damit sowohl die globale wie lokale linksventrikuläre Funktion eingeschränkt bleibt [83]. In einer retrospektiven Studie an Patienten mit einem akuten Herzinfarkt, die nach einer PTCA einen ungehinderten epikardialen Fluss (TIMI 3) zeigten, wurde bei 24% der Patienten ein Reperfusionsschaden gefunden. Dieser zeigte sich in Form einer Reduktion der vorherigen ST-Streckenhebung nur um bis zu 50% [165]. Als Ursache für das Auftreten des „no-reflow"-Phänomens beschrieben die Autoren einen Zeitverzug vom Auftreten der Symptome bis zum Beginn der Intervention sowie signifikant erhöhte Entzündungswerte (Leukozytenzahl und C-reaktives Protein (CRP)).

2.5.2 Pathophysiologische Ursachen des „no-reflow"-Phänomens

Zu den Mechanismen, die das Reperfusionsversagen auslösen, gehören Leukozyten-„rolling", „-sticking" und „-plugging", freie Sauerstoffradikale, Endothelzellschwellung und Verlust der Interzellularkontakte mit Austritt von Erythrozyten, Fibrin- und Thrombozytengerinnsel sowie Gewebsödem mit Schwellung der umliegenden Myozyten (siehe Abbildung 2.3).

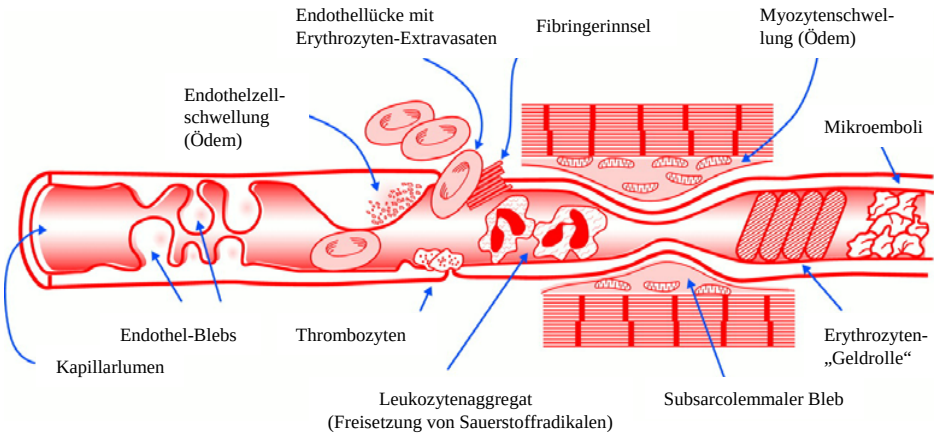


Abbildung 2.3: Schematischer Überblick über die verschiedenen, das „no-reflow"-Phänomen auslösenden Faktoren (aus Reffelmann/Kloner[152])

2.5.2.1 Leukozyten

Eine entscheidene Rolle für die Entstehung und die Folgen des Reperfusionsschadens spielen die Leukozyten. Die Leukozyten akkumulieren bereits bei niedrigem Fluss [159] im Kapil-

larbett, um ihrer eigentlichen Aufgabe im post-ischämischen Gewebe, der Elimination der Schadstoffe, nachzukommen [199]. Nach GO et al. sollen sie für einen großen Teil des „no-reflow“-Phänomens verantwortlich sein [58]. Bedingt durch ihre Größe und geringe Verformbarkeit können die Leukozyten das Kapillarbett nur langsam passieren [155]. Die im Rahmen des „no-reflow“-Phänomen geschwollenen Endothelien verstärken die physiologische Neigung der Leukozyten zur Adhäsion am Endothel. Dieses kann bis zur Verstopfung der Gefäßbahn („plugging“) gehen [147].

Verstärkend auf die Adhäsionseigenschaften der Leukozyten im Rahmen der Ischämie wirken die Stase, die Aktivierung sowie die Hypoxie selber [147, 155]. Die Endothel-Leukozyten-Interaktion spielt im Rahmen des Reperfusionsschadens eine wichtige Rolle, bei der spezifische Stadien mit spezifischen pathophysiologischen Folgen ablaufen [152]. Als erstes Stadium wird das „rolling“ bezeichnet. Hierunter versteht man das langsame Rollen der Leukozyten entlang der Gefäßwand. Das L-Selektin der Leukozyten und das P-Selektin der Endothelien vermitteln diesen Prozess [37, 104, 126]. Die Bildung von P-Selektin wird durch entzündliche Reize wie Histamin, Thrombin oder reaktive Sauerstoffradikale induziert [37]. Im Gegensatz dazu ist L-Selektin ständig präsent [193], jedoch steigt seine Konzentration im reperfundierten Gewebe und fällt nach Aktivierung der Leukozyten wieder ab [104, 126]. Auch E-Selektin wird während der Ischämie vermehrt exprimiert, später sinkt sein Gehalt wieder. Es konnte gezeigt werden, dass eine Blockade dieser Selektine den Reperfusionsschaden vermindert [193]. Ebenso zeigte sich eine zeitliche Zunahme der Leukozytenfraktion, die am „rolling“ teilnahm, durch die Aktivierung von Adhäsionsrezeptoren [126]. Auf molekularer Ebene konnte nachgewiesen werden, dass die Adhäsion, auch als „sticking“ bezeichnet, über die Glykoproteine CD-18 und CD-11b der Leukozytenmembran und das interzelluläre Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) am Endothel vermittelt wird [41, 89, 102].

Die am Endothel haftenden aktivierten Leukozyten schütten nun ihrerseits Mediatoren und Zytokine, die vasokonstriktiven Leukotriene, Thromboxane und Serotonin aus [41]. Auch freie Sauerstoffradikale werden freigesetzt, diese können unter anderem durch Aktivierung von Transkriptionsfaktoren NF-κB die Bildung der ICAM-1 Moleküle induzieren [43]. Nun kommt es zur „Margination“, also dem Verlassen der Gefäßbahn und Wanderung in das Interstitium durch die Leukozyten. Dort induzieren sie eine Entzündungsreaktion und aktivieren weitere immunkompetente Zellen wie Makrophagen und Mastzellen. Auf diese Weise wird die Barrierefunktion des Endothels gestört [104].

2.5.2.2 Freie Sauerstoffradikale

Die Entstehung freier Sauerstoffradikale im Rahmen des „no-reflow“-Phänomens wird durch unterschiedliche Enzyme der Leukozyten, Monozyten oder des Gewebes vermittelt. In der Tabelle 2.1 sind die verschiedenen Enzyme, Enzymsysteme und das dabei entstehende Radikal aufgelistet.

Superoxidradikal O_2^-	mitochondriale Atmungskette, vor allem zu Beginn der Reperfusion mit Überangebot an Sauerstoff und erhöhter Stoffwechselleistung durch Katecholamine, Arachidonsäuren und Purine $NADPH^-$ Oxidase (Phagozyten) Xanthinoxidase des post-ischämischen mikrovaskulären Endothels Monoaminooxidase Cycloxygenase, Lipoxigenase (Gefäßwand, Thrombozyten, Leukozyten)
Wasserstoffperoxid H_2O_2	Superoxiddismutase; Xanthinoxidase; NO-Synthetase
Hydroxylradikal OH	Cu, Fe und hämoproteinkatalysierte Bildung aus O_2^- und H_2O_2
Stickoxid NO (auch leicht antioxidativ)	NO- Synthetase (Gefäßendothel, Phagozyten, glatte Gefäßmuskulatur, neuronales Gewebe)

Tabelle 2.1: Radikalentstehung nach Becker et al. [11]

Im Anschluss an Ischämie und Reperfusion kommt es als so genannter „oxidative burst“ zur Radikalbildung. Zu Beginn entsteht Superoxid, und daraus dann H_2O_2, OH^- und $HOCL^-$ [11, 143]. Im Herzen gilt die Xanthinoxidase als eines der wichtigsten an der Radikalbildung beteiligten Enzyme. Sie steht im Gleichgewicht mit der Xanthinhydrogenase und wird im Rahmen einer Ischämie vermehrt gebildet [143]. Nach DUILIO et al. nimmt die Xanthinoxidase im Besonderen bei nur kurzer Ischämie eine wichtige Rolle ein, während bei prolongierter Ischämie die Leukozyten wichtiger für die Entstehung der Radikale sind [38]. So zeigte sich, dass durch Blockierung der CD-18 Glykoproteine der Leukozytenmembran eine signifikant geringere Radikalbildung nach 90 Minuten Ischämie erreicht werden kann.

Die körpereigenen Schutzmechanismen durch Enzymsyteme (Superoxiddismutase, Katalase, Glutathionperoxidase) und Antioxidanzien (Tocopherol, ß-Carotin, Ascorbinsäure, Coeru-

loplasmin, Transferrin, Katecholamine, Methionin, reduziertes Glutathion, N-Acetylzystein und andere SH-Verbindungen) werden durch die post-ischämisch anfallenden Radikale schnell erschöpft [11]. Auch NO hat neben anderen sehr günstigen Eigenschaften ein mäßiges antioxidatives Potential [11], NO-Mangel führt über die NO-Synthetase zu erhöhter Superoxidkonzentration.

Die Entstehung der Radikalen bewirkt im Gewebe Schmerzen, Schädigung der Zellmembran durch Lipidperoxidation, Hyaluronsäureabbau und intrazellulärer Kollagenerniedrigung [212]. Letztendlich kommt es auch zum Gewebeuntergang [126, 143] durch Verlust der Zellintegrität. Durch Endothelschädigung kommt es über gesteigerte Gefäßpermeabilität und Proteinextravasion zur Ausbildung eines Ödems [57, 117, 198]. Die geschädigte Kapillarwand fördert ihrerseits nun die Adhäsion von Leukozyten und Thrombozyten mit weiterer Freisetzung von proinflammatorischen Substanzen wie Zytokinen, Leukotrienen und dem platelet-activating-factor (PAF) [99, 126]. Zusätzlich fördern freie Radikale direkt die Bildung der Adhäsionsmoleküle wie ICAM-1 [43] und wirken vasokonstriktorisch auf die Gefäßmuskulatur [71]. Ebenfalls gefäßverengend wirkt die Inaktivierung des endothelium derived relaxing factor (EDRF) NO durch O_2^-.

2.5.2.3 Endothel und Vasoregulation

Ausgelöst durch eine Ischämie kommt es im Kapillarbett zum Flussstop mit Verlust der Volumenregulationsfähigkeit. Dieses geht einher mit perivaskulärer und endothelialer Schwellung [70], die eine Kompression der kleinen Arteriolen auslöst und zu einer Einengung des kapillär durchflossenen Lumens führt [142]. Es folgen Schäden der Intima und der Endothelzelle, die bei der Reperfusion auftreten. Mikroskopisch zeigen sich gesunde und pathologisch veränderte Gefäße mosaikartig im Gewebe verteilt [70]. Dieses Muster lässt vermuten, dass die Endothelzellen dort geschädigt werden, wo sich Leukozyten anlagern [142].

Elektronenmikroskopisch stellen sich die Endothelzellen schon zu Beginn der Reperfusion verdickt und die Basalmembran verbreitert dar [70, 199]. Ursache dafür könnte eine Ionenverschiebung durch Versagen der NA^+/K^+-Pumpe [127] oder die Einpressung von Plasma in die Zellen mit nachfolgender intravasaler Hämokonzentration sein [199]. Dies trägt weiter zur verminderten Perfusion bei [127]. Eine intrazelluläre Blasenbildung mit Vakuolen mit plasmatischem Inhalt führt durch Vorwölbung ins Lumen zu einer weiteren Flussbehinderung [70].

Des Weiteren kommt es zum Auseinanderweichen der interendothelialen Zellkontakte [70] bis hin zum Ablösen benachbarter Zellen [199]. Ursächlich für das Auseinanderweichen der Zell-Zell-Kontakte sollen Azidose [93], Calciumüberlastung [36] und Ansammlung von Lipid-Metaboliten [215] sein. Durch diese Lücken in der Gefäßwand können nun Wasser, wasserlösliche Moleküle [70] und sogar Erythrozyten die Gefäße verlassen [40]. Eine entscheidende Rolle wird den dissoziierenden Gap Junctions auch auf Grund der damit verbundenen elektrischen Instabilität in der Genese von Ischämie-induzierten ventrikulären Rhythmusstörungen zugeschrieben [35, 72].

Im gesunden Gefäßbett besteht ein Gleichgewicht zwischen vasodilatativen Substanzen, hauptsächlich NO und Prostacyclinen und vasokonstriktiven Katecholaminen wie Noradrenalin und Adrenalin. Die post-ischämisch geschädigten Endothelien zeigen eine geringere Produktion und Freisetzung des EDRF bzw. seiner aktiven Komponente NO [209]. In dieser Situation ist jedoch die Konzentration der vasokonstriktiven Substanzen noch zusätzlich deutlich erhöht. Gemeinsam bewirkt dies eine stark ausgeprägte Vasokonstriktion [71].

Das Zusammenspiel und die gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen Faktoren, die das Kapillarbett schädigen, kann der Abbildung 2.4 entnommen werden.

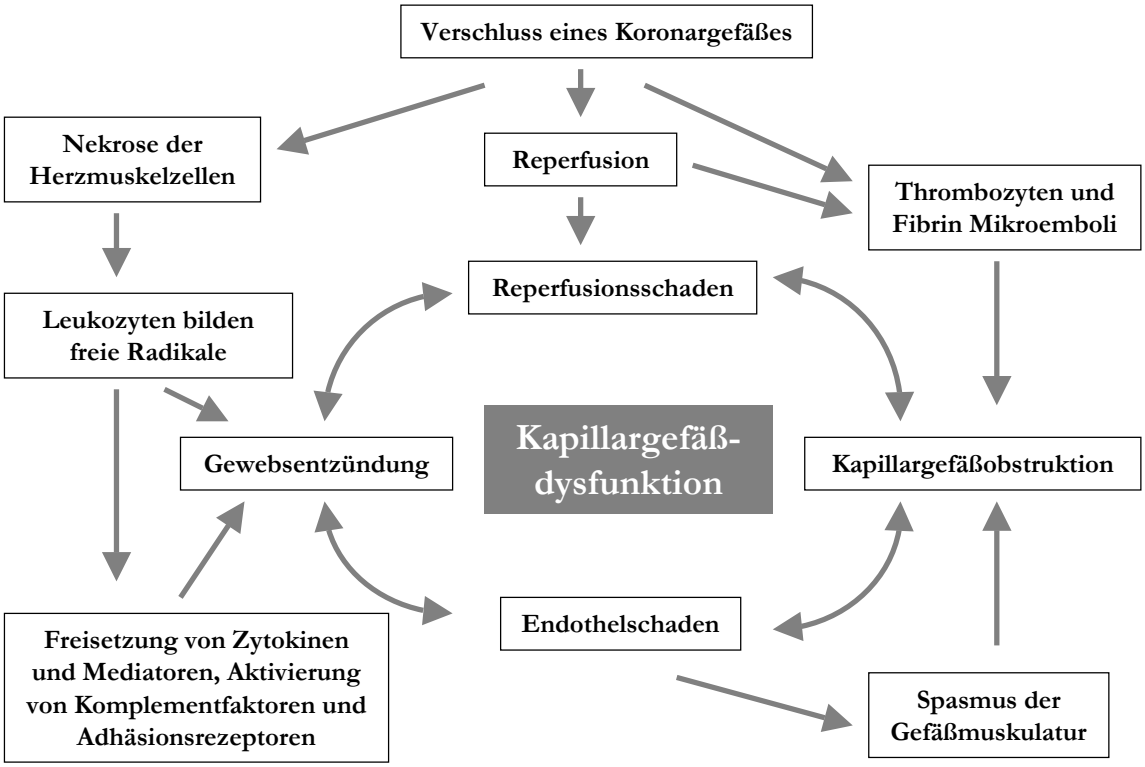


Abbildung 2.4: Pathophysiologie der Kapillargefäßdysfunktion nach ROE et al. [161]

2.5.2.4 Mikrothromben und aktivierte intravasale Gerinnung

Durch die Unterbrechung des Blutflusses während der Ischämie kommt es zur Aggregatbildung durch die Thrombozyten [70, 125, 127, 142, 147], die als Mikrothromben die Reperfusion behindern können. Insbesondere in der frühen Phase spielt die Flussbehinderung durch die Thrombozytengerinnsel eine Rolle [130]. Es wird auch vermutet, dass die Erythrozyten sich in Form von „Geldrollen“ in der Gefäßbahn aneinander lagern [152, 156] und auf diese Weise den Fluss behindern.

Durch Endothelverletzung kommt es zur Aktivierung der Gerinnungskaskade, unter anderem über den von-Willebrand-Faktor (vWF) [62]. Im Rahmen des „no-reflow“-Phänomens sind auch die freien Sauerstoffradikale für die Synthetisierung und Ausschüttung des vWF in den Endothelzellen verantwortlich [61]. Zusätzlich zum neusynthetisierten vWF gibt es einen Anteil, der ständig in den Endothelien präsent ist und während der Ischämie bzw. durch Verletzung der Intima freigesetzt wird [2, 62]. Durch Blockade der Aktivierung des vWFs kann

der Reperfusionsschaden verringert werden [62]. Auch durch die Hemmung der Glykoprotein IIb/IIIa vermittelten Thrombozytenaggregation kann der Reperfusionsschaden verringert werden [103].

Die thrombozytären P-Selektine können die Bildung von Leukozyten- und Thrombozytenaggregaten auslösen [104]. Auch der platelet-activating factor (PAF) kann die Aggregatbildung fördern [60]. Thrombozyten ihrerseits können über die Ausschüttung folgender Substanzen Einfluss auf die Leukozyten nehmen: Thromboxan A2, PDGF, Serotonin, Proteasen und Adenosinphosphate [103, 152]. Durch die vasoaktiven Substanzen wird eine weitere Vasokonstriktion erreicht [103].

Das negative Zusammenwirken der verschiedenen, das „no-reflow“-Phänomen auslösenden Faktoren kann hierbei zusätzlich beobachtet werden, da NO die Thrombozytenaktivierung hemmen kann [149]. Wie aber schon weiter oben beschrieben, wird im post-ischämisch geschädigten Gewebe weniger NO produziert und damit letztlich auch die Thrombozytenaktivierung verstärkt.

2.6 Das Auftreten Ischämie-induzierter ventrikulärer Arrhythmien

Frühe Ischämie-induzierte ventrikuläre Arrhythmien treten typischerweise in zwei verschiedenen Phasen während der ersten Stunde auf [35, 87]. Die in den ersten 2 bis 10 Minuten (1A-Phase) auftretenden Arrhythmien werden durch regionale Hyperkaliämie, Azidose und Katecholamine ausgelöst [160, 210, 211]. Vornehmlich die ausgeprägte Hyperkaliämie führt zu diesen frühen Reentry-Arrhythmien [87, 140, 160]. Die ab 12 bis 30 Minuten nach Beginn des Infarktes auftretenden Phase-1B Arrhythmien sind mit der elektrischen Instabilität durch das Auseinanderweichen der Gap Junctions assoziiert [35, 178]. Für das Auftreten der Phase-1 Arrhythmien konnte ein direkter Zusammenhang zwischen der Größe der „area at risk“ und dem Auftreten von arrhythmischen Ereignissen mit einer optimalen „area at risk“-Größe zwischen 30 und 50% gefunden werden [28].

Das autonome Nervensystem beeinflusst die Entstehung der späten, ca. 90 Minuten bis 9 Stunden nach dem Infarkt auftretenden Phase-2 Arrhythmien, da in Versuchen an denervierten und „in vitro“-präparierten Herzen keine Phase-2 Arrhythmien auftraten [27, 28]. Diese spät auftretenden Phase-2 Arrhythmien spielten in unserem Versuch mit nur 30-minütiger

Ischämie keine Rolle. Deswegen soll an dieser Stelle auf die Entstehung der Phase-1A und 1B Arrhythmien eingegangen werden.

Während der ersten Minuten der Ischämie kommt es zu metabolischen Veränderungen im Myokard in Form von ATP-Abbau, Ansammlung von ADP und, als Folge der anaeroben Glykolyse, von Laktat [21, 28]. Dieses führt zur Azidose. Elektrophysiologisch kommt es zur Depolarisation des Membranpotentials und damit zur extrazellulären Anhäufung von Kalium [87]. Diese erhöhte Kalium-Konzentration verläuft typischerweise triphasisch, zu Beginn ein starker Anstieg, dann ein Plateau und etwa 30 Minuten nach Einsetzen der Ischämie ein Abfall der Kalium-Konzentration. Dieses entspricht dem Zeitraum, in dem auch die Phase-1 Arrhythmien auftreten [28, 75]. Die Erhöhung des Membranpotentials erniedrigt die Amplitude und die Geschwindigkeit des Aktionspotentials (AP) und verlängert dadurch die AP-Dauer [23, 28, 87], wahrscheinlich als Folge der Inaktivierung des Natrium-Kanals.

Zusätzlich kommt es während der ersten halben Stunde zu einer intrazellulären Ansammlung unter anderem von Katecholaminen, Elektrolyten, freien Sauerstoffradikalen, Stoffwechselprodukten und pro-inflammatorischen Mediatoren [28]. Viele von diesen besitzen ebenfalls arrhythmogenes Potential, so beispielsweise PAF [9], Katecholamine [27], Natrium [140], Kalium [87]. Auch eine höhere Herzfrequenz geht mit einem arrhythmogenen Potential einher [140]. OPITZ et al. beschreiben eine kurze Pause zwischen dem Auftreten der 1A-Phase und 1B-Phase Arrhythmien [140]. Reentry-Erregungen in der Grenzzone zwischen ischämischem und durchblutetem Myokard sollen Hauptursache des Auftretens der 1A-Arrhythmien sein [21, 86, 87, 178]. Es kommt dabei zu kreisenden Erregungen, ausgelöst durch die langsame Depolarisation, und verzögerte Erregungsrückbildung speziell im ischämischen subepikardialen Gewebe [21, 87]. Wenn nun diese langsam kreisende Erregung in einzelne kleine Erregungszirkel um einzelne nicht erregbare Bezirke zerfällt, kann daraus Kammerflimmern entstehen [87]. Diese Gefahr ist größer bei höherer Herzfrequenz und sympathischer Aktivierung [21], durch β-Blockade kann hier protektiv eingegriffen werden.

Zu den pathophysiologischen Ursachen der Phase-1B Arrhythmien gehören neben dem schon oben beschriebenen Verlust der Gap Junctions [35, 72, 178] der mechanische Dehnungsreiz [30], die intrazellulär erhöhte Calcium-Konzentration [21] und die Freisetzung von Katecholaminen [171]. In einer Studie mit dem Antiarrhythmikum Rogaptide, das stabilisierend auf die Gap Junctions wirkt, zeigte sich eine signifikante Reduktion ventrikulärer Arrhythmien und der Infarktgröße [72].

3 Material und Methodik

3.1 Tierschutz

Der Tierversuch wurde auf der 1996 veröffentlichten Grundlage des „Guide for the Care and Use of Laboratory Animal“ des National Research Councils, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science durchgeführt [133]. Nach Begutachtung durch die Kommission wurde von der Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales (BAGS) der Freien und Hansestadt Hamburg eine Genehmigung für diese Versuchsreihe erteilt (Antragsnummer 36/03).

3.2 Statistik und Fallzahlberechnung

Ziel der Untersuchung war es zu überprüfen, ob eine prophylaktische und/oder therapeutische Applikation von HBOC-200 die Ausprägung von Arealen mit aufgehobener Perfusion („no-reflow“-Areale) in der „area at risk“ im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe nach 2-minütiger oder 240-minütiger Reperfusionszeit reduziert.

Als Grundlage für die Fallzahlberechnung diente das Hauptzielkriterium der Untersuchung. Hierbei wurde die Hypothese aufgestellt, dass die prophylaktische oder die therapeutische Applikation von HBOC-200 die Ausprägung von Arealen mit aufgehobener Perfusion („no-reflow“-Areale), dargestellt durch „in vivo“-Färbung mittels Thioflavin-S in der „area at risk“, demarkiert durch „in vivo“-Färbung mit Patentblau, um mindestens 25% reduziert. Als Vergleichsgruppe diente die Kontrollgruppe, bei der eine Koronarokklusion ohne Applikation von HBOC-200 durchgeführt wurde. Als Grundlage für diese Hypothese diente ein vorausgegangener Tierversuch an der Ratte, an dem die prophylaktische HBOC-200 Applikation zu einer entsprechenden Reduktion des Infarktareals führte [18, 19].

Die Berechnung der jeweiligen Gruppengröße erfolgte computergestützt mit dem Programm Instat (Graphpad Corp., CA, USA). Unter der Annahme eines α-Fehlers von 0,05 sowie

eines β-Fehlers von 0,2 ergibt sich eine Power von 0,8, und es resultiert, bezogen auf den Hauptzielparameter, eine notwendige Gruppengröße von 8 Tieren, die den Versuch bis zum Ende durchlaufen müssen.

Aus Gründen des Tierschutzes wurde durch eine blockweise Randomisierung von jeweils 8 Tieren und eine Zwischenauswertung der Ergebnisse nach jeweils 8 Tieren der Versuch unternommen, die Anzahl der für den Versuch benötigten Tiere möglichst gering zu halten. Würde diese Zwischenanalyse ein Signifikanzniveau von <0,05 bezogen auf den Hauptzielparameter zwischen den Behandlungsgruppen und der Kontrollgruppe ergeben, wäre der Versuch zu diesem Zeitpunkt beendet worden.

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mittels SPSS 9,0. Kontinuierliche, wiederholte Parameter (wie Hämodynamik, Blutgasanalysen, Hämoglobinwerte) wurden mittels ANOVA mit α-Korrektur für Messwertwiederholung (Bonferroni) verglichen. Die Analyse der Gewebeareale erfolgte mittels zweiseitigem t-Test für unverbundene Stichproben zwischen den Gruppen. Die post-hoc Testung erfolgte mittels zweiseitigem Dunett's Test, wobei die Positiv-Kontrollgruppe als Referenzgruppe herangezogen wurde. Bei fehlender Normalverteilung erfolgte die Testung mittels Mann-Whitney U-Test (unverbundene Stichproben) bzw. Wilcoxon-Test (verbundene Stichproben). Ein $p<0,05$ wurde als signifikant angenommen.

3.3 Operativer Versuchsablauf

3.3.1 Versuchsgruppen

Der vorliegende kardiale Reperfusions/Ischämieversuch untergliedert sich in zwei Versuchsabschnitte. Im ersten Versuchsteil wurden die Tiere nach Durchführung einer 30-minütigen Koronarligatur einer nur 2-minütigen Reperfusionszeit unterzogen, wogegen bei den Tieren des zweiten Versuchsteils eine 240-minütige Reperfusionszeit durchgeführt wurde.

Die Randomisierung beider Gruppen erfolgte in jeweils vier Gruppen. Die Gruppen 1 und 5 beinhalten die Negativ-Kontrolltiere. Die Gruppen 2 und 6 entsprechen den nur mit NaCl behandelten Positiv-Kontrollgruppen. Die Tiere, die mit HBOC-200 zehn Minuten nach der Ligatur behandelt wurden, haben die Gruppennummern 3 und 7. Die 15 Minuten vor Ligatur mit HBOC-200 behandelten Tiere sind den Gruppen 4 und 8 zugeordnet. Die Gruppen 1 bis 4 enthalten die Versuchstiere der langen Reperfusionszeit. Die Tiere der Negativ-Kontrollgruppe erhielten nach Durchführung der Thorakotomie weder eine Koronarligatur

noch eine HBOC-200 Applikation. Das Schema des Versuchsablaufs in den jeweiligen Therapiegruppen ist in Tabelle 3.1 dargestellt.

3.3.2 Versuchstiere

3.3.2.1 Art

Bei den Versuchstieren handelte es sich um Kaninchen (New Zealand White Rabbits; 2,0 - 3,5 kg), die wir über die Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf vom Züchter Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen haben.

3.3.2.2 Haltung

Die Kaninchen wurden vor Versuchsbeginn mindestens 5 Tage zur Gewöhnung in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und 50 - 60%-iger relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Ernährung bestand aus SNIFF Standarddiät und Wasser ad libitum. Der Transport in das Tierversuchslabor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie erfolgte unmittelbar vor Durchführung des Versuches in einer gewärmten Transportbox.

3.3.3 Studienmedikation

In der vorliegenden Studie wurde die zellfreie ultragereinigte Hämoglobinlösung HBOC-200 Oxyglobin® (Biopure, Cambridge, MA, USA) eingesetzt (Spezifikationen siehe Tabelle 3.1). Diese Hämoglobinlösung hat bereits in den Vereinigten Staaten eine veterinärmedizinische Zulassung als Blutersatz bei Tieren. Es handelt sich hierbei um einen „hemoglobin-based oxygen carrier“ (HBOC) boviner Herkunft. Die Hämoglobinmoleküle werden mit Hilfe von Glutaraldehyd polymerisiert, es entstehen Ketten, die aus durchschnittlich 15 Tetrameren bestehen. Der Unterschied zum HBOC-201, das als Hemopure® des gleichen Herstellers seit dem Jahr 2001 in Südafrika eine Zulassung mit der Indikation perioperativer Anämie beim erwachsenen Patienten hat, besteht in einem höheren Anteil von Molekülen mit einem niedrigeren Molekulargewicht (MG<64000 Dalton).

Bovines und humanes Hämoglobin unterscheidet sich lediglich in 17 Aminosäuren (AS) in der Alpha-Kette und 24 AS in der Beta-Kette. Die unterschiedlichen Aminosäuren liegen aber in der Molekülstruktur jeweils so zentral, dass eine antigene Wirkung sehr unwahrscheinlich ist.

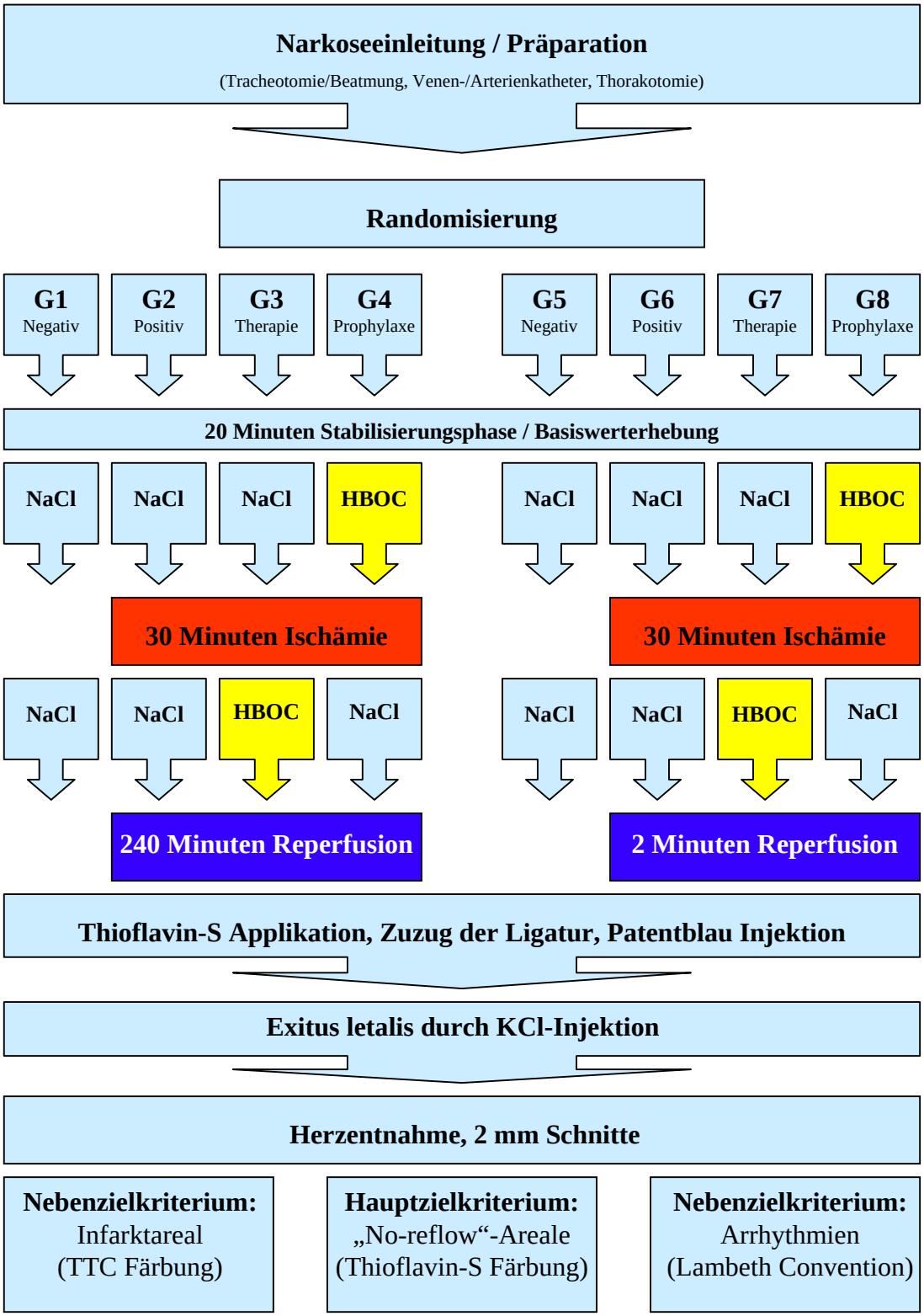


Abbildung 3.1: Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion mit HBOC-200, Schema des Versuchsablaufs

Durch die um eine AS kürzere Beta-Kette ist allerdings die Abhängigkeit der Sauerstoffaffinität des bovinen Hämoglobins von der Konzentration des 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) deutlich geringer. Die Sauerstoffaffinität des HBOC wird überwiegend durch Chlorid und nicht durch 2,3-DPG reguliert, das bewirkt einen im Vergleich mit humanem Hämoglobin deutlich erhöhten P_{50} von 36 mmHg und dadurch eine erleichterte Sauerstoffabgabe in der Peripherie. Weiterhin ist der Bohr-Effekt besonders ausgeprägt, so dass insbesondere bei azidotischen Verhältnissen leichter Sauerstoff abgegeben werden kann.

Oxyglobin® hat nur einen sehr geringen Anteil an Molekülen mit einem Molekulargewicht unterhalb der bei 32000 Dalton liegenden Nierenschwelle. Dadurch kommt es zu einer verlängerten intravasalen Halbwertszeit, da nahezu keine renale Ausscheidung erfolgt. Gleich-

Parameter	**HBOC-200 (Oxyglobin®)**
KOD (mmHg)	17
Viskosität 37° (mPa x s)	1,3
pH	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
p_{50} (mmHg)	36
Endotoxin (EU/ml)	<0,02
Phospholipid (nM)	<3
Polymerisiertes Hämoglobin	
MGW > 500.000 (%)	<15
MGW ca. 65.000 (%)	<10
MGW 32.000 (%)	<5
Freies Glutaraldehyd (μg/ml)	<3,5
N-acetyl-L-cystein (%)	<0,2
Partikel (Partikel/ml)	
> 10μm	<50
> 25μm	<5

Tabelle 3.1: Spezifika des in der Versuchsreihe verwendeten HBOC-200 (Oxyglobin®)

zeitig wird dadurch der kolloid-osmotische Druck der Hämoglobinlösung auf einem, im menschlichen Plasma herrschenden physiologischen Niveau gehalten. Durch einen niedrigen Anteil an Polymeren über 500000 Dalton kommt es zu einer geringen Speicherung im Monozytär-Phagozytären-Systems (MPS) mit der möglichen Nebenwirkung immunsuppressiver Effekte.

Die Methämoglobinbildung durch Oxidation der Hämoglobin-Moleküle wurde im Rahmen des Versuches durch Lagerung in einem lichtgeschützten und mit Stickstoff gefluteten Vakuumbehältnis vermieden. Dennoch wurde unmittelbar vor der Verwendung der Lösung die Methämoglobinkonzentration gemessen. Ab einem Wert über 5% wurde die Lösung verworfen. Unabhängig hiervon wurden 2 Wochen nach Anbruch des Medikaments die Restbestände verworfen.

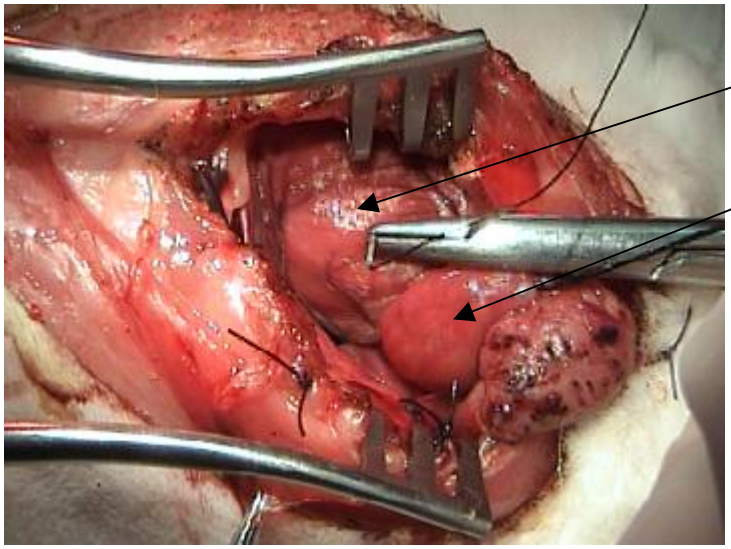
3.3.4 Narkose und Präparation

Bei den Versuchstieren (New Zealand White Rabbits) erfolgte vor Beginn des Versuchs eine intramuskuläre Gabe von 15 mg/kg S-Ketamin® (Pfizer, Karlsruhe) und 1,5 mg/kg Midazolam® (Hoffmann-LaRoche AG, Grenzach Wyhlen), um die Tiere in Allgemeinanästhesie zu versetzen. Die intramuskulären Boli wurden dabei auf maximal 0,5 ml je Injektionsstelle begrenzt, um ein zu starkes Gewebetrauma zu verhindern. Die Bewegungen ließen daraufhin innerhalb ein bis drei Minuten nach, und die Tiere wurden in Rückenlage auf einem beheizbaren und vorgewärmten Kleintier-OP-Tisch (Heated rodent operating table, Harvard Apparatus, MA, USA) gelagert.

Es erfolgte die Anlage zweier peripher venöser Zugänge an beiden Ohren des Kaninchens, um das Hypnotikum Thiopental getrennt von anderen Medikamenten zu verabreichen. Die Tiere bekamen eine Sauerstoffinsufflation sowie ein Monitoring mit EKG-Ableitung, rektaler Temperaturmessung und pulsoximetrischer Überwachung der Sauerstoffsättigung. Die Narkose erfolgte als totale intravenöse Narkose mittels 30 mg/kg/h Thiopental® (Altana Pharma, Konstanz) und 40 μg/kg/h Fentanyl® (Janssen-Cilag, Neuss). Nach Applikation eines Fentanylbolus von 40 μg/kg und einer Infiltrationsanästhesie mit 0,5 ml Lidocain® (Astra Zeneca, Wedel) wurde bei den Tieren eine Tracheotomie durchgeführt. Bis zum Abschluss der Tracheotomie wurden die Tiere über einen nasopharyngealen Vygon Tubus (Vygon GmbH, Aachen) ventiliert. Anschließend erfolgte die Präparation der linken Vena jugularis interna mit Anlage eines zentral venösen Katheters zur sicheren intravasalen Applikation der Narkosemedikamente.

Nach der Tracheotomie erfolgte die Beatmung über einen 3mm Vygon Tubus mit einer FiO_2 von 1,0 an einem Kleintierbeatmungsgerät (Inspira Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus). Es wurden Normocapnie, Normothermie und Normoglycämie gewährleistet. Der CO_2–Partialdruck wurde kontinuierlich endexspiratorisch (Monitoreinheit mit Mainstream-Messung, Fa. Datex-Ohmeda, Helsinki, Finnland) und wiederholt arteriell (ABL 505, Radiometer Kopenhagen, Dänemark) bestimmt.

a)



b)

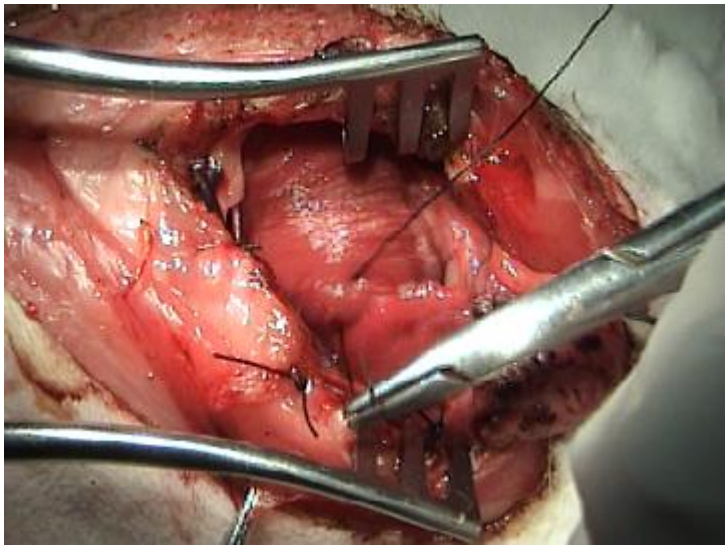


Abbildung 3.2: a und b: Durchführung des Herzstiches im Bereich des ersten Astes der Arteria circumflexa der linken Koronararterie

Die Körpertemperatur wurde mit dem beheizbaren OP-Tisch und zweier Wärmelampen (Osram Siccatherm 280 Watt) auf normothermen Werten gehalten. In der linken und rechten Femoralarterie wurden jeweils arterielle Zugänge platziert, auf diese Weise konnte eine kontinuierliche Blutdruckmessung durchgeführt und gleichzeitig eine Blutgasanalyse entnommen werden. Unter Präparation wurden die Versuchstiere mit einer FiO_2 von 1,0 kontrolliert beatmet, nach der Thorakotomie zusätzlich mit einem positiv-endexspiratorischen Druck von 5 mbar, um Atelektasenbildung zu vermeiden. Die Thorakotomie erfolgte auf der linken Seite zwischen dem vierten und fünften Interkostalraum.

Es erfolgte eine Perikardiotomie zur Darstellung der linken Arteria coronaria circumflexa. Ein 4-0 Seidenfaden wurde um den ersten Ast der Arterie nahe des Ursprungs geführt (siehe Abbildung 3.2) [84]. Die Fadenenden wurden durch ein Filzplättchen (Meadox Dacron Felt; Meadox Medicals, Inc., Oakland, NJ) und ein etwa 3 cm langes Wattestäbchen geführt. Durch Zug an den Fadenenden konnte somit eine temporäre Ligatur des Gefäßes erfolgen [150]. Das linke Herzohr wurde anschließend mittels Seldinger Technik punktiert und ein 18G Katheter implantiert 3.3. Über diesen Katheter erfolgte dann am Ende des Versuches die Injektion der Farbstoffe Thioflavin-S und Patentblau zur Messung der Perfusionsausfälle und der „area at risk“.

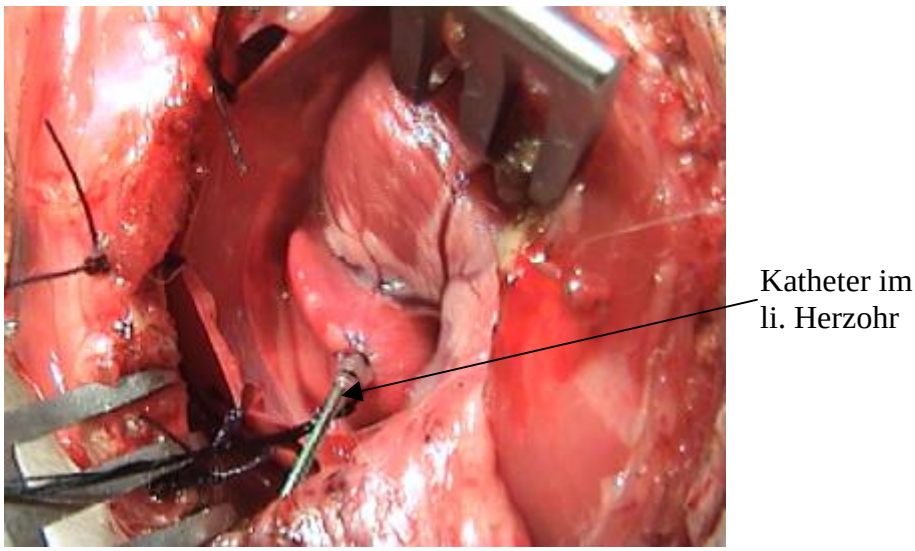


Abbildung 3.3: Situs nach Einführen des Katheters in das linke Herzohr

Nach Abschluss der Präparation des Versuchstieres wurde die FiO_2 auf 0,3 reduziert, und es folgte eine Erholungsphase von 20 Minuten. Erst zu diesem Zeitpunkt wurden die Tiere randomisiert in die jeweiligen Therapiegruppen und in die 2-minütige bzw. 240-minütige

Reperfusionsphase eingeteilt. In der Tabelle 3.2 findet sich der zeitliche Ablauf der Messpunkte sowie die jeweils erhobenen Messparameter.

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 (= Ligatur + 15 min)	FIO_2, HF, MAP, Temp, SaO_2
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
Versuchsende 2-minütige Reperfusion		
12-34 (R10-R230)	Reperfusion + jeweils 10 min bis + 230 min	FIO_2, HF, MAP, Temp, SaO_2
35 (R240)	Reperfusion + 240 min	FIO_2, HF, MAP, Temp, SaO_2, BGA, Hb, fHb, COHb, ZVD, BZ, E-lyte
Versuchsende 240-minütige Reperfusion		

Tabelle 3.2: Übersicht der intraoperativen Messpunkte und der jeweiligen Parameter

Im Anschluss an die 20-minütige Ruhephase und der Erhebung der Ausgangsparameter wurde nun in den Prophylaxegruppen 0,4 g/kg (10-15 ml ad 20 ml Gesamtvolumen durch NaCl ergänzt) HBOC-200 intravenös über etwa 5 Minuten verabreicht. Den Tieren der anderen Gruppen wurde ein äquivalentes Volumen NaCl 0,9% injiziert. 15 Minuten später wurde die Koronarligatur für 30 Minuten zugezogen (siehe Abbildung 3.4).

10 Minuten nach Beginn der Ligatur erfolgte in den Therapiegruppen die Applikation von 0,4 g/kg (10-15 ml ad 20 ml NaCl) HBOC-200. Die Tiere der anderen Gruppen erhielten ein äquivalentes Volumen an 0,9% NaCl. Während des gesamten Versuches erfolgte eine kontinuierliche Messung von Hämodynamik und $paSO_2$. Wiederholte Bestimmungen der Blut-

gase, Hämoglobin- und Blutzuckerkonzentrationen (siehe Tabelle 3.2) vervollständigten die Überwachung der Versuchstiere.

Sollten unter der Ligatur Herzrhythmusstörungen in Form von Kammertachykardien oder Kammerflimmern auftreten, die nicht innerhalb eines Zeitraums von 15 Sekunden in einen Sinusrhythmus umsprangen, so erfolgte eine „Thumb version“ mittels eines Q-Tips auf den apex cordis. Auf diese Weise sollte die Anzahl der Versuchstiere gering gehalten werden. Diese Vorgehensweise entspricht publizierten Standards [33].

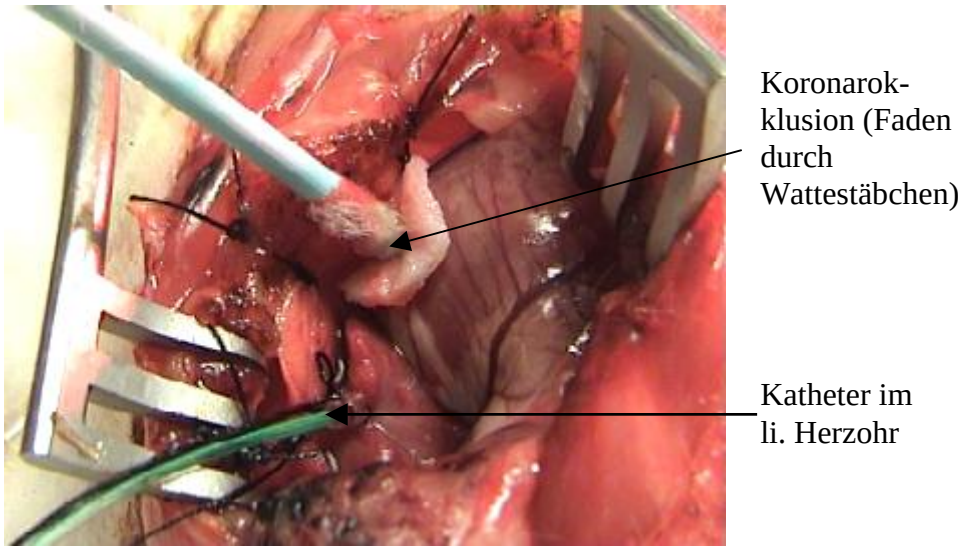


Abbildung 3.4: Zuzug der Koronararterie, sichtbar wird ein Abblassen der distal der Okklusion gelegenen Areale des linken Ventrikels

Am Ende der 2-minütigen bzw. 240-minütigen Reperfusionsphase wurde dann eine 4%-ige Thioflavin-S Lösung (1ml/kg) über den liegenden Katheter in das linke Herzohr appliziert. Eine Minute später wurde die Koronarligatur erneut zugezogen und Patentblau-Lösung (2%, 1ml/kg) ebenfalls in den linken Vorhof injiziert (siehe Abbildung 3.5). Nach Färbung der Lungen wurde der Exitus letalis durch eine Bolusinjektion von 4 mmol/kg KCl herbeigeführt.

Das Herz konnte durch Absetzen der großen Gefäße unmittelbar danach entnommen und in eine spezielle Matrix (Heart Matrix for rabbits, Harvard Apparatus) gelegt werden. Herz und Matrix wurden etwa 25 Minuten bei –20° C gefroren, um das Schneiden in 2 mm dicke atrioventrikuläre, basisparallele Scheiben ohne Zerreißen des Gewebes zu ermöglichen.

Sämtliche nachfolgenden Untersuchungen erfolgten verblindet.

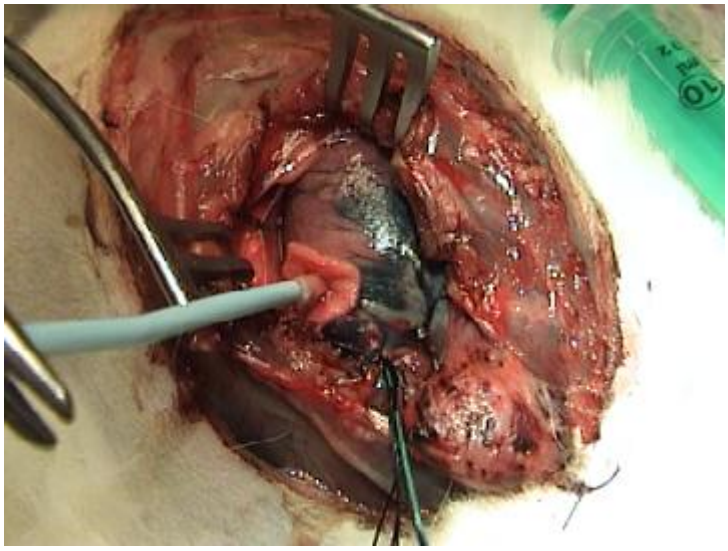


Abbildung 3.5: Darstellung des Herzens nach erneuter Anlage der Koronarokklusion und Injektion von Patentblau 2%. Die weiter perfundierten Areale stellen sich blau gefärbt dar, während die ischämischen Areale nicht angefärbt werden.

3.3.5 Intraoperative Messwerte

3.3.5.1 Inspiratorische Sauerstoffkonzentration und Kapnometrie

Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2) wurde mittels einer in das Mischkammerreservoir des Beatmungsgerätes eingebrachten Elektrode (Oxydig, Dräger, Lübeck) kontinuierlich gemessen.

Der endexspiratorische CO_2–Partialdruck wurde kontinuierlich mit Hilfe eines Normocap Monitors (Datex-Ohmeda, Helsinki, Finland) im Mainstream-Verfahren gemessen und graphisch auf dem Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) dargestellt. Bei den Versuchstieren wurden ausschließlich nicht blockbare Beatmungstuben benutzt. Aus diesem Grund war keine zuverlässige quantitative Messung zu erwarten, sondern die Messwerte dienten lediglich einer qualitativen Nutzung, um eine Verlegung oder Dislokation des Tubus frühzeitig zu erkennen und den Verlauf der Kurve beurteilen zu können. Die erhobenen Daten wurden dementsprechend nicht ausgewertet.

3.3.5.2 Hämodynamik

Zentraler Venendruck

Die Messung des zentralen Venendrucks (ZVD) erfolgte intermittierend über den zentralvenösen Katheter mittels eines elektromagnetischen Druckaufnehmers (Logical, Medex, Klein-Winternheim) und Monitoreinheit (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA).

Herzfrequenz und arterieller Blutdruck

Die kontinuierliche EKG-Ableitung erfolgte über drei an den Extremitäten des Tieres angebrachte Klebeelektroden für Neugeborene (Agilent 13953D, Agilent Technology, Andover, USA) als Extremitätenableitungen und Darstellung auf einem Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA). Der arterielle Blutdruck wurde über einen in der linken Femoralarterie liegenden Katheter kontinuierlich mittels eines elektromagnetischen Druckaufnehmers (Logical, Medex, Klein-Winternheim) bestimmt. Zu den Messzeitpunkten wurde die jeweilige Herzfrequenz notiert sowie über einen am Monitor angeschlossenen Drucker (Direct digital writer series 7100, Marquette, Milwaukee, USA) mit 50 mm/s dokumentiert. Unter Verwendung eines Analog-Digital-Wandlers (Fa. INET, Hamburg) erfolgte die kontinuierliche Speicherung von EKG und arteriellem Blutdruck über das Programm DasyLab (Vers 7.0, National Instruments, USA). Dies ermöglichte die Auswertung von Herzrhythmusstörungen nach der Lambeth Convention [33].

Rate-Pressure-Product

Das sogenannte Rate-Pressure-Product (RPP) ist ein sensitiver, indirekter Index für den myokardialen Sauerstoffverbrauch (mVO_2). Dieses gilt für wache Patienten, Patienten in Narkose und bei hämodynamisch instabilen Patienten [214]. Das RPP wird nach folgender Formel berechnet:

$$\text{RPP} = (\text{Herzfrequenz} \times \text{systolischer Blutdruck}) \div 1000$$

Ein über längere Zeit bestehender erhöhter Sauerstoffbedarf zum Beispiel durch Tachykardie

und/oder Hypertension kann bei durch Reperfusionsschäden bedingter Minderversorgung des Myokards zu Sauerstoffmangel führen und allein dadurch das Infarktareal möglicherweise vergrößern. Durch die Berechnung des RPP bei den Versuchstieren der langen Reperfusionszeit soll ein möglicher Zusammenhang zwischen erhöhtem myokardialen Sauerstoffbedarf und Vergrößerung der Infarktareale detektiert werden. In den Versuchsgruppen mit der 2-minütigen Reperfusionszeit wurde auf Grund der zu kurzen Reperfusionszeit auf die Berechnung verzichtet.

3.3.5.3 Blutgasanalysen, Elektrolyt- und Hämoglobinkonzentrationen

Über den in der rechten Femoralarterie liegenden arteriellen Zugang wurde zu den Messzeitpunkten etwa ein Milliliter Blut entnommen. Aus diesen Proben wurden Blutgasanalysen durchgeführt, die Blutglukosekonzentration und andere laborchemische Parameter bestimmt. Die Bestimmung von pH, paO_2, $paCO_2$, ionisiertem Calcium, Kalium und Natrium erfolgte mittels Blutgasanalysator (ABL 505, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark).

Folgende Parameter wurden bestimmt bzw. berechnet: Standard Basenüberschuss (SBE), Standard-Bikarbonat (SBc) und die Sauerstoffsättigung (SaO_2). Weiterhin wurde die Gesamthämoglobinkonzentration (tHb), der Anteil an Oxyhämoglobin (HbO_2), Carboxyhämoglobin (COHb), Methämoglobin (MetHb) und freiem, plasmatisch gelöstem Hämoglobin (fHb) gemessen (OSM 3, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Das fHb wurde nach 5-minütiger Zentrifugation (5000 rpm, Haraeus, Sepatech) von 80 μl Blut aus dem Plasmaüberstand gemessen. Die Blutzuckerbestimmung erfolgte mittels B-Glukose Analyser (Hemocue, Angelholm, Schweden).

3.3.5.4 Körpertemperatur

Im gesamten Verlauf des Versuches wurde auf strikte Einhaltung der Normothermie der Tiere geachtet. Zur Überwachung der Körpertemperatur wurde den Kaninchen vor Beginn der Präparation eine rektale Temperatursonde eingeführt und die Werte kontinuierlich auf den Monitor übertragen. Als Wärmequellen dienten zwei Wärmelampen (Osram Siccatherm 380W) und der beheizbare Operationstisch.

3.4 Organaufbereitung

Nach Entnahme des Organs durch Absetzen an den großen Gefäßen wurde das Herz mit kalter NaCl-Lösung gespült und gewogen. Das Herz wurde in die auf –20° C vorgekühlte Matrix (Heart Matrix for Rabbits, Harvard Medical Instruments, Holliston, MA, USA) gelegt und 25 Minuten bei –20° C gefroren. Vorher wurde das Organ in Frischhaltefolie eingewickelt, um ein Festfrieren am Metall der Matrix zu verhindern. Durch das Einfrieren wurde das Lamellieren des Organs vereinfacht. Anschließend wurde das Herz in 2 mm dicke Schnitte basisparallel lamelliert.

Sämtliche Schnitte wurden zur Bestimmung der „no-reflow“-Areale (Thioflavin negativ) unter UV-Licht eingescannt. Anschließend wurden die Herzschnitte unter einem Flachbettscanner zur Bestimmung der „area at risk“ und der TTC-Färbung verwendet (siehe 3.6.1).

3.5 Thioflavinfärbung

Sämtliche durch das Lamellieren entstandenen Schnitte des Herzens wurden für die Bestimmung der „no-reflow“-Areale eingescannt. Die Anfärbung des vitalen Gefäßendothels erfolgte mittels „in vivo“-Injektion von Thioflavin-S, das unmittelbar vor dem Versuchsende über den im linken Herzohr liegenden Katheter injiziert wurde (wie bereits unter 3.3.4 geschildert).

3.5.1 Ansetzen von Thioflavin-S 4%

Zur Bestimmung der Mikroperfusionsausfälle wurde in diesem Versuch Thioflavin-S 4% eingesetzt [95]. Die Lösung wurde hergestellt, indem 0,4g Thioflavin-S in 10 ml NaCl gelöst wurde. Nach dem vollständigen Auflösen des Pulvers wurde die Lösung 5 Minuten bei 1500 U/min zentrifugiert. Anschließend wurde die Lösung durch einen Feinfilter mit einer Porengröße von 0,2 μm filtriert. Bis zur Verwendung wurde das Thioflavin-S im Kühlschrank aufbewahrt, jedoch vor der Injektion in einem Wasserbad auf eine Temperatur von 37° C erwärmt.

3.5.2 Durchführung der Thioflavinfärbung und Auswertung

Die Dosierung des 4% Thioflavin-S betrug 1 ml/kg. Die angewärmte Lösung wurde kurz vor Ende der jeweiligen Versuchsreihe als Bolus über 15 Sekunden über den im linken Herzohr liegenden Katheter infundiert. Die Anflutungszeit von etwa 30 - 60 Sekunden wurde abgewartet,

bevor die Ligatur erneut zugezogen wurde und das Patentblau zur Anfärbung der „area at risk“ zum Einsatz kam. Das Thioflavin dringt in alle nicht durch das „no-reflow“-Phänomen verschlossenen Kapillare und färbt das Gefäßendothel an.

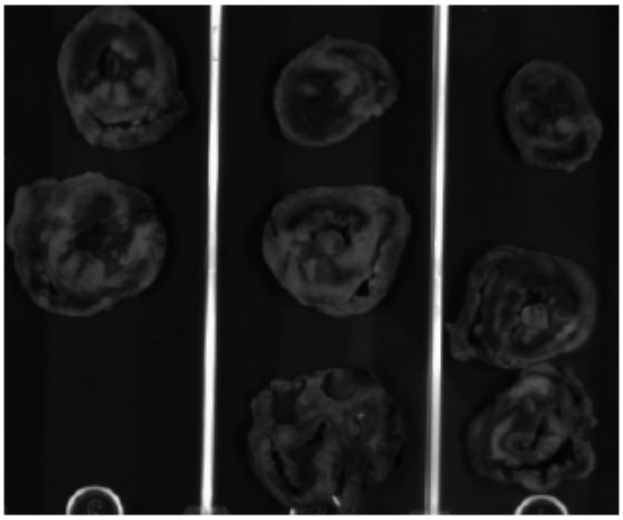


Abbildung 3.6: Darstellung der Färbung mit Thioflavin-S 4%. Die dunkel gefärbten Areale stellen die „no-reflow“-Areale dar.

Unmittelbar nachdem das Herz in 2 mm dicke Scheiben zerschnitten wurde, erfolgte das Einscannen des Gewebes (siehe Bild 3.6). Die Gewebeschnitte wurden dafür nebeneinander in einer Plastikschale auf dem UV-Scanner mit einer Wellenlänge von 365 nm und einer Belichtungszeit von 15 Sekunden eingescannt und im TIF-Format gespeichert. Nach Versuchsende erfolgte eine in Bezug auf die jeweilige Versuchsgruppe verblindete Auswertung am Monitor. Planimetrisch wurden sowohl die Fläche des linken Ventrikels als auch die Größe der „no-reflow“-Areale, die sich auf den Bildern dunkel darstellen (siehe Bild 3.6), ausgemessen. Die Größe der „no-reflow“-Areale wurde dann als Prozentsatz der „area at risk“ berechnet und in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe ausgewertet.

3.6 TTC-Färbung und „area at risk“

3.6.1 Technik

Das Versorgungsgebiet des ligierten Gefäßes entspricht der so genannten „area at risk“, die nach Ligatur und Injektion von Patentblau nicht angefärbt wird (siehe Abbildung 3.7).

Die Herzschnitte wurden unmittelbar nach dem Schneiden beidseitig eingescannt, um eine Unschärfe der Patentblau-markierten Flächen durch weitere Färbung zu verhindern. Die „area at risk“ stellt sich in den Schnitten als ungefärbtes Myokard scharf abgegrenzt gegenüber dem übrigen, blau angefärbten Herzgewebe dar. Erst danach erfolgte die Färbung mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC).

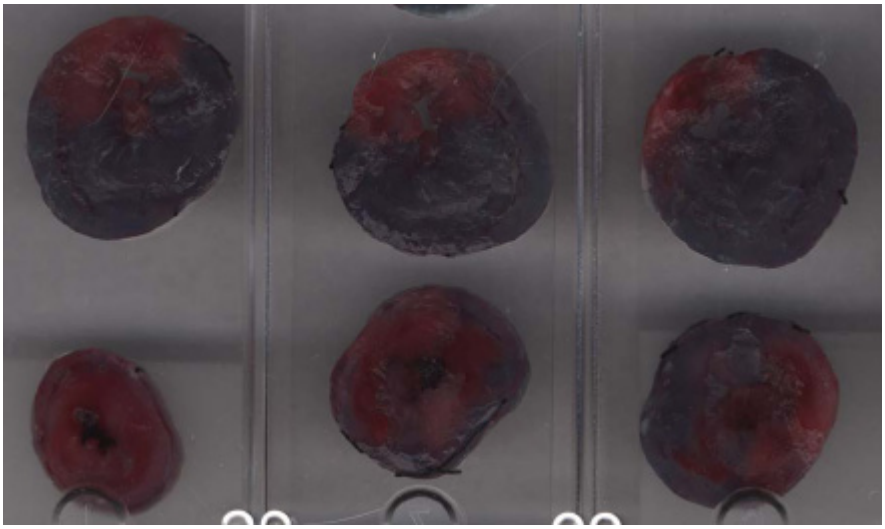


Abbildung 3.7: „Area at risk“. Die „area at risk“ stellt sich als durch Thioflavin nicht angefärbtes, rötliches Areal dar.

Zur Darstellung des Infarktareals innerhalb der Gewebeschnitte erfolgte, entsprechend der vorbeschriebenen Technik [47], eine Färbung der Schnitte in Multilayers mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) in 0,2 mol Trispuffer (pH=7,8; Serva Biochemica, Heidelberg). Nach 10 Minuten in 37° C Wasserbad wurde die Reaktion durch 6%-iges Formalin terminiert. Anschließend wurden die Schnitte erneut von beiden Seiten eingescannt (siehe Abbildung 3.8).

Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid ist ein Salz mit einer Ringstruktur aus Kohlenstoff und 4 Stickstoffatomen, von denen eines quarternär ist. Durch eine Reduktion des Tetrazoliums wird diese Ringstruktur geöffnet und das rote Formazan entsteht. Der Prozess erfolgt enzymabhängig mittels membranständiger Oxidasen und den Co-Enzymen NADH/NADPH, die zu NAD/NADP oxidiert werden. Sobald die Konzentration von NADH/NADPH unter 80 pmol/mg Gewebe gefallen ist, erfolgt keine Färbereaktion mehr [94]. Mit TTC wird also ein Mangel an Co-Enzymen im infarzierten Myokard nachgewiesen.

KLEIN et al. haben beschrieben, dass die mittels TTC gemessene Infarktfläche nahezu mit der mittels Elektronenmikroskopie bestimmten Infarktfläche [94] identisch ist.

3.6.2 Auswertung

In den Abbildungen 3.9 und 3.10 wird die Technik der Flächenberechnung schematisch dargestellt. Die Bestimmung der Flächen erfolgte planimetrisch mit dem Bildbearbeitungsprogramm ScionImage® (Scion Corp., ML, USA). Nicht gemessen wurde die Fläche des rechten Ventrikels. Bei allen Färbungen und verschiedenen Einscanvorgängen wurden jeweils der linke Ventrikel und die zu messende Fläche bestimmt: die „area at risk“ als die nicht gefärbte Fläche bei der Patentblau Färbung, die „no-reflow“-Areale als die durch Thioflavin nicht gefärbten Flächen sowie die infarzierten Areale als die durch TTC demarkierten Areale. Anschließend wurden die Relationen der Flächen berechnet.

Auf diesen Werten aller Einzelschnitte beruhte die Berechnung der entsprechenden Volumina, bezogen auf das gesamte Herz und nach Aufhebung der Verblindung auf die jeweiligen Studiengruppen. Diese Technik entspricht dem vielfach publizierten internationalen Standard [47, 201].

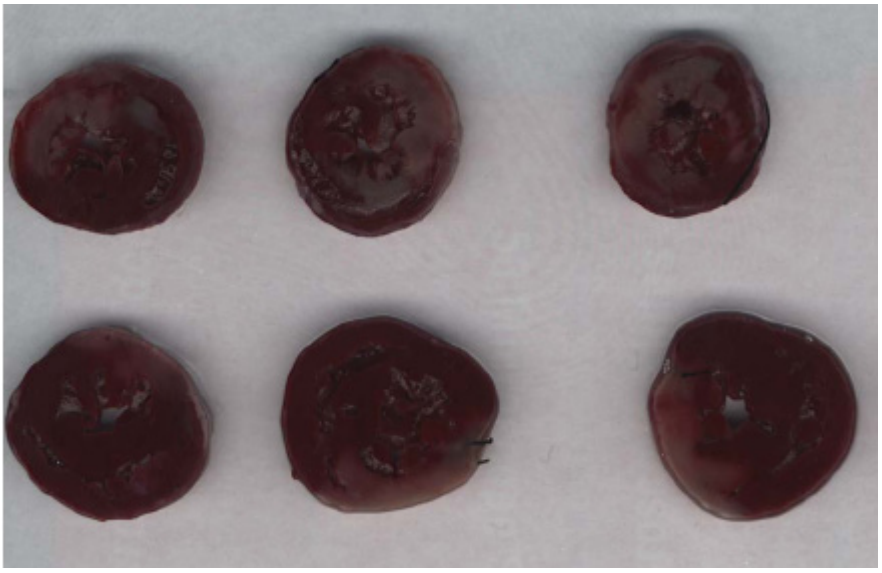


Abbildung 3.8: Infarktareale. Die Infarktareale stellen sich in der Abbildung durch Anfärbung mit TTC weiß dar.

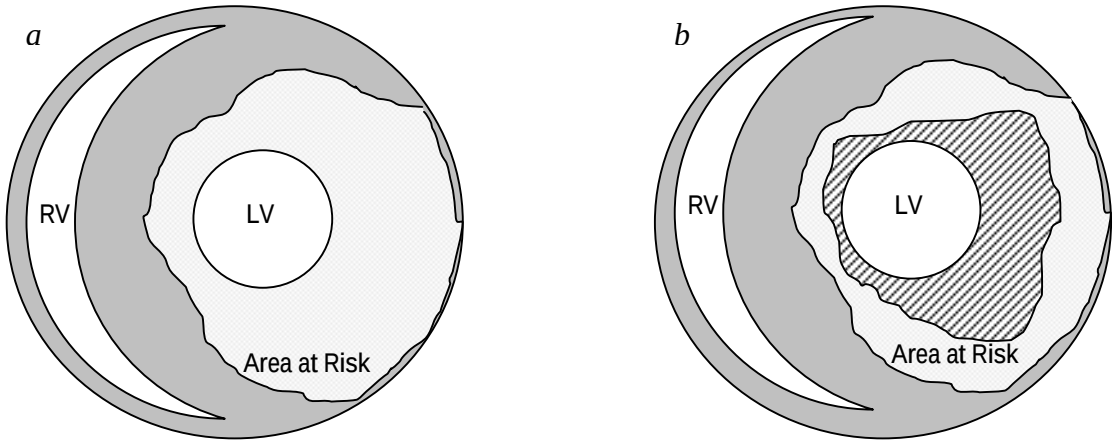


Abbildung 3.9: Schematische Darstellung der verschiedenen Auswertungsareale zur Quantifizierung des myokardialen Infarktareals nach Anfärbung mittels Patentblau und Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid. Abb. a: Es ist ein basisparalleler Querschnitt des Herzens mit den Lumina des linken (LV) und rechten (RV) Ventrikels dargestellt. Zusätzlich zeigt sich nach „in vivo"-Anfärbung mit Patentblau bei erneut angelegter Koronarligatur die „area at risk" (hellgrau). Abb. b: Nach Inkubation mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid stellt sich das Infarktareal als ungefärbtes Teilareal der nun kräftig roten „area at risk" dar.

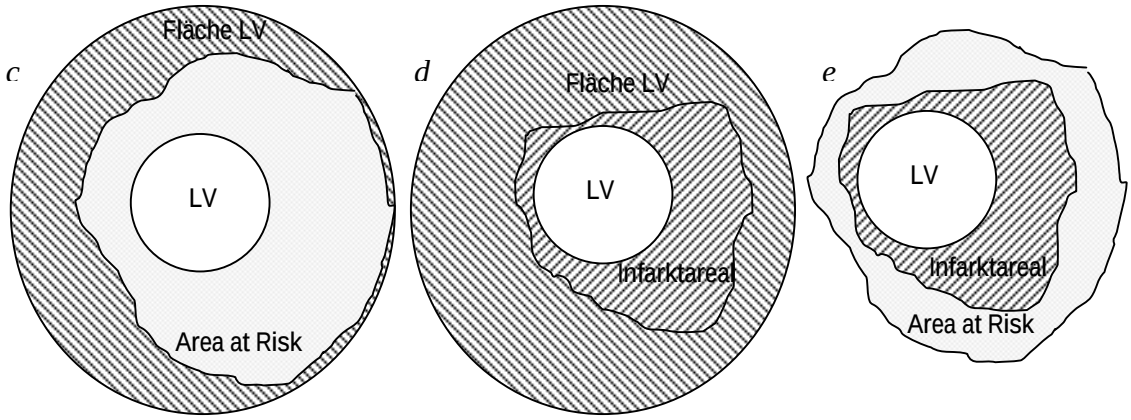


Abbildung 3.10: Es wurden nun die Absolutwerte der unterschiedlichen Flächen planimetrisch ermittelt und zueinander in Bezug gesetzt. Die Fläche des Ventrikellumens wurde bei allen Berechnungen ausgespart. Abb. c: Verhältnis der „area at risk" zur Fläche des linken Ventrikels. Abb. d: Verhältnis des Infarktareals an der Fläche des linken Ventrikels. Abb. e: Verhältnis des Infarktareals an der „area at risk"

3.7 Arrhythmieerfassung

3.7.1 Elektrokardiogramm

Die kontinuierliche EKG-Ableitung erfolgte, wie in Kapitel 3.3.5.2 beschrieben, mit an die Pfoten geklebten Neugeborenenelektroden. Sie wurde auf dem Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) dargestellt und auf dem Computer mit dem Programm DasyLab (Vers 7.0, National Instruments, USA) mit einer Sampling Rate von 100 Hz gespeichert. Zusätzlich zur EKG-Speicherung erfolgte die Registrierung der arteriellen Blutdruckkurve. Die Umwandlung des analogen in ein digitales Signal erfolgte mit einem AD-Wandler der Fa. INET (Hamburg).

3.7.2 Auswertung

Die Auswertung erfolgte entsprechend den Richtlinien und Definitionen der Lambeth Conventions [207]. Es kam der von CURTIS und WALKER validierte Score C zur Anwendung (siehe Tabelle 3.3) [33].

Die Zählung der Arrhythmien erfolgte von Beginn der Ligatur bis zum Beginn der Reperfusion. Die Wiedergabe der digital gespeicherten Daten erfolgte ebenfalls mit dem Programm DasyLAB, wobei die EKG-Darstellung mit einem Tiefpass-Filter von 30 Hz vorgenommen wurde. Erfasst wurde der exakte Zeitpunkt und die Dauer der jeweiligen Herzrhythmusstörung. Unterschieden wurde zwischen einer Ventrikulären Extrasystole (VES), einer Salve von zwei oder drei VES (VS), einer Ventrikulären Tachykardie (VT) als mehr als vier aufeinander folgenden VES und eines Kammerflimmerns (VF).

Während des Versuches erfolgte, wie unter 3.3.4 beschrieben, bei nicht nach 15 Sekunden terminiertem Kammerflimmern bzw. -tachykardien eine „Thumb Version“. Dieses wurde ebenfalls notiert und zwischen spontan beendeten Ventrikulären Tachykardien (SVT) und Kammerflimmern (SVF) und nicht spontan terminierten NVT und NVF unterschieden.

Wert	**Ereignis**
0	Keine VES, VT, VF
1	VES
2	1-5 Episoden von VT (=4 VES)
3	> 5 Episoden von VT und/oder 1x VF
4	2-5 Episoden von VF
5	> 5 Episoden von VF

Tabelle 3.3: Arrhythmiescore C nach CURTIS und WALKER (VES = ventrikuläre Extrasystole; VT = ventrikuläre Tachykardie; VF = ventrikuläres Flimmern/Flattern)

4 Ergebnisse

Die Versuchstiere, die eine 2-minütige Reperfusionsphase (Gruppen 5-8) durchliefen, werden im Folgenden getrennt von den Tieren mit der 240-minütigen Reperfusionszeit (Gruppen 1-4) dargestellt.

4.1 Reperfusionszeit 2 Minuten

Insgesamt wurden 6 Versuchstiere je Untersuchungsgruppe in die komplette Auswertung aller Parameter eingeschlossen.

4.1.1 Intraoperative Messwerte

4.1.1.1 Gewicht der Tiere

Das Körpergewicht der Kaninchen lag zwischen 2,33 und 2,69 Kilogramm. Es ergab sich kein statistischer Unterschied zwischen den 4 Untersuchungsgruppen. Im Anhang sind die Daten als MW±SD in Tabelle 8.1 angegeben.

4.1.1.2 Hämodynamische Parameter: Herzfrequenz, Blutdruck sowie rektale Körpertemperatur

Es zeigten sich nach der Präparation und vor der Anlage der Koronarstenose vergleichbare hämodynamische Parameter zwischen den Versuchsgruppen. Unabhängig von der Gruppe kam es im Verlauf des Versuches zu einer Zunahme der Herzfrequenz in allen Gruppen. Signifikante Unterschiede ergaben sich jedoch nicht. In den Gruppen mit der therapeutischen und prophylaktischen Gabe von HBOC-200 zeigte sich ein kurzfristiger, nicht signifikanter Abfall der Herzfrequenz. Der mittlere arterielle Blutdruck blieb während dieses ganzen Versuchsteiles stabil. In den Tabellen 8.2 und 8.3 sind die hämodynamischen Parameter aufgeführt,

der zeitliche Verlauf der Herzfrequenz und des mittleren arteriellen Blutdruckes ist in den Abbildungen 4.1 und 4.2 dargestellt.

Die rektal gemessene Körpertemperatur ist in Tabelle 8.4 dargestellt, es zeigten sich zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Gruppen.

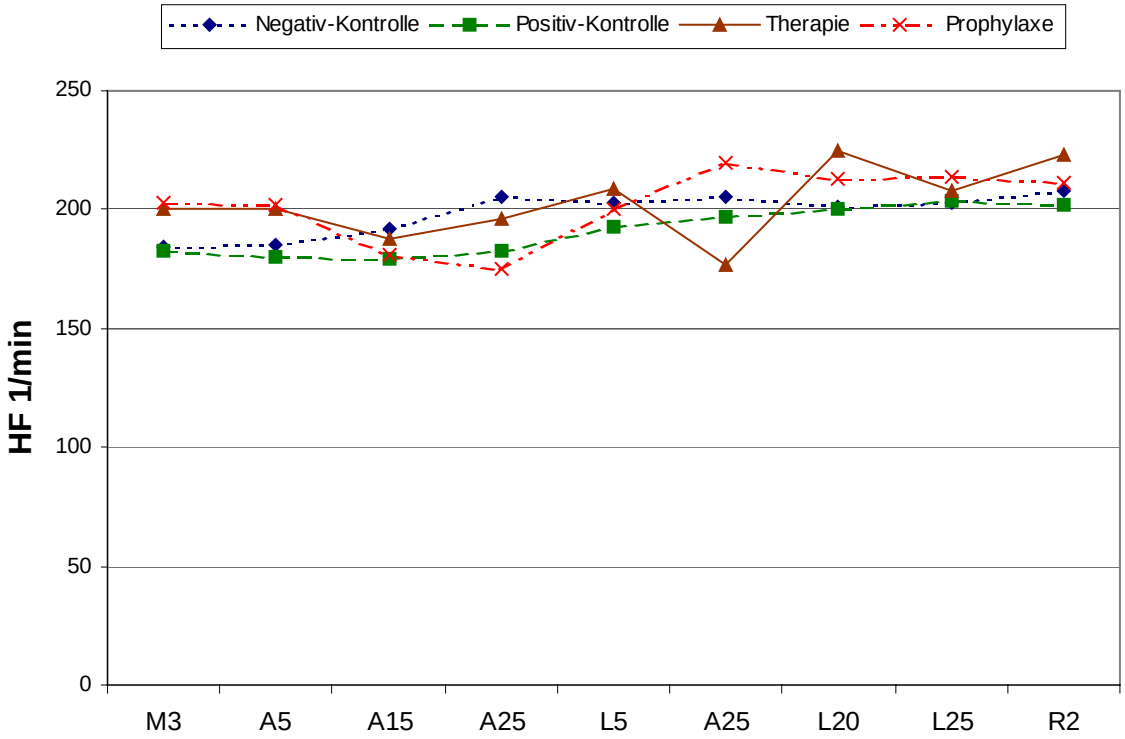


Abbildung 4.1: Zeitlicher Verlauf der Herzfrequenz. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2

4.1.1.3 Blutgasanalyseparameter

Die Bestimmung der Blutgasanalyseparameter fand zu 5 verschiedenen Zeitpunkten des Versuches statt (siehe Tabelle 3.2). Ausgewertet wurden vornehmlich die Parameter pH-Wert, $paCO_2$, paO_2, Standardbikarbonat und Standardbasenüberschuss. Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration und die Sauerstoffsättigung werden zusätzlich angegeben. Die einzelnen Parameter sind in den Tabellen 8.5 bis 8.11 im Anhang aufgeführt. Die Ausgangswerte sämtlicher Parameter unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen.

Im Versuchsverlauf ergaben sich für die pH-Werte zum Zeitpunkt 5 Minuten nach der prophylaktischen HBOC-Applikation signifikant höhere Werte in der Therapie- und Positiv-

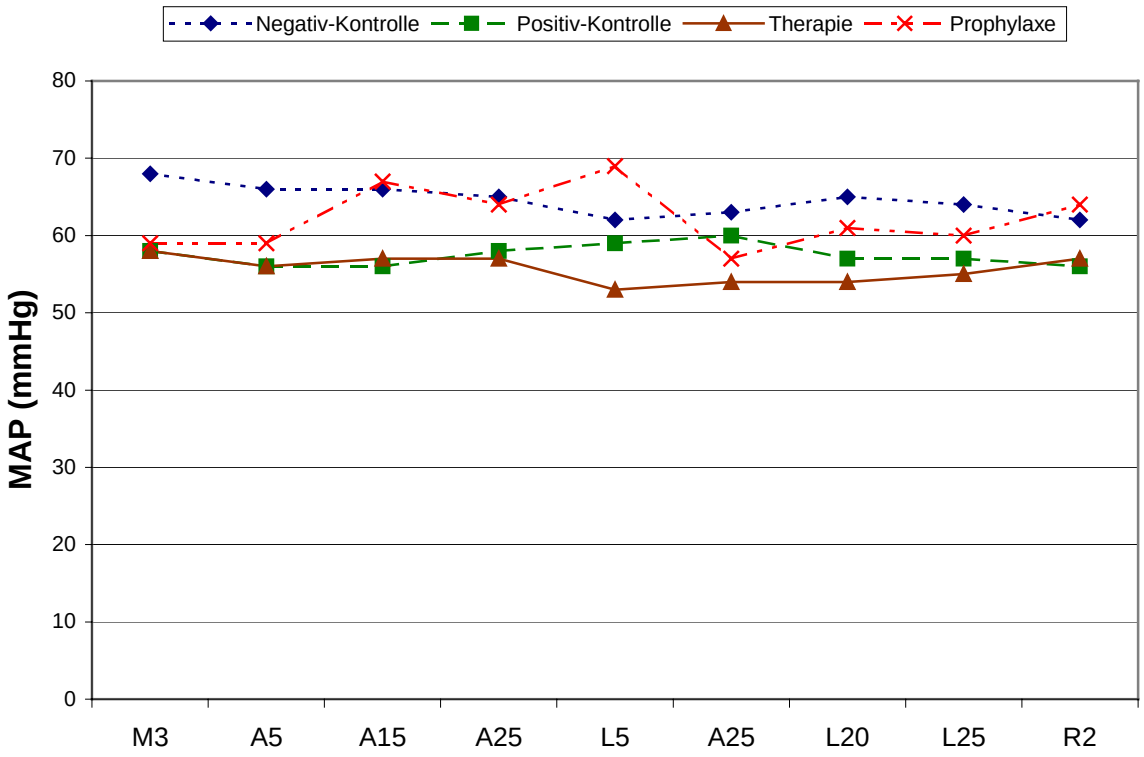


Abbildung 4.2: Zeitlicher Verlauf des Mittleren arteriellen Blutdruckes. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2

Kontrollgruppe im Vergleich zur Negativ-Kontrollgruppe. Auswirkungen konnten jedoch nicht festgestellt werden. Alle übrigen gemessenen Parameter ergaben keine Unterschiede zwischen den Gruppen.

4.1.1.4 Elektrolyte und Blutzuckerkonzentration

Im Rahmen des Versuches wurden die Elektrolyte Natrium, Kalium und das ionisierte Calcium bestimmt. Für die Elektrolyte Natrium und Kalium ergaben sich zu keinem Zeitpunkt Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Das ionisierte Calcium war jedoch in der Prophylaxegruppe schon zu Beginn des Versuches signifikant niedriger als in der Negativ-Kontrollgruppe. Im weiteren Verlauf des Versuches sank auch die Calcium-Konzentration in den anderen Therapiegruppen, so dass sich für die Negativ-Kontrollgruppe signifikant höhere Werte ergaben.

Unterschiede zwischen den Gruppen in der Blutzuckerkonzentration zeigten sich nicht, sie stieg im Versuchsverlauf in allen Gruppen an.

Die Messwerte sind im Anhang in den Tabellen 8.12 bis 8.15 aufgelistet.

4.1.1.5 Hämoglobinkonzentration

Weder bezüglich der Konzentration von Gesamt-Hömoglobin (tHb), Carboxy-Hämoglobin (COHb) noch von Met-Hämoglobin (MetHb) konnten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dies war auch nach Applikation von HBOC-200 nicht der Fall. Zwar kam es im Verlauf des Versuches zu einem leichten Abfall des Gesamthämoglobins, diese Tendenz war jedoch in allen Gruppen festzustellen.

Bei den Werten für das Oxy-Hämoglobin (HbO_2), zeigten sich zu den ersten beiden Messzeitpunkten signifikant niedrigere Werte in der Negativ und Positiv-Kontrollgruppe als in der Therapiegruppe. Im Versuchsverlauf fielen die Werte des Oxy-Hämoglobins in den beiden mit HBOC-200 behandelten Gruppen ab, es ergaben sich aber keine signifikanten Unterschiede.

Als Resultat der HBOC-200-Applikation in der Therapie- und Prophylaxegruppe kam es jeweils zu einem signifikanten Anstieg des plasmatischen Hämoglobins (fHb) im Vergleich zu den anderen Gruppen, die kein HBOC erhielten oder zu diesem Zeitpunkt noch keines erhalten hatten (Therapie). Die einzelnen Messwerte der verschiedenen Parameter sind als MW±SD im Anhang in den Tabellen 8.16 bis 8.20 angegeben.

4.1.2 „Area at risk“

Durch die Gabe von Patentblau am Versuchsende wurde die „area at risk“, also die Zone in den Herzschnitten, die sich nach erneuter Koronarokklusion nicht blau anfärbte, dargestellt. Sie repräsentieren das unter der Koronarokklusion ischämische Areal. In der Abbildung 4.3 sind die jeweiligen Durchschnittswerte der „area at risk“ in den einzelnen Gruppen als Prozentsatz der Fläche des linken Ventrikels aufgeführt. Mit Werten zwischen 32% und 36% war die „area at risk“ in allen Gruppen nahezu gleich groß. Die Unterschiede zwischen den Gruppen waren nicht signifikant.

4.1.3 „No-reflow“-Areale

Die „no-reflow“-Areale wurden mit Hilfe der Färbung mit Thioflavin-S 4% ausgemessen und ihre Relation zur Fläche der „area at risk“ berechnet. Die Abbildung 4.4 gibt den Prozentsatz der „no-reflow“-Areale an der „area at risk“ wieder.

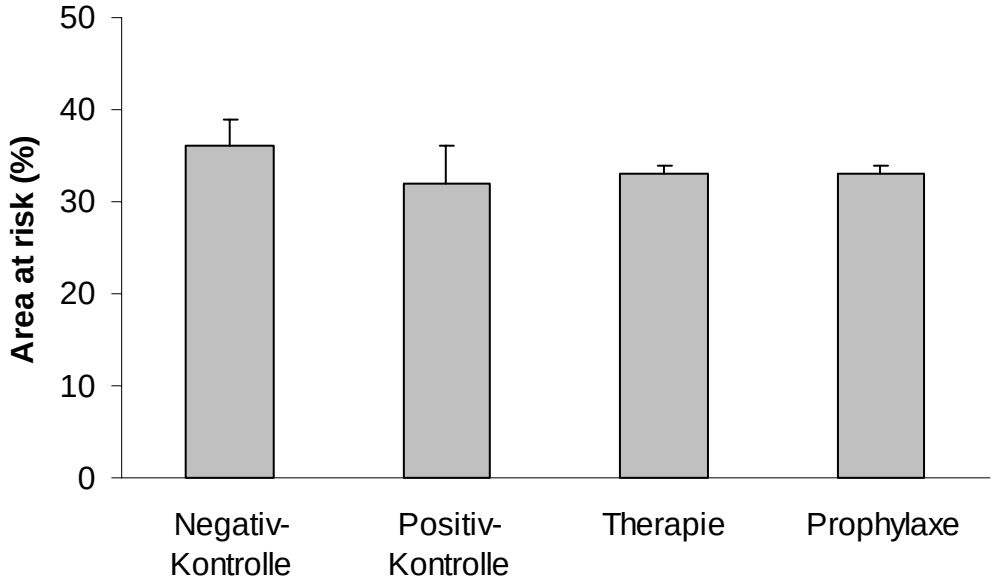


Abbildung 4.3: „Area at risk“ in Relation zur Fläche des linken Ventrikels (MW±SD)

Der hohe Prozentsatz und die große Standardabweichung in der Therapiegruppe kommt dadurch zu Stande, dass sich bei einem Tier aus dieser Gruppe 70% der „area at risk“ als „no-reflow“-Fläche darstellten. Statistische Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ergaben sich nicht.

4.1.4 Infarktareale

In allen Gruppen konnten mit der TTC-Färbung keine Infarktareale nachgewiesen werden. Dieses Ergebnis entspricht der Erfahrung und publizierten Literatur [84], die für diese Methode eine wesentlich längere Reperfusionsdauer fordert.

4.1.5 Herzrhythmusstörungen

Bei der Registrierung und Auswertung der Arrhythmien in diesem Versuchsabschnitt kam es zu technischen Schwierigkeiten. Deswegen konnten die Dauer und das Auftreten der Rhythmusstörungen nicht statistisch ausgewertet werden.

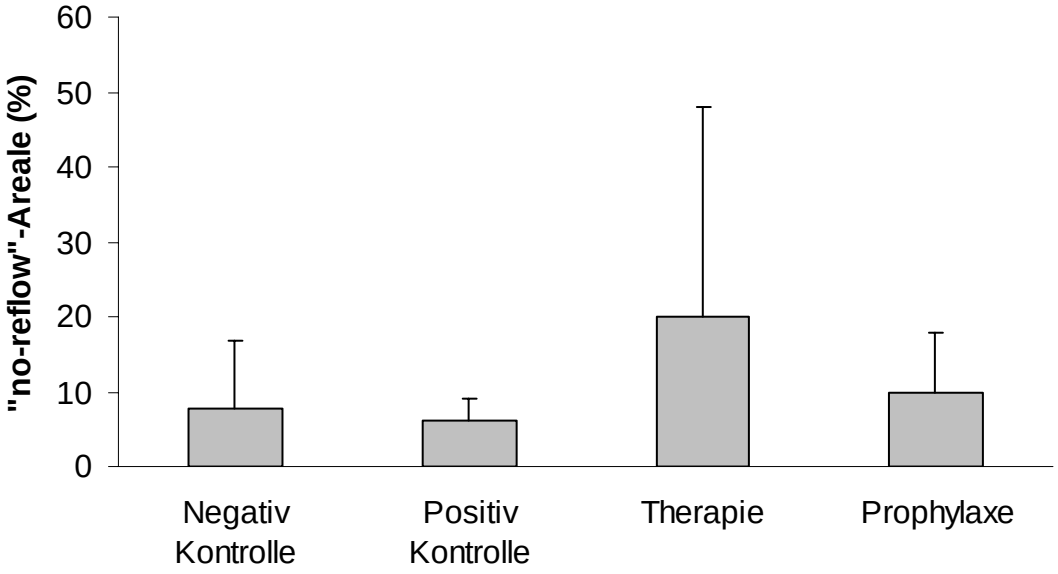


Abbildung 4.4: „No-reflow“-Areale im Verhältnis zur „area at risk“ (MW±SD)

4.2 Reperfusionszeit 240 Minuten

In die Negativ-Kontrollgruppe wurden 5 Tiere eingeschlossen; als Gruppengröße für diejenigen Gruppen, die eine Ligatur durchliefen, ergab sich eine Anzahl von 8 Tieren je Gruppe.

4.2.1 Intraoperative Messwerte

Die intraoperativen Messwerte entsprachen denen, die bereits im Versuchsabschnitt mit der 2-minütigen Reperfusionszeit bestimmt worden waren.

4.2.1.1 Gewicht der Tiere

Die Kaninchen hatten ein Körpergewicht zwischen 2,84 und 3,35 kg. Der Vergleich zwischen den Versuchsgruppen offenbarte keine statistischen Unterschiede. In Tabelle 8.22 sind die Daten dargestellt.

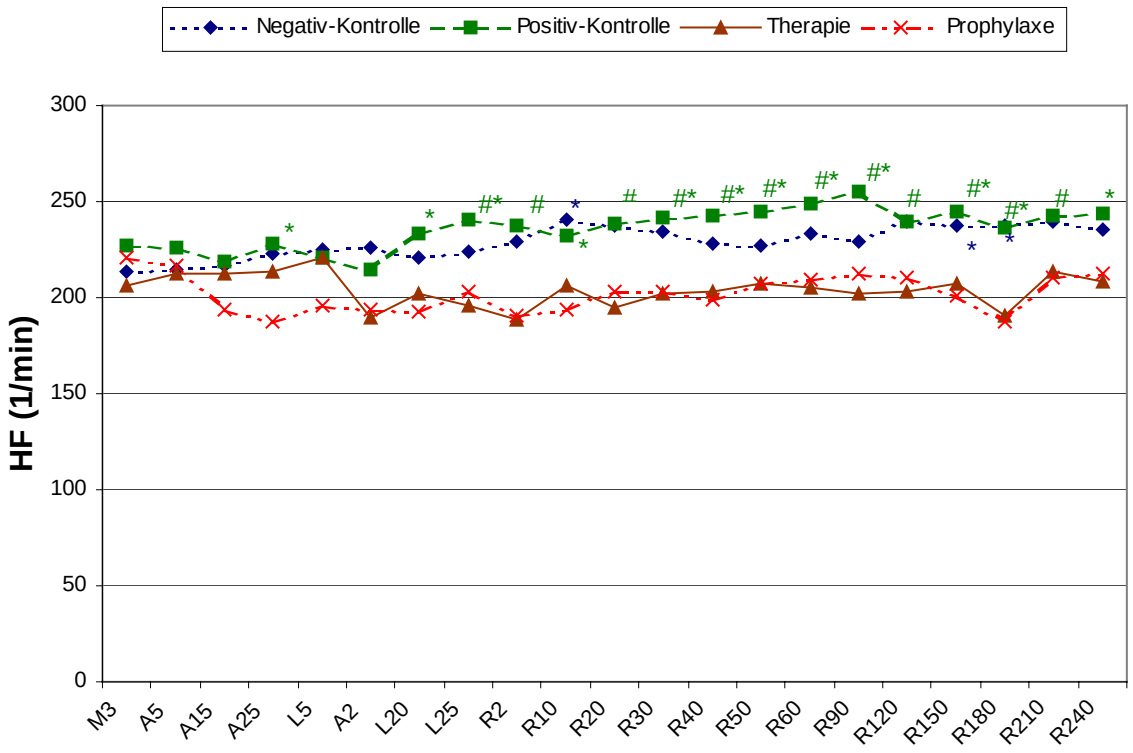


Abbildung 4.5: Zeitlicher Verlauf der Herzfrequenz. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2 (*p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)

4.2.1.2 Hämodynamische Parameter: Herzfrequenz, Blutdruck sowie rektale Körpertemperatur

Die Ausgangswerte von Herzfrequenz und arteriellem Blutdruck zeigten zwischen den Untersuchungsgruppen keinerlei Unterschiede. Wir konnten sowohl in der Therapie- als auch in der Prophylaxegruppe nach HBOC-Gabe einen signifikanten Abfall der Herzfrequenz im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe feststellen. Diese signifikanten Unterschiede blieben bis zum Ende des Versuches bestehen. Verglichen mit der Negativ-Kontrollgruppe ergaben sich für die mit HBOC behandelten Tiere nur vereinzelte, insbesondere im späteren Versuchsverlauf signifikante Unterschiede. In Abbildung 4.5 und in Tabelle 8.23 ist der Verlauf der Herzfrequenz angegeben. Auf die Darstellung jedes einzelnen Messzeitpunktes wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit verzichtet.

Nach der prophylaktischen Gabe von HBOC-200 kam es zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Drucks. Dieser Anstieg war im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe bis etwa 90 Minuten vor Versuchsende signifikant. Es gab zwar danach noch einen vergleichsweise erhöhten

Blutdruck, jedoch war diese Erhöhung nicht mehr signifikant. Im Vergleich mit der Negativ-Kontrollgruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede. Der Verlauf des mittleren arteriellen Drucks ist in der Abbildung 4.6 und der Tabelle 8.24 dargestellt.

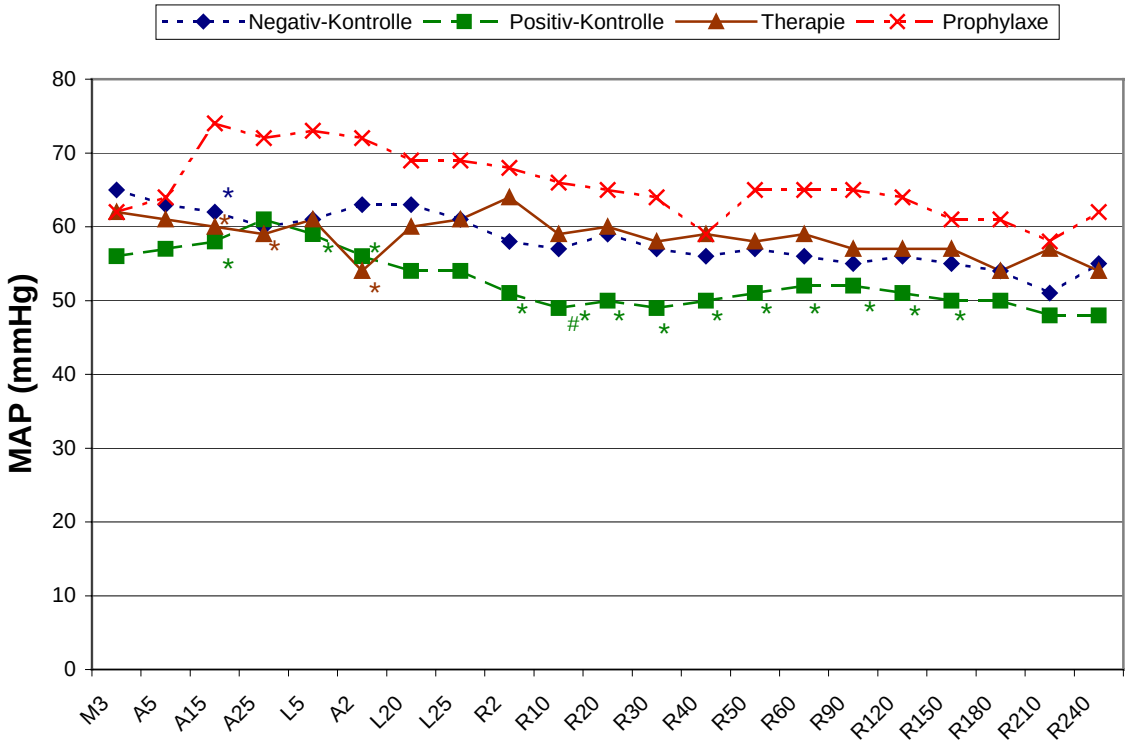


Abbildung 4.6: Zeitlicher Verlauf des mittleren arteriellen Blutdruckes. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2 (*p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)

Trotz der oben geschilderten Veränderungen bei den hämodynamischen Parametern ergab die Berechnung des Rate-Pressure-Products (RPP) nur zu einem Messzeitpunkt einen signifikanten Unterschied, nämlich an einem Messzeitpunkt zwischen der Prophylaxe- und der Negativ-Kontrollgruppe. Dieses trotz veränderter hämodynamischer Parameter stabile RPP erklärt sich aus der Tatsache, dass es nach HBOC-200-Gabe zu einem Anstieg des mittleren arteriellen Drucks und zu einem Abfall der Herzfrequenz kommt. Diese Veränderungen gleichen sich bei der Berechnung des RPP aus.

Somit kommt es während des Versuches durch die Applikation von HBOC-200 indirekt berechnet durch das RPP zu keinem signifikanten Anstieg des myokardialen Sauerstoffverbrauches (mVO_2). In Abbildung 4.7 und in Tabelle 8.25 sind die einzelnen Werte aufgeführt.

Für die rektal bestimmte Körpertemperatur ergaben sich zu keinem Zeitpunkt Differenzen

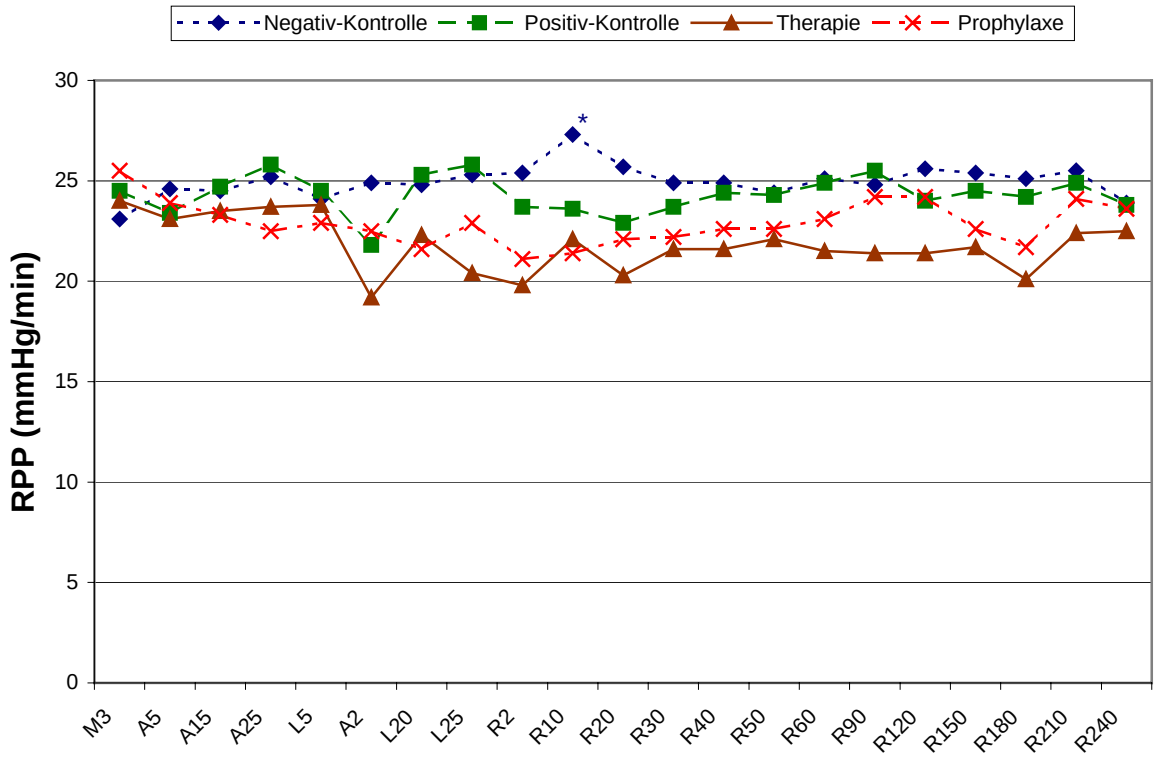


Abbildung 4.7: Zeitlicher Verlauf des Rate-Pressure-Products. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2 (*p<0,05 vs. Prophylaxe)

zwischen den Versuchsgruppen, die Werte sind in der Tabelle 8.26 angegeben.

4.2.1.3 Blutgasanalyseparameter

Für die Blutgasanalyseparameter, die zu 6 verschiedenen Zeitpunkten des Versuches bestimmt wurden, ergaben sich zwischen den Gruppen zu keinem Zeitpunkt signifikante Unterschiede. Ausgewertet wurden insbesondere die Parameter pH-Wert, $paCO_2$, paO_2, Standardbikarbonat und Standardbasenüberschuss. Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration und die Sauerstoffsättigung sind ebenso aufgeführt. Die einzelnen Parameter können den Tabellen 8.27 bis 8.32 als MW±SD entnommen werden.

Die Ausgangswerte sämtlicher Parameter unterschieden sich nicht signifikant zwischen den Gruppen und blieben auch nach HBOC-Gabe und Ischämie ohne statistisch signifikante Differenzen.

4.2.1.4 Elektrolyte und Blutzuckerkonzentration

In der Prophylaxegruppe fand sich zu Beginn des Versuches, also noch vor HBOC-Applikation, ein im Vergleich mit der Positiv-Kontrollgruppe signifikant niedrigerer Kaliumwert. Im weiteren Versuchsablauf konnten aber keine weiteren signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden.

Unterschiede zwischen den Gruppen in der Blutzuckerkonzentration zeigten sich nicht, jedoch stieg sie im Versuchsverlauf in allen Gruppen an.

Die gemessenen Werte für die Elektrolyte Natrium, Kalium und ionisiertes Calcium sind im Anhang in den Tabellen 8.33 bis 8.35 wiedergegeben. Die Blutzuckerwerte werden in der Tabelle 8.36 dargestellt.

4.2.1.5 Hämoglobinkonzentration

Es wurden die Gesamt-Hämoglobin-(tHb), die Methämoglobin- (MetHb), die Oxyhämoglobin-(HbO_2) sowie die Carboxyhämoglobinkonzentration (COHb) bestimmt. Auch die freie Hämoglobinkonzentration (fHb) wurde gemessen. Die Werte sind im Anhang in den Tabellen 8.37 bis 8.41 aufgeführt.

Für die Gesamt-Hämoglobinmesswerte zeigten sich im gesamten Versuchsverlauf keine Unterschiede. Zu Versuchsbeginn konnten auch bei den übrigen Parametern zwischen den Gruppen keine Unterschiede gefunden werden. In der Prophylaxe- und Therapiegruppe kam es durch die Infusion des bovinen Hämoglobins zu einem signifikanten Anstieg des plasmatischen Hämoglobins im Vergleich zu den nicht behandelten Gruppen.

Das Methämoglobin stieg in der Prophylaxegruppe verglichen mit der Positiv-Kontrolle nach der Applikation des HBOC signifikant an. Gegen Ende der 240-minütigen Reperfusion war dieser Unterschied jedoch nicht mehr festzustellen.

Das Carboxyhämoglobin zeigte im gesamten Versuchsverlauf keine Differenzen zwischen den Gruppen. Die Werte des Oxyhämoglobins waren bei der Ausgangsmessung in der Negativ-Kontrollgruppe signifikant höher als in der Prophylaxegruppe. Die beiden während der Reperfusion gemessenen Werte zeigten ebenfalls in der Negativ-Kontrollgruppe höhere Werte als in der Therapiegruppe.

4.2.2 „Area at risk“

Die Gebiete, die durch das am Versuchsende nach erneuter Koronarligatur applizierte Patentblau nicht angefärbt wurden, entsprechen der „area at risk“, also dem unter der Ligatur ischämischen Herzmuskelgewebe.

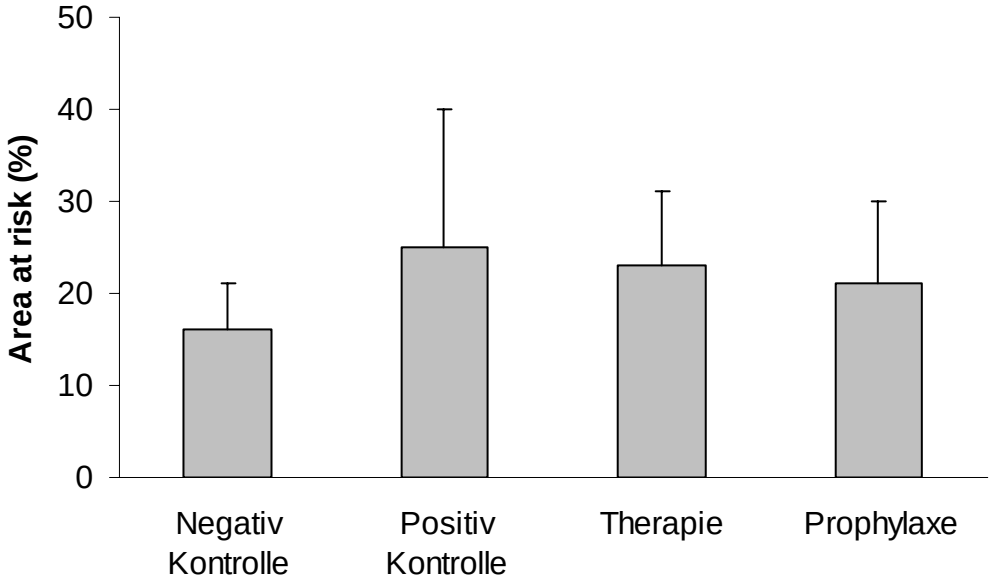


Abbildung 4.8: „Area at risk“ in Relation zur Fläche des linken Ventrikels (MW±SD)

In Abbildung 4.8 ist der jeweilige Durchschnittswert der „area at risk“ als Prozentsatz an der Fläche des linken Ventrikels angegeben. Mit einem Prozentsatz zwischen 20 und 25% waren sie in allen Gruppen nahezu gleich groß. Es fanden sich keine statistischen Unterschiede zwischen den Gruppen. Die Fläche der Negativ-Kontrollgruppe erscheint etwas kleiner. Ein signifikantes Niveau erreicht der Unterschied jedoch nicht.

4.2.3 „No-reflow“-Areale

Die mit Hilfe von Thioflavin-S 4% dargestellten „no-reflow“-Areale wurden nach dem Ausmessen in Relation zur „area at risk“ dargestellt und in Abbildung 4.9 aufgeführt. Anhand der Abbildung ist deutlich zu erkennen, dass die „no-reflow“-Areale der Tiergruppen mit der 240-minütigen Reperfusionsphase im Vergleich mit den Tieren mit nur 2-minütiger Reperfusion an Größe zugenommen hat (siehe Abbildung 4.4). Während nach nur 2-minütiger Reperfusion das „no-reflow“-Areal im Mittel einen Anteil von nur 10 - 20% an der „area at risk“ hatte,

stieg dieser Anteil nach 4-stündiger Reperfusion im Mittel auf 25 - 35%. In der Negativ-Kontrollgruppe war die Fläche des „no-reflow“-Areals nach 240-minütiger Reperfusion mit der Größe nach 2-minütiger Reperfusion vergleichbar.

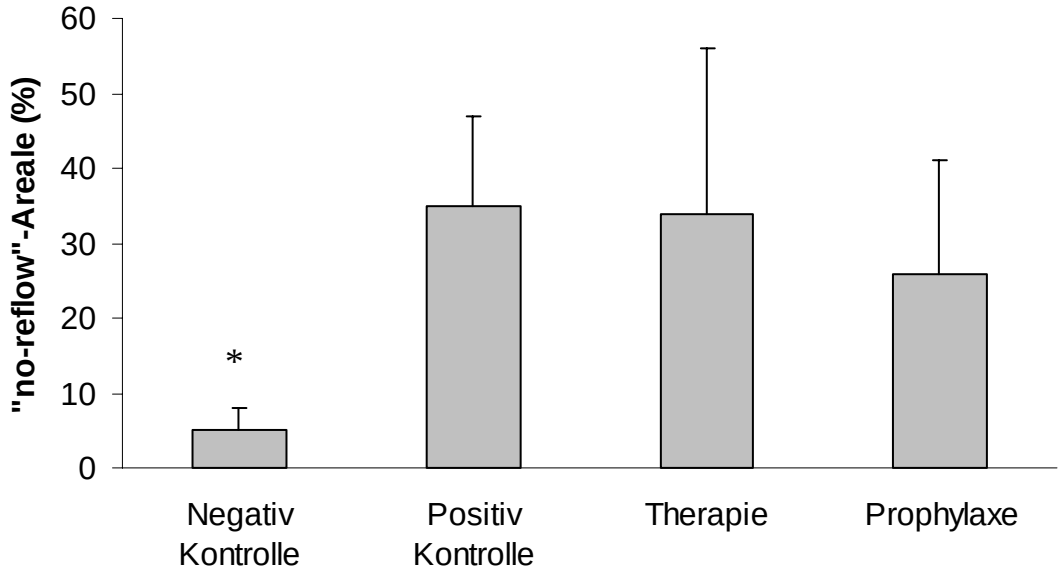


Abbildung 4.9: „No-reflow“-Areale im Verhältnis zur „area at risk“ (MW±SD, *p<0,05 vs. Positiv-Kontrolle)

Die „no-reflow“-Areale in der Negativ-Kontrollgruppe waren signifikant kleiner als in der Positiv-Kontrollgruppe, der Referenzgruppe. Zwischen den Gruppen, die eine 30-minütige Ischämie durchlaufen hatten, zeigten sich auch nach 240 Minuten Reperfusion keine signifikanten Unterschiede in Bezug auf die Ausdehnung der „no-reflow“-Areale.

4.2.4 Infarktareale

Die Infarktareale wurden mit Hilfe der TTC-Färbemethode markiert und nach dem Einscannen am Monitor in Relation zur „area at risk“ ausgemessen. Somit ist die Größe der Infarktfläche in Prozent der „area at risk“ angegeben.

Die Größe des Infarktareals, bezogen auf die „area at risk“, war in der Negativ-Kontrollgruppe mit 9±10% erwartungsgemäß signifikant kleiner als in der Positiv-Kontrollgruppe mit 48±17% (p=0,002). Die Versuchstiere, die mit HBOC-200 prophylaktisch oder therapeutisch behandelt wurden, wiesen eine signifikante Reduktion des Infarktareals im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe auf. Für die Prophylaxegruppe ergab sich ein Anteil des Infarktareals von

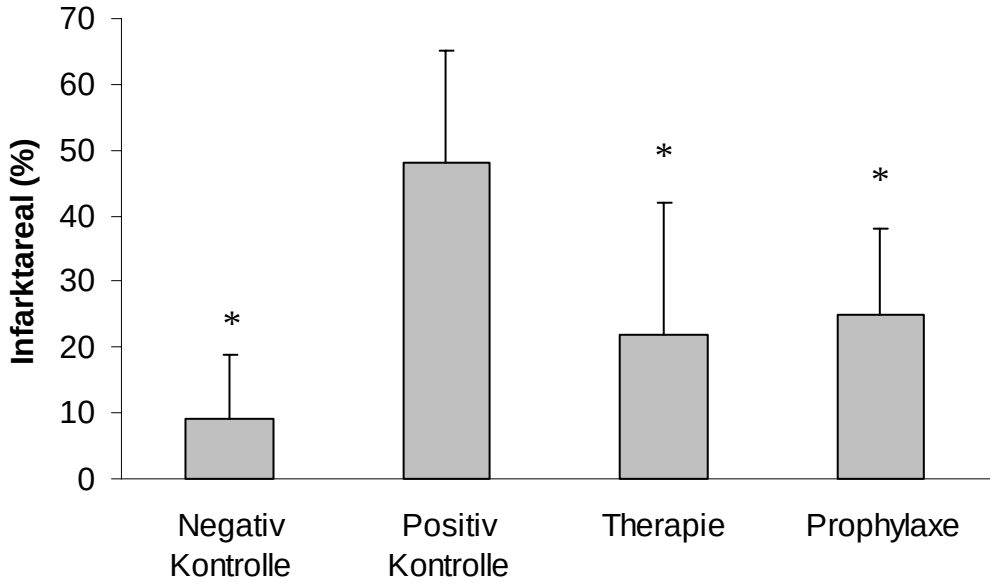


Abbildung 4.10: Größe der Infarktareale in Relation zur Größe der „area at risk“ (*p<0,05 vs. Positiv-Kontrollgruppe)

25±13% an der „area at risk“ (p=0,026 vs. Positiv-Kontrolle). Die therapeutische Applikation führte mit einer Fläche von 22±20% an der „area at risk“ (p=0,009 vs. Positiv-Kontrolle) ebenfalls zu mehr als einer Halbierung der Infarktfläche im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe. In der Abbildung 4.10 sind die jeweiligen Größen der Infarktfläche im Verhältnis zur „area at risk“ wiedergegeben.

In der Abbildung 4.11 wird die absolute Größe des Infarktareals im Verhältnis zur absoluten Größe der „area at risk“ dargestellt. Die Abbildung gibt zusätzlich die Messwerte für jedes einzelne Tier aus der 240 Minuten Reperfusions-Messreihe wieder.

Man kann aus der Abbildung deutlich den Zuwachs des Infarktareals in Abhängigkeit von der Größe der „area at risk“ entnehmen. Vor allem in der Positiv-Kontrollgruppe zeigt sich mit Zunahme der „area at risk“ deutlich eine lineare Zunahme der Infarktareale. Die Größenzunahme der Infarktfläche in der Prophylaxegruppe in Abhängigkeit von der „area at risk“ scheint demgegenüber deutlich geringer zu sein. In der Therapiegruppe beobachtet man bei einer kleinen „area at risk“ ein kleines Infarktareal und dann eine deutliche Zunahme mit wachsender „area at risk“. In der Negativ-Kontrollgruppe ist ein solcher Zusammenhang nicht zu erkennen.

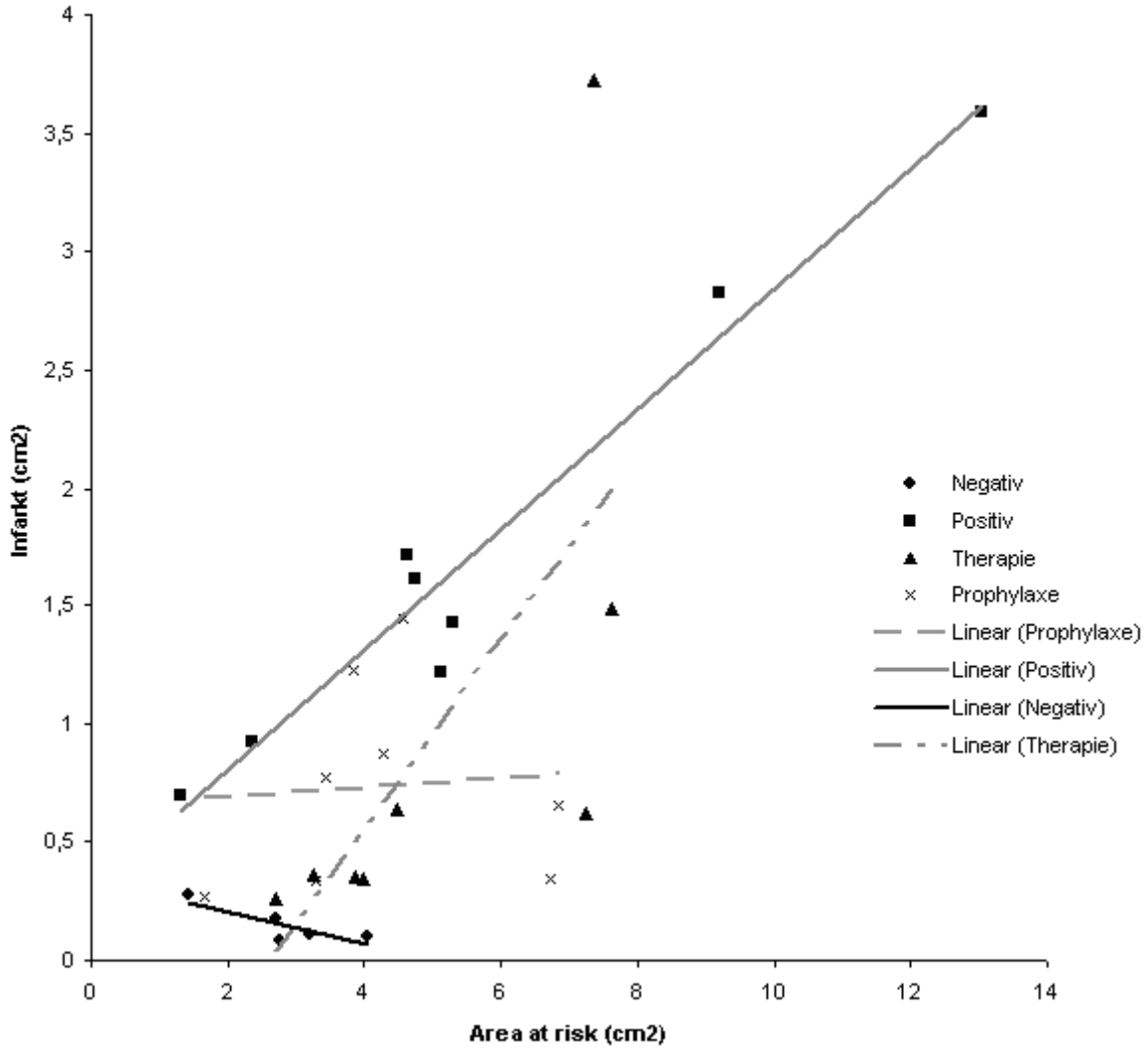


Abbildung 4.11: Absolute Größe in cm^2 der Infarktareale der einzelnen Tiere in Relation zur Größe der „area at risk“.

4.2.5 Herzrhythmusstörungen

Da Arrhythmien nur in den Gruppen auftraten, die eine Koronarligatur hatten, also nicht in der Negativ-Kontrollgruppe, wurde die Positiv-Kontrollgruppe als Referenzgruppe herangezogen und nur zwischen dieser Referenzgruppe und den mit HBOC-200 behandelten Gruppen auf statistische Signifikanz getestet. Die erzielten Scores sind in der Abbildung 4.12 und in der Tabelle 8.43 angegeben.

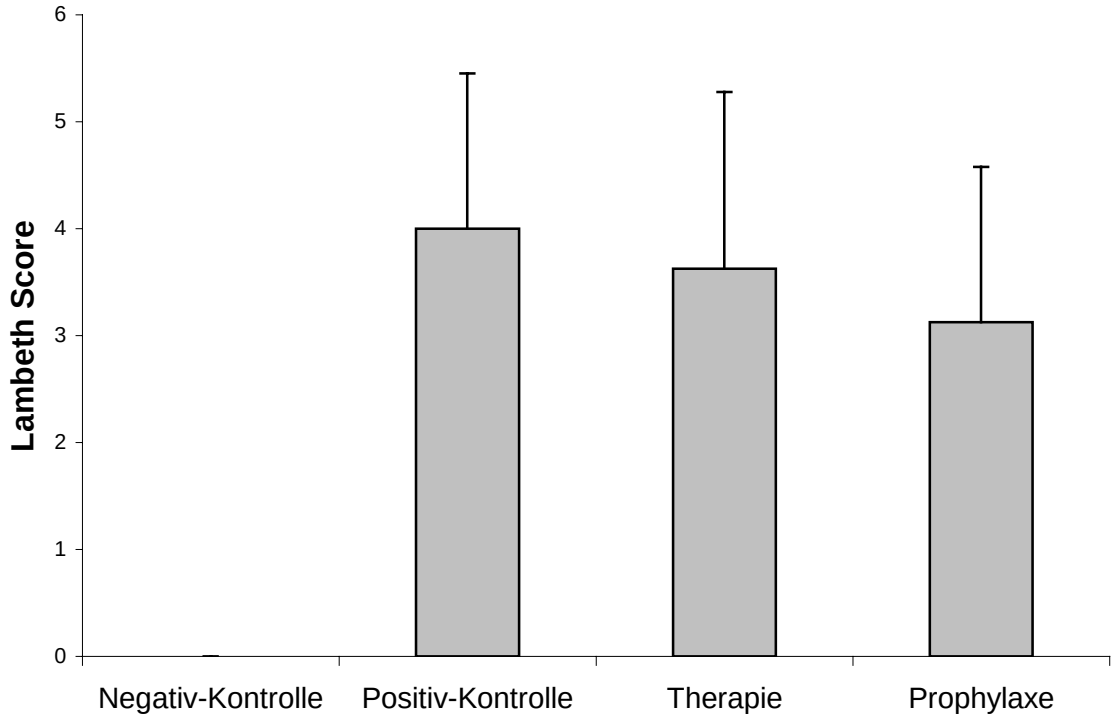


Abbildung 4.12: Erzielter Arrhythmie-Score nach Lambeth C

Die Tiere der Positiv-Kontrollgruppe erzielten mit einem Mittelwert von 4 den höchsten Score. Bei den Tieren, die das HBOC prophylaktisch erhielten, fand sich mit 3,125 der niedrigste Score, die Therapiegruppe erlangte einen mittleren Score von 3,625. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte nicht gefunden werden. Eine Bestätigung der Annahme, dass die prophylaktische HBOC-Gabe einen antiarrhythmischen Effekt hat, findet sich auch in der Auswertung der Dauer des Kammerflimmerns (siehe Abbildung 4.13 und Tabelle 8.44). Die Prophylaxegruppe zeigte mit einer mittleren Dauer von 19,25 Sekunden einen um über 50% reduzierten Wert der Positiv-Kontrollgruppe (55,4 Sekunden) gegenüber. Verglichen mit der Therapiegruppe (80,49 Sekunden) war die Dauer sogar um 75% reduziert. Mit einem p von 0,05 war die Differenz zwischen der Prophylaxe- und der Vergleichsgruppe nicht signifikant.

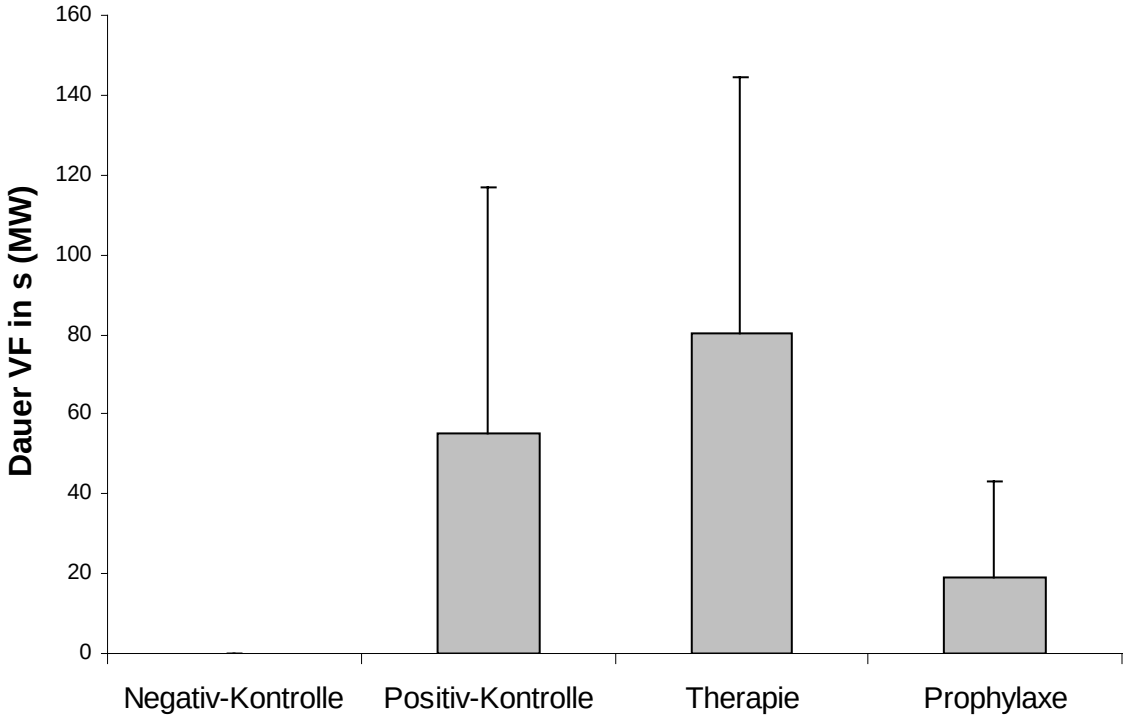


Abbildung 4.13: Dauer des Vorhofflimmerns

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass sowohl eine prä-ischämische, also prophylaktische HBOC-200-Gabe als auch eine therapeutische Applikation während der Ischämie zu einer signifikanten Reduktion des myokardialen Infarktareals im Ischämie/Reperfusionsmodell führt. Insbesondere die Verringerung der Infarktfläche durch die therapeutische HBOC-200-Gabe ist bisher noch nicht dargestellt worden. Beide Applikationszeitpunkte verkleinerten die Infarktgröße ähnlich signifikant im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe, die nur NaCl erhielt.

Das Hauptziel dieser Studie war es jedoch festzustellen, ob die Infarktverkleinerung durch HBOC mit einer Verbesserung der Mikroperfusion einhergeht.

5.1 Effekte von HBOC auf „no-reflow“-Areale

Auf der Basis von zuvor durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführten Ischämie-/Reperfusionsversuchen an Ratten, die eine Verringerung der Infarktgröße nur durch eine prophylaktische Gabe von HBOC zeigten, stellten wir die Hypothese auf, dass HBOC-200 zu einer Verbesserung der Mikroperfusionsverteilung führt. Diese Behauptung sollte durch die Messung der „no-reflow“-Areale mittels Thioflavin überprüft werden. Als Versuchsmodell diente ein Tierversuch an Kaninchen mit 30-minütiger Koronarischämie, gefolgt von einer 2-minütigen oder 240-minütigen Reperfusion.

Die Ergebnisse dieses Versuches zeigten keine signifikante Reduktion der Perfusionsausfälle. Keiner der beiden Applikationszeitpunkte reduzierte die Größe der „no-reflow“-Areale, weder nach 2-minütiger noch nach 240-minütiger Reperfusionsdauer. Die von uns gemessene Größe und die Größenzunahme bei längerer Reperfusion der „no-reflow“-Areale bewegten sich dabei im Rahmen von bisher publizierten Daten [151].

Das „no-reflow“-Phänomen bezeichnet den Umstand, dass nach vollständiger Wiederherstellung des Blutflusses nach temporärer Koronararterienligatur eine homogene Durchblutung

des vorher ischämischen Gewebes ausbleibt [150, 152] (siehe auch Kapitel 2.5.2). In der Literatur gibt es dazu die Hypothese, dass das Ausmaß der mikrovaskulären Obstruktion allein während der Ischämiephase bestimmt wird [46, 95]. Andere Untersucher vermuten, dass auch das Einsetzen der Reperfusion Mechanismen in Gang setzt, die ihrerseits zu Schäden an der Kapillarwand führen und einen regelrechten Blutfluss verhindern [6, 44]. Folgende Befunde sind für das Auftreten des „no-reflow“-Phänomens kennzeichnend [95, 96, 152]:

- herabgesetzter myokardialer Blutfluss
- ultrastrukturelle myokardiale Zellschäden
- mikrovaskuläre Zellschäden
- ausgeprägte Areale mit eingeschränkter Perfusion.

Frühere Studien zeigen, dass eine längere Ischämie und auch eine längere Reperfusion eine Zunahme der Größe der „no-reflow“-Areale bewirken [2, 96, 151]. So konnten REFFELMANN et al. zeigen, dass die Größe der „no-reflow“-Areale nach einer 8-stündigen Reperfusion dreimal größer ist als nach nur 2-minütiger Reperfusion [151]. In diesem Rahmen liegen auch die Ergebnisse unserer Studie. Diese Zunahme der Flächen mit verminderter Perfusion kann zum Zelltod von zum Zeitpunkt der beginnenden Reperfusion potentiell noch lebensfähigen Kardiomyozyten führen.

Mögliche kausale Mechanismen für die Ausbildung des „no-reflow“-Phänomens sind zum einen Endothelzellschäden, Endothelzellprotrusionen, vaskuläre Dysfunktionen und Verlegung des Kapillarbetts durch Blutbestandteile [152, 156]. Zum anderen werden die Bildung von freien Sauerstoffradikalen und die Ansammlung von Leukozyten und deren Interaktion mit der Kapillarwand („rolling and sticking“) genannt. Als weitere Ursache kommt eine mechanische Kompression der Kapillare durch die Ausbildung eines parakapillären Ödems in Betracht [57, 117, 198]. Für die Rolle des Ödems spricht die Tatsache, dass nach Gabe von Dexamethason [134] und Mannitol [213] die Größe der „no-reflow“-Areale verringert werden konnte. Alle diese Faktoren führen zu einer starken Vergrößerung der „no-reflow“-Areale im Verlauf der Reperfusion und verursachen damit letztlich eine Zunahme der Infarktgröße.

Dass Hämoglobinlösungen positive Effekte auf die mikrovaskuläre Integrität besitzen, wurde schon in verschiedenen Studien bestätigt. So untersuchten NOLTE et al. im Rahmen eines Versuches am Hamster die Auswirkung eines „Hemoglobin based oxygen carrier“ DCLHb (Diaspirin cross linked hemoglobin) auf die mikrovaskulären Schäden [137]. Mittels Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie konnte festgestellt werden, dass die DCLHb-Gabe nach Hämodilution auf einen Hämatokrit von 30% zu einer verbesserten Kontraktion eines

Hautmuskels im Vergleich zur Therapie mit Dextran führte. Auch die Leukozyten-Endothel-Interaktion zeigte sich verbessert, und die endotheliale Permeabilität erhöhte sich nicht. Im zweiten Teil des Versuches wurden die Effekte nach Ischämie und Reperfusion im Rahmen einer Wiederbelebung nach einem hämorrhagischen Schock untersucht. DCLHb zeigte im Vergleich zu Eigenblut und Dextran eine verbesserte Hämodynamik und verbesserten venulären Blutfluss, aber keine Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktion.

Die gleiche Arbeitsgruppe untersuchte ebenfalls am Hautmuskel des Hamsters die Auswirkungen einer DCLHb, Dextran oder NaCl-Infusion auf die Schäden nach einer druckinduzierten Ischämie mit nachfolgender Reperfusion [144]. Die Therapien mit DCLHb und Dextran zeigten eine signifikante Abnahme des Leukozyten „rolling and sticking“ in den postkapillären Venulen. Hierdurch zeigten sich die Kapillardichte und die Blutflussgeschwindigkeit deutlich verbessert. Nach 30 Minuten Reperfusion ergaben die Messwerte in diesen beiden Gruppen einen normalisierten Gewebssauerstoff-Partialdruck, während dieser in der mit NaCl behandelten Gruppe vermindert war. In der Analyse mittels Elektronenmikroskopie zeigten sich nach 24-stündiger Reperfusion deutlich reduzierte Gewebsschäden.

Diese vorgestellten Studien legen nahe, dass es neben einem verbesserten Gewebssauerstoff-Partialdruck einen weiteren Wirkmechanismus von Hämoglobinlösungen im Rahmen von Ischämie und Reperfusion geben könnte. Denkbar wäre eine Hemmung der Interaktion von Leukozyten und Endothelzellen, und auf dieser pathophysiologischen Annahme generierten wir unsere Hypothese. Die Ergebnisse unseres Versuches zeigten allerdings eine verkleinerte Infarktfläche in den mit HBOC behandelten Gruppen, ohne jedoch auch eine Verkleinerung der Gebiete mit aufgehobener Perfusion im Vergleich zur Kontrollgruppe zu zeigen.

Weitere durch unsere Arbeitsgruppe durchgeführte Studien mit Medikamenten-induzierter Pankreatitis sprachen für diese Hypothese. Wir konnten in einem Rattenmodell nach Induktion einer Pankreatitis durch die Applikation von HBOC-200 eine signifikante Reduktion der Nekrosen und eine Verbesserung der histologisch verifizierten Organintegrität und Funktion nachweisen [194, 195, 197]. In einem Versuchsmodell am Schwein konnten wir ebenfalls nach Medikamenten-induzierter Pankreatitis nach HBOC-200-Gabe und Hämodilution eine Verbesserung des Gewebssauerstoff-Partialdruckes feststellen [53, 196]. Die Kontrollgruppen, die Ringer-Lösung oder Hydroxyethylstärke (HES) erhielten, waren in dieser Hinsicht nicht erfolgreich. Verglichen mit der vorliegenden Studie muss man allerdings einschränkend sagen, dass es sich bei den vorgestellten Studien nicht um Ischämie und Reperfusionsmodelle handelte, sondern dass trotz induzierter Pankreatitis immer noch ein Blutfluss stattfand. Allerdings werden im Allgemeinen Mikrozirkulationsstörungen für die Entstehung einer nekrotisierenden

Pankreatitis verantwortlich gemacht. Die gemessene verbesserte Gewebsoxygenierung durch eine eventuell verbesserte Mikrozirkulation könnte also hauptverantwortlich für die erzielten Effekte sein.

Andere Studien unterstützen jedoch unsere Hypothese einer verbesserten Mikroperfusion durch künstliche Sauerstoffträger. So konnten Perfluorocarbone (PFC), die ursprünglich als künstlicher Blutersatzstoff entwickelt und in Studien am Menschen eingesetzt worden waren [108, 138, 179, 180, 181, 202], in verschiedenen Tiermodellen eine Reduktion von Ischämie- und Reperfusionsschäden am Herzmuskel zeigen [8, 49, 50, 51, 52, 98]. FORMAN et al. stellten anhand elektronenmikroskopischer Untersuchung bei Hunden nach Koronarstenose und Reperfusion eine Verbesserung der kapillären Obstruktion bei den mit Fluosol therapierten Versuchstieren fest [49]. Als Erklärungsansatz dieser Wirkung von PFC wird eine Reduktion der zytotoxischen Wirkung von neutrophilen Granulozyten an geschädigten Endothelzellen und Myokard angeführt [8, 49]. Auch eine direkte Stimulierung und Aktivierung des Komplementsystems wird angeführt [51].

Ein Nachteil der Perfluorocarbone ist die erhöhte inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FiO_2), die sie benötigen, um eine ausreichende Menge Sauerstoff physikalisch zu lösen. KOLODGIE et al. führen an, dass allein diese Tatsache schon zu einer Verkleinerung des Infarktareals führen könnte [98]. Die vermehrte Bildung freier Sauerstoffradikale könnte allerdings auch zu zusätzlichen Zellschädigungen führen. Es zeigte sich, dass die intrakoronararterielle Applikation von oxygenierter PFC-Lösung zu einer Reduktion der „no-reflow“-Areale führte, während die Gabe von desoxygeniertem PFC keinen Effekt zeigte. Diese tierexperimentellen Untersuchungen und diverse klinische Studien [5, 26, 31, 85, 203] führten dazu, dass PFC seit 1989 in den USA für die intrakoronare Applikation bei perkutaner transluminaler Angioplastie (PTCA) zugelassen ist.

Der Unterschied der oben genannten Untersuchungen mit PFC zu den an unserer Klinik durchgeführten Experimenten mit HBOC ist die rein therapeutische Applikation der Perfluorocarbone. Unsere Arbeitsgruppe konnte erstmals auch den prophylaktischen Effekt in einem Rattenmodell der kardialen Ischämie und Reperfusion zeigen. In dieser früheren Studie zeigte sich allerdings kein positiver Effekt bei der therapeutischen Applikation. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigen eine signifikante Reduktion des Infarktareals sowohl bei der therapeutischen als auch bei der prophylaktischen Applikation von HBOC-200. Die Perfusionsverteilung zeigte sich jedoch nicht verbessert. Demnach müssen wir davon ausgehen, dass weniger der Verbesserung der Perfusion als vielmehr der Verfügbarkeit von Sauerstoff im Gewebe eine besondere Rolle bei der Verkleinerung der Infarktareale durch HBOC zukommt.

Somit scheint die Erhöhung der Gewebsoxygenierung postkapillär im Herzmuskel eine wichtigere Bedeutung zu haben.

Eine Studie von SAETZLER et al. unterstützt diese Hypothese [167]. Sie konnten in einem Modell mit durch Zigarettenrauch induziertem Leukozyten-„Rolling and Sticking“ und Adhäsion an Endothelien nach Gabe eines polynitroxylierten HBOC eine statistisch signifikante Reduktion des „Rolling and Sticking“ und der Leukozyten und Thrombozyten-Aggregation feststellen. Die Mikroperfusion verbesserte sich allerdings trotz der verminderten Leukozytenadhäsion nicht. Die Gabe eines nicht polynitroxylierten HBOC konnte keine Verbesserung der Leukozyten-„Rolling and Sticking“ erzielen.

Den positiven Effekt, den HBOC auf die Leukozyteninfiltration besitzt, konnten CASWELL et al. in einem Ischämie-Reperfusionsmodell am Hund ebenfalls nachweisen [24]. In der Untersuchungsgruppe mit prophylaktischer HBOC-Gabe zeigte sich eine signifikante Reduktion der Infarktfläche und eine verminderte Leukozyteninfiltration. Eine Verbesserung der Mikroperfusion als Ausdruck für eine, durch die geringere Leukozytenaktivierung auch schwächere Ausprägung des „no-reflow“-Phänomens konnten sie jedoch nicht nachweisen. Das entspricht auch den Ergebnissen der vorliegenden Studie.

Zur Klärung einer möglichen Verbesserung der Gewebsoxygenierung durch HBOC hat unsere Arbeitsgruppe diverse Studien am Hund mit HBOC durchgeführt und eine deutliche Verbesserung des Gewebssauerstoffdruckes (tpO_2) durch HBOC festgestellt [77, 78, 79, 186, 188]. So kam es etwa nach nahezu komplettem Blutaustausch mit HBOC-201 zu deutlich höheren tpO_2-Werten als in den Versuchsgruppen, die nur HES erhielten, und sogar zu höheren Werten als in der Ausgangssituation [188]. Im Vergleich zu Warmblut und 3 Wochen alten Erythrozytenkonzentraten (EK) errechnete sich für HBOC-201 eine Oxygenierungspotenz von 3:1, und es zeigte sich, dass extrem niedrige tpO_2-Werte durch HBOC-201 schneller und effektiver beseitigt wurden als mit EK [191].

In einem weiteren Tiermodell am Hund mit isovolämer Anämie und akuter 95%-iger Stenose der Arteria poplitea erzielte die mit HBOC-201 behandelte Versuchsgruppe sowohl bei therapeutischer als auch bei prophylaktischer Applikation signifikant höhere tpO_2-Werte im nachgeschalteten Muskel als die Kontrollgruppe, die Hydroxyethylstärke erhielt [77]. In einem Koronarstenosemodell, ebenfalls am Hund, konnte die Aufrechterhaltung der poststenotischen myokardialen Sauerstoffspannung und Kontraktilität erzielt werden [10, 17, 80]. Die histologischen Zellschäden nach prophylaktischer HBOC-Gabe und 90%iger-Stenose der linken Koronararterie in Kombination mit einer isovolämen Anämie mit einem Hb von 7±1 g/dl waren

im Vergleich mit der Kontrollgruppe deutlich reduziert. Auch nach therapeutischer Applikation der Hämoglobinlösung zeigte sich eine erfolgreiche Wiederherstellung der myokardialen tpO_2-Werte und der Kontraktilität der linken Kammer fast auf Ausgangsniveau.

Der vorliegende Versuch zeigt eine signifikante Reduktion der Infarktflächen nach 30-minütiger Ischämie und 240-minütiger Reperfusion durch die therapeutische und prophylaktische Applikation von HBOC-200. Unsere Hypothese, dass dieser Effekt auf einer Verbesserung der Mikroperfusionsverteilung basiert, konnten wir durch Messung der Flächen mit aufgehobener Perfusion („no-reflow"-Areale) mittels Thioflavin nicht bestätigen. Das im Vergleich zum Blut höhere Oxygenierungspotential der Hämoglobinlösung scheint also in der Reduktion der Infarktflächen eine wichtige Rolle zu spielen und bedarf der weiteren Untersuchung.

5.2 Effekte von HBOC-200 auf das Infarktareal

In der vorliegenden Untersuchung konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass die Applikation von 0,4 g/kg HBOC-200 vor und nach Anlage einer Ligatur des ersten Astes der A. circumflexa beim Kaninchen zu einer signifikanten Reduktion des Infarktareals im Nachweis mittels Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe führen kann. In einem früheren von uns durchgeführten Versuch an der Ratte konnte dieser Effekt nur für die prophylaktische Applikation nachgewiesen werden. Eine mögliche Ursache für diese Differenz könnte die Wahl eines anderen Versuchstieres sein, auch die Verdoppelung der Reperfusionszeit auf 240 Minuten könnte eine Rolle spielen, da REFFELMANN et al. in einer Studie nachgewiesen haben, dass die Größe des Infarktareals in Abhängigkeit von der Reperfusionsdauer zunimmt [151]. Allerdings zeigte diese Studie nur einen signifikanten Effekt innerhalb der ersten 60 Minuten, während die weitere Zunahme des Infarktareals bis 240 Minuten nicht signifikant war.

Der Hauptzielparameter unserer Studie war jedoch die Ausdehnung des „no-reflow"-Areals. Da verschiedene Studien eine Zunahme der „no-reflow"-Areale bis zu einer Reperfusionszeit von 210 Minuten nachweisen konnten [2, 151], wählten wir eine Reperfusionszeit von 240 Minuten. Ob diese Verlängerung einen Einfluss auf die Reduktion der Infarktflächen um ca. 50% im Vergleich zur Kontrollgruppe hat, ist spekulativ. Ebenso spekulativ bleibt, ob die Verlängerung der Reperfusionszeit dazu führte, dass auch die therapeutische Applikation von HBOC zu einer Reduktion der Infarktflächen führte. Um diese Fragen zu klären, müsste bei derselben Tierspezies die Größe des Infarktareals mit verschiedenen Reperfusionszeiten im Verlauf bestimmt werden.

Offen ist die Frage, wie es zu der von uns beobachteten Reduktion der Infarktflächen kommt. Es scheint nicht die Mikroperfusionsverteilung zu sein, da wir in der „area at risk“ keinen Unterschied zwischen den Untersuchungsgruppen feststellen konnten. Eine denkbare Ursache mag die Tatsache sein, dass mit der Gabe von HBOC freie Hämoglobinmoleküle im Plasma vorhanden sind, die zum Sauerstofftransport keine Erythrozyten benötigen. Da es im Rahmen von Ischämie und Reperfusion zu den bereits beschriebenen Schäden des Gefäßendothels der Kapillare im Koronarbett unter anderem in Form von Schwellung mit Einengung des Kapillarlumens kommt, können die Erythrozyten, die einen mittleren Durchmesser von 7,5 μm haben, ab einer Einengung der Gefäße unter diesen Wert diese nicht mehr passieren. Freie Hämoglobintetramere haben einen Durchmesser von weniger als 10 nm. Somit sind sie in der Lage, selbst maximal eingeengte Gefäße zu passieren, solange noch ein Lumen vorhanden ist. In der Abbildung 5.1 sind zur Veranschaulichung der Größenverhältnisse zwei Erythrozyten umgeben von plasmatisch gelösten Hämoglobinmolekülen im Querschnitt eines Nierengefäßes dargestellt.

Auch die in der Peripherie durch einen ausgeprägten Bohr-Effekt erleichterte Sauerstoffabgabe, und damit letztendlich eine verbesserte Gewebeoxygenierung, könnte eine Rolle spielen. Die Sauerstoffbindungskurve verschiebt sich in der Peripherie nach rechts und führt zu einem erhöhten P_{50} von 36 mmHg im Gegensatz zu an Erythrozyten gebundenes Hämoglobin mit einem P_{50} von 26 mmHg [182]. Wie schon weiter oben erwähnt, führt HBOC im Gegensatz zu PFC auch unter Raumluft zu einer nachweisbar besseren Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe [68, 191]. Im Vergleich zu Warmblut und drei Wochen alten autologen Erythrozytenkonzentraten errechnete sich anhand der gemessenen tpO_2-Werte eine Oxygenierungspotenz für HBOC-200 von 3:1 [186, 191]. Insbesondere vermag HBOC extrem niedrige tpO_2-Werte, wie sie ja auch im Herzmuskel nach Ischämie vorliegen, schneller und effektiver zu beseitigen als Erythrozytenkonzentrate [191].

Diese durch HBOC-200 verbesserten Oxygenierungsbedingungen könnten den entscheidenden Mechanismus der Reduktion der Infarktareale in unserem Modell darstellen.

5.3 Effekte von HBOC-200 auf ventrikuläre Arrhythmien

Das Auftreten kardialer Arrhythmien ist eine typische und häufige Komplikation myokardialer Perfusionsstörungen. Dem arrhythmogenen plötzlichen Herztod liegt in ca. 80% der Fälle ein Myokardinfarkt oder eine transiente Ischämie zugrunde [59]. Dabei ist in einer Mehrzahl der Fälle das Kammerflimmern die tödliche Rhythmusstörung [174]. Eine Reduktion der

Schwere zellulärer Ischämie- und Reperfusionsschäden könnte mit einer Verringerung der Inzidenz schwerer Rhythmusstörungen einhergehen [82]. Unter der Annahme, dass ein durch prophylaktische oder therapeutische HBOC-Gabe verkleinertes Infarktareal mit einer Abnahme ventrikulärer Rhythmusstörungen einhergeht, untersuchten wir die Inzidenz und Schwere der auftretenden Arrhythmien.

Bei der Registrierung und Auswertung der Rhythmusstörungen im Versuchsteil mit der kurzen Reperfusion kam es zu technischen Schwierigkeiten, die eine aussagekräftige statistische Analyse verhinderten. Deswegen soll hier nur auf die Ergebnisse aus dem Versuchsarm mit der 4-stündigen Reperfusion eingegangen werden.

Die Ergebnisse unseres Versuches zeigen keine signifikante Verbesserung der Schwere ven-

Abbildung 5.1: Querschnitt durch eine Kapillare aus der Niere. Dargestellt sind 2 Erythrozyten, die von plasmatisch gelösten Hämoglobinmolekülen umgeben sind [187]

trikulärer Arrhythmien während 30 Minuten Ischämie durch HBOC-200. Der Score für die Prophylaxe ist allerdings um fast einen Punkt niedriger als der Wert für die Positiv-Kontrolle. Man kann vermuten, dass eine größere Gruppenstärke zu einem statistisch signifikanten Effekt geführt hätte. Zusätzlich zum Score wurde die Dauer der Rhythmusstörungen ausgewertet. Hier zeigte sich die Dauer des Kammerflimmerns in der Prophylaxegruppe gegenüber der Positiv-Kontrolle um mehr als 50% und gegenüber der Therapiegruppe um mehr als 75% reduziert. Die Dauer des Kammerflatterns war in diesen 3 Gruppen nahezu identisch. Man könnte also vermuten, dass prophylaktisch appliziertes HBOC einen antiarrhythmogenen Effekt besitzt, der über den von uns benutzten Score nicht nachzuweisen ist. So heißt es auch bei CURTIS/WALKER [33]:

„...eine Therapie ... ,die nicht die Inzidenz von Kammerflimmern reduziert, wird keinen der hier vorgestellten Scores erniedrigen."

Die Befürchtung, dass ein höheres Angebot an Sauerstoff im ischämischen Myokard durch die Hämoglobinlösung HBOC zu einer Verschlimmerung der ventrikulären Arrhythmien führt, können unsere Daten nicht belegen. Denn es war zu befürchten, dass ein erhöhter Gewebssauerstoffpartialdruck (tpO_2) über einen vermehrten Anfall an freien Sauerstoffradikalen arrhythmische Ereignisse fördert. In dieser Hinsicht scheint die Applikation von HBOC im Rahmen von Ischämie und Reperfusion am Herzen keine negativen Effekte zu haben. Möglicherweise ist aber auch diese Tatsache des in mehreren Studien nachgewiesenen Effektes der Erhöhung des tpO_2 durch HBOC (siehe Kapitel 2.4 [65, 80, 186, 188, 191]) der Wirkmechanismus, mit dem das Auftreten schwerer Arrhythmien verringert wurde, auch wenn diese Abnahme nicht signifikant war. Wie oben schon erwähnt, zeigte die Auswertung der VF Dauer einen positiven Effekt durch eine prophylaktische HBOC Applikation.

Die verbesserte Gewebsoxygenierung könnte sich durch eine größere Ischämietoleranz des Myokards positiv auswirken und dadurch eine Verkleinerung des Infarktes und Reduzierung der Schwere ventrikulärer Arrhythmien erzielen. Möglicherweise wurde dieser Effekt ergänzt durch eine erhöhte Sauerstoffextraktion aus dem Lumen des linken Ventrikels in das subendokardiale Herzgewebe, denn in diesem Bereich tritt bei Koronarverschlüssen typischerweise zuerst eine Hypoxie auf [81]. Wie in Kapitel 2.6 beschrieben, spielt dieser Bereich auch für die Genese der Phase-1A Arrhythmien und für deren Aufrechterhaltung eine entscheidende Rolle [21, 87]. In einer Studie mit dem künstlichen Sauerstoffträger PFC konnte gezeigt werden, dass eine Verkleinerung der epi- und endokardialen Ischämiezone mit einer Verminderung der Inzidenz von arrhythmischen Ereignissen korreliert [97].

Hinsichtlich des antiarrhythmogenen Effektes von Hämoglobinlösungen gibt es bisher wenig

Untersuchungen. WALTER et al. untersuchten den Effekt niedermolekularer und polymerisierter Hämoglobinlösungen auf isolierte Kardiomyozyten neonataler Ratten [208]. Dabei zeigte sich ein negativ chronotroper Effekt. Bei der polymerisierten Lösung war dieser Effekt um 50% reduziert. In einer Studie mit HBOC-200 an Rattenherzen, bei der die prophylaktische und die therapeutische Gabe vor 25-minütiger Ischämie untersucht wurde, zeigte sich eine signifikante Verringerung der Schwere kardialer Arrhythmien im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe [19]. Als Begründung wurde eine verminderte Aktivierung von Leukozyten und des Komplementsystems vermutet. Aber auch die verbesserte Oxygenierung soll einen positiven Effekt gehabt haben.

5.4 Hämodynamische Wirkungen und Nebenwirkungen von HBOC

Zu den kardiozirkulatorischen Wirkungen und Nebenwirkungen von HBOC gibt es zahlreiche Studien. Hierbei kam HBOC auch am Menschen schon mit deutlich höheren Dosierungen als in unserer Studie zum Einsatz, ohne dass es zu schwerwiegenden Nebenwirkungen kam [63, 110, 183, 184]. Aus diesem Grund war diese Studie nicht auf Erfassung dieser Effekte ausgelegt. Dennoch soll auf die beobachteten Effekte eingegangen werden.

5.4.1 Hämodynamik

Nach der Gabe von HBOC kam es zu Änderungen der hämodynamischen Parameter. Die Herzfrequenz nahm ab (siehe Abbildung 4.5), der mittlere arterielle Druck stieg (siehe Abbildung 4.6), während das Rate-Pressure-Product (RPP, siehe Abbildung 4.7) konstant blieb. Als Grund für den schon in früheren Studien beobachteten Anstieg des Blutdrucks wird unter anderem die Bindung des Hämoglobins an den endothelial gebildeten Vasodilatator NO (endothelium derived relaxing factor, EDRF) beschrieben, dessen vasodilatatorische Aktivität auf diese Weise blockiert wird (NO-Scavenging) [122]. Für einen zusätzlichen Mechanismus über eine gesteigerte Endothelin-1 Freisetzung durch Hämoglobin spricht eine Studie an Patienten mit cerebralem Insult, bei denen es nach Gabe von DCLHb (Diaspirin Cross-linked Hemoglobin) zu einem dosisabhängigen Anstieg der Endothelin-Konzentration kam [169].

Gegen die Inaktivierung von NO als alleinigem kausalen Faktor spricht außerdem, dass im Rattenmodell von ROHLFS et al. der Blutdruckanstieg nicht von einem Abfall der NO-Konzentration begleitet war [162]. Darüber hinaus kommen auch intrazelluläre Wirkungen

von HBOC in Frage. Nach Aufnahme von HBOC durch Endo- oder Transzytose in die Endothelzellen könnte es bereits dort zu einer Reaktion mit vasoaktiven Substanzen kommen [42].

Ein weiterer Risikofaktor für eine Vasokonstriktion sind Verunreinigungen der HBOC-Lösungen mit Phospholipiden [123]. Durch die in Tabelle 2.1 angegebenen Reinigungsschritte moderner Lösungen treten diese Nebenwirkungen jedoch seltener auf [1, 16, 111, 124]. Außerdem scheint die Zunahme der Molekülgröße wesentlich zur Reduktion der vasokonstriktiven Effekte beizutragen [14, 15].

Außer der Dosis und der Art der Substanz hat auch die untersuchte Spezies einen Einfluss auf die Änderung der Hämodynamik. In tierexperimentellen Untersuchungen stieg der MAP um 30 - 80% [22, 73, 74], während im Rahmen einer präoperativen Hämodilution bei Patienten vor Leberresektion lediglich ein Anstieg um 18% nachgewiesen wurde [189]. Der erhöhte mittlere arterielle Druck beruht auf einer Zunahme des peripheren Gefäßwiderstands und bewirkt eine Abnahme des Herzzeitvolumens (HZV) [73, 90, 91, 189], während das systemische Sauerstoffangebot (DO_2) in den angeführten Untersuchungen konstant blieb oder geringer als in der Kontrollgruppe war. In einem Hamstermodell konnte gezeigt werden, dass im Gegensatz zu den systemischen Effekten an den arteriellen Widerstandsgefäßen der Anstieg des MAP nach HBOC-Applikation keine Abnahme des regionalen oder mikrovaskulären Blutflusses in der Leber oder in der Muskulatur bewirkt [137, 176].

Der pulmonalarterielle Druck (PAP) steigt ebenfalls in Folge einer HBOC-Applikation an [73]. In einem Experiment an anästhesierten Affen führte eine Applikation von 43 ml/kg Polyhämoglobin zu einem Anstieg des PAP um 40% [109]. In einer Studie an Schafen mit fast vollständiger Austauschtransfusion mit einer freien Hb-Konzentration von 8 g/dl und einem Hämatokrit von 3% zeigte sich ein Anstieg des PAP um 200% [107].

Durch Berechnung des Rate-Pressure-Products (RPP) nach WILKINSON [214] als Maßzahl für den myokardialen Sauerstoffverbrauch (mVO_2) wollten wir feststellen, ob die durch HBOC veränderten kardiozirkulatorischen Parameter mit einem erhöhten Sauerstoffverbrauch bei gleichzeitig durch den Reperfusionsschaden erniedrigtem Angebot einhergehen. Es ergaben sich im gesamten Versuchsablauf mit der langen Reperfusionszeit keine signifikanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Diese Tatsache erklärt sich aus dem kalkulatorischen Zusammenhang von Herzfrequenz und Mitteldruck bei der Berechnung des RPP. In unserer Studie veränderten sich diese beiden Werte nach HBOC-Applikation gegenläufig, demnach blieb das Produkt beider Werte annähernd stabil.

Für eine exakte Bestimmung des myokardialen Sauerstoffverbrauchs wäre es nötig, die arterio-venöse Sauerstoffdifferenz (avDO_2) zwischen der Aorta und dem Sinus coronarius zu messen. Hierzu müssten allerdings Katheter in die jeweiligen Gefäße eingeführt und Blutproben entnommen werden. Aufgrund der kleinen Gefäßstrukturen bei den Kaninchen haben wir in dem vorliegenden Versuch darauf verzichtet und stattdessen den indirekten Parameter RPP verwendet.

5.4.2 Kardiale Effekte

Ein Absinken des Herzzeitvolumens unter HBOC-Medikation wurde relativ einheitlich sowohl in tierexperimentellen Studien [73, 101, 135] als auch bei Untersuchungen an Menschen [90, 91, 189] gefunden. Als Ursache ist wahrscheinlich der schon oben diskutierte Anstieg des arteriellen Mitteldrucks anzusehen.

Zu den direkten Wirkungen des HBOC am Herzen gibt es in der Literatur bisher nur wenige Studien. Der beschriebenen negativen Chronotropie [208] wurde durch die Polymerisation entgegengewirkt. Die Kontraktilität zeigte sich bei direkter Perfusion mit unmodifiziertem HBOC unbeeinträchtigt [92]. In einer Studie am Tiermodell konnten MOTTERLINI et al. [129] eine Potenzierung der vasokonstriktiven Effekte von Acetylcholin auf die Koronararterien feststellen. Dadurch könnte es zu einer direkten Auswirkung auf das Herz kommen, dessen Relevanz jedoch noch nicht geklärt ist. Es existiert nämlich auch eine „in vivo“-Studie am Hund mit einer „stroma-freien“ Hämoglobin-Lösung, bei der nach Hämodilution keinerlei spastische Effekte an den Koronarien festgestellt werden konnten [76].

Positive Effekte durch HBOC zeigten sich in einer Studie, die CARLUCCI et al. am isolierten Rattenherzen durchführten [20]. Sie konnten nachweisen, dass es nach Anreicherung einer kardioplegen Lösung mit HBOC zu einer deutlichen Verbesserung des Energiehaushalts kommt, gemessen anhand des Gehalts von ATP. Die Autoren zogen die Schlussfolgerung, dass HBOC auch im Rahmen der hypothermen Kardioplegie Sauerstoff liefert, den Energiehaushalt verbessert und anabole Reaktionen verbessert, ohne jedoch den oxydativen Stress zu vermindern [121]. Zum jetzigen Zeitpunkt werden die direkten und indirekten Effekte von HBOC auf die myokardiale Kontraktilität uneinheitlich beurteilt, und bevor ein abschließendes Urteil gefällt werden kann, bedarf es weiterer Studien.

5.4.3 Methämoglobin

Durch Oxidation des 2-wertigen Eisenatoms im Häm-Molekül des Hämoglobins kommt es zur Bildung von Methämoglobin (Met-Hb), das seiner Sauerstofftransportfunktion dann nicht mehr nachkommen kann. Der menschliche Körper besitzt zur Revidierung dieses natürlichen Prozesses Reduktionsenzyme in den Erythrozyten (Met-Hb-Reduktase). Diese Enzyme fehlen Hämoglobinlösungen. Somit besteht die Gefahr, dass es durch Infusion von Hämoglobinlösungen zu Methämoglobinämie kommt. Untersuchungen zeigten, dass es bis zu einer Met-Hb Konzentration von 10% nicht zu einer Beeinträchtigung der Gewebsoxygenierung kommt [112].

Um negative Effekte im vorliegenden Versuch ganz auszuschließen, wurde die Met-Hb Konzentration in der HBOC-200 Lösung vor Applikation gemessen und die Grenze bei 5% festgesetzt. Es kam sowohl in dem Versuchsarm mit der 2-minütigen Reperfusion (siehe Tabelle 8.20) als auch in dem Versuchsteil mit der langen Reperfusion (siehe Tabelle 8.41) in den mit HBOC behandelten Gruppen nur zu einem Anstieg auf etwa 1%. Diese Resultate bestätigen das Ergebnis bisheriger Studien, die in tierexperimentellen Studien [189] und auch in Untersuchungen am Menschen [190] keine klinisch relevanten Konzentrationszunahmen feststellen konnten. Im Prinzip ist es möglich, durch Enkapsulierung des HBOC oder Zugabe von Redox-Enzymen die Oxidation des Häms zusätzlich zu vermindern [34, 217]. Auf diese Weise würde ein noch höherer Anteil des Hämoglobins anhaltend für den Sauerstofftransport zur Verfügung stehen.

5.4.4 Fazit

Die Unbedenklichkeit von niedrig dosiertem HBOC konnte schon in mehreren Studien an Tieren und Menschen gezeigt werden. Auch in dem vorliegenden tierexperimentellen Versuch konnten keine relevanten Nebenwirkungen von HBOC-200 festgestellt werden.

5.5 Methodenkritik

5.5.1 Tierspezies

Bei jedem Tiermodell ist eine Übertragung auf den Menschen nur eingeschränkt möglich. Das gilt auch für die vorliegende Untersuchung, die an Kaninchen durchgeführt wurde. Das

Studiendesign stellt allerdings eine vielfach publizierte und anerkannte Möglichkeit dar, Erkenntnisse über pathophysiologische Vorgänge, die im Rahmen von Ischämie und Reperfusion ablaufen, zu gewinnen.

Für das von uns benutzte Modell der regionalen Myokardischämie durch Ligatur eines Astes der linken Koronararterie oder der Ligatur des linken Koronargefäßes selbst stellen experimentelle Tierversuche insbesondere an Kaninchen [32, 44, 100, 150, 192, 216], Hunden [2, 67, 95, 164, 203] und Ratten [88, 139, 173, 201, 204] ein übliches Design dar. Seltener werden Schweine [65, 131, 132], Schafe oder Primaten [146] verwendet. Der Vorteil der Versuchsmodelle an Kaninchen und Ratten gegenüber Hunden besteht im einheitlichen Versorgungstyp des linken Ventrikels und der fehlenden Kollateralisierung. Diese Tatsache vereinfacht die Auswertung und Interpretation des Studienergebnisses. Ebenso wird dadurch ein möglichst einheitliches Ischämieareal gewährleistet, das man in unseren Ergebnissen in Form einer nahezu identischen Größe der „area at risk“ in allen Studiengruppen wiederfinden kann.

Im Gegensatz zu Kaninchen haben Menschen und insbesondere Patienten mit chronischer Koronargefäßerkrankung eine ausgeprägte Kollateralisierung, die die Folgen eines Koronararterienverschlusses oft deutlich reduzieren kann [81]. Leidet ein Patient an rezidivierenden Angina pectoris Anfällen, können diese zeitlich begrenzten Ischämien im Sinne eines kardialen „Preconditioning“ die Folgen eines totalen Verschlusses eines Herzkranzgefäßes erheblich mindern. Bei den in der Versuchsreihe eingesetzten Tieren handelte es sich durchweg um junge und gesunde Kaninchen mit unverändertem Koronararterienstatus. Diese Faktoren müssen in die Interpretation im Hinblick auf die Zielgruppe einbezogen werden. Trotz dieser Einschränkungen sind Kaninchen neben Ratten die in Studien am häufigsten verwendete Tierspezies zur Untersuchung von myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschäden.

5.5.2 Ischämiedauer und Reperfusionszeit

Für kardiale Ischämie- und Reperfusionsmodelle am Kleintier liegt die in der Literatur angegebene Ischämiedauer zwischen 20 und 90 Minuten [106, 158, 170, 173]. Somit liegt die von uns verwendete Zeit von 30 Minuten eher im unteren Bereich, ist aber eine durchaus übliche Dauer [66, 68, 69, 153]. Frühere Erfahrungen unserer Arbeitsgruppe mit einem vergleichbaren Versuchsmodell an der Ratte zeigten eine relativ hohe Letalität und verschlechterte kardiozirkulatorische Parameter gegen Ende der 30-minütigen Ischämiedauer. In der früheren Studie führte das sogar zu einer Verkürzung auf 25 Minuten Ischämie [18]. Für die aktuelle Studie wählten wir erneut 30 Minuten als Ischämiedauer, da wir davon ausgingen, dass durch die

Größe der Kaninchen die Präparationsdauer kürzer sein würde und auch kleinere Blutungen sowie die regelmäßigen Blutentnahmen von den Tieren besser toleriert würden.

Die Reperfusionsdauer in den Gruppen mit der langen Reperfusionszeit von 240 Minuten ist deutlich länger als die in anderen Studien verwendete Zeitspanne von 120 Minuten. Auch eine neue Studie von REFFELMANN et al. konnte keine statistisch signifikante Zunahme der mittels TTC bestimmten Infarktfläche zwischen 120 und 180 Minuten Reperfusionsdauer nach 30 Minuten Ischämie in einem Kaninchen-Modell nachweisen [150]. Grundsätzlich wurde aber lange Zeit angenommen, dass die mit TTC gemessene Infarktgröße von der Dauer der Reperfusion abhängt [7]. Wir wählten die 4-stündige Reperfusion, um mögliche Effekte der HBOC-Therapie, die wir im oben genannten früheren Versuch mit einer nur 2-stündigen Reperfusion nicht erfasst haben, darstellen zu können. Es ergab sich nämlich nur für die prophylaktische HBOC-Applikation eine signifikante Reduktion der Infarktfläche, während die 30 Minuten später erfolgte therapeutische HBOC-Applikation keine Reduktion der Infarktfläche zeigte.

Im zweiten Versuchsteil führten wir eine nur 2-minütige Reperfusion durch, um frühe, direkt nach der Ischämie auftretende Auswirkungen der prophylaktischen und/oder therapeutischen HBOC-Applikation zu detektieren.

5.5.3 „Area at risk“ und Infarktareale

Die Wahl der Ligaturstelle im vorliegenden Versuch am ersten Ast der A.circumflexa bedingt eine eher kleine Ischämiefläche von etwa 30%. Wir folgten einer Modifikation nach YE et al. [218], die in einem Modell zur Senkung der Mortalität in einem kardialen Ischämiemodell an Ratten nicht wie in anderen Studien den Hauptstamm der LAD ligierten, sondern erst weiter peripher den oben beschriebenen Ast unterbanden. Auf diese Weise konnte die Mortalität zwar deutlich gesenkt werden, aber die Größe der „area at risk“ nimmt mit zunehmender Entfernung vom Hauptstamm ab. Einige Autoren, die den Hauptstamm okkludierten, beschreiben Flächen zwischen 30 - 40% in Ischämiestudien an Kaninchen [68, 157], andere konnten sogar 50 - 55% des linken Ventrikels als Ischämiezone erzielen [55, 139]. Im Hinblick auf die Größe des Infarktareals als Anteil der „area at risk“ liegen die Ergebnisse in unserem Versuch mit etwa 50% in der Positiv-Kontrollgruppe mit 240-minütiger Reperfusionszeit im Rahmen dessen, was auch von anderen Autoren angegeben wird [56, 139, 150, 151, 157].

5.5.4 „No-reflow“-Areale

Die Bestimmung der Mikroperfusionsverteilung, und damit der Ausprägung des „no-reflow“-Phänomens mittels Thioflavin-S, entspricht dem aktuellen Stand der Literatur [62, 95, 150]. Eine weitere experimentelle Möglichkeit zur Bestimmung der Areale mit „no-reflow“ ist die Untersuchung mittels radioaktiven oder farbgekoppelten Mikrosphären [68, 150, 151, 163, 164]. Dabei werden die Mikrosphären in das Herz injiziert und gleichzeitig eine Referenzprobe aus einer Arterie entnommen. Im Anschluss an den Versuch kann dann durch Herauslösen der Farb- oder radioaktiven Partikel aus dem Gewebe der regionale Blutfluss quantitativ untersucht werden. Ein Vorteil dieser Untersuchung liegt in der Möglichkeit, repetitive Messungen zu verschiedenen Zeitpunkten durchzuführen.

Man muss an dieser Stelle noch andere mögliche Messmethoden zur Perfusionsmessung nennen, zum einen die Kontrastechokardiographie, die neuerdings auch für Kleintier validiert ist [141], zum anderen die Messung mittels SPECT (Single Photon Emission-Computed Tomography), die für Hunde validiert wurde [166]. Beide Methoden sind sehr aufwändig, verursachen höhere Kosten und erfordern erfahrene Untersucher. Angesichts dieser Tatsachen erschien die bewährte Messung mit Thioflavin-S für unsere Studie vorteilhafter zu sein.

5.6 Ausblick

In der vorliegenden Untersuchung konnte erstmalig gezeigt werden, dass sowohl die prophylaktische als auch die therapeutische Applikation der zellfreien Rinder-Hämoglobinlösung HBOC-200 zu einer signifikanten Reduktion der Infarktfläche nach Ischämie und Reperfusion führt. Allerdings konnte unsere Hypothese, dass HBOC die Mikroperfusionsverteilung verbessert und es über diesen Mechanismus zu der Reduktion der Gewebsschäden kommt, nicht bestätigt werden.

Angesichts der signifikanten Reduktion der Infarktflächen und der zumindest im Versuchsabschnitt mit der 240-minütigen Reperfusion leicht reduzierten Schwere der Arrhythmien in der Prophylaxegruppe erscheint es uns angesichts des möglichen Benefits, den ein kardialer Risikopatient durch eine perioperative HBOC-Gabe erhalten könnte, zwingend erforderlich, den Einfluss zellfreier Hämoglobin-Lösungen auf die Oxygenierung im Rahmen von Ischämie und Reperfusion weiter zu untersuchen.

Zu den in Zukunft möglichen wissenschaftlichen Ansätzen zählt die Untersuchung des Einflusses von HBOC auf die Leukozyten-Endothel-Interaktion und auf das Komplementsystem.

Auch die Effekte auf die Bildung sogenannter „heat shock Proteine“ (HSP), insbesondere der (kardio-)protektiven Hämoxygenasen HO-1 und HO-2 sollten untersucht werden, da diese Enzyme im Abbau des Hämoglobins eine Rolle spielen und möglicherweise durch freies Hämoglobin induziert werden.

Es erscheint auch sinnvoll, andere künstliche Sauerstoffträger, wie zum Beispiel die bereits erfolgreich therapeutisch eingesetzten Perfluorocarbone (PFC), auch auf deren prophylaktische Anwendung zu testen.

Langfristig ist es aber erforderlich, multizentrische, klinische Studien an Risikopatienten mit KHK und geplanten Risikoeingriffen durchzuführen, um eine mögliche Verbesserung von Mortalität und Morbidität durch eine perioperative HBOC-Gabe feststellen zu können.

6 Zusammenfassung

Hintergrund

Das Risiko für Patienten mit koronarer Herzkrankheit, im Rahmen eines nicht herzchirurgischen Eingriffs eine perioperative Myokardischämie zu erleiden, wird in unterschiedlichen Studien mit etwa 3% beziffert. Klinisch äußert sich diese Ischämie mit Herzrhythmusstörungen, Angina pectoris bis hin zum manifesten Myokardinfarkt mit hoher Letalität. Neben der heutzutage verbreiteten medikamentösen Prophylaxe mit β-Blockern könnte eine Gabe plasmatischer Sauerstoffträger wie zum Beispiel dem HBOC-200 zu einer Reduktion der Auswirkungen dieser Komplikationen führen.

Fragestellung

In der vorliegenden Studie sollte die Hypothese überprüft werden, ob der Reduktion der myokardialen Infarktareale nach koronarer Ischämie und Reperfusion durch die prophylaktische oder therapeutische Applikation der zellfreien Hämoglobinlösung HBOC-200 eine Verbesserung der myokardialen Perfusionsverteilung zugrunde liegt. Auch eine mögliche Reduzierung der Schwere Ischämie-induzierter Herzrhythmusstörungen sollte überprüft werden.

Methodik

Die Untersuchung erfolgte prospektiv, randomisiert und bezogen auf die Auswertung verblindet. Um die Effekte der Ischämie und der Reperfusion unterscheiden zu können, wurden 2 Versuchsarme gebildet. Im ersten Versuchsteil, in den insgesamt 24 Tiere eingeschlossen wurden, erfolgte eine 30-minütige Ischämie, gefolgt von einer 2-minütigen Reperfusion (Gruppe 5-8). Der zweite Versuchsteil umfasste 29 Tiere, und bei gleicher Ischämiedauer wurde die Reperfusion auf 240 Minuten ausgedehnt (Gruppe 1-4).

Alle Versuchstiere erhielten eine intravenöse Allgemeinanästhesie und wurden kontrolliert beatmet. Nach Instrumentierung und Thorakotomie erfolgte die randomisierte Zuteilung in die verschiedenen Gruppen sowie die Versuchsarme mit kurzer oder langer Reperfusion. Die

Tiere der Gruppen 1 und 5 (Negativ-Kontrolle) erhielten Placebo und keine Koronararterienligatur. Die Tiere der Gruppen 2 und 6 (Positiv-Kontrolle) erhielten Placebo und eine Koronararterienligatur. Die Tiere der Versuchsgruppen 3 und 7 (Therapiegruppe) erhielten 0,4 g/kg HBOC-200 15 Minuten nach der Koronararterienligatur, während die Tiere der Gruppen 4 und 8 (Prophylaxegruppen) 0,4 g/kg HBOC-200 10 Minuten vor der Koronarligatur erhielten.

Die Ligatur wurde für 30 Minuten aufrechterhalten, gefolgt von der entsprechenden Reperfusionszeit. Die Größe der "no-reflow"-Areale wurde nach „in vivo"-Injektion von Thioflavin-S 4% planimetrisch bestimmt. Die Darstellung der „area at risk" erfolgte durch die Injektion von Patentblau, während die Größe der Infarktareale durch „in vitro"-Färbung mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) quantifiziert wurde. Neben einer kontinuierlichen Überwachung aller Basisparameter wie Hämodynamik, Blutgase und Elektrolyte erfolgte eine computergestützte Aufzeichnung kardialer Arrhythmien.

Ergebnisse

Die Demographie und die Basisparameter unterschieden sich nicht zwischen den Gruppen. In Folge der Applikation von HBOC-200 stieg der systemische Blutdruck temporär an, während die Herzfrequenz vorübergehend abnahm. Das Rate-Pressure Product als Ausdruck des myokardialen Sauerstoffverbrauches blieb stabil.

In dem Versuchsabschnitt mit 2-minütiger Reperfusion ist eine Bestimmung des Infarktareals mit TTC nicht möglich. Das „no-reflow"-Areal zeigte keine signifikanten Unterschiede.

Das Infarktareal im TTC-Nachweis nach 240-minütiger Reperfusion, bezogen auf die „area at risk", wurde sowohl durch die prophylaktische (25±13%, p=0,026) als auch die therapeutische Applikation (22±20%, p=0,009) von HBOC-200 im Vergleich zur Positiv-Kontrolle (48±17%) reduziert. Die „area at risk" zeigte in allen Gruppen eine vergleichbare Größe. Trotzdem waren die „no-reflow"-Areale, deren Größe in Abhängigkeit der Reperfusionszeit deutlich zunahm, nicht unterschiedlich zwischen den Gruppen, die einer Koronararterienligatur unterzogen wurden. Die Auswertung der Herzrhythmusstörungen zeigte keine signifikanten Differenzen zwischen den Gruppen.

Schlussfolgerungen

Die Größe des Infarktareals nach kardialer Ischämie und Reperfusion wurde sowohl durch die prophylaktische als auch durch die therapeutische Applikation von 0,4 g/kg HBOC-200 signifikant verringert. Die in diesem Modell zu untersuchende Hypothese einer Reduktion der „no-

reflow“-Areale durch HBOC-200 als Mechanismus dieses Effektes konnte nicht bestätigt werden. Weitere Untersuchungen müssen klären, ob die Infarktreduktion ein Effekt der Erhöhung des regionalen Sauerstoffangebots und der erleichterten Sauerstoffabgabe durch HBOC ist oder ob andere Wirkmechanismen zusätzlich eine Rolle spielen. Weitergehende Experimente mit dem Ziel eines perioperativen prophylaktischen oder therapeutischen Einsatzes von bovinen Hämoglobinlösungen bei kardialen Risikopatienten erscheinen damit notwendig und sinnvoll.

7 Literaturverzeichnis

[1] Alayash AI. Hemoglobin-based blood substitutes and the hazards of blood radicals. *Free Radic Res.* 2000;33:341-8.

[2] 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.

[3] The American College of Physicians. Clinical Guideline,Part I: guidelines for assessing and managing the perioperative risk from coronary artery disease associated with major noncardiac surgery. *Ann Intern Med.* 1997;127:309–312.

[4] Ames A 3rd, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Amer J Pathol.* 1968;52:437-453

[5] Anderson HV, Leimgruber PP, Roubin GS, Nelson DL, Gruentzig AR. Distal coronary artery perfusion during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J.* 1985;110:720-6.

[6] Arai M, Lefer DJ, So T, DiPaula A, Aversano T, Becker LC. An anti-CD18 antibody limits infarct size and preserves left ventricular function in dogs with ischemia and 48-hour reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:1278-85.

[7] Arnold G, Kaiser C, Fischer R, et al. 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.

[8] Bajaj AK, Cobb MA, Virmani R, Gay JC, Light RT, Forman MB. Limitation of myocardial reperfusion injury by intravenous perfluorochemicals. Role of neutrophil activation. *Circulation.* 1989;79:645-56.

[9] Baker KE, Curtis MJ. (2004). Left regional cardiac perfusion in vitro with platelet-activating factor, norepinephrine and K+ reveals that ischaemic arrhythmias are caused by independent effects of endogenous mediators facilitated by interactions, and moderated by paradoxical antagonism. *Br J Pharmacol.* 2004;142:352–366.

[10] 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.

[11] Becker BF, Massoudy P, Permanetter B, Raschke P, Zahler S. Possible significance of free oxygen radicals for reperfuion injury. *Z Kardiol.* 1993;82:49-58

[12] Böttiger BW, Martin E. Prävention perioperativer Myokardischämien- ein Update. *Anaesthesist.* 2000;49:174-86.

[13] Brauer P, Standl T. Transcranial Doppler sonography mean flow velocity during infusion of ultrapurified bovine hemoglobin. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1998;10:146-52.

[14] Bucci E, Matheson B. Vascular response to infusions of a nonextravasating hemoglobin polymer. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine.* 2002;4:72(P53).

[15] Bucci E, Watts TL. Cell-free hemoglobin, oxygen off-load and vasoconstriction. *Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2001;36:S123-4.

[16] Buehler PW, Mehendale S. Resuscitative effects of polynitroxylated alphaalpha-crosslinked hemoglobin following severe hemorrhage in the rat. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:764-74.

[17] Burmeister M, Bangert K, Horn E, Arnold G, Standl T, Schulte am Esch. Prophylaxe mit bovinem Hämoglobin reduziert den myocardialen tpO2-Abfall und Myokardschäden unter akuter Korornarstenose im Tiermodell. *Anaesth Intensivmed.* 2001;42: 473.

[18] Burmeister M, Rempf C, Rehberg S, Standl T, Schulte am Esch J. Effects of a prophylactic or therapeutic application of cell-free hemoglobin solution HBOC-200 on infarct size after myocardial ischemia and reperfusion in rats. *Anesthesiology.* 2003:A-751.

[19] 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 ischaemia–reperfusion injury following acute coronary ligature in rats. *Br J Anaesth.* 2005;95:737-745.

[20] 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.

[21] Carmeliet E. Cardiac Ionic Currents and Acute Ischemia: From Channels to Arrhythmias. *Physiol Rev.* 1999;79:917-1017.

[22] Caron A, Menu P. Cardiovascular and hemorheological effects of three modified human hemoglobin solutions in hemodiluted rabbits. *J Appl Physiol.* 1999;86:541-8.

[23] Cascio WE, Johnson TA, Gettes LS. Electrophysiologic changes in ischemic ventricular myocardium: I. Influence of ionic, metabolic, and energetic changes. *J Cardiovasc Electrophysiol.* 1995;6:1039-62.

[24] Caswell JE, Strange MB, Rimmer DM 3rd, Gibson MF, Cole P, Lefer DJ. A novel hemoglobin-based blood substitute protects against myocardial reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2005;288:1796-801.

[25] Christopherson R, Beattie C, Frank SM, Norris EJ, Meinert CL, Gottlieb SO, Yates H, Rock P, Parker SD, Perler BA, et al. Perioperative morbidity in patients randomized to epidural or general anesthesia for lower extremity vascular surgery. Perioperative Ischemia Randomized Anesthesia Trial Study Group. *Anesthesiology.* 1993;79:422-34.

[26] Cleman M, Jaffee CC, Wohlgelernter D. Prevention of ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty by transcatheter infusion of oxygenated Fluosol DA 20%. *Circulation.* 1986;74:555-62.

[27] Clements-Jewery H, Hearse DJ, Curtis MJ. Independent contribution of catecholamines to arrhythmogenesis during evolving infarction in the isolated rat heart. *Br J Pharmacol.* 2002;135:807-15.

[28] Clements-Jewery H, Hearse DJ, Curtis MJ. Phase 2 ventricular arrhythmias in acute myocardial infarction: a neglected target for therapeutic antiarrhythmic drug development and for safety pharmacology evaluation. *Br J Pharmacol.* 2005;145:551-64.

[29] Collins P, Burman J, Chung HI, Fox K. Hemoglobin inhibits endothelium-dependent relaxation to acetylcholine in human coronary arteries in vivo. *Circulation.*1993;87: 80-85.

[30] Coronel R, Wilms-Schopman FJ, deGroot JR. Origin of ischemia-induced phase 1b ventricular arrhythmias in pig hearts. *J Am Coll Cardiol.* 2002;39:166-176.

[31] Cowley MJ, Snow FR, DiSciascio G, Kelly K, Guard C, Nixon JV. Perfluorochemical perfusion during coronary angioplasty in unstable and high-risk patients. *Circulation.* 1990;81:IV27-34.

[32] 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.

[33] Curtis MJ, Walker MJ. Quantification of arrhythmias using scoring systems: an examination of seven scores in an in vivo model of regional myocardial ischaemia. *Cardiovasc Res* 1988;22(9):656-65.

[34] D'Agnillo F, Chang TM. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nat Biotechnol.* 1998;16:667-71.

[35] De Groot JR and Coronel R. Acute ischemia-induced gap junctional uncoupling and arrhythmogenesis. *Cardiovasc Res* 2004;62:323-334.

[36] Dekker LR, Fiolet JW, VanBavel E, Coronel R, Opthof T, Spaan JA and Janse MJ. Intracellular Ca2+, intercellular electrical coupling, and mechanical activity in ischemic rabbit papillary muscle. Effects of preconditioning and metabolic blockade. *Circ Res.* 1996;79:237-246.

[37] Dore M, Korthuis RJ, Granger DN, Entman ML, Smith CW. P-selectin mediates spontaneous leukocyte rolling in vivo. *Blood.* 1993;82:1308-16.

[38] Duilio C, Ambrosio G, Kuppusamy P, DiPaula A, Becker LC, Zweier JL. Neutrophils are primary source of O_2 radicals during reperfusion after prolonged myocardial ischemia. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:2649–2657.

[39] Elert O, Steinau HU. Postischämische Reperfusionsschäden und ihre Verminderung. *In: Kramer G.: Weichteilschäden. VHC, Weinheim.* 1988:55-63

[40] Engler RL, Schmid- Schönbein GW, Pavelec RS. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. *Amer J Pathol.* 1983;111:98-111

[41] Entman ML and Smith CW. Postreperfusion inflammation: a model for reaction to injury in cardiovascular disease. *Cardiovasc Res* 1994;28:1301–1311.

[42] Faivre-Fiorina B, Caron A. Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs. *Am J Physiol.* 1999;276:H766-70.

[43] Fan H, Sun B, Gu Q, Lafond-Walker A, Cao S, Becker LC. Oxygen radicals trigger activation of NF-*kappa* B and AP-1 and upregulation of ICAM-1 in reperfused canine heart *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;282:H1778-86.

[44] 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.

[45] Feola M, Simoni J, Dobke M, Canizaro PC. Complement activation and the toxicity of stroma-free hemoglobin solutions in primates. *Circ Shock.* 1988;25:275-90.

[46] Fishbein MC, J YR, Lando U, Kanmatsuse K, Mercier JC, Ganz W. The relationship of vascular injury and myocardial hemorrhage to necrosis after reperfusion. *Circulation.* 1980;62:1274-9.

[47] 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.

[48] 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.

[49] Forman MB, Puett DW, Bingham SE, Virmani R, Tantengco MV, Light RT, Bajaj A, Price R, Friesinger G. Preservation of endothelial cell structure and function by intracoronary perfluorochemical in a canine preparation of reperfusion. *Circulation.* 1987;76:469-79.

[50] Forman MB, Virmani R, Puett DW. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation.* 1990;81:IV69-78.

[51] Forman MB, Ingram DA, Murray JJ. Role of perfluorochemical emulsions in the treatment of myocardial reperfusion injury. *Am Heart J.* 1992;124:1347-57.

[52] Forman MB, Pitarys CJ, Vildibill HD, Lambert TL, Ingram DA, Virmani R, Murray JJ. Pharmacologic perturbation of neutrophils by Fluosol results in a sustained reduction in infarct size in the canine model of reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:205-16.

[53] Freitag M, Standl TG, 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;6:232-239.

[54] 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.

[55] 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.

[56] 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.

[57] 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.

[58] Go LO, Murry CE, Richard VJ, Weischedel GR, Jennings RB, Reimer KA. Myocardial neutrophil accumulatioin during reperfusion after reversible or irreversible ischemic injury. *Amer J Physiol.* 1988;255:H1188-1198.

[59] Goldstein S. The epidemiology of tachyfibrillation in sudden death. *Pacing Clin Electrophysiol.* 1986;9:1339-42.

[60] Golino P, Ambrosio G, Ragni M, Pascucci I, Triggiani M, Oriente A, McNatt J, Buja LM, Condorelli M, Chiariello M, Willerson JT. Short-term and long-term role of platelet-activating factor as a mediator of in vivo platelet aggregation. *Circulation.* 1993;88:1205-1214.

[61] Golino P, Ragni M, Cirillo P, Avvedimento VE, Feliciello A, Esposito N, Scognamiglio A, Trimarco B, Iaccarino G, Condorelli M, Chiariello M, and Ambrosio G. Effects of tissue factor induced by oxygen free radicals on coronary flow during reperfusion. *Nat Med.* 1996;2:35–41.

[62] Golino P, Ragni M, Cirillo P, Scognamiglio A, Ravera A, Buono C, Guarino A, Piro O, Lambiase C, Botticella F, Ezban M, Condorelli M, Chiariello M. Recombinant human, active site-blocked factor VIIa reduces infarct size and no-reflow phenomenon in rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;278:1507-16.

[63] 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.

[64] Gulati A, Rebello S. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb©): Involvment of adrenergic mechanisms in the pressor effect. Artif. Cells Blood Substit. *Immobil. Biotechnol.* 1994;22:603-612.

[65] Habler O, Kleen M, Pape A, Meisner F, Kemming G, Messmer K. Diaspirin-crosslinked hemoglobin reduces mortality of severe hemorrhagic shock in pigs with critical coronary stenosis. *Crit Care Med.* 2000;28:1889-98.

[66] 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.

[67] 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.

[68] 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.

[69] 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.

[70] Hammersen F, Messmer K (Hrsg.). Ischämie und Reperfusion *Karger, Basel - München - Paris - London - New York - New Dehli - Singapore - Tokyo - Sydney.* 1989

[71] Hashimoto K, Pearson PJ, Schaff HV, Cartier R. Endothelial cell dys-function after ischemic arrest and reperfusion: a possible mechanism of myocardial injury during reflow. *Thorac Cardiovasc Surg.* 1991;102:688-694

[72] Hennan JK, Swillo RE, Morgan GA, Keith Jr JC, Schaub RG, Smith RP, Feldman HS, Haugan K, Kantrowitz J, Wang PJ, Abu-Qare A, Butera J, Larsen BD, Crandall DL. Rotigaptide (ZP123) Prevents Spontaneous Ventricular Arrhythmias And Reduces Infarct Size During Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury In Open-Chest Dogs. *J Pharmacol Exp Ther.* 2005;Dec 12; ePub; noch nicht gedruckt erschienen

[73] Hess JR, MacDonald VW, Brinkley WW. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol.* 1993;74:1769-78.

[74] Hess JR, Macdonald VW. Increased vascular resistance with hemoglobin-based oxygen carriers. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22:361-72.

[75] Hirche H, Franz C, Bos L, Bissig R, Lang R, Schramm M. (1980). Myocardial extracellular K+ and H+ increase and noradrenaline release as possible cause of early arrhythmias following acute coronary artery occlusion in pigs. *J Mol Cell Cardiol.* 1980;12:579–593.

[76] 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.

[77] 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.

[78] 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.

[79] 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.

[80] 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.

[81] Hort W. Pathologie des akuten Herzinfarktes. *Internist.* 2001;42:631-40.

[82] Humphreys RA, Haist JV, Chakrabarti S, Feng Q, Arnold JM, Karmazyn M. Orally administered NHE1 inhibitor cariporide reduces acute responses to coronary occlusion and reperfusion. *Am J Physiol.* 1999;276:749-57.

[83] Ito H, Tomooka T, Sakai N, et al. Lack of myocardial perfusion immediately after suc-

cessful thrombolysis: a predictor of poor recovery of left ventricular function in anterior myocardial infarction. *Circulation* 1992;85:1699 –705.

[84] 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.

[85] Jaffe CC, Wohlgelernter D, Cabin H, Bowman L, Deckelbaum L, Remetz M, Cleman M. Preservation of left ventricular ejection fraction during percutaneous transluminal coronary angioplasty by distal transcatheter coronary perfusion of oxygenated Fluosol DA 20%. *Am Heart J.* 1988;115:1156-64.

[86] Janse MJ, van Capelle FJL, Morsink H, Kléber AG, Wilms-Schopman F, Cardinal R, d'Alnoncourt CN, Durrer D. Flow of injury current and patterns of excitation during early ventricular arrhythmias in acute regional myocardial ischemia in isolated porcine and canine hearts: evidence for two different arrhythmogenic mechanisms. *Circ Res.* 1980;47:151-165.

[87] Janse MJ, Wit AL. Electrophysiological mechanisms of ventricular arrhythmias resulting from myocardial ischemia and infarction. *Physiol Rev.* 1989;69:1049-1098.

[88] 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.

[89] Jordan JE, Zhao ZQ, Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. *Cardiovasc Res* 1999;43:860-78.

[90] 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.

[91] 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.

[92] 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.

[93] Kleber G. The potential role of Ca2+ for electrical cell-to-cell uncoupling and conduction block in myocardial tissue. *Basic Res Cardiol.* 1992;87:131-143.

[94] 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.

[95] Kloner RA, Ganote CE, Jennings RB. The „no-reflow“ phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 1974;54:1496-508.

[96] Kloner RA, Rude RE, Carlson N, Maroko PR, DeBoer LW, Braunwald E. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation.* 1980;62:945-52.

[97] Kolodgie FD, Dawson AK, Roden DM, Forman MB, Virmani R. Effect of Fluosol-DA on infarct morphology and vulnerability to ventricular arrhythmia. *Am Heart J.* 1986;112:1192-201.

[98] Kolodgie FD, Farb A, Carlson GC, Wilson PS, Virmani R. Hyperoxic reperfusion is required to reduce infarct size after intravenous therapy with perfluorochemical (Fluosol-DA 20%) or its detergent component (poloxamer 188) in a poorly collateralized animal model. Absence of a role of polymorphonuclear leukocytes. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:1098-108.

[99] Korthuis RJ, Granger DN. Reactive oxygen metabolites, neutrophils, and the pathogenesis of ischemic-tissue reperfusion. *Clin. Cardiol.* 1993;16:I19-26

[100] 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.

[101] 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.

[102] Kukielka GL, Hawkins HK, Michael L, et al. Regulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in ischemic and reperfused canine myocardium. *J Clin Invest* 1993;92:1504-16.

[103] Kunichika H, Ben-Yehuda O, Lafitte S, Kunichika N, Peters B, DeMaria AN. Effects of glycoprotein IIb/IIIa inhibition on microvascular flow after coronary reperfusion. A quantitative myocardial contrast echocardiography study. *J Am Coll Cardiol.* 2004;43:276-83.

[104] Kurose I, Anderson DC, Miyasaka M, Tamatani T, Paulson JC, Todd RF, Rusche JR, Granger DN. Molecular determinants of reperfusion- induced leukocyte adhesion and vascular protein leakage. *Circ Res.* 1994;74:336-343

[105] 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 ST-segment depression in cardiac morbidity after vascular surgery. *Lancet.* 1993;341:715-9.

[106] 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.

[107] Lee R, Neya K. Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J Appl Physiol.* 1995;79:236-42.

[108] 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.

[109] Lenz G, Junger H. Hemodynamic effects after partial exchange transfusion with pyridoxylated polyhemoglobin in chimpanzees. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1991;19:709-18.

[110] 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.

[111] Lieberthal W, Fuhro R. O-raffinose cross-linking markedly reduces systemic and renal vasoconstrictor effects of unmodified human hemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther.* 1999;288:1278-87.

[112] 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.

[113] Lipfert B, Standl T, Dullmann J, Helmchen U, Schulte am Esch J, Lorke DE. Histology and ultrastructure of liver and kidney following blood exchange with ultrapurified, polymerised bovine hemoglobin in comparison with hydroxyethyl starch. *Lab Invest.* 1999;79:573-82.

[114] Machi T, Stewart N, Kassell NF, Comar Y, Nihei H, Tanaka Y. Hemoglobin enhances release of endothelin from cultured endothelial cells. *In: Cerebral vasospasm, edited by K. Sano, K. Takakura, N. F. Kassell, and T. Sasaki. University of Tokyo Press, Tokyo.* 1991;pp.262-265.

[115] MacDonald RL, Weir BK. A review of hemoglobin and the pathogenesis of cerebral vasospasm. *Stroke.* 1991;22:971-1082.

[116] Malcolm DS, Hamilton IN, Schultz SC, Cole F, Burhop K. Characterization of hemo-

dynamic response to intravenous diaspirin crosslinked hemoglobin in rats. *Artif. Cells Blood Substit. Immobil. Biotechnol.* 1994;22:91-107.

[117] Manciet LH, Poole DC, McDonagh PF, Copeland JG, Mathieu-Costello O. Microvascular compression during myocardial ischemia: mechanistic basis for no-reflow phenomenon. *Am J Physiol.* 1994;266:H1541-50.

[118] Mangano DT. Perioperative cardiac morbidity. *Anesthesiology.* 1990;72:153–184

[119] 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.

[120] 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.

[121] 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.

[122] Martin W, Villiabi GM, Lothianandan D, Furchgott RF. Selective blockade of endothelium-dependent and glyceryl trinitrate-induces relaxation by hemoglobin and by methylene blue in the rabbit aorta. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1985;232: 708-716.

[123] Matsuda N, Nakai K. The quality control of stroma-free hemoglobin: lysophosphatidylcholine, a component of stromal phospholipids, as candidate vasoconstrictive factor. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22:939-44.

[124] Maxwell RA, Gibson JB. Resuscitation of severe chest trauma with four different hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J Trauma.* 2000;49:200-9; discussion 209-11.

[125] McDonagh PF, Cohen DM, Suaudeau J, Laks H. The effects of myocardial ischemia followed by reperfusion on perfused coronary capillarity. *Microcirc Endothelium Lymphatics.* 1985;2:67-84.

[126] Menger MD, Pelikan S, Steiner D, Messmer K. Microvascular ischemia-reperfusion injury in striated muscle: significance of „reflow paradox“. *Amer J Physiol.* 1992;263:H1901-1906

[127] Menger MD, Messmer K. Microcirculation of skeletal muskle after ischemia and reperfusion. *Wien Med Wochenschr.* 1993;143:148-158

[128] Moss GS, DeWoskin R, Cochin A. Stroma-free hemoglobin. I. Preparation and observations on in vitro changes in coagulation. *Surgery.* 1973;74:198-203.

[129] Motterlini R, Macdonald VW. Cell-free hemoglobin potentiates acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in rabbit hearts. *J Appl Physiol.* 1993;75:2224-33.,

[130] Mukherjee D, Moliterno DJ. Achieving tissue-level perfusion in the setting of acute myocardial infarction. *Am J Cardiol.* 2000;85:39–46.

[131] 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.

[132] 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.

[133] National Research Council, I. o. L. A. R., Commission on Life Sciences. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *National Academy Press, Washington, D.C.*; 1996.

[134] 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.

[135] Ning J, Anderson PJ, Biro GP. Resuscitation of bled dogs with pyridoxalated-polymerized hemoglobin solution. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1992;20:525-30.

[136] Niquille M, Touzet M, Leblanc I, Baron JF. Reversal of intraoperative myocardial ischemia with a hemoglobin-based oxygen carrier. *Anesthesiology.* 2000;92:882-5.

[137] Nolte D, Botzlar A, Pickelmann S, Bouskela E, Messmer K. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med.* 1997;130:314-27.

[138] 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.

[139] 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.

[140] Opitz CF, Mitchell GF, Pfeffer MA, Pfeffer JM. Arrhythmias and death after coronary artery occlusion in the rat. Continuous telemetric ECG monitoring in conscious, untethered rats. *Circulation.* 1995;92:253-61.

[141] 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.

[142] Pemberton M, Anderson G, Barker J. In vivo microscopy in microcirculartory injury in skeletal muscle following ischemia-reperfusion. *Microsurgery.* 1994;15:374-382

[143] Perler BA, Tohmeh AG, Bulkley BG. Inhibition of the compartment syndrome by the ablation of free radical-mediated reperfusion injury. *Surgery.* 1990;108:40-47

[144] 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.

[145] 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.

[146] 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.

[147] Quinones-Baldrich WJ, Chervu A, Hernandez JJ, Colburn M, Moore WS. Skeletal muscle funktion after ischemia: no-reflow versus reperfusion injury. *J Surg Res.* 1991;51:5-12

[148] Rabinovici R, Rudolph AS, Yue TL, Feuerstein G. Biological responses to liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) are improved by a PAF antagonist. *Circ Shock.* 1990;31:431-45.

[149] Radomski MW, Palmer RMJ, Moncada S. Endogenous nitric oxide inhibits human platelet adhesion to vascular endothelium. *Lancet.* 1987;2:1057-68.

[150] 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.

[151] 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.

[152] Reffelmann T, Kloner RA. The „no-reflow“ phenomenon: basic science and clinical correlates. *Heart.* 2002;87:162-8.

[153] Reffelmann T, Kloner RA. Effects of adenosine and verapamil on anatomic no-reflow in a rabbit model of coronary artery occlusion and reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol.* 2004;43:580-8.

[154] Rempf C, Burmeister MA, Bartsch-Zwemke S, Rehberg S, Standl T, Schulte am Esch J. Effect of prophylactic or therapeutic application of cell-free hemoglobin HBOC-200 on severity of cardiac arrhythmias during myocardial ischemia/reperfusion in rats. *Eur J Anaesth.* 2003;20:A-558.

[155] Reynolds JM, McDonagh PF. Early in reperfusion, leukocytes alter perfused capillarity and vascular resistance. *Amer J Physiol.* 1989;256:H982-989

[156] Rezkalla SH, Kloner RA. No-reflow phenomenon. *Circulation.* 2002;105:656-62.

[157] 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.

[158] 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.

[159] Ritter LS, McDonagh PF. Low-flow reperfusion after myocardial ischemia enhances leukocyte accumulation in coronary microcirculation. *Amer J Physiol.* 1997;273:H1154-1165

[160] Rodriguez B, Ferrero JM Jr, Trenor B. Mechanistic investigation of extracellular K+ accumulation during acute myocardial ischemia: a simulation study. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283:490-500.

[161] Roe MT, Ohman EM, Maas AC, Christenson RH, Mahaffey KW, Granger CB, Harrington RA, Califf RM, Krucoff MW. Shifting the open-artery hypothesis downstream: the quest for optimal reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 2001;37(1):9-18.

[162] Rohlfs RJ, Bruner E. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J Biol Chem.* 1998;273:12128-34.

[163] 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.

[164] 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.

[165] Romano M, Buffoli F, Lettieri C, Aroldi M, Tomasi L, Baccaglioni N, Rosiello R, Zanini R. No reflow in patients undergoing primary angioplasty for acute myocardial infarction at high risk: incidence and predictive factors. *Minerva Cardioangiol.* 2005;53(1):7-14.

[166] Rumsey WL, Kuczynski B, Patel B, Bauer A, Narra RK, Eaton SM, Nunn AD, Strauss HW. SPECT imaging of ischemic myocardium using a technetium-99m-nitroimidazole ligand. *J Nucl Med.* 1995;36:1445-50.

[167] Saetzler RK, Arfors KE, Tuma RF, Vasthare U, Ma L, Hsia CJ, Lehr HA. Polynitroxylated hemoglobin-based oxygen carrier: inhibition of free radical-induced microcirculatory dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1-6.

[168] Savitsky JP, Doczi J, Black J, Arnold JD. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther.* 1978;23:73-80.

[169] Saxena R, Wijnhoud AD, et al. Effect of diaspirin cross-linked hemoglobin on endothelin-1 and blood pressure in acute ischemic stroke in man. *J Hypertens.* 1998;16:1459-65.

[170] 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.

[171] Schömig A, Dart AM, Dietz R, Mayer E, Kübler W. Release of endogenous catecholamines in the ischemic myocardium of the rat. Part A: locally mediated release. *Circ Res.* 1984;55:689–701.

[172] Schultz SC, Grady B, Cole F, Hamilton I, Burhop K, Malcolm S. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J. Lab. Clin. Med.* 1993;122: 301-308.

[173] 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.

[174] Sefrin P, Schua R. Results of cardiopulmonary resuscitation. *Internist.* 1992;33:332-40.

[175] Sellards A, Minot G. Injection of Haemoglobin in man and its relatin to blood destruction, with especial reference to the anaemias. *J Med Res.* 1916;34:469-494.

[176] Sherman IA, Dlugosz JA. Systemic hemodynamic and hepatic microvascular responses to a 33blood, stroma-free hemoglobin, and oxypolyhemoglobin solutions. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1993;21:537-51.

[177] Sloan EP, Königsberg M, Gens D, Cipolle M, Runge J Mallory MN, Rodman jr G. Diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock: a randomized controlled efficacy trial. *JAMA*. 1999;282:1857-1864.

[178] Smith WT 4th, Fleet WF, Johnson TA, Engle CL, Cascio WE.The Ib Phase of Ventricular Arrhythmias in Ischemic In Situ Porcine Heart Is Related to Changes in Cell-to-Cell Electrical Coupling. *Circulation*. 1995;92:3051-3060.

[179] Spahn DR. Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit Care (Lond)*. 1999;3:R93-R97.

[180] 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.

[181] 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.

[182] Spence RPL, Swisher SN, Kleinman S. Blood substitutes. *Clinical Practice of Transfusion Medicine. In. 3 ed. New York: Churchill Livingstone*. 1996:967-84.

[183] 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

[184] Standl T. Arificial Oxygen Carriers as Red Blood Cell Substitutes - Perfluorocarbons and Cell-Free Hemoglobin. *Infusionsther Transfusionsmed*. 2000;27:128-137.

[185] Standl, T. Haemoglobin-based erythrocyte transfusion substitutes. *Expert Opin Biol Ther*. 2001;1:831-43.

[186] 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.

[187] Standl T, Lipfert B, Reeker W, Schulte am Esch J, Lorke DE. Acute effects of complete blood exchange with ultra-purified hemoglobin solution or hydroxyethyl starch on liver and kidney in the animal model. *Anasthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther*. 1996;31:354-61

[188] Standl T, 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.

[189] 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.

[190] 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;80:189-94.

[191] Standl T, Freitag M, Burmeister MA, Horn EP, Wilhelm S, Am Esch JS. 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.

[192] 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.

[193] Stotland MA, Kerrigan CL. E- and L- selectin adhesion molecules in mus-culocutaneous flap reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99:2010-2020

[194] 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).

[195] 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.

[196] 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.

[197] 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.

[198] Summers WK, Jamison RL. The no reflow phenomenon in renal ischemia. *Lab Invest.* 1971;25:635-43.

[199] Suval WD, Duran WN, Boric MP, Hobson RW, Berendsen PB, Ritter AB. Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury. *Amer J Surg.* 1987;154:211-218

[200] Symons JD, Sun X, Flaim SF, del Balzo U. Perflubron emulsion improves tolerance to low-flow ischemia in isolated rabbit hearts. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1999;34:108-15.

[201] 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.

[202] Tremper KK. Perfluorochemical "blood substitutes". *Anesthesiology.* 1999;91:1185-7.

[203] Virmani R, Kolodgie FD, Osmialowski A, Zimmerman P, Mergner W, Forman MB. Myocardial protection by perfluorochemical infusion during transient ischemia produced by balloon coronary occlusion. *Am Heart J.* 1988;116:421-31.

[204] 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.

[205] Vollrath B, Weir BKA, Cook DA. Hemoglobin causes release of inositol triphosphate from vascular muscle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1990;171:506-511.

[206] 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.

[207] Walker MJ, Curtis MJ, Hearse DJ, Campbell RW, Janse MJ, Yellon DM, Cobbe SM, Coker SJ, Harness JB, Harron DW, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res* 1988;22(7):447-55.

[208] 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.

[209] Wang WZ, Anderson G, Fleming JT, Peter FW, Franken RJ, Acland RD, Barker J. Lack of nitric oxide contributes to vasospasm during ischemia/ reperfusion injury. *Plast Reconstr Surg.* 1997;99:1099-1108

[210] Weiss J, Shine KI. K+ accumulation and electrophysiological alterations during early myocardial ischemia. *Am J Physiol.* 1982;243:318-27.

[211] Weiss J, Couper GS, Hiltbrand B, Shine KI. Role of acidosis in early contractile dysfunction during ischemia: evidence from pH measurements. *Am J Physiol.* 1984;247:760-7.

[212] Weiss AP, Carey LA, Randolph MA, Moore JR, Weiland AJ. Oxygen radical scavengers improve vasculare patency and bone muscle and cell survival in an ischemic extremity replant model. *Plast Reconstr Surg.* 1989;84:117-123

[213] 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.

[214] Wilkinson PL, Moyers JR, Ports T, Chatterjee K, Ullyott D, Hamilton WK. Rate-pressure product and myocardial oxygen consumption during surgery for coronary artery bypass. *Circulation.* 1979;60:170-3.

[215] Wu J, McHowat J, Saffitz JE, Yamada KA and Corr PB. Inhibition of gap junctional conductance by long-chain acylcarnitines and their preferential accumulation in junctional sarcolemma during hypoxia. *Circ Res.* 1993;72:879-889.

[216] 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.

[217] Yang T, Olsen KW. Enzymatic protection from autoxidation for crosslinked hemoglobins. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22:709-17.

[218] 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.

[219] Zaugg M. Kardioprotektion in der perioperativen Phase bei nicht kardialen Eingriffen. *Anaesthesist.* 2000;49:570-585.

8 Anhang

8.1 Tabellen Reperfusionszeit 2 Minuten

8.1.1 Gewicht

	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Gewicht (kg)	2,3±0,4	2,67±0,3	2,69±0,3	2,5 ± 0,3

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

8.1.2 Hämodynamik und Körpertemperatur

HF (1 min^{-1})	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	184±25	183±30	200±43	203±16
Applikation 1 + 5 min	185±25	180±25	200±36	202±16
Applikation 1 + 15 min	192±28	179±27	188±17	181±6
Applikation 1 + 25 min	205±32	183±26	196±24	175±7
Ligatur + 5 min	203±34	193±24	209±33	200±10
Applikation 2	205±31	197±27	177±77	220±43
Ligatur + 20 min	201±25	200±26	225±34	213±21
Ligatur + 25 min	203±33	204±27	208±43	214±20
Reperfusion + 2 min	208±30	202±29	223±39	211±21

Tabelle 8.2: Darstellung der Herzfrequenz der Versuchstiere (MW±SD)

MAP (mmHg)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	68±10	58±9	58±12	59±8
Applikation 1 + 5 min	66±14	56±8	56±13	59±7
Applikation 1 + 15 min	66±10	56±8	57±15	67±9
Applikation 1 + 25 min	65±8	58±12	57±16	64±9
Ligatur + 5 min	62±8	59±13	53±9	69±9
Applikation 2	63±8	60±11	54±8	57±25
Ligatur + 20 min	65±8	57±11	54±17	61±16
Ligatur + 25 min	64±8	57±10	55±13	60±10
Reperfusion + 2 min	62±9	56±9	57±10	64±10

Tabelle 8.3: Darstellung der mittleren arteriellen Druckwerte (MW±SD)

°Celsius	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	38,4±0,5	37,9±0,3	38,3±0,6	38,4±0,5
Applikation 1 + 5 min	38,3±0,3	38,0±0,3	38,2±0,5	38,4±0,5
Ligatur + 5 min	38,3±0,4	37,9±0,5	38,1±0,4	38,1±0,4
Ligatur + 20 min	38,2±0,5	37,9±0,4	38,1±0,5	38,1±0,4
Reperfusion + 2 min	38,2±0,4	38,2±0,4	38,2±0,4	38,2±0,4

Tabelle 8.4: Rektale Körpertemperatur (MW±SD)

8.1.3 Blutgasanalyse

pH	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	7,47±0,06	7,55±0,06	7,51±0,04	7,51±0,03
Applikation 1 + 5 min	7,45±0,04	7,54±0,05*	7,52±0,07*	7,50±0,06
Ligatur + 5 min	7,43±0,05	7,52±0,04	7,52±0,03	7,47±0,06
Ligatur + 20 min	7,42±0,05	7,49±0,06	7,43±0,1	7,43±0,05
Reperfusion + 2 min	7,42±0,06	7,51±0,06	7,43±0,08	7,43±0,05

Tabelle 8.5: pH-Wert (*p<0,05 vs. Negativ Kontrolle)(MW±SD)

$paCO_2$ (mmHg)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	37±5	35±3	38±5	40±10
Applikation 1 + 5 min	38±4	32±5	34±7	39±6
Ligatur + 5 min	41±3	35±3	35±5	43±10
Ligatur + 20 min	41±4	35±6	39±10	43±11
Reperfusion + 2 min	39±4	35±4	36±9	41±8

Tabelle 8.6: Arterieller Kohlendioxidpartialdruck ($paCO_2$)(MW±SD)

FIO_2 (%)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	37,6±9	33,6±2	34,3±4	34,3±4
Applikation 1 + 5 min	37,1±9	34,3±4	35,5±3	34,3±3
Ligatur + 5 min	30,8±2	36,0±4	34,5±1	36,5±4
Ligatur + 20 min	30,8±2	34,3±5	48±29	43,8±21
Reperfusion + 2 min	30,8±1	33,1±4	36,2±8	33,6±3

Tabelle 8.7: Inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FIO_2)(MW±SD)

paO_2 (mmHg)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	151±95	119±27	88±9	96±10
Applikation 1 + 5 min	121±49	123±26	91±8	108±18
Ligatur + 5 min	85±24	122±31	101±14	92±31
Ligatur + 20 min	84±14	106±26	119±36	93±54
Reperfusion + 2 min	92±9	106±25	108±35	83±24

Tabelle 8.8: Arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO_2)(MW±SD)

SaO_2 (%)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	97,8±2	98±1	94,6±2	96,9±1
Applikation 1 + 5 min	97,6±1	97,5±1	94,9±2	95,7±2
Ligatur + 5 min	93±5	97,7±2	95,4±2	92,5±4
Ligatur + 20 min	94,7±2	96,8±3	90,9±8	86,7±15
Reperfusion + 2 min	95,3±1	97,4±1	92,2±5	88,9±12

Tabelle 8.9: Arterielle Sauerstoffsättigung (SaO_2)(MW±SD)

HCO3 (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	27±3	31±3	30±3	32±8
Applikation 1 + 5 min	26±4	27±4	28±3	31±6
Ligatur + 5 min	27±2	28±2	27±2	31±7
Ligatur + 20 min	26±2	26±4	25±3	28±6
Reperfusion + 2 min	25±3	28±2	24±4	27±5

Tabelle 8.10: Standardbikarbonat (HCO_3)(MW±SD)

SBE (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	3±3	8±3	7±3	9±7
Applikation 1 + 5 min	2±2	4±4	5±3	7±6
Ligatur + 5 min	3±2	5±2	6±3	7±6
Ligatur + 20 min	2±2	4±3	1±3	4±6
Reperfusion + 2 min	1±3	5±2	0±4	3±6

Tabelle 8.11: Standardbasenüberschuss (SBE)(MW±SD)

8.1.4 Elektrolyte und Blutzucker

Na^+ (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	144±3	141±2	142±1	141±2
Applikation 1 + 5 min	143±1	143±1	143±1	140±4
Ligatur + 5 min	144±2	142±1	140±5	142±2
Ligatur + 20 min	144±2	143±1	141±3	142±3
Reperfusion + 2 min	144±1	141±2	142±2	141±3

Tabelle 8.12: Natrium (Na+)(MW±SD)

K^+ (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	3,3±0,3	3,4±0,5	3,3±0,4	3,3±0,5
Applikation 1 + 5 min	3,0±0,3	3,0±0,3	3,0±0,5	3,3±0,4
Ligatur + 5 min	3,1±0,3	3,3±0,5	3,5±0,2	3,2±0,5
Ligatur + 20 min	3,1±0,3	3,1±0,4	3,5±0,5	3,2±0,5
Reperfusion + 2 min	3,1±0,3	3,5±0,5	3,2±0,6	3,3±0,4

Tabelle 8.13: Kalium (K+)(MW±SD)

Ca^{++} (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	1,47±0,07	1,4±0,03	1,36±0,1	1,3±0,1*
Applikation 1 + 5 min	1,48±0,06	1,29±0,08*	1,29±0,05*	1,29±0,09*
Ligatur + 5 min	1,5±0,07	1,37±0,05	1,37±0,1	1,30±0,1*
Ligatur + 20 min	1,5±0,09	1,32±0,09*	1,34 ±0,09*	1,29±0,08*
Reperfusion + 2 min	1,48±0,07	1,35±0,06	1,26±0,09*	1,35±0,1*

Tabelle 8.14: Ionisiertes Calcium (Ca++, *p<0,05 vs. Negativ Kontrolle)(MW±SD)

BZ (mg/dl)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	120±21	131±12	117±8	135±12
Applikation 1 + 5 min	129±46	125±9	119±7	131±15
Ligatur + 5 min	123±40	130±11	145±40	131±10
Ligatur + 20 min	134±46	137±24	229±90	168±41
Reperfusion + 2 min	147±53	141±13	211±64	186±47

Tabelle 8.15: Blutzucker (BZ)(MW±SD)

8.1.5 Hämoglobinkonzentrationen

tHb (g/dl)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	14±1	13,1±1,1	13,1±1,7	13,8±1
Applikation 1 + 5 min	12,9±1,2	11,6±1	11,9±1	12,8±0,6
Ligatur + 5 min	13,2±1,1	12±0,5	12,2±0,7	13±0,6
Ligatur + 20 min	12,8±0,9	11,5±1	11,6±0,7	12,4±1,4
Reperfusion + 2 min	12,2±0,9	11,2±1	10,9±0,8	11,6±1

Tabelle 8.16: Gesamthämoglobin (tHb)(MW±SD)

HbO_2 (%)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	96,2±2*	96,8±1*	93±3	95,3±1
Applikation 1 + 5 min	96±1,2*	95±1,2*	93,4±2	94,1±1
Ligatur + 5 min	91,6±5	96,2±2	93,8±2	91±4
Ligatur + 20 min	93,2±2	95,2±3	89,6±8	85,4±14
Reperfusion + 2 min	93,9±1	95,8±1	90,7±5	87,6±11

Tabelle 8.17: Oxyhämoglobin (HbO_2, *$p<0,05$ vs. Prophylaxe)(MW±SD)

HbCO (%)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	1±0,3	1±0,3	0,8±0,4	1±0,3
Applikation 1 + 5 min	1±0,3	1±0,3	1±0,2	1±0,3
Ligatur + 5 min	0,9±0,3	1±0,3	1±0,4	0,9±0,6
Ligatur + 20 min	1±0,3	1±0,4	0,6±0,4	0,8±0,5
Reperfusion + 2 min	1±0,1	1±0,3	0,6±0,3	0,8±0,5

Tabelle 8.18: Carboxyhämoglobin (HbCO)(MW±SD)

pHb (g/dl)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	0±0	0±0	0±0	0±0
Applikation 1 + 5 min	0±0*	0±0*	0±0*	1±0,5
Ligatur + 5 min	0±0*	0±0*	0±0*	1±0,5
Ligatur + 20 min	0±0*#	0±0*#	0,9±0,4	1,1±0,2
Reperfusion + 2 min	0±0*#	0±0*#	0,8±0,4	1±0,1

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

MetHb (g/dl)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	0,5±0,06	0,6±0,1	0,6±0,3	0,6±0,2
Applikation 1 + 5 min	0,6±0,1	0,6±0,1	0,5 ±0,1	0,7±0,3
Ligatur + 5 min	0,6±0,1	0,6±0,1	0,6±0,2	0,5±0,3
Ligatur + 20 min	0,6±0,08	0,6±0,1	0,6±0,3	0,7±0,2
Reperfusion + 2 min	0,6±0,08	0,6±0,1	0,5±0,3	0,6±0,08

Tabelle 8.20: Methämoglobin (MetHb)(MW±SD)

8.1.6 Flächenauswertung

	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
„Area at risk“ (% LV)	36±3	32±4	33±1	33±1
„no-reflow“ (% AR)	7,7±9	6,1±3	20±28	10±8
Infarktgröße (% AR)	n.a.	n.a.	n.a.	n.a.

Tabelle 8.21: Ergebnisse der Flächenauswertung(MW±SD)(LV = Größe des linken Ventrikels, AR = „Area at risk“, n.a. = nicht ausgewertet)

8.2 Tabellen Reperfusionszeit 240 Minuten

8.2.1 Gewicht

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

Tabelle 8.22: Darstellung des Körpergewichts der Versuchstiere (MW±SD)

8.2.2 Hämodynamik und Körpertemperatur

HF (1 min^{-1})	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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	233±12	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

Tabelle 8.23: Darstellung der Herzfrequenz der Versuchstiere (1/min, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD)

MAP (mmHg)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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 8.24: Darstellung der mittleren arteriellen Druckwerte (mmHg, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD)

RPP (mmHg/min)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase + 30 min	13,9±2	12,6±2	12,7±2	13,8±4
Applikation 1 + 5 min	13,6±2	12,8±2	12,9±2	13,9±3
Applikation 1 + 15 min	13,6±1	12,8±2	12,8±2	14,7±5
Applikation 1 + 25 min	13,3±1	13,9±2	12,6±2	13,7±5
Ligatur + 5 min	14,3±2	11,9±2	10±3	14,1±5
Applikation 2	14,1±3	12,6±3	12±3	13,4±4
Ligatur + 20 min	13,6±2	13,1±2	11,9±3	14,1±4
Ligatur + 25 min	13,2±1	12±2	12±2	13±3
Reperfusion + 2 min	13,6±1	11,3±2	12±2	12,8±3
Reperfusion + 10 min	13,9±2*	12±2	11,7±2	13,3±4
Reperfusion + 20 min	13,2±2	11,9±2	11,7±3	13,1±4
Reperfusion + 30 min	12,6±1	12,0±1	12,1±3	11,6±4
Reperfusion + 40 min	12,9±1	12,4±2	11,9±2	13,6±4
Reperfusion + 50 min	13±1	12,9±2	12,1±2	13,8±4
Reperfusion + 60 min	12,6±1	13,2±2	11,5±2	14,1±4
Reperfusion + 90 min	13,4±1	12,1±2	11,6±2	13,5±3
Reperfusion + 120 min	13±1	12,2±2	11,9±3	12±2
Reperfusion + 150 min	13±1	12,2±2	11,9±3	12±2
Reperfusion + 180 min	12,8±1	11,7±2	10,3±3	11,4±2
Reperfusion + 210 min	12,3±2	11,7±2	12,3±4	12,3±3
Reperfusion + 240 min	12,9±2	11,7±2	11,2±4	13,2±4

Tabelle 8.25: Rate Pressure Product (RPP, *p<0,05 vs. Prophylaxe)(MW±SD)

°Celsius	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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

Tabelle 8.26: Rektale Körpertemperatur(MW±SD)

8.2.3 Blutgasanalyse

pH	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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 8.27: pH-Wert(MW±SD)

paCO_2 (mmHg)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
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 8.28: Arterieller Kohlendioxidpartialdruck (paCO_2)(MW±SD)

paO_2 (mmHg)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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

Tabelle 8.29: Arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO_2)(MW±SD)

SaO_2 (%)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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 8.30: Arterielle Sauerstoffsättigung (SaO_2)(MW±SD)

HCO_3 (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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 8.31: Standardbikarbonat (HCO_3)(MW±SD)

SBE (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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

Tabelle 8.32: Standardbasenüberschuss (SBE)(MW±SD)

8.2.4 Elektrolyte und Blutzucker

Na^+ (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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

Tabelle 8.33: Natrium (Na+)(MW±SD)

K^+ (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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 8.34: Kalium (K+)(MW±SD)

Ca^{++} (mmol/l)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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 8.35: Ionisiertes Calcium (Ca++)(MW±SD)

BZ (mg/dl)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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

Tabelle 8.36: Blutzucker (BZ)(MW±SD)

8.2.5 Hämoglobinkonzentrationen

tHb (g/dl)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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

Tabelle 8.37: Gesamthämoglobin (tHb)(MW±SD)

HbO_2 (%)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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 8.38: Oxyhämoglobin (HbO_2,#p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD)

HbCO (%)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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 8.39: Carboxyhämoglobin (HbCO)(MW±SD)

pHb (g/dl)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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

Tabelle 8.40: Plasmatisch gelöstes Hämoglobin (pHb, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD)

MetHb (g/dl)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	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 8.41: Methämoglobin (MetHb, #p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD)

8.2.6 Flächenauswertung

	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
„Area at risk“ (% LV)	16±5	25±15	23±8	21±9
„no-reflow“ (% AR)	5±3*	35±12	34±22	26±15
Infarktgröße (% AR)	9±10*	48±17	22±20*	25±13*

Tabelle 8.42: Ergebnisse der Flächenauswertung (*p<0,05 vs. Positiv-Kontrolle)(MW±SD)(LV = Größe des linken Ventrikels, AR = „Area at risk“)

8.2.7 Arrhythmiescore nach Lambeth

MW	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Lambeth Score	0	4±1,45	3,625±1,65	3,125±1,45

Tabelle 8.43: Erzielter Arrhythmie-Score nach Lambeth C(MW±SD)

8.2.8 Dauer des Vorhofflimmerns

Dauer VF (s)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Gesamt (n=8)	0	443,16	643,95	154,03
MW±SD	0	55,4±61,25	80,49±64,06	19,25±23,99

Tabelle 8.44: Dauer des Vorhofflimmerns

Tabellenverzeichnis

2.1 Radikalentstehung nach Becker et al. [11] 21

3.1 Spezifika des in der Versuchsreihe verwendeten HBOC-200 (Oxyglobin®) . . 31
3.2 Übersicht der intraoperativen Messpunkte und der jeweiligen Parameter . . . 35
3.3 Arrhythmiescore C nach CURTIS und WALKER (VES = ventrikuläre Extrasystole; VT = ventrikuläre Tachykardie; VF = ventrikuläres Flimmern/Flattern) 46

8.1 Darstellung des Körpergewichts der Versuchstiere (MW±SD) 102
8.2 Darstellung der Herzfrequenz der Versuchstiere (MW±SD) 102
8.3 Darstellung der mittleren arteriellen Druckwerte (MW±SD) 103
8.4 Rektale Körpertemperatur (MW±SD) 103
8.5 pH-Wert (*p<0,05 vs. Negativ Kontrolle)(MW±SD) 103
8.6 Arterieller Kohlendioxidpartialdruck ($paCO_2$)(MW±SD) 104
8.7 Inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FIO_2)(MW±SD) 104
8.8 Arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO_2)(MW±SD) 104
8.9 Arterielle Sauerstoffsättigung (SaO_2)(MW±SD) 104
8.10 Standardbikarbonat (HCO_3)(MW±SD) 105
8.11 Standardbasenüberschuss (SBE)(MW±SD) 105
8.12 Natrium (Na+)(MW±SD) 105
8.13 Kalium (K+)(MW±SD) 106
8.14 Ionisiertes Calcium (Ca++, *p<0,05 vs. Negativ Kontrolle)(MW±SD) 106
8.15 Blutzucker (BZ)(MW±SD) 106
8.16 Gesamthämoglobin (tHb)(MW±SD) 107
8.17 Oxyhämoglobin (HbO_2, *p<0,05 vs. Prophylaxe)(MW±SD) 107
8.18 Carboxyhämoglobin (HbCO)(MW±SD) 107
8.19 Plasmatisch gelöstes Hämoglobin (pHb, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD) 108
8.20 Methämoglobin (MetHb)(MW±SD) 108

8.21 Ergebnisse der Flächenauswertung(MW±SD)(LV = Größe des linken Ventrikels, AR = „Area at risk“, n.a. = nicht ausgewertet) 108
8.22 Darstellung des Körpergewichts der Versuchstiere (MW±SD) 109
8.23 Darstellung der Herzfrequenz der Versuchstiere (1/min, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD) 110
8.24 Darstellung der mittleren arteriellen Druckwerte (mmHg, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD) 111
8.25 Rate Pressure Product (RPP, *p<0,05 vs. Prophylaxe)(MW±SD) 112
8.26 Rektale Körpertemperatur(MW±SD) 113
8.27 pH-Wert(MW±SD) 113
8.28 Arterieller Kohlendioxidpartialdruck (paCO_2)(MW±SD) 113
8.29 Arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO_2)(MW±SD) 114
8.30 Arterielle Sauerstoffsättigung (SaO_2)(MW±SD) 114
8.31 Standardbikarbonat (HCO_3)(MW±SD) 114
8.32 Standardbasenüberschuss (SBE)(MW±SD) 115
8.33 Natrium (Na+)(MW±SD) 115
8.34 Kalium (K+)(MW±SD) 115
8.35 Ionisiertes Calcium (Ca++)(MW±SD) 116
8.36 Blutzucker (BZ)(MW±SD) 116
8.37 Gesamthämoglobin (tHb)(MW±SD) 116
8.38 Oxyhämoglobin (HbO_2,#p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD) 117
8.39 Carboxyhämoglobin (HbCO)(MW±SD) 117
8.40 Plasmatisch gelöstes Hämoglobin (pHb, *p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD) 117
8.41 Methämoglobin (MetHb, #p<0,05 vs. Therapie)(MW±SD) 118
8.42 Ergebnisse der Flächenauswertung (*p<0,05 vs. Positiv-Kontrolle)(MW±SD)(LV = Größe des linken Ventrikels, AR = „Area at risk“) 118
8.43 Erzielter Arrhythmie-Score nach Lambeth C(MW±SD) 118
8.44 Dauer des Vorhofflimmerns 118

Abbildungsverzeichnis

2.1 Übersicht über den Separations- und Purifikationsprozess von modernen zellfreien Hämoglobinlösungen (aus [185]) 12

2.2 Schematische Darstellung der Modifikationen von Hämoglobinmolekülen zur Verminderung toxischer Nebenwirkungen sowie zur Verlängerung der intravasalen Halbwertszeit (HWZ) (aus [185]) 13

2.3 Schematischer Überblick über die verschiedenen, das „no-reflow“-Phänomen auslösenden Faktoren (aus Reffelmann/Kloner[152]) 19

2.4 Pathophysiologie der Kapillargefäßdysfunktion nach ROE et al. [161] 24

3.1 Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion mit HBOC-200, Schema des Versuchsablaufs 30

3.2 a und b: Durchführung des Herzstiches im Bereich des ersten Astes der Arteria circumflexa der linken Koronararterie 33

3.3 Situs nach Einführen des Katheters in das linke Herzohr 34

3.4 Zuzug der Koronararterie, sichtbar wird ein Abblassen der distal der Okklusion gelegenen Areale des linken Ventrikels 36

3.5 Darstellung des Herzens nach erneuter Anlage der Koronarokklusion und Injektion von Patentblau 2%. Die weiter perfundierten Areale stellen sich blau gefärbt dar, während die ischämischen Areale nicht angefärbt werden. 37

3.6 Darstellung der Färbung mit Thioflavin-S 4%. Die dunkel gefärbten Areale stellen die „no-reflow“-Areale dar. 41

3.7 „Area at risk“. Die „area at risk“ stellt sich als durch Thioflavin nicht angefärbtes, rötliches Areal dar. 42

3.8 Infarktareale. Die Infarktareale stellen sich in der Abbildung durch Anfärbung mit TTC weiß dar. 43

3.9 Schematische Darstellung der verschiedenen Auswertungsareale zur Quantifizierung des myokardialen Infarktareals nach Anfärbung mittels Patentblau und Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid. Abb. a: Es ist ein basisparalleler Querschnitt des Herzens mit den Lumina des linken (LV) und rechten (RV) Ventrikels dargestellt. Zusätzlich zeigt sich nach „in vivo“-Anfärbung mit Patentblau bei erneut angelegter Koronarligatur die „area at risk“ (hellgrau). Abb. b: Nach Inkubation mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid stellt sich das Infarktareal als ungefärbtes Teilareal der nun kräftig roten „area at risk“ dar. 44

3.10 Es wurden nun die Absolutwerte der unterschiedlichen Flächen planimetrisch ermittelt und zueinander in Bezug gesetzt. Die Fläche des Ventrikellumens wurde bei allen Berechnungen ausgespart. Abb. c: Verhältnis der „area at risk“ zur Fläche des linken Ventrikels. Abb. d: Verhältnis des Infarktareals an der Fläche des linken Ventrikels. Abb. e: Verhältnis des Infarktareals an der „area at risk“ 44

4.1 Zeitlicher Verlauf der Herzfrequenz. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2 48

4.2 Zeitlicher Verlauf des Mittleren arteriellen Blutdruckes. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2 49

4.3 „Area at risk“ in Relation zur Fläche des linken Ventrikels (MW±SD) 51

4.4 „No-reflow“-Areale im Verhältnis zur „area at risk“ (MW±SD) 52

4.5 Zeitlicher Verlauf der Herzfrequenz. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2 (*p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie) 53

4.6 Zeitlicher Verlauf des mittleren arteriellen Blutdruckes. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2 (*p<0,05 vs. Prophylaxe, #p<0,05 vs. Therapie) 54

4.7 Zeitlicher Verlauf des Rate-Pressure-Products. Erklärung der Messzeitpunkte siehe Tabelle 3.2 (*p<0,05 vs. Prophylaxe) 55

4.8 „Area at risk“ in Relation zur Fläche des linken Ventrikels (MW±SD) 57

4.9 „No-reflow“-Areale im Verhältnis zur „area at risk“ (MW±SD, *p<0,05 vs. Positiv-Kontrolle) 58

4.10 Größe der Infarktareale in Relation zur Größe der „area at risk“ (*p<0,05 vs. Positiv-Kontrollgruppe) 59

4.11 Absolute Größe in cm^2 der Infarktareale der einzelnen Tiere in Relation zur Größe der „area at risk“. 60

4.12 Erzielter Arrhythmie-Score nach Lambeth C 61

4.13 Dauer des Vorhofflimmerns 62

5.1 Querschnitt durch eine Kapillare aus der Niere. Dargestellt sind 2 Erythrozyten, die von plasmatisch gelösten Hämoglobinmolekülen umgeben sind [187] . 70

8.3 Abkürzungsverzeichnis

ANOVA	Analysis of Variance
AP	Alkalische Phosphatase
AR	„Area at risk“
$avDO_2$	arteriovenöse Sauerstoffdifferenz
BAGS	Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales
BGA	Blutgasanalyse
BZ	Blutglukosekonzentration
Ca^{++}	ionisiertes Calcium
COHb	Carboxyhämoglobin
DCLHb	Diaspirin Cross-linked Hemoglobin
EDRF	Endothelin Derived Relaxing Factor
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
KHK	Koronare Herzkrankheit
KOD	Kolloidosmotischer Druck
LAD	Left anterior Descendend = Ramus interventrikularis anterior
LV	linker Ventrikel
MAP	Mittlerer Arterieller Druck
MetHb	Methämoglobin
MGW	Molekulargewicht
MPS	Makrozytär-Phagozytäres System
MW	Mittelwert

n.a.	nicht ausgewertet
Na^+	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
NO	Stickstoffmonoxid
p	Alphafehler
P	Partialdruck
$PaCO_2$	Arterieller Kohlendioxidpartialdruck
PAF	platelet-activating-factor
PaO_2	Arterieller Sauerstoffpartialdruck
PAP	Pulmonalarterieller Druck
PDGF	Platelet-Derived-Growth-Factor
PFC	Perfluorocarbone
pHb	plasmatisch gelöstes Hämoglobin
P_{50}	Halbsättigungspartialdruck des Hämoglobins
PTCA	Percutane Transluminäre Coronare Angioplastie
PVR	Pulmonal Vaskulärer Widerstand
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
TIMI	Thrombolysis In Myocardial Infarction
tpO_2	Gewebesauerstoffpartialdruck
TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid
VES	Ventrikuläre Extrasystole
VF	Ventrikuläres Flimmern
VT	Ventrikuläre Tachykardie
ZVD	Zentralvenöser Druck
ZVK	Zentralvenöser Katheter

8.4 Übersicht der laborchemischen Parameter

Gemessene Parameter	**Berechnete Parameter**
pH	SBC
$PaCO_2$	SBE
PaO_2	
K^+	
Na^+	
Ca^{++}	
SaO_2	
HbO_2	
pHb	
tHb	
MetHb	
COHb	
BZ	

9 Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt dem emeritierten Direktor der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Jochen Schulte am Esch für die Möglichkeit, meine Dissertation unter hervorragenden wissenschaftlichen Bedingungen an seiner Klinik erarbeiten und schreiben zu können.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Thomas Standl möchte ich an dieser Stelle einen besonderen Dank für die Überlassung des Themas und die fortwährende freundliche und intensive Unterstützung aussprechen.

Herrn PD Dr. André Gottschalk möchte ich herzlich für die engagierte Unterstützung während der experimentellen Phase und der Erstellung sowie für die Durchsicht dieser Dissertationsschrift danken.

Ein spezieller Dank gilt Herrn Dr. Christian Rempf für seine unschätzbare Unterstützung in jedem Abschnitt dieses Projektes. Die enge Zusammenarbeit im experimentellen Labor, der freundliche Umgang, die Hilfe bei der Literatursuche und schlussendlich die mehrfache Durchsicht dieses Manuskriptes haben zur Fertigstellung einen immensen Beitrag geleistet.

Danken möchte ich weiterhin Herrn Karim Chammas für die angenehme und erfolgreiche Zusammenarbeit während der Tierversuche.

Den Mitarbeitern des Labors, der leitenden MTA Frau Monika Weber und Frau Sonja Schuppart möchte ich für die freundliche Aufnahme und erfolgreiche Kooperation einen ganz besonderen Dank aussprechen.

Danken möchte ich von Herzen meinen Eltern, die mich während meiner gesamten Ausbildung stets unterstützt haben und mir in jeder Hinsicht fürsorglich zur Seite standen. Meiner Mutter Frau Renate Dirks gebührt ein großer Dank für die orthographische Durchsicht. Meiner Freundin Anne-Kathrin Matouschek möchte ich für ihre Liebe und Unterstützung bei der Erstellung dieser Dissertation danken.

10 Lebenslauf

Name:	Karsten Schenke
Anschrift:	Dorotheenstr. 101
	22301 Hamburg
Geburtsdatum:	13. November 1976
Geburtsort:	Hannover
eMail:	KaSchenke@web.de

Akademische Ausbildung

Studium	
seit 1999	Universität Hamburg, Studium der Humanmedizin
30. März 2001	Physikum
29. August 2002	Erstes Staatsexamen
15. März 2005	Zweites Staatsexamen
23. Mai 2006	Drittes Staatsexamen
21. Juni 2006	Erteilung der Approbation als Arzt
1997-1998	Universität Oldenburg
	Studium der Betriebswirtschaft
Schule	
1993–1996	Schulzentrum Mitte in Bremerhaven
	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
1983–1993	Pestalozzischule Bremerhaven
	Grundschule und Gymnasium

Berufserfahrung und -ausbildung

seit 01.08.2006	Assistenzarzt
	Asklepios Klinik Altona
	III. Medizinische Abteilung
	Chefarzt Prof. Dr. Dipl-Ing. K. v. Olshausen
2003–2006	DRK Kreis Stormarn als Rettungsassistent
2001–2002	Rettungsdienstschule in Werdau
	Ausbildung zum Rettungsassistenten
1999–2003	DRK Ambulanzdienst HH-Harburg als
	Rettungssanitäter/Rettungsassistent
1998–1999	Rettungssanitäter beim DRK für den
	Rettungsdienst in Bremerhaven
1996–1997	Zivildienst im Rettungsdienst
	der Stadt Bremerhaven beim DRK

Hamburg, 28. Juni 2007

11 Eidesstattliche Erklärung

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.