

Universität Hamburg
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Klinik und Poliklinik für Allgemein-, Viszeral- und Thoraxchirurgie
Direktor: Prof. Dr. med. J. R. Izbicki

Dissertation

**Effekte der therapeutischen Gabe der zellfreien Hämoglobinlösung
HBOC-301 (Oxyglobin™) auf das Überleben, die Mikrozirkulation und den
Gewebeschaden ohne isovolämische Hämodilution bei akuter schwerer
Pankreatitis im Großtiermodell**

zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin
dem Fachbereich Medizin der Universität Hamburg
vorgelegt von

Hendrik Lohalm

aus Nordenham

Hamburg, Mai 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 8. Februar 2011

Veröffentlicht mit der Genehmigung der Medizinischen
Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, Vorsitzende/r: PD Dr. med. Oliver Mann

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. med. Jens Aberle

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. med. Peter Kühnl

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	6
	1.1 Fragestellung	8
2	Material und Methoden	9
	2.1 Tierschutz	9
	2.2 Versuchstiere	9
	2.3 Anästhesie	10
	2.4 Präparation der Halsgefäße	11
	2.5 Laparotomie und Präparation	13
	2.6 Gemessene und errechnete Parameter	14
	2.6.1 Hämodynamische Parameter	14
	2.6.2 Laborparameter	15
	2.6.3 Errechnete Parameter	15
	2.7 Induktion der akuten Pankreatitis	16
	2.8 Randomisierung und Gruppeneinteilung	17
	2.9 Therapie	17
	2.10 Messungen	18
	2.10.1 Schematische Darstellung des Versuchaufbaus	19
	2.11 Verschluss des Halses und des Bauchs	20
	2.12 Postoperative Versorgung	20
	2.13 Sakrifizierung und Probenentnahme	20
	2.14 Histopathologische Aufarbeitung der Präparate	21
	2.14.1 Beurteilung des histologischen Gewebeschadens	21
	2.14.2 Histologie Score zur Beschreibung von Gewebeschäden des Schweinepankreas bei akuter Pankreatitis in Überlebensversuchen	22
	2.15 Messung der pankreatischen Mikrozirkulation	23
	2.16 Therapeutika	25
	2.16.1 Hemoglobin-based Oxygen Carriers (HBOC–301)	25
	2.16.2 Hydroxyethylstärke	28
	2.17 Statistische Methoden	28

3	Ergebnisse	30
3.1	Überleben	30
3.2	Mikrozirkulation	31
3.3	Histologie	32
3.4	Gewebssauerstoffpartialdruck (tpO ₂) des Pankreas	34
3.5	Hämodynamische Parameter	36
3.5.1	Herzfrequenz	36
3.5.2	Mittlerer arterieller Druck (MAP)	37
3.5.3	Mittlerer pulmonalarterieller Druck (PAP)	38
3.5.4	Cardiac Output (CO)	39
3.5.5	Cardiac Index (CI)	41
3.5.6	Systemischer Widerstand (SVR)	42
3.5.7	Pulmonaler Widerstand (PVR)	43
3.6	Sauerstofftransport	44
3.6.1	Arterieller Sauerstoffgehalt (CaO ₂)	44
3.6.2	Gemischt-venöser Sauerstoffgehalt (CvO ₂)	45
3.6.3	Arteriovenöse Sauerstoffdifferenz (avDO ₂)	46
3.6.4	Sauerstoffangebot (DO ₂)	47
3.6.5	Sauerstoffverbrauch (VO ₂)	48
3.6.7	Sauerstoffextraktion (ERO ₂)	49
3.7	Hämoglobingehalt (Hb) per Blutgasanalyse	50
3.8	Laborchemische Parameter	51
3.8.1	Rheologie – Viskosität	51
3.8.2	Rheologie - Kolloidosmotischer Druck (KOD)	52
3.9	Elektrolyte	53
4	Diskussion	54
4.1	Methodenkritik	54
4.1.1	Pankreatitismodell	54
4.1.2	Meßmethoden	55
4.1.3	Meßsubstanzen	57
4.2	Diskussion der Ergebnisse	59
4.2.1	Überleben	59
4.2.2	Mikrozirkulation	60

4.2.3	Histologie	62
4.3	Begleiteffekte in der Anwendung von HBOC	63
4.3.1	Met-Hämoglobin	64
4.3.2	Immunogenität bzw. Immunsuppression	64
4.3.3	Nephrotoxizität	66
4.4	Klinische Therapiestrategien bei akuter schwerer Pankreatitis	66
4.5	Experimentelle Therapiestrategien bei schwerer akuter Pankreatitis	69
4.6	Ausblick für HBOC in der Behandlung der akuten Pankreatitis	70
5	Zusammenfassung	71
6	Literaturverzeichnis	73
7	Danksagung	86
8	Lebenslauf	87
9	Eidesstattliche Erklärung	88

1 Einleitung

Die Inzidenz der akuten Pankreatitis beträgt etwa 5 bis 80 Neuerkrankungen pro 100.000 Einwohner [88;89]. Es gibt keine saisonalen oder tageszeitlichen Steigerungen der Inzidenz [75] und der Ausgang ist unabhängig vom Geschlecht [74].

Exzessiver Alkoholkonsum zeigt sich zusammen mit dem Gallensteinleiden für 80% der Erkrankungen verantwortlich [52;76;89], wobei es durch steigenden Alkoholkonsum zu einem allmählichen Überwiegen der alkoholischen Genese gekommen ist [15;119]. Weitere Ursachen können obstruktive Erkrankungen von Ductus pancreaticus major, Ductus pancreaticus minor oder der Papilla vateri, Autoimmunreaktionen, Erkrankungen des Duodenums, medikamentös-toxische Faktoren, Drogen oder endogene metabolische Erkrankungen wie Hyperparathyreodismus oder Hyperlipidämie sein.

Bei der akuten Pankreatitis werden 2 Verlaufsformen unterschieden. Während die milde, ödematöse Pankreatitis in der Regel zu einer restitutio ad integrum führt, verläuft die schwere als hämorrhagisch-nekrotisierende Entzündung mit pankreatischer und peripankreatischer Gewebsdestruktion. Häufig kommt es dabei zu schwerwiegenden lokalen und systemischen Komplikationen, wobei 10 – 30% der Fälle einen letalen Ausgang haben [11;89;138]. Typische lokale Komplikationen sind die Bildung von Pankreaspseudozysten oder Pankreasabszessen. Systemisch sind insbesondere respiratorische Insuffizienz, akutes Nierenversagen und Sepsis von Bedeutung.

Der Verlauf nach Induktion der akuten Pankreatitis folgt einem vergleichbaren Schema unabhängig von der jeweiligen Noxe. Es kommt nicht physiologischerweise im Darmlumen zur Proteolyse von Trypsinogen zu Trypsin durch eine in der Mucosa intestinalis produzierten Enteropeptidase, sondern im Pankreas zu einer Translokation von Trypsinogen in Vakuolen, in denen sich die lysosomale Hydrolase Cathepsin B befindet, welches das Proenzym zu Trypsin aktiviert [67;80], so dass es zur Autodigestion kommt. Sauerstoffradikale [152] und durch den Azinuszellschaden freigesetzte

proinflammatorischen Cytokine TNF- α , IL-6 und PAF bewirken eine Chemotaxis der Leukozyten, die wiederum zusammen mit den vasoaktiven Mediatoren NO und Endothelin zur vasculären Endothelaktivierung führt, die eine Verschlechterung der Mikrozirkulation nach sich zieht, die zum Untergang von Pankreasgewebe führt, welches der entscheidende Schritt beim Übergang der milden, ödematösen Form in die schwere, nekrotisierende ist. Die entstehenden Pankreasnekrosen dienen aus dem Intestinaltrakt translozierten Bakterien als Replikationsort, wodurch die systemische Inflammation unterhalten wird und wesentlich zur Sepsis und zum Multiorganversagen beiträgt [37].

Trotz großer intensivmedizinischer Fortschritte gibt es derzeit noch keine kausale Therapie der akuten nekrotisierenden Pankreatitis, sondern es erfolgt ausschließlich eine Reaktion auf die durch die Erkrankung hervorgerufenen Komplikationen. Entscheidend ist der Übergang von der ödematösen Form der Pankreatitis in die nekrotisierende. Da die Initiale Enzymaktivierung und Cytokinfreisetzung bereits irreversibel abgelaufen ist, wenn sich die betroffenen Patienten in der Klinik vorstellen [60], und die Mikrozirkulationsstörung zum Fortschreiten der Erkrankung führt, stellt die Beeinflussung der Mikrozirkulation einen Ansatz in der Therapie der nekrotisierenden Pankreatitis dar [146].

Eine therapeutisch geeignete Substanz müsste somit sowohl die Blutrheologie verbessern, als auch einen optimierten Sauerstofftransport in ischämischem Gewebe ermöglichen. Die ultragereinigte bovine Hämoglobinlösung HBOC-301 (Hemoglobin Based Oxygen Carrier; Oxyglobin[®] Biopure, Boston, USA) gewährleistet eine Verbesserung der Rheologie und einen plasmatischen Sauerstofftransport in Gewebearrealen, in denen der zelluläre Sauerstofftransport nahezu vollständig zum Erliegen gekommen ist. Dieser Effekt, auch minderperfundierte Bereiche (95% Stenose) ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen, wurde bereits in umfangreichen Tierstudien nachgewiesen [39;57;127;131;132].

In vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe um Prof. T. Strate, PD Dr. M. Freitag und PD Dr. O. Mann [41;133] konnte bereits die Verbesserung der Mikrozirkulation des porcinen Pankreas bei hämorrhagisch-nekrotisierender Pankreatitis durch eine ultragereinigte Hämoglobinlösung und zusätzlicher isovolämischer Hämodilution nachgewiesen werden. Bei der normovolämischen Hämodilution ist der Effekt der Rheologieverbesserung ein zusätzliches Supportivum der Eigenschaften des HBOC-301. Sollte beim Patienten allerdings z.B. eine Anämie, kardiale Erkrankungen wie eine Koronare Herzkrankheit oder eine hochgradige Aortenklappenstenose, Blutgerinnungsstörungen oder eine Hypovolämie bestehen, darf eine Hämodilution nicht durchgeführt werden. Zu dem bedarf es eines hohen logistischen Aufwandes, eine isovolämische Hämodilution durchzuführen.

1.1 Fragestellung

Durch die folgende Studie sollen folgende Fragen beantwortet werden:

- Welchen Einfluss hat die ultragereinigte bovine Hämoglobinlösung HBOC-301 auf die Mikrozirkulation des Pankreas bei hämorrhagisch-nekrotisierender Pankreatitis ohne Einsatz von isovolämischer Hämodilution im Schweinemodell?
- Erreicht man durch alleinigen Einsatz von HBOC-301 ohne isovolämische Hämodilution einen geringeren histologischen Schaden als in den Vergleichsgruppen?
- Gibt es durch eine Therapie mit HBOC-301 ohne isovolämische Hämodilution einen Überlebensvorteil im Vergleich zu den Kontrollgruppen?

2 Material und Methoden

2.1 Tierschutz

Die tierexperimentellen Untersuchungen dieser Versuchsreihe wurden entsprechend dem „Guide for the Care and Use of Laboratory Animals“ von 1996 des National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources, Commission on Life Science, durchgeführt. Die Genehmigung für diese Versuche erfolgte durch die Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales der Freien und Hansestadt Hamburg (Antragsnummer: 34/03).

2.2 Versuchstiere

Für die Untersuchung wurden 39 Schweine aus dem Deutschen Hybrid-Zuchtprogramm (Züchtungszentrale Deutsches Hybridschwein GmbH) mit einem Körpergewicht von 25-30 kg verwendet. Die Tiere wurden artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in Gruppen von bis zu fünf Tieren in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten und der Gesundheitszustand der Tiere veterinärmedizinisch überwacht. Die Ernährung bestand aus nährstoff- und vitaminbilanzierendem Futter für Schweine (Standarddiät für Schweine, Versuchstierhaltung UKE). Vor dem Versuchsbeginn wurde ein 36-stündiges Fasten der Tiere bei freiem Zugang zu Wasser und 20%iger Glukoselösung bis 12 Stunden vor Operationsbeginn sichergestellt. Die Nüchternphase diente der Verbesserung der Präparationsbedingungen und sollte standardisierte Ausgangsbedingungen der Pankreasstimulation durch die Nahrung gewährleisten.

2.3 Anästhesie

Am Versuchstag wurden die Tiere zunächst gewogen, von Schnauze bis zum Schwanzansatz bauchseitig gemessen und anschließend mittels intramuskulärer Injektion von 10 mg/kg KG Ketamin (Ketanest[®], Atarost GmbH, Twistingen), 4 mg/kg KG Azaperon (Stresnil[®], Janssen-Cilag, Neuss) und 0,015mg/kg KG Atropinsulfat (Atropin[®], B. Braun, Melsungen) prämediziert. Nach der Überführung in der Operationssaal wurde das Tier auf dem Rücken fixiert, und es wurden EKG-Elektroden zur Überwachung der Herzaktivität am Rumpf und ein Sensor zur pulsoxymetrischen Messung der O₂-Sättigung (Marquette[®], Milwaukee, USA) am linken Ohr platziert. Nach der Präoxygenierung mit 100% Sauerstoff erfolgte über eine Venenverweilkanüle (Vasofix 1,1 mm, B. Braun, Melsungen) im rechten Ohr die Einleitung der Narkose mittels intravenöser Injektion von 0,5 mg/kg KG Midazolam (Dormicum[®], Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen), 0,05 mg/kg KG Fentanyl (Fentanyl-Janssen[®], Janssen-Cilag, Neuss) und 1mg/kg KG Pancuronium (Pantolax). Nach der endotrachealen Intubation (Tubusgröße 6,0-7,0 Ch) wurde das Tier permanent mechanisch ventiliert (Romulus 800, Dräger, Lübeck). Die Narkose wurde mittels Isofluran (MAC 1-1,5) (Forene[®], Abbott, Wiesbaden) und kontinuierlicher intravenöser Injektion von 0,05 mg/kg KG/h Fentanyl (Fentanyl-Janssen[®], Janssen-Cilag, Neuss) per Perfusor (PerfusorSecua[®], Braun, Melsungen) für die Versuchsdauer am Operationstag balanciert aufrechterhalten. Der FiO₂ blieb dabei konstant bei 0,3. Der endexpiratorische pCO₂ wurde konstant bei 35-40 mmHg gehalten (Normocap CO₂ Monitor, Datex, Helsinki).

Eine Magensonde mit angeschlossenem Beutel entlastete den Magen.

Die Operationsgebiete wurden rasiert, anschließend eine Hautdesinfektion mittels Cutasept[®] (Bodechemie, Hamburg) und eine sterile Abdeckung durchgeführt.

Während der gesamten Versuchsdauer wurde strikt auf die Aufrechterhaltung der Körpertemperatur bei 38°C (± 0,5°C) geachtet. Diese wurde durch Anwärmung der Infusionslösungen, Verwendung von Wärmelampen und Wärmedecken (Bair Hugger, Augustine Medical, Inc., Eden Prairie, Stufe IV,

41°C) sowie einer mittels Klimaanlage konstant gehaltenen Raumtemperatur von ca. 30°C gewährleistet.



Abbildung 2.1: Abgeschlossene Vorbereitungen vor den operativen Maßnahmen

2.4 Präparation der Halsgefäße

Es wurde rechtsseitig ein Hautschnitt von ca. 8cm Länge im Verlauf des M. sternocleidomastoideus gesetzt. Nach Durchtrennung des Platysmas erfolgte die Darstellung und Umschlingung der Vv. jugulares externa und interna und der A. carotis communis. Zunächst wurde die A. carotis communis retrograd kanüliert und anschließend mittels Seldingertechnik ein Arterienkatheter (Vygon Leader Cath 18 G., 10 cm, B. Braun, Melsungen) gelegt, der an der Haut fixiert wurde. Der Arterienkatheter wurde mit dem Druckaufnehmersystem, dann mit dem Monitor (Solar 7000, Maquette, Milwaukee, USA) konnektiert, worüber kontinuierlich der arterielle Mitteldruck

(MAP) kontrolliert wurde. Außerdem wurde zu den Messpunkten Blut für Blutgasanalysen (BGA) und laborchemische Parameter entnommen. Die V. jugularis interna wurde fischmaulartig eingeschnitten und eine Schleuse mit Ventil (8 F, Dispomedia, Hamburg) gelegt. Das kraniale Gefäßende wurde ligiert, die Schleuse mit einer Naht an der Haut fixiert. Über die Schleuse wurde mittels Einschwemmtechnik ein Thermodilutionskatheter (7 F, 110 cm, 4 LG, Baxter Deutschland, München), der zuvor über das Druckaufnehmersystem mit dem Monitor verbunden und geeicht wurde, eingebracht, so dass das Katheterende in der A. pulmonalis liegt. Bei Aufblasen des Ballons stellte sich die typische Kurve des Pulmonalen Kapillären Wedge Druckes (PCWP), bei Entblockung die Kurve des Pulmonal Arteriellen Druckes (PAP) dar, womit die korrekte Lage des Katheters bestimmt wurde. Mittels Thermodilutionskatheter erfolgte eine kontinuierliche Registrierung des PAP und des zentralen Venendruckes (ZVD) sowie zu den Messpunkten die Bestimmung des PCWP und die Blutentnahme für eine gemischt-venöse Blutgasanalyse. Außerdem wurde das Herzzeitvolumen (CO) mittels Thermodilution bestimmt, wobei aus vier Einzelmessungen mit 10 ml auf 4°C gekühlte NaCl-Lösung am Ende der Inspiration der Mittelwert des jeweiligen Messzeitpunktes berechnet wurde. Messwerte, die mehr als 10% vom Mittelwert abwichen, wurden verworfen und wiederholt. Danach erfolgte ebenfalls nach einem Fischmauleinschnitt in die Gefäßwand die Platzierung eines Shaldon-Katheters (12 F, Certofix Trio SB 1225, B. Braun, Melsungen) und eines Zentralen Venenkatheters (14 G. Cavafix Certo 335, B. Braun, Melsungen) in der V. jugularis externa. Das kraniale Gefäßende wurde ligiert. Der Shaldon-Katheter diente zur Volumensubstitution mit Ringer Infusionslösung (Böhringer, Ingelheim) und zur Blutentnahme zu den Messpunkten. Dabei wurde der PCWP als Bezugsgröße des Flüssigkeitsstatus zwischen 8-10 mmHg konstant gehalten.

Alle Drucksysteme wurden kontinuierlich mit 0,9% Kochsalzlösung perfundiert und vor jedem Messpunkt gegen einen Referenzwert (rechter Vorhof) auf 0 kalibriert.

Danach wurden die Katheter an der Haut fixiert, das Wundgebiet gereinigt und die Haut provisorisch verschlossen.

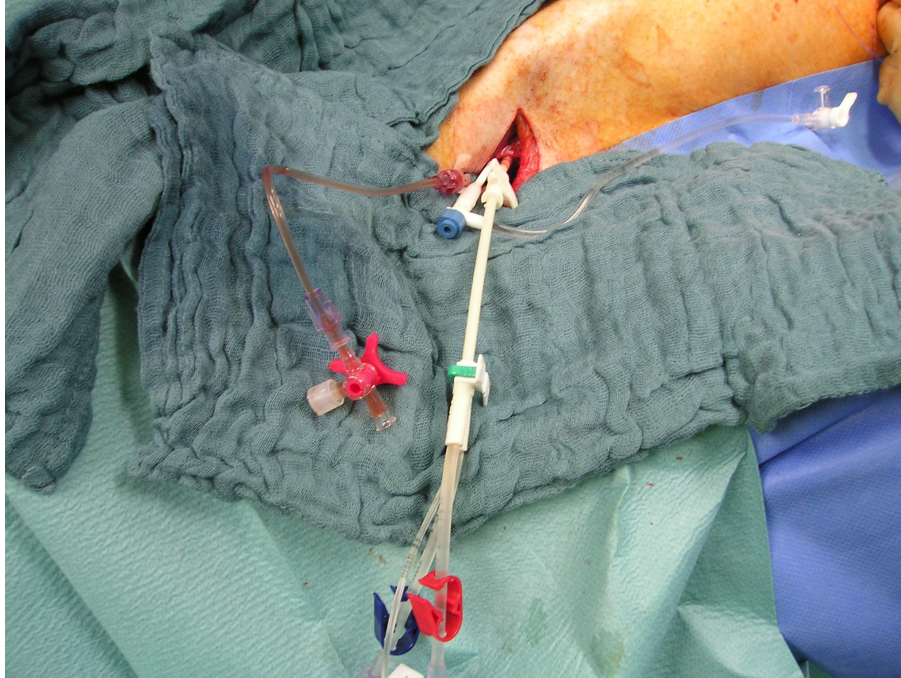


Abbildung 2.2: Präparation der Halsgefäße: Arterienkatheter (links), Schleuse mit Ventil (Mitte), Shaldon-Katheter (rechts)

2.5 Laparotomie und Präparation

Es erfolgte eine querverlaufende Oberbauchlaparotomie zwischen der zweiten und dritten Zitze. Damit ein Blut-Pooling vermieden wird, wurde die Milz entfernt. Anschließend wurde nach Anlegen einer Tabaksbeutelnaht in die Blasenvorderwand diese stichartig eingeschnitten und ein Absaugkatheter (16 Ch) in die Blase eingebracht, über den der Urin in einen Urinbeutel abließ. Es wurde nun das Duodenum und das Pankreas aufgesucht. Mit einer Venenverweilkanüle (Vasofix 0,8 mm, B. Braun, Melsungen) wurde der Ductus pancreaticus an dem Übergang zum Duodenum kanüliert. Nach Einbringen der Kanüle wurde das duodenale C und der Pankreaskopf mit Enbucrilat Gewebekleber (Histoacryl®, Braun, Melsungen) und einer Naht auf einem Hakensystem fixiert, wodurch die spätere Mikrozirkulationsmessung erheblich erleichtert wurde. Um den Flüssigkeitsverlust zu minimieren, wurde das Abdomen provisorisch mit Klemmen verschlossen. Daran schloss sich eine dreißigminütige Äquilibrationsphase an, der der Messpunkt 0 folgte.

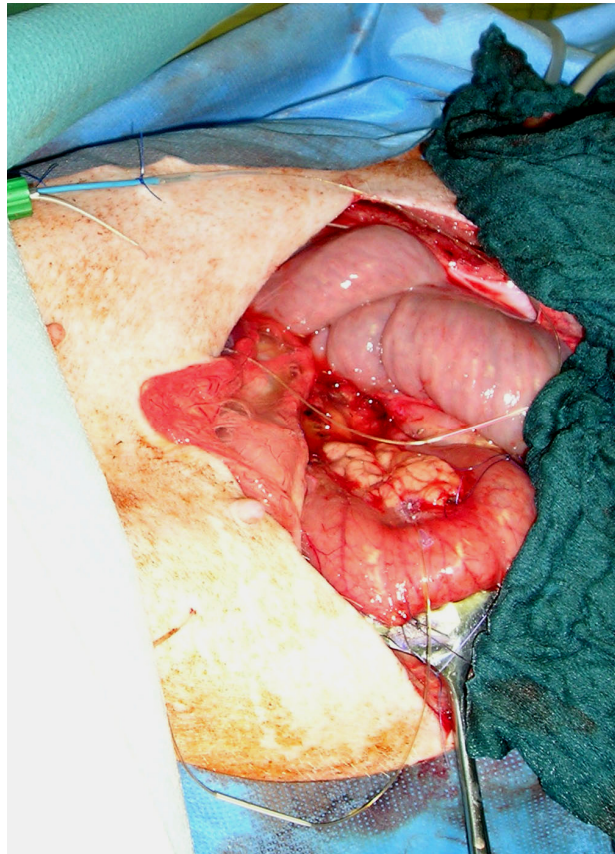


Abbildung 2.3: Pankreas und Duodenum auf Hakensystem fixiert

2.6 Gemessene und errechnete Parameter

2.6.1 Hämodynamische Parameter

- Herzfrequenz (HF) [min^{-1}]
- Mittlerer arterieller Druck (MAP) [mmHg]
- Mittlerer pulmonal arterieller Druck (PAP) [mmHg]
- Zentraler Venendruck (ZVD) [mmHg]
- Pulmonal arterieller Wedge Druck (PCWP) [mmHg]
- Cardiac Output (CO) [$\text{l}\cdot\text{min}^{-1}$]

Die hämodynamischen Parameter wurden kontinuierlich mit Hilfe eines Computerprogramms (Solar 2000 Data Logger Version 1.0) aufgezeichnet.

2.6.2 Laborparameter

- Blutgasanalysen (arteriell und gemischt-venös): pH-Wert, pO_2 [mmHg], pCO_2 [mmHg], Basenüberschuß (BE) [mmol·l⁻¹], Standard-Bicarbonat (SB) [mmol·l⁻¹] mittels ABL 505 (Radiometer, Copenhagen)
- Hämatokrit (Hkt) [Vol%] nach 5 min Zentrifugation von arteriellem Blut (Haemofuge A, Heraeus Sepatech, FRG)
- Arteriell Gesamt-Hämoglobin (t-Hb) [g·dl⁻¹] mittels OSM 3 (Radiometer, Copenhagen) ,
- Arteriell freies Hämoglobin (f-Hb) [g·dl⁻¹] nach 5 min Zentrifugation (Biofuge 17 RS, Heraeus Sepatech, FRG) im Serum mittels OSM 3 (Radiometer, Copenhagen)
- Hb im Urin (u-Hb) [g·dl⁻¹] mittels OSM 3 (Radiometer, Copenhagen)
- Arterieller [CaO₂] und gemischt-venöse [Cv-O₂] O₂-Gehalt mittels OSM 3 (Radiometer, Copenhagen)
- Elektrolyte: Na⁺ [mmol·l⁻¹], K⁺ [mmol·l⁻¹], ionisiertes Calcium [mmol·l⁻¹] und Glucose mittels ABL 505 (Radiometer, Copenhagen)
- Arteriell Laktat [mg/dl] mittels ABL 505 (Radiometer, Copenhagen)
- Kolloidosmotischer Druck (KOD) [mmHg] mittels Onkometer BMT 851 (Thomae, Biberach)
- Plasmaviskosität η (Vis) [mPa·s] mittels Rheomat (Fresenius, Oberursel)
- Temperatur [°C] (A. pulmonalis, Pankreas)

2.6.3 Errechnete Parameter

- Cardiac Index (CI) = CO/Körperoberfläche [l·min⁻¹·m⁻²]
- Systemischer Gefäßwiderstand (SVR) = $\frac{MAP - ZVD}{CO} \times 80$ [dyn·s·cm⁻⁵]
- Pulmonaler Gefäßwiderstand (PVR) = $\frac{PAP - PAOP}{CO} \times 80$ [dyn·s·cm⁻⁵]
- Arterio-venöse Sauerstoffdifferenz (avDO₂) = CaO₂ – CvO₂ [ml·dl⁻¹]
- Sauerstoffangebot (DO₂) = CO x CaO₂ [ml·min⁻¹]

- Sauerstoffverbrauch (VO_2) = $CO \times AvDO_2$ [$ml \cdot min^{-1}$]
- Sauerstoffextraktion (ERO_2) = VO_2/DO_2 [%]

2.7 Induktion der akuten Pankreatitis

Nach Abschluss des Messpunktes 0 wurde eine Perfusorleitung an die im Ductus pancreaticus befindliche Verweilkanüle angeschlossen, über die mit einem konstantem Druck, der 25 mmHg nicht überschritt, per Präzisionsperfusor (Braun, Melsungen) über 10 min 0,4 ml/kg KG Glykodeoxycholsäure (GDOC) (10mmol/l, ph 8, Sigma, Steinheim) injiziert wurde. Zeitgleich wurde intravenös Cerulein (5 μ g/kg KG/h, Takus[®] Pharmacia & Upjohn, Erlangen) zur Hyperstimulation der exokrinen Funktion des Pankreas über eine Stunde verabreicht. Die Verabreichung der Gallensäure und des Ceruleins definierte den Beginn der Pankreatitis [115]. Nach einer 15-minütigen Äquilibrationsphase erfolgte der Messpunkt 1 und 60 Minuten darauf der Messpunkt 2. Die Kanüle wurde danach aus dem Pankreasgang entfernt und der Defekt verschlossen.

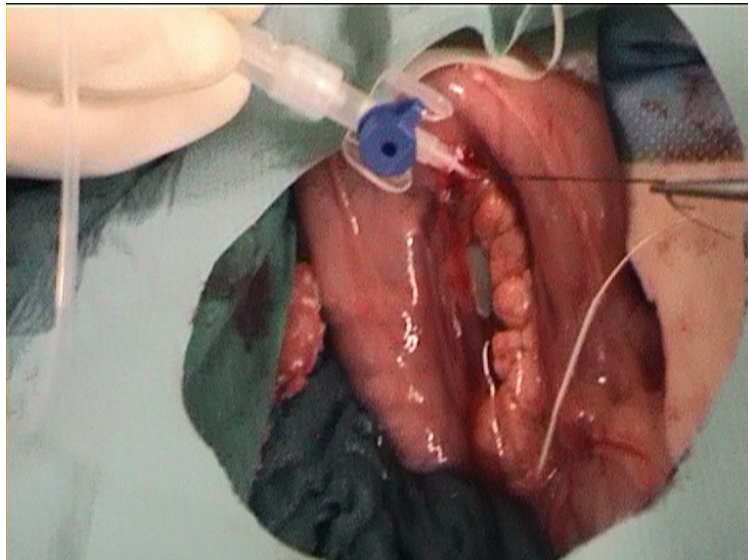


Abbildung 2.4: Präpariertes Pankreas nach Kanülierung des Ductus pancreaticus

2.8 Randomisierung und Gruppeneinteilung

Nach 15minütiger Äquilibration wurde Messpunkt 1 durchgeführt, nach weiteren 60 Minuten folgte der Messpunkt 2. Nach Entfernung der Verweilkanüle aus dem Pankreasgang und Deckung des Defektes schloss sich die Therapie an, die nach einer computergenerierten Randomisierungsliste (SPSS 11.0/SPSS Inc., Chicago, IL, USA) die Tiere 3 Gruppen (n = 13) zuteilte.

Gruppe	Anzahl	Therapieform	Therapiebeginn
1	13	HBOC-301 und HES	75 Minuten nach Induktion
2	13	HES	75 Minuten nach Induktion
3	13	Ringer-Lösung	75 Minuten nach Induktion

2.9 Therapie

Gruppe 1 erhielt eine Lösung aus ultragereinigtem, polymerisiertem Rinderhämoglobin (hemoglobin based oxygen carrier, HBOC-301, Biopure).

Die Dosis berechnete sich nach folgender Formel:

$$\text{HBOC-301 [ml]} = \text{Körpergewicht [kg]} \cdot 0,6 / 0,13 \quad [82]$$

Die Konzentration des Hämoglobins im Plasma wurde kontinuierlich bei 0,6 g/dl gehalten. Zu den Messpunkten wurde stündlich die Hämoglobinkonzentration im Plasma mittels Blutgasanalysegerät bestimmt und bei Bedarf wurde die Konzentration durch Gabe von HBOC-301 wieder auf 0,6 g/dl angehoben. Zur Volumensubstitution wurde 10% HES 200.000 / 0.5 (HES-steril Fresenius, Bad Homburg) unter Konstanthaltung des PCWP bei 10 mmHg verwendet. Direkt vor Verwendung der Lösung am Versuchstier wurde der Beutel auf Beschädigung kontrolliert (siehe Abb. 2.8) und die Met-Hämoglobinkonzentration gemessen (OSM 3, Radiometer, Kopenhagen), um eine stattgefunden Oxidation der Hämoglobinmoleküle mit konsekutiver Bildung von Met-Hämoglobin auszuschließen. Bei einem Wert, der 5%

übersteigt, wäre die Lösung verworfen worden. Dieser Wert wurde jedoch im Rahmen der Versuchsreihe bei keinem Beutel erreicht.

Gruppe 2 wurde mit HES therapiert, wobei der der PCWP konstant bei 10mmHg gehalten wurde. Falls bei adäquatem PCWP der mittlere arterielle Druck auf unter 75 mmHg gesunken sein sollte, so wurde zusätzlich Noradrenalin (Arterenol[®] Aventis, Frankfurt am Main) verabreicht, um den mittleren arteriellen Druck auf Werte über 75 mmHg anzuheben.

Gruppe 3 bekam zur Volumensubstitution weiterhin Ringer Lösung nach Bedarf. Auch hier wurde der PCWP konstant bei 10mmHg erhalten.

2.10 Messungen

Es wurde bis zum Messpunkt 8 jeweils alle 60 min ein Messpunkt durchgeführt.

2.10.1 Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus

39 Versuchstiere

Prämedikation und Narkose (ca. 20 min)

Präparation

Halsgefäßpräparation (ca. 15 min)

Laparotomie (ca. 20 min)

Mobilisierung des Pankreas, Kanülierung des Ductus pancreaticus,
Splenektomie, Blasenkatheterisierung

Messpunkt 0

Induktion der Pankreatitis

Messpunkte 1 und 2

Randomisierung und Gruppeneinteilung

Gruppe 1: HBOC-301; Gruppe 2: HES; Gruppe 2: Ringer

Therapiebeginn

Messpunkte 3 bis 8

**Wundverschluss, Ausleitung, Analgesie, Überwachung
(1. – 6. postoperativer Tag)**

Tötung und Sektion am 6. postoperativen Tag

2.11 Verschluss des Halses und des Bauchs

Nach Messpunkt 8 wurden alle Sonden und Katheter bis auf den ZVK, der bis zum Ende des Versuchs blieb, entfernt und die jeweiligen Gefäße bzw. Wunden an den Organen verschlossen. Nach intensiver Spülung des Bauchraumes mit 2-3l gewärmter Ringer-Lösung wurde der Bauch verschlossen. Daraufhin wurde auch die Halswunde verschlossen.

Währenddessen wurde dem Tier intravenös 7,5mg Piritramid (Dipidorol[®], Janssen-Cilag, Neuss) und 50mg Pethidin (Dolantin[®] 50mg Injektionslösung) zur Analgesie verabreicht. Anschließend wurde die Narkose ausgeleitet, und das Tier erwachte und wurde in einen gewärmten Stall getragen.

2.12 Postoperative Versorgung

Alle 6h erfolgte eine intramuskuläre Injektion mit 7,5mg Piritramid (Dipidorol[®], Janssen-Cilag, Neuss) zur Schmerzlinderung. 24h nach Op-Ende wurde es nur noch bei Bedarf appliziert.

Die Versuchstiere befanden sich in einer Intensivüberwachung bei sechsständlicher Beurteilung von Wachheit, Herzfrequenz, Atemfrequenz, rektaler Temperatur, Aktivität, Trink- und Essverhalten und Verdauung. Mittags wurde über den ZVK immer Blut zur Labordiagnostik entnommen. Zusätzlich visitierte einmal am Tag ein Veterinär der Versuchstierhaltung des Universitäts-Klinikums Hamburg Eppendorf die Tiere.

Den 1. postoperativen Tag bekamen die Tiere nur Wasser, ab dem 2. postoperativen Tag wurde ihnen zusätzlich eine Standarddiät (Ferkel-Aufzuchtfutter, UNA-HAKRA, Hamburg) angeboten.

2.13 Sakrifizierung und Probenentnahme

Am 6. postoperativen Tag oder bei Verschlechterung des Gesundheitszustandes des Tieres wurde über den ZVK Midazolam (Dormicum[®], Hoffmann-LaRoche, Grenzach-Wyhlen) verabreicht. Nach

dessen Wirkeintritt wurde T61 (Intervet, Unterschleißheim) injiziert, woraufhin das Tier verstarb. Der Bauchraum wurde anschließend sofort über den Op-Zugang geöffnet. Es erfolgte die Entnahme von Gewebeproben aus Pankreaskopf, Pankreascorpus, Processus uncinatus, Peritoneum, Leber, Lunge, Niere, welche in gepufferter 3,5%iger Formalinlösung fixiert wurden. Die Tiere, die während des Beobachtungszeitraumes verstarben, wurden sofort nach Todesfeststellung laparotomiert und das Gewebe wie oben angegeben entnommen und verarbeitet.

2.14 Histopathologische Aufarbeitung der Präparate

Die Gewebeproben wurden nach Entnahme in 3,5% Formalin-Lösung fixiert. Anschließend wurden die Gewebeproben in einer aufsteigenden Alkoholreihe entwässert und in Paraffin eingebettet. Nach der Paraffineinbettung wurden von der Pankreaskopregion je zwei Schnitte in longitudinaler Schnittrichtung mit einer Dicke von 5 µm angefertigt und mit Hämatoxylin-Eosin (HE-Färbung) eingefärbt.

2.14.1 Beurteilung des histologischen Gewebeschadens

Die Beurteilung der Histologien erfolgte unter einem Durchlichtmikroskop (Olympus, BX-60F5, Japan) durch einen unabhängigen und hinsichtlich der Gruppenzugehörigkeit geblindeten Auswerter. Die Auswertung geschah in Anlehnung an einen validiertes histopathologisches Bewertungsschema [115]. Dieses Scoringsystem wurde durch einen Facharzt für Pathologie entwickelt (Prof. Dr. A. Gocht, Oberarzt des Institutes für Pathologie, Universitäts-Klinikum Hamburg Eppendorf) und durch ihn und eine Mitarbeiterin (Dr. S. Koops) intern validiert.

Als Kriterien für das Ausmaß der Gewebsschädigung galten Ödem, Azinusnekrosen, Hämorrhagien und Fettgewebnekrosen, sowie leukozytäre Infiltrate, eingeordnet auf einer Punkteskala von 0 bis 3. Die Punkte wurden addiert. Der Höchstwert lag bei 12 Punkten.

Pro Tier wurden aus 2 verschiedenen Bereichen des Pankreas Gewebeprobe entnommen.

2.14.2 Histologie Score zur Beschreibung von Gewebeschäden des Schweinepankreas bei akuter Pankreatitis in Überlebensversuchen

Azinusnekrosen

0	Keine Nekrose
1	<10 Einzelnekrosen/Läppchen
2	≥10 Einzelnekrosen/Läppchen
3	Mindestens ein Drittel der Fläche

Fettgewebsnekrosen (Nekroseanteil bezogen auf die Fläche)

0	Keine Nekrose
1	<1/3 der Fläche
2	≥1/3 der Fläche
3	≥2/3 der Fläche

Inflammation (Plasmazellen, Lymphozyten und Granulozyten außerhalb der Fettgewebs- und Parenchymnekrosen)

0	Keine Zellen
1	Lockere Infiltrate (≤ 30 Zellen/HPF)
2	Mäßige Infiltrate (> 30 ; ≤100 Zellen/HPF)
3	Dichte Infiltrate (>100 Zellen/HPF)

Ödem

0	Kein Ödem
1	Interlobuläres Ödem
2	Interazinäres Ödem, mind. in 2 Läppchen
3	Interzelluläres Ödem, mind. in 2 Läppchen

2.15 Messung der pankreatischen Mikrozirkulation

Die Messung der Mikrozirkulation erfolgte durch einen Laser-Doppler-Scanner PeriScan PIM II (Laser: EN 60825-1 Class 2, Wellenlänge $\lambda=670\text{nm}$, maximale Leistung $P=1\text{mW}$, Strahldurchmesser $\varnothing=1\text{mm}$) der Firma Perimed (Stockholm, Schweden). Mit dem Laser-Doppler-Scanner konnte auf nicht invasive Weise die vorhandene Durchblutung im Scanbereich beurteilt werden. Diese Methode ist sehr gut geeignet, da es zu keinem Kontakt mit dem Messbereich und deshalb zu kaum einer Beeinflussung des untersuchten Bereiches kommt.

Ein Laserstrahl wird vom Scanner ausgesandt, der im Gewebe auf sich unterschiedlich schnell bewegende korpuskuläre Partikel trifft. Dabei wird der Laserstrahl gestreut und ändert seine Wellenlänge (so genannter Doppler-Effekt). Der reflektierte Strahl wird von einem Detektor erfasst und durch die Software in ein farbcodiertes Bild umgewandelt. Der Scanbereich umfasst 4096 (64 x 64) Messpunkte, aus denen das Bild generiert wird.

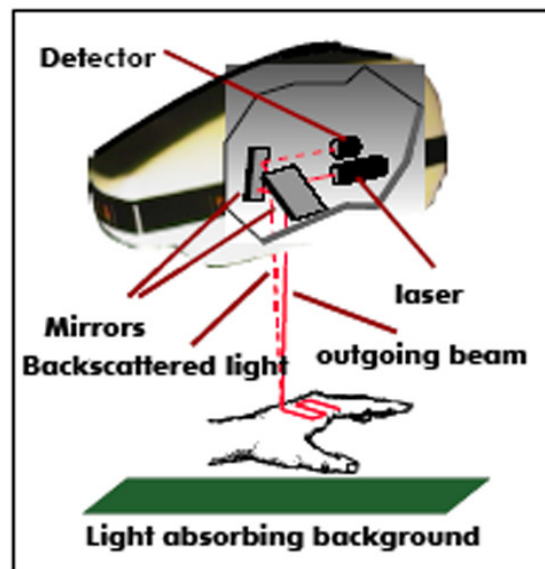


Abbildung 2.5: Schematische Darstellung des Funktionsprinzipes des Laser-Doppler-Scanner PeriScan PIM II (Quelle: Perimed, Stockholm, Schweden)

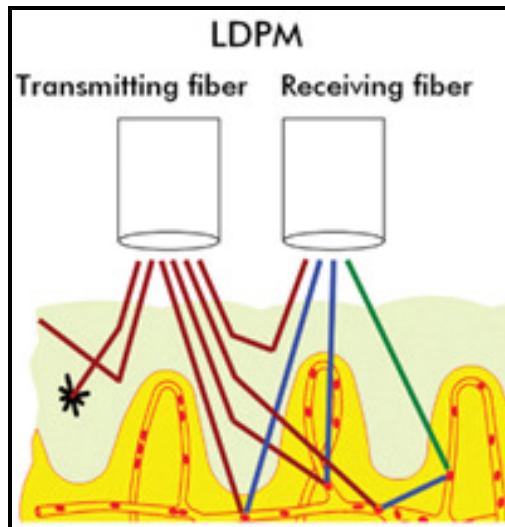


Abbildung 2.6: Schematische Darstellung des Funktionsprinzipes des Laser-Doppler-Scanner PeriScan PIM II (Quelle: Perimed, Stockholm, Schweden)

Der Scanner wurde ca. 30cm über dem Pankreaskopf installiert. Der Scanvorgang wurde in Apnoe durchgeführt, damit es zu keiner Lageveränderung des Pankreas kommt. Pro Messpunkt (MP 0-8) wurden 2 Scans durchgeführt.



Abbildung 2.7: Messung der Mikrozirkulation des Pankreas mittels Laser-Doppler-Scanner PeriScan PIM II

2.16 Therapeutika

2.16.1 Hemoglobin-based Oxygen Carriers (HBOC–301)

HBOC-301 ist eine zellfreie Hämoglobinlösung, die aus Rinderblut gewonnen wird [59]. Es wird von der Firma Biopure (Cambridge, MA, USA) hergestellt und ist als Oxyglobin™ frei erhältlich. Oxyglobin™ besitzt in der Veterinärmedizin eine Zulassung als Blutersatzstoff. Hemopure™, das ebenfalls von der Firma Biopure hergestellt wird und sich nur durch einen höheren kolloidosmotischen Druck vom Oxyglobin™ unterscheidet, wird in klinischen Phase-II/III-Studien eingesetzt und ist in Südafrika seit 2001 als einziger „Hemoglobin-based Oxygen Carrier“ (HBOC) zugelassen.



Abbildung 2.8: Hämoglobinlösung HBOC-301 (Oxyglobin™)

In der Produktion werden bovine Erythrozyten lysiert, filtriert und chromatographisch aufgetrennt, und dadurch von Erythrozytenmembranresten befreit. Somit besitzt HBOC keine ABO-Antigene mehr, so dass es ohne Kenntnis der Blutgruppe des Empfängers verabreicht werden kann. Die Besonderheit der guten Verträglichkeit beim Menschen lässt sich darauf zurückführen, dass sich das bovine Hämoglobinmolekül vom humanen Hämoglobinmolekül nur in 17 Aminosäuren der Alpha-Kette und in 24 Aminosäuren der Beta-Kette unterscheidet [139], und dass diese sich zum

größten Teil in der Mitte des Moleküls befinden. Daraus resultiert, dass die nach außen zeigenden Aminosäuren, die hauptverantwortlich für die Antigenpräsentation sind, beim bovinen und humanen Hämoglobin fast identisch sind [53;54;139]. Die Beta-Kette des bovinen Hämoglobins ist kürzer als die des humanen, wodurch dieser eine wesentliche Bedeutung zukommt. Beim Menschen ist die Sauerstoffaffinität des Hämoglobins abhängig vom 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG). Durch die kürzere Beta-Kette des bovinen Hämoglobinmoleküls wird die Sauerstoffaffinität hauptsächlich durch Chlorid reguliert [4;87], so dass durch den hohen Chlorid-Gehalt des menschlichen Blutes die Sauerstoffabgabe ins Gewebe deutlich erleichtert wird, da die Sauerstoffaffinität des HBOC mit einem P_{50} von 36 mmHg im Vergleich zum Menschen deutlich erniedrigt ist [140]. Hinzu kommt, dass der Bohr-Effekt besonders stark ausgeprägt ist, so dass vor allem in azidotischen Verhältnissen die Sauerstoffabgabe an das Gewebe erleichtert wird.

HBOC-301 Oxyglobin™ hat einen niedrigen Anteil an Polymeren mit einem Molekulargewicht von unter 32.000 Da, d.h. unterhalb der Nierenschwelle, was eine längere intravasale Verweildauer als bei früher eingesetzten niedermolekularen Lösungen gewährleistet. Der Hersteller gibt eine Halbwertszeit von 30 bis 40 Stunden für HBOC-301 Oxyglobin™ an, da nahezu keine renale Ausscheidung erfolgt. Die Ausscheidung von HBOC-301 Oxyglobin™ erfolgt linear nach einer Elimination erster Ordnung [58;140]. Gleichzeitig wird dadurch der kolloidosmotische Druck auf einem dem humanen Plasma entsprechenden Niveau gehalten, da die Anzahl der osmotisch wirksamen Teilchen begrenzt ist.

Durch diese genannten Eigenschaften ergeben sich folgende Effekte des HBOC-301 Oxyglobin™:

1. plasmatischer Sauerstofftransport
2. Verkürzung der Diffusionsstrecke für den intravasalen Sauerstoff ins umliegende Gewebe (so genannte Oxygen Bridge)
3. HBOC passiert aufgrund der geringen Größe noch Gefäßstenosen, an denen Erythrozyten nicht mehr vorbeikommen

4. Erhöhung des arteriellen Mitteldruckes und des systemischen Gefäßwiderstandes durch Vasokonstriktion aufgrund des NO-bindenden Effektes (NO-scavenging) des zellfreien Hämoglobins nach Aufnahme des HBOC in die Endothelzellen und Bindung an NO.

Parameter	HBOC-301 (Oxyglobin™)
Hämoglobin [g/dl]	13,0 ± 1,0
Methämoglobin [%]	< 5
Oxyhämoglobin [%]	< 5
p50 [mmHg]	36
Natrium [mmol/l]	145 - 160
Kalium [mmol/l]	3,5 - 5,5
Chlorid [mmol/l]	105 - 120
Calcium [mmol/l]	0,5 - 1,5
KOD [mmHg]	17
Viskosität 37° [mPa x s]	1,3
PH	7,6 - 7,9
Osmolarität [mOsm/kg]	290 - 310
Endotoxin [EU/ml]	< 0,05
Phospholipid [nM]	< 3
Sterilität	kein Koloniewachstum
Polymerisiertes Hämoglobin	
MGW>500 000 [%]	< 15
MGW~65 000 [%]	< 10
MGW<32 000 [%]	< 5
Freies Glutaraldehyd [µg/ml]	< 3,5
Partikel [Partikel/ml]	
> 10µ	< 50
> 25µ	< 5

Tabelle 2.1: Spezifika der in den Versuchen verwendeten Hämoglobinlösung HBOC-301 (Oxyglobin™) entsprechend Herstellerangaben.

2.16.2 Hydroxyethylstärke

Es kam eine 10% HES-Lösung (HES-steril Fresenius, Bad Homburg) mit einem Substitutionsgrad von 0,5 und einem mittlerem Molekulargewicht von 200.000Da zur Anwendung, die mit einer dem HBOC-301 Oxyglobin™ vergleichbar langen Halbwertszeit und ähnlichen rheologischen Eigenschaften ausgestattet ist.

2.17 Statistische Methoden

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mittels SPSS 11.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA).

Für die deskriptive Analyse des Überlebens und des Histocores dienten Mittelwert und Standardabweichung (SD). Ordinaldaten sind als Median und Spannweite angegeben. Die Normalverteilung wurde mit dem Kolmogorov-Smirnov Test und Gruppenunterschiede mittels Kruskal-Wallis Test untersucht. Für die Überprüfung der statistischen Signifikanz wurde der Mann-Whitney-U Test für nicht-normal verteilte Daten und der ungepaarte Student-t-Test für normal verteilte Daten verwendet.

Da es sich bei der Mikrozirkulation um Verlaufsparemeter handelt, sind diese mittels einer Varianzanalyse für wiederholte Messungen (ANOVA) zu vergleichen. Fand sich ein Gruppen-Effekt und keine Interaktion zwischen Zeit und Therapie (time by treatment interaction test), wurde ein paarweiser post-hoc Test (Tukey's HSD) angeschlossen, um Therapieunterschiede mittels Standardfehler (SE) und 95% Konfidenzintervall (CI) der Differenz zu beschreiben. Das Signifikanzniveau wurde dabei auf $p < 0,05$ festgesetzt. Wurden keine Gruppenunterschiede im Verlauf festgestellt, so kam der Student-t-Test zur Anwendung, um Inter-Gruppeneffekte zu verschiedenen Zeitpunkten zu beschreiben. Ein Signifikanzniveau wurde dabei nicht festgesetzt. Bei einer positiven Interaktion "time-by-treatment-interaction test" wurde zusätzlich die Fläche unter der Kurve berechnet und mittels one-way ANOVA und post hoc Test (Tukey's HSD) verglichen. Das Signifikanzniveau wurde wiederum bei $p < 0,05$ festgesetzt. Beginn der Berechnung der Fläche unter der Kurve war der Messpunkt 2 (unmittelbar vor Beginn der Therapie).

Nachteil der Beschreibung durch die Fläche unter der Kurve ist, dass die Zahl nicht von klinisch vergleichbarer Relevanz ist (man kann z.B. einen Blutdruckunterschied von 20mmHg klinisch einordnen, einen Unterschied der Fläche unter der Kurve des Blutdruckverlaufes von 60mmHg allerdings nicht) und damit die direkte klinische Interpretierbarkeit eingeschränkt ist. Dieses ist allerdings auch nicht notwendig, da es sich bei den Versuchsreihen um experimentell erhobene Daten handelt und die beschriebenen Unterschiede am besten grafisch zur Geltung kommen.

3 Ergebnisse

Zwischen den drei Gruppen waren keine Unterschiede in den demographischen Daten (Alter, Gewicht), dem Blutvolumen und der Körperoberfläche zu finden. Körpertemperatur sowie die Dosis an Anästhetika und Relaxantien waren den gesamten Versuch über konstant und zeigten keine Differenz zwischen den Untersuchungsgruppen.

3.1 Überleben

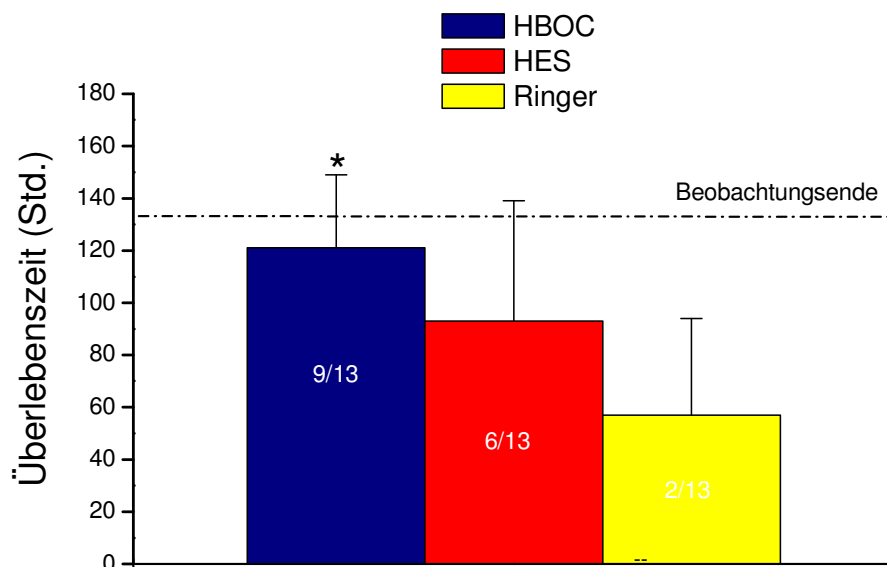


Abbildung 3.1: Darstellung der Überlebenszeit in Stunden bis zum Beobachtungsende nach 144 Std. MW± SD; * p<0,05 vs Ringer. Die Zahlen in den Säulen entsprechen der Anzahl der überlebenden Tiere über den Beobachtungszeitraum.

In der HBOC-301 Gruppe überlebten 9 der insgesamt 13 Tiere den gesamten Beobachtungszeitraum von 144 Stunden. Jeweils 1 Tier verstarb am 2. bzw. am 4. postoperativen Tag, 2 Tiere verstarben am 5. postoperativen Tag.

In der HES-Gruppe überlebten 6 Tiere den Beobachtungszeitraum, jeweils 2 Tiere verstarben am 1., 2. bzw. 4. postoperativen Tag, 1 Tier verstarb am 3. Tag.

In Ringer-Gruppe überlebten insgesamt nur 2 Tiere den gesamten Beobachtungszeitraum. 3 Tiere starben bereits am 1. Tag nach Intervention, 7 Tiere am 2. postoperativen Tag und eins am 4. postoperativen Tag.

Die mittlere Überlebenszeit der HBOC-301 Gruppe betrug 121 Stunden (SD 29,3; CI 102, 139), der HES-Gruppe 93 Stunden (SD 49; CI 62, 124) und der Ringer-Gruppe 57 Stunden (SD 39; CI 32, 82) (Abb. 3.1). Zwischen den Gruppen fand sich ein signifikanter Unterschied hinsichtlich des Überlebens ($p < 0,001$; One-Way Anova). In der anschließenden ad-hoc Analyse zeigte sich eine mittlere Differenz von 64 Stunden (SE 16; CI 23; 104) zwischen der HBOC-301 Gruppe und Ringer-Gruppe ($p < 0,001$). Die mittlere Differenz zwischen der HBOC-301 Gruppe der und HES-Gruppe ist mit 27 Stunden (SE 16; CI -12, 67) nicht signifikant ($p = 0,227$). Auch die mittlere Differenz in der Überlebenszeit zwischen der HES-Gruppe und der Ringer-Gruppe ist mit 36 Stunden (SE 16; CI -3,6, 76,5) nicht signifikant ($p = 0,081$).

3.2 Mikrozirkulation

Durch die Varianzanalyse für wiederholte Messungen konnte ein Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p < 0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p < 0,001$) detektiert werden (Abb. 3.2). Zur Verdeutlichung wurde für jedes Tier die Fläche unter der Kurve für die Veränderung der Mikrozirkulation (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p < 0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte eine verbesserte Mikrozirkulation in der HBOC-301 Gruppe im Verhältnis zur Ringer-Gruppe (mittlere Differenz 18,1, (standard error (SE) 2,9); 95% confidence interval (CI): -2,05 - 20,6; one-way ANOVA $p < 0,01$). Dieser Effekt war in der HES-Gruppe im Vergleich zu den Ringer Tieren nicht signifikant (mittlere Differenz 8,9 (SE 2,7); 95% CI: -2,4 - 20,2; $p > 0,05$). Zwischen der HBOC-301 und der HES-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

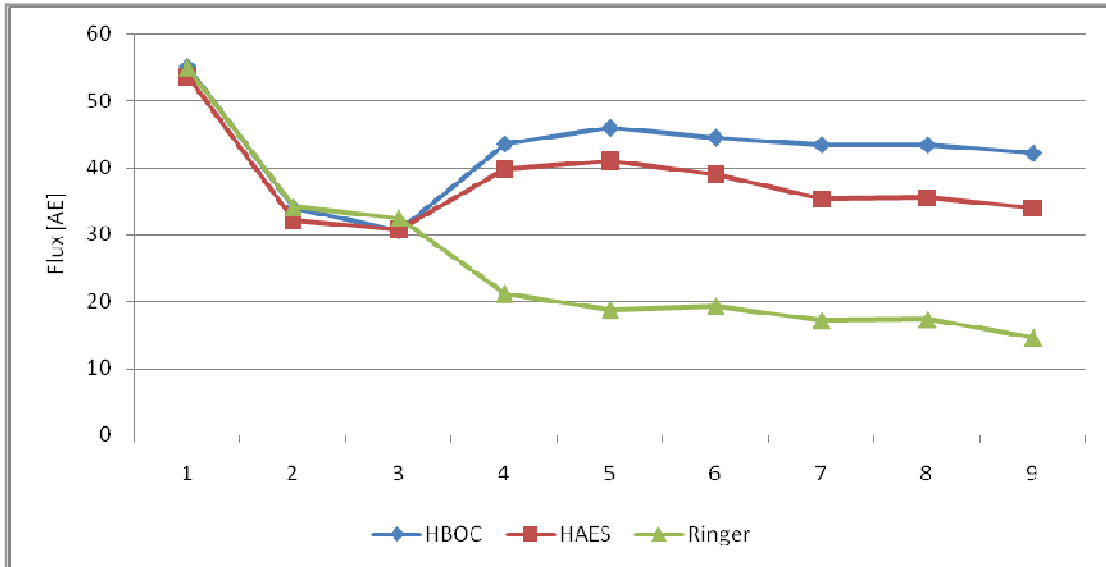


Abbildung 3.2: Mikrozirkulation über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie)

Fläche unter der Kurve:	HBOC-301:	265,7
	HES:	194,2
	Ringer:	117,3

3.3 Histologie

Hinsichtlich der histologischen Schädigung valuiert anhand des Histoscores fand sich ein signifikanter Unterschied bezüglich des Gesamtscores ($p=0,003$) (Abb. 3.3), der Azinusnekrosen ($p<0,001$, Kruskal Wallis Test) und der Inflammation ($p=0,025$).

Die Ringer-Gruppe zeigte im Vergleich zur HBOC-301 Gruppe einen höheren Score im Bereich der Azinusnekrosen (Median 2,5 vs. 1; $p=0,001$), der Inflammation (Median 2 vs. 1, $p=0,022$), was zu einem höheren Gesamtscore (Median 9,5 vs. 5,5; $p<0,001$) der Ringer-Gruppe führt.

Der Effekt der geringeren Gewebeschädigung durch das HBOC-301 konnte zum Teil auch im Vergleich zur HES-Gruppe festgestellt werden. In der HES-Gruppe zeigte sich ein höherer Score bezüglich der Inflammation (Median 1,5 vs. 2, $p=0,021$).

Im Vergleich der HES-Gruppe zur Ringer-Gruppe ist der Score hinsichtlich der Azinusnekrosen (Median 2 vs. 2,5, $p < 0,042$), Fettgewebsnekrosen (Median 1 vs. 2,5, $p = 0,020$) geringer. Der Gesamtscore in der HES-Gruppe ist niedriger (Median 7 vs. 9,5, $p > 0,001$).

Histologischer
Gesamtscore

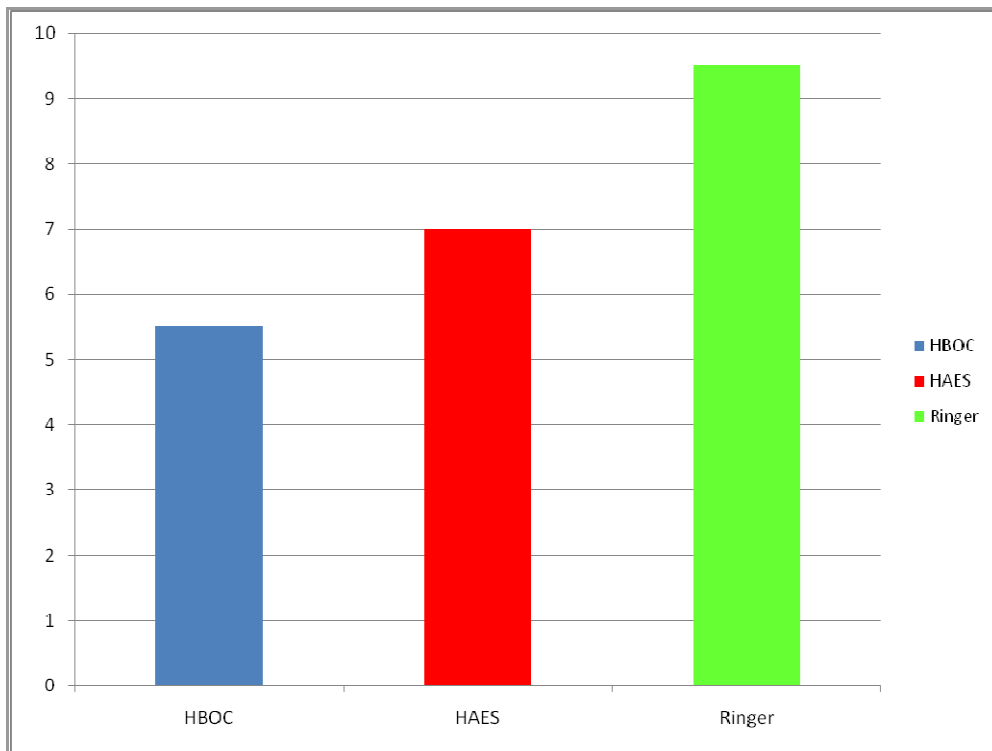


Abbildung 3.3: Vergleich der Gesamtscores untereinander (ANOVA Test): $p = 0.022$ HBOC-301 vs. HAES; $p < 0.001$ HBOC-301 vs. Ringer; $p < 0.001$ HAES vs. Ringer

Gruppe	Azinus- nekrosen	Fettnekrosen	Inflammation	Ödem	Gesamt- score
HBOC-301	1 (0-3)	0,5 (0-2)	1,5 (1-2,5)	2 (1-2,5)	5,5 (3-8,5)
HES	2 (1-3)	1 (1-2,5)	2 (1-3)	2 (1-3)	7,0 (5,5-10)
Ringer	2,5 (2-3)	2,5 (2-3)	2 (1-3)	2 (1,5-2,5)	9,5 (7,5-11)

Tabelle 3.1: Histoscore aus 2 unterschiedlichen Bereichen des Pankreas nach Versterben oder Sakrifizierung der Tiere (Werte im Median und Spannweite). Der Histoscore reicht von 0 bis 3, wobei Azinusnekrosen, Fettnekrosen, Inflammation und Ödem beurteilt wurden. Aus zwei verschiedenen Analysen aus einer Probe wurde der Median gebildet. Der Gesamtscore reicht somit von 0 bis 12.

3.4 Gewebssauerstoffpartialdruck (tpO₂) des Pankreas

Die Varianzanalyse für wiederholte Messungen zeigte bezüglich der tpO₂-Messung im Pankreas einen Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p < 0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p < 0,001$) (Abb. 3.4). Zusätzlich wurde daher für jedes Tier die Fläche unter der Kurve für die Veränderung des tpO₂ (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p < 0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte einen verbesserten tpO₂ in der HBOC-301 Gruppe im Verhältnis zur Ringer-Gruppe (mittlere Differenz 91,6 (SE 13,3); one-way ANOVA $p < 0,001$). Im Vergleich mit der HES-Gruppe fand sich ebenso ein erhöhter tpO₂ in der HBOC-301 Gruppe (mittlere Differenz 65,1 (SE 13,3); $p < 0,001$). Die Unterschiede zwischen der HES- und Ringer-Gruppe waren nicht signifikant.

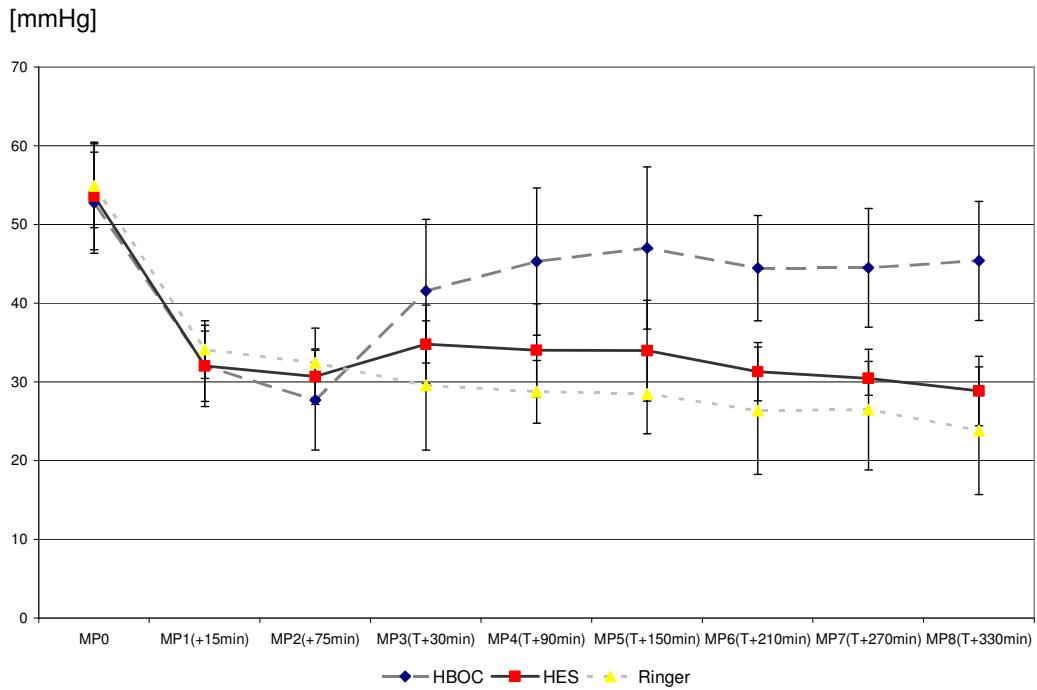


Abbildung 3.4: Gewebssauerstoffpartialdruck über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in mmHg

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 259,3 (SD 45,5) CI 228,7; 289,8

HES: 194,2 (SD 23,3) CI 179,5; 209,1

Ringer: 167,7 (SD 23,1) CI 153,1; 182,4

3.5 Hämodynamische Parameter

3.5.1 Herzfrequenz (HF)

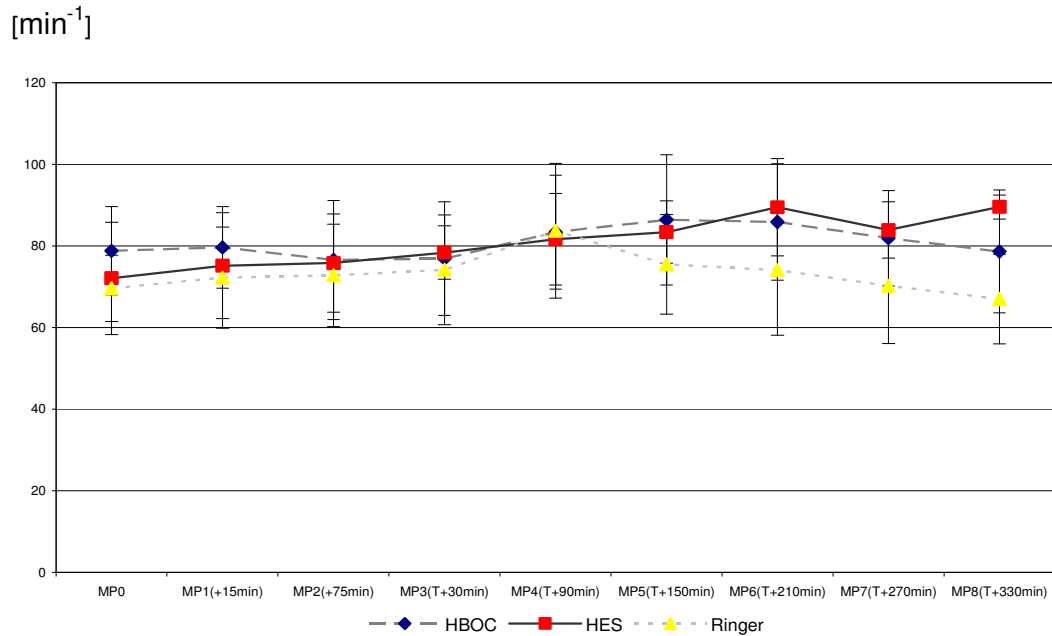


Abbildung 3.5: Herzfrequenz über den Beobachtungszeitraum (MP0 = vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in min⁻¹

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 492,2 (SD 80,3) CI 441,2; 543,2
HES: 492,2 (SD 80,3) CI 441,2; 543,2
Ringer: 447,7 (SD 68,3) CI 404,3; 491,07

Zwischen den Gruppen ergaben sich über den Beobachtungszeitraum im Mittel keine signifikanten Unterschiede (repeated measurements ANOVA) (Abb. 3.5).

3.5.2 Mittlerer arterieller Druck (MAP)

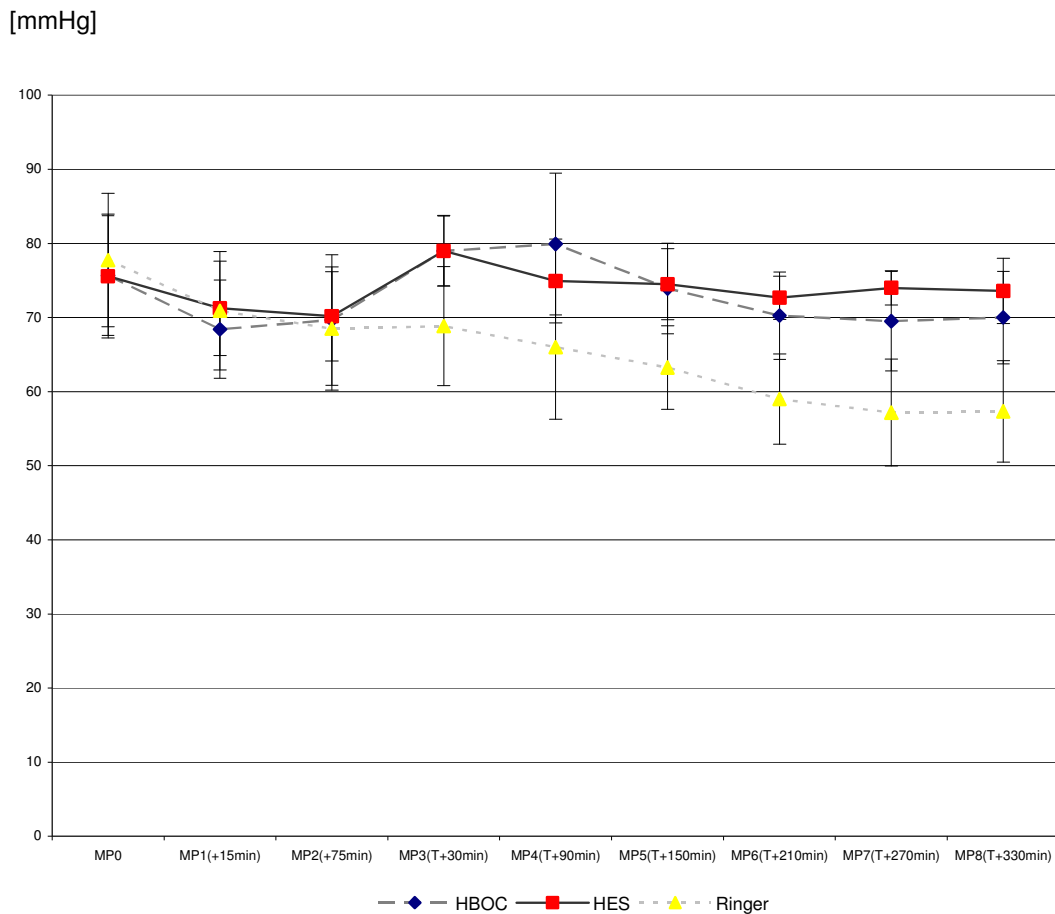


Abbildung 3.6: Mittlerer Arterieller Druck über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in mmHg

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 442,42 (SD 31,74) CI 421,4; 463,5
HES: 446,96 (SD 18,25) CI 434,8; 459,1
Ringer: 377,17 (SD 35,35) CI 353,7; 400,6

Durch die Varianzanalyse für wiederholte Messungen konnte ein Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p < 0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p < 0,001$) detektiert werden (Abb. 3.6).

Zusätzlich wurde daher für jedes Tier die Fläche unter der Kurve für die Veränderung des MAP (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP 2) beginnend) berechnet.

Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p < 0,001$).

Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte einen erhöhten MAP in der HBOC-301 Gruppe im Verhältnis zur Ringer-Gruppe (mittlere Differenz 65,3; (SE 12,5); one-way ANOVA $p < 0,001$). Dieser Effekt war ebenfalls in der HES Gruppe im Vergleich zu den Ringer Tieren nachzuweisen (mittlere Differenz 69,8 (SE 12,5); $p < 0,001$). Zwischen der HBOC- und HES-Gruppe gab es keine signifikanten Unterschiede.

Zu beachten ist, dass in der HES-Gruppe der MAP bei Werten unter 75 mmHg trotz eines adäquaten Volumenstatus ab dem Messpunkt 2 durch die Applikation von Noradrenalin über 75 mmHg gehalten wurde (siehe auch Methodik). Die kumulativen Noradrenalin-Dosen in der HES-Gruppe betragen in $\mu\text{g} \pm \text{SD}$: MP3 42,5 \pm 31, MP4 77,5 \pm 58, MP5 117 \pm 79, MP6 170 \pm 102, MP7 224 \pm 126, MP8 275 \pm 147

3.5.3 Mittlerer pulmonalarterieller Druck (PAP)

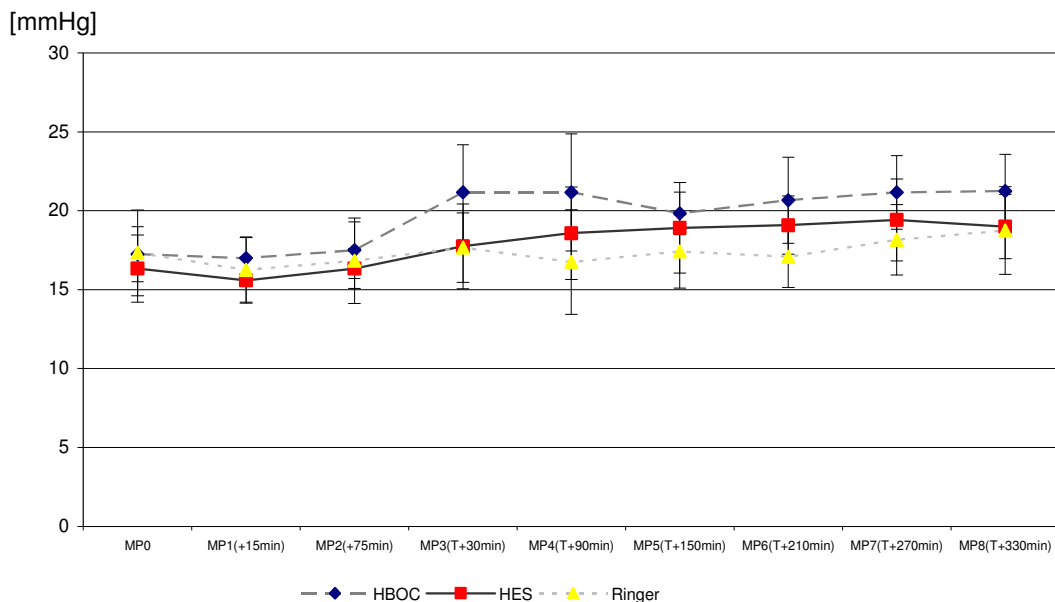


Abbildung 3.7: PAP über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in mmHg

Fläche unter der Kurve:	HBOC-301:	123,4 (SD 10,4) CI 116,8; 130,0
	HES:	111,4 (SD 9,7) CI 105,2; 117,6
	Ringer:	104,9 (SD 11,9) CI 97,3; 112,4

Durch die Varianzanalyse für wiederholte Messungen konnte ein Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p=0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p<0,001$) detektiert werden (Abb.3.7). Zusätzlich wurde daher für jedes Tier die Fläche unter der Kurve für die Veränderung des PAP (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP 2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p<0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte einen erhöhten PAP in der HBOC-301 Gruppe im Verhältnis zur Ringer Gruppe (mittlere Differenz 18,5 (SE 4,38); one-way ANOVA $p<0,001$). Zwischen der HBOC-301 und der HES sowie zwischen der HES und der Ringer Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.5.4 Cardiac Output (CO)

Durch die Varianzanalyse für wiederholte Messungen konnte ein Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p<0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p<0,001$) detektiert werden (Abb. 3.8). Für jedes Tier wurde erneut die Fläche unter der Kurve für die Veränderung des CI (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP 2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p<0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte einen erhöhten CI in der HES-Gruppe im Verhältnis zur HBOC-301 Gruppe und Ringer-Gruppe (mittlere Differenz 5,7 (SE) 1,8 bzw. 9,1 (SE 1,8); one-way ANOVA, $p<0,001$). Zwischen der HBOC-301- und der Ringer-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

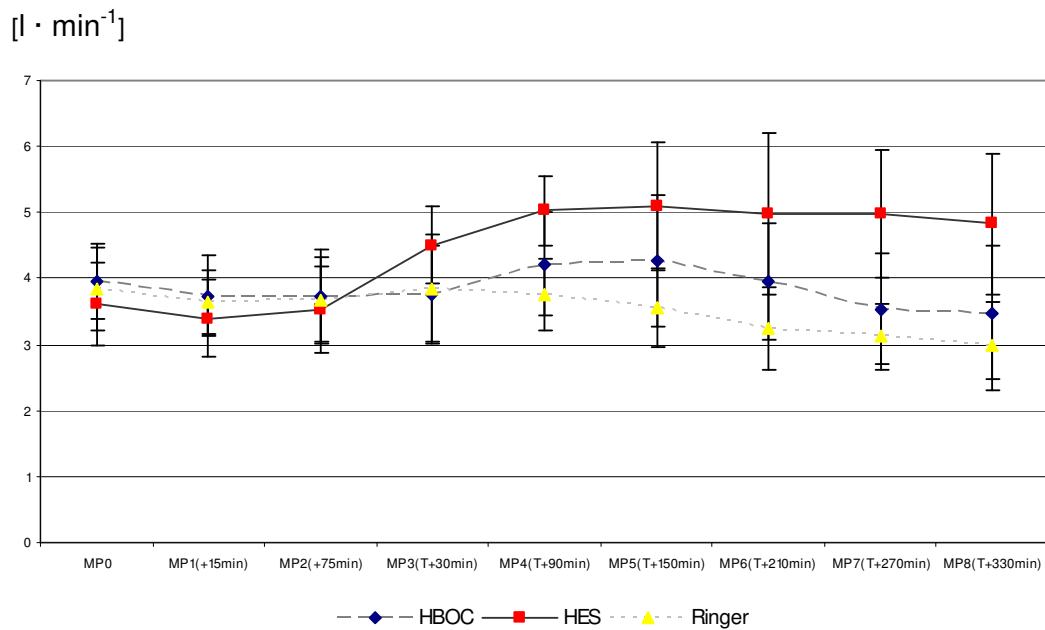


Abbildung 3.8: Cardiac output über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in l · min⁻¹

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 23,4 (SD 4,7) CI 20,4; 26,4
HES: 28,7 (SD 4,5) CI 25,9; 31,6
Ringer: 20,8 (SD 2,7) CI 19,1; 22,6

3.5.5 Cardiac Index (CI)

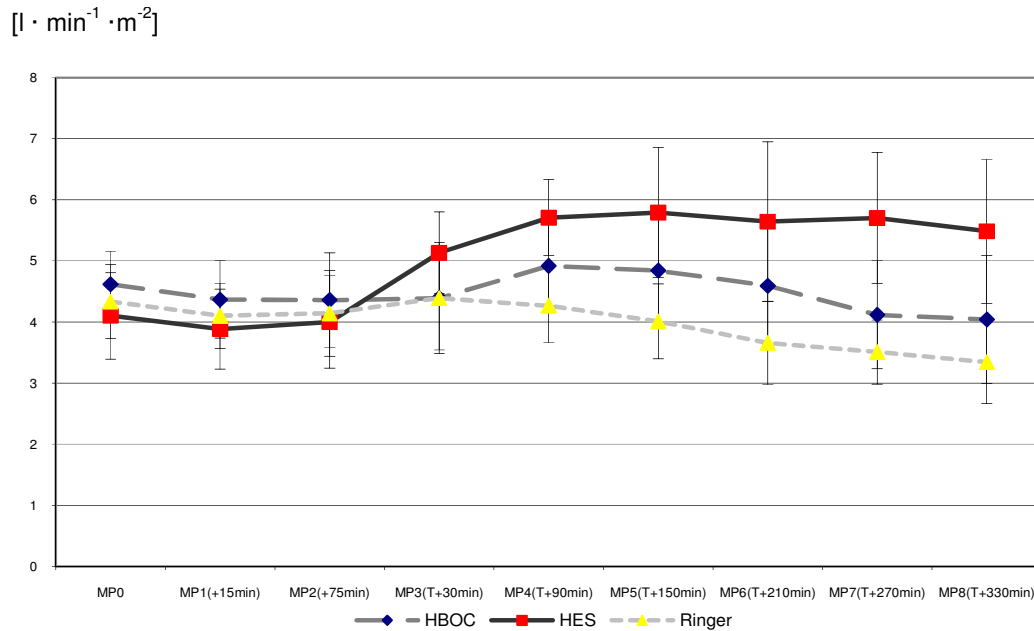


Abbildung 3.9: Cardiac Index über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in l · min⁻¹ · m⁻²

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 27,1 (SD 5,0) CI 23,9; 30,2
HES: 32,7 (SD 4,9) CI 29,6; 35,8
Ringer: 23,6 (SD 2,7) CI 21,9; 25,3

Durch die Varianzanalyse für wiederholte Messungen konnte ein Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p < 0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p < 0,001$) detektiert werden (Abb. 3.9). Für jedes Tier wurde erneut die Fläche unter der Kurve für die Veränderung des Cardiac Index (CI) (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP 2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p < 0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte einen erhöhten CI in der HES-Gruppe im Verhältnis zur HBOC-301 Gruppe und Ringer-Gruppe (mittlere Differenz 5,7 (SE) 1,8 bzw. 9,1 (SE 1,8); one-way ANOVA, $p < 0,001$).

Zwischen der HBOC-301- und der Ringer-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.5.6 Systemischer Widerstand (SVR)

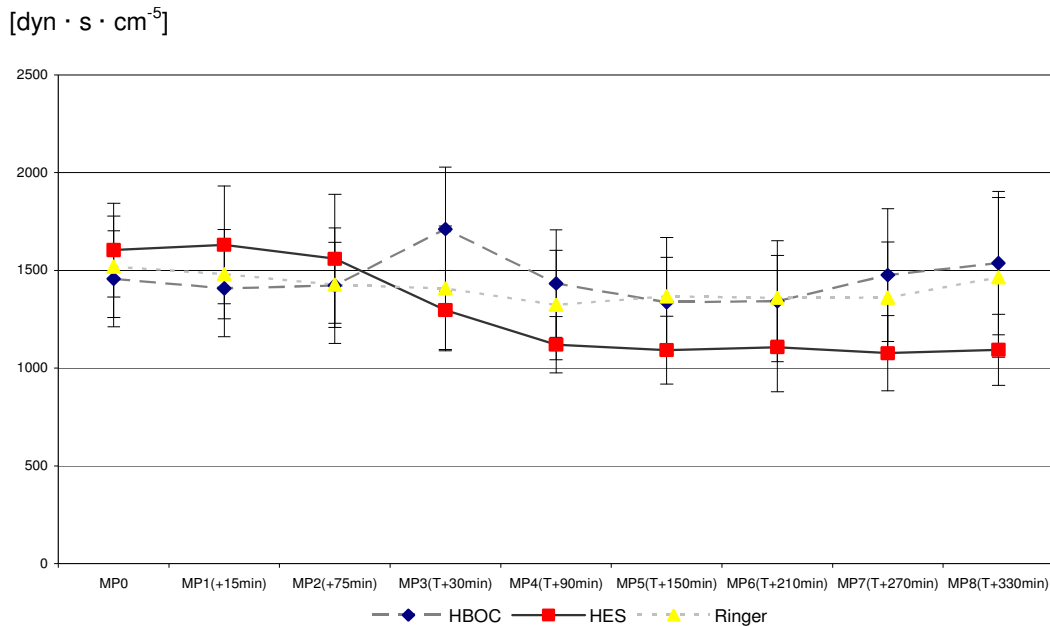


Abbildung 3.10: SVR über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in dyn · s · cm⁻⁵

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 8779,0 (SD 1562,3) CI 7786,4; 9771,7
HES: 7018,8 (SD 968,2) CI 6403,7; 7633,9
Ringer: 8263,8 (SD 1375,9) CI 7389,6; 9138,0

Erneut konnte durch die Varianzanalyse für wiederholte Messungen ein Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p < 0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p < 0,001$) detektiert werden (Abb. 3.10). Zusätzlich wurde daher für jedes Tier die Fläche unter der Kurve für die Veränderung des systemischen Widerstandes (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP 2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p < 0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte einen erhöhten

SVR in der HBOC-301 Gruppe im Verhältnis zur HES-Gruppe (mittlere Differenz 1760,3 (SE 541,2); one-way ANOVA $p=0,007$). Zwischen der HBOC-301- und der Ringer-Gruppe sowie zwischen HES- und Ringer-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.5.7 Pulmonaler Widerstand (PVR)

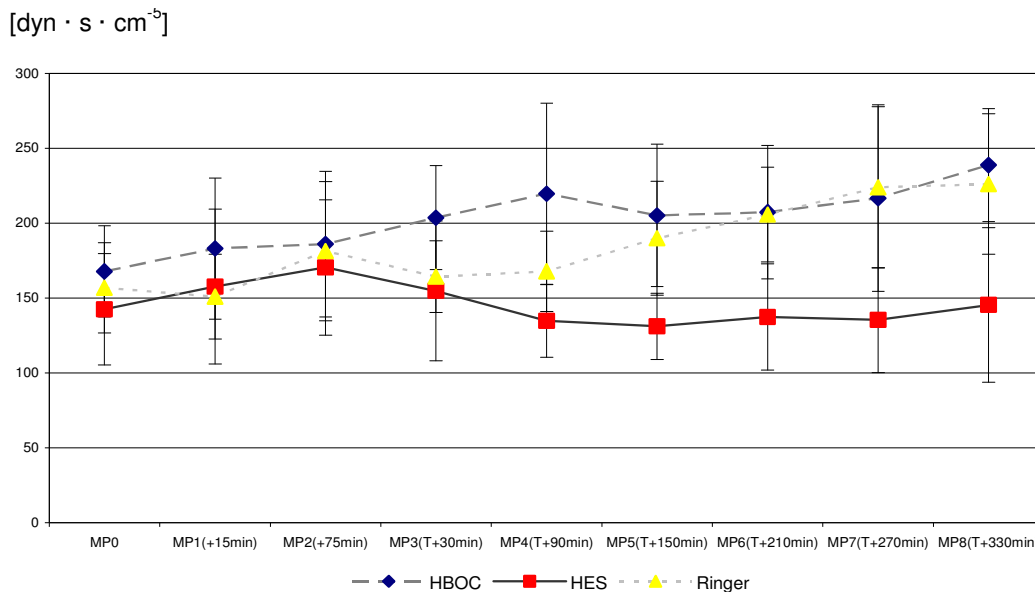


Abbildung 3.11: PVR über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in $\text{dyn} \cdot \text{s} \cdot \text{cm}^{-5}$

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 1265,4 (SD 172,6) CI 1155,7; 1375,1
HES: 851,6 (SD 170,6) CI 743,3; 960,0
Ringer: 1155,9 (SD 143,9) CI 1064,4; 1247,3

Es ergab sich für den PVR durch die Varianzanalyse für wiederholte Messungen ein Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p<0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p<0,001$) (Abb. 3.11). Zusätzlich wurde daher für jedes Tier die Fläche unter der Kurve für die Veränderung des PVR (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP 2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen

den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p < 0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte einen erhöhten PVR in der HBOC-301 Gruppe im Verhältnis zur HES Gruppe (mittlere Differenz 413,8 (SE 66,5); one-way ANOVA $p < 0,001$). Zudem zeigte sich ein erhöhter PVR in der Ringer-Gruppe im Verhältnis zur HES-Gruppe (mittlere Differenz 304,3 (SE 66,5); one-way ANOVA $p < 0,001$). Zwischen der HBOC-301- und der Ringer-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.6 Sauerstofftransport

3.6.1 Arterieller Sauerstoffgehalt (CaO_2)

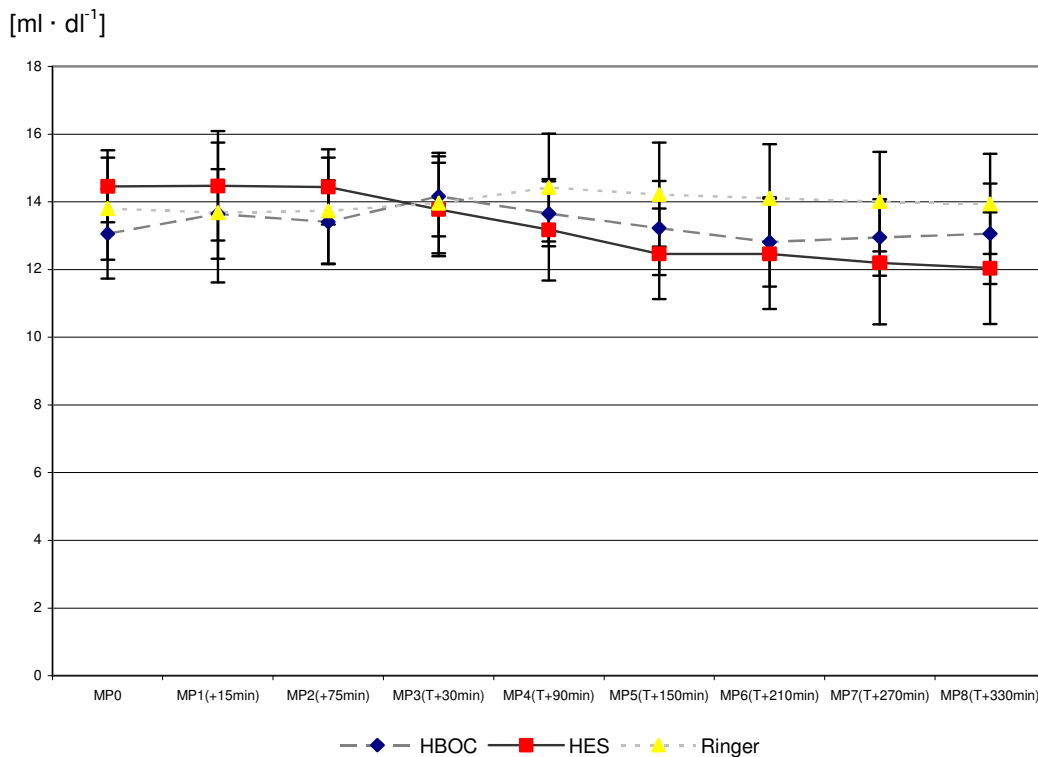


Abbildung 3.12: CaO_2 über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in $\text{ml} \cdot \text{dl}^{-1}$

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 80,0 (SD 7,1) CI 75,6; 84,5
 HES: 76,9 (SD 8,3) CI 71,6; 82,2
 Ringer: 84,6 (SD 9,0) CI 78,9; 90,3

Zwischen den Gruppen ergaben sich über den Beobachtungszeitraum im Mittel keine signifikanten Unterschiede (repeated measurements ANOVA) (Abb. 3.12).

3.6.2 Gemischt-venöser Sauerstoffgehalt (CvO₂)

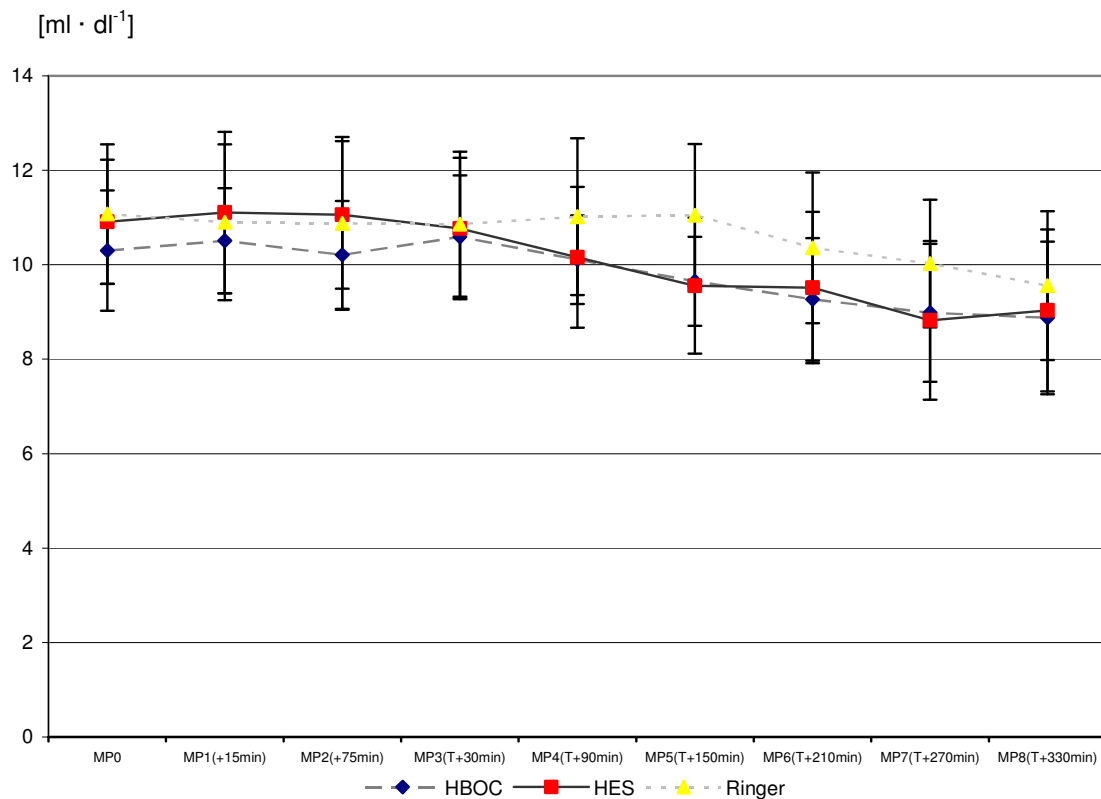
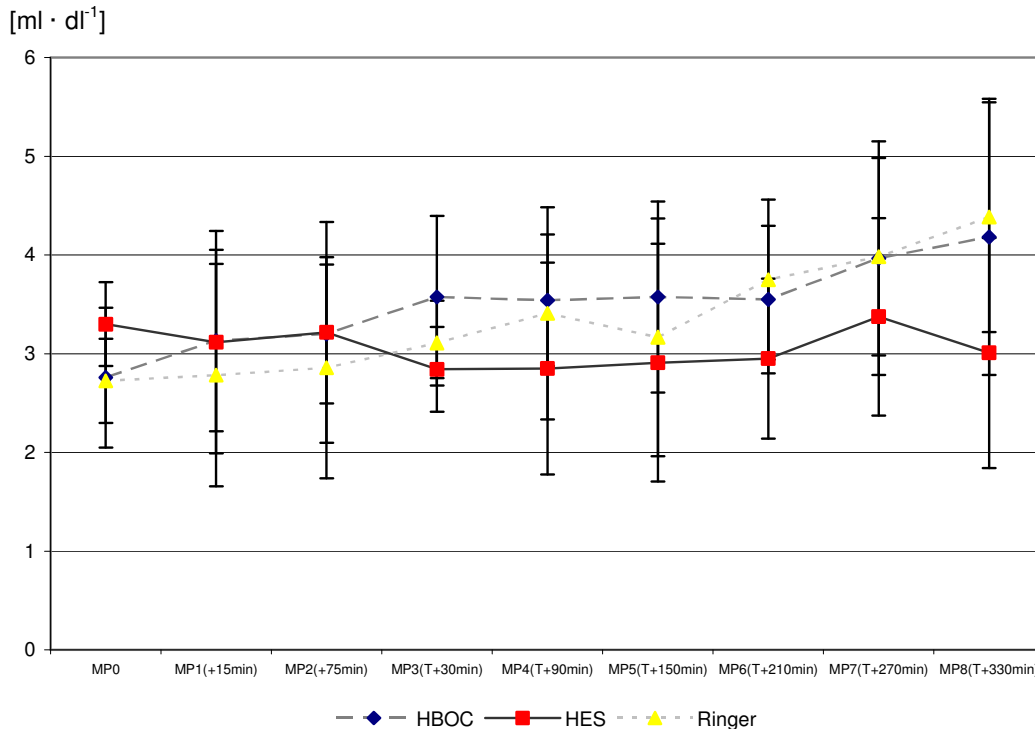


Abbildung 3.13: CvO₂ über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in ml · dl⁻¹

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 58,1 (SD 6,7) CI 53,9; 62,4
 HES: 58,9 (SD 9,4) CI 52,9; 64,8
 Ringer: 63,5 (SD 9,1) CI 57,7; 69,3

Zwischen den Gruppen ergaben sich über den Beobachtungszeitraum im Mittel keine signifikanten Unterschiede (repeated measurements ANOVA) (Abb. 3.13).

3.6.3 Arteriovenöse Sauerstoffdifferenz (avDO₂)



3.14: avDO₂ über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in ml · dl⁻¹

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 21,9 (SD 4,8) CI 18,8; 24,9
HES: 18,0 (SD 3,7) CI 15,6; 20,4
Ringer: 21,0 (SD 4,4) CI 18,2; 23,8

Die Varianzanalyse für wiederholte Messungen ergab einen Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA p<0,05) und eine Zeit-Therapie Interaktion (p<0,05) (Abb. 3.14) für die AvDO₂. Zusätzlich wurde daher für jedes Tier die Fläche unter der Kurve für die Veränderung der avDO₂ (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP 2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter

der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p < 0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte eine erhöhte $avDO_2$ in der HBOC-301 Gruppe im Verhältnis zur Ringer-Gruppe (mittlere Differenz 0,487 (SE 0,188); one-way ANOVA $p = 0,037$). Zudem zeigte sich eine erhöhte $avDO_2$ in der Ringer-Gruppe im Verhältnis zur HES-Gruppe (mittlere Differenz 0,621 (SE 0,1919); one-way ANOVA $p < 0,007$).

Zwischen der HBOC und der HES Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.6.4 Sauerstoffangebot (DO_2)

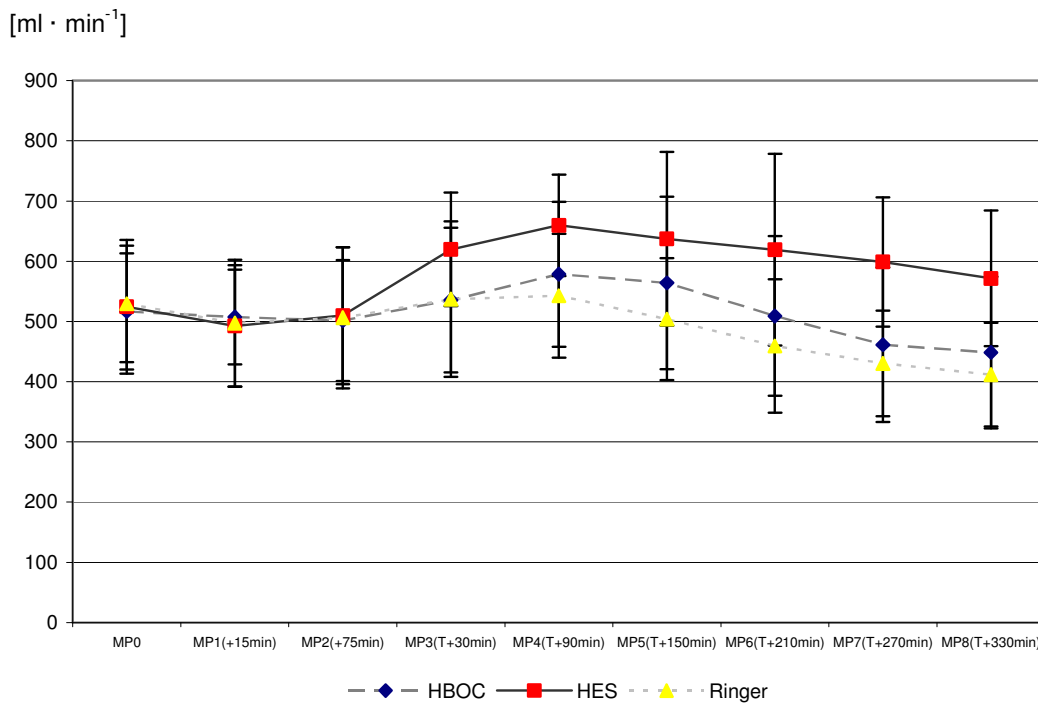


Abbildung 3.15: DO_2 über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in $ml \cdot min^{-1}$

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 3123,6 (SD 727,7) CI 2661,3; 3586,0
HES: 3658,7 (SD 656,3) CI 3241,7; 4075,7
Ringer: 2932,4 (SD 537,2) CI 2591,1; 3273,8

Durch die Varianzanalyse für wiederholte Messungen konnte ein Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p < 0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p < 0,001$) detektiert werden (Abb. 3.15). Zusätzlich wurde daher für jedes Tier die Fläche unter der Kurve für die Veränderung der DO_2 (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP 2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p < 0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte einen erhöhten DO_2 in der HES-Gruppe im Verhältnis zur Ringer-Gruppe (mittlere Differenz 726,3 (SE 263,4); one-way ANOVA $p < 0,001$). Zwischen der HBOC-301- und der Ringer-Gruppe sowie der HBOC-301- und der HES-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.6.5 Sauerstoffverbrauch (VO_2)

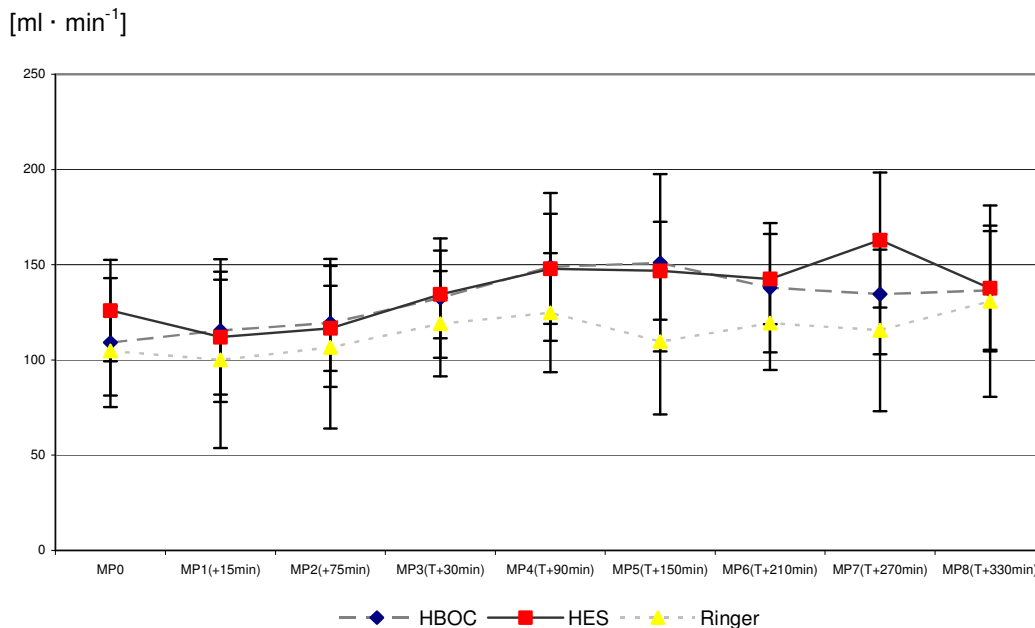


Abbildung 3.16: VO_2 über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in ml · min⁻¹

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 832,7 (SD 204) CI 702; 962
HES: 844,9 (SD 147) CI 751; 938
Ringer: 706,9 (SD 177) CI 593; 820

Zwischen den Gruppen ergaben sich über den Beobachtungszeitraum im Mittel keine signifikanten Unterschiede (repeated measurements ANOVA) (Abb. 3.16).

3.6.6 Sauerstoffextraktion (ERO_2)

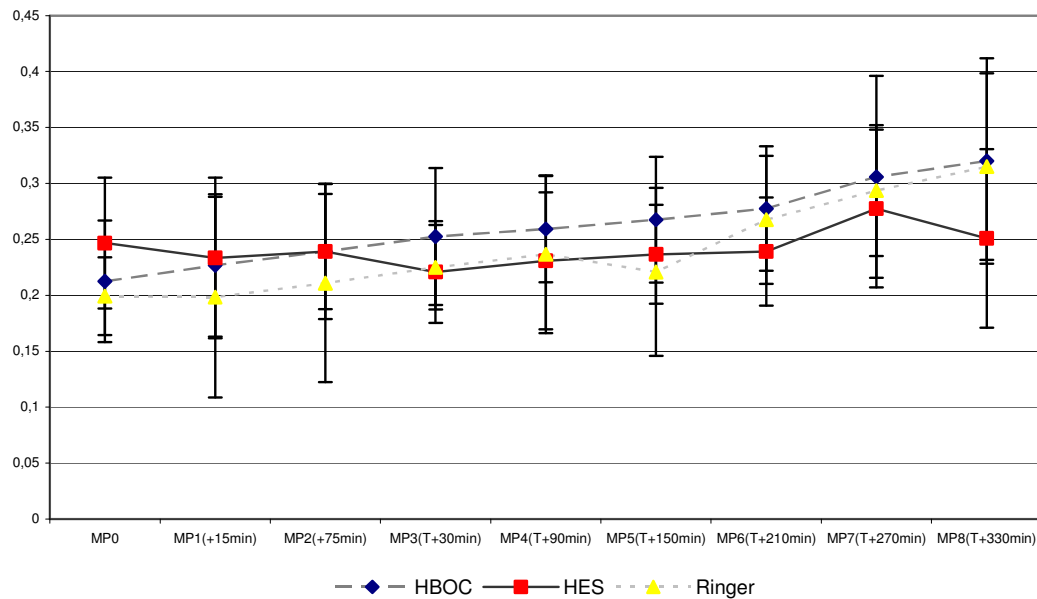


Abbildung 3.17: ERO_2 über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben als Quotient

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 1,6 (SD 0,3) CI 1,4; 1,9
HES: 1,4 (SD 0,3) CI 1,2; 1,6
Ringer: 1,5 (SD 0,3) CI 1,3; 1,7

Zwischen den Gruppen ergaben sich über den Beobachtungszeitraum im Mittel keine signifikanten Unterschiede (repeated measurements ANOVA) (Abb. 3.17).

3.7 Hämoglobingehalt (Hb) per Blutgasanalyse

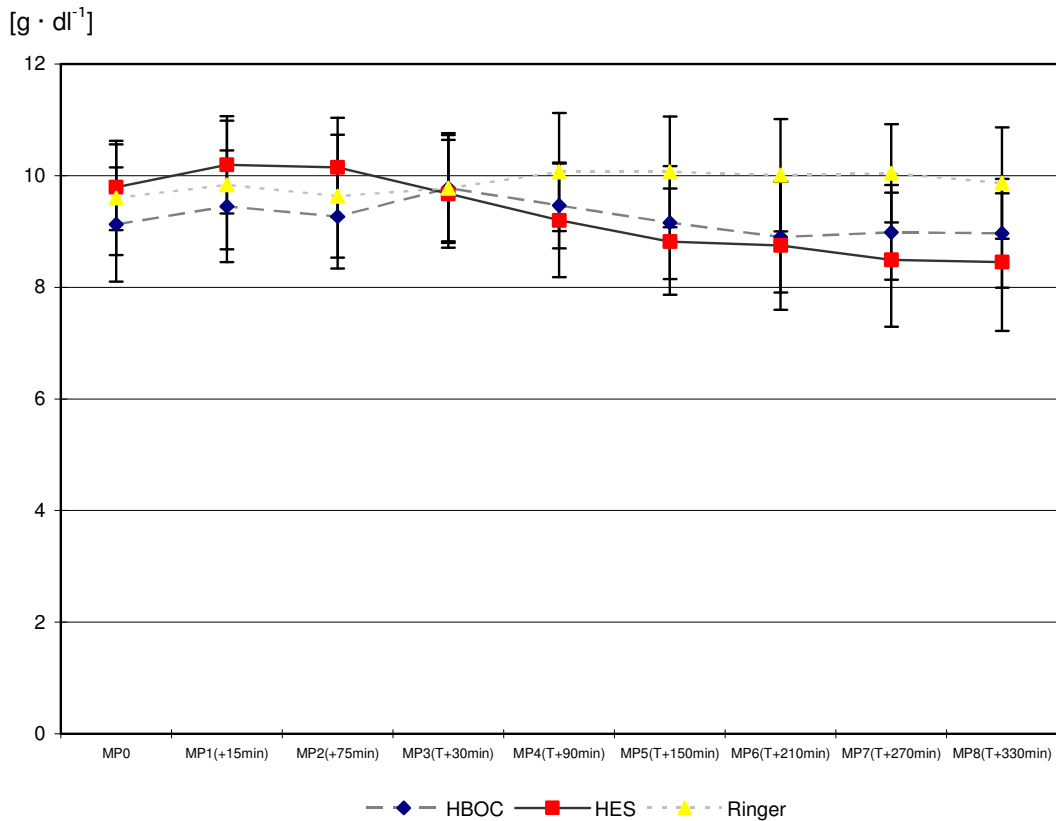


Abbildung 3.18: Hb über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in $\text{g} \cdot \text{dl}^{-1}$

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 55,4 (SD 5,4) CI 52,0; 58,8
HES: 54,2 (SD 6,3) CI 50,2; 58,2
Ringer: 59,7 (SD 6,0) CI 55,9; 63,5

Zwischen den Gruppen ergaben sich über den Beobachtungszeitraum im Mittel keine signifikanten Unterschiede (repeated measurements ANOVA) (Abb. 3.18).

3.8 Laborchemische Parameter

3.8.1 Rheologie - Viskosität

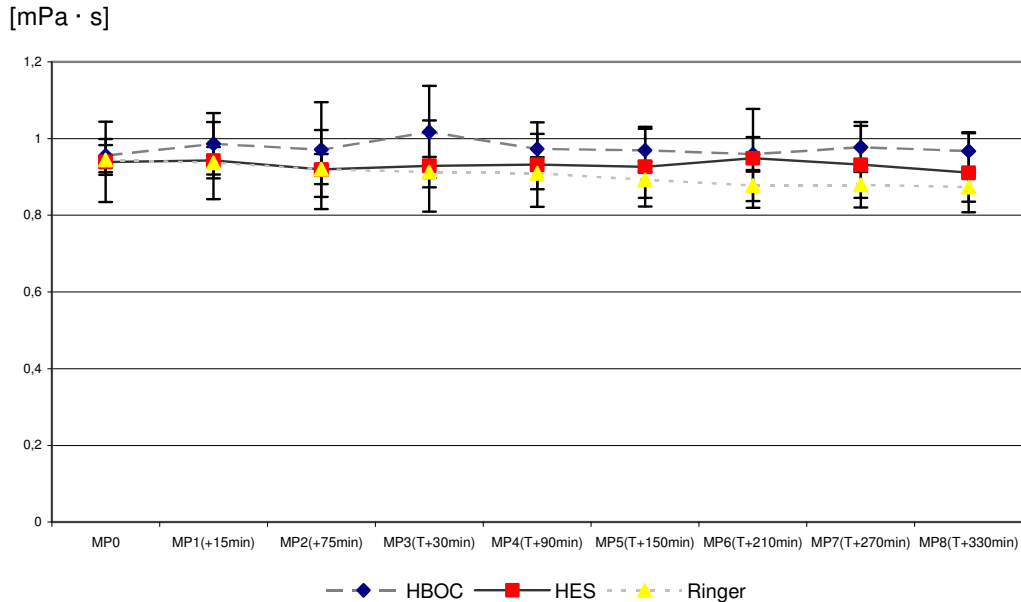


Abbildung 3.19: Viskosität über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in mPa · s

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 5,9 (SD 0,3) CI 5,7; 6,1

HES: 5,6 (SD 0,7) CI 5,2; 6,0

Ringer: 5,4 (SD 0,2) CI 5,2; 5,5

Zwischen den Gruppen ergaben sich über den Beobachtungszeitraum im Mittel keine signifikanten Unterschiede (repeated measurements ANOVA) (Abb. 3.19).

3.8.2 Rheologie - Kolloidosmotischer Druck (KOD)

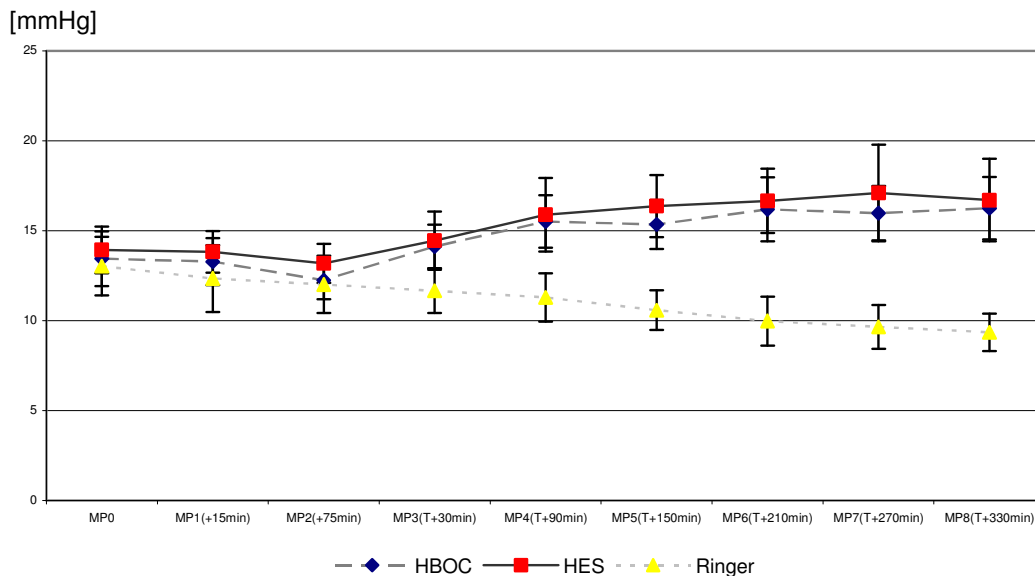


Abbildung 3.20: KOD über den Beobachtungszeitraum (MP0=vor Induktion der akuten Pankreatitis, MP1 und 2 nach Induktion der Pankreatitis, MP3-8 0,5-5,5 Stunden nach Therapie; Mittelwerte und SD); Angaben in mmHg

Fläche unter der Kurve: HBOC-301: 91,4 (SD 7,4) CI 88,7; 96,1
HES: 95,4 (SD 11,3) CI 88,3; 102,3
Ringer: 63,8 (SD 63,8) CI 59,2; 68,5

Erneut konnte durch die Varianzanalyse für wiederholte Messungen ein Gruppeneffekt (repeated measurements ANOVA $p < 0,001$) und eine Zeit-Therapie Interaktion ($p < 0,001$) detektiert werden (Abb. 3.20). Zusätzlich wurde daher für jedes Tier die Fläche unter der Kurve für die Veränderung des KOD (mit dem Zeitpunkt der Randomisierung (MP2) beginnend) berechnet. Hinsichtlich der Fläche unter der Kurve fanden sich signifikante Unterschiede zwischen den 3 Gruppen (ANOVA F-Test, $p < 0,001$). Die anschließende post-hoc Analyse (Tukey's HSD) zeigte einen erhöhten KOD in der HBOC-301 Gruppe und HES-Gruppe im Verhältnis zur Ringer-Gruppe (mittlere Differenz 27,6 (SE 3,6) bzw. 31,6 (SE 3,6); one-way ANOVA $p < 0,001$). Zwischen der HBOC-301- und der HES-Gruppe ergaben sich keine signifikanten Unterschiede.

3.8.3 Elektrolyte

Für die Konzentrationen der gemessenen Elektrolyte Natrium, Kalium und Calcium ergaben sich zwischen den Gruppen über den Beobachtungszeitraum im Mittel keine signifikanten Unterschiede (repeated measurements ANOVA).

4 Diskussion

4.1 Methodenkritik

4.1.1 Pankreatitismodell

Ein Modell zur Untersuchung einer Therapie bei akuter nekrotisierender Pankreatitis sollte sich so nah wie möglich an die Pathophysiologie halten, der man im klinischen Alltag begegnet. Wichtig ist auch, dass man ein Modell wählt, das zu einem vergleichbaren Ausmaß der Pankreasschädigung führt, so dass die Ergebnisse valide sind.

Im Jahre 1901 entdeckte der Pathologe Opie bei 2 Patienten einen Gallenstein, der die Öffnung des Ductus pancreaticus verschloss. Daraus leitete er die Theorie ab, dass es durch ein Ganghindernis zu einem Rückstau von Gallenflüssigkeit ins Pankreasgangsystem kommt, welcher eine Pankreatitis auslösen kann [104].

Seidel [120] und Pfeffer [107] stellten ein Modell auf, bei dem sie ober- und unterhalb der Papilla Vateri das Duodenum ligierten, was zu einem Reflux aus dem Duodenum in den Ductus pancreaticus führt, was eine Aktivierung von Pankreasenzymen nach sich zieht. Pannum unterbrach im Jahre 1862 die arterielle Versorgung des Pankreas, in dem er Wachskugeln in die Pankreasarterien injizierte, was zu einer akuten Pankreatitis führte [105]. Diese Theorie wurde durch verschiedene klinische Beobachtungen des Auftretens der akuten Pankreatitis nach Schock [145], Pankreastransplantation [13], Bypassoperation [32], Aortenaneurysmaoperation [51] und arterieller Embolie [112] bestätigt.

Eine experimentelle Induktion einer akuten Pankreatitis ist durch eine hormonelle Überstimulation mit Cerulein möglich [7;93]. Bei diesem Ansatz kommt es zu einer ödematösen Pankreatitis ohne große Organschädigung. Dies entspricht nicht dem angestrebten Schweregrad für diesen Versuch.

Durch eine Cholin-defiziente Ethionin-supplementierte Diät oder Zufuhr von Alkohol kann eine akute Pankreatitis induziert werden [44;98]. Bei diesem Modell ist allerdings der hohe Zeitaufwand von Nachteil. Außerdem lässt sich

der Interventionszeitpunkt schlecht abschätzen.

Durch Injektion von Na-Taurocholat in den Ductus pancreaticus [71;111] kommt die pankreatische Mikrozirkulation in Abhängigkeit von der Dosis sehr früh und irreversibel zum Stillstand, was bei der vorliegenden Fragestellung der Mikrozirkulationsverbesserung nicht sinnvoll erscheint.

Die Ligatur des Pankreasganges kommt der pathophysiologischen klinischen Situation, z.B. im Sinne einer Steinpassage, schon sehr nahe [121]. Eine Mischung aus galligem Reflux, welcher das Gangepithel zerstört und gleichzeitiger Pankreasüberstimulation ist die Grundlage für das hier vorliegende Modell [116;121]. Für das Modell spricht nicht nur die klinische Relevanz der Pathophysiologie, sondern auch die Tatsache, dass die Pankreatitis graduiert induziert werden kann und der Zeitpunkt der Intervention sehr genau zu vergleichen ist. Dieses Pankreatitismodell erlaubt es, eine schwere akute Pankreatitis zu induzieren. Sie ist schwer genug, dass Tiere ohne Therapie versterben und auch mit Therapie eine relativ hohe Sterblichkeit vorliegt, ohne dass es bei Beginn der Therapie schon zu einem irreversiblen Zusammenbruch der Mikrozirkulation gekommen ist.

Durch Injektion von chemischen Substanzen in den Ductus pancreaticus kann es bei Drücken über 20-30mmHg leicht zu einem Barotrauma führen. Durch die Druckschädigung kommt es zum Austritt der Noxe, was eine Totalnekrose des betroffenen Bereichs nach sich zieht, wofür es in der Humanmedizin kein pathophysiologisches Korrelat gibt. Während des Experiments wurde dieses durch Verwendung eines druckbegrenzten Perfusors verhindert.

4.1.2 Messmethoden

Die Versuchsreihe wurde an kardiopulmonal gesunden Tieren unter standardisierten Bedingungen, also ohne Veränderung von Beatmungsparametern durchgeführt. Um Mikrozirkulationsbeobachtungen vergleichbar zu machen, sind der mittlere arterielle Druck (MAP) und die intravasale Isovolämie von großer Wichtigkeit. Durch Konstanthaltung des Wedge-Drucks (PCWP, Pulmonary Capillary Wedge Pressure) wurde die Aufrechterhaltung der intravasalen Isovolämie gewährleistet. Der PCWP spiegelt den Druck im linken Vorhof des Herzens und damit den aktuellen

Volumenstatus wider. Er wird beim vorübergehenden Blocken der Pulmonalarterie mittels eines Ballonkatheters (Swan-Ganz-Katheter) distal des geblockten Ballons gemessen. Wenn das linksventrikuläre enddiastolische Volumen zunimmt, steigt auch der enddiastolische Druck, was als Anstieg des PCWP zu beobachten ist. Eine genauere Messung des enddiastolischen Füllungsstatus könnte man mittels eines Echokardiogramms bestimmen, allerdings zeigten Parallelversuche an Hunden und Schweinen eine hohe Korrelation des PCWP mit dem Füllungszustand des linken Herzens [40;48]. Daher ist davon auszugehen, dass der PCWP eine repräsentative Aussage über die intravasale Volumensituation gibt und somit als Überwachungsparameter der Isovolumämie geeignet ist.

Da es während des Versuchs um die Vermeidung von signifikanten Änderungen des intravasalen Volumens ging, sind vor allem die relativen Änderungen der Parameter und weniger die Absolutwerte der Füllungsdrücke von Bedeutung. Es wird daher davon ausgegangen, dass der PCWP in unserem Versuchsaufbau eine repräsentative Aussage über die intravasale Volumensituation gibt und daher als Überwachungsparameter der Isovolumämie geeignet ist.

Die Mikrozirkulation wurde mittels eines Laser Doppler Perfusion Imager gemessen, wodurch eine genaue Messung der Mikrozirkulation über Flächen ermöglicht wird [16;27;49;85;97;103]. Ein genaueres Verfahren ist die direkte Beobachtung per Fluoreszenzmikroskopie [7;25;91;95;114;142;143]. Um dieses Verfahren bei Schweinen anwenden zu können bedarf es aufwendig modifizierter Mikroskope, die nicht zur Verfügung standen.

Die histologischen Schäden am Pankreas wurden durch einen Score beschrieben, der Summe aus den Punkten hinsichtlich der Azinus-, Fettgewebsnekrosen, Inflammation und Ödem entspricht. Die Auswertung der histologischen Proben erfolgte durch 2 Pathologen, die sowohl die Untersuchung unabhängig durchführten, als auch hinsichtlich der Therapie geblindet waren. Es war eine Übereinstimmung der unabhängig voneinander arbeitenden Pathologen in ca. 90% gegeben und die Ergebnisse spiegeln den Verlauf der akuten Pankreatitis wider, so dass man davon ausgehen kann, dass der Score die Pankreasschäden reproduzierbar beschreibt.

4.1.3 Meßsubstanzen

In diesem Versuch kam die bovine Hämoglobinlösung HBOC-301 Oxyglobin™ (Oxyglobin™, Biopure Inc., Cambridge, Massachusetts, USA) zur Anwendung, da sie die einzige zellfreie Hämoglobinlösung ist, die eine Zulassung besitzt. Sie ist in Südafrika für die Behandlung der perioperativen Anämie bei Erwachsenen zugelassen. Es wurde deren Wirksamkeit mit der von Ringer- und HES-Lösungen, die im alltäglichen Klinikalltag regelmäßig gebraucht werden, verglichen. Boldt et al. zeigte in Studien, dass mittelmolekulare, niedrigrsubstituierte HES (6% HES 200/0,5) eine günstigere Beeinflussung der Mikrozirkulation im Vergleich zu hochsubstituierter HES (6% HES 450/0,7) und mittelmolekularer, hochsubstituierter HES (6% HES 200/0,62) zeigt [9].

Es wurde mittelmolekulare, niedrigrsubstituierte HES (10% HES 200.000/0,5) verwendet, da es eine ähnlich lange Halbwertszeit wie die verwendete Hämoglobinlösung aufweist.

Infusion von ungereinigtem isoliertem Hämoglobin hat allerdings einige unerwünschte Effekte. Außerhalb des Erythrozyten zerfällt das Hämoglobinmolekül spontan in seine dimeren und monomeren Untereinheiten, was die intravasale Halbwertszeit des Hämoglobins auf weniger als 90min reduziert. Die glomeruläre Filtration und Präzipitation von Hämoglobindi- und -monomeren in der Henle-Schleife bedeutet eine deutliche Nephrotoxizität. Bei Anwesenheit von freiem, insbesondere desoxygeniertem Hämoglobin kommt es zu einer gesteigerten Oxidation von zweiwertigem zu dreiwertigem Eisen im Hämoglobin. Das so entstandene Methämoglobin kann keinen Sauerstoff binden bzw. transportieren und führt zudem noch zur Bildung unerwünschter radikaler Sauerstoffspezies wie Superoxidanionen und Wasserstoffperoxid. Das humane Enzym Methämoglobinreduktase kann das Methämoglobin nur zum Teil wieder in Hämoglobin reduzieren. Während der Versuche lag der Methämoglobinanteil stets unter 0,5%. Außerdem kommt es zu einer Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve, da die Sauerstoffaffinität von freiem Hämoglobin erhöht ist. Ausgeglichen wird dieser Effekt physiologischerweise durch das intraerythrozytär vorkommende 2,3-Diphosphoglyzerat (2,3-DPG), das durch allosterische Wirkung die Bindung von Sauerstoff an das Hämoglobin mindert. Extraerythrozytär kommt nur sehr

wenig 2,3-DPG vor, was die erhöhte Affinität und die dadurch erschwerte Abgabe ins Gewebe erklärt. Der P_{50} (Sauerstoffpartialdruck, bei dem 50% des Hämoglobins mit Sauerstoff gesättigt sind) fällt bei freiem Hämoglobin auf 12-15mmHg, während er unter physiologischen Bedingungen 26-28mmHg beträgt.

Diese unerwünschten Effekte werden durch intra- und intermolekulare Modifikationen minimiert. Zum einen koppelt man Moleküluntereinheiten durch intramolekulares Crosslinking, wie z.B. per Diaspirin-Bindung zwischen beiden Alpha-Ketten, zum anderen per intermolekulares Crosslinking durch Glutaraldehyd 10 bis 15 Hämoglobintetramere aneinander. Außerdem werden mehrere Hämoglobinmoleküle an Makromoleküle wie Dextran oder Polyethylglykol konjugiert. Zudem kann das zellfreie Hämoglobin in Liposomen verkapselt werden, in die 2,3-DPG hinzugefügt werden kann, so dass die Oxydation zu Methämoglobin verzögert ist.

In einigen tierexperimentellen Untersuchungen kam es nach Gabe von zellfreiem artfremdem Hämoglobin zu Immunreaktionen, die sich beispielsweise in nachweisbaren Erhöhungen von IgG äußerten [14;18;55]. Trotz der guten Verträglichkeit moderner Hämoglobinlösungen darf eine mögliche Immunisierung mit Antikörperbildung nicht außer Acht gelassen werden. Auch die Tatsache, dass die Elimination von zellfreiem Hämoglobin über das retikuloendotheliale System und eine Speicherung in Organen wie Leber und Milz erfolgt, wirft die Frage nach einem möglichen immunsuppressiven Effekt von zellfreiem Hämoglobin auf [149]. Durch die Veränderung der sterischen Konfiguration, beispielsweise durch eine Verlagerung antigenpräsentierender Stellen von der Oberfläche hinein ins weniger reaktive Zentrum des Hämoglobinmoleküls, besteht die Möglichkeit, die Immunisierung zu minimieren. In einer experimentellen Studie von Estep et al. wurde nach intravenöser Gabe von humanem α - α vernetztem Hämoglobin bei Primaten keine Erhöhung von spezifischem IgG oder IgM nach Injektion nachgewiesen [28]. In einer experimentellen Versuchsreihe an Schafen tauschten Vlahakes et al. fast 95% des zirkulierenden Blutvolumens mit einer bovinen Hämoglobinlösung aus [141]. Alle Tiere überlebten und konnten durch zweimalige Nachinfusion der Hämoglobinlösung den Zeitraum bis zur Neubildung einer ausreichenden Anzahl an Retikulo- und Erythrozyten

überbrücken. Eine endgültige Beurteilung möglicher immunmodulierender Nebeneffekte von HBOC-301 Oxyglobin™ ist zum gegenwärtigen Stand der Kenntnisse noch nicht möglich.

4.2 Diskussion der Ergebnisse

4.2.1 Überleben

Es wurde untersucht, ob es einen Überlebensvorteil hinsichtlich der Therapie mit HBOC-301 Oxyglobin™ im Vergleich zur Therapie mit HES oder Ringer gibt. Die Überlebenszeit in Stunden wurde definiert als die Zeit vom Ende der Anästhesie bis zur Feststellung des Todes. Der maximale Beobachtungszeitraum wurde mit 144 Stunden festgelegt.

Während in der Gruppe 1 (Therapie mit HBOC-301 Oxyglobin™) 9 von den 13 Tieren den gesamten Beobachtungszeitraum überlebten, war die Überlebensrate in Gruppe 2 (Therapie mit HES) 6 von 13 und in Gruppe 3 (Therapie mit Ringer) nur 2 von 13. Auch in der Überlebenszeit zeigt sich ein Unterschied. Im Schnitt überlebten die Tiere der Gruppe 1 (Therapie mit HBOC 301 Oxyglobin™) 121 Stunden, die Tiere der Gruppe 2 (Therapie mit HES) 93 und die der Gruppe 3 (Therapie mit Ringer) nur 57 Stunden. Bei deutlicher Verschlechterung des Allgemeinzustandes eines Tieres wurde die Tötung durch den Veterinärmediziner angeordnet und dann vor Ablauf der sechs postoperativen Tage durchgeführt. Bei tot aufgefundenen Tieren wurde der Todeszeitpunkt mit Hilfe der Körpertemperatur auf zwei Stunden genau bestimmt. Die Tatsache, dass kein signifikanter Unterschied zwischen der HBOC-301- und der HES-Gruppe detektiert werden konnte, könnte darin liegen, dass es keinen Unterschied gab oder aber dass die statistische Power zu niedrig war. Um zu einer statistischen Signifikanz in der Untersuchung der Überlebensraten zu gelangen, müssten die Größe jeder Gruppe auf 165 Tiere (5% α Fehler, 80% power) gesteigert werden [33], was praktisch nicht durchführbar ist.

Vergleicht man die Ergebnisse dieses Versuches mit den Ergebnissen hinsichtlich der Therapie der akuten nekrotisierenden Pankreatitis mit HBOC-

200 und isovolämischen Hämodilution [42], die eine mittlere Überlebenszeit von 130 Stunden aufweist, und bei der 10 von 13 Tieren den gesamten Beobachtungszeitraum überlebten, so zeigt sich allein durch die Applikation der bovinen Hämoglobinlösung der gleiche Therapieeffekt auf das Überleben in einem definierten Nachuntersuchungszeitraum ohne die in der klinischen Praxis doch sehr aufwendige isovolämische Hämodilution.

4.2.2 Mikrozirkulation

Da es sich bei HBOC-301 Oxyglobin™ um einen nicht-korpuskulären Sauerstoffträger handelt, kann der Sauerstoff aufgrund des plasmatischen Transportes auch Gebiete erreichen, die von Erythrozyten nicht mehr durchflossen werden können. Aber auch in Gefäßabschnitten, in denen ein Erythrozyt von Plasma umflossen wird, erleichtert das HBOC-301 die Sauerstoffabgabe durch einen Überbrückungseffekt. Hierbei kann der Sauerstoff vom Erythrozyten über die HBOC-301 Moleküle verbindend an das Gewebe transportiert werden, da die Hämoglobinlösungen die Kapillaren homogen ausfüllen und somit eine geringere Diffusionsstrecke ermöglichen [29;84].

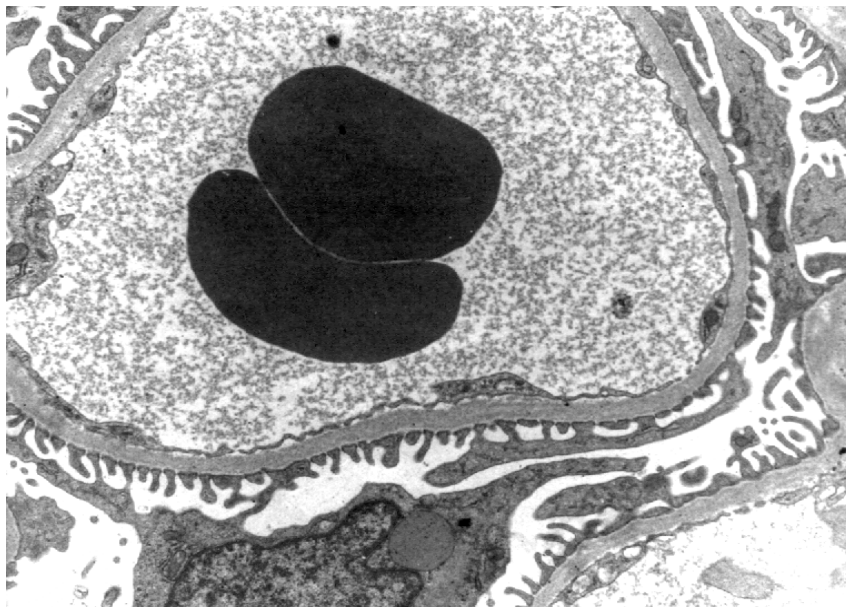


Abbildung 4.1: Elektronenmikroskopische Aufnahme einer renalen Kapillare: 2 Erythrozyten werden homogen von HBOC Molekülen umgeben [84]

Ein weiterer vorteilhafter Effekt des HBOC beruht unter anderem auf der niedrigeren Sauerstoffaffinität des bovinen Hämoglobins (p50 von 36mmHg vs. 26mmHg im Vergleich zu zellulären humanen Hämoglobin). Die Sauerstoffdissoziationskurve des HBOC-301 ist nach rechts verschoben, was eine Sauerstoffabgabe an das durch die akute Pankreatitis sauerstoffdefiziente Gewebe erleichtert. Dies ist insbesondere bei Patienten mit schwerer akuter Pankreatitis von Bedeutung, da diese zu einem hohen Prozentsatz schon bei Aufnahme eine nach links versetzte Sauerstoffbindungskurve aufweisen, was die lebenswichtige Abgabe von Sauerstoff an das Gewebe erschwert [47].

Zellfreies Hämoglobin besitzt eine hohe Affinität zu Stickstoffmonoxid (NO), so genanntes NO-Scavenging [2;3;137]. Stickstoffmonoxid wird vom Gefäßendothel freigesetzt und wirkt relaxierend auf die Gefäßmuskulatur, was zu einer Vasodilatation führt. Nach Passage freier Hämoglobinmoleküle durch die Endothelbarriere der glatten Gefäßmuskulatur und Transzytose in die Gefäßmedia kommt es über Bindung von NO an die Häm-Gruppe indirekt zur Vasokonstriktion. Zusätzlich lässt sich der vasokonstringierende Effekt von HBOC-Lösungen über Endothelinabgabe und Modulation von alpha-adrenergen Rezeptoren erklären [118;122]. Trotz dieser Effekte kam es zu einer Verbesserung der pankreatischen Mikrozirkulation durch Gabe von HBOC-301 Oxyglobin™ [50;129]. Das scheint darin begründet, dass diese Lösungen im Gegensatz zu Erythrozyten Bezirke jenseits von kritischen Stenosen erreichen können.

Bereits 1994 wiesen Sharma et al. bei Ratten nach, dass Diaspirin-crosslinked Hemoglobin (DCLHb) zwar den systemischen Gesamtwiderstand erhöhte, aber zum einen im Intestinum den Gefäßwiderstand nicht beeinflusste und zum anderen sogar den Blutfluss zum Magen und Dünndarm erhöhte [122]. Ähnliche Beobachtungen konnten von Driessen et al. bei einem Schockmodell bei Hunden gemacht werden, in dem sie nach Gabe von HBOC die Durchblutung des Splanchnikusgebietes aufrechterhalten konnten und keinen histologischen Schaden fanden, obwohl es zum Anstieg des systemischen Gefäßwiderstandes kam [23].

Während unserer Untersuchung der Wirkung der unterschiedlichen Lösungen im Hinblick auf die Mikrozirkulation konnte beobachtet werden, dass es zu

einer signifikanten Verbesserung der Mikrozirkulation durch Gabe von HBOC-301 Oxyglobin™ im Vergleich zur Gabe von Ringer-Lösung kommt. Nicht signifikant sind allerdings die Unterschiede zwischen der HBOC-301- und der HES-Gruppe bzw. zwischen der HES- und der Ringer-Gruppe.

Diese Beobachtungen sind vergleichbar mit den Ergebnissen, die bei der Therapie der akuten nekrotisierenden Pankreatitis mit HBOC-200 und isovolämischer Hämodilution erarbeitet wurden. Auch hier zeigt sich kein signifikanter Unterschied zwischen der HBOC- und der HES-Gruppe. Wiederum gibt es eine deutliche Differenz zwischen der HBOC- und der Ringer-Gruppe.

Vergleicht man die Mikrozirkulation zwischen den Gruppen HBOC-301 ohne Hämodilution und HBOC-200 mit Hämodilution, so zeigen sich, allerdings nicht signifikant, höhere Werte in der HBOC-301 Gruppe. Diese lassen sich darauf zurückführen, dass aufgrund der isovolämischen Hämodilution weniger korpuskuläre Anteile im Blutkreislauf zirkulieren, die den Laserstrahl des Laser-Doppler-Scanners reflektieren können. Wenn man die Gewebsoxygenierung der HBOC-Gruppen mit und ohne Hämodilution betrachtet, so zeigt sich allerdings kein signifikanter Unterschied in den tpO₂-Werten.

Schlussfolgernd kann man sagen, dass durch Gabe von HBOC-301 eine deutliche Verbesserung der Mikrozirkulation im Pankreas erreicht werden kann, wodurch ein Gewebeuntergang verringert wird. Allerdings zeigt sich die alleinige Therapie mit HBOC-301 nur durch den logistisch geringeren Aufwand gegenüber der Therapie mit HBOC-200 mit Hämodilution in Bezug auf die Mikrozirkulation überlegen.

4.2.3 Histologie

Wie bereits in der Einleitung erwähnt ist die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation ein entscheidender Schritt im Verlauf der akuten Pankreatitis. Ein histologischer Schaden entwickelt sich sehr früh und ist nicht die weiterentwickelnde Form einer ödematösen Pankreatitis [1;61;90;102]. Eine frühe therapeutische Intervention zur Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation entscheidet über die Gewebsschädigung. Durch rechtzeitige Verbesserung der

Mikrozirkulation konnten Klar et al. zeigen, dass sich bei Patienten mit akuter nekrotisierender Pankreatitis, bei denen die Mikrozirkulation durch isovolämische Hämodilution verbessert wurde, in einem hohen Prozentsatz keine Progression der CT-dokumentierten Nekrosen fand [66]. Dieses Erkenntnis wird in den vorliegenden Versuchsreihen durch die parallelen Verläufe (verbesserte Mikrozirkulation-geringerer Gewebeschaden) unterstützt. In dieser Studie begannen alle Therapieoptionen 75min nach Induktion einer massiven nekrotisierenden Pankreatitis, so dass gleiche Ausgangsbedingungen vorlagen. Bei der histologischen Auswertung zeigte sich ein signifikanter Unterschied des Gesamthistocores zwischen der HBOC-301- und der Ringer-Gruppe. Allerdings zeigten sich durchaus deutliche Unterschiede unterhalb der Gruppen hinsichtlich Azinusnekrosen, wobei sich die HBOC-301 Gruppe mit einem Score von 1 deutlich von der HES-Gruppe mit einem Score von 2 und der Ringer-Gruppe mit einem Score von 2,5 abhebt. Auch hinsichtlich Fettnekrosen und Inflammation ergibt sich für die HBOC-301 Gruppe im Vergleich der niedrigste Score. Erklären lässt sich der geringere Gewebeschaden durch die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation bedingt durch die Gabe von HBOC-301 Oxyglobin™. Die Rechtsverschiebung der Sauerstoffbindungskurve im Vergleich zum humanen Hämoglobin und ein ausgeprägter Bohreffekt des HBOC begünstigen die Sauerstoffabgabe im schlecht perfundierten, azidotischen Gewebe [31;78;129]. Diese Tatsache in Verbindung mit einem zusätzlichen Angebot an plasmatisch gebundenen Sauerstoff könnte eine Erklärung für den geringeren Gewebeschaden in der HBOC-301 Gruppe darstellen. Vergleicht man die Histocores bei Therapie mit HBOC mit bzw. ohne Hämodilution zeigen sich nahezu identische Werte, so dass die Therapien in Hinblick auf die Gewebeschädigung als gleichwertig anzusehen sind.

4.3 Begleiteffekte in der Anwendung von HBOC

Neben den angesprochenen Problembereichen, die bei der Anwendung von Hämoglobinlösungen auftreten und bereits diskutiert wurden, wie z.B. die Vasokonstriktion (siehe Kapitel 2.16.1), stellen in der klinischen Anwendung

von HBOC die Oxygenierung von plasmatischem Hämoglobin zu Met-Hämoglobin, eine mögliche Immunogenität von HBOC beziehungsweise Immunsuppression durch HBOC und ein nephrotoxischen Effekt mögliche Problemfelder dar.

4.3.1 Met-Hämoglobin

Eine Oxydation des Eisenatoms im Häm-Anteil des Hämoglobins führt zur Entstehung von Met-Hämoglobin (MetHb), das am Sauerstofftransport dann nicht mehr teilnimmt. Da den Hämoglobinlösungen die intraerythrozytär vorliegenden Enzyme zur Reduktion fehlen, kann es bei diesen Lösungen vermehrt zu einem persistierenden Anstieg der MetHb Konzentration kommen. Untersuchungen von Linberg et. al ergaben jedoch, dass Konzentrationen von bis zu 10% zu keiner signifikanten Reduktion der Gewebsoxygenierung führen [83]. Vor dem Einsatz von HBOC in unseren Versuchen wurde der Anteil von MetHb untersucht (siehe Einleitung), so dass eine Konzentration >5% vor Applikation sicher ausgeschlossen werden konnte. Nach Applikation kam es zu keinem Anstieg der MetHb Konzentration. Die Konzentrationen bewegten sich in allen Fällen unter 0,5%. Diese Befunde stehen im Einklang mit den Resultaten bisheriger Studien mit HBOC, in denen weder tierexperimentell [128], noch beim Einsatz am Menschen [126] klinisch relevante Konzentrationen nachgewiesen werden konnten. Prinzipiell kann ein Zusatz von Redox-Enzymen oder die Einkapsulierung von HBOC die Oxydation des Häms zusätzlich vermindern, und somit gewährleisten, dass ein noch höherer Anteil des Hämoglobins anhaltend zum Sauerstofftransport zur Verfügung steht [19;151]. Eine Möglichkeit stellt zum Beispiel die Bindung von Polynitroxiden an Hämoglobin dar, wodurch katalytisch aktive Redoxzentren entstehen, die die Aufgabe des intraerythrozytären Redoxsystems übernehmen [69].

4.3.2 Immunogenität bzw. Immunsuppression

Trotz der guten Verträglichkeit moderner Hämoglobinlösungen in moderaten Dosen ist eine mögliche Immunisierung durch Hämoglobinlösungen besondere

Aufmerksamkeit zu schenken, da ein heterogenes oder zumindest chemisch modifiziertes Protein appliziert wird, welches eine Antikörperbildung verursachen kann. Nach Applikation von zellfreiem artfremdem Hämoglobin kam es in einigen tierexperimentellen Studien zu Immunreaktionen, die sich z.B. in nachweisbaren Erhöhungen von IgG äußerten [14;18;55]. Eine Möglichkeit die Immunisierung zu minimieren, stellt die Veränderung der sterischen Konfiguration des Hämoglobinmoleküls dar, die die Antigen präsentierenden Stellen von der Oberfläche hin zum weniger reaktiven Zentrum des Hämoglobinmoleküls verlagern sollen. So konnte in einer experimentellen Studie von Estep et. al, bei der chemisch modifiziertes Hämoglobin angewendet wurde, keine Erhöhung von spezifischem IgG oder IgM nach fünf aufeinander folgenden Injektionen von humanem α - α vernetztem Hämoglobin bei Primaten gefunden werden [28].

Aufgrund der Elimination von zellfreiem Hämoglobin über das retikuloendotheliale System (RES) aus dem Intravasalraum und die Speicherung in Organen wie Leber und Milz stellt sich die Frage nach einem möglichen immunsuppressiven Effekt von zellfreiem Hämoglobin [149]. In tierexperimentellen Studien wiesen Crowley [17] und White [149] eine verminderte Abwehrfunktion auf Bakteriämie und eine Verstärkung von Endotoxineffekten in Zusammenhang mit der Applikation von Hämoglobin-Lösungen nach, was mit einer immunsupprimierenden Wirkung auf das RES erklärt wurde. Langermans et al. konnten außerdem eine verbesserte Wundheilung nach Behandlung mit HBOC nachweisen [73;125].

In einer tierexperimentellen Studie an Schafen tauschten Vlahakes et. al. annähernd 95% des zirkulierenden Blutvolumens mit einer bovinen Hämoglobinlösung aus [141]. Alle Tiere überlebten unter der Bedingung einer zweimaligen Nachinfusion der Hämoglobinlösung, die aufgrund der intravasalen Verweildauer des Präparates von etwa 20h erforderlich war. Dadurch konnte der Zeitraum bis zur Neubildung einer ausreichenden Anzahl an Retikulo- und Erythrozyten wirkungsvoll überbrückt werden. Nach Applikation von HBOC konnten bei Freiwilligen und Patienten erhöhte Serumeisen- und Ferritinspiegel sowie eine gesteigerte Retikulozytose gemessen werden, was ein Hinweis darauf sein können, dass abgebautes zellfreies Hämoglobin als Ausgangssubstanz für eine gesteigerte Erythropoese

dienen kann [126]. Auf Grund der bisherigen Datenlage kann aber eine endgültige Beurteilung möglicher immunmodulierender Nebeneffekte von HBOC noch nicht abgegeben werden.

4.3.3 Nephrotoxizität

In den Anfangsjahren der experimentellen Forschung mit stromafreien Hämoglobinlösungen (SFH) zogen nephrotoxische Nebenwirkungen schwerwiegende Komplikationen nach sich [43]. Außerdem kam es nach Substitution von SFH zu Gerinnungs- und Komplementaktivierung [31;96;109]. Ursächlich hierfür waren Verunreinigungen durch Phospholipidmembranen und Stromareste der Erythrozyten [31;92]. Ob andere Mechanismen, wie Vasokonstriktion, Reduktion der glomerulären Filtrationsrate und Tubulusobstruktion durch Hämoglobinpräzipitate zur Nephrotoxizität herkömmlicher SFH beigetragen haben, ist nicht vollständig geklärt [6;135]. Ein erheblicher Teil der organotoxischen Nebenwirkungen in den älteren Hämoglobinlösungen konnte durch Einführung der Ultrapurifikation z.B. durch das Abscheiden des freien Hämoglobins an Chromatographiesäulen beseitigt werden [134]. Dies zeigte sich in einer tierexperimentellen Untersuchung von Lee, in der die Nephrotoxizität von bovinen Hämoglobin durch Ultrapurifikation drastisch gesenkt wurde [79].

4.4 Klinische Therapiestrategien bei akuter schwerer Pankreatitis

Derzeit gibt es keine spezifische Behandlung für die akute Pankreatitis, sondern die Therapie erfolgt rein symptomorientiert. Die Basistherapie basiert auf einer adäquaten Schmerzbehandlung und der möglichst frühen Erkennung des Schweregrades, um eine adäquate Flüssigkeitssubstitution durchzuführen, welche die Mikrozirkulation aufrechterhält. Es werden die auftretenden Komplikationen z.B. renaler, pulmonaler oder septischer Genese gezielt behandelt. Die meisten Patienten (ca. 80%) erkranken an einer leichten und komplikationslosen Pankreatitis und erholen sich binnen weniger Tage. Kommt es allerdings zu einem schweren Verlauf mit Komplikationen ist

eine Intensivbehandlung unabdingbar. Handelt es sich um eine biliär-induzierte Pankreatitis sollte nach einigen Autorenangaben zeitnah eine Steinextraktion und ggf. eine Papillotomie mittels ERCP erfolgen [30;81]. Andere Arbeitsgruppen hingegen halten die ERCP mit Papillotomie und Steinextraktion nur bei Persistenz der Cholestase bzw. elektiv im Intervall für indiziert [38;100].

Eine wichtige Säule der Basistherapie stellt die Flüssigkeitssubstitution dar. Bei der akuten Pankreatitis kann es zu hohen Volumenverschiebungen kommen, z.B. ins Retroperitoneum, die Bauch- oder Pleurahöhle, welche anhand des ZVD, der stündlichen Urinausscheidung und des arteriellen Drucks adäquat ausgeglichen werden müssen. In ausgeprägten Verläufen kann es sogar zu einem Flüssigkeitsbedarf von über 500ml pro Stunde kommen, der durch alleinige Gabe von kristalloiden Lösungen nicht zu beherrschen ist [22]. Die Gabe von Kolloiden zeigt sich als sehr sinnvoll, da es dadurch zur Verbesserung der Mikrozirkulation und einer Senkung der Morbidität und Mortalität kommt [117]. Ein engmaschiges, gegebenenfalls invasives hämodynamisches Monitoring ist von großer Wichtigkeit. Ist auch durch rasche Volumenzufuhr keine Stabilisierung der Hämodynamik zu erreichen, ist die Gabe von Katecholaminen indiziert. Neben der Volumen- und Katecholamintherapie muss regelmäßig die Indikation von Transfusionen, Kortisontherapie, intensivierter Insulintherapie, lungenprotektiver Beatmung und Antibiose überprüft werden.

Während die orale Nahrungskarenz eine subjektive Erleichterung für die Patienten hinsichtlich Übelkeit, Erbrechen und Schmerzen darstellt, so zeigen Studien allerdings, dass durch enterale Ernährung, z.B. über eine Jejunalsonde, die Darmintegrität erhalten bleibt, wodurch eine bessere Durchblutung gewährleistet und einer Atrophie der Darmmukosa vorgebeugt wird [124]. Die Aufrechterhaltung der Darmmukosa-Barriere spielt auch eine entscheidende Rolle hinsichtlich der bakteriellen Translokation mit resultierender Nekroseninfektion [113;136], welche eine chirurgische Intervention mittels Nekrosektomie und Lavage notwendig machen kann [110]. Pankreasnekrosen korrelieren eng mit einem Multiorganversagen [62;68] und sind als wichtigster prognostischer Risikofaktor für den letalen Ausgang der Pankreatitis anzusehen [12]. Besteht ein Verdacht auf Pankreasnekrosen

muss innerhalb der ersten 72 Stunden eine kontrastmittelangereicherte Computertomographie des Abdomens erfolgen [77], damit ein Ausmaß der Nekrosen und die Notwendigkeit einer chirurgischen Intervention abgeschätzt werden kann, auch wenn es Arbeitsgruppen gibt, die die chirurgische Intervention unabhängig von dem Ausmaß oder dem bakteriellen Status der Nekrosen sehen [110]. Langzeitstudien zeigten, dass die perkutane Drainage von infizierten Pankreasnekrosen eine Alternative zur chirurgischen Intervention darstellen könnte [26].

Um den Darm als wahrscheinlichste Quelle der Superinfektion der Pankreasnekrosen auszuschalten, wird die prophylaktische Gabe von Antibiotika diskutiert [64;94]. Die meisten der Infektionen sind durch gramnegative Erreger wie E. coli, Pseudomonas, Klebsiellen oder Enterokokken verursacht. Große randomisierte Studien belegten den Vorteil einer intravenösen Antibiose [46;86;106;108]. Es besteht jedoch die Gefahr, dass bei häufiger Anwendung der Antibiotika vermehrt Antibiotikaresistenzen auftreten. So wiesen Gloor et al. in einer prospektiven Beobachtungsstudie bei 21% der Patienten, die bei nekrotisierender Pankreatitis prophylaktisch ein Antibiotikum erhielten, Resistenzen gegen das eingesetzte Antibiotikum nach [45].

Eine ausreichende Analgesie nimmt einen wichtigen Stellenwert in der Basistherapie ein. Patienten leiden häufig unter stärksten Schmerzen, was den Einsatz von Opioid-Analgetika in den meisten Fällen unabdingbar macht. Allerdings darf man in diesem Zusammenhang nicht die konstriktive Wirkung einiger Opioide auf den Sphincter Oddi außer Acht lassen. Bei Pethidin und Tramal wurde kein konstriktiver Effekt nachgewiesen [130;150]. Eine Behandlung mittels Periduralkatheter (Th 7 bis Th 10) hilft nicht nur in der Schmerzbekämpfung, sondern dient durch Sympathikolyse und damit verbundener erhöhter Motilität auch der Ileusprophylaxe [5;99].

Zusätzlich sind eventuell weitere Therapien, wie Hämofiltration, Beatmung, Behandlung von Gerinnungsstörungen und metabolischen Entgleisungen, notwendig, falls Komplikationen auftreten.

4.5 Experimentelle Therapiestrategien bei schwerer akuter Pankreatitis

Es gibt eine Reihe experimenteller Untersuchungen zur Prophylaxe und Therapie der akuten Pankreatitis, aber keine hat bisher Einzug in den klinischen Alltag gefunden.

Es wurden Untersuchungen zu dem plättchenaktivierenden Faktor (PAF) und dem interzellulären Adhäsionsmolekül-1 (ICAM-1) durchgeführt. PAF ist ein potentes Lipid Autocoid, welches als Mediator der Entzündungsreaktion wirkt und auf dem pankreatischen Gefäßendothel lokalisiert ist [34]. Verschiedene Arbeitsgruppen belegten die therapeutische Wirkung von PAF-Antagonisten [20;21;36;72], aber in einer klinischen Studie des PAF-Antagonisten Lexipafant konnte zwar die Rate an septischen Komplikationen verringert werden, allerdings kam es zu keinem Überlebensvorteil oder Reduktion der Rate an Multiorganversagen gegenüber der Placebogruppe [63;65]. ICAM-1 wird auf Endothelzellen exprimiert und ist für die Vermittlung von Leukozyten-Endothel-Interaktion verantwortlich und spielt somit eine tragende Rolle in der Entstehung von Mikrozirkulationsstörungen [8;70;101;148]. Der Arbeitsgruppe um Foitzik ist es durch Gabe von Antikörpern gegen ICAM-1 gelungen, die Mikrozirkulation zu verbessern und eine Volumenverschiebung in den dritten Raum zu verringern [8].

Andere Untersuchungen zeigten, dass durch Gabe von Endothelin-Rezeptor-Blockern ein sogar noch größerer Effekt hinsichtlich der Reduktion von Leukozytenadhärenz und Verringerung des kapillären Lecks zu erzielen war als durch PAF-Antagonisten [24;36]. Endothelin-1 ist ein vasoaktives Peptid, welches sich in dem Endothel von Gefäßwänden findet und bei schwerer akuter Pankreatitis die Entzündungsantwort vermittelt. Durch die Gabe des Endothelin-Rezeptor-Antagonisten LU-135252 konnte sogar die Letalität von 42% auf 12% ($p < 0,05$) im Rattenversuch gesenkt werden [35].

Bradykinin führt bei akuter Pankreatitis zu einer gesteigerten Entzündungsreaktion, Vasodilatation mit konsekutiver Hypotension, Leukozytenaktivierung, vermehrter kapillärer Permeabilität und eine Verstärkung der Reperfusionsschäden am Rattenpankreas [10;56;123]. Durch den Einsatz des Bradykinin-Antagonisten Icatibant bei schwerer akuter

Pankreatitis konnte im Rattenmodell eine Aufrechterhaltung der funktionellen Kapillardichte und eine Verringerung der Leukozytenadhärenz erreicht werden [7].

Als positiv stellte sich auch die Gabe von Dexametason (0,5mg/kg KG) hinsichtlich einer Senkung der Mediatoren IL6, TXB2 und 6-keto-PGI1alpha und Verbesserung der Überlebensrate bei schwerer akuter Pankreatitis im Rattenmodell heraus [144].

Werner et al. konnten durch Gabe eines Stickstoffmonoxyddonators bei experimenteller akuter Rattenpankreatitis den Verlauf einer schweren Pankreatitis abschwächen [147].

4.6 Ausblick für HBOC in der Behandlung der akuten Pankreatitis

Die durchgeführten tierexperimentellen Untersuchungen führten zu ermutigenden Ergebnissen, was Anlass zu einer klinischen Untersuchung von HBOC bei schwerer akuter Pankreatitis bieten sollte. Aufgrund der niedrigen Inzidenz wäre es sinnvoll, diese Untersuchung als Multicenterstudie anzulegen, da die Patientengenerierung an einer einzelnen Klinik zu viel Zeit in Anspruch nehmen würde. Das Überleben sollte hierbei Primärparameter bei einer Erkrankung mit immer noch hoher Letalität sein. Bei auch heute noch fehlenden kausalen Therapiestrategien, die effektiv zu einem relativ frühen Zeitpunkt die Entstehung von Nekrosen und Organkomplikationen verhindern können, stellt die Applikation von HBOC-301 und HES als Kombination von rheologischer und O₂-liefernder Therapie möglicherweise eine Option zur Behandlung einer schweren akuten Pankreatitis dar.

5 Zusammenfassung

Die schwere akute Pankreatitis ist heutzutage trotz modernster intensivmedizinischer Maßnahmen immer noch mit einer hohen Letalität verbunden. Es gibt trotz umfangreicher Forschungen noch keine kausale Therapie. Ein wichtiger Schritt in der Pathogenese von der milden, ödematösen Pankreatitis zur schweren, nekrotisierenden Pankreatitis stellt die Enzymaktivierung und der anschließende Zusammenbruch der Mikrozirkulation dar. Zum Zeitpunkt der klinischen Aufnahme der Patienten ist es bereits irreversibel zur Enzymaktivierung gekommen, so dass man hier leider mit keiner Therapieoption ansetzen kann. Aus dem Grunde kommt der Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation ein besonders hoher Stellenwert zu. Aus diesem Grund wurde in dieser Studie die Wirkung der zellfreien Hämoglobinlösung HBOC-301 Oxyglobin™ bei akuter nekrotisierender Pankreatitis hinsichtlich der Mikrozirkulation, des histologischen Schadens und des Überlebens im Vergleich zur Wirkung von HES und Ringer im Schweinmodell untersucht. Die Untersuchung erfolgte prospektiv, randomisiert an 39 Schweinen (jeweils 13 Tiere pro Gruppe). Alle Tiere erhielten eine balancierte Allgemeinanästhesie mit kontrollierter Beatmung. Nach Laparotomie wurde der Ductus pancreaticus kanüliert. Die Induktion der Pankreatitis erfolgte durch Gabe von Glycodeoxycholsäure (10 mmol/l, 0.4 ml/kg intraduktal über 10 Minuten) und Cerulein (5 µg/kg/h i.v.). Die Mikrozirkulation wurde mittels eines Laser-Doppler-Scanner PeriScan PIM II der Firma Perimed gemessen. 75 Minuten nach Pankreatitisinduktion wurde die Therapie begonnen. In diesem Zeitraum zeigten sich bei allen Versuchstieren hinsichtlich der Demographie und den Ausgangswerten keine Unterschiede. Die Einteilung erfolgte randomisiert in 3 Gruppen. Gruppe 1 erhielt HBOC-301 Oxyglobin™, Gruppe 2 HES 200000/0,5, Gruppe 3 Ringer. In der HES-Gruppe wurde durch Noradrenalin der arterielle Mitteldruck auf das Niveau der Gruppe 1 angehoben. 6 Stunden nach Beginn der Therapie wurde die Narkose beendet und die Tiere extubiert. Der maximale Beobachtungszeitraum betrug 144 Stunden, anschließend wurden die Tiere, die überlebt haben, getötet. Falls es einem Tier vor Ablauf des Beobachtungszeitraums klinisch schlecht ging, wurde es nach tierärztlicher

Begutachtung getötet. Allen Tieren wurde nach der Tötung Gewebeproben aus dem Pankreas entnommen und geblindet von 2 unabhängigen Pathologen histologisch aufbereitet, untersucht und die Ergebnisse in einem Histocore zusammengefasst.

In der HBOC-301 Gruppe überlebten 9 Tiere den gesamten Beobachtungszeitraum, in der Ringer-Gruppe nur 2. Dieser Unterschied ist signifikant ($p < 0,001$). In der HES-Gruppe überlebten 6 Tiere.

Hinsichtlich der Mikrozirkulation zeigte sich eine bessere Mikrozirkulation in der HBOC-301 Gruppe im Vergleich zur Ringer-Gruppe. Die HES-Gruppe zeigte zu beiden Gruppen keinen signifikanten Unterschied.

Der histologische Schaden ist in der HBOC-301 Gruppe am geringsten mit einem Gesamtscore von 5,5. Der Gesamtscore in der HES-Gruppe beträgt 7, in der Ringer-Gruppe 9,5. Vor allem in der HBOC-301 Gruppe wurde ein geringer Schaden an den Azinuszellen festgestellt.

Ein Vergleich der Therapieoptionen HBOC mit und ohne Hämodilution zeigt keinen signifikanten Unterschied in der Mikrozirkulation, im Gewebeschaden und im Überleben. Daraus kann man schließen, dass die Therapiestrategien als gleichwertig gesehen werden können. Allerdings zeigt sich durch den hohen logistischen Aufwand der Hämodilution im klinischen Alltag ein Vorteil bei alleiniger Therapie mit HBOC.

Die Gabe von HBOC-301 Oxyglobin™ bei akuter schwerer Pankreatitis führt zu einer Verbesserung der Mikrozirkulation, und dadurch zu einer besseren Sauerstoffversorgung des Gewebes und verbunden damit zu geringeren histologischen Schäden. Dieser positive Verlauf zeigt sich auch in dem Überlebensvorteil der HBOC-301 Gruppe verglichen mit den Kontrollgruppen. Die Applikation von HBOC-301 zur Optimierung des Sauerstofftransportes stellt möglicherweise eine Option zur Behandlung einer schweren akuten Pankreatitis dar und sollte im Rahmen einer klinischen Studie bei Patienten mit akuter schwerer Pankreatitis weitergehend untersucht werden.

6 Literaturverzeichnis

- (1) Acosta JM, Rossi R, Galli OM, Pellegrini CA, Skinner DB. Early surgery for acute gallstone pancreatitis: evaluation of a systematic approach. *Surgery* 1978 April;83(4):367-70.
- (2) Alayash AI, Cashon RE. Reactions of nitric oxide and hydrogen peroxide with hemoglobin-based blood substitutes. *Ann N Y Acad Sci* 1994 November 17;738:378-81.
- (3) Alayash AI, Ryan BA, Fratantoni JC, Cashon RE. Redox reactivity of modified hemoglobins with hydrogen peroxide and nitric oxide: toxicological implications. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22(3):373-86.
- (4) Baudin V, Bihoreau MT, Kister J, Marden M, Pagnier J, Poyart C. Functional properties of beta(NA1)Val-deleted,(NA2)His-->Met hemoglobin synthesized in *Escherichia coli*. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22(3):739-45.
- (5) Bernhardt A, Kortgen A, Niesel HC, Goertz A. [Using epidural anesthesia in patients with acute pancreatitis--prospective study of 121 patients]. *Anaesthesiol Reanim* 2002;27(1):16-22.
- (6) Birndorf NI, Lopas H. Effects of red cell stroma-free hemoglobin solution on renal function in monkeys
1. *J Appl Physiol* 1970 November;29(5):573-8.
- (7) Bloechle C, Kusterer K, Kuehn RM, Schneider C, Knoefel WT, Izbicki JR. Inhibition of bradykinin B2 receptor preserves microcirculation in experimental pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1998 January;274(1 Pt 1):G42-G51.
- (8) Bochner BS, Lusinskas FW, Gimbrone MA, Jr., Newman W, Sterbinsky SA, Derse-Anthony CP, Klunk D, Schleimer RP. Adhesion of human basophils, eosinophils, and neutrophils to interleukin 1-activated human vascular endothelial cells: contributions of endothelial cell adhesion molecules. *J Exp Med* 1991 June 1;173(6):1553-7.
- (9) Boldt J, Zickmann B, Rapin J, Hammermann H, Dapper F, Hempelmann G. Influence of volume replacement with different HES-solutions on microcirculatory blood flow in cardiac surgery. *Acta Anaesthesiol Scand* 1994 July;38(5):432-8.
- (10) Briner VA, Tsai P, Schrier RW. Bradykinin: potential for vascular constriction in the presence of endothelial injury. *Am J Physiol* 1993 February;264(2 Pt 2):F322-F327.

- (11) Bruennler T, Hamer OW, Lang S, Gruene S, Wrede CE, Zorger N, Herold T, Siebig S, Rockmann F, Salzberger B, Feuerbach S, Schoelmerich J, Langgartner J. Outcome in a large unselected series of patients with acute pancreatitis. *Hepatogastroenterology* 2009 May;56(91-92):871-6.
- (12) Buchler MW, Gloor B, Muller CA, Friess H, Seiler CA, Uhl W. Acute necrotizing pancreatitis: treatment strategy according to the status of infection. *Ann Surg* 2000 November;232(5):619-26.
- (13) Busing M, Hopt UT, Quacken M, Becker HD, Morgenroth K. Morphological studies of graft pancreatitis following pancreas transplantation. *Br J Surg* 1993 September;80(9):1170-3.
- (14) Chang TM, Varma R. Immunological and systemic effects of transfusions in rats using pyridoxylated hemoglobin and polyhemoglobin from homologous and heterogeneous sources. *Biomater Artif Cells Artif Organs* 1988;16(1-3):205-15.
- (15) Corfield AP, Cooper MJ, Williamson RC. Acute pancreatitis: a lethal disease of increasing incidence. *Gut* 1985 July;26(7):724-9.
- (16) Cottler PS, Skalak TC. Development of a clinically useful mechanical leech device that promotes flap survival in an animal model of venous-congested skin flaps. *Ann Plast Surg* 2001 August;47(2):138-47.
- (17) Crowley JP, Metzger J, Gray A, Pivacek LE, Cassidy G, Valeri CR. Infusion of stroma-free cross-linked hemoglobin during acute gram-negative bacteremia
1. *Circ Shock* 1993 November;41(3):144-9.
- (18) Cunningham PG, Jenkins SN, Tam SC, Wong JT. Oxygen-binding and immunological properties of complexes between dextran and animal haemoglobins. *Biochem J* 1981 January 1;193(1):261-6.
- (19) D'Agnillo F, Chang TM. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties
1. *Nat Biotechnol* 1998 July;16(7):667-71.
- (20) Dabrowski A, Gabryelewicz A, Chyczewski L. The effect of platelet activating factor antagonist (BN 52021) on cerulein-induced acute pancreatitis with reference to oxygen radicals. *Int J Pancreatol* 1991 January;8(1):1-11.
- (21) de Souza LJ, Sampietre SN, Assis RS, Knowles CH, Leite KR, Jancar S, Monteiro Cunha JE, Machado MC. Effect of platelet-activating factor antagonists (BN-52021, WEB-2170, and BB-882) on bacterial translocation in acute pancreatitis. *J Gastrointest Surg* 2001 July;5(4):364-70.
- (22) Donaldson LA, Schenk WG, Jr. The effect of Trasylol and vasopressin on experimental pancreatitis. *Surg Gynecol Obstet* 1980 May;150(5):657-60.

- (23) Driessen B, Jahr JS, Lurie F, Griffey SM, Gunther RA. Effects of haemoglobin-based oxygen carrier hemoglobin glutamer-200 (bovine) on intestinal perfusion and oxygenation in a canine hypovolaemia model. *Br J Anaesth* 2001 May;86(5):683-92.
- (24) Eibl G, Forgacs B, Hotz HG, Buhr HJ, Foitzik T. Endothelin A but not endothelin B receptor blockade reduces capillary permeability in severe experimental pancreatitis. *Pancreas* 2002 August;25(2):e15-e20.
- (25) Eichhorn ME, Ney L, Massberg S, Goetz AE. Platelet kinetics in the pulmonary microcirculation in vivo assessed by intravital microscopy. *J Vasc Res* 2002 July;39(4):330-9.
- (26) Endlicher E, Volk M, Feuerbach S, Scholmerich J, Schaffler A, Messmann H. Long-term follow-up of patients with necrotizing pancreatitis treated by percutaneous necrosectomy. *Hepatology* 2003 November;50(5):2225-8.
- (27) Essex TJ, Byrne PO. A laser Doppler scanner for imaging blood flow in skin. *J Biomed Eng* 1991 May;13(3):189-94.
- (28) Estep TN, Gonder J, Bornstein I, Aono F. Immunogenicity of diaspirin cross-linked human hemoglobin solutions. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol* 1992;20(2-4):603-9.
- (29) Faivre-Fiorina B, Caron A, Fassot C, Fries I, Menu P, Labrude P, Vigneron C. Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs. *Am J Physiol* 1999 February;276(2 Pt 2):H766-H770.
- (30) Fan ST, Lai EC, Mok FP, Lo CM, Zheng SS, Wong J. Early treatment of acute biliary pancreatitis by endoscopic papillotomy. *N Engl J Med* 1993 January 28;328(4):228-32.
- (31) Feola M, Gonzalez H, Canizaro PC, Bingham D, Periman P. Development of a bovine stroma-free hemoglobin solution as a blood substitute. *Surg Gynecol Obstet* 1983 November;157(5):399-408.
- (32) Fernandez-del CC, Harringer W, Warshaw AL, Vlahakes GJ, Koski G, Zaslavsky AM, Rattner DW. Risk factors for pancreatic cellular injury after cardiopulmonary bypass. *N Engl J Med* 1991 August 8;325(6):382-7.
- (33) Fleiss J. *Statistical methods for rates and proportions*. 2 ed. John Wiley & Sons, New York 1981;33-49.
- (34) Flickinger BD, Olson MS. Localization of the platelet-activating factor receptor to rat pancreatic microvascular endothelial cells. *Am J Pathol* 1999 May;154(5):1353-8.
- (35) Foitzik T, Eibl G, Hotz HG, Faulhaber J, Kirchengast M, Buhr HJ. Endothelin receptor blockade in severe acute pancreatitis leads to systemic enhancement of microcirculation, stabilization of capillary

permeability, and improved survival rates. *Surgery* 2000 September;128(3):399-407.

- (36) Foitzik T, Hotz HG, Eibl G, Hotz B, Kirchengast M, Buhr HJ. Therapy for microcirculatory disorders in severe acute pancreatitis: effectiveness of platelet-activating factor receptor blockade vs. endothelin receptor blockade. *J Gastrointest Surg* 1999 May;3(3):244-51.
- (37) Foitzik T, Hotz HG, Schmidt J, Klar E, Warshaw AL, Buhr HJ. Effect of microcirculatory perfusion on distribution of trypsinogen activation peptides in acute experimental pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995 October;40(10):2184-8.
- (38) Folsch UR, Nitsche R, Ludtke R, Hilgers RA, Creutzfeldt W. Early ERCP and papillotomy compared with conservative treatment for acute biliary pancreatitis. The German Study Group on Acute Biliary Pancreatitis. *N Engl J Med* 1997 January 23;336(4):237-42.
- (39) Freitag M, Standl TG, Gottschalk A, Burmeister MA, Rempf C, Horn EP, Strate T, Schulte am EJ. Enhanced central organ oxygenation after application of bovine cell-free hemoglobin HBOC-201. *Can J Anaesth* 2005 November;52(9):904-14.
- (40) Freitag M, Standl TG, Gottschalk A, Burmeister MA, Rempf C, Horn EP, Strate T, Schulte Am EJ. Enhanced central organ oxygenation after application of bovine cell-free hemoglobin HBOC-201. *Can J Anaesth* 2005 November;52(9):904-14.
- (41) 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(3):232-9.
- (42) 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(3):232-9.
- (43) 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.
- (44) Gilliland L, Steer ML. Effects of ethionine on digestive enzyme synthesis and discharge by mouse pancreas. *Am J Physiol* 1980 November;239(5):G418-G426.
- (45) Gloor B, Muller CA, Worni M, Stahel PF, Redaelli C, Uhl W, Buchler MW. Pancreatic infection in severe pancreatitis: the role of fungus and multiresistant organisms. *Arch Surg* 2001 May;136(5):592-6.

- (46) Golub R, Siddiqi F, Pohl D. Role of antibiotics in acute pancreatitis: A meta-analysis. *J Gastrointest Surg* 1998 November;2(6):496-503.
- (47) Greenburg AG, Terlizzi L, Peskin GW. Oxyhemoglobin affinity in acute pancreatitis
6. *J Surg Res* 1977 May;22(5):561-5.
- (48) Greim CA, Broscheit J, Kortlander J, Roewer N, Schulte Am EJ. Effects of intra-abdominal CO₂-insufflation on normal and impaired myocardial function: an experimental study. *Acta Anaesthesiol Scand* 2003 July;47(6):751-60.
- (49) Gschwandtner ME, Ambrozy E, Maric S, Willfort A, Schneider B, Bohler K, Gaggl U, Ehringer H. Microcirculation is similar in ischemic and venous ulcers. *Microvasc Res* 2001 November;62(3):226-35.
- (50) Gulati A, Sharma AC, Burhop KE. Effect of stroma-free hemoglobin and dapsirin cross-linked hemoglobin on the regional circulation and systemic hemodynamics. *Life Sci* 1994;55(10):827-37.
- (51) Gullo L, Cavicchi L, Tomassetti P, Spagnolo C, Freyrie A, D'Addato M. Effects of ischemia on the human pancreas. *Gastroenterology* 1996 October;111(4):1033-8.
- (52) Gullo L, Migliori M, Olah A, Farkas G, Levy P, Arvanitakis C, Lankisch P, Beger H. Acute pancreatitis in five European countries: etiology and mortality. *Pancreas* 2002 April;24(3):223-7.
- (53) Hamilton RG, Kelly N, Gawryl MS, Rentko VT. Absence of immunopathology associated with repeated IV administration of bovine Hb-based oxygen carrier in dogs. *Transfusion* 2001 February;41(2):219-25.
- (54) Harringer W, Hodakowski GT, Svizzero T, Jacobs EE, Jr., Vlahakes GJ. Acute effects of massive transfusion of a bovine hemoglobin blood substitute in a canine model of hemorrhagic shock. *Eur J Cardiothorac Surg* 1992;6(12):649-54.
- (55) Hertzman CM, Keipert PE, Chang TM. Serum antibody titers in rats receiving repeated small subcutaneous injections of hemoglobin or polyhemoglobin: a preliminary report. *Int J Artif Organs* 1986 May;9(3):179-82.
- (56) Hoffmann TF, Steinbauer M, Waldner H, Messmer K. Exogenous bradykinin enhances ischemia/reperfusion injury of pancreas in rats. *J Surg Res* 1996 April;62(1):144-51.
- (57) Horn EP, Standl T, Wilhelm S, Jacobs EE, Freitag U, Freitag M, Schulte am EJ. [Bovine hemoglobin. HBOC-201 causes a reduction of the oxygen partial pressure in poststenotic skeletal muscle]
7. *Anaesthesist* 1998 February;47(2):116-23.

- (58) Hughes GS, Francom SF, Antal EJ, Adams WJ, Locker PK, Yancey EP, Jacobs EE. Effects of a novel hemoglobin-based oxygen carrier on percent oxygen saturation as determined with arterial blood gas analysis and pulse oximetry. *Ann Emerg Med* 1996 February;27(2):164-9.
- (59) Hughes GS, Jr., Yancey EP, Albrecht R, Locker PK, Francom SF, Orringer EP, Antal EJ, Jacobs EE, Jr. Hemoglobin-based oxygen carrier preserves submaximal exercise capacity in humans
3. *Clin Pharmacol Ther* 1995 October;58(4):434-43.
- (60) Isenmann R, Buchler M, Uhl W, Malfertheiner P, Martini M, Beger HG. Pancreatic necrosis: an early finding in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 1993 May;8(3):358-61.
- (61) Isenmann R, Buchler M, Uhl W, Malfertheiner P, Martini M, Beger HG. Pancreatic necrosis: an early finding in severe acute pancreatitis. *Pancreas* 1993 May;8(3):358-61.
- (62) Isenmann R, Rau B, Beger HG. Bacterial infection and extent of necrosis are determinants of organ failure in patients with acute necrotizing pancreatitis. *Br J Surg* 1999 August;86(8):1020-4.
- (63) Johnson CD, Kingsnorth AN, Imrie CW, McMahon MJ, Neoptolemos JP, McKay C, Toh SK, Skaife P, Leeder PC, Wilson P, Larvin M, Curtis LD. Double blind, randomised, placebo controlled study of a platelet activating factor antagonist, lexipafant, in the treatment and prevention of organ failure in predicted severe acute pancreatitis. *Gut* 2001 January;48(1):62-9.
- (64) Kalfarentzos F, Kehagias J, Mead N, Kokkinis K, Gogos CA. Enteral nutrition is superior to parenteral nutrition in severe acute pancreatitis: results of a randomized prospective trial. *Br J Surg* 1997 December;84(12):1665-9.
- (65) Kingsnorth AN, Galloway SW, Formela LJ. Randomized, double-blind phase II trial of Lexipafant, a platelet-activating factor antagonist, in human acute pancreatitis. *Br J Surg* 1995 October;82(10):1414-20.
- (66) Klar E, Foitzik T, Buhr H, Messmer K, Herfarth C. Isovolemic hemodilution with dextran 60 as treatment of pancreatic ischemia in acute pancreatitis. *Ann Surg* 1993;217:369-74.
- (67) Klar E, Werner J. [New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis]. *Chirurg* 2000 March;71(3):253-64.
- (68) Klar E, Werner J. [New pathophysiologic knowledge about acute pancreatitis]. *Chirurg* 2000 March;71(3):253-64.
- (69) Krishna CM, Ma L, Samuni A, Trimble CE, Mitchell JB, Hsia CJ. Superoxide dismutase- and catalase-mimetic activities of a polynitroxyl-hemoglobin (PNH). *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1996;24:369.

- (70) Kusterer K, Bojunga J, Enghofer M, Heidenthal E, Usadel KH, Kolb H, Martin S. Soluble ICAM-1 reduces leukocyte adhesion to vascular endothelium in ischemia-reperfusion injury in mice. *Am J Physiol* 1998 August;275(2 Pt 1):G377-G380.
- (71) Kusterer K, Enghofer M, Zender S, Blochle C, Usadel KH. Microcirculatory changes in sodium taurocholate-induced pancreatitis in rats. *Am J Physiol* 1991 February;260(2 Pt 1):G346-G351.
- (72) Lane JS, Todd KE, Gloor B, Chandler CF, Kau AW, Ashley SW, Reber HA, McFadden DW. Platelet activating factor antagonism reduces the systemic inflammatory response in a murine model of acute pancreatitis. *J Surg Res* 2001 August;99(2):365-70.
- (73) Langermans JA, van Vuren-van der Hulst ME, Bleeker WK. Safety evaluation of a polymerized hemoglobin solution in a murine infection model. *J Lab Clin Med* 1996;127(5):428-34.
- (74) Lankisch PG, Assmus C, Lehnick D, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Acute pancreatitis: does gender matter? *Dig Dis Sci* 2001 November;46(11):2470-4.
- (75) Lankisch PG, Assmus C, Pflichthofer D. The calendar and acute pancreatitis. *Pancreas* 1998 May;16(4):465-7.
- (76) Lankisch PG, Burchard-Reckert S, Petersen M, Lehnick D, Schirren CA, Kohler H, Stockmann F, Peiper HJ, Creutzfeldt W. Morbidity and mortality in 602 patients with acute pancreatitis seen between the years 1980-1994. *Z Gastroenterol* 1996 June;34(6):371-7.
- (77) Lankisch PG, Struckmann K, Assmus C, Lehnick D, Maisonneuve P, Lowenfels AB. Do we need a computed tomography examination in all patients with acute pancreatitis within 72 h after admission to hospital for the detection of pancreatic necrosis? *Scand J Gastroenterol* 2001 April;36(4):432-6.
- (78) Laver MB, Jackson E, Scherperel M, Tung C, Tung W, Radford EP. Hemoglobin-O₂ affinity regulation: DPG, monovalent anions, and hemoglobin concentration. *J Appl Physiol* 1977 October;43(4):632-42.
- (79) Lee R, Atsumi N, Jacobs EE, Jr., Austen WG, Vlahakes GJ. Ultrapure, stroma-free, polymerized bovine hemoglobin solution: evaluation of renal toxicity
1. *J Surg Res* 1989 November;47(5):407-11.
- (80) Lerch MM, Albrecht E, Ruthenburger M, Mayerle J, Halangk W, Kruger B. Pathophysiology of alcohol-induced pancreatitis. *Pancreas* 2003 November;27(4):291-6.
- (81) Leser HG, Scholmerich J. [Papillotomy in acute pancreatitis: more benefits than risks]. *Bildgebung* 1992 March;59 Suppl 1:28-30.

- (82) Liard JF, Kunert MP. Hemodynamic changes induced by low blood oxygen affinity in dogs. *Am J Physiol* 1993 February;264(2 Pt 2):R396-R401.
- (83) 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 March;26(2):133-48.
- (84) Lipfert B, Standl T, Dullmann J, Helmchen U, Schulte Am EJ, 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 May;79(5):573-82.
- (85) Litscher G, Wang L, Huber E, Nilsson G. Changed skin blood perfusion in the fingertip following acupuncture needle introduction as evaluated by laser Doppler perfusion imaging. *Lasers Med Sci* 2002;17(1):19-25.
- (86) Luiten EJ, Hop WC, Lange JF, Bruining HA. Controlled clinical trial of selective decontamination for the treatment of severe acute pancreatitis. *Ann Surg* 1995 July;222(1):57-65.
- (87) Manning JM. Random chemical modification of hemoglobin to identify chloride binding sites in the central dyad axis: their role in control of oxygen affinity
1. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22(2):199-205.
- (88) Mayerle J, Hlouschek V, Lerch MM. Current management of acute pancreatitis. *Nat Clin Pract Gastroenterol Hepatol* 2005 October;2(10):473-83.
- (89) Mayerle J, Simon P, Kraft M, Meister T, Lerch MM. [Conservative treatment of acute pancreatitis]. *Med Klin (Munich)* 2003 December 15;98(12):744-9.
- (90) McKay CJ, Evans S, Sinclair M, Carter CR, Imrie CW. High early mortality rate from acute pancreatitis in Scotland, 1984-1995. *Br J Surg* 1999 October;86(10):1302-5.
- (91) Menger MD, Bonkhoff H, Vollmar B. Ischemia-reperfusion-induced pancreatic microvascular injury. An intravital fluorescence microscopic study in rats. *Dig Dis Sci* 1996 May;41(5):823-30.
- (92) Menu P, Labrude P, Grandgeorge M, Vigneron C. Importance of purification on transfusional efficacy of hemoglobin solutions
2. *Int J Artif Organs* 1991 October;14(10):672-5.
- (93) Mithofer K, Fernandez-del CC, Rattner D, Warshaw AL. Subcellular kinetics of early trypsinogen activation in acute rodent pancreatitis. *Am J Physiol* 1998 January;274(1 Pt 1):G71-G79.

- (94) Moody FG, Haley-Russell D, Muncy DM. Intestinal transit and bacterial translocation in obstructive pancreatitis. *Dig Dis Sci* 1995 August;40(8):1798-804.
- (95) Mordon S, Begu S, Buys B, Tourne-Peteilh C, Devoisselle JM. Study of platelet behavior in vivo after endothelial stimulation with laser irradiation using fluorescence intravital videomicroscopy and PEGylated liposome staining. *Microvasc Res* 2002 September;64(2):316-25.
- (96) Moss GS, DeWoskin R, Cochin A. Stroma-free hemoglobin. I. Preparation and observations on in vitro changes in coagulation
1. *Surgery* 1973 August;74(2):198-203.
- (97) Niazi ZB, Essex TJ, Papini R, Scott D, McLean NR, Black MJ. New laser Doppler scanner, a valuable adjunct in burn depth assessment. *Burns* 1993 December;19(6):485-9.
- (98) Niederau C, Luthen R, Niederau MC, Grendell JH, Ferrell LD. Acute experimental hemorrhagic-necrotizing pancreatitis induced by feeding a choline-deficient, ethionine-supplemented diet. *Methodology and standards. Eur Surg Res* 1992;24 Suppl 1:40-54.
- (99) Niesel HC, Klimpel L, Kaiser H, Bernhardt A, al-Rafai S, Lang U. [Epidural blockade for analgesia and treatment of acute pancreatitis]. *Reg Anaesth* 1991 December;14(6):97-100.
- (100) Nitsche R, Folsch UR. Role of ERCP and endoscopic sphincterotomy in acute pancreatitis. *Baillieres Best Pract Res Clin Gastroenterol* 1999 July;13(2):331-43.
- (101) Nolte D, Hecht R, Schmid P, Botzlar A, Menger MD, Neumueller C, Sinowatz F, Vestweber D, Messmer K. Role of Mac-1 and ICAM-1 in ischemia-reperfusion injury in a microcirculation model of BALB/C mice. *Am J Physiol* 1994 October;267(4 Pt 2):H1320-H1328.
- (102) Nordback IH, Auvinen OA. Long-term results after pancreas resection for acute necrotizing pancreatitis. *Br J Surg* 1985 September;72(9):687-9.
- (103) Obaid SI, Morris DJ. Laser Doppler perfusion imager use in incisional hernia repair following omental breast reconstruction. *Plast Reconstr Surg* 2002 May;109(6):2006-8.
- (104) Opie F. The relation of cholelithiasis to disease of the pancreas and to fat necrosis. *Bull Johns Hopkins Hosp* 1901;12:19-21.
- (105) Pannum P. Experimentelle Beiträge zur Lehre von der Embolie. *Virchows Archiv Pathologie Anatomie* 1862;25:308.
- (106) Pederzoli P, Bassi C, Vesentini S, Campedelli A. A randomized multicenter clinical trial of antibiotic prophylaxis of septic complications in acute necrotizing pancreatitis with imipenem. *Surg Gynecol Obstet* 1993 May;176(5):480-3.

- (107) Pfeffer RB, Stasior O, Hinton JW. The clinical picture of the sequential development of acute hemorrhagic pancreatitis in the dog. *Surg Forum* 1957;8:248-51.
- (108) Powell JJ, Miles R, Siriwardena AK. Antibiotic prophylaxis in the initial management of severe acute pancreatitis. *Br J Surg* 1998 May;85(5):582-7.
- (109) Rabiner SF, Friedman LH. The role of intravascular haemolysis and the reticulo-endothelial system in the production of a hypercoagulable state 5. *Br J Haematol* 1968 February;14(2):105-18.
- (110) Runzi M, Layer P, Buchler MW, Beger HG, Ell C, Folsch UR, Goebell H, Hopt UT, Lankisch PG, Schmidt WE, Schmiegel W, Scholmerich J. [The therapy of acute pancreatitis. General guidelines. Working group of the Society for Scientific-Medical Specialties]. *Z Gastroenterol* 2000 July;38(7):571-81.
- (111) Ruud TE, Aasen AO, Kierulf P, Stadaas J, Aune S. Studies on the kallikrein-kinin system in plasma and peritoneal fluid during experimental pancreatitis. *Adv Exp Med Biol* 1984;167:489-94.
- (112) Sakorafas GH, Tsiotos GG, Bower TC, Sarr MG. Ischemic necrotizing pancreatitis. Two case reports and review of the literature. *Int J Pancreatol* 1998 October;24(2):117-21.
- (113) Samel S, Lanig S, Lux A, Keese M, Gretz N, Nichterlein T, Sturm J, Lohr M, Post S. The gut origin of bacterial pancreatic infection during acute experimental pancreatitis in rats. *Pancreatology* 2002;2(5):449-55.
- (114) Schmidt J, Ebeling D, Ryschich E, Werner J, Gebhard MM, Klar E. Pancreatic capillary blood flow in an improved model of necrotizing pancreatitis in the rat. *J Surg Res* 2002 August;106(2):335-41.
- (115) Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992 January;215(1):44-56.
- (116) Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, Compton CC, Mandavilli U, Knoefel WT, Warshaw AL. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy. *Ann Surg* 1992 January;215(1):44-56.
- (117) Schmidt J, Werner J. [Acute pancreatitis: reliable and prospective conservative therapy]. *Langenbecks Arch Chir Suppl Kongressbd* 1998;115:434-8.
- (118) Schultz SC, Grady B, Cole F, Hamilton I, Burhop K, Malcolm DS. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to diaspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1993 September;122(3):301-8.
- (119) Secknus R, Mossner J. [Changes in incidence and prevalence of acute and chronic pancreatitis in Germany]. *Chirurg* 2000 March;71(3):249-52.

- (120) Seidel H. Bemerkungen zu meiner Methode der experimentellen Erzeugung der akuten hämorrhagischen Pankreatitis. *Zentralbl Chir* 1910;37:1601-4.
- (121) Senninger N, Moody FG, Coelho JC, Van Buren DH. The role of biliary obstruction in the pathogenesis of acute pancreatitis in the opossum. *Surgery* 1986 June;99(6):688-93.
- (122) Sharma AC, Gulati A. Yohimbine modulates diaspirin crosslinked hemoglobin-induced systemic hemodynamics and regional circulatory effects. *Crit Care Med* 1995 May;23(5):874-84.
- (123) Shimamoto K, Nakao T, Ura N, Tanaka S, Ando T, Nishimiya T, Mita T, Kondo M, Nakagawa M, Imura O. The role of the renal kallikrein-kinin system in sodium metabolism in normal and low renin essential hypertension. *Jpn Circ J* 1983 October;47(10):1210-5.
- (124) Sigurdsson G. Enteral or parenteral nutrition? Pro-enteral. *Acta Anaesthesiol Scand Suppl* 1997;110:143-7.
- (125) Soltero R, Leppaniemi A, Pikoulis E, Ratigan J, Waasdorp C, Malcolm D. Diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb) increases rat skin wound breaking strength after hemorrhage. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1996;24:433.
- (126) Standl T, Burmeister MA, Horn EP, Wilhelm S, Knoefel WT, Schulte Am EJ. Bovine haemoglobin-based oxygen carrier for patients undergoing haemodilution before liver resection
15. *Br J Anaesth* 1998 February;80(2):189-94.
- (127) 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 April;37(4):859-65.
- (128) Standl T, Horn P, Wilhelm S, Greim C, Freitag M, Freitag U, Sputtek A, Jacobs E, Schulte Am EJ. Bovine haemoglobin is more potent than autologous red blood cells in restoring muscular tissue oxygenation after profound isovolaemic haemodilution in dogs
22. *Can J Anaesth* 1996 July;43(7):714-23.
- (129) Standl TG, Reeker W, Redmann G, Kochs E, Werner C, Schulte Am EJ. Haemodynamic changes and skeletal muscle oxygen tension during complete blood exchange with ultrapurified polymerized bovine haemoglobin. *Intensive Care Med* 1997 August;23(8):865-72.
- (130) Staritz M. Pharmacology of the sphincter of Oddi. *Endoscopy* 1988 August;20 Suppl 1:171-4.

- (131) Strate T, Mann O, Kleinhans H, Rusani S, Schneider C, Yekebas E, Freitag M, Standl T, Bloechle C, Izbicki JR. Microcirculatory function and tissue damage is improved after therapeutic injection of bovine hemoglobin in severe acute rodent pancreatitis. *Pancreas* 2005 April;30(3):254-9.
- (132) 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 November;238(5):765-71.
- (133) Strate T, Mann O, Standl T, Izbicki JR, Knoefel WT. The potential of HBOC in acute pancreatitis
5. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther* 2001 November;36 Suppl 2:S119-S120.
- (134) Takahashi T, Iwasaki K, Malchesky PS, Harasaki H, Emoto H, Goldcamp JB, Matsushita M, Nose Y, Rolin H, III, Hall P. Effects of single-dose infusion of pyridoxalated-hemoglobin-polyoxyethylene conjugate solution on canine renal function
2. *Artif Organs* 1991 December;15(6):462-73.
- (135) Tam SC, Wong JT. Impairment of renal function by stroma-free hemoglobin in rats
5. *J Lab Clin Med* 1988 February;111(2):189-93.
- (136) Tarpila E, Nystrom PO, Franzen L, Ihse I. Bacterial translocation during acute pancreatitis in rats. *Eur J Surg* 1993 February;159(2):109-13.
- (137) Thompson A, McGarry AE, Valeri CR, Lieberthal W. Stroma-free hemoglobin increases blood pressure and GFR in the hypotensive rat: role of nitric oxide. *J Appl Physiol* 1994 November;77(5):2348-54.
- (138) Uhl W, Buchler MW, Malfertheiner P, Begler HG, Adler G, Gaus W. A randomised, double blind, multicentre trial of octreotide in moderate to severe acute pancreatitis. *Gut* 1999 July;45(1):97-104.
- (139) Van Kempen LH, Breepoel PM, Kreuzer F. The carbamate equilibrium of bovine hemoglobin at 37 degrees C. *Respir Physiol* 1975 March;23(2):223-41.
- (140) Vlahakes GJ, Lee R, Jacobs EE, Jr., Laraia PJ, Austen WG. Hemodynamic effects and oxygen transport properties of a new blood substitute in a model of massive blood replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990 September;100(3):379-88.
- (141) Vlahakes GJ, Lee R, Jacobs EE, Jr., Laraia PJ, Austen WG. Hemodynamic effects and oxygen transport properties of a new blood substitute in a model of massive blood replacement. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1990 September;100(3):379-88.

- (142) Vollmar B, Glasz J, Menger MD, Messmer K. Leukocytes contribute to hepatic ischemia/reperfusion injury via intercellular adhesion molecule-1-mediated venular adherence. *Surgery* 1995 February;117(2):195-200.
- (143) Vollmar B, Menger MD, Glasz J, Leiderer R, Messmer K. Impact of leukocyte-endothelial cell interaction in hepatic ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol* 1994 November;267(5 Pt 1):G786-G793.
- (144) Wang ZF, Pan CE, Lu Y, Liu SG, Zhang GJ, Zhang XB. The role of inflammatory mediators in severe acute pancreatitis and regulation of glucocorticoids. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int* 2003 August;2(3):458-62.
- (145) Warshaw AL, O'Hara PJ. Susceptibility of the pancreas to ischemic injury in shock. *Ann Surg* 1978 August;188(2):197-201.
- (146) Werner J, Klar E. Therapeutische Beeinflussung des Schweregrades der akuten Pankreatitis. *Chir Gastroenterol* 1999;15:328-33.
- (147) Werner J, Rivera J, Fernandez-del CC, Lewandrowski K, Adrie C, Rattner DW, Warshaw AL. Differing roles of nitric oxide in the pathogenesis of acute edematous versus necrotizing pancreatitis. *Surgery* 1997 January;121(1):23-30.
- (148) Werner J, Z'graggen K, Fernandez-del CC, Lewandrowski KB, Compton CC, Warshaw AL. Specific therapy for local and systemic complications of acute pancreatitis with monoclonal antibodies against ICAM-1. *Ann Surg* 1999 June;229(6):834-40.
- (149) White CT, Murray AJ, Smith DJ, Greene JR, Bolin RB. Synergistic toxicity of endotoxin and hemoglobin. *J Lab Clin Med* 1986 August;108(2):132-7.
- (150) Wu SD, Zhang ZH, Jin JZ, Kong J, Wang W, Zhang Q, Li DY, Wang MF. Effects of narcotic analgesic drugs on human Oddi's sphincter motility
13. *World J Gastroenterol* 2004 October 1;10(19):2901-4.
- (151) Yang T, Olsen KW. Enzymatic protection from autoxidation for crosslinked hemoglobins
4. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol* 1994;22(3):709-17.
- (152) Zeybek N, Gorgulu S, Yagci G, Serdar M, Simsek A, Kaymakcioglu N, Deveci S, Ozcelik H, Tufan T. The effects of ginkgo biloba extract (EGb 761) on experimental acute pancreatitis. *J Surg Res* 2003 December;115(2):286-93.

7 Danksagung

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. J. R. Izbicki für die freundliche Überlassung des Themas, die diese Doktorarbeit erst ermöglicht hat.

Besonderen Dank gilt PD Dr. med. O. Mann für seine hervorragende Betreuung und seine tatkräftige Unterstützung. Seine kompetente Einarbeitung in das Thema und seine unermüdliche Motivation machten eine Realisierung dieser Doktorarbeit erst möglich.

Die Durchführung der Experimente wäre ohne die exzellente Zusammenarbeit mit Frau Dr. med. H. Ameis, den Herren Prof. Dr. med. T. Strate, PD Dr. med. M. Freitag, Dr. med. H. Kleinhaus und J. Rau nicht möglich gewesen. Vielen Dank für den opferungsvollen Einsatz.

Großen Dank schulde ich meinen Eltern Kay und Ulrike Lohalm und meiner Großmutter Ruth von Oeynhausen, die mir das Studium und somit auch diese Doktorarbeit durch ihre Unterstützung ermöglichten.

Zur Erstellung dieser Promotionsschrift haben mehr Menschen beigetragen, als ich hier namentlich nennen kann. Diesen Freunden und Kollegen aufrichtig zu danken, ist mir ein großes Anliegen.

8 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Hendrik Lohalm
Geburtsdatum / -ort 01. Februar 1977 in Nordenham
Staatsangehörigkeit deutsch
Familienstand ledig
Anschrift Heckscherstraße 9 B
20253 Hamburg

Schul- und Berufsausbildung

1983 – 1987 Grundschule St.Willehad in Nordenham
1987 – 1989 Orientierungsstufe Mitte in Nordenham
1989 – 1996 Gymnasium Nordenham; Abitur 1996
04 / 1997 – 03 / 2000 abgeschlossene Berufsausbildung zum
Krankenpfleger im Allgemeinen Krankenhaus
St.Georg in Hamburg

Hochschulausbildung

04 / 2000 – 12 / 2006 Studium der Humanmedizin an der Universität
Hamburg
03 / 2002 Physikum
03 / 2003 1. Staatsexamen
10 / 2005 2. Staatsexamen
12 / 2006 3. Staatsexamen

Berufliche Laufbahn

07 / 2007 – 01 / 2009 Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie
und operative Intensivmedizin der Asklepios Klinik
St.Georg
seit 06 / 2009 Assistenzarzt in der Abteilung für Anästhesiologie,
Intensivmedizin und Schmerztherapie des
Katholischen Marienkrankenhauses Hamburg

9 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 (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 einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Hamburg, Mai 2010