

Zentrum für Anästhesiologie
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
Direktor: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Jochen Schulte am Esch

**Auswirkungen der prophylaktischen oder
therapeutischen Gabe der zellfreien Hämoglobinlösung
HBOC-200 (Oxyglobin™) auf die Ausprägung
myokardialer DNA-Schäden nach akuter
Koronararterienligatur im Ischämie- und
Reperusionsmodell**

Dissertation

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

Sebastian Rehberg

aus Hamburg

Hamburg, 2004

Angenommen vom Fachbereich Medizin

der Universität Hamburg am :

11. November 2004

Veröffentlicht mit Genehmigung des Fachbereichs

Medizin der Universität Hamburg

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

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

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: PD Dr. J.Kähler

Meinen Eltern in Liebe und Dankbarkeit gewidmet

Inhaltsverzeichnis

1.	STUDIENZIELE.....	4
1.1.	VALIDIERUNG DER „IN-SITU“-NICK-TRANSLATION.....	4
1.2.	DNA-EINZELSTRANGBRÜCHE	4
1.3.	APOPTOSE	4
1.4.	DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHE	4
2.	EINLEITUNG	5
2.1.	ANSATZ.....	5
2.2.	DNA : AUFBAU UND SCHÄDEN	6
2.3.	ZELLTOD : APOPTOSE UND NEKROSE	8
2.4.	EIGENSCHAFTEN UND MODIFIKATIONEN VON HÄMOGLOBINLÖSUNGEN.....	10
2.5.	MYOKARDINFARKT UND ALTERNATIVE SAUERSTOFFTRÄGER	13
2.6.	STUDIEN MIT HBOC-200/HBOC-201	14
3.	MATERIAL UND METHODIK	16
3.1.	GENEHMIGUNG DES TIERVERSUCHES.....	16
3.2.	FALLZAHLKALKULATION UND STATISTIK	16
3.3.	OPERATIVER VERSUCHSABLAUF	17
3.3.1.	<i>Versuchsgruppen</i>	17
3.3.2.	<i>Art und Haltung der Versuchstiere</i>	17
3.3.3.	<i>Studienmedikation HBOC-200</i>	18
3.3.4.	<i>Narkose und Präparation</i>	21
3.3.5.	<i>Intraoperative Messwerte</i>	27
3.3.5.1.	Hämodynamik	27
3.3.5.2.	Temperatur.....	27
3.3.5.3.	Inspiratorische Sauerstoffkonzentration und Capnometrie.....	28
3.3.5.4.	Blutgasanalysen, Elektrolyt- und Hämoglobinkonzentrationen	28
3.3.5.5.	Blutzucker.....	28
3.4.	GEWEBEAUFARBEITUNG	29
3.5.	„AREA AT RISK“	32
3.5.1.	<i>Technik</i>	32
3.5.2.	<i>Auswertung</i>	32
3.6.	NICK-TRANSLATION UND AUTORADIOGRAPHIE.....	34
3.6.1.	<i>Technik</i>	34
3.6.2.	<i>Auswertung mittels Densitometrie</i>	39
3.7.	DNA-LADDERING	42
3.8.	TUNEL-REAKTION	43
3.8.1.	<i>Technik</i>	43
3.8.2.	<i>Auswertung</i>	46
4.	ERGEBNISSE	49
4.1.	INTRAOPERATIVE MESSWERTE.....	49
4.1.1.	<i>Gewicht</i>	50
4.1.2.	<i>Hämodynamik</i>	50
4.1.3.	<i>Temperatur</i>	50
4.1.4.	<i>Inspiratorische Sauerstoff-Konzentration und Blutgasanalysen</i>	50
4.1.5.	<i>Fraktionelle O₂-Sättigung des Hämoglobins und Hämoglobinkonzentrationen</i> ..	51
4.1.6.	<i>Säure-Basen-Haushalt</i>	51
4.1.7.	<i>Blutzucker</i>	51
4.1.8.	<i>Elektrolyte</i>	51
4.2.	“AREA AT RISK”	52
4.3.	NICK-TRANSLATION.....	53

4.4.	DNA-LADDERING	58
4.5.	TUNEL-REAKTION	59
5.	DISKUSSION	64
5.1.	VALIDIERUNG DER „IN-SITU“-NICK-TRANSLATION	64
5.2.	EFFEKTE VON HBOC-200 AUF DNA-EINZELSTRANGBRÜCHE	65
5.3.	QUALITATIVER NACHWEIS VON APOPTOSE	71
5.4.	EFFEKTE VON HBOC-200 AUF DNA-DOPPELSTRANGBRÜCHE	72
5.5.	HÄMODYNAMISCHE WIRKUNGEN UND NEBENWIRKUNGEN VON HBOC.....	74
5.6.	METHODENKRITIK	78
5.7.	AUSBLICK	82
6.	ZUSAMMENFASSUNG	83
7.	LITERATURVERZEICHNIS.....	85
8.	ANHANG.....	98
8.1.	ABKÜRZUNGEN.....	98
8.2.	ÜBERSICHT DER LABORCHEMISCHEN PARAMETER	100
8.3.	TABELLEN.....	101
8.3.1.	<i>Gewicht</i>	101
8.3.2.	<i>Hämodynamik</i>	101
8.3.3.	<i>Temperatur</i>	102
8.3.4.	<i>Inspiratorische Sauerstoff-Konzentration und Blutgasanalysen</i>	103
8.3.5.	<i>Hämoglobin-Messungen</i>	104
8.3.6.	<i>Säure-Basen-Haushalt</i>	105
8.3.7.	<i>Blutzucker</i>	106
8.3.8.	<i>Elektrolyte</i>	106
9.	DANKSAGUNGEN.....	107
10.	LEBENS LAUF	108
11.	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	109

1. Studienziele

1.1. Validierung der „in-situ“-Nick-Translation

Es soll gezeigt werden, dass der quantifizierende Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen durch Autoradiographie nach „in-situ“-Nick-Translation eine eindeutige Differenzierung der Tiere der Positiv-Kontrollgruppe und der unbehandelten Kontrollgruppe („Sham control“) gewährleistet.

1.2. DNA-Einzelstrangbrüche

Die Auswirkungen der prophylaktischen oder therapeutischen Anwendung der zellfreien Hämoglobinlösung HBOC-200 im Kleintiermodell auf die Rate an DNA-Einzelstrangbrüchen im linken Ventrikel sollen im quantitativen Nachweis mittels „in-situ“-Nick-Translation nach akuter Ischämie und Reperfusion untersucht werden.

1.3. Apoptose

Der qualitative Nachweis für das Auftreten von Apoptose in den Kardiomyozyten nach akuter Ischämie und Reperfusion soll für das vorliegende Kleintiermodell mittels DNA-Laddering erbracht werden.

1.4. DNA-Doppelstrangbrüche

Die Auswirkungen der prophylaktischen oder therapeutischen Anwendung der zellfreien Hämoglobinlösung HBOC-200 im Kleintiermodell auf die Rate an DNA-Doppelstrangbrüchen im linken Ventrikel sollen im Nachweis mittels TUNEL-Reaktion nach akuter Ischämie und Reperfusion quantitativ untersucht werden.

2. Einleitung

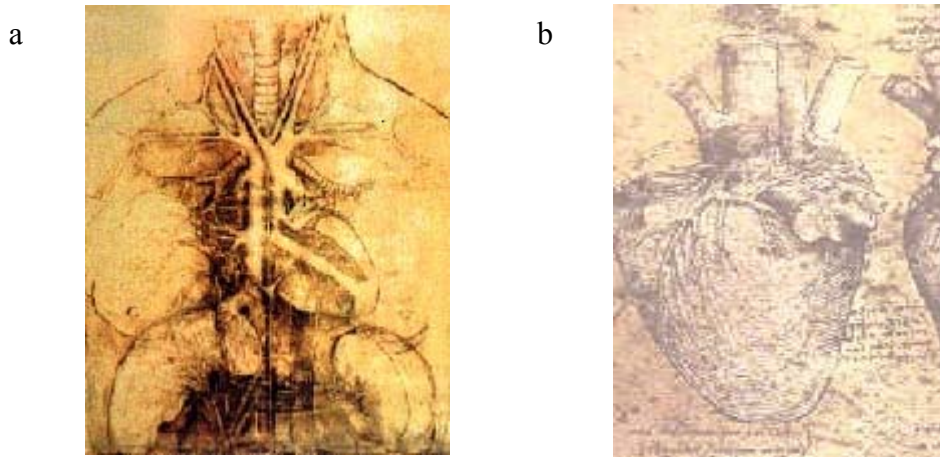
2.1. Ansatz

Anfang des 16. Jahrhunderts lag ein älterer Mann in Florenz im Sterben. Er fühlte sich nur etwas schwach, sagte er noch zu dem Mann an seinem Bett, bevor er aufhörte zu atmen und ganz leise verstarb. Fasziniert von dem „süßen Tod“ führte der junge Wissenschaftler eine Obduktion durch, um die Ursache zu ergründen. In seinem Bericht heißt es: „Die Blutgefäße am Herzen des Alten waren verändert wie Krampfadern. Auch im übrigen Körper waren die Adern knotig verdickt, oft in Kurven gelegt wie Wiesenbäche, an manchen Stellen regelrecht verknöchert.“ Er schlussfolgerte, dass der Tod durch „das Versagen des Blutes und der Arterie eintrat, die das Herz versorgt.“ (ZEITpunkte, Nr.7/99, S.16; Die Erfindungen von Leonardo da Vinci, Charles Gibbs-Smith, Stuttgart, 1998)

Leonardo da Vinci war der Name dieses jungen Mannes, und seine Ausführungen und Zeichnungen (Abbildung 2.1) stellen eine der ersten Beschreibungen der Arterio-/ Atherosklerose dar. Fast ein halbes Jahrtausend später denkt bei verengten Gefäßen niemand mehr an einen „süßen Tod“. Heute wird hiermit der gefürchtete Herzinfarkt assoziiert. Herz-Kreislaufkrankungen führen mittlerweile die Todesursachenstatistik in vielen sogenannten zivilisierten Ländern der Welt an.

Auf dem Fachgebiet der Anästhesiologie stellen Myokardischämien eine wesentliche perioperative Komplikation dar. Zum einen gehen sie mit einer akuten Lebensbedrohung einher, zum anderen ist ihr Auftreten bei ca. 5 Millionen Menschen im Jahr keineswegs selten. Klinisch manifestieren sich perioperative Myokardischämien als Rhythmusstörungen, Angina pectoris oder im schwersten Fall als Myokardinfarkt mit hoher Letalität; und das keineswegs nur im Rahmen herzchirurgischer Eingriffe [9;20;90;102]. Das Risiko dieser Patienten könnte möglicherweise durch die prophylaktische oder therapeutische Gabe einer Hämoglobinlösung gesenkt werden. Hämoglobinlösungen sind plasmatische Sauerstoffträger, die eine Verbesserung der O₂-Versorgung des Myokards bei Perfusionsstörungen gewährleisten. Diese Wirkung legt eine potentielle Verminderung von Ischämie- und Reperfusionsschäden nahe.

Abbildung 2.1 Das Herz-Kreislaufsystem (a) bzw. das Herz (b) in Zeichnungen von Leonardo da Vinci



Quelle: Kunst und Medizin, Anton Neumayr, Wien 1996

2.2. DNA : Aufbau und Schäden

Die Struktur der DNA (deoxyribonukleic acid), dem Träger der genetischen Information, wurde 1953 von J.Watson und F.Crick anhand von Röntgenstrukturanalysen entschlüsselt, wofür ihnen 1962 der Nobelpreis verliehen wurde. Es handelt sich um einen Doppelstrang bestehend aus zwei Polynukleotidketten entgegengesetzter Polarität, die durch komplementäre Basenpaarung über Wasserstoffbrücken die Konformation einer Doppelhelix annehmen. Die Reihenfolge der einzelnen Nukleotide, die über 3',5'-Phosphodiesterbindungen verknüpft sind, kodiert die genetische Information. Ein Nukleotid besteht aus einem Zucker (Desoxyribose), einem Phosphatrest sowie jeweils einer der organischen Basen Adenin und Guanin (Purine) bzw. Cytosin und Thymin (Pyrimidine), durch die sich die einzelnen Nukleotide unterscheiden. Drei solcher Nukleotide bilden ein Basentriplett, welches für eine der zwanzig Aminosäuren steht. Die Reihenfolge der Aminosäuren bestimmt wiederum die Art des synthetisierten Proteins.

Im Rahmen von endo- oder exogenen Noxen, aber auch physiologischen Prozessen, kann es zur Schädigung der DNA in lebenden Zellen kommen [105]. Diese kann in Form von Einzel- und Doppelstrangbrüchen auftreten. DNA-Einzelstrangbrüche treten einerseits auch unter physiologischen Bedingungen jeden Tag tausendfach pro Zelle auf [27]. Andererseits ist ihre Rate bereits sehr

schnell nach Einwirken einer Noxe (z.B. einer Ischämie) deutlich erhöht [18;71]. DNA-ESB repräsentieren nekrotische Zellkerne, wie auch Zellkerne deren DNA im weiteren Verlauf, z.B. im Rahmen einer Reperfusion, bei wieder zur Verfügung stehender Energie und Sauerstoff durch Reparaturvorgänge eine vollständige „restitutio ad integrum“ erfahren. Ursachen für DNA-Einzelstrangbrüche sind sowohl Reaktionen mit Sauerstoffradikalen [104], genotoxische Substanzen, die Desintegration defekter Zuckermoleküle als auch das Entfernen defekter Basen [15]. Da ein Strang und damit die genetische Information noch erhalten ist, kann dieser als Matritze für DNA-Polymerasen dienen [83]. Somit sind diese Schäden in der überwiegenden Anzahl der Fälle reversibel [71] und können mittels Exzisionsreparatur („BER“: base excision repair; [114]) behoben werden, ohne dass daraus Folgen für die Zelle entstehen. Kommt es dagegen zur Replikation dieser DNA-Bereiche oder war die einwirkende Noxe zu stark, entstehen mit DNA-Doppelstrangbrüchen wesentlich größere Schäden [88], die als irreparabel gelten [83]. Zwar besteht auch hier durch den erheblich komplexeren Vorgang der homologen Rekombination [114] noch die theoretische Möglichkeit der Reparatur, es entstehen jedoch schwere Folgen für die Zelle, die mit großer Wahrscheinlichkeit zum Zelltod führen. Maßgeblich für Überleben oder Zelltod sind die Anzahl der DNA-Einzelstrangbrüche und das Verhältnis der DNA-Einzel- zu den DNA-Doppelstrangbrüchen [171]. Allerdings ist nicht jede Veränderung der DNA automatisch schädlich. Große Abschnitte stellen nicht-kodierende Sequenzen, sogenannte Introns, dar. Ein Schaden in einem dieser Bereiche zieht keine negativen Folgen für die Zelle bzw. den Organismus nach sich.

In der vorliegenden Studie wurde das Ausmaß der Ischämie- und Reperfusionsschäden anhand von DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüchen in Myokardzellen quantifiziert, um frühzeitige, nicht-letale Zellschädigungen noch vor dem Auftreten von histologischen Veränderungen nachzuweisen [18;141].

2.3. Zelltod : Apoptose und Nekrose

Der Zelltod kann auf zwei verschiedene Arten ablaufen. DNA-Doppelstrangbrüche treten sowohl im Rahmen der Nekrose als auch des programmierten Zelltodes, der Apoptose, auf [48;130]. Die sowohl bei pathologischen Prozessen als auch physiologisch z.B. im Rahmen von Umbauprozessen, der Embryonalentwicklung oder der Immuntoleranz [48] vorkommende Apoptose stellt einen hochspezifischen, energieabhängigen Vorgang mit einer determinierten Aktivierung von Caspase- Kaskaden dar. Dieser Prozeß verläuft sehr schnell und ist deshalb im gesunden Gewebe nur geringfügig nachweisbar [141]. Caspasen (cysteinyll aspartate specific proteins) sind Proteasen, die in ihrem Zentrum Cystein enthalten und Proteine nach der Aminosäure Aspartat aufspalten. Sie liegen bereits als inaktive Proenzyme, welche durch autokatalytische oder proteolytische Prozesse aktiviert werden, in der Zelle vor [54;141]. Beim Menschen sind bisher vierzehn verschiedene Caspasen bekannt, die in Signalkaskaden angeordnet sind [121]. Extrazelluläre Signale, Bindung von Liganden wie Apo, Fas oder TNF, leiten die Aktivierung eines membranständigen Rezeptors ein, der über einen Komplex (Apoptosom) zur Aktivierung der Initiator-Caspasen-8 und -10 führt (extrinsischer/Typ-I-Weg). Die intrinsische Regulation (Typ-II) erfolgt hauptsächlich durch mitochondriale Proteine wie Cytochrom C. Nach Freisetzung ins Cytoplasma bildet es zusammen mit Apaf-1 (apoptotic protease activating factor), der Pro-Caspase-9 und dATP das Apoptosom. Die Caspase-9 wird aktiviert und aktiviert wiederum die Pro-Caspasen-3,-6 und -7. Der dritte mögliche Signalweg wird durch Stress ausgelöst. Das aus dem endoplasmatischen Retikulum freigesetzte Calcium aktiviert hierbei die Caspase-12 [48;141]. Letztendlich führen alle Induktionsvarianten zur Spaltung der DNA (DNA-Degradation) durch Caspase-aktivierte-DNAsen in Fragmente genau definierter Größe (180-200 Basenpaare) [54], die in der Gelelektrophorese mit ihren Vielfachen eine typische „DNA-Leiter“ hervorrufen. Dieser Sachverhalt beruht auf der „Verpackung“ der DNA in Form von Nukleosomen. Hierbei ist der DNA-Faden in $1\frac{3}{4}$ Windungen um einen Kern aus basischen Proteinen (Histonen) gewickelt und in diesem Bereich vor dem Abbau geschützt. Die Spaltung erfolgt deshalb nur in den Zwischenbereichen mit Bruchstücken von 180-200 Basenpaaren. Im weiteren Verlauf der Apoptose schrumpft die Zelle („Schrumpfnekrose“) und zerfällt schließlich in

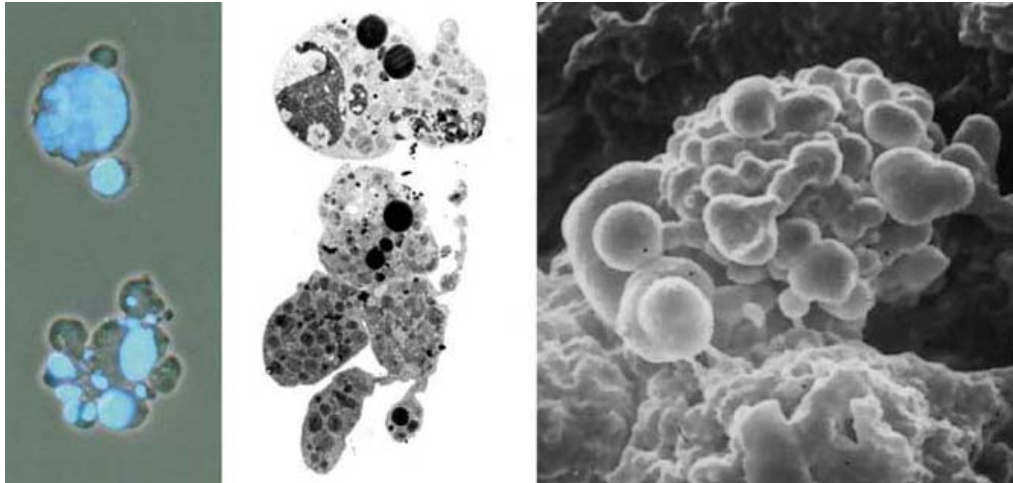
membranumschlossene Vesikel, die Apoptose-Körperchen (apoptotic bodies), wodurch eine Entzündungsreaktion ausbleibt. Die Morphologie der Zellorganellen bleibt dabei im Normalfall zunächst erhalten. Allerdings kommt es im Nukleus zu einer charakteristischen Kondensation des Chromatins mit bestimmten heterochromatischen Bereichen [183]. Abbildung 2.2 zeigt mikroskopische Aufnahmen apoptotischer Zellen.

Dagegen ist Nekrose immer ein pathologischer Prozess, der energieunabhängig abläuft und mit einer deutlichen Entzündungsreaktion einhergeht [174]. Sie tritt nach physikalischen, chemischen, mikrobiellen oder hypoxischen Noxen auf [175], die die Kompensationsfähigkeit der Zelle übersteigen. Unabhängig von der Art der auslösenden Noxe kommt es zu einer erhöhten Permeabilität der Zellmembran und dadurch bedingt zu einem Wassereinstrom mit konsekutiver Schwellung der Zelle und ihrer Organellen bis die Plasmamembran schließlich aufbricht. Die dabei frei werdenden Zellinhalte lösen die begleitende Entzündungsreaktion aus. In der Gelelektrophorese zeigt sich aufgrund der zufälligen Zersetzung der DNA eine kontinuierliche DNA-Spur, ein „Smear“.

Trotz dieser zahlreichen Unterschiede sind die beiden Formen des Zelltodes keinesfalls immer strikt voneinander zu trennen. Einige Stimuli können sowohl Apoptose als auch Nekrose nach sich ziehen [57]. In diesen Fällen ist die Art des Zelluntergangs abhängig von Zeit, Lokalisation oder Schwere des ursächlichen Stimulus [57]. Auch der sekundäre Übergang primär apoptotischer Zellen in Nekrose [141] ist ebenso wie das parallele Auftreten von Apoptose und Nekrose in einem Gewebe [171] nachgewiesen worden. Letzteres tritt im Rahmen von Ischämie, Reperfusion und Myokardinfarkt auf [59;122].

Abbildung 2.2

Mikroskopische Aufnahmen von Zellen während der Ausführung der Apoptose



- Lichtmikroskopische Aufnahme von humanen Tumorzellen (B-Zell-Lymphom) nach Induktion der Apoptose durch Exposition mit einem Antikörper gegen den CD95-Rezeptor; hellblau fluoreszierend sind die Zellkerne (obere Zelle) bzw. -fragmente (untere Zelle) dargestellt.
- Elektronenmikroskopische Aufnahme von zwei isolierten Leberzellen nach Induktion der Apoptose durch einen Kälteschock; die untere Zelle ist deutlich fragmentiert.
- Rasterelektronenmikroskopische Aufnahme einer humanen Pankreastumorzelle nach Induktion der Apoptose durch Stoffwechselgifte; deutlich sind die zahlreichen Ausstülpungen der Plasmamembran zu erkennen.

Quelle: www.ruhr-uni-bochum.de/anat1/Forschungsschwerpunkte/Forschung_Apoptose.htm

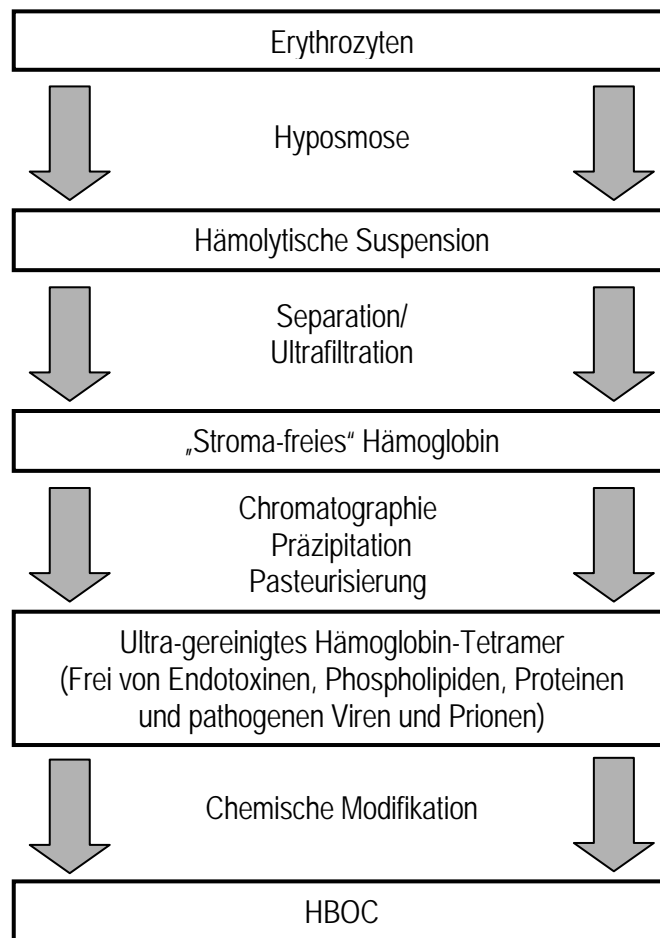
2.4. Eigenschaften und Modifikationen von Hämoglobinlösungen

Hämoglobinlösungen (HBOC: Hemoglobin based oxygen carrier) sind schon seit Anfang des letzten Jahrhunderts Gegenstand intensiver Forschung. Bereits 1916 sind erste klinische Studien an Freiwilligen und bei anämischen Patienten von Sellards und Minot beschrieben worden [147]. Der ursprüngliche Ansatz bestand damals in der Herstellung eines Blutersatzstoffes, der bei schwerer Anämie oder akuten traumatischen oder operativen Blutverlusten unter Umgehung der mit der Bluttransfusion einhergehenden Risiken (Blutgruppeninkompatibilität, Infektionsübertragung) Leben retten sollte.

Es traten jedoch schwerwiegende Nebenwirkungen wie beispielsweise eine Aktivierung der intravasalen Gerinnung [108] oder Fieber und Nierenversagen [43] auf, so dass noch 1978 klinische Studien aufgrund der erheblichen hämodynamischen und renalen Komplikationen nicht vertretbar waren [142]. Die Ursache lag überwiegend in Verunreinigungen durch Zellmembranrückstände, wie z.B. Phospholipide [32;126]. Diese und damit die renale Toxizität konnten mit Einführung der Ultrapurifikation (Abbildung 2.3) beseitigt werden.

Abbildung 2.3

Übersicht über den Separations- und Purifikationsprozess von modernen zellfreien Hämoglobinlösungen (HBOC).

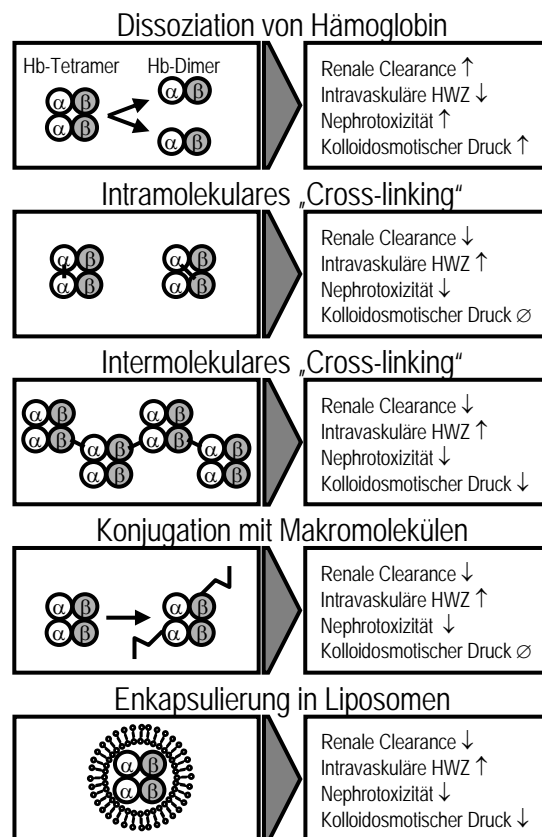


Quelle: [157]

Eine noch heute bestehende Nebenwirkung der Hämoglobinlösungen ist der hypertensive Effekt. Der zugrunde liegende Pathomechanismus besteht mit großer Wahrscheinlichkeit in der Bindung und der damit verbundenen Inaktivierung von NO bzw. EDRF („endothelium derived relaxing factor“) an das plasmatische Hämoglobin („NO-Scavenging“) [145]. Durch den Wegfall dieses Vasodilatators kommt es zur Vasokonstriktion. Auch eine verstärkte Sensibilisierung von Adrenozeptoren sowie eine erhöhte Endothelinfreisetzung unter HBOC-Anwendung [49; 50] könnten zu einer Blutdrucksteigerung beitragen. Die erhöhte Methämoglobin-Bildung stellt dagegen nur bei Applikation sehr großer Mengen und der daraus resultierenden Überladung des Makrozyten-Phagozyten Systems (MPS) eine nennenswerte unerwünschte Wirkung dar [156]. Sie beruht auf dem Fehlen von Reduktionsenzymen, wie z.B. der Methämoglobinreduktase, in den zellfreien Hämoglobinlösungen.

Zusätzlich zu diesen Nebenwirkungen gab es weitere Eigenschaften, die die Verwendung der Hämoglobinlösungen stark einschränkten: eine hohe Sauerstoffaffinität, die kurze intravasale Halbwertszeit und der durch die große Molekülanzahl verursachte hohe kolloidosmotische Druck (KOD). Durch unterschiedliche chemische Modifikationen, wie z.B. Polymerisation (siehe Abbildung 2.4), wurde unter anderem ein höheres Molekulargewicht bei gleichzeitig verminderter Molekülanzahl erreicht und somit sowohl die intravasale Halbwertszeit verlängert als auch der KOD gesenkt. Von den derartig modifizierten Präparaten, u.a. OxyglobinTM oder HemopureTM, befinden sich zur Zeit bereits mehrere in klinischen Phase-II/III-Studien. HBOC-201 wurde bereits zur Behandlung der perioperativen Anämie bei erwachsenen Patienten in Südafrika zugelassen, nachdem dessen Effektivität und Verträglichkeit in der Therapie der intra- und postoperativen Anämie in klinischen Studien belegt worden war [89;158;165].

Abbildung 2.4 Schematische Darstellung der Modifikationen von Hämoglobinmolekülen zur Verminderung toxischer Nebenwirkungen sowie zur Verlängerung der intravasalen Halbwertszeit (HWZ). Das in dieser Studie verwendete HBOC-200 wurde durch intermolekulares Glutaraldehyd Cross-Linking modifiziert.



Quelle: [157]

2.5. Myokardinfarkt und alternative Sauerstoffträger

Eine Diskrepanz zwischen dem Sauerstoffbedarf des Herzens und dem Sauerstoffangebot führt zur Ischämie des Myokards und letztendlich zur Koagulationsnekrose der Kardiomyozyten, dem Myokardinfarkt. Ursächlich liegt im überwiegenden Anteil der Fälle ein thrombotischer Verschluss eines Koronargefäßes zugrunde [64].

Die in diesem Projekt angestrebte Reduktion der Ischämie- und Reperfusionsschäden am Herzmuskel konnte für Perfluorocarbone (PFC), einen anderen Sauerstoffträger, bereits in mehreren Studien nachgewiesen werden [5;37;38;39;40;81]. Aufgrund dessen erfolgte in den USA die Zulassung für PFC zur intrakoronararteriellen Applikation bei der percutanen transluminalen coronaren Angioplastie (PTCA). Ein Vorteil von HBOC gegenüber PFC-Lösungen ist die Wirksamkeit unter Atmung von Raumluft (21%O₂), während bei Perfluorocarbonen eine inspiratorisch erhöhte O₂-Konzentration von 50-100% vorhanden sein muss, um genügend Sauerstoff physikalisch zu lösen [81]. Des Weiteren ist die wirksame Dosis von HBOC mit 0,4 g kg⁻¹, entsprechend 200-250 ml auf einen Menschen übertragen, relativ gering.

Wurde in den PFC-Studien lediglich eine therapeutische Applikation nach dem Ischämie erzeugenden Ereignis untersucht, so stellt die prophylaktische Anwendung, wie sie beispielsweise im Rahmen der perioperativen Risikoreduktion neben der verbreiteten β -Adrenozeptoren-Blockade [103;124;179] eingesetzt werden könnte, einen vollkommen neuen Ansatz dar, um das Risiko von Myokardischämien und deren Konsequenzen (Myokardinfarkt, maligne Rhythmusstörungen) zu senken. Hierbei würden sich beide Methoden ergänzen. Während β -Blocker die Herzarbeit ökonomisieren, erhöhen die HBOC aufgrund ihrer geringeren Sauerstoffaffinität und der im Vergleich zum Erythrozyten winzigen Partikelgröße auch in poststenotischen Arealen das Sauerstoffangebot [60]. Da die überwiegende Anzahl der Operationen elektiv geplant sind und somit der Zeitraum eines erhöhten Risikos für derartige Komplikationen vorher bekannt ist, erscheint eine temporäre Prophylaxe durchaus sinnvoll.

Die prognostische Bedeutung perioperativer Myokardischämien wird in zahlreichen klinischen Untersuchungen bestätigt [35;90;102]. Dabei zeigt sich in einer Studie von Mangano et al. unter anderem, dass bei 20% der Patienten mit nachgewiesener koronarer Herzerkrankung bzw. mit Risikofaktoren für eine koronare

Herzerkrankung Myokardischämien präoperativ, bei 25% intraoperativ und bei 41% postoperativ auftraten. Mit dem postoperativen Auftreten von Ischämien war außerdem eine Erhöhung der Komplikationsrate (Angina pectoris, Myokardinfarkt oder akuter Herztod) um das Neunfache verbunden [102]. Nicht nur die Häufigkeit sondern auch die Schwere der auftretenden Ischämien sind am Ende des operativen Eingriffs bzw. während der Ausleitung der Narkose am ausgeprägtesten [9]. Der Reduktion gerade dieser ischämischen Ereignisse durch eine prophylaktische HBOC-Applikation könnte eine erhebliche klinische Relevanz zukommen.

2.6. Studien mit HBOC-200/HBOC-201

Die Bedenken im Hinblick auf die Verträglichkeit von Hämoglobinlösungen (siehe 2.3) konnten bezüglich HBOC-200 und HBOC-201 (Hemopure™, Oxyglobin™, Biopure, Cambridge, MA, USA; Details siehe Kapitel 3.3.3) mittlerweile sowohl in Versuchen am Tier [61;99;160;163;164] als auch am Menschen [10;158;165] erheblich verringert werden. Weder in Tierversuchen mit kompletten Blutaustausch durch eine ultragereinigte bovine Hämoglobinlösung [99;163], noch im Rahmen klinischer Studien bei Patienten, die sich einer Leberteilresektion unterzogen [158], konnten nephrotoxische Effekte oder Gerinnungsstörungen durch diese Substanz nachgewiesen werden. Auch eine klinisch relevante Methämoglobinbildung konnte in dieser wie auch in einer nachfolgenden internationalen Phase-III-Studie selbst bei Anwendung von bis zu 7 Einheiten (à 250 ml HBOC-201) ausgeschlossen werden. Bestätigt hat sich dagegen eine Erhöhung des mittleren arteriellen Druckes. Während der pulmonal-vaskuläre Widerstand weitgehend unverändert blieb, zeigte sich ein um etwa 20% gesteigerter systemischer Gefäßwiderstand nach HBOC-201 Applikation [165].

Die positiven Effekte der HBOC-Lösungen auf die Gewebeoxygenierung wurden in zahlreichen Modellen mit unterschiedlichen Ansätzen am Hund verifiziert [61;62;63;159;160;164]. Nach 95%iger Stenosierung der A. poplitea waren die Gewebe-O₂-Partialdrücke (tPO₂) im poststenotischen Skelettmuskel sowohl nach prophylaktischer als auch nach therapeutischer Applikation wesentlich höher als in der Kontrollgruppe, die Hydroxyethylstärke (HES) erhalten hatte [61;62]. Auch im Rahmen eines nahezu vollständigen Blutaustausches mit HBOC-201 waren die tPO₂-Werte in dieser Gruppe höher als in der Gruppe, die HES erhalten hatte, und insbesondere höher als bei der Ausgangsmessung [164]. Dabei konnte für HBOC-

201 eine Oxygenierungspotenz von 3:1 im Vergleich zu Warmblut und drei Wochen alten autologen Erythrozytenkonzentraten (EK) errechnet werden [159;160]. Besonders extrem niedrige tPO₂-Werte wurden durch die Gabe von HBOC-200 schneller und effektiver beseitigt als durch Erythrozytenkonzentrate [159]. Weitere positive Wirkungen von HBOC-201 konnten für die prophylaktische Applikation bei Anlage einer 90%igen Stenose des Ramus interventricularis anterior (LAD) der linken Koronararterie in Kombination mit einer akuten isovolämen Anämie von Hb=7±0,5 g dl⁻¹ an Hunden gezeigt werden [6;14;60]: Sowohl die Kontraktilität als auch die myokardiale Sauerstoffspannung konnten im ischämischen Areal aufrechterhalten werden. Zusätzlich waren die histologischen Gewebeschäden und die DNA-Einzelstrangbruchrate (Nick-Translations-Technik) im Myokard des Versorgungsgebiets der LAD deutlich vermindert [162]. Durch die therapeutische Applikation von HBOC-201 wurden die Werte der myokardialen tPO₂ und der Kontraktilität des linken Ventrikels im poststenotischen Areal bis fast auf die Ausgangswerte angehoben.

Die Effektivität von HBOC-200 bestätigte sich auch in Studien am Pankreas im Rattenmodell. Eine frühe und protrahierte Verabreichung von HBOC-200 nach medikamenteninduzierter Pankreatitis bewirkte eine signifikante Reduktion von Nekrosen sowie eine Verbesserung der histologisch verifizierten Organintegrität und Funktion [167;168]. In einer Studie an Schweinen mit ebenfalls medikamentös induzierter Pankreatitis wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass die therapeutische Applikation mit HBOC-200 in Kombination mit einer isovolämischen Hämodilution die Gewebe-O₂-Partialdrücke auf Ausgangsniveau anheben konnte. Im Gegensatz hierzu war die alleinige Hämodilution mit HES oder Ringer-Lösung in dieser Hinsicht nicht erfolgreich [41]. Gleichzeitig zeigten sich auch hier signifikant geringere histopathologische Veränderungen, geringere Anstiege der Pankreasenzyme und eine höhere Überlebensrate in der mit HBOC-200 behandelten Gruppe im Vergleich zur Therapie mit Ringerlösung.

3. Material und Methodik

Anmerkung:

Diese Arbeit ist im Rahmen einer Studie erstellt worden, deren Hauptzielparameter die Reduktion des Anteils des Infarktareales an der „area at risk“ im Nachweis mittels Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid (TTC) darstellte. Die folgenden Zielkriterien waren primär zur Hypothesengenerierung ohne eigenständige Power-Analyse konzipiert. Deshalb beziehen sich einige Parameter (z.B. die Fallzahlberechnung) auf den Infarktnachweis mittels TTC, auf den hier aber nicht eingegangen werden soll. Ein weiterer Grund hierfür ist, dass aufgrund des Pilotcharakters der vorliegenden Versuchsreihe keine verlässlichen Daten in der Literatur existieren.

3.1. Genehmigung des Tierversuches

Nach veterinärmedizinischer Begutachtung wurde für die vorliegende tierexperimentelle Untersuchung die Genehmigung der BAGS der Freien und Hansestadt Hamburg erteilt (Antragsnummer 51/00). Die Versuche 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 [111].

3.2. Fallzahlkalkulation und Statistik

Grundlage für die Fallzahlkalkulation war als Hauptzielkriterium der Gesamtstudie (siehe Anmerkung unter 3) das Infarktareal als Anteil an der „area at risk“ im Nachweis mittels Färbung mit Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid nach „in-vivo“-Injektion von Patentblau. Die computergestützte Bestimmung (Instat, Graphpad Corp, CA, USA) bezogen auf den Hauptzielparameter (α -Fehler: 5%, β -Fehler 20%, Power: 0,8) ergab unter der Annahme einer Reduktion dieses Anteils um 25% in einer der Behandlungsgruppen eine Anzahl von 10 Tieren pro Gruppe, die den Versuch komplett durchlaufen müssen. Aus ethischen Gründen sollte der Bedarf an Versuchstieren möglichst gering gehalten werden, weshalb eine blockweise Randomisierung von jeweils 8 Tieren und eine Zwischenanalyse nach jeweils 8 Tieren, die den Versuch komplett durchlaufen hatten, durchgeführt wurde. Versuche, in denen die Tiere das geplante Versuchsende nicht erreichten, wurden bezogen auf die Randomisierungsliste als nicht erfolgt gewertet. Nach Erreichen eines Signifikanzniveaus von $<0,05$ für den Unterschied zwischen einer der

Behandlungsgruppen gegenüber der Kontrollgruppe bezogen auf den Hauptzielparameter wurde die Versuchsreihe geplant beendet. In die Auswertung der Parameter DNA-Einzel- und Doppelstrangbrüche wurden nur Tiere eingeschlossen, die den Versuch komplett durchlaufen hatten.

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mittels SPSS 9.0. Kontinuierliche Parameter wurden mittels ANOVA mit α -Korrektur für Messwertwiederholung (Varianzgleichheit: Bonferroni, Varianzungleichheit: Dunit-C) verglichen. Für die Dichtewerte der Nick-Translation sowie die Anteile der TUNEL-positiven Zellen und die „area at risk“ erfolgte der Vergleich mittels zweiseitigem t-Test für unverbundene Stichproben. Hierbei diente die Positiv-Kontroll-Gruppe als Referenz. Ein $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

3.3. Operativer Versuchsablauf

3.3.1. Versuchsgruppen

Die Versuchstiere wurden in der vorliegenden kardialen Ischämie- und Reperfusionstudie in vier Gruppen eingeteilt: eine Negativ-Kontrollgruppe (1), eine Positiv-Kontrollgruppe (2), eine Therapie-Gruppe (3) und eine Prophylaxe-Gruppe (4). In der Negativ-Kontrollgruppe erfolgte eine Narkotisierung inklusive Instrumentierung der Tiere, aber weder eine Ligatur der linken Koronararterie noch eine Applikation von HBOC-200. Die Positiv-Kontrollgruppe erhielt ebenfalls kein HBOC-200, hier wurde aber eine Ischämie mit anschließender Reperusionsphase induziert. Die Tiere der Behandlungsgruppen unterschieden sich lediglich in dem Zeitpunkt der HBOC-Applikation **vor** beziehungsweise **nach** Ischämieinduktion.

3.3.2. Art und Haltung der Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um männliche Sprague-Dawley-Ratten (Auszucht), die mittelbar über die Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf vom Züchter Charles River Wiga GmbH (Sulzfeld, Deutschland) bezogen wurden.

Vor Versuchsbeginn wurden die Tiere mindestens 5 Tage zur Gewöhnung in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf bei einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus, 20°-22°C Raumtemperatur und 50-60%iger relativer Luftfeuchtigkeit gehalten. Die Ernährung bestand aus SNIFF Standarddiät (Hamburg) und Wasser ad libitum. Der Transport zum Labor erfolgte in einer gewärmten Transportbox.

3.3.3. Studienmedikation HBOC-200

Die Studienmedikation bestand in der zellfreien, ultragereinigten Hämoglobinlösung HBOC-200 Oxyglobin™. Oxyglobin™ (Biopure, Cambridge, MA, USA) ist ein „hemoglobin based oxygen carrier“ (HBOC) boviner Herkunft mit einem vom Polymerisationsgrad abhängigen Molekulargewicht von 64.000-500.000 Dalton und einer intravasalen Halbwertszeit von 16-24 h [156]. Bei Tieren hat es eine veterinärmedizinische Zulassung als Blutersatz. Der etwas höhere Anteil von Molekülen mit niederem MG (<64.000 Dalton) stellt den einzigen Unterschied zu dem in klinischen Phase-II/III-Studien beim Menschen eingesetzten Hemopure™ des gleichen Herstellers dar, das seit 2001 eine Zulassung als Blutersatz bei Erwachsenen mit perioperativer Anämie in Südafrika besitzt.

Obwohl Oxyglobin™, wie zuvor erwähnt, auf bovinem Hämoglobin basiert, ist seine antigene Wirkung sehr begrenzt, da alle Aminosäuren, die das bovine vom humanen Hämoglobin unterscheiden (17 Aminosäuren in der Alpha-Kette und 24 Aminosäuren in der Beta-Kette) im Zentrum des Moleküls liegen. Die Polymerisation der Hämoglobintetramere mit Hilfe von Glutaraldehyd bewirkt, dass Ketten aus durchschnittlich 15 Tetrameren entstehen. Ein weiterer Vorteil von Oxyglobin™ ist der niedrige Anteil von Polymeren mit einer Größe über 500.000 Da, wodurch die immunsuppressiven Effekte bei der Speicherung im Monozyten-Phagozyten-System (MPS) relativ gering ausfallen.

Die erleichterte Sauerstoffabgabe im Gewebe im Vergleich zum humanen Hämoglobin beruht auf zwei Faktoren: Zum einen ist die Sauerstoffaffinität des HBOC mit einem P_{50} von 36 mmHg durch die Änderung des Ladungszustandes und der damit verbundenen Verschiebung der Sauerstoffbindungskurve nach rechts wesentlich geringer als beim menschlichen Hämoglobin mit einem P_{50} von 26 mmHg. Hierzu trägt die hauptsächliche Regulation der Sauerstoffaffinität beim HBOC durch Chlorid anstatt wie beim Menschen durch 2,3-Diphosphoglycerat (2,3-DPG) bei. Der Grund für diesen Unterschied liegt in der beim Rind um eine Aminosäure kürzeren Beta-Kette. Zum anderen ist der Bohr-Effekt bei bovinem Hämoglobin besonders ausgeprägt, so dass gerade bei azidotischen Verhältnissen der Sauerstoff leichter abgegeben werden kann [156].

Infolge des geringen Anteils an Polymeren mit einem Molekulargewicht von weniger als 32.000 Da, also unterhalb der Nierenschwelle, ist die intravasale Halbwertszeit gegenüber früheren niedermolekularen Lösungen verlängert, da

nahezu keine renale Ausscheidung erfolgt. Zusätzlich ist dadurch die Anzahl der osmotisch wirksamen Teilchen begrenzt, was wiederum den kolloidosmotischen Druck auf einem dem humanen Plasma entsprechenden Niveau hält.

Während des gesamten Versuches wurde die Lösung zur Vermeidung einer Oxidation der Hämoglobinmoleküle mit konsekutiver Bildung von Met-Hämoglobin nach dem ersten Eröffnen unter sterilen Bedingungen in einem mit Stickstoff gefluteten Vakuumbehältnis lichtabgeschirmt bei Raumtemperatur gelagert. Direkt vor Verwendung der Lösung am Versuchstier wurde die Met-Hämoglobinkonzentration zur Qualitätskontrolle gemessen (OSM 3, Radiometer, Kopenhagen). Bei einem Wert $>5\%$ wäre die Lösung verworfen worden. Obwohl dieser Wert im Rahmen der Versuchsreihe nicht erreicht wurde, wurden angebrochene Restbestände unabhängig hiervon nach 12 Tagen (zwei Versuchswochen) verworfen. Die Spezifika der verwendeten Lösung laut Herstellerangaben sind in Tabelle 3.1 dargestellt.

Tabelle 3.1 Spezifika der in der Versuchsreihe verwendeten Hämoglobinlösung HBOC-200 (Oxyglobin™) entsprechend Herstellerangaben.

Parameter	HBOC-200 (Oxyglobin™)
KOD (mmHg)	17
Viskosität 37° (mPa x s)	1,3
pH	7,6 - 7,9
Osmolarität (mOsm/kg)	290 - 310
Natrium (mmol/l)	145 - 160
Kalium (mmol/l)	3,5 - 5,5
Chlorid (mmol/l)	105 - 120
Calcium (mmol/l)	0,5 - 1,5
Hämoglobin (g/dl)	12,0±1,0
Methämoglobin (%)	< 10
Oxyhämoglobin (%)	< 5
p50 (mmHg)	36
Endotoxin (EU/ml)	< 0,02
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
N-acetyl-L-Cystein (%)	< 0,2
Partikel (Partikel/ml)	
> 10µ	< 50
> 25µ	< 5

3.3.4. Narkose und Präparation

Im Folgenden werden die Narkoseführung und Präparation detailliert beschrieben. Die wesentlichen Schritte sind in Abbildung 3.1 dargestellt.

Die Versuchstiere wurden vor Beginn des Versuches durch eine intramuskuläre Gabe von Ketamin (80 mg kg^{-1}) und Midazolam (3 mg kg^{-1}) in Allgemeinanästhesie versetzt. Hierbei wurde ein maximales Injektionsvolumen von $0,2 \text{ ml}$ je Muskel nicht überschritten [181]. Nach Aussetzen der Abwehrbewegungen wurden die Tiere auf einem beheizbaren Kleintier-OP-Tisch (Heated Rodent Operating Table, Harvard Apparatus) gelagert. Unter Sauerstoffinsufflation, EKG-Ableitung, rektaler Temperaturmessung und pulsoximetrischer Überwachung der O_2 -Sättigung erfolgte nach Infiltration mit $0,5 \text{ ml}$ Lidocain 2% die Tracheotomie. Nach Anlage eines zentralvenösen Zuganges in die V. cava superior wurde die Narkose als total-intravenöse Anästhesie mit Midazolam ($10 \text{ mg kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$) und einem Fentanylbolus ($7,5 \text{ } \mu\text{g kg}^{-1}$) aufrechterhalten. Die weitere Fentanylapplikation wurde dem individuellen Bedarf der Tiere angepasst. Zur Erhaltung des Flüssigkeitshaushaltes wurde den Tieren insgesamt $20 \text{ ml kg}^{-1} \text{ h}^{-1}$ Flüssigkeit zugeführt. Dieses Volumen setzte sich aus der Midazolam-Lösung und NaCl 0,9% zusammen. Die Ratten wurden unter dieser Medikation mit einem Sauerstoff-/Luftgemisch kontrolliert beatmet (Inspira Advanced Safety Ventilator, Harvard Apparatus). Die FiO_2 betrug dabei situationsadaptiert 0,3 bis 1,0. Es wurden Normocapnie (Pet CO_2 36-40 mmHg), Normothermie (37°C) und Normoglykämie ($80\text{-}120 \text{ mg dl}^{-1}$) gewährleistet. Der Kohlendioxidpartialdruck wurde kontinuierlich endexpiratorisch (Monitoreinheit mit Mainstream-Messung, Fa. Datex-Ohmeda) und intermittierend arteriell (ABL 500, Radiometer Kopenhagen) bestimmt. Die Wärmung erfolgte ergänzend zum beheizbaren Kleintier-OP-Tisch mit Wärmelampen. Zur Durchführung von Blutgasanalysen und zur kontinuierlichen Messung des Blutdruckes erfolgte die Anlage eines arteriellen Zuganges in die rechte Femoralarterie. Während der gesamten weiteren Präparationsphase betrug die FiO_2 1,0 unter kontrollierter Beatmung. Nach linksseitiger Thorakotomie zwischen dem vierten und fünften Interkostalraum wurde die Beatmung mit positiv-endexpiratorischem Druck ($3\text{-}5 \text{ mbar}$) fortgesetzt, um eine Atelektasenausbildung zu vermeiden. Es erfolgte die Perikardiotomie zur Darstellung der linken Koronararterie zwischen dem Ansatz des Truncus pulmonalis und linkem Herzohr.

Anschließend wurde das Herz aus dem Thorax luxiert, ein 6-0 Seidenfaden mittels Unterstechung um die linke Koronararterie nahe des Ursprungs gelegt und das Herz nach thorakal reponiert [148]. Beide Fadenenden wurden zum Schutz des Gefäßes durch ein Filzplättchen (Meadox Dacron Felt; Meadox Medicals, Inc., Oakland, NJ) und anschließend durch einen 1 cm langen Polyethylen-Schlauch (Perfusorleitung, Fa. B. Braun Melsungen, Außendurchmesser: 1,5 mm) geführt [65]. Durch Fadenspannung konnte somit eine Unterbindung der Gefäße erfolgen [119]. Nach Abschluss dieser Präparation wurde die FiO_2 bei allen Tieren auf 0,3 reduziert. Erst zu diesem Zeitpunkt erfolgte die randomisierte Gruppeneinteilung. Nach Randomisierung wurde eine Erholungsphase von 30 Minuten eingeleitet. Während des Versuches erfolgte eine engmaschige Messung von Hämodynamik, Blutgasen, Sauerstoff-, Hämoglobin- und Blutzuckerkonzentration sowie der Temperatur. Nach 10 min wurden die ersten Messungen im Rahmen von Messpunkt 1 vorgenommen. Die zeitliche Abfolge der Messpunkte sowie die einzelnen Messparameter sind in Tabelle 3.2 dargestellt. Nach Messpunkt 3 erfolgte in der Prophylaxe-Gruppe (4) die Gabe von $0,4 \text{ g kg}^{-1}$ HBOC-200 ad 2ml NaCl 0,9%, während die Tiere der Gruppen 1-3 das äquivalente Volumen in Form von NaCl 0,9% erhielten. Die Gabe erfolgte über 5 min über den zentralen Venenkatheter. Nach dem Ende der Applikation erfolgte Messpunkt 4. Fünfzehn Minuten nach Ende der Applikation wurde in den Gruppen 2-4 die Koronararterienligatur für 25 min zugezogen, während in der Gruppe 1 (Negativ-Kontrolle) keine Ligatur erfolgte. Nach 10 min Ligatur wurden in der Therapiegruppe (3) $0,4 \text{ g kg}^{-1}$ HBOC-200 ad 2 ml NaCl 0,9% appliziert, während die Tiere der anderen Gruppen wiederum NaCl 0,9% zum Volumenausgleich erhielten. Die Koronararterienligatur wurde nach 25 min Ischämiezeit aufgehoben. Nach einer Reperfusion von 120 min wurde die Koronararterienligatur erneut zugezogen. Die Tiere erhielten zur Darstellung der „area at risk“ 2 ml Patentblau (Sigma Chemicals GmbH, Deutschland) intravenös (ZVK) injiziert [67]. Der Exitus letalis wurde anschließend durch KCl-Injektion (2 mmol kg^{-1} KCl 7,45%) herbeigeführt. Nach Absetzen an den großen Gefäßen erfolgte die sofortige Entnahme des Herzens. Während des gesamten operativen Verlaufes wurden alle gemessenen Parameter im Normbereich gehalten. Dies beinhaltete insbesondere die Gabe von NaCl 0,9% (bei einem ZVD < 5 mmHg), Natrium-Bicarbonat 8,4% (bei einem SBE < -5 mmol l⁻¹) und Calcium - Chlorid (bei einem ionisierten Ca^{2+} < 1,0 mmol l⁻¹). Die FiO_2 wurde

ebenfalls angepasst, sofern der PaO₂ unter 70 mmHg abfiel. Darüber hinaus erfolgte bei Auftreten von VF der Versuch einer Defibrillation mittels „thumb version“ [178].

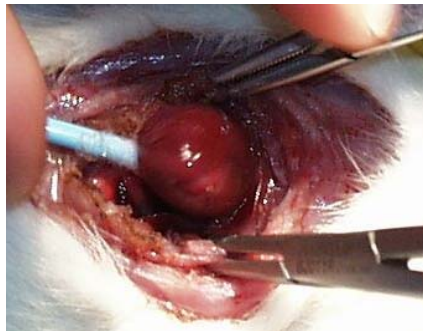
Abbildung 3.1 Darstellung der einzelnen Präparationsschritte (a-e) zur Anlage der Ligatur der linken Koronararterie an der narkotisierten und beatmeten Ratte.



(a) Gesamtsitus nach Einleitung der Narkose, Tracheotomie und Insertion von arteriellem und zentralvenösem Katheter.



(b) Aufsicht von links caudal auf das Herz nach linkssternaler Thorakotomie mit Durchtrennung und Teilresektion der 4-6 Rippe.



(c) Luxation des Herzens von caudal kommend nach extrathorakal.



(d) Darstellung des Abganges der linken Koronararterie zwischen Truncus pulmonalis und linkem Herzohr vor Unterstechung für die Ligatur mit einem 6-0 Faden.

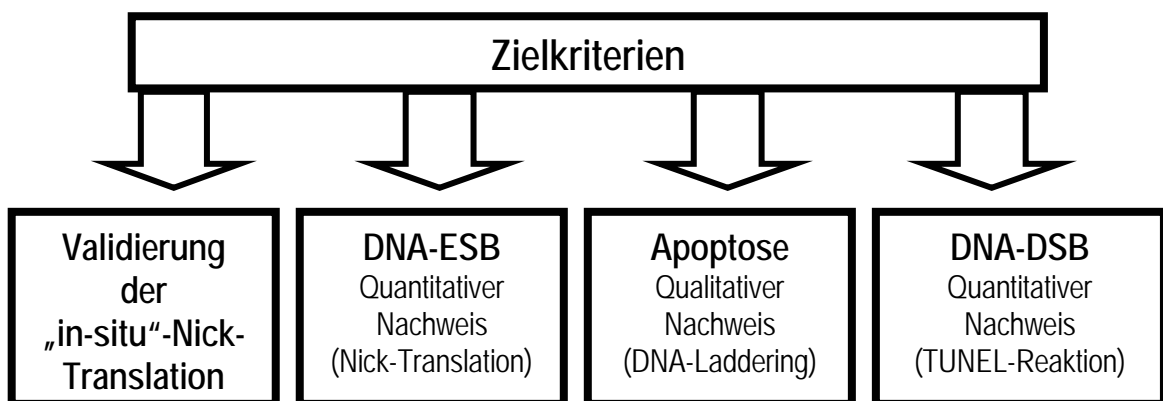
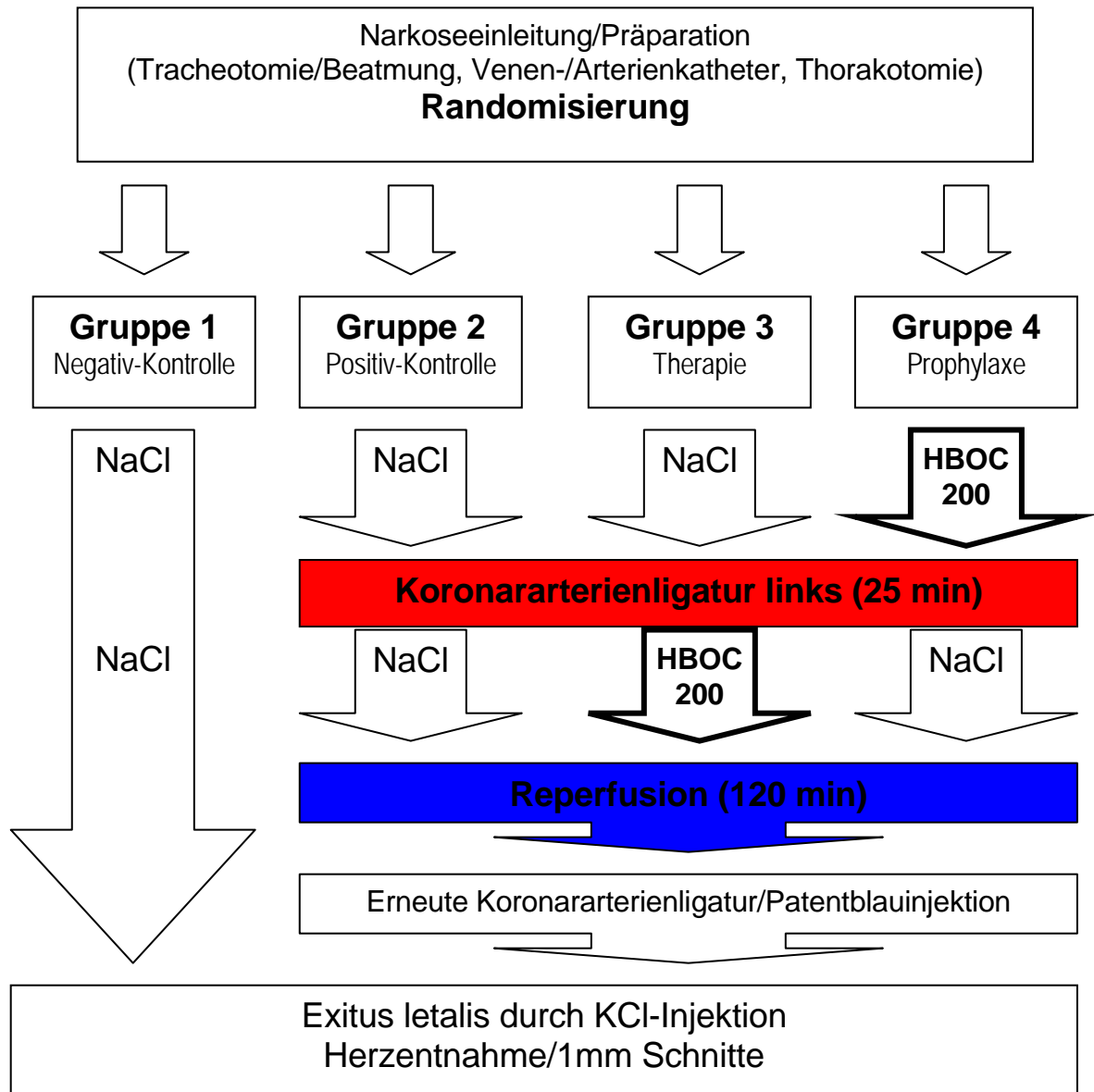


(e) Situs nach Unterstechung und Reposition des Herzens nach intrathorakal.

Tabelle 3.2 Übersicht der intraoperativen Messpunkte und Parameter (die verwendeten Abkürzungen sind im Anhang unter 8.1 erläutert).

Messpunkt	Zeitpunkt	Messparameter
1	Ruhephase +10 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
2	Ruhephase +20 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
3	Ruhephase +30 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
4	Applikation Prophylaxe+5 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
5	Applikation Prophylaxe+10min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
6	Applikation Prophylaxe +20min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
7	Ligatur +5 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
8	Applikation Therapie	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
9	Ligatur +25min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
10	Reperfusion +10 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.
11	Reperfusion +20 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
12	Reperfusion +30 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
13	Reperfusion +40 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
14	Reperfusion +50 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
15	Reperfusion +60 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
16	Reperfusion +70 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
17	Reperfusion +80 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
18	Reperfusion +90 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
19	Reperfusion +100 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
20	Reperfusion +110 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp.
21	Reperfusion +120 min	FiO ₂ , MAP, HF, Temp. + BGA, Hb, fHb, COHb, MetHb, ZVD, BZ, E-lyte.

Abbildung 3.2 Schematische Darstellung des Versuchablaufs und der Zielkriterien



3.3.5. Intraoperative Messwerte

3.3.5.1. Hämodynamik

Zentraler Venendruck

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

Mittlerer arterieller Druck

Der arterielle Blutdruck wurde über einen Katheter in der rechten A. femoralis kontinuierlich bestimmt. Die Ableitung erfolgte kontinuierlich über einen weiteren elektromagnetischen Druckaufnehmer. Da für die Perfusion der arterielle Mitteldruck (MAP) relevant ist, wurde nur der MAP und nicht der systolische und diastolische Druck ausgewertet.

Herzfrequenz

Die kontinuierliche EKG-Ableitung erfolgte über die Pfoten der Versuchstiere mittels Klebeelektroden für Neugeborene (Agilent 13953D, Agilent Technology, Andover, USA) als Extremitätenableitung und wurde auf einen Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) übertragen sowie mit Hilfe des an den Monitor angeschlossenen Druckers (direct digital writer series 7100, Marquette, Milwaukee, USA) zu den entsprechenden Messzeitpunkten mit 50 mm s^{-1} dokumentiert. Die Herzfrequenz wurde durch manuelle Zählung des jeweiligen Ausdruckes bestimmt, um etwaige Artefakte bei der automatischen Messung auszuschließen.

3.3.5.2. Temperatur

Es wurde bereits vor Versuchsbeginn sowie während des Versuches strikt auf Normothermie der Tiere geachtet ($37^{\circ}\text{C}\pm 0,5$). Die Wärmung erfolgte mittels des beheizbaren Operationstisches sowie zusätzlich bei Bedarf mit einer Wärmelampe (Osram Siccatherm 280W). Die Körpertemperatur wurde bei jedem Tier kontinuierlich über eine rektale Sonde am Messmodul (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) gemessen.

3.3.5.3. Inspiratorische Sauerstoffkonzentration und Capnometrie

Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration wurde kontinuierlich über eine in das Mischkammerreservoir des Beatmungsgerätes eingebrachte Elektrode (Oxydig, Dräger, Lübeck) gemessen. Der endexpiratorische CO₂-Partialdruck wurde kontinuierlich im Mainstream-Verfahren gemessen und graphisch auf dem Monitor (Tram 200 A, Marquette, Milwaukee, USA) dargestellt. Diese Messung wurde nur qualitativ genutzt, um eine Dislokation oder Verlegung der Trachealkanüle frühzeitig zu detektieren. Eine zuverlässige quantitative Messung ist beim Kleintier mit einer ungeblockten Trachealkanüle nicht zu erwarten. Die Werte wurden dementsprechend nicht ausgewertet.

3.3.5.4. Blutgasanalysen, Elektrolyt- und Hämoglobinkonzentrationen

Die Entnahme von arteriellem Blut zur Bestimmung arterieller Blutgasanalysen (BGA), der Blutglucosekonzentration sowie aller anderen laborchemischen Parameter erfolgte ebenfalls über den arteriellen Zugang. Es wurden Kapillaren à 150 µl verwendet, um unnötige Blutverluste zu vermeiden. Die Bestimmung von pH, PO₂, PCO₂, ionisiertem Calcium, Kalium- und Natriumkonzentration erfolgte mittels Analysator (ABL 505, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Darüberhinaus wurden folgende Parameter berechnet: Standard-Basenüberschuss (SBE), Standard-Bikarbonat (SBc), Sauerstoff-Sättigung (SaO₂). Weiterhin wurden die Gesamthämoglobinkonzentration (tHb), der Anteil an Oxyhämoglobin (HbO₂), Carboxyhämoglobin (COHb), Methämoglobin (MetHb) und plasmatischem Hämoglobin (fHb) mit einem 5-Wellenlängen Oxymeter gemessen (OSM 3, Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Das fHb wurde nach Zentrifugation (5 min bei 5000 rpm, Heraeus, Sepatech) von 80µl Blut aus dem Plasmaüberstand bestimmt. Der Sauerstoffgehalt wurde direkt über eine Sauerstoffmesszelle gemessen (Lex-O₂-Con™, Lexington, MA, USA).

3.3.5.5. Blutzucker

Die Bestimmungen der Blutzuckerkonzentration erfolgten mittels B-Glucose Analyser (Hemocue, Angelholm, Schweden).

3.4. Gewebeaufarbeitung

Abbildung 3.3 zeigt eine schematische Übersicht der Gewebeaufarbeitung. Das Herz wurde zur histopathologischen Aufarbeitung für 20 min bei -20°C tiefgekühlt, in eine vorgekühlte Matrix (Heart Matrix, Harvard) für 1mm-Schnitte eingebracht und basisparallel mittels Rasierklingen (Aesculap, Ersatzklingen zu BA244R) lamelliert. Sämtliche nachfolgende Untersuchungen erfolgten „verblindet“.

Die geradzahligen Schnitte wurden nach dem Schneiden sofort zwischen je zwei mit Folie abgedeckten Objektträgern in Trockeneis eingelegt und im Anschluß bei -80°C tiefgefroren. Um die Gefrierschnitte anfertigen zu können, wurden diese Präparate innerhalb von 4-12 Wochen nach dem Versuch in der Kühlkammer in Gefriermedium (Tissue Freezing Medium, Jung, Leica Instruments GmbH) eingebettet, wobei das Gewebe mit der Unterseite auf einem Korkplättchen fixiert wurde. Diese so entstandenen „Blöcke“ wurden sofort bei -80°C tiefgefroren und erst kurz vor Bearbeitung auf -20°C erwärmt. Nach der Fixation der eingebetteten Präparate auf Kryoblöcken erfolgte die Anfertigung der Gefrierschnitte mittels Ultramikrotom (CM 1800, Leitz, Nussloch) aus der zentralen Schnittebene 8, in der Ventrikeldicke und Infarktausdehnung (TTC-Färbung; siehe Anmerkung unter 3.) das größte Ausmaß annahmen. Die Schnittdicke betrug 10µm. Die Schnitte wurden jeweils auf einen in Trockeneis gelagerten Objektträger (Superfrost, Novoglas) aufgezogen und in Pappmappen wiederum bei -80°C gelagert. Die histochemischen Techniken zum Nachweis von DNA-Strangbrüchen wurden demzufolge nur in der zentralen Schnittebene (Schnittebene 8) durchgeführt.

Abbildung 3.3 Schema der Gewebeaufarbeitung

Basisparallele Lamellierung des Herzens in 1mm Schnitte in einer Heart Matrix (Harvard Apparatus)

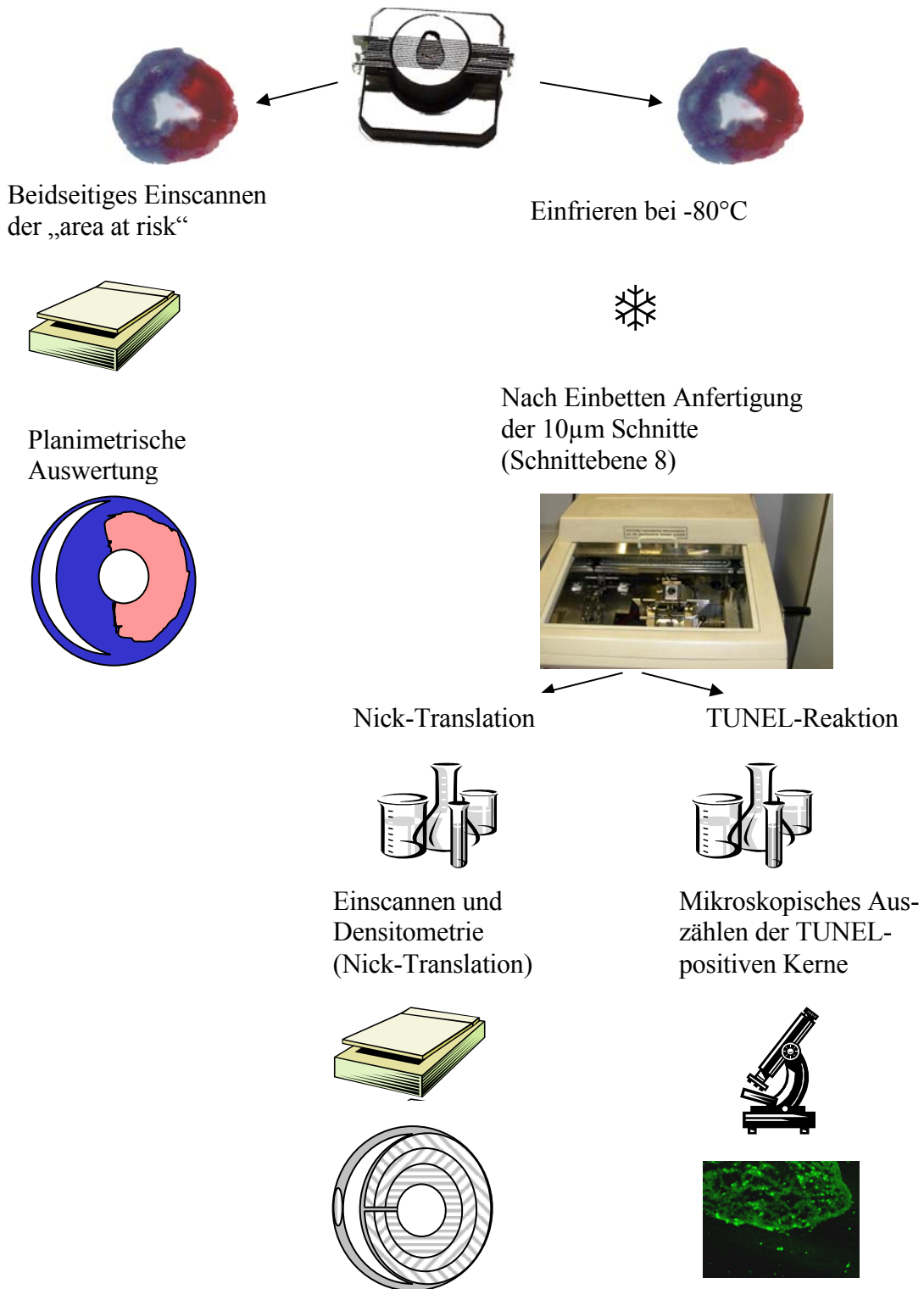


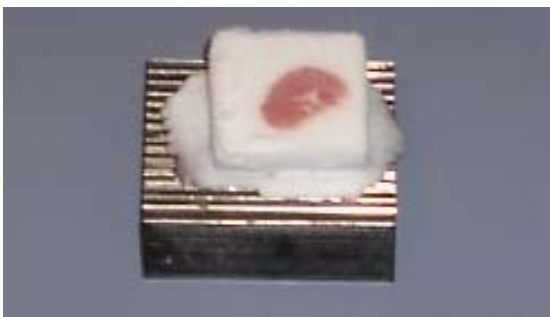
Abbildung 3.4 Darstellung ausgewählter Schritte der Anfertigung der Gefrierschnitte



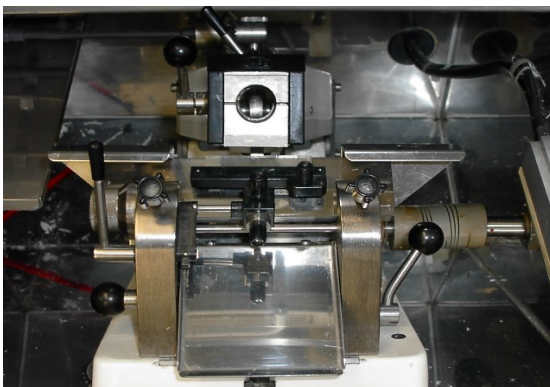
(a) Herzmatrix mit Rasierklingen, Objektträgern und Folien



(b) 1mm Herzschnitt Ebene 8 auf dem Objektträger



(c) Eingebetteter Herzschnitt auf dem „Schlitten“ des Mikrotoms



(d) Frontansicht des Kryotoms



(e) Gefrierschnitte der Dicke $10 \mu\text{m}$ auf Objektträgern in der Lagerungsmappe

3.5. „Area at risk“

3.5.1. Technik

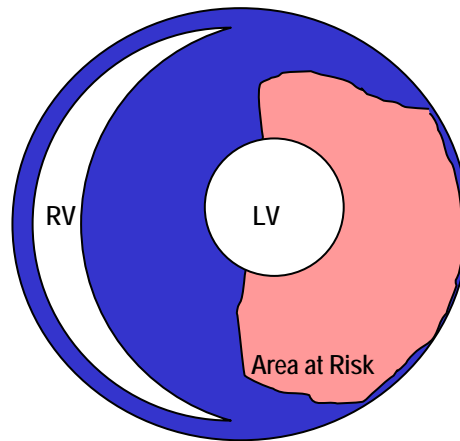
Die „area at risk“, das Versorgungsgebiet der ligierten Koronararterie, stellte sich nach „in-vivo“-Patentblau-Injektion unter erneuter Ligatur im Gegensatz zum blau gefärbten Restgewebe des Herzens als ungefärbtes Areal dar. Hierbei war der Übergang zwischen beiden Bereichen scharf abgrenzbar. Die ungeradzahligen Schnitte wurden sofort nach dem Lamellieren jeweils von beiden Seiten eingescannt. Dieses Verfahren ermöglichte es uns, ohne einen Informationsverlust jeden zweiten Schnitt (siehe Abschnitt 3.4. Gewebeaufarbeitung) für die histochemischen Nachweise mittels Nick-Translation und TUNEL-Reaktion zu verwenden.

3.5.2. Auswertung

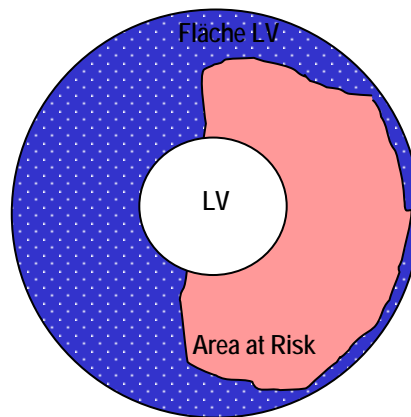
Die Bestimmung der Flächengröße der „area at risk“ (Patentblau-negative Areale) sowie des linken Ventrikels erfolgte planimetrisch mit Hilfe des Bildbearbeitungsprogrammes ScionImage™ (Scion Corp., ML, USA) jeweils für die Ober- und Unterseite jedes Schnittes. Das Ventrikellumen wurde hierbei stets ausgespart. Die Auswertung erfolgte ohne Kenntnis der Gruppenzugehörigkeit des einzelnen Tieres. Nachdem die genannten Einzelflächen bestimmt worden waren, wurde das Verhältnis der „area at risk“ zum linken Ventrikel ermittelt. Auf diesen Werten aller Teilschnitte beruhte die anschließende Berechnung der entsprechenden Volumina bezogen auf das gesamte Herz und nach Aufhebung der Kodierung auf die jeweiligen Versuchsgruppen. Diese Technik, die in Abbildung 3.5 zur Verdeutlichung schematisch dargestellt ist, entspricht dem vielfältig publizierten internationalen Standard [34;169], wobei üblicherweise auch ein Infarktnachweis mittels TTC-Färbung durchgeführt wird (siehe Anmerkung unter 3.).

Abbildung 3.5 Schematische Darstellung der verschiedenen Auswertungsareale zur Quantifizierung der „area at risk“ nach Injektion von Patentblau.

a) Es ist ein basisparalleler Querschnitt des Herzens mit den Lumina des linken (LV) und rechten (RV) Ventrikels dargestellt. Zusätzlich zeigt sich nach „in-vivo“-Anfärbung mit Patentblau bei erneut angelegter Koronarligatur die „area at risk“ (blass-rot).



b) Verhältnis der „area at risk“ zur Fläche des linken Ventrikels

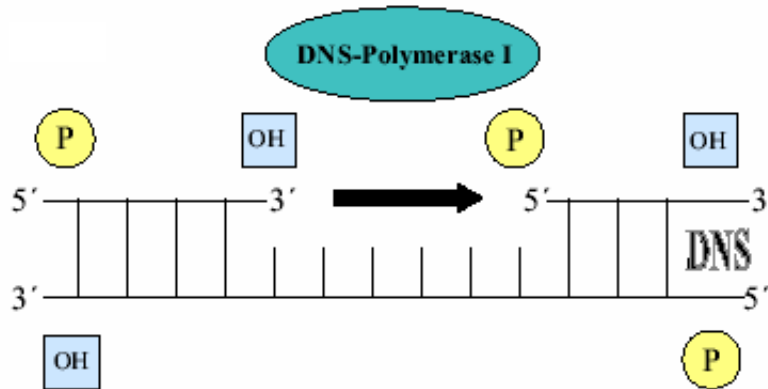


3.6. Nick-Translation und Autoradiographie

3.6.1. Technik

Um die DNA-Einzelstrangbrüche nachzuweisen, wurde die „In-situ-Nick-Translation“ (ISNT)-Methode [133] angewendet. Die Bezeichnung „Nick“ steht in diesem Zusammenhang für eine geöffnete Phosphodiesterbrücke mit einem freien 3'OH-Ende in einem doppelsträngigen DNA-Molekül, kurz für einen DNA-Einzelstrangbruch. Die Nick-Translation ist ein enzymabhängiges in situ Verfahren zur sensitiven Detektion von DNA-Einzelstrangbrüchen [83;84;115]. Nach dem Auftauen und Waschen der Gefrierschnitte wurden diese mit einem Reaktionscocktail aus DNA-Polymerase I und radioaktiv markierten Nukleotiden inkubiert. Hierbei bindet sich die DNA-Polymerase (*E. coli* DNA-Polymerase I (Kornberg Polymerase, Boehringer Mannheim)) spezifisch an die freien 3'OH-Enden der „offenen“ Einzelstränge. Während der Inkubation mit dem vorhandenen Nukleotidgemisch, das auch radioaktiv markiertes dTTP (desoxy[methyl-3H]Thymidine-5'-triphosphat, Amersham Pharmacia Biotech) enthält, füllt die DNA-Polymerase I die Lücken in der DNA abhängig von der Sequenz des Gegenstranges („template-abhängig“) mittels „de novo“-Synthese auf. Hierfür ist ein intakter Gegenstrang essentiell, so dass Doppelstrangbrüche durch dieses Verfahren nicht mit erfasst werden. Gleichzeitig katalysiert sie den Abbau des ursprünglichen DNA-Stranges am 5'-Phosphat-Ende. Zur radioaktiven Markierung diente das Wasserstoffisotop Tritium (^3H), das durch seine emittierte β -Strahlung zur Schwärzung eines Röntgenfilms führt, indem es die im Film enthaltenen Silberhalogenide reduziert. Damit besteht ein proportionaler Zusammenhang zwischen der Menge an eingebautem radioaktiven dTTP, also der DNA-Einzelstrangbruchrate, und der Schwärzungsintensität des Röntgenfilms. Diese lässt sich nach Entwicklung und Fixierung des Filmes mittels Densitometrie semiquantitativ bestimmen. Der Versuchsablauf ist nachfolgend detailliert beschrieben und in Abbildung 3.6 schematisch dargestellt.

Abbildung 3.6 Die Abbildung zeigt schematisch die Reaktion der „in-situ“-Nick-Translation
 Zur Erläuterung siehe vorangehender Textabschnitt



Zuerst wurden die Schnitte für 5 min in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl) aufgetaut und für 20 min in einer Methanol:Eisessig-Lösung (2:1) fixiert. Danach folgten zwei erneute Waschvorgänge für jeweils 5 min in NaCl. Anschließend wurden die Schnitte mittels Warmluft getrocknet. Während der Trocknungsphase wurde das Reaktionsgemisch in folgenden Konzentrationen angesetzt (Tabelle 3.3). Der Puffer (Tabelle 3.4) wurde in größeren Mengen angesetzt und in Aliquots bei -20°C gelagert.

Tabelle 3.3 Reaktionsgemisch für die In-Situ-Nick-Translation. ¹Boehringer Mannheim, ²Sigma, ³Amersham Pharmacia Biotech. Alle Komponenten wurden in einem Becherglas gemischt.

Substanz	Endkonzentration	pro Schnitt
NT-Puffer		636,5 µl
dATP ¹	50 µM (Stammlsg.: 5 mM)	7 µl
dGTP ¹	50 µM (Stammlsg.: 5 mM)	7 µl
dCTP ¹	50 µM (Stammlsg.: 5 mM)	7 µl
Dimethylsulfoxid (DMSO) ²	5%	35 µl
³ H-dTTP (51 Ci/mmol) ³	3 µCi/ml	4 µl
DNA-Polymerase ¹	20 U/ml	3,5 µl

Tabelle 3.4 Zusammensetzung des NT-Puffers.
 Tris : Tris [hydromethyl]aminomethane (TRIZMA BASE)

Substanz	Endkonzentration	für 100 ml
Tris $MW=121,1$	50 mM	605,5 mg
MgCl ₂ x 6 H ₂ O $MW=203,3$	5 mM	102 mg
2-Mercaptoethanol $MW=78,13$	10 mM	78 µl

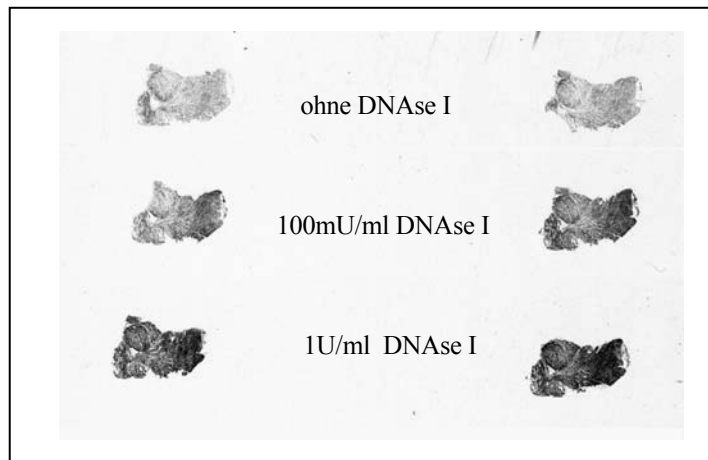
Das Reaktionsgemisch wurde 10 s durch Invertieren gemischt und 1 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Je 700 µl Reaktionscocktail wurden im Anschluss auf die vollständig trockenen Schnitte pipettiert und dann 40 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Reaktion durch Entfernen des Reaktionscocktails und Waschen der Schnitte in NaCl mit 1% Tetrasodium-Pyrophosphat (Sigma) gestoppt. Der Waschschrift wurde fünfmal wiederholt. Nach dem Waschen wurden die Schnitte wieder mittels Warmluft getrocknet, auf Fotokarton aufgeklebt und beschriftet. Darauf wurde im abgedunkelten Raum ein Röntgenfilm (Hyperfilm 3H, Amersham Pharmacia Biotech, Amersham, GB) platziert und beides zusammen in einer Expositionskassette für 24 Stunden im Dunkeln inkubiert. Anschließend wurden die Filme durch den Röntgenentwickler AGFA G150 entwickelt (5 min) und mit dem Fixierer AGFA G354 fixiert (10 min), wobei nicht reduzierte Silberhalogenide entfernt wurden, so dass der Film durchsichtig wurde. Zusätzlich zu den zu untersuchenden Schnitten wurden die nachfolgenden Kontrollen durchgeführt:

Kontrollschnitte

Um einen unspezifischen Einbau der Nukleotide auszuschließen, wurden in Vorversuchen Schnitte mit dem oben beschriebenen Reaktionsgemisch ohne DNA-Polymerase als Negativkontrolle behandelt.

Ebenfalls im Vorversuch wurden Schnitte mit einer Reaktionslösung inkubiert, die zusätzlich noch DNase I (Desoxyribonuklease I, Boehringer Mannheim) in verschiedenen Konzentrationen enthielt, um die Funktionalität der Reaktion zu zeigen (je mehr DNase I desto größer die Anzahl der Einzelstrangbrüche, desto mehr Nukleotideinbau, desto stärker die Schwärzung des Filmes). Abbildung 3.7 zeigt die aus dem Vorversuch hervorgegangenen Ergebnisse der Autoradiographie:

Abbildung 3.7 Autoradiographische Ergebnisse des Vorversuches. Hier wurden den Reaktionsgemischen verschiedene Konzentrationen DNase I beigemischt, um eine geeignete Konzentration für die qualitativen Positivkontrollen des Hauptversuches zu bestimmen.

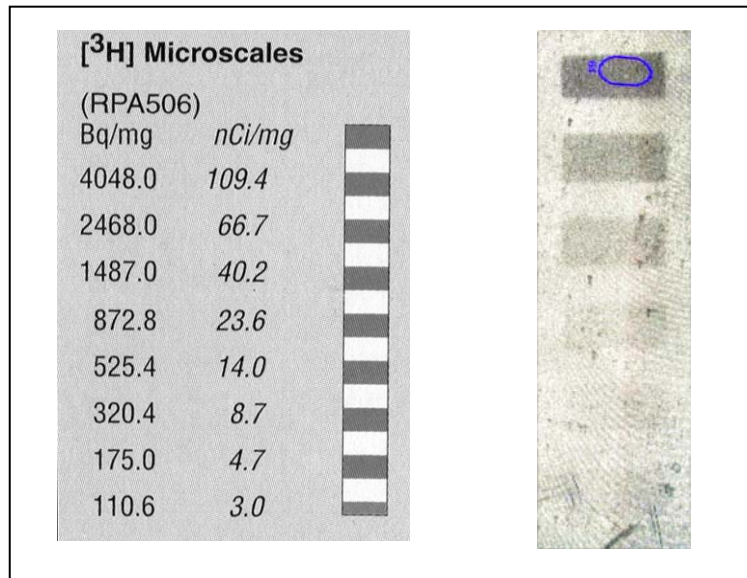


In den eigentlichen Experimenten wurden jedesmal 5 komplette Querschnitte der zentralen Ebene 8 eines jeden Tieres in die Untersuchungen eingeschlossen.

Microscale:

Auf jedem Film wurden zusätzlich zu den bereits beschriebenen Kontrollen Microscales als eine weitere Kontrolle mitgeführt. Diese Teststreifen enthalten das jeweilige Radioisotop in gleichmäßig in ein Polymer inkorporierter Form. Die 8-10 verschiedenen Zonen, die auf einem Streifen untereinander angeordnet sind, stellen jeweils eine spezifische Aktivität dar, wie Abbildung 3.8 schematisch verdeutlicht. Als Bezugspunkt für die quantitative Auswertung wurde die optische Dichte des Feldes mit der intensivsten Schwärzung der Microscale herangezogen.

Abbildung 3.8 Schematische Darstellung einer Microscale (Quelle: Katalog Amersham Pharmacia Biotech). Links: Angegeben sind die spezifischen Aktivitäten der einzelnen Bereiche in Bq/mg und in nCi/mg. Rechts: Microscale auf einem Autoradiogramm. Die niedrigeren spezifischen Aktivitäten sind nicht abgebildet, da sie keine Schwärzung des Röntgenfilms hervorgerufen haben. Im oberen Bereich ist abgebildet, wie per ImageQuant die optische Dichte des intensivsten Feldes der Microscale bestimmt wurde.



Während der Versuchsdurchführung wurden grundsätzlich Schnitte, die mit verschiedenen Reaktionscocktails inkubiert wurden (z.B. mit/ohne DNase I, mit/ohne DNA-Polymerase), in verschiedenen Gefäßen und mit getrennten Puffer-Aliquots gewaschen, um eine Verschleppung der Enzyme (Kreuzkontamination) zu verhindern.

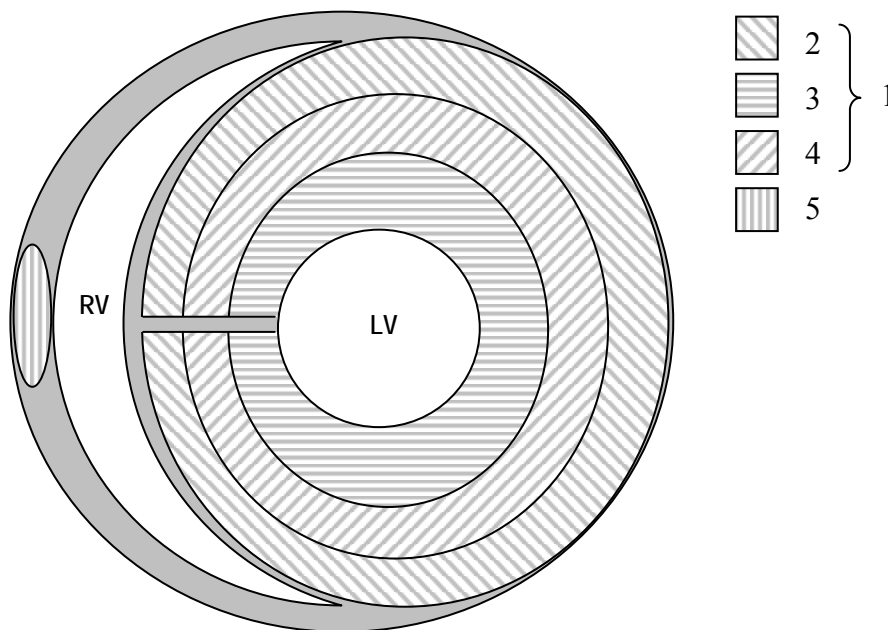
Das dargestellte Verfahren ist von unserer Arbeitsgruppe erstmalig in einem kardialen Ischämiemodell etabliert worden [162]. Für die aufgetauten Gefrierschnitte wurde ein Standard Kit (Kit Nick Translation, Kat.-Nr. 976776, Roche) verwendet.

3.6.2. Auswertung mittels Densitometrie

Die Autoradiogramme wurden mit Hilfe eines Laser-Densitometers (Personal Densitometer SI, Molecular Dynamics) in den Computer eingelesen. Mit Hilfe des Programmes ImageQuant™ 4.1 (Amersham Biosciences, Amersham, GB) wurde anschließend die Schwärzung der folgenden Areale des Filmes gemessen. Pro Schnitt wurden dazu fünf Flächen berechnet:

1. Der gesamte linke Ventrikel (ohne Lumen)
2. Das epikardiale Drittel (sichelförmig)
3. Das endokardiale Drittel (sichelförmig)
4. Das mittlere/myokardiale Drittel (sichelförmig)
5. Ein repräsentatives Areal des rechten Ventrikels (Ellipsoid)

Abbildung 3.9 Schematische Darstellung eines Querschnittes des Herzens mit den verschiedenen Auswertungsarealen zur Quantifizierung der Dichte der DNA-Einzelstrangbrüche im autoradiographischen Nachweis nach Nick-Translation (Die nummerierten Felder entsprechen der Aufzählung unter Punkt 3.6.2)



Für die Bestimmung des jeweiligen Referenzwertes (RW) pro Film wurde die optische Dichte des jeweils intensivsten Feldes der 5 auf jedem Film mitgeführten Microscales bestimmt (Polygonales Messfeld). Zur Ermittlung der Hintergrundschwärzung (HS) wurden drei große Areale (Ellipsoide) verteilt über den Film berechnet. In allen Berechnungsarealen wurden Artefakte umfahren und so von der Messung ausgeschlossen.

Das Programm berechnete für jedes Areal die mittlere optische Dichte mit Standardabweichung, Median und Flächengröße (in Pixeln). Die Werte wurden in MS-Excel-Tabellen exportiert. Der genaue Algorithmus ist nachfolgend aufgelistet:

1. Zunächst wurde der „Range“ des Durchschnittswertes der optischen Dichte (Average) für jeden Film auf einen Bereich von 0,0 bis 1,0 eingestellt.
2. Aus den drei Hintergrundwerten wurde der Mittelwert der Hintergrundschwärzung (HS) berechnet. Dieser wurde in der Folge von allen anderen Messwerten abgezogen.
3. Es wurde weiterhin für die fünf Microscales ein Mittelwert des intensivsten (obersten) Feldes berechnet, der nach Abzug der HS als Referenzwert (RW) mit einer optischen Dichte von 1=100% festgelegt wurde.
4. Bei den Messarealen der Versuchstiere wurde für jedes Tier die Bestimmung eines jeden Areals in den fünf verschiedenen Schnitten durchgeführt und der Mittelwert bestimmt, der wiederum durch die HS korrigiert wurde.
5. Da man zur Flächenbestimmung einzelne Areale (z.B. das Ventrikellumen oder Artefakte (Areale im Schnitt, die dem Hintergrund entsprechen)) aussparen musste, war es teilweise notwendig, die Zonen in mehrere Teilbereiche zu untergliedern. In diesen Fällen wurde die optische Dichte für die Gesamtzone entsprechend der folgenden Formel bestimmt:

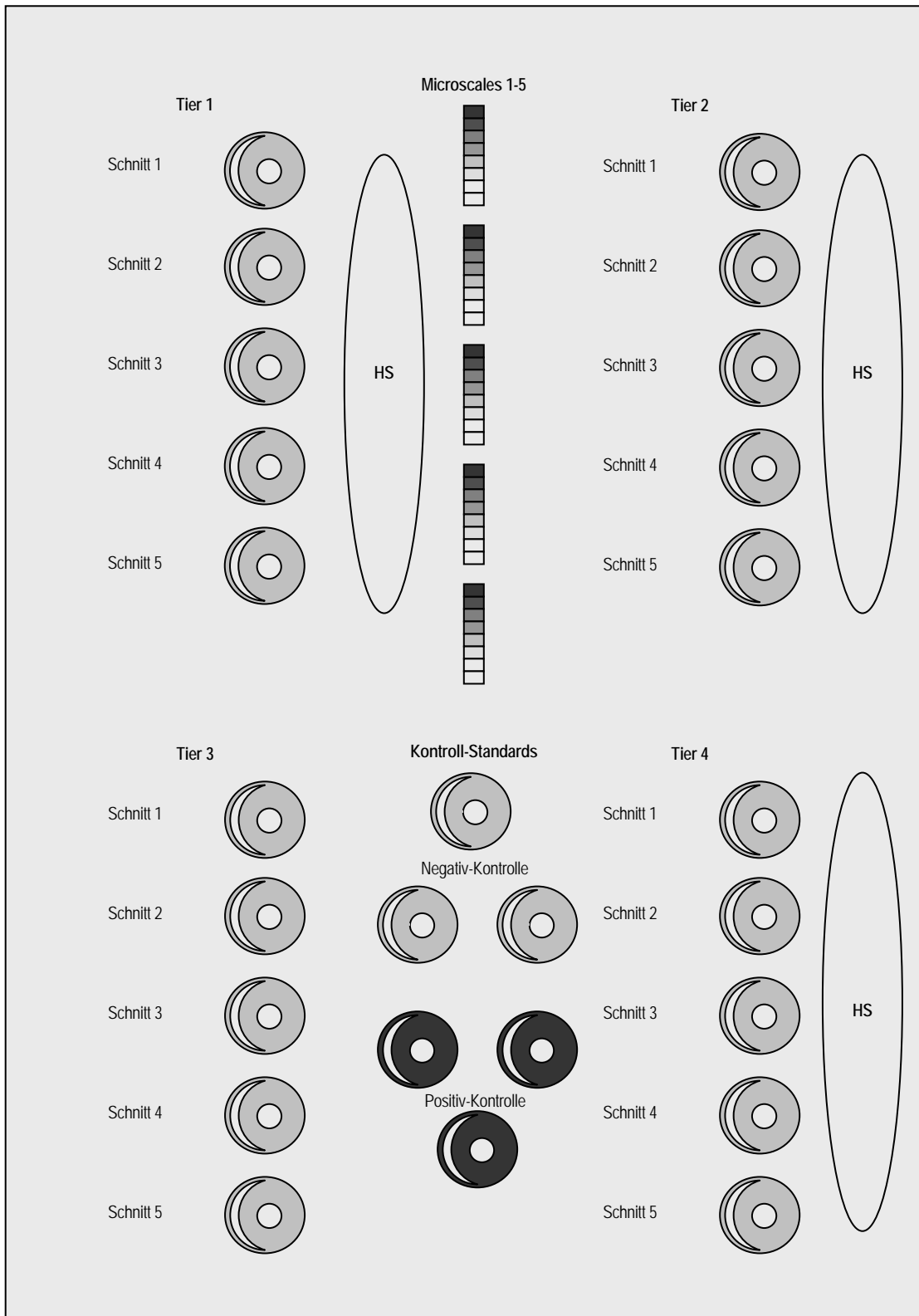
$$\frac{Av_1 * F_1 + \dots + Av_n * F_n}{F_1 + \dots + F_n}$$

Av=Average (Durchschnittswert); F=Fläche; n=Anzahl der Teilstücke

6. Es wurden zur Extremwertkorrektur die Werte des Schnittes mit dem höchsten sowie des Schnittes mit dem niedrigsten Gesamtwert für den linken Ventrikel von der weiteren Auswertung ausgeschlossen.
7. Die Messwerte der drei pro Tier verbliebenen Schnitte wurden nun in Relation zu dem RW (100%) gesetzt und als relative Dichte (in %) angegeben. Für jedes Tier wurde nun ein Mittelwert pro Messareal gebildet, der für die weitere statistische Auswertung genutzt wurde.
8. Nach Auswertung aller Tiere wurde die Kodierung aufgehoben, die Tiere entsprechend ihrer Gruppenzugehörigkeit geordnet und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

Abbildung 3.10 zeigt eine schematische Darstellung der Filmbelegung.

Abbildung 3.10 Schematische Darstellung der Filmbelegung mit je 5 Schnitten von 4 Versuchstieren, den Microscales für die Ermittlung des Standards sowie einer Positiv- und einer Negativ-Kontrolle. Zusätzlich sind die Felder für die Bestimmung der Hintergrundschwärzung (HS) eingezeichnet.

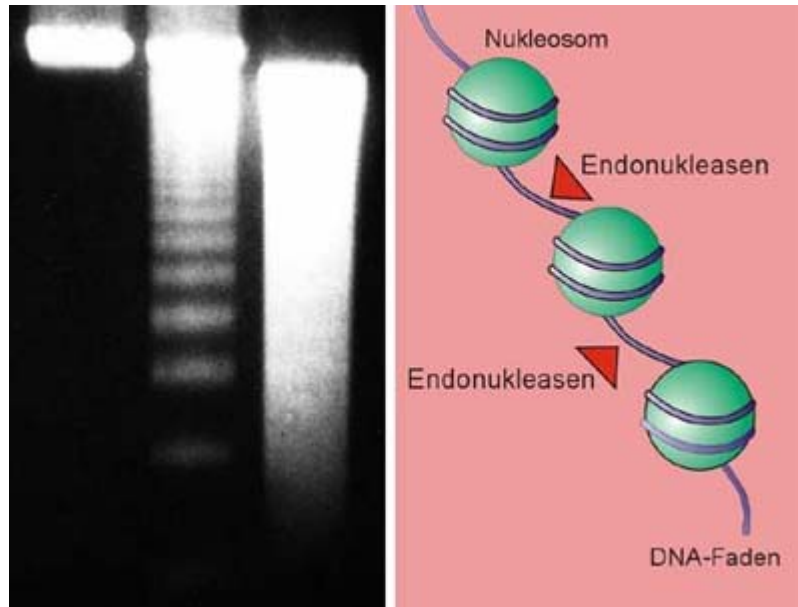


3.7. DNA-Laddering

Das DNA-Laddering stellt einen verbreiteten Standard für den Nachweis von Apoptose dar. Nach DNA-Extraktion und Elektrophorese erlaubt dieses Verfahren die Darstellung von apoptosespezifischen Banden, die aus einer DNA-Fragmentation in 180-200 Basenpaare (bzw. geradzahlige Vielfache) resultieren [46;182]. Im Unterschied hierzu findet man nach abgelaufener Nekrose Fragmente jeglicher Größe, da es in diesem Fall zu stochastischen Schäden der DNA kommt. In der Elektrophorese zeigen sich dann keine separaten Banden, sondern ein typischer „Smear“, d. h. ein „Grauschleier“ aus DNA-Fragmenten jeglicher Größe. Um die quantitativen Ergebnisse der TUNEL-Reaktion interpretieren zu können, erfolgte, wie in der Literatur empfohlen [29], zusätzlich der qualitative Nachweis von Apoptose in exemplarischer Weise durch DNA-Laddering. Dieses Vorgehen begründet sich zum einen auf der Tatsache, dass die Apoptose einen von diversen Faktoren (z.B. Organ, Tierart, Sauerstoffzufuhr) abhängigen Prozess darstellt. Zum anderen kommt es im Rahmen der Apoptose erst mit einer bis jetzt noch nicht genau definierten zeitlichen Latenz nach der einwirkenden Noxe (z.B. Ischämie) zum Auftreten von DNA-Doppelstrangbrüchen. Diese treten jedoch nicht nur ausschließlich im Rahmen von Apoptose sondern auch während der Nekrose auf [48;130]. Aus diesen Gründen muss Apoptose zunächst spezifisch für jedes Modell nachgewiesen werden, bevor eine sinnvolle quantitative Beurteilung erfolgen kann. Das DNA-Laddering wurde während der Vorversuche an den Herzen von 3 separaten Tieren der Positiv-Kontrolle sowie 3 Tieren der Negativ-Kontrolle durchgeführt. Der operative Versuchsablauf entsprach hierbei exakt dem bereits dargestellten Procedere im Hauptversuch. Nach Entnahme des Herzens und basisparalleler Lamellierung wurde das jeweilige Herz bei -80°C tiefgefroren. Das DNA-Laddering erfolgte in üblicher Verfahrensweise [119]. Etwa 60 mg Gewebe wurden aus der „area at risk“ (Positiv-Kontrolle) bzw. dem linken Ventrikel (Negativ-Kontrolle) entnommen und die myokardiale DNA mittels Nucleinsäure Extraktions Kit (DNeasy Tissue-KIT, Qiagen, Hilden) isoliert. Nachdem die isolierte DNA (10 μg) auf 2% Agarose-Gel gegeben worden war, erfolgte die Auftrennung mittels Flachbett-Gelelektrophorese (Midi 1 Gelelektrophoresekammer, Fa. Carl Roth, Karlsruhe) bei 100 V (Spannungsgeber PowerSupply, 250 EX, Life Technologies, Inc., USA) in TBE Puffer. Anschließend wurden die Gele

unter UV-Licht fotografiert (ChemiDoc Documentation System, BioRad Laboratories, Inc., USA). Als positiver Nachweis wurde das Vorhandensein von 180-200 Basenpaaren (oder geraden Vielfachen) gewertet.

Abbildung 3.11 Nachweis des apoptotischen Chromatinabbaus anhand der DNA-Leiter



- Elektrophoretische Auftrennung isolierter DNA aus normalen (hochmolekulare DNA), apoptotischen (DNA-Leiter) und nekrotischen Zellen (DNA-„Schmier“).
- Der DNA-Faden ist zweifach um einen Proteinkern aus Histonen gewickelt. Diese Struktur wird Nucleosom genannt. Die DNA-Leiter kommt dadurch zustande, dass die DNA im Bereich der Nucleosomen vor dem Abbau geschützt ist, wohingegen die Zwischenbereiche hydrolysiert werden können.

Quelle: www.ruhr-uni-bochum.de/anat1/Forschungsschwerpunkte/Forschung_Apoptose.htm

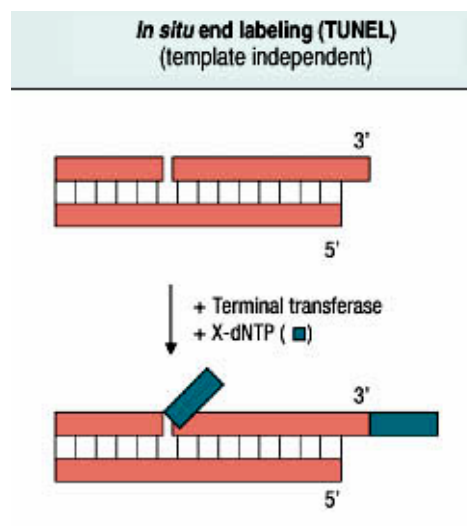
3.8. TUNEL-Reaktion

3.8.1. Technik

Zum quantitativen Nachweis der DNA-Doppelstrangbrüche, die unter anderem während der Apoptose entstehen, wurde die TUNEL-Reaktion (TdT-mediated dUTP nick end labeling) angewendet. Zwar bestehen bei dieser Methode bezüglich der Apoptose-Spezifität auch einige Schwächen, sie ist aber unter den bisher bestehenden Nachweismöglichkeiten die beste und wird demzufolge häufig zur Quantifizierung und Lokalisierung von Apoptose eingesetzt [29]. Die Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase bindet dabei spezifisch an freie 3'OH-Enden der doppelsträngigen DNA und füllt die Lücken vollkommen unabhängig von einem komplementären DNA-Strang mit zugegebenen Fluoreszeinkoppelten Nucleotiden auf. Diese Fluoreszenz ist unter dem Mikroskop

nachweisbar, jedoch nur innerhalb eines begrenzten Zeitintervalls. Deshalb wurde in dieser Studie das indirekte TUNEL-Assay verwendet, bei dem sich der im Anschluss zugefügte Anti-Fluoreszein-Antikörper mit seinen Fab-Fragmenten an die modifizierten Nukleotide anlagert. Der Antikörper ist seinerseits mit dem Enzym Alkalische Phosphatase konjugiert, das nach Hinzugabe eines Substrates, in diesem Fall Fast-Red-Tablets (Roche), die TUNEL-positiven Zellkerne sichtbar macht. Der Substratlösung wurde Levamisol, ein Inhibitor der endogenen Alkalischen Phosphatase-Aktivität, zugesetzt.

Abbildung 3.12 Schematische Darstellung des Prinzips der TUNEL-Reaktion (Quelle: Herstellerkatalog). Zur Erläuterung siehe vorangehender Textabschnitt



Die zuvor bei -80°C gelagerten Schnitte wurden zuerst für 5 min in physiologischer Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) aufgetaut, anschließend für 20 min in 3,7% Formaldehyd in PBS fixiert und danach dreimalig 5 min in PBS gewaschen. Um das Gewebe zu permeabilisieren wurden die Schnitte 2 min bei 4°C in Triton X-100 0,1% und Natriumcitrat 0,1% inkubiert, woraufhin wiederum drei Waschschritte à 5 min in PBS folgten. In dieser Zeit wurde das Reaktionsgemisch vorbereitet: 100 μl des Nukleotidgemisches wurden abpipettiert und für Negativ-Kontrollen in ein neues Reaktionsgefäß überführt. 50 μl Enzymlösung wurden dem Nukleotidgemisch zugefügt, 10 s durch Invertieren gemischt und 1 min bei Raumtemperatur äquilibriert. Jeweils 50 μl der so hergestellten TUNEL-Reaktionsmischung wurden auf die Schnitte aufpipettiert. Es folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37°C im Wärmeschrank. Danach wurde

die Reaktion durch dreimaliges Waschen der Schnitte in PBS à 5 min beendet und die Schnitte mittels Warmluft getrocknet. Anschließend erfolgte die Zugabe von jeweils 50 µl an Alkalische Phosphatase gekoppelter Anti-Fluoreszein-Antikörper (Converter-AP) und wiederum eine 30 minütige Inkubation bei 37°C . Nach erneutem dreimaligen Waschen mit PBS wurde als letzter Schritt für 10 min je 75 µl Substratlösung zugesetzt (Fast Red Tablets) und auch diese Reaktion durch Waschen in PBS für 3x5 min beendet. Das Plasma der Zellen wurde mit Light Green angefärbt, um zytoplasmatische Strukturen im Lichtmikroskop erfassen und von Kernstrukturen abgrenzen zu können. Neben den zu untersuchenden Schnitten wurden die nachfolgend dargestellten Kontrollen durchgeführt:

Negativkontrollen

Bereits in Vorversuchen wurden einige Herzschnitte mit dem oben beschriebenen Reaktionsgemisch ohne terminale Desoxynukleotidyl-Transferase (TdT) als Negativkontrolle behandelt, um einen unspezifischen Einbau der Nukleotide ausschließen zu können. In den folgenden Versuchen wurden jeweils zwei Schnitte als Negativkontrollen behandelt.

Positivkontrollen

Ebenfalls in den Vorversuchen wurden Schnitte mit einer Reaktionslösung inkubiert, die zusätzlich DNase I (Desoxyribonuklease I, Roche) in verschiedenen Konzentrationen enthielt. Durch diesen sicher gesetzten Schaden konnte die Funktionalität der Reaktion nachgewiesen werden.

In den eigentlichen Experimenten wurde jeweils drei Schnitten eines unbehandelten Tieres (Negativ-Kontrolle) 100 mU ml⁻¹ DNase I zugesetzt. Drei weitere Schnitte dieses Versuchstieres wurden parallel mit der Reaktionslösung ohne DNase I inkubiert. Diese sechs Schnitte wurden als qualitative Kontrollen für das erfolgreiche Ablaufen der Reaktion verwendet.

Grundsätzlich wurden Schnitte, die mit verschiedenen Reaktionscocktails inkubiert wurden (z.B. mit DNase I, mit und ohne TdT), in verschiedenen Gefäßen und mit getrennten Puffer-Aliquots gewaschen, um eine Verschleppung der Enzyme (Kreuzkontamination) zu verhindern.

Im Einzelnen wurden folgende Reagenzien verwendet:

„In Situ Cell Death Detection Kit, AP“ (Roche), beinhaltet:

- Lösung 1 (Enzymlösung): Terminale Desoxynucleotidyl Transferase aus Kalbsthymus
- Lösung 2 (Färbelösung): Fluoreszein-markierte Nukleotidmischung.
- Lösung 3 (Converter-AP): Anti-Fluoreszein-Antikörper, Fab-Fragment vom Schaf konjugiert mit Alkalischer Phosphatase (AP).

Weitere Substanzen:

- Formaldehyd, 3,7% in PBS
- 0,1% Triton X-100 in 0,1% Natriumcitrat
- DNase-Lösung: 50 mM TrisHCl + BSA (1mg ml⁻¹), pH 7,5
- Fast-Red-Lösung: 0,1 M TrisHCl, pH 8,2

3.8.2. Auswertung

Die TUNEL-positiven Zellkerne wurden bei 400-facher Vergrößerung (BX40, Olympus) rastergestützt ausgezählt [169]. Das mikroskopische Bild wurde zunächst fotografiert (U-CMAD3, Olympus), digitalisiert abgespeichert und mittels des Computerprogrammes Analysis 3.1 (SoftImaging Systems) weiterbearbeitet. Im nächsten Schritt wurde ein nummeriertes Messraster mit Feldern der Kantenlänge 50x50µm über das Foto gelegt. Für die Auszählung wurden nur Felder berücksichtigt, die zu mindestens 50% mit Gewebe ausgefüllt waren. Hierdurch sollten Artefakte, wie z.B. Gewebelücken, von der Auswertung ausgenommen werden. Angeschnittene Zellkerne wurden jeweils nur an der linken und unteren Kante der Felder gezählt. Die Verteilung der Gesichtsfelder erfolgte transmural in der Vorderseitenwand des linken Ventrikels. Aufgrund der Darstellung der „area at risk“ in den benachbarten Schnittebenen (siehe 3.5) kann mit sehr großer Wahrscheinlichkeit davon ausgegangen werden, dass diese Region Teil der „area at risk“ war. Wie auch in der Literatur beschrieben wurde je ein Drittel der Felder im endokardialen, mittleren/myokardialen und epikardialen Bereich der Wand des linken Ventrikels gelegt [119]. In drei Schnitten pro Tier wurde insgesamt 1 mm² ausgezählt. Abbildung 3.13 zeigt die Anordnung der Auswertungsareale innerhalb der Vorderseitenwand des linken Ventrikels. Die Gesamtzahl der TUNEL-positiven Kerne der Kardiomyozyten wurde entsprechend anderen Publikationen [47;73;150]

pro Fläche (mm²) angegeben und statistisch zwischen den Gruppen verglichen. Auf eine Angabe der relativen Anteile von TUNEL-positiven Kernen an der Gesamtzahl der Kerne wurde verzichtet, da eigene Vorversuche sowie Ergebnisse aus der Literatur [47] gezeigt hatten, dass durch die hierfür notwendige Gegenfärbung aller Zellkerne Überlagerungsphänomene entstanden wären, die eine Identifikation der TUNEL-positiven Kerne deutlich erschwert hätten. Die Auszählung erfolgte geblindet. Im Anschluß wurde die Kodierung der Tiere aufgehoben. In Abbildung 3.14 sind Fotos von TUNEL-positiven Zellkernen nach unterschiedlichen Färbungen dargestellt.

Abbildung 3.13 Schematische Darstellung der verschiedenen Auswertungsareale zur Quantifizierung der TUNEL-positiven Zellkerne. Die Areale wurden im Verlauf des Lotes zur Verbindungslinie der Ansätze des rechten Ventrikels innerhalb der vermuteten „area at risk“ platziert. *a)* endokardiales 1/3, *b)* mittleres 1/3, *c)* epikardiales 1/3.

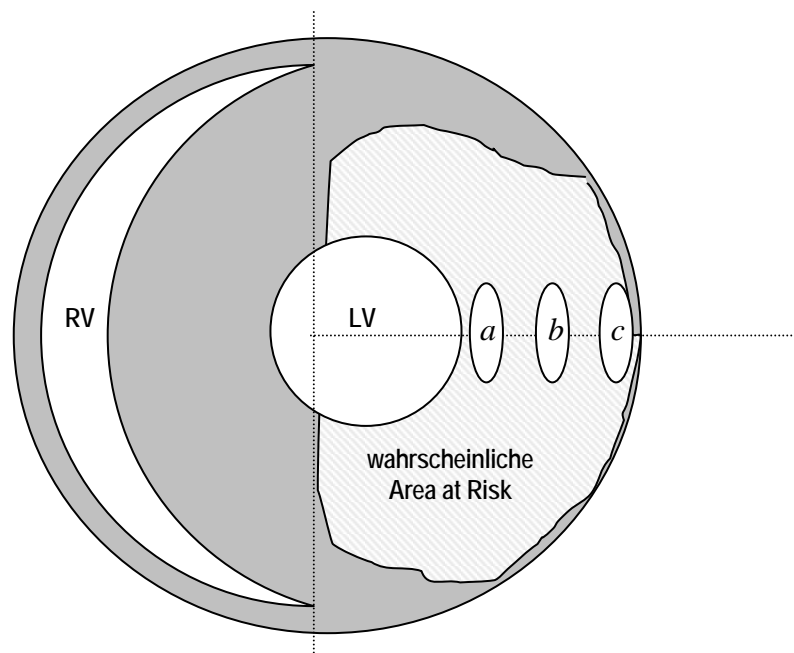
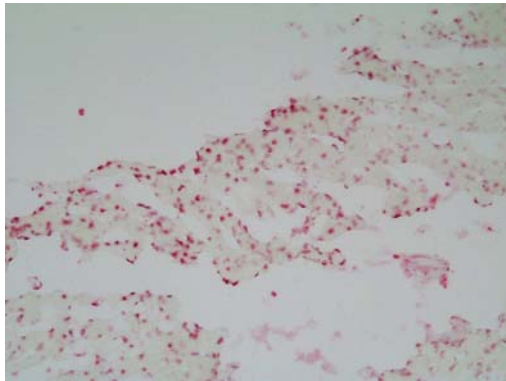
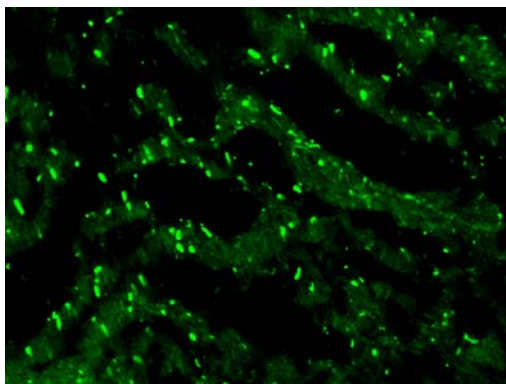


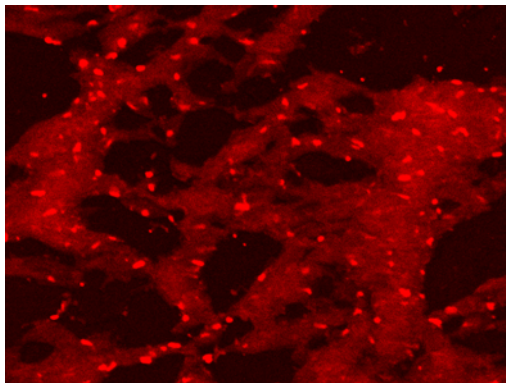
Abbildung 3.14 Darstellung von verschieden angefärbten TUNEL-positiven Zellkernen (a-d) im Myokard nach 25 min Ischämie und 120 min Reperfusion im Rahmen der Pilotversuche.



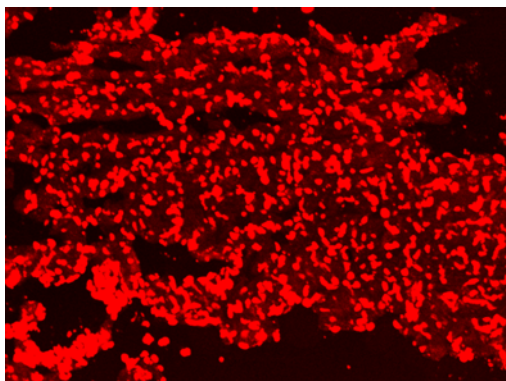
(a) Färbung durch Alkalische Phosphatase und das Substrat Fast-Red - Tablets. Zytoplasmatische Strukturen wurden mit Light Green angefärbt.



(b) Färbung durch Fluorescein



(c) Färbung durch Tetramethylrodamin (TMR)



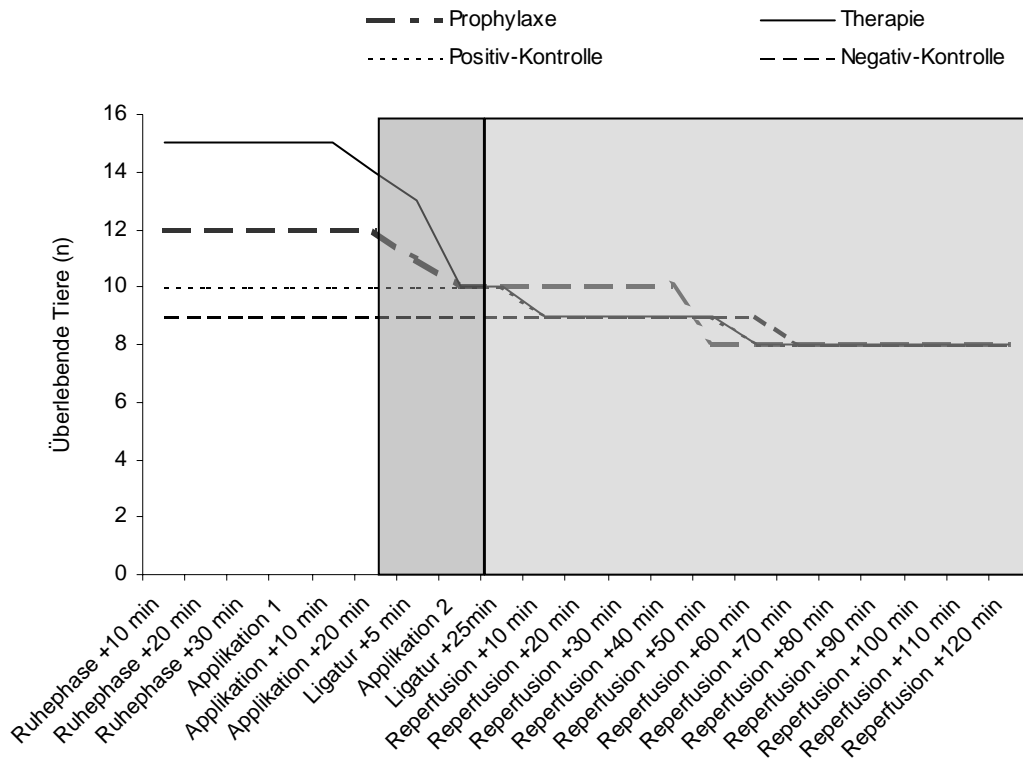
(d) Positiv-Kontrolle nach Inkubation mit DNase I und Färbung mit Tetramethylrodamin (TMR)

4. Ergebnisse

4.1. Intraoperative Messwerte

Die intraoperativen Messwerte wurden im folgenden (4.1.1-4.1.8) nur für die Tiere aufgeführt, die den Versuch mit kompletter Ischämie und 120 minütiger Reperfusion durchlaufen hatten (n=32). Die jeweilige Überlebenszeit in den einzelnen Versuchsgruppen ist in Abbildung 3.1 unter zusätzlicher Berücksichtigung der Tiere, die nach Randomisierung aber noch vor der Ischämie bzw. vor therapeutischer Applikation von HBOC-200 oder in der Reperfusion verstarben (n=14), veranschaulicht. Vor Ablauf der Randomisierung verstarben 10 Tiere, die nicht dargestellt sind.

Abbildung 4.1 Darstellung der Überlebenskurve (Kaplan-Meier) in den einzelnen Versuchsgruppen in Absolutwerten; am Ende der Reperfusion ergibt sich die Zielgröße n=8 pro Gruppe.



4.1.1. Gewicht

Bezüglich des Körpergewichtes der Versuchstiere traten keine Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen auf. Das schwerste Tier, das den Versuch komplett durchlief, wog 482g, das leichteste 280g. In Tabelle 8.1 im Anhang (8.3.1) sind die Daten als $MW \pm SD$ aufgeführt.

4.1.2. Hämodynamik

Sowohl der arterielle Mitteldruck als auch der zentralvenöse Druck und die Herzfrequenz zeigten auf die Gesamtzeit des Versuches bezogen keine relevanten Unterschiede zwischen den Gruppen. Ausnahmen stellten erwartungsgemäß die jeweiligen Applikationszeitpunkte von HBOC-200 dar. Hierbei kam es zu einem ca. 10-20 minütigen deutlichen Anstieg des arteriellen Mitteldruckes und somit zu signifikanten Gruppenunterschieden zu den Zeitpunkten „Applikation Prophylaxe +10 min“ und „Applikation Prophylaxe +20 min“ zwischen der Prophylaxe- und der Negativ-Kontrollgruppe. Die Daten sind als $MW \pm SD$ in den Tabellen 8.2-8.4 im Anhang (8.3.2) dargestellt.

4.1.3. Temperatur

Die Körpertemperatur verhielt sich gruppenübergreifend über die gesamte Versuchszeit hinweg konstant. Wie aus den Daten ($MW \pm SD$) in Tabelle 8.5 im Anhang (8.3.3) ersichtlich, traten allerdings zu den Zeitpunkten „Reperfusion +10 min“, „Reperfusion +20 min“ und „Reperfusion +30 min“ signifikant höhere Werte bei den Tieren der Therapie-Gruppe auf als in der Negativ-Kontrolle.

4.1.4. Inspiratorische Sauerstoff-Konzentration und Blutgasanalysen

Die inspiratorische Sauerstoffkonzentration unterschied sich nicht zwischen den Gruppen. Nur zum Zeitpunkt „Ruhephase +30 min“ waren im Rahmen der Äquilibration nach der Präparationsphase vereinzelt noch Maximalwerte bis 0,5 notwendig. Nachfolgend lagen alle Werte zwischen 0,29 und 0,4 ($MW \pm SD$ in Tabelle 8.6 im Anhang (8.3.4)). Der PaO_2 konnte bei allen Tieren zwischen 70 und 160 mmHg gehalten werden. Gruppenunterschiede traten weder hierbei noch bei der arteriellen Sauerstoffsättigung oder dem arteriellen Sauerstoffgehalt auf. Der $PaCO_2$ unterschied sich ebenfalls nicht zwischen den Gruppen. Eine Normo- bzw. leichte Hyperventilation zur Unterdrückung der Spontanatmung konnte in allen

Fällen gewährleistet werden. Die Tabellen 8.7-8.10 im Anhang (8.3.4) zeigen die Daten der jeweiligen Parameter als MW±SD.

4.1.5. Fraktionelle O₂-Sättigung des Hämoglobins und Hämoglobinkonzentrationen

Weder bezüglich der Konzentration von Gesamt-Hämoglobin, Oxy-Hämoglobin, Carboxy-Hämoglobin noch von Met-Hämoglobin konnten Unterschiede zwischen den Gruppen festgestellt werden. Dies war insbesondere auch nach Applikation von HBOC-200 nicht der Fall. Das Carboxy-Hämoglobin betrug zu allen Messzeitpunkten in allen Gruppen 0% des tHb. Das Met-Hämoglobin stieg im Vergleich zur Referenzgruppe (Positiv-Kontrolle) nicht an. Die Maximalwerte betragen 0,6% (Positiv-Kontrolle) respektive 0,4% (Prophylaxe). Dagegen erfolgte erwartungsgemäß nach der Applikation von HBOC-200 in der Prophylaxe- und Therapie-Gruppe ein Konzentrationsanstieg des plasmatischen Hämoglobins im Blutplasma mit signifikanten Unterschieden zur Referenzgruppe. Die Konzentrationen an plasmatischem Hämoglobin lagen kurz nach Applikation in den Behandlungsgruppen zwischen minimal 0,7 und maximal 1,2 g dl⁻¹. Zum Versuchsende fielen diese auf Werte von ca. 0,7 g/dl in der Therapie-Gruppe und 0,47 g/dl in der Prophylaxe-Gruppe ab. Die Daten sind als MW±SD in den Tabellen 8.11-8.14 im Anhang (8.3.5) aufgeführt.

4.1.6. Säure-Basen-Haushalt

Anhand der Daten (MW±SD) in den Tabellen 8.15-8.17 im Anhang (8.3.6) ist ersichtlich, dass die Werte des arteriellen pH sowie von Standard-Bicarbonat und Base-Excess ohne Gruppenunterschiede stabil gehalten werden konnten.

4.1.7. Blutzucker

Die Glucose-Konzentration lag bei allen Tieren in einem Bereich zwischen 55 und 160 mg dl⁻¹. Gruppenunterschiede bezogen auf den Mittelwert traten nicht auf. Die Daten sind als MW±SD in Tabelle 8.18 im Anhang (8.3.7) dargestellt.

4.1.8. Elektrolyte

Die Elektrolyte konnten weitgehend stabil gehalten werden. Bei verschiedenen Tieren aller Gruppen mit Ausnahme der Negativ-Kontrolle stiegen im Verlauf die Kalium-Konzentrationen in hochpathologische Bereiche bis maximal 9,5 mmol l⁻¹

an, ohne dass es hierbei jedoch zu Gruppenunterschieden bezogen auf den Mittelwert kam. Die Tabellen 8.19-8.21 im Anhang (8.3.8) zeigen die Daten als MW±SD.

4.2. “Area at risk”

Die „area at risk“ stellte sich nach „in-vivo“-Patentblau-Injektion am Ende der 120 minütigen Reperfusion nach erneuter Koronararterienligatur als nicht angefärbtes Areal dar. Da in der Negativ-Kontrollgruppe (Gruppe 1) zu keinem Zeitpunkt eine Ligatur der linken Koronararterie erfolgte und somit keine „area at risk“ vorhanden war, wurde die Gruppe nicht in die Auswertung miteinbezogen. Diese Tiere dienten als Nullwert für die Untersuchungen der DNA-Schäden.

Bezogen auf das Verhältnis der „area at risk“ zum Gesamtvolumen des linken Ventrikels konnten in den verbleibenden drei Gruppen zwar keine signifikanten Unterschiede nachgewiesen werden, es zeigte sich jedoch eine Tendenz zu niedrigeren Werten in der Prophylaxe-Gruppe ($26,1 \pm 7,6\%$) im Vergleich zur Positiv-Kontrolle ($30,5 \pm 10,0\%$). Bei der Betrachtung der Absolutwerte der „area at risk“ erscheint dieser ebenfalls nicht signifikante Trend noch deutlicher, was jedoch auf das im Mittel kleinere Volumen des linken Ventrikels in der Gruppe 4 (Prophylaxe) zurückzuführen ist. Die Werte der Tiere, die zehn Minuten nach Ischämieinduktion die therapeutische Applikation von HBOC-200 in der gleichen Dosierung erhalten hatten, waren dagegen nahezu identisch ($30,1 \pm 10,5\%$) mit denen der Positiv-Kontrolle. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.1 dargestellt.

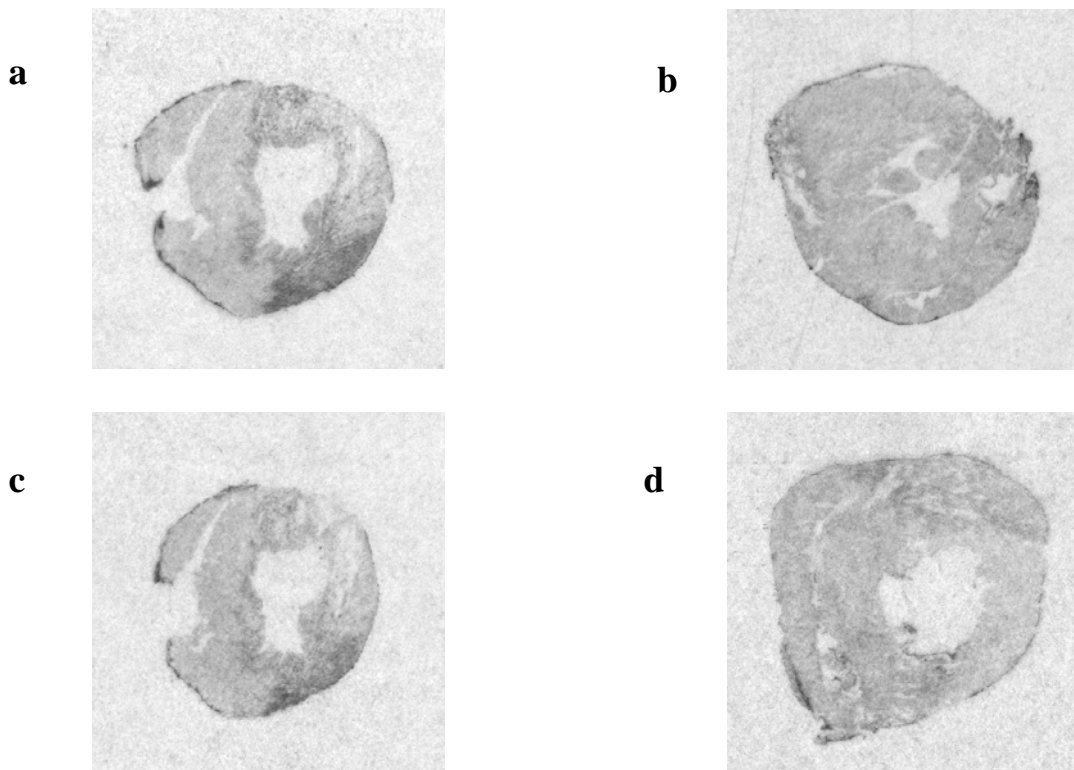
Tabelle 4.1 Übersicht über die absoluten Volumina (mm^3) von linkem Ventrikel (LV), „area at risk“ sowie den Relationen dieser Volumina in Prozent. Angegeben sind neben Mittelwert (MW) und Standardabweichung (SD) das 95% Konfidenzintervall für den Mittelwert sowie die minimalen und maximalen Werte der Versuchsgruppen.

Parameter	Gruppe	MW	SD	95%-Konfidenzintervall		Minimum	Maximum
				Untergrenze	Obergrenze		
LV (mm^3)	Positiv-Kontrolle	817,8	151,4	691,2	944,4	520,0	1015,0
	Therapie	785,3	40,3	751,6	818,9	725,0	855,8
	Prophylaxe	711,4	78,1	646,1	776,7	581,7	817,7
"area at risk" (mm^3)	Positiv-Kontrolle	237,6	37,1	206,6	268,6	168,0	284,0
	Therapie	236,1	81,1	168,2	304,0	146,7	410,0
	Prophylaxe	186,6	56,1	139,1	234,1	87,6	287,0
"area at risk"/ LV (%)	Positiv-Kontrolle	30,5	10,0	22,1	38,9	18,1	51,2
	Therapie	30,1	10,5	21,3	38,9	18,7	53,7
	Prophylaxe	26,1	7,6	19,8	32,5	15,1	40,6

4.3. Nick-Translation

Die Auswertung der „in-situ“-Nick-Translation erfolgte für alle vier Versuchsgruppen. Aufgrund von Beschädigungen der Gefrierschnitte von Tier 13 aus der Gruppe 1, die eine korrekte planimetrische Auswertung im Rahmen der Densitometrie unmöglich machten, wurde dieses Tier von der Auswertung ausgeschlossen. Die Ergebnisse der Negativ-Kontroll-Gruppe sind infolgedessen nur auf 7, anstatt wie in den anderen Gruppen auf jeweils 8, Tiere zurückzuführen. Der Grad der Schädigung ist im Folgenden als relativer Anteil der Schwärzungsintensität des internen Standards der Microscales, der demzufolge 100% entspricht, in Prozent dargestellt. Die Schwärzungsintensität korreliert hierbei mit der Rate an DNA-Einzelstrangbrüchen. Abbildung 4.2 zeigt exemplarisch für jede Gruppe jeweils einen basisparallelen Schnitt der Ebene 8.

Abbildung 4.2 Dargestellt ist exemplarisch jeweils ein basisparalleler Schnitt des Herzens (Ebene 8) eines Tieres der Positiv-Kontrolle (a), der Negativ-Kontrolle (b), der Therapie- (c) und der Prophylaxe-Gruppe (d).



Im Hinblick auf das Ziel einer Validierung der Nachweismethode der densitometrischen Auswertung der „in-situ“-Nick-Translation nach Autoradiographie war eine signifikante Diskriminisation zwischen der Positiv- und der Negativ-Kontrollgruppe möglich. Die 95%-Konfidenzintervalle des Mittelwertes beider Gruppen wiesen keine Überlappungen auf (Abb. 4.3). Dies galt sowohl für den linken Ventrikel insgesamt ($p=0,008$) als auch für das epikardiale 1/3 ($p<0,004$) sowie für das mittlere 1/3 ($p=0,011$) des linken Ventrikels (Abb.4.4 und 4.5). Im endokardialen Drittel (Abb.4.6) waren die Unterschiede zwar ebenfalls signifikant ($p=0,024$), doch kam es hier zu einer geringfügigen Überlappung der Konfidenzintervalle beider Gruppen. Obwohl die Schwärzungsintensität und damit der Grad an DNA-Einzelstrangbrüchen auch im rechten Ventrikel, also sicher außerhalb des eigentlichen Schädigungsareales, wesentlich höher in der Positiv-Kontrolle waren, konnte in diesem Fall keine Signifikanz erreicht werden (Abb. 4.7).

Deutliche Unterschiede traten auch bei der Betrachtung der beiden Behandlungsgruppen auf. Entsprachen die relativen Schädigungsgrade in der Therapie-Gruppe in allen Arealen des linken Ventrikels weitestgehend denen der Positiv-Kontrollgruppe, so waren diese in der Prophylaxe-Gruppe nicht nur im gesamten linken Ventrikel ($p<0,039$), sondern auch im epikardialen ($p<0,034$) und mittleren Drittel ($p<0,045$) signifikant geringer als in der Positiv-Kontrolle. Mit $p=0,057$ wurde die Signifikanz im endokardialen Drittel nur minimal verfehlt (Abb.4.3-4.6). Im rechten Ventrikel (Abb.4.7) zeigte sich ebenfalls eine Tendenz zu erheblich geringeren Schädigungsintensitäten in der Prophylaxe-Gruppe bezogen auf die Positiv-Kontrolle ($p=0,09$). Im rechten Ventrikel konnte auch bei den Tieren, denen HBOC-200 therapeutisch appliziert worden war, ein derart positiver Effekt festgestellt werden ($p=0,12$).

Abbildung 4.3 Darstellung der relativen Schwärzungsdichte in der Autoradiographie nach Nick-Translation als Nachweis der Intensität der DNA-ESB in der gesamten Wand des linken Ventrikels (p vs. Positiv-Kontrolle).

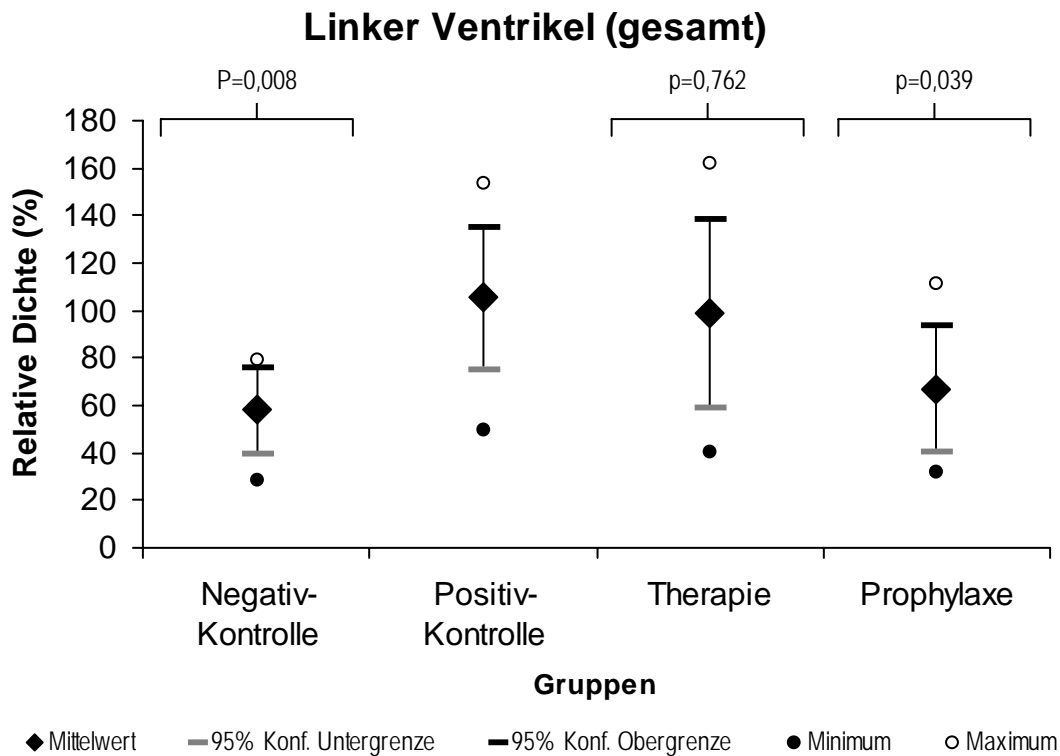


Abbildung 4.4 Darstellung der relativen Schwärzungsdichte in der Autoradiographie nach Nick-Translation als Nachweis der Intensität der DNA-ESB im epikardialen 1/3 der Wand des linken Ventrikels (p vs. Positiv-Kontrolle).

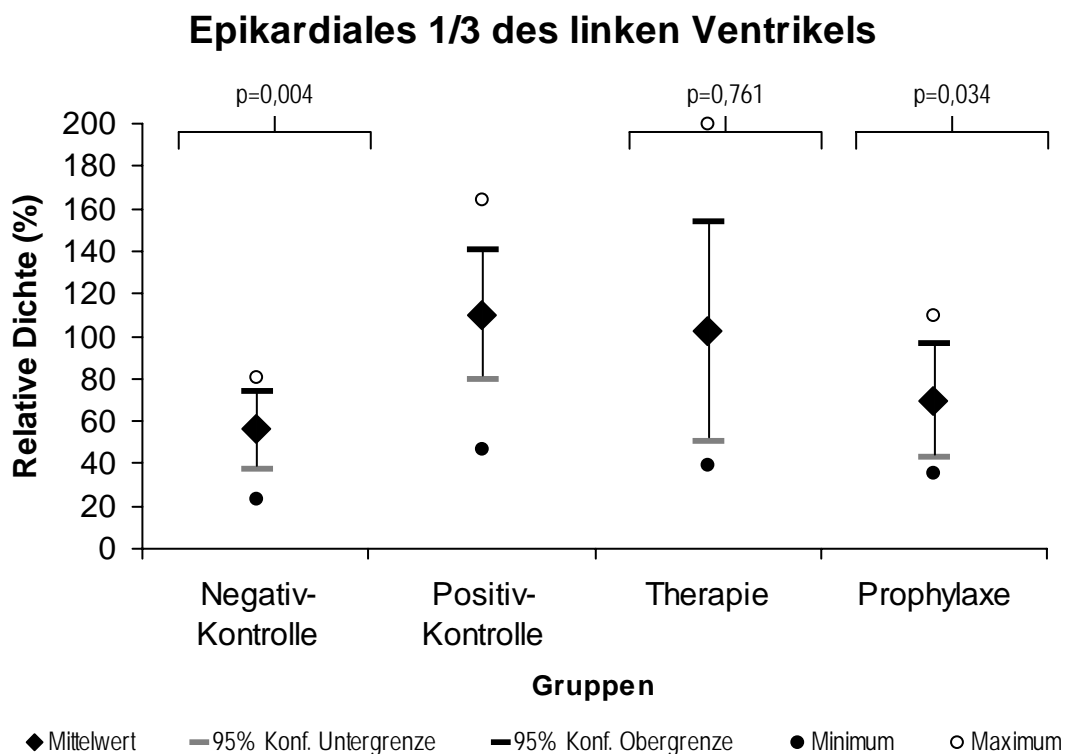


Abbildung 4.5 Darstellung der relativen Schwärzungsdichte in der Autoradiographie nach Nick-Translation als Nachweis der Intensität der DNA-ESB im mittleren 1/3 der Wand des linken Ventrikels (p vs. Positiv-Kontrolle).

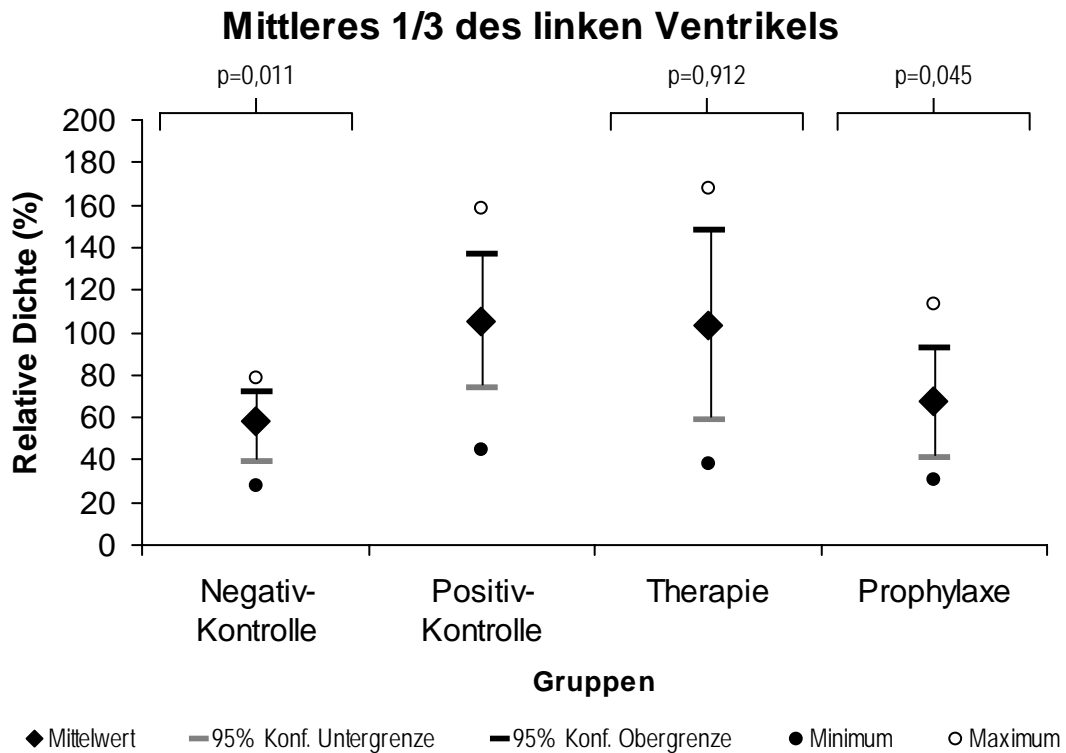


Abbildung 4.6 Darstellung der relativen Schwärzungsdichte in der Autoradiographie nach Nick-Translation als Nachweis der Intensität der DNA-ESB im endokardialen 1/3 der Wand des linken Ventrikels (p vs. Positiv-Kontrolle).

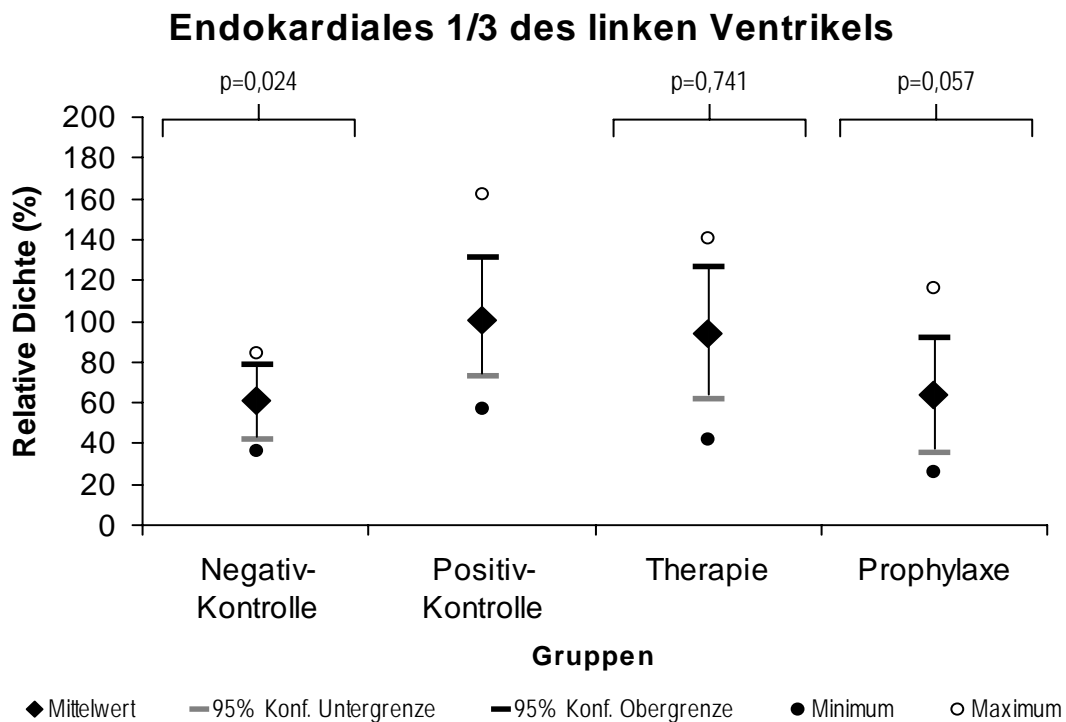
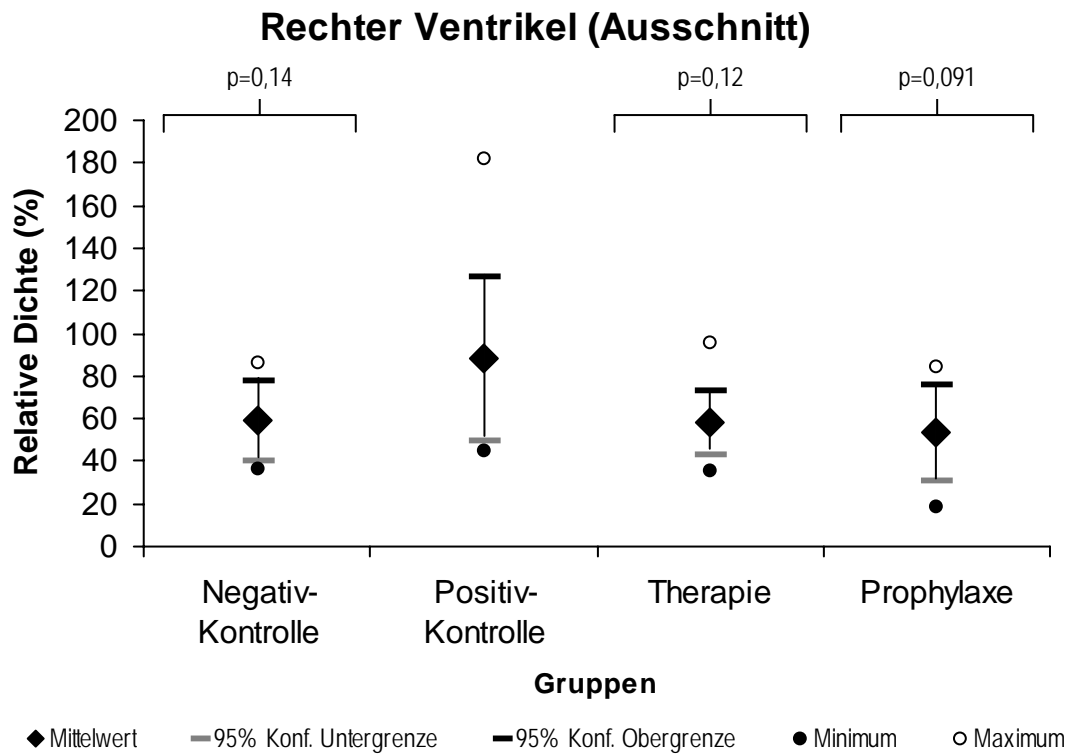


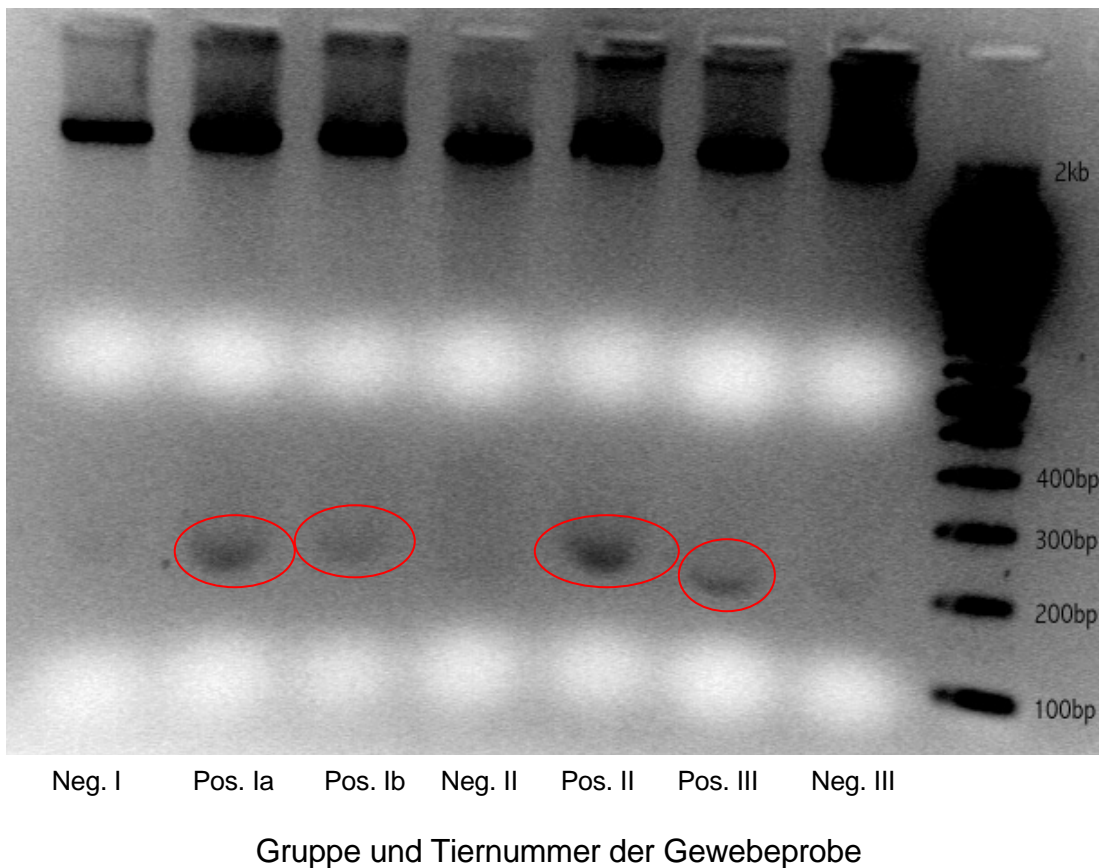
Abbildung 4.7 Darstellung der relativen Schwärzungsdichte in der Autoradiographie nach Nick-Translation als Nachweis der Intensität der DNA-ESB in einem repräsentativen Areal des rechten Ventrikels (p vs. Positiv-Kontrolle).



4.4. DNA-Laddering

In der Gelelektrophorese zeigte die serielle Darstellung der DNA-Fragmente für sämtliche Schnitte der 3 Positiv-Kontrolltiere innerhalb der „area at risk“ apoptosespezifische Banden bei 180-200 Basenpaaren innerhalb eines „Smears“ (Grauschleier) von Molekülen stochastischer Größe (Abbildung 4.8). In den Negativ-Kontrollen stellten sich demgegenüber keine Banden dar.

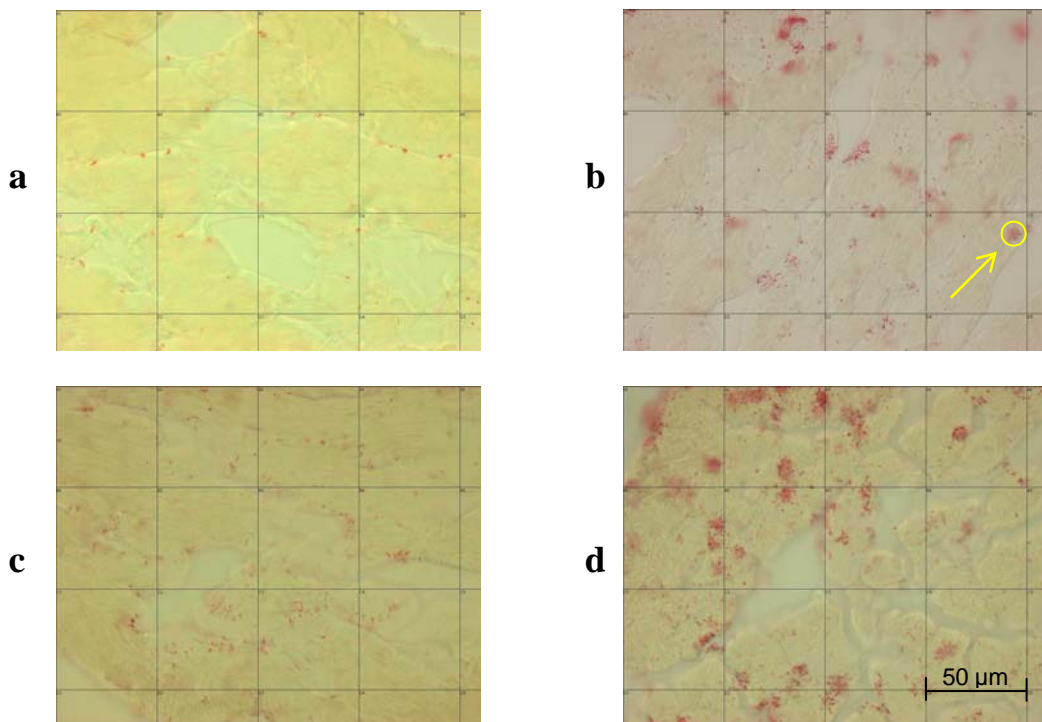
Abbildung 4.8 Fotographische Darstellung (unter UV-Licht) einer Gelelektrophorese von DNA-Proben aus der „area at risk“ des Myokards des linken Ventrikels der separaten Tiere der Positiv- und Negativ-Kontrolle aus Vorversuchen. An der rechten Seite sind an der Kontrolle zur Orientierung die Molekülgrößen in Basenpaaren (bp) vermerkt. Es zeigen sich apoptosespezifische Banden von 180-200 bp (rot eingekreist) bei den Positiv-Kontrolltieren.



4.5. TUNEL-Reaktion

In die Auswertung der TUNEL-Reaktion durch mikroskopische Auszählung der TUNEL-positiven Zellkerne wurden alle vier Versuchsgruppen eingeschlossen. Aufgrund der ausgedehnten Schäden an den Gefrierschnitten von Tier 13 (Negativ-Kontrollgruppe) konnte dieses Tier wie bei der Nick-Translation auch in diesem Fall nicht berücksichtigt werden, da eine verlässliche topographische Zuordnung und Auswertung nicht gewährleistet gewesen wären. Die Ergebnisse sind im Folgenden als TUNEL-positive Zellkerne pro mm² angegeben. Exemplarisch ist in Abbildung 4.9 jeweils ein Auszählungsfeld in Ebene 8 mit Messraster von jeder Gruppe dargestellt.

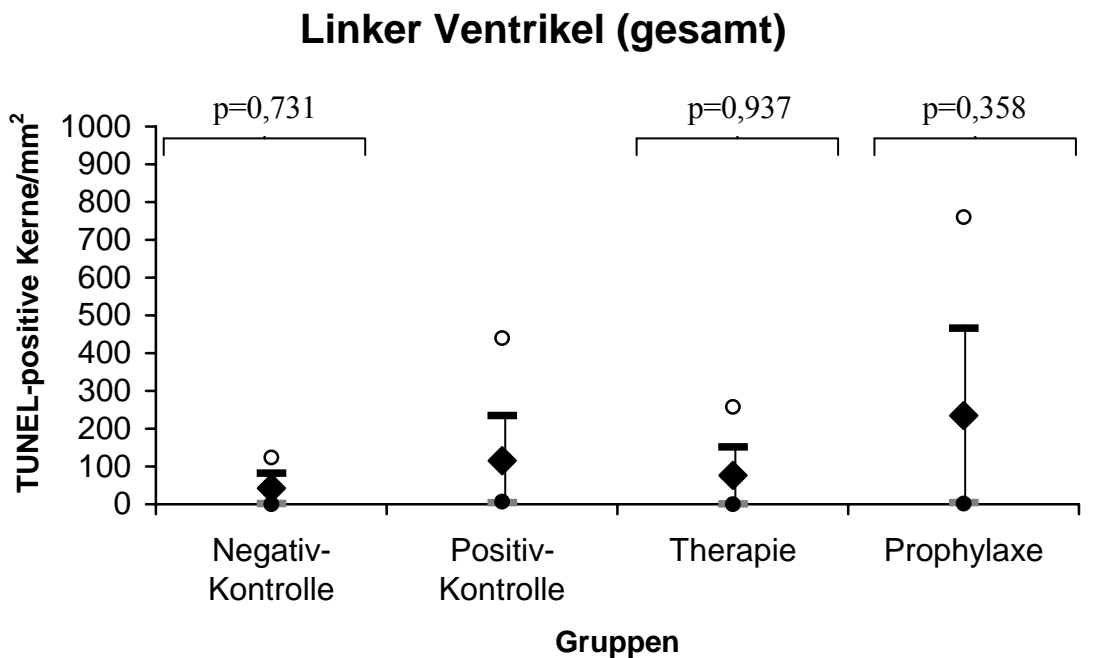
Abbildung 4.9 Dargestellt ist je ein Auszählungsfeld eines Tieres der Positiv-Kontrolle (a), der Negativ-Kontrolle (b), der Therapie- (c) und der Prophylaxe-Gruppe (d) mit Messraster bei 400facher Vergrößerung nach Färbung mit Alkalischer Phosphatase und Fast-Red-Tablets sowie Plasmafärbung mittels Light Green. TUNEL-positive Kerne stellen sich rot dar (exemplarisch in Abb. b gelb markiert).



Es konnte keine sichere Trennung zwischen der Positiv- und der Negativ-Kontrollgruppe für den linken Ventrikel aufgezeigt werden. Stattdessen fanden sich sowohl für den linken Ventrikel insgesamt, für jedes seiner Teilareale als auch für den rechten Ventrikel große Überlappungen der 95% Konfidenzintervalle des Mittelwertes zwischen den Gruppen bezüglich der DNA-Doppelstrangbrüche (Abb.4.10-4.14). Die Tiere innerhalb einer Gruppe wiesen eine große Streubreite der TUNEL-positiven Zellkerne pro mm^2 auf. Die drei Schnitte eines Tieres lieferten dagegen relativ homogene Ergebnisse. Trotz der fehlenden Diskriminisation fand sich eine tendenziell höhere Dichte an DNA-Doppelstrangbrüchen in der Positiv-Kontrollgruppe.

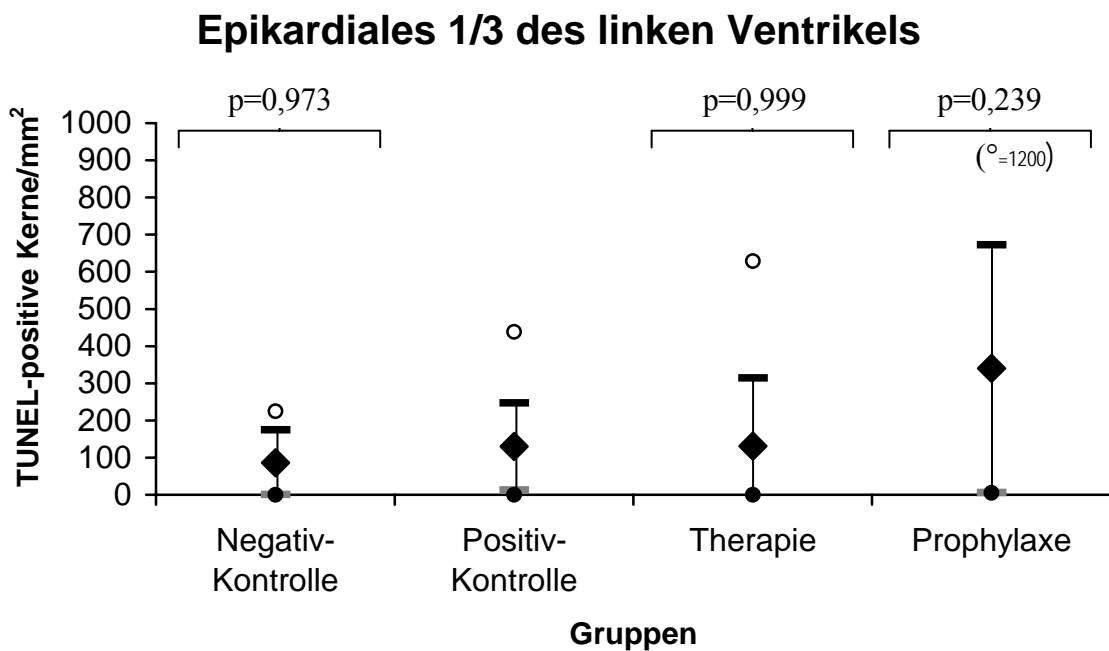
Auch für die beiden Behandlungsgruppen konnte aufgrund der Anzahl an TUNEL-positiven Zellkernen pro mm^2 im linken Ventrikel keine Signifikanz der festgestellten Unterschiede erreicht werden. Die Tiere der Prophylaxe-Gruppe wiesen in diesem Fall allerdings deutlich höhere Werte auf als die der Therapie-Gruppe (Abb.4.10-4.13). Bei der genauen Betrachtung der Ergebnisse fällt auf, dass in den endokardialen und epikardialen Arealen in allen Gruppen eine größere Anzahl von TUNEL-positiven Zellkernen pro mm^2 ermittelt wurde als im mittleren Drittel. Diese Beobachtung konnte auch bei den hier nicht dargestellten Kontrollen nach Schädigung aller Zellkerne mit DNase I gemacht werden (siehe 3.8.1), so dass davon ausgegangen werden muss, dass die Dichte an Zellkernen im Präparat in diesen Arealen allgemein höher war als in der mittleren Region. Für die Kontrollen mit DNase I ergaben sich zum Vergleich Werte von 800 ± 300 TUNEL-positive Zellkerne pro mm^2 für den linken Ventrikel. Repräsentative Areale des rechten Ventrikels zeigten in allen Gruppen TUNEL-positive Zellkerne (Abb.4.14). Auch in diesem Fall wiesen die Tiere der Prophylaxe-Gruppe die höchsten Werte auf. Es ließen sich jedoch keine Signifikanzen feststellen.

Abbildung 4.10 Darstellung der relativen Häufigkeit von TUNEL-positiven Zellkernen (n/mm^2) im Myokard des linken Ventrikels innerhalb der „area at risk“ (p vs. Positiv-Kontrolle).



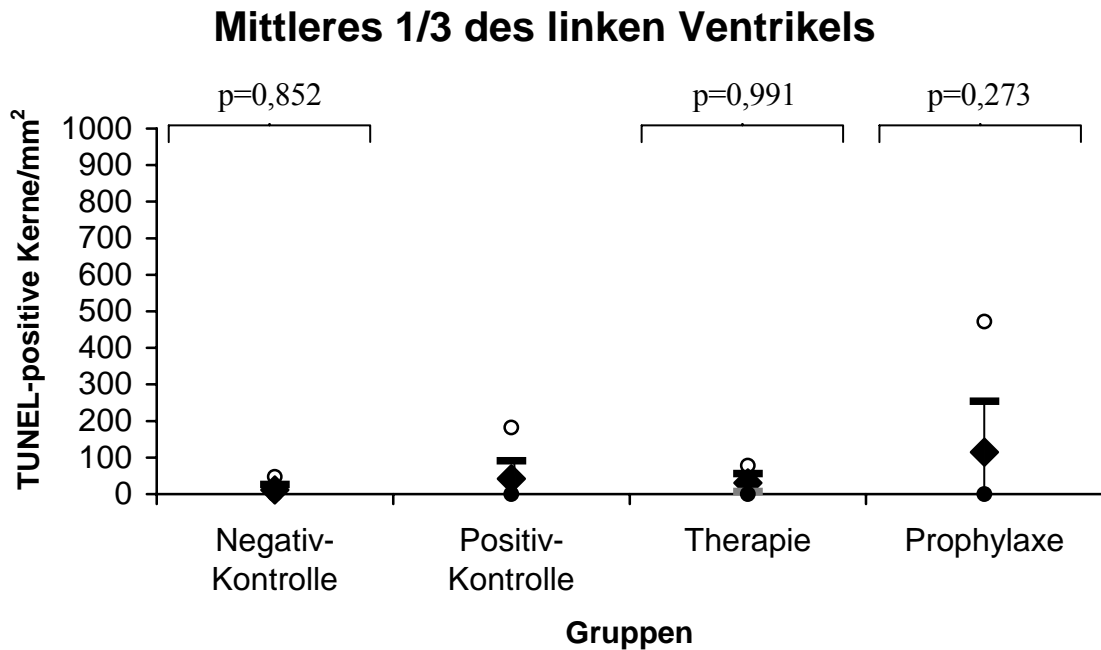
◆ Mittelwert — 95% Konf. Untergrenze — 95% Konf. Obergrenze ● Minimum ○ Maximum

Abbildung 4.11 Darstellung der relativen Häufigkeit von TUNEL-positiven Zellkernen (n/mm^2) im epikardialen 1/3 des Myokards des linken Ventrikels innerhalb der „area at risk“ (p vs. Positiv-Kontrolle).



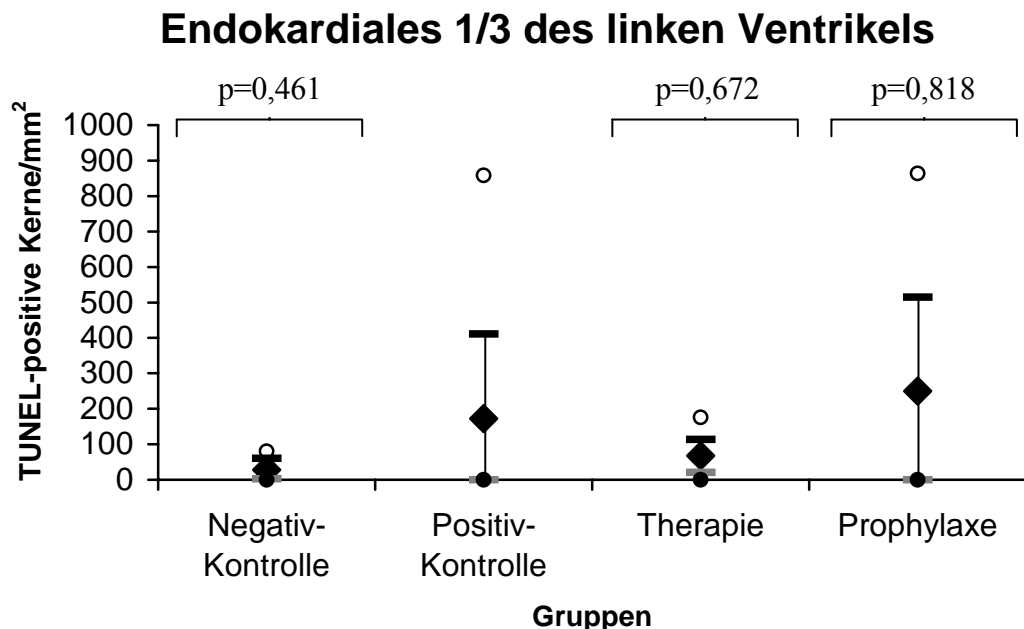
◆ Mittelwert — 95% Konf. Untergrenze — 95% Konf. Obergrenze ● Minimum ○ Maximum

Abbildung 4.12 Darstellung der relativen Häufigkeit von TUNEL-positiven Zellkernen (n/mm^2) im mittleren 1/3 des Myokards des linken Ventrikels innerhalb der „area at risk“ (p vs. Positiv-Kontrolle).



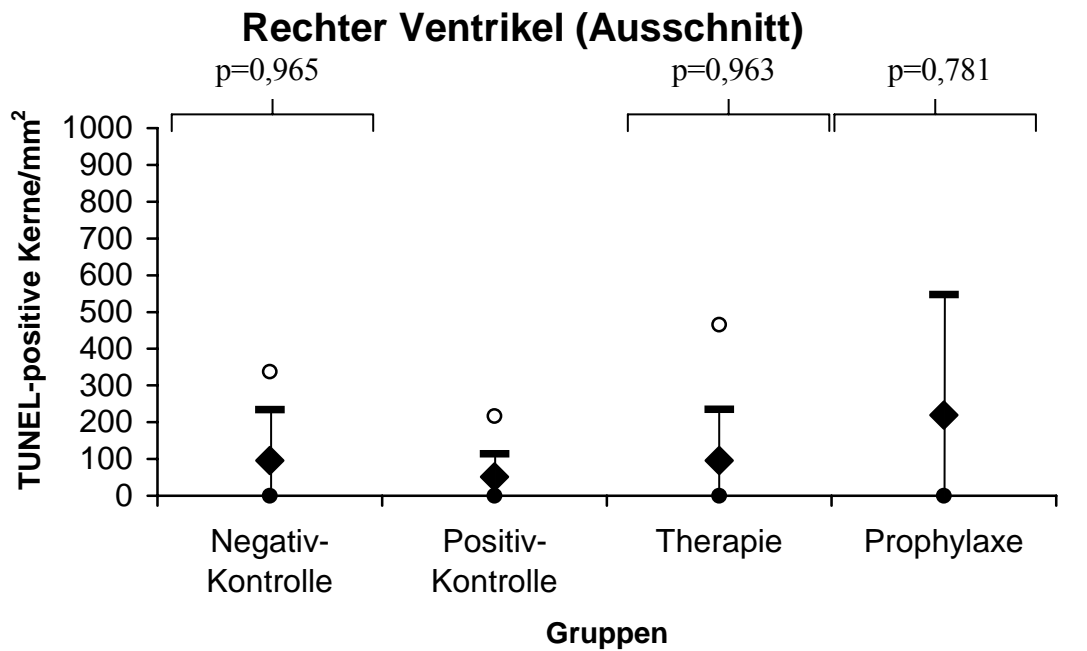
◆ Mittelwert — 95% Konf. Untergrenze — 95% Konf. Obergrenze ● Minimum ○ Maximum

Abbildung 4.13 Darstellung der relativen Häufigkeit von TUNEL-positiven Zellkernen (n/mm^2) im endokardialen 1/3 des Myokards des linken Ventrikels innerhalb der „area at risk“ (p vs. Positiv-Kontrolle).



◆ Mittelwert — 95% Konf. Untergrenze — 95% Konf. Obergrenze ● Minimum ○ Maximum

Abbildung 4.14 Darstellung der relativen Häufigkeit von TUNEL-positiven Zellkernen (n/mm^2) in einem repräsentativen Ausschnitt im Myokard des rechten Ventrikels (p vs. Positiv-Kontrolle).



◆ Mittelwert — 95% Konf. Untergrenze — 95% Konf. Obergrenze ● Minimum ○ Maximum

5. Diskussion

5.1. Validierung der „in-situ“-Nick-Translation

Die „in-situ“-Nick-Translation stellt die Standardmethode zum Nachweis von DNA-ESB in unterschiedlichen Geweben dar [18;66;115]. Standl et al. verwendeten sie erstmals als quantifizierende Technik durch densitometrische Auswertung nach Autoradiographie für größere Auswertungsareale im Koronarstenosemodell am Hundeherzen [162]. Hierbei war die Rate an DNA-Einzelstrangbrüchen im Versorgungsgebiet der LAD in der Gruppe, die eine prophylaktische Applikation von HBOC-200 erhalten hatte, am geringsten. Im vorliegenden Versuch konnte mittels dieser Technik eine signifikante Trennung der Negativ- von der Positiv-Kontrollgruppe erfolgen. Die 95% Konfidenzintervalle beider Gruppen wiesen keine Überlappungen auf. Damit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass die „in-situ“-Nick-Translation am Gefrierschnitt des Rattenherzens nach Ischämie und Reperfusion eine verlässliche Technik zum Nachweis von DNA-Einzelstrangbrüchen darstellt. Außerdem bietet dieses Verfahren eine Reihe von Vorteilen. Die Visualisierung der Schäden mittels Autoradiographie ermöglicht eine topographische Zuordnung innerhalb des Herzens. Des Weiteren erlaubt die „in-situ“-Nick-Translation im Gegensatz z.B. zum Infarktnachweis mittels TTC [34], der nur eine „entweder-oder-Entscheidung“ zulässt, eine wesentlich differenziertere Betrachtung der Schäden z.B. bezüglich der Gewichtung (stark – schwach), der transmuralen Verteilung innerhalb des linken Ventrikels oder zwischen den einzelnen Gruppen. Außerdem werden auch Schäden sicht- und quantifizierbar, die sicher außerhalb der „area at risk“ liegen und damit nicht primär durch die Ligatur und die damit verbundene Ischämie, sondern vermutlich sekundär durch Metabolite oder hämodynamische Belastungen entstanden sind. Hierdurch können die Auswirkungen von HBOC-200 auch in diesen Arealen, in die es sowohl vor als auch nach der Ligatur ungehindert gelangen konnte, differenziert betrachtet werden. Eine Weiterentwicklung dieses Verfahrens könnte darin bestehen, die Abgrenzungen der „area at risk“ mit Hilfe von Bildbearbeitungsprogrammen in den densitometrisch auszuwertenden Schnitten sichtbar zu machen, um die Verteilung der Schadensrate innerhalb der „area at risk“ beurteilen zu können.

5.2. Effekte von HBOC-200 auf DNA-Einzelstrangbrüche

In der vorliegenden Arbeit konnte im Kleintiermodell der Ratte erstmalig nachgewiesen werden, dass die prophylaktische Applikation von $0,4 \text{ g kg}^{-1}$ HBOC-200 vor Anlage einer Ligatur der linken Koronararterie mit nachfolgender 25 minütiger Ischämie und 120 minütiger Reperfusion die DNA-Einzelstrangbruchrate im gesamten linken Ventrikel im autoradiographischen Nachweis nach „in-situ“-Nick-Translation im Vergleich zur unbehandelten Kontrollgruppe signifikant verringert. Diese Wirkung bestätigt sich bei der isolierten Betrachtung der Teilareale sowohl für das epikardiale als auch für das myokardiale Drittel mit eindeutigen Ergebnissen. Im Hinblick auf das endokardiale Areal wurde das Signifikanzniveau nur geringfügig verfehlt.

Einer der zugrundeliegenden Wirkmechanismen könnte in der verbesserten Gewebeoxygenierung durch HBOC bestehen. Diese Effekte zellfreier Hämoglobinlösungen konnten bereits in zahlreichen Versuchen am Hund aufgezeigt und bestätigt werden [61;62;63;159;160;164]. Nach 95%iger Stenosierung der A. poplitea waren die Gewebe- O_2 -Partialdrücke ($t\text{PO}_2$) unter isovolämischer Anämie ($\text{Hb } 7,5 \text{ g dl}^{-1}$) im poststenotischen Skelettmuskel sowohl nach prophylaktischer als auch nach therapeutischer Applikation wesentlich höher als in der Kontrollgruppe, die Hydroxyethylstärke (HES) erhalten hatte [61]. Auch nach nahezu vollständigem Blutaustausch mit HBOC-201 (Hkt=2%) waren die $t\text{PO}_2$ -Werte in dieser Gruppe höher als in der Gruppe, die HES erhalten hatte, und sogar signifikant höher als bei der Ausgangsmessung [61]. Dabei konnte für HBOC-201 eine Oxygenierungspotenz von 3:1 im Vergleich zu Warmblut und drei Wochen alten autologen Erythrozytenkonzentraten (EK) errechnet werden [160]. Besonders extrem niedrige $t\text{PO}_2$ -Werte wurden durch die Gabe von HBOC-200 schneller und effektiver beseitigt als durch Erythrozytenkonzentrate [159]. Weitere positive Wirkungen von HBOC-201 konnten für die prophylaktische Applikation bei Anlage einer 90%igen Stenose des Ramus interventricularis anterior (LAD) der linken Koronararterie in Kombination mit einer akuten isovolämen Anämie von $\text{Hb}=7\pm 0,5 \text{ g dl}^{-1}$ an Hunden gezeigt werden [6;14;161]: Sowohl die Kontraktilität als auch die myokardiale Sauerstoffspannung konnten im poststenotischen Areal aufrechterhalten werden. Zusätzlich waren die histologischen Gewebeschäden deutlich vermindert. Durch die therapeutische Applikation von HBOC-201 wurden die Werte der myokardialen $t\text{PO}_2$ und der

Kontraktilität des linken Ventrikels im poststenotischen Areal bis fast auf die Ausgangswerte angehoben.

Auch am Pankreas konnte in interdisziplinären Studien im Rattenmodell die Effektivität von HBOC-200 bestätigt werden. Die frühe und protrahierte Verabreichung von HBOC-200 nach medikamenteninduzierter Pankreatitis bewirkte eine signifikante Reduktion von Nekrosen sowie eine Verbesserung der histologisch verifizierten Organintegrität und Funktion [167;168]. In einer Studie an Schweinen mit medikamentös induzierter Pankreatitis wurde zum ersten Mal nachgewiesen, dass die therapeutische Applikation mit HBOC-200 in Kombination mit einer isovolämischen Hämodilution die Gewebe-O₂-Partialdrücke auf Ausgangsniveau anheben konnte. Im Gegensatz hierzu war dies mit alleiniger Hämodilution mit HES oder Ringer-Lösung nicht möglich [41].

Die verbesserte Gewebeoxygenierung kann die vorliegenden Ergebnisse jedoch nur zum Teil erklären, da es sich in dieser Studie nicht wie in vielen soeben aufgeführten [6;14;60;61] um ein stenosiertes Gefäß handelte, durch das HBOC noch in das zu untersuchende Areal gelangen konnte, sondern um einen kompletten Verschluss. Die Möglichkeit einer Versorgung über Kollateralen wurde durch die Wahl des Versuchstieres minimiert. Eine eventuell erhöhte Sauerstoffextraktion aus dem Ventrikellumen würde sich allenfalls auf das subendokardiale Myokard auswirken, das im Rahmen von Gefäßverschlüssen das größte Risiko einer Hypoxie aufweist [64]. Eine Verbesserung der subendokardialen Perfusion und des Sauerstoffangebotes mit konsekutiv reduzierter Mortalität konnten Habler et al. bei hämorrhagischem Schock und Koronarstenose im Modell am Schwein nach Gabe von DCLHb im Vergleich zu Humanalbumin erzielen [51]. Gerade in diesem Areal zeigte sich in dieser Studie jedoch „nur“ eine starke Tendenz zu einer geringeren Schadensrate im Sinne von DNA-ESB, während die Ergebnisse für das myo- und epikardiale Drittel eine signifikante Reduktion aufzeigten.

Allerdings könnte durch die prophylaktische Applikation 20 Minuten vor Anlage der Ligatur eine homogenere Verteilung eines erhöhten mikrovaskulären Sauerstoffangebots erreicht worden sein. Die hierdurch verbesserte Oxygenierung führte möglicherweise zu einer größeren Toleranz gegenüber der Ischämie, so dass eine Hypoxie des Myokards nur in geringerem Ausmaß oder erst zu einem

späteren Zeitpunkt auftrat. Desweiteren ist nach Wiedereröffnung des Gefäßes durch das Vorhandensein von HBOC im Kreislauf sofort eine verbesserte Sauerstoffversorgung gerade im azidotischen Gewebe aufgrund des ausgeprägten Bohr-Effektes möglich. Andererseits könnte das erhöhte Sauerstoffangebot aber theoretisch die Entstehung von Sauerstoffradikalen begünstigen. Diese stellen eine wesentliche Komponente der DNA-Schädigung dar [104]. Andererseits könnte das HBOC-Molekül als Protein selbst als Radikalfänger fungieren. Da weder in der Prophylaxe- noch in der Therapie-Gruppe ausgeprägtere Schäden als in der Positiv-Kontrollgruppe auftraten, kann ein durch Radikalenbildung hervorgerufener negativer Effekt in dieser Studie zumindest indirekt ausgeschlossen werden. Es erfolgte jedoch keine Bestimmung von Radikalen, so dass diese Nebenwirkungen, die in ihren Auswirkungen durch die positiven Eigenschaften von HBOC-200 offensichtlich mehr als kompensiert werden, nicht ganz ausgeschlossen werden können.

Im Hinblick auf die therapeutische Applikation von HBOC-200 konnten weder für den gesamten linken Ventrikel noch für einen seiner Teilbereiche signifikante Wirkungen festgestellt werden. In Anbetracht der Verwendung von HBOC als Volumenersatzmittel ist es wichtig zu erwähnen, dass auch keine Erhöhung der DNA-Schadensrate im Vergleich zur Positiv-Kontrolle auftrat. Diese Tendenz zeigte sich in abgeschwächter Form auch im Koronarstenosemodell an Hunden bei einer vergleichbaren Dosierung von HBOC-201. Hierbei kam es in der Prophylaxe-Gruppe jeweils zu stärkeren Effekten im Hinblick auf die Erhöhung der myokardialen Gewebesauerstoffspannung [161], die Verringerung der linksventrikulären Wandbewegungsstörungen [6] sowie die Verminderung histopathologischer Schäden [14;162] als in der Therapie-Gruppe.

Der ausbleibende Effekt der therapeutischen im Gegensatz zur prophylaktischen Applikation von HBOC-200 könnte darauf schließen lassen, dass zum Zeitpunkt der Reperfusion ein Teil des Kapillarnetzes bereits nicht mehr perfundierbar war, weshalb die Hämoglobinlösung nicht mehr in die ischämisch geschädigten Bereiche gelangen und dort ihre Wirkungen somit nicht entfalten konnte. Derartige Areale, die trotz vollständiger Wiederherstellung des epikardialen Blutflusses nach temporärer Ischämie nicht mehr perfundierbar sind, werden als „no-reflow“-Areale bezeichnet. Dieses Phänomen beruht auf mikrovaskulären Schäden [127], die

aufgrund von Endothelzellschäden, Endothelzellprotrusionen, vaskulären Dysfunktionen, perivaskulären Schwellungen sowie kapillären Verlegungen durch Mikroembolien oder Blutbestandteile entstehen [129]. Beeinträchtigend auf die Perfusionsverhältnisse wirken sich außerdem Leukozytenakkumulation und Kapillarbettverlegungen durch Leukozyten aus. Auch die Leukozyten-Interaktionen mit dem Gefäßendothel („rolling and sticking“) stellt einen wesentlichen Pathomechanismus für anhaltende Perfusionsausfälle dar. Kennzeichnend für das „no-reflow“ Phänomen sind ein reduzierter myokardialer Blutfluss, ultrastrukturelle Gefäßalterationen und große Areale mit eingeschränkter Perfusion [78;79]. Des Weiteren steigt das Ausmaß der Perfusionsstörung mit der Dauer der Ischämiephase an [79]. In der folgenden Reperfusionphase scheint eine zusätzliche Progredienz zu erfolgen [2]. Über den entscheidenden Zeitpunkt der Determination der Schadensgröße wird zur Zeit noch diskutiert. Einige Untersucher vertreten den Standpunkt, dass das Ausmaß von mikrovaskulären Obstruktionen ausschließlich während der Ischämiephase definiert wird [33;78]. Die Hypothese anderer Autoren fordert dagegen, dass die Aktivierung der die Schäden induzierenden Pathomechanismen mit dem Einsetzen der Reperfusion erfolgt [4;31]. Die Ergebnisse dieser Studie lassen den Schwerpunkt in der Ischämiephase vermuten, da die Applikation von HBOC-200 nach Ablauf der Ischämiephase (Therapie-Gruppe) wirkungslos blieb.

Auf diese oben genannten pathophysiologischen Prozesse an den Endothelzellen sowie die Interaktion mit den Leukozyten scheinen HBOC hemmend oder abschwächend einzuwirken, sofern sie bereits vor deren Auftreten gegeben werden. Die Wirkung auf die mikrovaskuläre Integrität zeigten Nolte et al. in Modellen am Hamster anhand von DCLHb (Diaspirin cross-linked hemoglobin) mittels Intravital-Fluoreszenz-Mikroskopie im quergestreiften Hautmuskel nach Hämodilution auf einen Hkt von 30% [113]. Nach Applikation von DCLHb kam es zu einer kurzen (0-2 min) arteriolären Konstriktion (ca. 20% Reduktion zum Ausgangsdurchmesser), während die venuläre Blutflussgeschwindigkeit anstieg. Die mikrovaskuläre Leukozyten-Endothel-Interaktion oder endotheliale Permeabilität erhöhte sich dagegen nicht. Im Anschluss daran konnte im Rahmen der Wiederbelebung nach hämorrhagischem Schock und damit verbundener Ischämie und Reperfusion im Gegensatz zu den Effekten nach Gabe von Eigenblut oder Dextran keine Zunahme der Leukozyten-Endothel-Interaktion

nachgewiesen werden. Gleichzeitig gelang es mit DCLHb, die systemische Hämodynamik wiederherzustellen und eine Zunahme des venulären Blutflusses zu erreichen.

Die Auswirkungen von DCLHb im Vergleich zu Dextran oder Kochsalzlösung nach einer druckinduzierten Ischämie und nachfolgender Reperfusion wurden in einem vergleichbaren Modell untersucht [123]. Fünfzehn Minuten vor Reperfusion erhielten die Tiere 5 ml kg⁻¹ 10% DCLHb, 6% Dextran 60 oder 0,9% NaCl. Sowohl nach Gabe von DCLHb als auch von Dextran konnte eine signifikante Abnahme von „rolling and sticking“ der Leukozyten in den postkapillären Venulen im Vergleich zu Kochsalz behandelten Tieren nachgewiesen werden. Parallel dazu erfolgte eine Wiederherstellung der funktionellen Kapillardichte und der Blutflussgeschwindigkeit. Der Gewebssauerstoffpartialdruck normalisierte sich in der frühen Phase der Reperfusion (30 min) in diesen Gruppen vollständig, wohingegen in der NaCl-Gruppe ein Abfall zu verzeichnen war. Des Weiteren konnte in der DCLHb-Gruppe eine deutliche Reduktion von Gewebeschäden in der Analyse mittels Elektronenmikroskopie nach 24 Stunden Reperfusion aufgezeigt werden. Eine Wirkung von HBOC auf Leukozyten wird auch von Saetzler et al. beschrieben. Nach Gabe eines polynitroxylierten HBOC vor durch Zigarettenrauch induzierter Stimulation stellten sie eine signifikante Reduktion des Auftretens von Leukozyten-“Rolling“ und -Adhäsion an Endothelzellen sowie von Leukozyten- und Thrombozyten-Aggregaten fest [140].

Die Ergebnisse der beschriebenen Studien lassen einen Wirkungsmechanismus von Hämoglobinlösungen wahrscheinlich erscheinen, der in einer Hemmung der Interaktion von Leukozyten und Endothel besteht und dadurch im Rahmen von Ischämie und Reperfusion eine verbesserte Mikroperfusion gewährleistet.

Als Ursache für eine Reduktion von DNA-Eizelstrangbrüchen kommt auch eine verminderte Aktivierung von Komplement in Frage. Diese wiederum kann auf der oben dargestellten verminderten Leukozyten-Endothel-Interaktion beruhen. Die Relevanz des Komplementsystems in diesem Zusammenhang belegt eine Untersuchung von Ito et al., bei der C6-insuffiziente Tiere im Rahmen von kardialer Ischämie und Reperfusion signifikant weniger arrhythmische Ereignisse entwickelten als C6-kompetente Tiere [68]. In einer anderen Studie wurde durch die

Gabe von Tetrandrine, einem Bisbenzyltetrahydroisodiquinolin, die Adhäsion von neutrophilen Granulozyten am Endothel gehemmt, wodurch eine Reduktion des Infarktareals erzielt werden konnte. Auch eine Verringerung ventrikulärer Arrhythmien wurde beobachtet [151].

Betrachtet man die Schädigung des rechten Ventrikels in der Positiv-Kontrollgruppe, so zeigt sich auch in diesem sicher außerhalb der „area at risk“ gelegenen Areal eine Zunahme der Rate an DNA-Einzelstrangbrüchen im Vergleich zur Negativ-Kontrolle. Ursächlich hierfür sind wahrscheinlich sekundäre Schäden aufgrund der erhöhten hämodynamischen Belastung nach dem Infarktereignis. Auch in diesem Areal bewirkte die prophylaktische Applikation von HBOC-200 eine deutliche Verringerung der Schadensrate auf Werte der Negativ-Kontrolle. Im Gegensatz zum linken Ventrikel hatte die Therapie ähnlich positive Auswirkungen. Dieses Ergebnis erklärt sich wahrscheinlich dadurch, dass im Hinblick auf die hämodynamische Belastung des rechten Ventrikels die therapeutische Gabe zu einem sehr frühen, eventuell sogar prophylaktischen Zeitpunkt erfolgte, noch vor vollständiger Ausbildung der Schäden. Außerdem kann HBOC ungehindert zum Myokard des rechten Ventrikels gelangen, ohne dass Behinderungen des Blutflusses aufgrund von ischämischen Endothelschäden zu erwarten sind.

Von Bedeutung sind eventuell auch Wirkungsmechanismen, die für Perfluorocarbone (PFC), einen anderen zellfreien Sauerstoffträger, in zahlreichen Studien nachgewiesen worden sind. PFC wurden ebenfalls primär als Blutersatz entwickelt und in Studien am Menschen eingesetzt [93;116;153;154;155;172]. In verschiedenen Tiermodellen konnte zusätzlich eine Reduktion von Ischämie- und Reperfusionsschäden am Herzmuskel gezeigt werden [5;37;38;39;40;81]. Aufgrund der sehr positiven Ergebnisse in klinischen Studien [3;21;22;69;176] wurde in den USA 1989 eine Zulassung für PFC für die intrakoronare Applikation bei der percutanen transluminalen coronaren Angioplastie (PTCA) erteilt.

Kolodgie et al. konnten im Hundemodell nach 90 min Ischämie und 210 min Reperfusion nachweisen, dass die intrakoronararterielle Gabe von oxygenierten PFC das Auftreten von „no reflow“-Arealen vermindert. Für desoxygeniertes PFC zeigte sich diesbezüglich kein signifikanter Effekt. Dennoch war auch hier die Anzahl von Kapillaren, die durch neutrophile Granulozyten obliteriert waren, im

Vergleich zur Kontrollgruppe reduziert [82]. Dabei beruhte die Wirkung von PFC vermutlich hauptsächlich auf einer Reduktion der cytotoxischen Wirkungen von neutrophilen Granulozyten an geschädigtem kardialen Endothel und Myokardzellen [38;39], was auf einer direkten phagozytotischen Stimulation und Aktivierung des Komplementsystems durch PFC zu beruhen scheint [37].

Die Beeinflussung der Leukozyten-Endothel-Interaktion durch PFC wird nicht nur am ischämischen Myokard, sondern auch in experimentellen Untersuchungen an Lunge und Muskel deutlich [173;185]. Eine verminderte Aktivierung von neutrophilen Granulozyten und konsekutive Reduktion von Superoxiden im Rahmen der Reperfusion konnte in zwei Studien beobachtet werden, in denen oxygeniertes PFC transluminal in den ischämischen Darm verabreicht wurde. Die Schäden an Darm und Lunge waren daraufhin vermindert [117;138].

Eine Grundvoraussetzung für positive Effekte durch PFC stellt eine gleichzeitige Hyperoxie dar [81], wodurch sie sich in einem wesentlichen Punkt vom HBOC-200, das auch bei Atmung von Raumluft Wirkungen zeigt, unterscheiden. Dieser höhere Sauerstoffgehalt (100% PFC vs. 30% HBOC) könnte die Gefahr der Entstehung von O₂-Radikalen zusätzlich erhöhen. Außerdem handelt es sich bei den angeführten Studien ausschließlich um therapeutische Applikationen. Gerade dieser therapeutische Einsatz von HBOC-200 zeigte in diesem Experiment bezogen auf den linken Ventrikel keine signifikante Wirkung im Nachweis mittels Nick-Translation.

5.3. Qualitativer Nachweis von Apoptose

Aus den unter Abschnitt 3.7 genannten Gründen wurde Apoptose zunächst in Vorversuchen qualitativ mittels DNA-Laddering spezifisch für dieses Modell nachgewiesen. Die Darstellung von Banden in dem für Apoptose charakteristischen Bereich von 180-200 Basenpaaren im unbehandelten Kontrolltier, erlaubte einen positiven Rückschluss, trotz der von uns gewählten relativ kurzen Ischämiezeit von 25 min bei 120 min Reperfusion. Aufgrund der zahlreichen Varianten der beschriebenen Untersuchungen zu Apoptose sowohl im Hinblick auf Ischämie- und Reperfusionszeiten als auch Modell-Design und Auswertungsverfahren [29] stellt sich eine Diskussion anhand der Literatur schwierig dar. Die Aussagen divergieren im Extremfall zwischen einem positiven

qualitativen Nachweis von Apoptose in allen Fällen (n=7) nach 30 min Ischämie und 4 h Reperfusion in einer Studie an Kaninchen [47] und einem gänzlich fehlenden Nachweis von Apoptose in Studien von Ohno und Takemura, die ebenfalls an Kaninchen durchgeführt wurden [118;170]. Letztere beinhalteten im Versuchsprotokoll Ischämiezeiten von 30 min und eine Reperfusion von 2-24 h. Darüberhinaus gibt es Untersuchungen an der Maus mit einer Ischämie von 3-24 h [87]. Dem hier angewandten Modell noch am nächsten kommen Okamura et al. im Rahmen ihrer Experimente an Ratten mit einer Ischämiezeit von 30 min und einer Reperfusion von 6 h im Gegensatz zu 2 h in dieser Studie [119]. Andere Studien an Ratten nutzten Ischämiezeiten von bis zu 2 Tagen [72;73]. Hierdurch wird deutlich, dass das Zeitfenster, in dem Apoptose auftritt, noch nicht endgültig geklärt ist. Relativ sicher steht dagegen heute fest, dass Apoptose in der Ischämie induziert und während der Reperfusion ausgeführt wird [8;36;42], weshalb ohne Reperfusion kaum Apoptose zu erwarten ist.

Bisherige Studien zeigen, dass der Zelltod im Rahmen von myokardialen [7] und cerebralen [95;96] Ischämien sowohl in Form von Apoptose als auch Nekrose auftritt, wobei der Nekroseanteil überwiegt [17]. Bei der differenzierten Betrachtung der Verteilung dieser beiden Arten des Zelltodes innerhalb des Infarktareales fällt eine Akkumulation von apoptotischen Zellen im Randbereich, der Penumbra, auf. Hierbei handelt es sich um Gewebe, das zwar in seiner Funktion eingeschränkt ist, aber noch einen zum Überleben vorläufig noch ausreichenden Restmetabolismus aufweist. Zentral dagegen ist überwiegend Nekrose nachweisbar [7;17;95;96]. Eine strikte Trennung von Apoptose und Nekrose kann jedoch nicht erfolgen, da es sich um einen dynamischen und progressiven Prozeß handelt [17]. Als Auslöser für Apoptose können dabei sowohl DNA-Einzel- als auch Doppelstrangbrüche wirken [18;71].

5.4. Effekte von HBOC-200 auf DNA-Doppelstrangbrüche

Die quantitative Auswertung der DNA-Doppelstrangbrüche mittels TUNEL-Reaktion zeigte keine signifikanten Ergebnisse, da die Streubreite der TUNEL-positiven Kerne/mm² innerhalb der Gruppen zu groß war. Weder die Negativkontrolle noch eine der Behandlungsgruppen zeigte im Vergleich zur Positivkontrolle eindeutige Unterschiede. Die Interpretation der Ergebnisse war

erheblich erschwert, da keine genaue Zuordnung der Messareale zur Nekrosezone und zur „area at risk“ erfolgte. Diese topographische Zuordnung müsste in folgenden Studien sichergestellt werden, beispielsweise durch ein autoradiographisches Verfahren ähnlich wie bei der Nick-Translation. Vor dem Hintergrund der Tatsache, dass Apoptose ein energieabhängiger Prozess ist [26], lässt sich der erkennbare Trend zu einer höheren Dichte an TUNEL-positiven Kernen in der Prophylaxe-Gruppe im Vergleich zur Positiv-Kontrollgruppe eventuell durch ein höheres Sauerstoffangebot aufgrund von HBOC und der daraus resultierenden Möglichkeit zur oxidativen Energiegewinnung erklären. Zum Teil spielt auch die kleinere „area at risk“ in dieser Gruppe eine Rolle. Es muss außerdem in Erwägung gezogen werden, dass HBOC-200 selbst Apoptose induziert. Eine Untersuchung an bovinen Endothelzellen führte während der Inkubation mit DCLHb in Gegenwart von H₂O₂ zu einem verstärkten Auftreten von Apoptose [24]. Dies könnte eine Ursache für die tendenziell höheren Werte für die Behandlungsgruppen darstellen.

Es ist jedoch noch offen, ob dieser Effekt ausschließlich negativ zu beurteilen ist, oder ob durch ihn ein medikamentöses Eingreifen mit Apoptose-Hemmstoffen, wie z.B. Caspase- oder Protease-Inhibitoren, ermöglicht wird. Hierfür sprechen beispielsweise die Ergebnisse einer Studie von Chen et al. am Gehirn, in der die Caspase-3 gehemmt wurde. Nach einer cerebralen Ischämie schien die Proteaseaktivität zu sinken und eine bessere Erholung der ischämischen Region zu erfolgen als in der Kontrollgruppe [19].

Um zusätzliche Unsicherheiten bei der Auswertung zu umgehen, wurde in diesem Modell keine Gegenfärbung der Kerne durchgeführt. Ausgehend von den Ergebnissen aus den Vorversuchen (siehe 3.8.1) nach Inkubation mit DNase I, die in allen Zellkernen Schäden induziert, kann dennoch ein relativer Anteil von TUNEL-positiven Kernen zur Gesamtzahl der Kerne gemacht werden. Mit 10-25% in Abhängigkeit von der Versuchsgruppe liegen die Werte dieser Studie etwa in dem Bereich von Studien, in denen eine Gegenfärbung mit Hematoxylin erfolgt war [119]. 12-40% apoptotische Zellen traten in einer Studie an Mäusen auf [87]. Diese unterschiedlichen Ergebnisse lassen sich wahrscheinlich zu einem wesentlichen Anteil durch die großen Unterschiede im Studiendesign zurückführen.

Im Hinblick auf die Spezifität der TUNEL-Reaktion bezüglich Apoptose bestehen jedoch einige Unsicherheitsfaktoren. Auch bei kumulierten DNA-Einzelstrangbrüchen, onkotischen Zellen und DNA-Replikation können positive Ergebnisse auftreten [74;118]. Außerdem treten DNA-Doppelstrangbrüche ebenfalls im Rahmen von Nekrose auf [48;130]. Andererseits können auch DNA-Einzelstrangbrüche als Auslöser für Apoptose wirken [18;71]. Trotz dieser teilweise Widersprüche kommt der „in-situ“-TUNEL-Reaktion neben der qualitativen Detektion von Apoptose durch „DNA-Laddering“ sowie dem Nachweis von Caspasen-Aktivierung durch „Western“- oder „Nothorn-Blot“ als Methode der quantitativen und lokalisierenden Erfassung die entscheidende Bedeutung zu [29]. Sie sollte allerdings in Verbindung mit anderen qualitativen Techniken sowie Nachweisen von DNA-ESB durchgeführt werden [28]. Besonders für die frühe Detektion von Ischämie- und Reperfusionsschäden wird die TUNEL-Reaktion in Verbindung mit einem TTC-Nachweis empfohlen [169].

5.5. Hämodynamische Wirkungen und Nebenwirkungen von HBOC

Da im Hinblick auf Nebenwirkungen von HBOC bereits zahlreiche Untersuchungen an Menschen unter Verwendung wesentlich höherer Dosierungen bezogen auf das Körpergewicht als in diesem Modell durchgeführt worden sind, war diese Studie nicht darauf ausgelegt, hämodynamische Nebenwirkungen qualitativ und quantitativ zu erfassen. Dennoch soll kurz auf die beobachteten Effekte eingegangen werden.

Hämodynamik

Die prophylaktische Applikation von HBOC-200 hatte einen kurzfristigen (10-20 min), aber signifikanten Anstieg des arteriellen Mitteldruckes (MAP) im Vergleich zu den anderen Gruppen zur Folge. Einflüsse auf die Herzfrequenz oder den zentralvenösen Druck konnten nicht festgestellt werden. Auch in der Therapie-Gruppe zeigte sich dieser Effekt allerdings in geringerer Ausprägung. Die fehlende Signifikanz ist in diesem Fall wohl auch auf die zu diesem Zeitpunkt (kurz nach Koronarligatur) deutlich höhere Varianz des MAP zurückzuführen. Eine Beeinträchtigung der Hämodynamik bis hin zur Dekompensation trat jedoch bei keinem Tier auf. Obwohl die pathophysiologische Grundlage der hypertensiven Effekte von Hämoglobinlösungen noch nicht endgültig geklärt werden konnte, hat

in diesem Zusammenhang u.a. die Bindung und die daraus resultierende Inaktivierung von vasodilatatorisch wirksamen NO bzw. EDRF (“endothelium derived relaxing factor”) an das freie Hämoglobinmolekül eine große Bedeutung („NO-Scavenging“) [137]. Als weitere Mechanismen sind eine erhöhte Endothelin-Freisetzung [145] sowie die Sensibilisierung von Adrenozeptoren wahrscheinlich [49;50]. Das zeigt z.B. eine Untersuchung bei Patienten mit cerebralem Insult, in der ein dosisabhängiger Anstieg der Endothelin-I-Konzentration nach Gabe von DCLHb (Diaspirin Cross-linked Hemoglobin) beobachtet werden konnte [143]. Einen weiteren Beleg für die Relevanz dieser Ansätze stellt die Beobachtung dar, dass durch die prophylaktische Gabe eines α -Adrenozeptor-Blockers (2 mg kg⁻¹ Yohimbin) vor Applikation von 0,4 g kg⁻¹ DCLHb eine Erhöhung des Blutdruckes bei Sprague-Dawley-Ratten verhindert werden konnte [149]. Gegen die Inaktivierung von NO als alleinigen kausalen Faktor spricht außerdem, dass im Rattenmodell von Rohlf et al. der Blutdruckanstieg nicht von einem Abfall der NO-Konzentration begleitet war [134]. Außerdem kommen auch intrazelluläre Wirkungen von HBOC in Frage. Nach Aufnahme von HBOC durch Endo- oder Transzytose in die Endothelzellen könnte es schon dort zu einer Reaktion mit vasoaktiven Substanzen kommen [30].

Verunreinigungen der HBOC mit Phospholipiden, wie z.B. dem Lysophosphatidylcholin, stellen generell einen Risikofaktor für eine Vasokonstriktion dar [106]. Durch die unter 2.3 beschriebenen Purifikationschritte und chemischen Modifikationen wie Polymerisation und Polynitroxilierung tritt dieser Effekt allerdings bei den heute verwendeten Lösungen kaum noch auf [1;13;97;107]. Außerdem scheint die Zunahme der Molekülgröße wesentlich zur Reduktion der vasokonstriktiven Effekte beizutragen [11;12].

Neben der Dosis und der Art der Substanz stellt die untersuchte Spezies eine weitere Einflussgröße auf die Höhe des Blutdruckanstiegs dar. Während in verschiedenen tierexperimentellen Untersuchungen Anstiege des MAP zwischen 30% und 80% beobachtet wurden [16;55;56], konnte im Rahmen einer präoperativen Hämodilution bei Patienten vor Leberresektion nach Gabe von 0,4 g kg⁻¹ HBOC-201 nur ein moderater Anstieg des MAP um 18% nachgewiesen werden [165].

Als Folge des erhöhten MAP, der auf einem erhöhten peripheren Widerstand (PVR) beruht, kam es in unterschiedlichen Untersuchungen zu einem konsekutiv erniedrigten Herzzeitvolumen (HZV) [55;75;76;165], während das systemische Sauerstoffangebot (DO_2) in den angeführten Untersuchungen unverändert blieb oder geringer als in den Kontrollgruppen war. Im Gegensatz zu den systemischen Effekten an den arteriellen Widerstandsgefäßen bewirkt ein Anstieg des MAP nach Gabe von HBOC keine Abnahme des regionalen oder mikrovaskulären Blutflusses in der Leber oder der Muskulatur, was in Modellen am Hamster gezeigt werden konnte [113;152].

Verschiedene tierexperimentelle Studien zeigen zusätzlich einen Anstieg des pulmonalarteriellen Druckes (PAP) nach Gabe von HBOC [55]. Die Transfusion von 43 ml kg^{-1} Polyhämoglobin ging bei einem Experiment an anästhesierten Affen mit einem 40%igen Anstieg des PAP einher [94]. In einer Studie an Schafen stieg der PAP im Rahmen einer nahezu vollständigen Austauschtransfusion (freie Hb-Konzentration: 8 g dl^{-1} , Hkt: 3%) um 200% an [92].

Kardiale Effekte

Ein Absinken des Herzzeitvolumens unter Medikation mit HBOC wurde sowohl in den meisten tierexperimentellen Studien [55;86;112] als auch bei Untersuchungen am Menschen beobachtet [75;76;165]. Ursache hierfür ist wahrscheinlich, wie bereits diskutiert, der Anstieg des systemischen Widerstandes.

In der Literatur finden sich hinsichtlich direkter Auswirkungen von HBOC am Herzen nur wenig Informationen. Unter anderem ist eine negative Chronotropie nachgewiesen worden. Diesem Effekt wurde bereits durch Polymerisation entgegengewirkt [180]. Die Kontraktilität zeigte sich selbst durch eine direkte Perfusion mit unmodifiziertem HBOC im Tierversuch unbeeinflusst [77]. Eine Vasokonstriktion der Koronararterien kann allerdings zu direkten Auswirkungen auf das Herz führen. Zwar ist die Relevanz noch nicht geklärt, doch konnten Motterlini et al. im Tiermodell zeigen, dass sich die vasokonstriktiven Effekte von Acetylcholin potenzieren [109], wodurch es ebenfalls zu Auswirkungen am Herzen kommen kann. Der demgegenüber fehlende Nachweis von spastischen Effekten an den Koronararterien unter Hämodilution mit einer „Stroma-freien“ Hämoglobinlösung in „in vivo“-Versuchen am Hund [58] macht die uneinheitliche

Beurteilung der direkten und indirekten Effekte von HBOC auf die myokardiale Kontraktilität deutlich.

Met-Hämoglobin

Den Hämoglobinlösungen fehlen die in den Erythrozyten vorliegenden Reduktionsenzyme. Aus diesem Grund kann es bei derartigen Lösungen durch Oxidation des Eisenatoms im Häm-Anteil des Hämoglobins zu einer verstärkten Bildung von Met-Hämoglobin (MetHb) kommen, das dann seiner eigentlichen Funktion, dem Sauerstofftransport, nicht mehr gerecht werden kann. Bis zu einer Konzentration von 10% des MetHb wird das Gewebe jedoch nicht wesentlich durch die hieraus resultierende mangelnde Oxygenierung in Mitleidenschaft gezogen [98]. Um diesen Effekt ganz sicher ausschließen zu können, wurde die Grenze in dieser Studie auf 5% festgesetzt und der Anteil an MetHb vor der Gabe von HBOC durch Messung überprüft (siehe auch 3.3.3). Nach Applikation blieb ein Anstieg der Konzentration von MetHb, die nie über 0,5% lag, in den entsprechenden Behandlungsgruppen (Gruppe 3 und 4) aus. Diese Befunde bestätigen die Ergebnisse bisheriger Studien mit HBOC, in denen sich weder tierexperimentell [164] noch beim Einsatz am Menschen [158] klinisch relevante Konzentrationen zeigten. Der MetHb-Anteil kann durch Zusatz von Redox-Enzymen oder Einkapsulierung von HBOC zusätzlich vermindert werden, wodurch ein noch höherer Anteil des Hämoglobins anhaltend zum Sauerstofftransport zur Verfügung steht [25;187].

Wie zu Beginn dieses Abschnittes erwähnt, wurde die Unbedenklichkeit von niedrig dosiertem HBOC bereits in zahlreichen tierexperimentellen und klinischen Studien nachgewiesen. Auch die aktuelle Untersuchung lieferte keinen neuen Anhalt für relevante Nebenwirkungen von HBOC-200. Somit könnte ein Einsatz in klinischen Studien zur Verminderung perioperativer kardialer Komplikationen bei Risikopatienten in greifbare Nähe gerückt sein.

5.6. Methodenkritik

Tierversuche

Wie bei jedem Tiermodell ist eine Übertragung der Ergebnisse auf den Menschen selbstverständlich nur eingeschränkt möglich. Das gilt auch für die vorliegende Studie, die an Ratten durchgeführt wurde. Das Design dieses Versuches stellt jedoch eine anerkannte und vielfältig praktizierte Vorstufe zu Humanstudien dar. Für die Untersuchung von regionalen Myokardischämien durch Ligatur der linken Koronararterie bzw. einer ihrer Äste sind Hunde [2;52;136;176], Kaninchen [23; 85;128;166] und Ratten [70;119;127] die bevorzugten Tierarten, wohingegen Schweine [51;110], Schafe und Primaten [125] eher selten verwendet werden. Bei Ratten und Kaninchen besteht im Gegensatz zu Hunden der Vorteil des relativ einheitlichen Infarktareales durch relativ identische Versorgungstypen ohne wesentliche Kollateralversorgung. Durch diese Tatsache wird die Auswertung und Interpretation der Ergebnisse erheblich erleichtert. Des Weiteren handelt es sich überwiegend um gesunde und junge Tiere. Dagegen befindet sich das Patientenkollektiv der KHK-Patienten meist schon in einem fortgeschrittenen Alter mit entsprechenden Begleiterkrankungen und weist größtenteils eine Kollateralisierung aufgrund der Chronizität der Erkrankung auf, wodurch die Auswirkungen einer akuten Ischämie oft reduziert werden [64] und die HBOC noch effektiver wirken können. Diese veränderten Einflussfaktoren müssen bei Schlussfolgerungen im Hinblick auf diese Zielgruppe bedacht werden. Trotz dieser Einschränkungen sind Ratten neben Kaninchen die am häufigsten verwendeten Tierarten zur Untersuchung von myokardialen Ischämie- und Reperfusionsschäden [31;146;169;177].

Ischämie- und Reperfusionszeit

Im Hinblick auf diesen Parameter muss berücksichtigt werden, dass sich die gewählten Zeiten primär auf den Hauptzielparameter der Gesamtstudie (Infarktnachweis mittels TTC-Färbung) bezogen (siehe Anmerkung unter 3.). Unter diesem Aspekt stellt die gewählte Ischämiezeit eine übliche Zeitdauer dar [91;101;132;144;169]. Aufgrund der relativ hohen Mortalität der Versuchstiere und einer sich besonders am Ende der Ischämiezeit abzeichnenden kardiozirkulatorischen Verschlechterung liegt sie mit 25 min aber eher im unteren Bereich des in der Literatur angegebenen Bereiches von 20-90 min für kardiale

Ischämie- und Reperfusionmodelle am Kleintier [146]. Auch die Reperfusionszeit von 120 min entspricht dem in zahlreichen Studien gewählten Zeitintervall. Bezogen auf den Infarktnachweis mittels TTC wäre eine Verlängerung nicht sinnvoll gewesen, da Reffelmann et al. in einer neueren Studie weder in der Infarktgröße noch im regionalen myokardialen Blutfluss signifikante Unterschiede zwischen 120 min und 180 min Reperfusion nach einer 30 minütigen Ischämie in einem Modell am Kaninchen nachweisen konnten [127].

Um Apoptose in vollem Ausmaß nachzuweisen, scheint die gewählte Reperfusionszeit dagegen eher kurz zu sein [29]. Andererseits existiert hierfür bisher auch kein präzise definiertes Zeitintervall, da die Anzahl der „in vivo“ Studien relativ gering ist. Zudem weisen sie erhebliche Varianten im Design und den Ergebnissen auf. Die volle Ausprägung von Apoptose ist in Zellkulturen mit adulten Kardiomyozyten erst nach 14 h Reperfusion nachgewiesen worden [29]. Außerdem ist die Rolle, die Apoptose im Rahmen regionaler myokardialer Ischämien bei Ausbildung von Gewebeschäden spielt, noch nicht sicher einzuschätzen.

Im Hinblick auf die DNA-Einzelstrangbrüche, die bereits sehr früh auftreten, war die Dauer der Reperfusionszeit sicher ausreichend. In diesem Fall wäre ein Modell mit unterschiedlichen Reperfusionszeiten interessant, um so Aussagen über den zeitlichen Verlauf der Rate an DNA-Einzelstrangbrüchen treffen zu können.

„Area at risk“

Da in der aktuellen Versuchsreihe entsprechend den Modifikationen von Ye et al. zur Senkung der Mortalität bei kardialen Ischämie modellen an Ratten [188] die Stelle der Ligatur bewusst in den Bereich der Aufteilung der linken Koronararterie, also weiter distal, gelegt wurde, anstatt direkt den Hauptstamm zu ligieren, überrascht es nicht, dass die Größe der „area at risk“ als Anteil des linken Ventrikels mit etwa 30% eher im unteren Bereich der in der Literatur beschriebenen Werte lag. Bei vergleichbarer Technik sind in Versuchen mit Kaninchen Werte von 30 - 40% [53;131], teilweise sogar von 50-55% beschrieben worden [44;119]. Das geringere Volumen der „area at risk“ mag aber im Hinblick auf eine möglichst hohe Anzahl der die Ischämie überlebenden Versuchstiere von Vorteil sein.

Blutflussmessung

Kritisch anzumerken ist unter diesem Aspekt, dass in diesem Modell weder die Ligatur noch die Reperfusion exakt kontrolliert wurden. Entsprechend zahlreicher anderer Studien [23;119;131;186] erfolgte die Überprüfung der Ligatur rein visuell, indem auf eine Abblassung bzw. livide Verfärbung des Epikards geachtet wurde. Im nachhinein bestätigte der positive Infarktnachweis mittels TTC (siehe Anmerkung unter 3.) den erfolgreich herbeigeführten Gefäßverschluss. Für die stattgefundenene Reperfusion bestand dagegen außer der Visuskontrolle auch am Versuchsende kein eindeutiger Beweis. Die von einzelnen Autoren zu Hilfe genommenen elektrokardiographischen und hämodynamischen Indikatoren [151] stellten sich in dieser Studie als unzureichend oder undurchführbar (z.B. Elektromagnetische Flussmessung) heraus. Zur objektiven Überprüfung von Ligatur und Reperfusion hätte eine Messung des myokardialen Blutflusses erfolgen müssen, was mittels farbmarkierten oder radioaktiven Mikrosphären auch an Ratten prinzipiell möglich ist [80]. Dennoch sind zu diesem Zweck größere Versuchstiere, wie z.B. Hunde [135;136] oder Kaninchen [53;127;128], wesentlich besser geeignet, da diese Methode für zuverlässige Ergebnisse ausreichend Gewebe sowie die Abnahme relevanter Blutmengen erfordert. Aus diesem Grund war eine derartige Kontrolle in diesem Modell nicht praktikabel. Weitere Nachweismethoden der Blutflussmessung sind die Kontrastechokardiographie, die sowohl an Hunden [45] als auch an Kleintieren [120] durchgeführt worden ist, und die SPECT, die an Hunden validiert wurde [139]. Beide Verfahren erfordern jedoch neben Spezialgeräten sehr erfahrene Untersucher, weshalb sie noch keine Standardmethoden darstellen.

Vorzeitige Letalität

Das verwendete Modell der kardialen Ischämie und Reperfusion ist bei der Ratte mit einer vorzeitigen Letalität von etwa 30-50% assoziiert [188]. Hieraus ergibt sich ein weiterer Kritikpunkt. Ist die Letalität in einer der Gruppen höher als in den anderen, so gehen die kardiozirkulatorisch instabilen Tiere dieser Gruppe nicht in die Auswertung mit ein. Diese Selektion kann zu einer nachfolgenden Bevorzugung dieser Gruppe führen. Außerdem kann nicht ausgeschlossen werden, dass gerade Tiere, die einen besonders großen Infarkt erlitten haben, nicht in die Auswertung einbezogen wurden, da sie vorzeitig verstarben. Dieses Problem lässt sich jedoch

nicht umgehen. Eine adäquate Detektion der „area at risk“ ist bei fehlender „in-vivo“-Demarkation kaum möglich. Entsprechendes gilt für den Vergleich der Rate an DNA-Einzelstrangbrüchen der Tiere unterschiedlicher Gruppen bzw. innerhalb einer Gruppe bei differenten Reperfusionzeiten.

Auswertung

Da die DNA sehr empfindlich auf verschiedenste Arten von Noxen reagiert und die Nachweismethoden der Nick- und TUNEL-Reaktionen eine hohe Sensivität bei geringer Spezifität aufweisen, können bereits kleinste Abweichungen vom Standard im Einzelfall zu einer artifiziellen Erhöhung der Rate an DNA-Strangbrüchen führen. Aufgrund des komplexen Studiendesigns existieren mehrere derartiger Fehlerquellen, wie zum Beispiel eine zu starke Quetschung des Gewebes beim Lamellieren des Herzens, eine Verzögerung des Einfrierens oder ein zwischenzeitliches Auftauen. Bei der manuell sehr anspruchsvollen Technik der Herstellung von Kryoschnitten kann es trotz größter Sorgfalt zu feinen Zerreißen des Gewebes kommen. Außerdem sind die Schnitte im Rahmen der laborchemischen Nachweismethoden weiteren Einflüssen wie Erwärmung, Erschütterung oder Lichteinwirkung ausgesetzt, welche ebenfalls DNA-Schäden induzieren können. Im Hinblick auf die Nick-Translation muss beachtet werden, dass die Areale manuell mit der Computer-Maus umfahren wurden und auch die Aufteilung der Ventrikelwand in epi-, myo- und endokardiale Drittel subjektiv erfolgte, so dass hierbei geringfügige Abweichungen nicht ausgeschlossen werden können. Bezüglich der TUNEL-Reaktion ist zu bedenken, dass bei der Festlegung der Auszählungsfelder innerhalb der „area at risk“ ebenfalls eine Auswahl getroffen werden musste. Durch die Standardisierung der Gewebeaufarbeitung und eine verblindete Auswertung wurde einer systematischen Benachteiligung einer Gruppe vorgebeugt. Auch die Definition der Auswertungsareale muss kritisch betrachtet werden. Hierbei würde eine Auswertung getrennt nach „area at risk“ und Nekrosezone im TTC-Nachweis den Idealfall darstellen.

Bei der Beurteilung der Ergebnisse muss darauf aufmerksam gemacht werden, dass die Untersuchungen zu DNA-ESB und -DSB nur in einer mutmaßlich repräsentativen Ebene des Herzens durchgeführt worden sind. Rückschlüsse für das gesamte Herz können deshalb nicht ohne Vorbehalt gezogen werden.

5.7. Ausblick

Zwar konnte das Auftreten von Apoptose für dieses Modell mittels DNA-Laddering bestätigt werden, eine Interpretation der Ergebnisse des quantitativen Nachweises mittels TUNEL-Reaktion ist jedoch schwierig, da in diesem Zusammenhang noch zahlreiche Fragen offen sind. Welche Rolle spielt Apoptose bei regionalen Myokardischämien? In welchem Zeitintervall spielt sie sich ab? Ermöglicht ein Überwiegen von Apoptose gegenüber Nekrose ein therapeutisches Eingreifen, um noch Gewebe zu retten, oder stellt sie lediglich eine Vorstufe eines zwangsläufigen Absterbens der Zelle dar? Zur Klärung unter anderem dieser Fragen sind noch weitere Studien erforderlich.

Die „in-situ“-Nick-Translation mit densitometrischer Auswertung nach Autoradiographie bietet sich nach der Validierung in dieser Studie durch die Möglichkeit einer sehr differenzierten Beurteilung der Schäden als verlässliches und gut durchführbares Verfahren zum Nachweis von DNA-ESB für folgende Untersuchungen in hervorragender Weise an. Aufgrund der signifikanten Reduktion der Rate an DNA-ESB im linken Ventrikel nach prophylaktischer Applikation von HBOC-200 im Ischämie- und Reperusionsmodell der Ratte nach akuter Koronararterienligatur stellt sich die Frage nach den ursächlichen Mechanismen. Vor dem Hintergrund des jetzigen Kenntnisstandes erscheinen diesbezüglich Untersuchungen des „no-reflow“-Phänomens, der Leukozyten-Endothel-Interaktion sowie des Komplementsystems erfolgversprechend. „In-vitro“-Versuche zur Beeinflussung der Granulozytenaktivität durch HBOC-200 dürften ebenfalls zum weiteren Verständnis beitragen. Außerdem wäre es durchaus sinnvoll, die prophylaktische Wirkung auch bei Perfluorocarbonen, deren therapeutischer Effekt bereits nachgewiesen ist, zu untersuchen. Da Patienten mit KHK die Hauptzielgruppe dieser Substanz darstellen, wären Experimente an genotypisch veränderten Tieren mit chronischer koronarer Durchblutungsstörung äußerst interessant. Aufgrund der dann bestehenden Kollateralisierung könnten eventuell noch ausgeprägtere Effekte durch HBOC-200 erzielt werden. Letztendlich sollte es angestrebt werden, die plasmatischen Sauerstoffträger an KHK-Patienten in klinischen Studien zu testen und somit eventuell ein neues Verfahren zu entwickeln, um die perioperative Mortalität und Morbidität bei diesen Patienten zu reduzieren.

6. Zusammenfassung

Hintergrund

Unterschiedliche Studien belegen, dass nichttherapeutische koronare Risikopatienten in etwa 3% perioperativ einen Myokardinfarkt mit hoher Letalität erleiden. Perioperative Myokardischämien können sich klinisch bei Risikopatienten auch als Rhythmusstörungen oder Angina pectoris manifestieren. Die Gabe plasmatischer Sauerstoffträger, wie z.B. die zellfreie Hämoglobinlösung HBOC, stellt eine potentielle Möglichkeit dar, die Auswirkungen dieser Komplikationen zu verringern.

Fragestellung

In der vorliegenden Studie sollte erstmalig die Hypothese überprüft werden, ob die prophylaktische oder therapeutische Applikation der zellfreien Hämoglobinlösung HBOC-200 die myokardialen DNA-Schäden einer akuten Ischämie und Reperfusion nach Koronararterienligatur im Kleintiermodell verringern kann.

Methodik

Bei der vorliegenden Studie handelt es sich um eine prospektive und randomisierte Untersuchung. Die Auswertung erfolgte verblindet. Von den 46 verwendeten Tieren konnten letztlich nur 32 Tiere in die Auswertung eingeschlossen werden, da diese den Versuch vollständig durchlaufen hatten. Die Tiere wurden nach intravenöser Allgemeinanästhesie mit kontrollierter Beatmung instrumentiert und thorakotomiert. Anschließend erfolgte die Gruppenzuteilung. Tiere der Gruppe 1 (Negativ-Kontrolle) erhielten Placebo und keine Koronararterienligatur, Tiere der Gruppe 2 (Positiv-Kontrolle) erhielten Placebo und eine Koronararterienligatur, Tiere der Gruppe 3 (Therapie-Gruppe) erhielten $0,4 \text{ g kg}^{-1}$ HBOC-200 nach, Tiere der Gruppe 4 (Prophylaxe-Gruppe) vor der Koronararterienligatur intravenös appliziert. Der Ischämiezeit von 25 min schloß sich eine 120 minütige Reperfusion an. Es erfolgten semiquantitative Nachweise von DNA-Strangbrüchen mittels Autoradiographie nach Nick-Translation sowie durch TUNEL-Reaktion in der „area at risk“, die durch „in-vivo“-Patentblau-Injektion dargestellt wurde. Des Weiteren wurden alle Basisparameter kontinuierlich überwacht. Die statistische Auswertung erfolgte mittels ANOVA (post-hoc Test nach Dunnett) und zweiseitigem t-Test für unverbundene Stichproben (Referenzgruppe: Positiv-Kontrolle). Ein $p \leq 0,05$ wurde als signifikant angenommen.

Ergebnisse

Hinsichtlich Demographie und Basisparametern bestanden zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Unter diesen Bedingungen wurde in dieser Studie erstmalig die Validität der quantifizierenden Detektion von DNA-ESB im Myokard durch Autoradiographie nach „in-situ“-Nick-Translation bestätigt. Die Positiv-Kontrolle unterschied sich signifikant von der Negativ-Kontrolle. Die 95% Konfidenzintervalle zeigten keine Überlappungen. Anhand dieser Methode konnte wiederum erstmalig nachgewiesen werden, dass die prophylaktische Applikation von HBOC-200 die Rate an DNA-Einzelstrangbrüchen im linken Ventrikel im Vergleich zur Positiv-Kontrolle signifikant reduziert ($p < 0,039$). Die therapeutische Applikation zeigte keine signifikante Reduktion der DNA-ESB, aber auch keine Vermehrung. Zwar konnte das Auftreten von Apoptose für das vorliegende Modell qualitativ mittels DNA-Laddering belegt werden, signifikante Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen ergaben sich bei der quantitativen Auswertung der DNA-Doppelstrangbrüche mit Hilfe der TUNEL-Reaktion jedoch nicht.

Schlussfolgerungen

Der Nachweis von DNA-ESB mittels „in-situ“-Nick-Translation stellt nicht nur ein sensitives Verfahren dar, sondern erlaubt darüber hinaus beispielsweise im Vergleich zum Infarktnachweis mittels TTC-Färbung eine wesentlich differenziertere Betrachtung der Schäden am Myokard sowie zusätzlich eine Beurteilung des Gewebes außerhalb der eigentlichen „area at risk“. Die Ergebnisse dieser Studie, insbesondere die Wirkungslosigkeit der therapeutischen Applikation, machen deutlich, dass ein großer Anteil der Schäden bereits während der Ischämie determiniert wird. Die positiven Effekte der prophylaktischen Applikation von $0,4 \text{ g kg}^{-1}$ der zellfreien Hämoglobinlösung HBOC-200 sind scheinbar nicht allein durch ein regional erhöhtes Sauerstoffangebot und eine erleichterte Sauerstoffabgabe zu erklären. Vielmehr sind, wie für die Perflourocarbone, noch weitere protektive Effekte anzunehmen, wie z.B. Auswirkungen auf Sauerstoffradikale, Neutrophile Granulozyten oder das Komplementsystem, die ein sogenanntes „no reflow“ potentiell reperfundierbarer Areale verhindern. Diese Wirkungsmechanismen weiter aufzuklären sollte das Ziel kommender Studien auf diesem Gebiet sein, um schließlich den perioperativen prophylaktischen Einsatz von plasmatischen Sauerstoffträgern zu ermöglichen.

7. Literaturverzeichnis

1. Alayash, A. I. Hemoglobin-based blood substitutes and the hazards of blood radicals. *Free Radic Res.* 2000;33:341-8.
2. Ambrosio, G., H. F. Weisman, et al. Progressive impairment of regional myocardial perfusion after initial restoration of postischemic blood flow. *Circulation.* 1989;80:1846-61.
3. Anderson, H. V., P. P. Leimgruber, et al. Distal coronary artery perfusion during percutaneous transluminal coronary angioplasty. *Am Heart J.* 1985;110:720-6.
4. Arai, M., D. J. Lefer, et al. An anti-CD18 antibody limits infarct size and preserves left ventricular function in dogs with ischemia and 48-hour reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1996;27:1278-85.
5. Bajaj, A. K., M. A. Cobb, et al. Limitation of myocardial reperfusion injury by intravenous perfluorochemicals. Role of neutrophil activation. *Circulation.* 1989;79:645-56.
6. Bangert, K., M. A. Burmeister, et al. HBOC-201 verbessert das myokardiale Kontraktionsverhalten unter Anämie im Koronarstenosemodell beim Hund. *Anesth Intensiv Med.* 2000;41: S 481.
7. Bartling, B., Holtz, J., Darmer, D. Contribution of myocyte apoptosis to myocardial infarction ? *Basic Res Cardiol* 1998;93:71-84.
8. Black, S. C., J. Q. Huang, et al. Co-localization of the cysteine protease caspase-3 with apoptotic myocytes after in vivo myocardial ischemia and reperfusion in the rat. *J Mol Cell Cardiol.* 1998;30:733-42.
9. Böttiger, B. W. and E. Martin. [Prevention of perioperative myocardial ischemia--an update]. *Anaesthesist.* 2000;49:174-86.
10. Brauer, P., T. Standl, et al. Transcranial Doppler sonography mean flow velocity during infusion of ultrapurified bovine hemoglobin. *J Neurosurg Anesthesiol.* 1998;10:146-52.
11. Bucci, E., B. Matheson, et al. Vascular response to infusions of a nonextravasating hemoglobin polymer. *Transfusion Alternatives in Transfusion Medicine.* 2002;4:72(P53).
12. Bucci, E., T. L. Watts, et al. Cell-free hemoglobin, oxygen off-load and vasoconstriction. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2001;36:S123-4.
13. Buehler, P. W., S. Mehendale, et al. Resuscitative effects of polynitroxylated alphaalpha-cross-linked hemoglobin following severe hemorrhage in the rat. *Free Radic Biol Med.* 2000;29:764-74.
14. Burmeister, M., K. Bangert, et al. Prophylaxe mit bovinem Hämoglobin reduziert den myokardialen tpO₂-Abfall und Myokardschäden unter akuter Koronarstenose im Tiermodell. *Anesthesiol Intensivmed* : 2001;42 (Suppl):473.

15. Caldecott, K. W. Mammalian DNA single-strand break repair: an X-ra(y)ted affair. *Bioessays*. 2001;23:474-455.
16. Caron, A., P. Menu, et al. Cardiovascular and hemorheological effects of three modified human hemoglobin solutions in hemodiluted rabbits. *J Appl Physiol*. 1999;86:541-8.
17. Charriaut-Marlangue, C., Margaill, I., Represa, A., Popovici, T., Plotkine, M., Ben-Ari, Y. Apoptosis and Necrosis after reversible focal ischemia: an in situ DNA fragmentation analysis. *J Cereb Blood Flow Metab* 1996; 16: 186-194
18. Chen, J., K. Jin, et al. Early detection of DNA strand breaks in the brain after transient focal ischemia: implications for the role of DNA damage in apoptosis and neuronal cell death. *J Neurochem*. 1997;69:232-45.
19. Chen, J., Nagayama, T., Jin, K., Setler, R. A., Zhu, R. L., Graham, S. H., Simon, R. P. Induction of caspase-3-like protease may mediate delayed neuronal death in the hippocampus after transient cerebral ischemia. *J Neurosci*. 1998;18,13:4914-4928.
20. Christopherson, R., C. Beattie, et al. Perioperative morbidity in patients randomized to epidural or general anesthesia for lower extremity vascular surgery. Perioperative Ischemia Randomized Anesthesia Trial Study Group [see comments]. *Anesthesiology*. 1993;79:422-34.
21. Cleman, M., C. C. Jaffee, et al. Prevention of ischemia during percutaneous transluminal coronary angioplasty by transcatheter infusion of oxygenated Fluosol DA 20%. *Circulation*. 1986;74:555-62.
22. Cowley, M. J., F. R. Snow, et al. Perfluorochemical perfusion during coronary angioplasty in unstable and high-risk patients. *Circulation*. 1990;81:IV27-34.
23. Currie, R. W., R. M. Tanguay, et al. Heat-shock response and limitation of tissue necrosis during occlusion/reperfusion in rabbit hearts. *Circulation*. 1993;87:963-71.
24. D'Agnillo, F. and A. I. Alayash. Redox cycling of diaspirin cross-linked hemoglobin induces G2/M arrest and apoptosis in cultured endothelial cells. *Blood*. 2001;98:3315-23.
25. D'Agnillo, F. and T. M. Chang. Polyhemoglobin-superoxide dismutase-catalase as a blood substitute with antioxidant properties. *Nat Biotechnol*. 1998;16:667-71.
26. Depre, C. and H. Taegtmeyer. Metabolic aspects of programmed cell survival and cell death in the heart. *Cardiovasc Res*. 2000;45:538-48.
27. Eastman, A. B., M. A. The origin of DNS breaks: a consequence of DNA damage, DNA repair, or apoptosis? *Cancer Invest*. 1992;10/3:229-240.
28. Elsasser, A., K. Suzuki, et al. Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure. *J Mol Cell Cardiol*. 2000;32:711-24.
29. Elsasser, A., K. Suzuki, et al. The role of apoptosis in myocardial ischemia: a critical appraisal. *Basic Res Cardiol*. 2001;96:219-26.

30. Faivre-Fiorina, B., A. Caron, et al. Presence of hemoglobin inside aortic endothelial cells after cell-free hemoglobin administration in guinea pigs. *Am J Physiol.* 1999;276:H766-70.
31. Farb, A., F. D. Kolodgie, et al. Myocardial infarct extension during reperfusion after coronary artery occlusion: pathologic evidence. *J Am Coll Cardiol.* 1993;21:1245-53.
32. Feola, M., J. Simoni, et al. Complement activation and the toxicity of stroma-free hemoglobin solutions in primates. *Circ Shock.* 1988;25:275-90.
33. Fishbein, M. C., Y. R. J, et al. The relationship of vascular injury and myocardial hemorrhage to necrosis after reperfusion. *Circulation.* 1980;62:1274-9.
34. Fishbein, M. C., S. Meerbaum, et al. Early phase acute myocardial infarct size quantification: validation of the triphenyl tetrazolium chloride tissue enzyme staining technique. *Am Heart J.* 1981;101:593-600.
35. Fleisher, L. A., A. H. Nelson, et al. Postoperative myocardial ischemia: etiology of cardiac morbidity or manifestation of underlying disease? *J Clin Anesth.* 1995;7:97-102.
36. Fliss, H. and D. Gattinger. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium. *Circ Res.* 1996;79:949-56.
37. Forman, M. B., D. A. Ingram, et al. Role of perfluorochemical emulsions in the treatment of myocardial reperfusion injury. *Am Heart J.* 1992;124:1347-57.
38. Forman, M. B., C. J. Pitarys, 2nd, et al. Pharmacologic perturbation of neutrophils by Fluosol results in a sustained reduction in infarct size in the canine model of reperfusion. *J Am Coll Cardiol.* 1992;19:205-16.
39. Forman, M. B., D. W. Puett, et al. Preservation of endothelial cell structure and function by intracoronary perfluorochemical in a canine preparation of reperfusion. *Circulation.* 1987;76:469-79.
40. Forman, M. B., R. Virmani, et al. Mechanisms and therapy of myocardial reperfusion injury. *Circulation.* 1990;81:IV69-78.
41. Freitag, M., T. Strate, et al. Improvement of Impaired Pancreatic Tissue Oxygen Tension after Isovolemic Hemodilution with Hydroxyethyl Starch Plus HBOC in Comparison to Hydroxyethyl Starch and Ringer Solution in Acute Pancreatitis. *Anesthesiology.* 2002:A379.
42. Freude, B., T. N. Masters, et al. Apoptosis is initiated by myocardial ischemia and executed during reperfusion. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:197-208.
43. Friedman, H. I., F. DeVenuto, et al. Histologic and ultrastructural effects of stroma-free hemoglobin solutions on rat liver, kidney, and brain. *Surg Forum.* 1977;28:3-5.
44. Fryer, R. M., A. K. Hsu, et al. Opioid-induced cardioprotection against myocardial infarction and arrhythmias: mitochondrial versus sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels. *J Pharmacol Exp Ther.* 2000;294:451-7.

45. Galiuto, L., A. N. DeMaria, et al. Evaluation of dynamic changes in microvascular flow during ischemia-reperfusion by myocardial contrast echocardiography. *J Am Coll Cardiol.* 1998;32:1096-101.
46. Gerschenson L.E., R. R. J. Apoptosis: a different type of cell death. *FASEB-J.* 1992;6:2450-2455.
47. Gottlieb, R. A., K. O. Burleson, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest.* 1994;94:1621-8.
48. Granville, D. J., C. M. Carthy, et al. Apoptosis: molecular aspects of cell death and disease. *Lab Invest.* 1998;78:893-913.
49. Gulati, A., A. C. Sharma, et al. Role of endothelin in the cardiovascular effects of diaspirin crosslinked and stroma reduced hemoglobin. *Crit Care Med.* 1996;24:137-47.
50. Gulati, A., G. Singh, et al. Effect of diaspirin crosslinked and stroma-reduced hemoglobin on mean arterial pressure and endothelin-1 concentration in rats. *Life Sci.* 1995;56:1433-42.
51. Habler, O., M. Kleen, et al. Diaspirin-crosslinked hemoglobin reduces mortality of severe hemorrhagic shock in pigs with critical coronary stenosis. *Crit Care Med.* 2000;28:1889-98.
52. Hale, S. L., K. J. Alker, et al. Evaluation of nonradioactive, colored microspheres for measurement of regional myocardial blood flow in dogs. *Circulation.* 1988;78:428-34.
53. Hale, S. L., H. Hammerman, et al. Effect of two perfluorocarbon emulsions on reperfusion injury after coronary artery occlusion in rabbits. *Basic Res Cardiol.* 1995;90:404-9.
54. Hengartner, M. O. The biochemistry of apoptosis [In Process Citation]. *Nature.* 2000;407:770-6.
55. Hess, J. R., V. W. MacDonald, et al. Systemic and pulmonary hypertension after resuscitation with cell-free hemoglobin. *J Appl Physiol.* 1993;74:1769-78.
56. Hess, J. R., V. W. Macdonald, et al. Increased vascular resistance with hemoglobin-based oxygen carriers. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22:361-72.
57. Hockenbery, D. Defining apoptosis. *Am J Pathol.* 1995;146:16-19.
58. Hodakowski, G. T., R. D. Page, et al. Ultra-pure polymerized bovine hemoglobin blood substitute: effects on the coronary circulation. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1992;20:669-72.
59. Holtz, J. H., H. Apoptosis- what is it? Significance in coronary heart disease and myocardial infarct. *Herz.* 1999;24:196-210.
60. Horn, E. P. and M. A. Burmeister. Bovine hemoglobin (HBOC-201) restores tissue oxygen tension during peripheral and coronary artery stenosis under extended hemodilution. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2001;36:S117-8.

61. Horn, E. P., T. Standl, et al. Bovine hemoglobin increases skeletal muscle oxygenation during 95% artificial arterial stenosis. *Surgery*. 1997;121:411-8.
62. Horn, E. P., T. Standl, et al. [Bovine hemoglobin. HBOC-201 prevents a reduction of the oxygen partial pressure in poststenotic skeletal muscle]. *Anaesthesist*. 1998;47:116-23.
63. Horn, E. P., T. Standl, et al. Additional augmentation of liver tissue oxygen tension following hemodilution with bovine hemoglobin. *Anesth Analg*. 2000;90:427.
64. Hort, W. [Pathology of acute myocardial infarction]. *Internist (Berl)*. 2001;42:631-40.
65. Hort, W. and S. da Canalis. Untersuchung an Rattenherzen nach temporärer Unterbindung der linken Kranzarterie. *Virchows Arch A Pathol Anat Histol*. 1965;339:61-71.
66. Iseki, S. DNA strand breaks in rat tissues as detected by in situ nick translation. *Exp Cell Res*. 1986;167:311-26.
67. Ito, W. D., S. Schaarschmidt, et al. Infarct size measurement by triphenyltetrazolium chloride staining versus in vivo injection of propidium iodide. *J Mol Cell Cardiol*. 1997;29:2169-75.
68. Ito, W., H. J. Schafer, et al. Influence of the terminal complement-complex on reperfusion injury, no-reflow and arrhythmias: a comparison between C6-competent and C6-deficient rabbits. *Cardiovasc Res*. 1996;32:294-305.
69. Jaffe, C. C., D. Wohlgelernter, et al. Preservation of left ventricular ejection fraction during percutaneous transluminal coronary angioplasty by distal transcatheter coronary perfusion of oxygenated Fluosol DA 20%. *Am Heart J*. 1988;115:1156-64.
70. Ji, L. L., R. G. Fu, et al. Myocardial response to regional ischemia and reperfusion in vivo in rat heart. *Can J Physiol Pharmacol*. 1993;71:811-7.
71. Jin, K. C., C. F.; Nagayama, T.; Chen, M.; Sinclair, J.; Graham, S.H.; Simon, R.P. In situ detection of neuronal DNA strand breaks using the Klenow fragment of DNA polymerase I reveals different mechanisms of neuronal death after global cerebral ischemia. *J Neurochem*. 1999;72:1204-1214.
72. Kajstura, J., W. Cheng, et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats. *Lab Invest*. 1996;74:86-107.
73. Kajstura, J., Y. Liu, et al. Coronary artery constriction in rats: necrotic and apoptotic myocyte death. *Am J Cardiol*. 1998;82:30K-41K.
74. Kanoh, M., G. Takemura, et al. Significance of myocytes with positive DNA in situ nick end-labeling (TUNEL) in hearts with dilated cardiomyopathy: not apoptosis but DNA repair. *Circulation*. 1999;99:2757-64.

75. Kasper, S. M., F. Grune, et al. The effects of increased doses of bovine hemoglobin on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg.* 1998;87:284-91.
76. Kasper, S. M., M. Walter, et al. Effects of a hemoglobin-based oxygen carrier (HBOC-201) on hemodynamics and oxygen transport in patients undergoing preoperative hemodilution for elective abdominal aortic surgery. *Anesth Analg.* 1996;83:921-7.
77. Kim, H. W., M. Feola, et al. Effects of hemoglobin perfusion on contractile function of the isolated ventricular septa. *Biomater Artif Cells Artif Organs.* 1988;16:331-45.
78. Kloner, R. A., C. E. Ganote, et al. The "no-reflow" phenomenon after temporary coronary occlusion in the dog. *J Clin Invest.* 1974;54:1496-508.
79. Kloner, R. A., R. E. Rude, et al. Ultrastructural evidence of microvascular damage and myocardial cell injury after coronary artery occlusion: which comes first? *Circulation.* 1980;62:945-52.
80. Koerner, J. E. and R. L. Terjung. Effect of physical training on coronary collateral circulation of the rat. *J Appl Physiol.* 1982;52:376-87.
81. Kolodgie, F. D., A. Farb, et al. Hyperoxic reperfusion is required to reduce infarct size after intravenous therapy with perfluorochemical (Fluosol-DA 20%) or its detergent component (poloxamer 188) in a poorly collateralized animal model. Absence of a role of polymorphonuclear leukocytes. *J Am Coll Cardiol.* 1994;24:1098-108.
82. Kolodgie, F. D., R. Virmani, et al. Limitation of no reflow injury by blood-free reperfusion with oxygenated perfluorochemical (Fluosol-DA 20%). *J Am Coll Cardiol.* 1991;18:215-23.
83. Krause, T., M. Einhaus, et al. A novel technique for the detection of DNA single-strand breaks in human white blood cells and its combination with the unscheduled DNA synthesis assay. *Int Arch Occup Environ Health.* 1993;65:77-82.
84. Krause, T., J. Scholz, et al. DNA single strand breaks as a sensitive marker for neuronal injury following a transient cerebral hypoxemia. *Anesthesiology.* 1998;89:A765.
85. Krenz, M., M. V. Cohen, et al. The protective and anti-protective effects of ethanol in a myocardial infarct model. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;957:103-14.
86. Krieter, H., G. Hagen, et al. Isovolemic hemodilution with a bovine hemoglobin-based oxygen carrier: effects on hemodynamics and oxygen transport in comparison with a nonoxygen-carrying volume substitute. *J Cardiothorac Vasc Anesth.* 1997;11:3-9.
87. Kurrelmeyer, K. M., L. H. Michael, et al. Endogenous tumor necrosis factor protects the adult cardiac myocyte against ischemic-induced apoptosis in a murine model of acute myocardial infarction. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2000;97:5456-61.

88. Kuzminov, A. Single-strand interruptions in replicating chromosomes cause double-strand breaks. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2001;98:8241- 8246.
89. La Muraglia GM, O'Hara PJ, Baker WH, et al. The reduction of the allogenic transfusion requirement in aortic surgery with a hemoglobin-based solution. *J Vasc Surg* 2000; 31:299-308.
90. Landesberg, G., M. H. Luria, et al. Importance of long-duration postoperative ST-segment depression in cardiac morbidity after vascular surgery. *Lancet*. 1993;341:715-9.
91. Lauerma, K., M. Saeed, et al. Verapamil reduces the size of reperfused ischemically injured myocardium in hypertrophied rat hearts as assessed by magnetic resonance imaging. *Am Heart J*. 1996;131:14-23.
92. Lee, R., K. Neya, et al. Limitations of the efficacy of hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J Appl Physiol*. 1995;79:236-42.
93. Leese, P. T., R. J. Noveck, et al. Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. I. Effects on coagulation function in healthy volunteers. *Anesth Analg*. 2000;91:804-11.
94. Lenz, G., H. Junger, et al. Hemodynamic effects after partial exchange transfusion with pyridoxylated polyhemoglobin in chimpanzees. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*. 1991;19:709-18.
95. Li, Y., Chopp, M., Jiang, N., Zaloga, C. In situ detection of DNA fragmentation after focal cerebral ischemia. *Mol Brain Res* 1995;28: 164-168.
96. Li, Y., Chopp, M., Powers, C., Jiang, N. Apoptosis and protein expression after focal cerebral ischemia in rat. *Brain Res* 1997;28:301-312.
97. Lieberthal, W., R. Fuhro, et al. O-raffinose cross-linking markedly reduces systemic and renal vasoconstrictor effects of unmodified human hemoglobin. *J Pharmacol Exp Ther*. 1999;288:1278-87.
98. Linberg, R., C. D. Conover, et al. Hemoglobin based oxygen carriers: how much methemoglobin is too much? *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol*. 1998;26:133-48.
99. Lipfert, B., T. Standl, et al. Histology and ultrastructure of liver and kidney following blood exchange with ultrapurified, polymerised bovine hemoglobin in comparison with hydroxyethyl starch. *Lab Invest*. 1999;79:573-82.
100. Lips, J. K., B. DNA double-strand breaks trigger apoptosis in p53-deficient fibroblasts. *Carcinogenesis*. 2001;22/4:579-585.
101. Liu, J. X., K. Tanonaka, et al. Beneficial effects of quinidine on post-ischemic contractile failure of isolated rat hearts. *J Mol Cell Cardiol*. 1993;25:1249-63.
102. Mangano, D. T., W. S. Browner, et al. Association of perioperative myocardial ischemia with cardiac morbidity and mortality in men undergoing noncardiac surgery. The Study of Perioperative Ischemia Research Group. *N Engl J Med*. 1990;323:1781-8.

103. Mangano, D. T., E. L. Layug, et al. Effect of atenolol on mortality and cardiovascular morbidity after noncardiac surgery. Multicenter Study of Perioperative Ischemia Research Group. *N Engl J Med.* 1996;335:1713-20.
104. Marnett, L. J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis.* 2000;31/3:361-370.
105. Marnett, L. J. P., J.P. Endogenous DNA damage and mutation. *Trends-Genet.* 2001;17/4:214-221.
106. Matsuda, N., K. Nakai, et al. The quality control of stroma-free hemoglobin: lysophosphatidylcholine, a component of stromal phospholipids, as candidate vasoconstrictive factor. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22:939-44.
107. Maxwell, R. A., J. B. Gibson, et al. Resuscitation of severe chest trauma with four different hemoglobin-based oxygen-carrying solutions. *J Trauma.* 2000;49:200-9; discussion 209-11.
108. Moss, G. S., R. DeWoskin, et al. Stroma-free hemoglobin. I. Preparation and observations on in vitro changes in coagulation. *Surgery.* 1973;74: 198-203.
109. Motterlini, R. and V. W. Macdonald. Cell-free hemoglobin potentiates acetylcholine-induced coronary vasoconstriction in rabbit hearts. *J Appl Physiol.* 1993;75:2224-33.
110. Naslund, U., S. Haggmark, et al. Quantification of myocardium at risk and detection of reperfusion by dynamic vectorcardiographic ST segment monitoring in a pig occlusion-reperfusion model. *Cardiovasc Res.* 1993;27:2170-8.
111. National Research Council, I. o. L. A. R., Commission on Life Sciences. *Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Washington, D.C.: National Academy Press; 1996.
112. Ning, J., P. J. Anderson, et al. Resuscitation of bled dogs with pyridoxalated-polymerized hemoglobin solution. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol.* 1992;20:525-30.
113. Nolte, D., A. Botzlar, et al. Effects of diaspirin-cross-linked hemoglobin (DCLHb) on the microcirculation of striated skin muscle in the hamster: a study on safety and toxicity. *J Lab Clin Med.* 1997;130:314-27.
114. Norbury, C. J., Hickson, I.D. Cellular responses to DNA damage. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 2001;41:367-401.
115. Nose, K. and H. Okamoto. Detection of carcinogen-induced DNA breaks by nick translation in permeable cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 1983;111:383-9.
116. Noveck, R. J., E. J. Shannon, et al. Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. II. Effects on immune function in healthy volunteers. *Anesth Analg.* 2000;91:812-22.
117. O'Donnell, K. A., M. G. Caty, et al. Oxygenated intraluminal perfluorocarbon protects intestinal mucosa from ischemia/reperfusion injury. *J Pediatr Surg.* 1997;32:361-5.

118. Ohno, M., G. Takemura, et al. "Apoptotic" myocytes in infarct area in rabbit hearts may be oncotic myocytes with DNA fragmentation: analysis by immunogold electron microscopy combined with In situ nick end-labeling. *Circulation*. 1998;98:1422-30.
119. Okamura, T., M. Toshiro, et al. Effect of caspase inhibitors on myocardial infarct size and myocyte DNA fragmentation in the ischemia-reperfused rat heart. *Cardiovascular Research*. 2000;45:642-650.
120. Oshita, A., K. Ohmori, et al. Myocardial blood flow measurements in rats with simple pulsing contrast echocardiography. *Ultrasound Med Biol*. 2002;28:459-66.
121. Padosch S.A., V. P., Böttinger B.W. Neuronale Apoptose nach zerebraler Ischämie. *Anaesthesist*. 2001;50:905-920.
122. Pankuweit, S. J., M.; Crombach, M.; Portig,I.; Alter,P.; Kruse,T.; Hufnagel,G.; Maisch,B. Cell death in inflammatory heart muscle diseases - apoptosis or necrosis ? *Herz*. 1999;24:211-218.
123. Pickelmann, S., D. Nolte, et al. Attenuation of postischemic reperfusion injury in striated skin muscle by diaspirin-cross-linked Hb. *Am J Physiol*. 1998;275:H361-8.
124. Poldermans, D., E. Boersma, et al. Bisoprolol reduces cardiac death and myocardial infarction in high-risk patients as long as 2 years after successful major vascular surgery. *Eur Heart J*. 2001;22:1353-8.
125. Premaratne, S., R. N. Harada, et al. Effects of perfluorocarbon exchange transfusion on reducing myocardial infarct size in a primate model of ischemia-reperfusion injury: a prospective, randomized study. *Surgery*. 1995;117:670-6.
126. Rabinovici, R., A. S. Rudolph, et al. Biological responses to liposome-encapsulated hemoglobin (LEH) are improved by a PAF antagonist. *Circ Shock*. 1990;31:431-45.
127. Reffelmann, T., S. L. Hale, et al. Relationship between no reflow and infarct size as influenced by the duration of ischemia and reperfusion. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;282:H766-72.
128. Reffelmann, T. and R. A. Kloner. Microvascular reperfusion injury: rapid expansion of anatomic no reflow during reperfusion in the rabbit. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2002;283:H1099-107.
129. Reffelmann, T. and R. A. Kloner. The "no-reflow" phenomenon: basic science and clinical correlates. *Heart*. 2002;87:162-8.
130. Renvoize, C. B., A.; Pallardy, M.; Breard, J. Apoptosis: identification of dying cells. *Cell Biol Toxicol*. 1998;12:111-120.
131. Rice, H. E., R. Virmani, et al. Dose-dependent reduction of myocardial infarct size with the perfluorochemical Fluosol-DA. *Am Heart J*. 1990;120:1039-46.
132. Richard, V., C. Tron, et al. Infarct size-limiting properties of Ro 40-5967, a novel nondihydropyridine calcium channel, in anesthetized rats: comparison with verapamil. *J Cardiovasc Pharmacol*. 1995;25:552-7.

133. Rigby, P. W., M. Dieckmann, et al. Labeling deoxyribonucleic acid to high specific activity in vitro by nick translation with DNA polymerase I. *J Mol Biol.* 1977;113:237-51.
134. Rohlf, R. J., E. Bruner, et al. Arterial blood pressure responses to cell-free hemoglobin solutions and the reaction with nitric oxide. *J Biol Chem.* 1998;273:12128-34.
135. Rolf, N., A. Meissner, et al. The effects of thoracic epidural anesthesia on functional recovery from myocardial stunning in propofol-anesthetized dogs. *Anesth Analg.* 1997;84:723-9.
136. Rolf, N., M. Van de Velde, et al. Thoracic epidural anesthesia improves functional recovery from myocardial stunning in conscious dogs [see comments]. *Anesth Analg.* 1996;83:935-40.
137. Rooney, M. W., L. J. Hirsch, et al. Hemodilution with oxyhemoglobin. Mechanism of oxygen delivery and its supraaugmentation with a nitric oxide donor (sodium nitroprusside). *Anesthesiology.* 1993;79:60-72.
138. Rossman, J. E., M. G. Caty, et al. Mucosal protection from intestinal ischemia-reperfusion reduces oxidant injury to the lung. *J Surg Res.* 1997;73:41-6.
139. Rumsey, W. L., B. Kuczynski, et al. SPECT imaging of ischemic myocardium using a technetium-99m-nitroimidazole ligand. *J Nucl Med.* 1995;36:1445-50.
140. Saetzler, R. K., K. E. Arfors, et al. Polynitroxylated hemoglobin-based oxygen carrier: inhibition of free radical-induced microcirculatory dysfunction. *Free Radic Biol Med.* 1999;27:1-6.
141. Saraste, A. and K. Pulkki. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiovasc Res.* 2000;45:528-37.
142. Savitsky, J. P., J. Doczi, et al. A clinical safety trial of stroma-free hemoglobin. *Clin Pharmacol Ther.* 1978;23:73-80.
143. Saxena, R., A. D. Wijnhoud, et al. Effect of d aspirin cross-linked hemoglobin on endothelin-1 and blood pressure in acute ischemic stroke in man. *J Hypertens.* 1998;16:1459-65.
144. Schneider, S., W. Chen, et al. Inhibition of p38 MAPK alpha/beta reduces ischemic injury and does not block protective effects of preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2001;280:H499-508.
145. Schultz, S. C., B. Grady, et al. A role for endothelin and nitric oxide in the pressor response to d aspirin cross-linked hemoglobin. *J Lab Clin Med.* 1993;122:301-8.
146. Schwarz, E. R., Y. Somoano, et al. What is the required reperfusion period for assessment of myocardial infarct size using triphenyltetrazolium chloride staining in the rat? *J Thromb Thrombolysis.* 2000;10:181-7.
147. Sellards, A. and G. Minot. Injection of Haemoglobin in man and its relation to blood destruction, with especial reference to the anaemias. *J Med Res.* 1916;34:469-494.

148. Selye, H., E. Bajusz, et al. Simple techniques for surgical occlusion of coronary vessels in the rat. *Angiology*. 1960;11:398-407.
149. Sharma, A. C. and A. Gulati. Yohimbine modulates diaspirin crosslinked hemoglobin-induced systemic hemodynamics and regional circulatory effects. *Crit Care Med*. 1995;23:874-84.
150. Sharov, V. G., H. N. Sabbah, et al. Evidence of cardiocyte apoptosis in myocardium of dogs with chronic heart failure. *Am J Pathol*. 1996;148:141-9.
151. Shen, Y. C., C. F. Chen, et al. Tetrandrine ameliorates ischaemia-reperfusion injury of rat myocardium through inhibition of neutrophil priming and activation. *Br J Pharmacol*. 1999;128:1593-601.
152. Sherman, I. A., J. A. Dlugosz, et al. Systemic hemodynamic and hepatic microvascular responses to a 33% blood volume exchange with whole blood, stroma-free hemoglobin, and oxypolyhemoglobin solutions. *Biomater Artif Cells Immobilization Biotechnol*. 1993;21:537-51.
153. Spahn, D. R. Blood substitutes Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit Care (Lond)*. 1999;3:R93-R97.
154. Spahn, D. R., R. van Bremp, et al. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. European Perflubron Emulsion Study Group [see comments]. *Anesthesiology*. 1999;91:1195-208.
155. Spahn, D. R., K. F. Waschke, et al. Use of perflubron emulsion to decrease allogeneic blood transfusion in high-blood-loss non-cardiac surgery: results of a European phase 3 study. *Anesthesiology*. 2002;97:1338-49.
156. Spence, R. P. L., S. N. Swisher, et al. Blood substitutes. *Clinical Practice of Transfusion Medicine*. In. 3 ed. New York: Churchill Livingstone; 1996:967-84.
157. Standl, T. Haemoglobin-based erythrocyte transfusion substitutes. *Expert Opin Biol Ther*. 2001;1:831-43.
158. Standl, T., M. A. Burmeister, et al. Bovine haemoglobin-based oxygen carrier for patients undergoing haemodilution before liver resection. *Br J Anaesth*. 1998;80:189-94.
159. Standl, T., M. Freitag, et al. Hemoglobin-based oxygen carrier HBOC-201 in comparison to banked blood red cells provides faster and higher increases of oxygen tensions in canine skeletal muscle tissues with anemia-related reduced oxygenation. *J Vasc Surgery*. 2003;37:859-65.
160. Standl, T., P. Horn, et al. Bovine haemoglobin is more potent than autologous red blood cells in restoring muscular tissue oxygenation after profound isovolaemic haemodilution in dogs [see comments]. *Can J Anaesth*. 1996;43:714-23.
161. Standl, T., Horn, E.-P., et al. Bovine hemoglobin restores myocardial tissue oxygen tension in dogs with acute critical coronary stenosis and extended hemodilution. *Anesthesiology* 1999;91(Suppl.):A697.
162. Standl, T., T. Krause, et al. Application of bovine hemoglobin HBOC-201 reduces the frequency of DNA strand breaks in a model of coronary ischemia in dogs. *Anesthesiology*. 2002;96:A609.

163. Standl, T., B. Lipfert, et al. [Acute effects of complete blood exchange with ultra-purified hemoglobin solution or hydroxyethyl starch on liver and kidney in the animal model]. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 1996;31:354-61.
164. Standl, T. G., W. Reeker, et al. Haemodynamic changes and skeletal muscle oxygen tension during complete blood exchange with ultrapurified polymerized bovine haemoglobin. *Intensive Care Med.* 1997;23:865-72.
165. Standl, T., S. Wilhelm, et al. Preoperative hemodilution with bovine hemoglobin. Acute hemodynamic effects in liver surgery patients. *Anaesthesist.* 1997;46:763-70.
166. Sterling, D. L., J. D. Thornton, et al. Hyperbaric oxygen limits infarct size in ischemic rabbit myocardium in vivo. *Circulation.* 1993;88:1931-6.
167. Strate, T., Mann, O., et al. Systemic intravenous infusion of bovine hemoglobin significantly reduces microcirculatory dysfunction in experimentally induced pancreatitis in the rat. *Ann Surg.* 2003;238(5):765-71.
168. Strate, T., O. Mann, et al. The potential of HBOC in acute pancreatitis. *Anesthesiol Intensivmed Notfallmed Schmerzther.* 2001;36 Suppl 2:S119-20.
169. Takashi, E. and M. Ashraf. Pathologic assessment of myocardial cell necrosis and apoptosis after ischemia and reperfusion with molecular and morphological markers. *J Mol Cell Cardiol.* 2000;32:209-24.
170. Takemura, G., M. Ohno, et al. [Ischemic heart disease and apoptosis]. *Rinsho Byori.* 1997;45:606-13.
171. Tounekti, O. K., A.; Foray, N.; Orłowski, S.; Mir, L.M. The ratio of single- to double-strand DNA breaks and their absolute values determine cell death pathway. *Br J Cancer.* 2001;84/9:1272-1279.
172. Tremper, K. K. Perfluorochemical "blood substitutes". *Anesthesiology.* 1999;91:1185-7.
173. Ueno, T., Y. Matsuura, et al. Efficacy of perfluorotributylamine/pluronic F-68 stem-emulsion (FC43se) against reperfusion injury in ischemic rabbit lungs. *Transplant Proc.* 1997;29:1349-53.
174. Van Furth, R. V. Z., T. L. Immunocytochemical detection of 5-bromo-2-deoxyuridine incorporation in individual cells. *J Immunol Methods.* 1988;108:45-51.
175. Vermes, I. H., C. Apoptosis and programmed cell death in health and disease. *Adv Clin Chem.* 1994;31:177-246.
176. Virmani, R., F. D. Kolodgie, et al. Myocardial protection by perfluorochemical infusion during transient ischemia produced by balloon coronary occlusion. *Am Heart J.* 1988;116:421-31.
177. Vivaldi, M. T., R. A. Kloner, et al. Triphenyltetrazolium staining of irreversible ischemic injury following coronary artery occlusion in rats. *Am J Pathol.* 1985;121:522-30.

178. Walker, M. J., M. J. Curtis, et al. The Lambeth Conventions: guidelines for the study of arrhythmias in ischaemia infarction, and reperfusion. *Cardiovasc Res.* 1988;22:447-55.
179. Wallace, A., B. Layug, et al. Prophylactic atenolol reduces postoperative myocardial ischemia. McSPI Research Group. *Anesthesiology.* 1998;88:7-17.
180. Walter, S. V. and T. M. Chang. Chronotropic effects of in vitro perfusion with albumin, stroma-free hemoglobin, and polyhemoglobin solutions. *Biomater Artif Cells Artif Organs.* 1990;18:283-98.
181. Waynforth, H. and P. Flecknell. *Experimental and surgical technique in the rat.* second Edition ed. London San Diego New York Boston Sydney Tokyo Toronto: Academic Press,; 1992.
182. Wyllie, A. H. Apoptosis (The 1992 Frank Rose memorial lecture). *Br J Cancer.* 1993;67:205-208.
183. Wyllie, A. H. Cell death. In *Apoptosis and Cell proliferation.* Boehringer Mannheim. 1998.
184. Xuan, Y. T., X. L. Tang, et al. Biphasic response of cardiac NO synthase isoforms to ischemic preconditioning in conscious rabbits. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2000;279:H2360-71.
185. Yabe, Y., N. Ishiguro, et al. A perfluorochemical prevents ischemia-reperfusion injury of muscle. *J Surg Res.* 1996;64:89-94.
186. Yamashita, N., S. Hoshida, et al. Monophosphoryl lipid A provides biphasic cardioprotection against ischaemia-reperfusion injury in rat hearts. *Br J Pharmacol.* 1999;128:412-8.
187. Yang, T. and K. W. Olsen. Enzymatic protection from autoxidation for crosslinked hemoglobins. *Artif Cells Blood Substit Immobil Biotechnol.* 1994;22:709-17.
188. Ye, J., L. Yang, et al. A new technique of coronary artery ligation: experimental myocardial infarction in rats in vivo with reduced mortality. *Mol Cell Biochem.* 1997;176:227-33.

8. Anhang

8.1. Abkürzungen

A.	Arteria
aO ₂ Sat	Arterielle Sauerstoffsättigung
ANOVA	Analysis of Variance
AP	Alkalische Phosphatase
BAGS	Behörde für Arbeit, Gesundheit und Soziales
BGA	Blutgasanalyse
bp	Basenpaare
Bq	Bequerel
BZ	Blutzuckerkonzentration
Ca ⁺⁺	Calcium (ionisiert)
CO ₂	Kohlendioxid
COHb	Carboxyhämoglobin
Da	Dalton
DCLHb	Diaspirin Cross-linked Hemoglobin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonucleinsäure (-acid)
DNA-DSB	DNA-Doppelstrangbrüche
DNA-ESB	DNA-Einzelstrangbrüche
DO ₂	Systemisches Sauerstoffangebot
2,3-DPG	2,3-Diphosphoglycerat
dTTP	Desoxy[methyl-3H]Thymidine 5'-Triphosphat
EDRF	Endothelium-Derived Relaxing Factor
EK	Erythrozytenkonzentrat
EKG	Elektrokardiogramm
E-Lyte	Elektrolyte
fHb	Freies, das heißt plasmatisch gelöstes Hämoglobin
FiO ₂	Fraktion des inspirierten Sauerstoffs
³ H	Tritium
Hb	Hämoglobin
HbO ₂	Oxyhämoglobin
HBOC	Hemoglobin Based Oxygen Carrier
HCl	Salzsäure
HES	Hydroxyethylstärke
HF	Herzfrequenz
Hkt	Hämatokrit
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HS	Hintergrundschwärzung
HWZ	Halbwertszeit
HZV	Herzzeitvolumen
IHD	Isovolämische Hämodilution
ISNT	In situ Nick-Translation
K ⁺	Kalium
KCl	Kaliumchlorid
KHK	Koronare Herzkrankheit
KOD	Kolloidosmotischer Druck

LAD	Left Anterior Descendend=Ramus interventricularis anterior (RIVA)
LV	Linker Ventrikel
MAP	Mittlerer Arterieller Druck
MetHb	Methämoglobin
MgCl	Magnesiumchlorid
MGW	Molekulargewicht
MPS	Makrozyten-Phagozyten-System
MW	Mittelwert
Na ⁺	Natrium
NaCl	Natriumchlorid
nCi	NanoCurie
NO	Stickstoffmonoxid
O ₂	Sauerstoff
O ₂ ct	Arterieller Sauerstoffgehalt
p	Alphafehler
P/Pa	Partialdruck
PAP	Pulmonalarterieller Mitteldruck
PetCO ₂	Partialdruck des endtidalen CO ₂
PBS	Phosphatyl buffered saline
PFC	Perfluorocarbone
P ₅₀	Halbsättigungspartialdruck des Hämoglobins
PTCA	Percutane Transluminäre Coronarangioplastie
PVR	Pulmonal Vaskulärer Widerstand
RV	Rechter Ventrikel
RW	Referenzwert
SaO ₂	Arterielle Sauerstoffsättigung
SBc	Standard Bicarbonat
SBE	Standard Basenüberschuss
SD	Standardabweichung
SPECT	Single-Photon-Emissions-Computertomographie
SVR	Systemischer Vaskulärer Widerstand
TdT	Terminale Desoxynukleotidyl-Transferase
Temp	Temperatur
tHb	Gesamthämoglobin
tPO ₂	Gewebesauerstoffpartialdruck
TTC	Triphenyl-Tetrazolium-Chlorid
TUNEL	TdT-mediated dUTP Nick End Labeling
VF	Ventrikuläres Flimmern
ZVD	Zentralvenöser Druck
ZVK	Zentralvenöser Katheter

8.2. Übersicht der laborchemischen Parameter

Gemessene Parameter:

pH

PaCO₂

PaO₂

O₂ct

K⁺

Na⁺

ionisiertes Ca⁺⁺

SaO₂

tHb

OxyHb

MetHb

COHb

fHb

BZ

Berechnete Parameter:

SBc

SBE

8.3. Tabellen

8.3.1. Gewicht

Tabelle 8.1 Darstellung des Körpergewichtes der Versuchstiere (MW±SD)

	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
<i>Gewicht (g)</i>	364 ±51	367 ±72	350 ±38	340 ±32

8.3.2. Hämodynamik

Tabelle 8.2 Darstellung des arteriellen Mitteldruckes (MW±SD) über die Zeit
*p<0.01 vs Negativ-Kontrolle

<i>MAP (mmHg)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +10 min	97 ±25	108 ±15	108 ±26	107 ±18
Ruhephase +20 min	98 ±30	94 ±22	99 ±32	110 ±14
Ruhephase +30 min	86 ±26	103 ±21	104 ±28	101 ±20
Applikation Prophylaxe	82 ±25	101 ±21	97 ±30	108 ±23
Applikation P.+10 min	92 ±28	111 ±22	92 ±27	140 ±18*
Applikation P.+20 min	92 ±33	104 ±26	104 ±25	134 ±17*
Ligatur +5 min	88 ±39	90 ±26	84 ±49	98 ±38
Applikation Therapie	90 ±39	94 ±31	106 ±36	107 ±27
Ligatur +25min	87 ±42	88 ±36	88 ±38	115 ±26
Reperfusion +10 min	85 ±38	82 ±35	99 ±36	104 ±38
Reperfusion +20 min	94 ±43	87 ±37	105 ±30	107 ±37
Reperfusion +30 min	92 ±53	77 ±39	105 ±28	103 ±38
Reperfusion +40 min	92 ±47	70 ±34	106 ±23	102 ±46
Reperfusion +50 min	93 ±44	75 ±37	97 ±30	97 ±46
Reperfusion +60 min	84 ±43	71 ±33	98 ±31	90 ±43
Reperfusion +70 min	86 ±44	72 ±37	94 ±24	94 ±48
Reperfusion +80 min	82 ±40	73 ±36	90 ±31	97 ±40
Reperfusion +90 min	91 ±36	72 ±34	90 ±34	87 ±44
Reperfusion +100 min	83 ±39	75 ±35	97 ±25	89 ±42
Reperfusion +110 min	82 ±30	71 ±35	97 ±26	86 ±44
Reperfusion +120 min	82 ±28	72 ±38	98 ±34	80 ±37

Tabelle 8.3 Darstellung des zentralvenösen Druckes (MW±SD) über die Zeit

<i>ZVD (mmHg)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	8 ±6	4 ±3	7 ±3	5 ±2
Applikation Prophylaxe	8 ±6	5 ±2	6 ±3	6 ±1
Ligatur +5 min	8 ±6	5 ±2	7 ±3	6 ±1
Ligatur +25min	7 ±6	6 ±2	8 ±4	6 ±3
Reperfusion +10 min	7 ±5	5 ±2	8 ±4	6 ±3
Reperfusion +110 min	8 ±6	5 ±1	7 ±3	6 ±2

Tabelle 8.4 Darstellung der Herzfrequenz (MW(SD)) über die Zeit

HF (1 min ⁻¹)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +10 min	393 ±17	403 ±15	401 ±17	394 ±39
Ruhephase +20 min	402 ±13	398 ±26	391 ±22	396 ±44
Ruhephase +30 min	395 ±14	401 ±23	397 ±20	385 ±45
Applikation Prophylaxe	396 ±14	398 ±22	399 ±19	388 ±46
Applikation P.+10 min	404 ±12	404 ±23	378 ±37	391 ±30
Applikation P.+20 min	397 ±17	411 ±20	397 ±13	396 ±37
Ligatur +5 min	403 ±10	414 ±13	368 ±75	385 ±40
Applikation Therapie	401 ±14	413 ±20	386 ±32	399 ±26
Ligatur +25min	394 ±19	420 ±13	391 ±27	404 ±12
Reperfusion +10 min	389 ±20	404 ±46	391 ±41	410 ±13
Reperfusion +20 min	366 ±77	413 ±18	401 ±25	399 ±26
Reperfusion +30 min	389 ±39	404 ±22	391 ±23	408 ±13
Reperfusion +40 min	393 ±34	405 ±40	397 ±30	399 ±16
Reperfusion +50 min	394 ±32	412 ±24	396 ±28	384 ±44
Reperfusion +60 min	394 ±23	413 ±28	400 ±23	386 ±27
Reperfusion +70 min	398 ±42	408 ±23	393 ±42	384 ±44
Reperfusion +80 min	381 ±91	406 ±30	396 ±31	394 ±18
Reperfusion +90 min	399 ±44	406 ±24	398 ±17	396 ±17
Reperfusion +100 min	369 ±98	399 ±38	398 ±19	395 ±28
Reperfusion +110 min	398 ±29	390 ±43	392 ±17	399 ±13
Reperfusion +120 min	403 ±15	391 ±43	375 ±41	401 ±14

8.3.3. Temperatur

Tabelle 8.5 Darstellung der rektalen Temperatur (MW±SD) über die Zeit
*p<0.05 vs Negativ-Kontrolle

Temperatur (°C)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +10 min	36,8 ±0,7	37,1 ±0,4	37,2 ±0,5	36,9 ±0,4
Ruhephase +20 min	36,8 ±0,7	37,0 ±0,4	37,2 ±0,6	36,9 ±0,3
Ruhephase +30 min	36,9 ±0,7	37,0 ±0,4	37,4 ±0,6	36,9 ±0,2
Applikation Prophylaxe	37,0 ±0,6	37,0 ±0,4	37,3 ±0,6	36,9 ±0,3
Applikation P.+10 min	37,3 ±0,4	36,9 ±0,3	37,3 ±0,6	37,2 ±0,4
Applikation P.+20 min	37,5 ±0,4	37,2 ±0,3	37,5 ±0,4	37,5 ±0,4
Ligatur +5 min	37,5 ±0,5	37,4 ±0,4	37,4 ±0,3	37,6 ±0,5
Applikation Therapie	37,4 ±0,3	37,4 ±0,5	37,3 ±0,3	37,5 ±0,5
Ligatur +25min	37,1 ±0,4	37,2 ±0,4	37,3 ±0,4	37,3 ±0,5
Reperfusion +10 min	36,9 ±0,5	37,2 ±0,5	37,4 ±0,4*	37,0 ±0,3
Reperfusion +20 min	36,7 ±0,4	37,0 ±0,4	37,5 ±0,6*	36,9 ±0,5
Reperfusion +30 min	36,7 ±0,4	37,0 ±0,3	37,4 ±0,5*	37,2 ±0,3
Reperfusion +40 min	36,9 ±0,4	37,0 ±0,5	37,2 ±0,4	37,4 ±0,6
Reperfusion +50 min	37,3 ±0,5	37,2 ±0,4	37,1 ±0,4	37,5 ±0,5
Reperfusion +60 min	37,5 ±0,2	37,4 ±0,3	37,3 ±0,4	37,5 ±0,6
Reperfusion +70 min	37,6 ±0,3	37,6 ±0,3	37,4 ±0,3	37,6 ±0,7
Reperfusion +80 min	37,5 ±0,5	37,6 ±0,5	37,8 ±0,3	37,3 ±0,5
Reperfusion +90 min	37,2 ±0,7	37,6 ±0,7	37,8 ±0,3	37,2 ±0,5
Reperfusion +100 min	37,1 ±0,7	37,3 ±0,6	37,5 ±0,5	37,3 ±0,4
Reperfusion +110 min	37,4 ±0,5	37,0 ±0,4	37,2 ±0,4	37,2 ±0,4
Reperfusion +120 min	36,7 ±0,5	36,7 ±0,3	37,0 ±0,3	37,1 ±0,6

8.3.4. Inspiratorische Sauerstoff-Konzentration und Blutgasanalysen

Tabelle 8.6 Darstellung der FiO_2 (MW \pm SD) über die Zeit

FiO_2	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +10 min	0,43 \pm 0,16	0,38 \pm 0,05	0,42 \pm 0,18	0,40 \pm 0,16
Ruhephase +20 min	0,37 \pm 0,04	0,34 \pm 0,04	0,41 \pm 0,18	0,37 \pm 0,09
Ruhephase +30 min	0,37 \pm 0,04	0,36 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,35 \pm 0,03
Applikation Prophylaxe	0,37 \pm 0,04	0,35 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02
Applikation P.+10 min	0,35 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01
Applikation P.+20 min	0,35 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01
Ligatur +5 min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01
Applikation Therapie	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01
Ligatur +25min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02
Reperfusion +10 min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01
Reperfusion +20 min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01
Reperfusion +30 min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,01
Reperfusion +40 min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,33 \pm 0,01
Reperfusion +50 min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02
Reperfusion +60 min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02
Reperfusion +70 min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,35 \pm 0,02	0,33 \pm 0,02
Reperfusion +80 min	0,33 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,42 \pm 0,31	0,34 \pm 0,02
Reperfusion +90 min	0,33 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,41 \pm 0,20	0,34 \pm 0,02
Reperfusion +100 min	0,33 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,03	0,34 \pm 0,01
Reperfusion +110 min	0,33 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,03	0,33 \pm 0,01
Reperfusion +120 min	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,02	0,34 \pm 0,03	0,33 \pm 0,01

Tabelle 8.7 Darstellung des PaO_2 (MW \pm SD) über die Zeit

PaO_2 (mmHg)	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	107,3 \pm 19,3	107,7 \pm 22,0	114,8 \pm 29,6	100,1 \pm 16,2
Applikation Prophylaxe	104,5 \pm 18,6	103,9 \pm 23,0	114,0 \pm 25,1	104,2 \pm 12,9
Ligatur +5 min	101,4 \pm 16,8	102,6 \pm 27,1	98,9 \pm 43,0	107,2 \pm 14,2
Ligatur +25min	102,4 \pm 19,9	97,2 \pm 27,9	108,8 \pm 34,9	104,6 \pm 13,8
Reperfusion +10 min	104,9 \pm 15,5	101,1 \pm 27,3	107,8 \pm 20,5	101,7 \pm 15,0
Reperfusion +110 min	108,6 \pm 19,6	102,9 \pm 33,1	107,9 \pm 17,2	99,2 \pm 14,4

Tabelle 8.8 Darstellung des arteriellen Sauerstoffgehaltes (MW \pm SD) über die Zeit

O_{2ct} (ml dl^{-1})	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	17,1 \pm 2,0	16,6 \pm 2,7	17,2 \pm 1,8	16,2 \pm 1,2
Applikation Prophylaxe	15,8 \pm 0,6	15,5 \pm 3,5	16,2 \pm 2,1	15,2 \pm 1,1
Ligatur +5 min	15,1 \pm 1,3	16,2 \pm 2,8	16,5 \pm 1,6	16,1 \pm 1,5
Ligatur +25min	15,1 \pm 2,3	13,6 \pm 6,5	14,6 \pm 2,6	15,6 \pm 1,8
Reperfusion +10 min	15,6 \pm 3,0	15,8 \pm 2,0	15,9 \pm 2,4	15,4 \pm 1,4
Reperfusion +110 min	15,9 \pm 2,5	15,9 \pm 3,0	15,8 \pm 2,3	16,1 \pm 3,3

Tabelle 8.9 Darstellung der arteriellen O₂-Sättigung (MW±SD) über die Zeit

<i>aO₂Sat (%)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	97,6 ±0,9	97,0 ±2,3	97,5 ±1,7	97,3 ±1,5
Applikation Prophylaxe	97,4 ±1,0	97,1 ±1,8	97,8 ±1,1	97,7 ±0,7
Ligatur +5 min	97,0 ±1,5	96,2 ±3,2	97,6 ±1,1	97,6 ±1,0
Ligatur +25min	97,2 ±1,7	96,6 ±3,6	94,3 ±10,7	97,7 ±2,5
Reperfusion +10 min	97,5 ±1,2	96,2 ±2,8	97,3 ±1,3	97,5 ±1,0
Reperfusion +110 min	97,4 ±1,3	96,5 ±2,4	97,5 ±1,2	96,8 ±1,1

Tabelle 8.10 Darstellung des arteriellen pCO₂ (MW(SD)) über die Zeit

<i>PaCO₂ (mmHg)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	33,6 ±5,4	38,0 ±4,3	36,2 ±8,5	33,5 ±4,4
Applikation Prophylaxe	33,1 ±5,5	37,0 ±6,3	35,1 ±4,7	33,0 ±5,4
Ligatur +5 min	35,8 ±4,5	39,5 ±6,7	35,7 ±4,3	32,9 ±4,7
Ligatur +25min	34,2 ±4,0	38,3 ±4,9	38,4 ±7,8	32,6 ±1,9
Reperfusion +10 min	33,1 ±4,3	36,8 ±5,0	37,3 ±3,1	32,4 ±2,5
Reperfusion +110 min	36,3 ±2,4	35,2 ±5,0	35,6 ±4,8	34,4 ±6,1

8.3.5. Hämoglobin-Messungen

Tabelle 8.11 Darstellung der Gesamt-Hb-Konzentration (MW±SD) über die Zeit

<i>tHb (g dl⁻¹)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	13,0 ±1,0	12,5 ±1,6	13,3 ±1,1	12,3 ±0,5
Applikation Prophylaxe	12,5 ±0,6	11,8 ±2,3	12,7 ±1,3	12,0 ±0,8
Ligatur +5 min	12,0 ±0,7	12,8 ±1,8	12,8 ±0,8	12,1 ±1,2
Ligatur +25min	11,7 ±1,4	13,2 ±2,6	12,1 ±1,3	11,8 ±1,8
Reperfusion +10 min	11,9 ±1,9	12,2 ±1,4	12,3 ±1,4	12,1 ±1,0
Reperfusion +110 min	12,3 ±1,9	12,6 ±2,0	12,1 ±1,3	12,4 ±1,9

Tabelle 8.12 Darstellung der Konzentration des HbO₂ (MW±SD) über die Zeit

<i>HbO₂ (%)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	93,9 ±3,0	92,7 ±3,5	93,1 ±3,4	93,2 ±2,6
Applikation Prophylaxe	93,6 ±2,5	93,3 ±4,3	94,1 ±3,5	92,0 ±2,7
Ligatur +5 min	92,1 ±7,3	90,6 ±7,1	93,5 ±3,6	92,8 ±3,5
Ligatur +25min	92,8 ±4,3	91,5 ±7,9	93,1 ±5,7	91,9 ±3,2
Reperfusion +10 min	93,6 ±3,3	91,1 ±6,5	93,1 ±3,1	92,8 ±3,3
Reperfusion +110 min	93,1 ±3,5	91,1 ±5,8	93,1 ±3,0	92,5 ±3,7

Tabelle 8.13 Darstellung der Konzentration an plasmatisch gelöstem Hb (MW(SD)) über die Zeit. *p<0.001 vs Positiv-Kontrolle.

<i>tHb(g dl⁻¹)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	0,08 ±0,10	0,04 ±0,05	0,02 ±0,04	0,06 ±0,07
Applikation Prophylaxe	0,06 ±0,05	0,04 ±0,03	0,07 ±0,09	1,05 ±0,14*
Ligatur +5 min	0,04 ±0,05	0,08 ±0,05	0,04 ±0,05	0,81 ±0,21*
Ligatur +25min	0,04 ±0,05	0,06 ±0,05	0,95 ±0,20*	0,82 ±0,08*
Reperfusion +10 min	0,03 ±0,05	0,04 ±0,05	0,93 ±0,13*	0,70 ±0,22*
Reperfusion +110 min	0,00 ±0,00	0,15 ±0,17	0,70 ±0,08*	0,47 ±0,27*

Tabelle 8.14 Darstellung der Konzentration an MetHb (MW±SD) über die Zeit

<i>MetHb (% des tHb)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	0,00 ±0,00	0,05 ±0,11	0,00 ±0,00	0,04 ±0,14
Applikation Prophylaxe	0,02 ±0,07	0,10 ±0,16	0,01 ±0,05	0,03 ±0,12
Ligatur +5 min	0,03 ±0,07	0,09 ±0,20	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
Ligatur +25min	0,03 ±0,07	0,01 ±0,03	0,00 ±0,00	0,00 ±0,00
Reperfusion +10 min	0,06 ±0,17	0,03 ±0,09	0,03 ±0,07	0,00 ±0,00
Reperfusion +110 min	0,00 ±0,00	0,11 ±0,19	0,00 ±0,00	0,03 ±0,08

8.3.6. Säure-Basen-Haushalt

Tabelle 8.15 Darstellung des arteriellen pH (MW(SD)) über die Zeit

<i>pH</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	7,37 ±0,06	7,36 ±0,05	7,38 ±0,07	7,41 ±0,03
Applikation Prophylaxe	7,39 ±0,04	7,37 ±0,05	7,38 ±0,03	7,40 ±0,03
Ligatur +5 min	7,36 ±0,04	7,34 ±0,07	7,36 ±0,04	7,39 ±0,04
Ligatur +25min	7,38 ±0,04	7,33 ±0,06	7,36 ±0,08	7,39 ±0,04
Reperfusion +10 min	7,38 ±0,04	7,32 ±0,06	7,35 ±0,02	7,36 ±0,09
Reperfusion +110 min	7,32 ±0,07	7,36 ±0,05	7,35 ±0,04	7,33 ±0,07

Tabelle 8.16 Darstellung des Standard Bicarbonats SBc (MW(SD)) über die Zeit

<i>SBc (mmol l⁻¹)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	20,51 ±3,27	21,23 ±1,75	21,88 ±2,66	21,99 ±2,34
Applikation Prophylaxe	20,83 ±1,67	21,19 ±1,40	21,11 ±0,77	21,65 ±1,83
Ligatur +5 min	20,78 ±2,61	20,95 ±3,21	20,86 ±1,72	21,10 ±1,36
Ligatur +25min	21,26 ±2,58	19,95 ±2,13	21,54 ±2,72	21,14 ±1,67
Reperfusion +10 min	20,08 ±2,47	19,46 ±2,70	20,68 ±1,20	21,03 ±0,63
Reperfusion +110 min	19,40 ±3,45	20,44 ±3,10	20,27 ±2,11	19,00 ±3,89

Tabelle 8.17 Darstellung des Standard Base Excess (MW±SD) über die Zeit

<i>SBE (mmol l⁻¹)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	-5,2 ±4,2	-3,9 ±2,0	-3,4 ±3,5	-3,4 ±3,1
Applikation Prophylaxe	-4,8 ±2,3	-4,0 ±1,8	-4,3 ±1,2	-3,8 ±2,5
Ligatur +5 min	-4,3 ±4,0	-4,2 ±4,0	-4,6 ±2,4	-4,6 ±1,8
Ligatur +25min	-4,2 ±3,2	-5,4 ±2,4	-3,5 ±2,9	-3,0 ±4,1
Reperfusion +10 min	-5,7 ±3,1	-6,1 ±3,6	-4,7 ±1,6	-4,6 ±0,9
Reperfusion +110 min	-6,3 ±4,5	-5,2 ±3,9	-5,3 ±2,8	-7,1 ±5,5

8.3.7. Blutzucker

Tabelle 8.18 Darstellung der Blutzucker-Konzentration (MW(SD)) über die Zeit

<i>BZ (mg dl⁻¹)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	119,5 ±39,3	131,0 ±18,7	125,3 ±28,7	124,4 ±15,1
Applikation Prophylaxe	112,6 ±45,2	130,5 ±18,9	128,4 ±29,4	120,1 ±11,1
Ligatur +5 min	128,8 ±31,5	142,6 ±42,0	125,8 ±31,2	124,3 ±22,5
Ligatur +25min	125,7 ±23,9	133,4 ±22,4	120,7 ±36,2	127,0 ±30,9
Reperfusion +10 min	103,4 ±36,8	136,4 ±28,0	116,4 ±31,1	111,0 ±7,4
Reperfusion +110 min	119,0 ±29,4	86,6 ±33,5	121,3 ±27,0	102,9 ±27,3

8.3.8. Elektrolyte

Tabelle 8.19 Darstellung der Natrium-Konzentration (MW(SD)) über die Zeit

<i>Na⁺ (mmol l⁻¹)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	141,8 ±3,4	141,6 ±2,5	142,1 ±2,4	143,1 ±2,4
Applikation Prophylaxe	143,3 ±2,5	138,6 ±8,1	143,1 ±2,2	142,5 ±1,3
Ligatur +5 min	144,1 ±2,9	141,5 ±2,3	142,3 ±2,7	141,0 ±1,8
Ligatur +25min	144,8 ±3,6	124,2 ±4,1	142,8 ±3,0	142,2 ±1,2
Reperfusion +10 min	144,6 ±4,2	142,2 ±5,7	142,5 ±2,1	142,8 ±1,8
Reperfusion +110 min	145,0 ±3,7	144,1 ±6,2	145,5 ±3,2	147,0 ±2,0

Tabelle 8.20 Darstellung der Kalium-Konzentration (MW±SD) über die Zeit

<i>K⁺ (mmol l⁻¹)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	4,8 ±0,8	5,3 ±0,7	4,5 ±0,6	4,6 ±0,5
Applikation Prophylaxe	4,7 ±1,4	5,4 ±1,0	4,0 ±0,5	4,3 ±0,5
Ligatur +5 min	4,8 ±0,9	5,5 ±0,6	4,4 ±0,5	5,1 ±0,6
Ligatur +25min	4,5 ±1,0	5,2 ±0,9	4,5 ±0,9	4,8 ±0,6
Reperfusion +10 min	4,7 ±1,0	5,4 ±0,8	4,7 ±0,7	5,0 ±0,8
Reperfusion +110 min	5,5 ±1,8	6,9 ±1,7	4,7 ±0,4	6,3 ±1,5

Tabelle 8.21 Darstellung der Konzentration des ionisierten Calciums (MW±SD) über die Zeit

<i>Ca⁺⁺ (mmol l⁻¹)</i>	Negativ-Kontrolle	Positiv-Kontrolle	Therapie	Prophylaxe
Ruhephase +30 min	1,07 ±0,15	1,18 ±0,11	1,13 ±0,14	1,12 ±0,12
Applikation Prophylaxe	1,09 ±0,10	1,15 ±0,11	1,12 ±0,12	1,10 ±0,13
Ligatur +5 min	1,11 ±0,07	1,20 ±0,24	1,15 ±0,12	1,12 ±0,09
Ligatur +25min	1,09 ±0,16	1,27 ±0,13	1,18 ±0,09	1,12 ±0,04
Reperfusion +10 min	1,13 ±0,12	1,16 ±0,09	1,14 ±0,06	1,14 ±0,05
Reperfusion +110 min	1,22 ±0,11	1,05 ±0,11	1,21 ±0,15	1,19 ±0,12

9. Danksagungen

Zunächst möchte ich Herrn Prof. Dr. Dr. h.c. Jochen Schulte am Esch für die Möglichkeit danken, meine Dissertation in der unter seinem Direktorat stehenden Klinik unter hervorragenden wissenschaftlichen Bedingungen erarbeiten und schreiben zu können.

Mein außerordentlicher Dank gilt meinem Doktorvater, Herrn Prof. Dr. Thomas Standl, der mich nicht nur im Rahmen dieser Dissertation intensiv gefördert hat. Die Arbeit in der von ihm geleiteten Forschungsgruppe stellt eine wertvolle Bereicherung für mich dar.

Zu größtem Dank bin ich Herrn PD Dr. Marc-Alexander Burmeister für seine überaus engagierte Unterstützung verpflichtet. Vom ersten Tag meiner Arbeit an war er mir ein immer erreichbarer, geduldiger und unverzichtbarer Ratgeber.

Eine unendliche Hilfe in jeder erdenklichen Situation war Herr Dr. Christian Rempf, dem ich für die sehr enge Mitarbeit im experimentellen Labor und auch im Anschluss daran recht herzlich danken möchte. Einen wesentlichen Anteil an dieser Arbeit hatten durch ihre unerlässliche Unterstützung bei den histochemischen Nachweismethoden Herr Dr. Ralph Winter und Frau Dr. Simone Tuszynski.

Aufgrund der sehr netten und erfolgreichen Zusammenarbeit während der Tierversuche gebührt mein Dank Frau Susanne Bartsch-Zwemke.

Für die überaus freundliche Aufnahme sowie die stets unkomplizierte, rücksichtsvolle und erfolgreiche Kooperation möchte ich mich bei der leitenden MTA Frau Weber und ihren Kolleginnen Frau Schuppart und Frau Lüchow sowie Frau Roth aus dem Kinderforschungslabor bedanken.

Meiner Freundin Janina möchte ich für ihr Verständnis und ihre Rücksichtnahme danken. Mit ihrer einmaligen Art und Weise, mich sowohl zu motivieren als auch für den wichtigen Ausgleich zu sorgen, trägt sie maßgeblich zu meinem Erfolg bei.

Alle diese zahlreichen Hilfen wären vermutlich vergeblich gewesen ohne die tagtägliche bedingungslose Unterstützung meiner Familie, insbesondere meiner Eltern sowie meiner Brüder Benjamin und Marcel-Dominic, deren unschätzbare Wert für Außenstehende nicht ermessbar ist. Da meinen Eltern sicherlich der größte Dank gebührt, ist ihnen meine Dissertation gewidmet.

10. Lebenslauf

Name : Sebastian Rehberg

Anschrift : Altenfeldsdeich 14a, 25489 Haseldorf

Geburtsdatum /-ort : 26. Februar 1978, in Hamburg / Harburg

Familienstand : ledig

Eltern : Dagmar Rehberg, geb. Laufmann, Hausfrau
Klaus Rehberg, Fruchtkaufmann (Prokurist)

Geschwister : zwei Brüder (17 und 25 Jahre)

Schulbildung : 1983 – 1984 Besuch der Vorschule in Haselau
1984 – 1988 Besuch der Grundschule in Haseldorf
1988 – 1997 Besuch des Ludwig-Meyn Gymnasiums
Uetersen

Schulabschluss : Fachhochschulreife 1996
Allgemeine Hochschulreife 1997

Wehrdienst : November 1997 - August 1998 im
1./Sanitätsregiment 6

Studium : seit Oktober 1998 an der Universität Hamburg
Ärztliche Vorprüfung im September 2000
1. Staatsexamen im August 2001
2. Staatsexamen im August / September 2003

11. EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG

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

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