

Aus der Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin,
Universitätsklinikum des Saarlandes, Homburg/Saar

**Wiederherstellung von Sauerstoffverfügbarkeit und
hepatozellulärem Energiestoffwechsel durch Perfluorocarbone
- eine tierexperimentelle Studie im hämorrhagischen Schock**

Dissertation zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der UNIVERSITÄT DES SAARLANDES
2013

vorgelegt von: Katrin Geckeis
geb. am: 01.12.1976 in Heidelberg

Inhaltsverzeichnis

1. Zusammenfassung

- 1.1 Deutsche Version 3
- 1.2 Summary – Restoration of oxygen availability and hepatic energy metabolism by perfluorocarbons – an animal study in prolonged hemorrhagic shock 5

2. Einleitung

- 2.1 Klinische Bedeutung 7
- 2.2 Hämorrhagischer Schock 8
- 2.3 Ischämie und Reperfusion 11
- 2.4 Leberanatomie und Leberhistologie 12
- 2.5 Glutamin-Synthetase 1 16
- 2.6 Künstliche Sauerstoffträger – Hämoglobinlösung versus Perfluorocarbone 19

3. Material und Methoden

- 3.1 Chemikalien 24
- 3.2 Operative Vorbereitung 24
- 3.3 Versuchsablauf 25
- 3.4 Bestimmung des hepatischen ATP-Gehaltes
 - 3.4.1 ELISA 27
 - 3.4.2 Biolumineszenz 27
- 3.5 Bestimmung der Glutamin-Synthetase 1- Expression mittels Western Blot 28
- 3.6 Immunhistochemische Bestimmung der Glutamin-Synthetase 1 29
- 3.7 ATP-Bestimmung im Leberhomogenat 30
- 3.8 Bestimmung der Leberenzyme 31
- 3.9 Statistische Auswertung 34

4. Ergebnisse

- 4.1 Allgemeine Grundlagen 35
- 4.2 Hämodynamische Parameter 35
 - 4.2.1 Mittlerer arterieller Druck 35
 - 4.2.2 Herzzeitvolumen 37

4.3 Hämatokrit, Blutgase, Basendefizit und pH-Wert	39
4.3.1 Hämatokrit	39
4.3.2 Arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO ₂)	41
4.3.3 Arterieller Kohlendioxidpartialdruck (pCO ₂)	42
4.3.4 Basendefizit	43
4.3.5 pH-Wert	44
4.4 Wirkung der Reperfusion auf den hepatozellulären ATP-Gehalt nach hämorrhagischen Schock	46
4.4.1 Enzymatische Bestimmung des ATP-Gehaltes im Leberhomogenat	46
4.4.2 Bestimmung des ATP-Gehaltes mittels Biolumineszenz-Methode	47
4.5 Genexpression der Glutamin-Synthetase-1 nach unterschiedlicher Reperfusion	50
4.5.1 Expression der Glutamin-Synthetase 1 (GluS-1) im Leberhomogenat	50
4.5.2 Immunhistochemischer Nachweis der Leberhypoxie durch Bestimmung der Glutamin-Synthetase-1 in Lebersemidünnschnitten	52
4.6 Hepatozellulärer Schaden nach hämorrhagischen Schock und Reperfusion	54
5. Diskussion	
5.1 Organdysfunktion und Management des hämorrhagischen Schocks	58
5.2 Probleme der Erythrozytenkonzentrate	59
5.3 Alternativen zur Erythrozytenkonzentraten	61
5.4 Makrohämodynamik und Blutgase	64
5.5 Effekte der Perflubron-Emulsion auf den Energiemetabolismus der Leber	65
5.6 Beurteilung des Leberschadens	67
6. Literaturverzeichnis	70

1. Zusammenfassung

1.1 Zusammenfassung

Das Trauma mit konsekutivem hämorrhagischen Schock stellt die Haupttodesursachen von Patienten zwischen 5 und 44 Jahren in den westlichen Ländern dar (71).

In der Therapie des hämorrhagischen Schocks steht die Identifikation und Kontrolle der Blutungsquelle an erster Stelle. Zudem spielt die Aufrechterhaltung der Gewebepfusion durch Flüssigkeitssubstitution sowie die Therapie der Gerinnungsstörung eine zentrale Rolle (147).

In klinischen Studien wird die Bedeutung von gelagertem Fremdblut zur Erhaltung der Sauerstoffversorgung von Organen und Geweben kritisch bewertet (89;137). Daher wird nach alternativen Blutersatzstoffen gesucht. Aktuell unterscheidet man hämoglobin-basierte Sauerstoffträger von rein synthetisch hergestellten Kohlenwasserstoffen, den Perfluorocarbonen.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Perfluorocarbone (Perflubron) im Vergleich zur Standardtherapie nach hämorrhagischem Schock zu einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung in der Leber führt.

Hiefür wurden männliche Sprague Dawley Ratten (200-300g KG, n= 8/Gruppe) einer 120-minütigen Schockphase (MAP 30-40mmHg) gefolgt von einer vierstündigen Therapie unterzogen. Die Therapie erfolgte mit unterschiedlichen Infusionsregimes. Gruppe I erhielt 21 Tage gelagertes Fremdblut. Die Gruppe II wurde mit Hydroxyethylstärke 6% (HAES) therapiert während die Gruppen III und IV Hydroxyethylstärke und Perflubron in unterschiedlicher Dosierung erhielten (Gruppe III Haes +2,7 g/kg PFB, die Gruppe IV Haes +5,4 g/kg PFB).

Die Stressantwort der Leber wurde hinsichtlich der Leberenzyme, des ATP-Gehaltes und der Genexpression eines durch Hypoxie induzierten Genes (Glutamin-Synthetase 1) untersucht.

In Gruppe I und II, der mit gelagertem Fremdblut und Hydroxyethylstärke, reperfundierten Tiere konnte im Vergleich zu der Kontrollgruppe nach der Therapie keine Wiederherstellung des ursprünglichen ATP-Gehaltes oder eine Veränderung

hinsichtlich der sauerstoff-abhängigen Glutamin-Synthetase 1 Expression verzeichnet werden.

Nach der Reperfusion mit Perflubron ließen sich im Vergleich zur Kontrollgruppe bei einer Dosis von 2,7g PFE/KG ein gleichwertiger ATP-Gehalt und eine Abnahme der Glutamin-Synthetase-1 Expression verzeichnen. Die Therapie mit einer Dosis von 5,4 g PFE/KG führte noch zu einer Zunahme des ATP-Gehaltes in der Leber, welches sogar die Kontrollgruppe übertraf. Auch die Expression hypoxieabhängiger Gene nahm ab.

In Kombination mit einer hohen inspiratorischen Sauerstoff-Konzentration ist Perflubron durch eine erhöhte Sauerstoff-Transportfähigkeit in der Lage, Mikrogefäße zu rekrutieren und somit den Fluss in den Gefäßen wiederherzustellen. Jedoch führt die verbesserte Sauerstoff-Versorgung nicht zu einer Reduktion des frühen hepatozellulären Schadens.

1.2 Summary

Trauma with consecutive hemorrhagic shock is the leading cause of death in patients between 5 and 44 years in Western countries (Ref).

Therapy of hemorrhagic shock requires early identification and rapid control of the bleeding source followed by an adequate resuscitation to restore tissue oxygenation as well as therapy of the ensuing coagulopathy (91).

In several studies it was shown that red blood cells failed to restore tissue oxygenation as least in the early post-transfusion phase. In order to meet this demand, alternative strategies to transport oxygen by artificial "oxygen-carrying substances", that can be classified as either haemoglobin-based or synthetic perfluorocarbon-based, are actively studied.

In this study we investigated if such a perfluorocarbon-based strategy (Perflubron) is able to restore the tissue oxygenation compared to the standard of care, i.e. asanguineous resuscitation or stored red blood cell concentrates after hemorrhagic shock with persistent microvascular failure.

Male Sprague Dawley rats (200-300g body weight, n= 8) were subjected to hemorrhagic shock (120 minutes, MAP 30-40mHg) followed by a short period of resuscitation (four hours). The reperfusion was managed by different infusion regimes. Group I was resuscitated applying stored blood (stored for 21days). The second group received pentastarch and group III and IV pentastarch in combination with Perflubron in different concentrations (group III 2,7g/body weight, group IV 5,4g/body weight).

The liver was examined in respect of liver enzymes, ATP-level and the gene expression of oxygen-dependent glutamine-synthetase 1.

Compared with the control group the reperfusion regimes with stored blood and pentastarch failed to restore ATP-levels and resulted in an increased expression of the hypoxia-inducible gene glutamine-synthetase 1.

The reperfusion with Perflubron in a concentration of 2,7g Perflubron/kg body weight restored the ATP-level to control and resulted in a physiologic expression pattern of glutamine-synthetase-1.

Reperfusion with pentastarch in combination with Perflubron in a dose of 5,4g/kg body weight was associated with an increase of the ATP-level even above the control-

group. The expression of the hypoxia-dependent gene was restricted to single cell layers around the central vein, similar to physiological expression patterns. In combination with a high inspiratory oxygen fraction Perflubron is able to improve oxygen availability presumably by recruiting micro vessels. However the improvement of oxygen-availability failed to either reduce or paradoxically aggravate early hepatocellular injury.

2. Einleitung

2.1 Klinische Bedeutung

In den westlichen Ländern stellt der hämorrhagische Schock in Verbindung mit einem Trauma die häufigste Todesursache bei den unter 40jährigen dar (31;127) .

Trotz scheinbar ausreichender Wiederherstellung des Flüssigkeitshaushaltes persistieren Störungen der Mikrozirkulation und des Energiestoffwechsels.

Zusätzlich haben diese Patienten ein hohes Risiko, ein Multiorganversagen zu entwickeln (23).

Unter den versagenden Organen ist die Leber das zweithäufigste betroffene Organ, welches nach hämorrhagischem Schock in seiner Funktion beeinträchtigt wird (127).

Durch die verminderte Sauerstoffversorgung kommt es zu Änderungen im zellulären Energiestoffwechsel. Diese führen zu frühen oder zu späten hepatozellulären Schäden, welche letztendlich für die Organdysfunktion verantwortlich sind.

Die Gewebekonzentration an Adenosinriphosphaten wird während des hämorrhagischen Schocks erschöpft und kann erst wiederhergestellt werden, wenn das ischämische Gewebe erneut adäquat perfundiert und mit Sauerstoff versorgt wird (160).

Aufgrund einer schweren mikrovaskulären Schädigung kann eine optimale Reperfusion allerdings behindert werden. Dies wird als „No-Reflow-Phänomen“ bezeichnet (9;32;68;91).

Die intravenöse Flüssigkeitssubstitution dient in erster Linie der Wiederherstellung des Herzzeitvolumens, es bleiben jedoch häufig Mikrozirkulationsstörungen bestehen (14;60;166). Derzeit werden primär kristalloide Infusionen ggf. in Kombination mit Kolloiden verabreicht. Bei größeren Blutverlusten wird die Gabe von allogenen Bluttransfusionen empfohlen (23). Hierbei ist zu bemerken, dass durch die Lagerung der Erythrozyten, deren Fähigkeit das Gewebe mit Sauerstoff zu versorgen, beeinträchtigt wird (137).

In der folgenden Studie werden an einem den hämorrhagischen Schock simulierenden Rattenmodell unterschiedliche Infusionsregime verglichen. Der entstandene Leberzellschaden wird bezüglich der Wiederherstellung des hepatozellulären ATP-Gehaltes, des enzymatischen hepatozellulären Schadens und

der Expression sauerstoffabhängiger Genprodukte am Beispiel der Glutaminsynthetase -1 (GluS-1) (29;120) verglichen.

2.2 Hämorrhagischer Schock

Der hämorrhagische Schock entspricht einem akuten oder subakuten generalisierten Kreislaufversagen mit Störungen der Mikrozirkulation und einer daraus resultierenden Minderdurchblutung lebenswichtiger Organe.

Durch den Volumenverlust kommt es zu einer Hypovolämie, welche zu einem reduzierten Herzzeitvolumen führt. Daraus resultiert der Schock mit einem akuten Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf im Gewebe, dies führt zu funktionellen und strukturellen Veränderungen. Weiterhin zählen Sauerstoffabgabe-, und Sauerstoffverwertungsstörungen zum Begriff des Schocks, da sie zu einer generellen Gewebhypoxie führen.

Die Ursache des hämorrhagischen Schocks ist ein massiver Blutverlust, mit konsekutivem Volumenmangel. Auslöser ist meist ein Trauma.

Das reduzierte Herzzeitvolumen geht mit einem erniedrigten Blutdruck und einer erhöhten Herzfrequenz einher. Der Anstieg der Herzfrequenz ist Ausdruck einer Gegenregulation des Organismus um bei Volumenmangel das Herzzeitvolumen durch Frequenzerhöhung aufrecht zu erhalten.

Ist der Organismus nicht mehr in der Lage, den drohenden Schock mit physiologischen Maßnahmen zu kompensieren, entwickelt sich ein manifester Schock.

Kommt es im Rahmen des Traumas zu Weichteil- oder Knochenschäden, so führt dies zu einer Aktivierung verschiedener humoraler Systeme (Komplementsystem, Koagulation, Fibrinolyse) (8;39;40;86;155). Diese Aktivierung bewirkt eine weitere Stimulation verschiedener zellulärer Systeme. Nach Ischämie/Reperfusion werden Thrombozyten und neutrophile Granulozyten aktiviert, deren freigesetzte Mediatoren eine systemische Entzündungsreaktion mit nachfolgendem zellulären Schaden hervorrufen (63;73).

Die daraus resultierende Organschädigung kann in verschiedene Stadien eingeteilt werden.

Zu Beginn spricht man vom „Organ im Schockzustand“. In diesem ersten Stadium ist die Organfunktion prinzipiell reversibel beeinträchtigt, allerdings besteht schon ein manifester Schaden der Ultrastruktur. In dieser Phase ist durch therapeutische Maßnahmen eine vollständige Regeneration des Organs möglich.

Entwickelt sich eine Organdysfunktion innerhalb der ersten 2-3 Tage nach dem Trauma, so spricht man von der „frühen Organdysfunktion“. Diese wird durch eine systemische Entzündungsreaktion getriggert.

Das als „späte oder septische Organdysfunktion“ bezeichnete Stadium entwickelt sich erst nach weiterer Aktivierung zellulärer Systeme (Makrophagen, neutrophile Granulozyten, Aktivierung von Zytokinen) typischerweise im Rahmen nosokomialer Infektionen. Es entspricht dem vollständigen Organausfall, in dessen Folge sich ein Multiorganversagen (Multiple Organ Dysfunction Syndrome, MODS) entwickeln kann (126).

Selbst nach erfolgreicher Wiederherstellung der Makrozirkulation, kann es auch beim Fehlen einer primären Infektionsquelle, nach einem hämorrhagischen Schock durch die initial ausgelösten humoralen und zellulären Veränderungen zu einer systemischen abakteriellen Entzündungsreaktion des Organismus kommen, die mit typischen Symptomen, wie Fieber und Leukozytose einhergeht (Systemic Inflammatory Response Syndrome, SIRS)(16;140).

In weiteren Stadien kann sich aus einem SIRS ebenfalls ein Multiorganversagen entwickeln. Diese Form der Organdysfunktion geht, trotz großer Fortschritte in der Intensivmedizin, mit einer hohen Mortalität einher (16;24;34).

Das systemische Inflammationssyndrom (SIRS) ist gekennzeichnet durch eine Veränderung der Körpertemperatur ($>38^{\circ}\text{C}$ oder $< 36^{\circ}\text{C}$), der Herzfrequenz ($> 90/\text{min}$), der Atemfrequenz ($> 20/\text{min}$) oder des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks (paCO_2) ($<38 \text{ mmHg}$), sowie der Leukozyten ($> 12000/\mu\text{l}$ oder $< 4000/\mu\text{l}$ bzw. 10% Stabkernige). Hierbei müssen mindestens zwei der genannten Kriterien erfüllt sein.

Der Begriff des Multiorganversagens (MOV) wird heute gemäß der Richtlinien des „American College of Chest Physician (ACCP) / Society of Critical Care Medicine (SCCM) Consensus Conference Committees“ durch die Bezeichnung des „Multiple Organ Dysfunction Syndrome (MODS)“ abgelöst und ist als Auftreten von Organdysfunktionen bei Akutkranken mit der Notwendigkeit einer intensivmedizinischen Intervention zur Aufrechterhaltung der Homöostase definiert.

Es beginnt meist einige Tage nach einem größeren Trauma oder nach einer Operation mit Versagen von mindestens zwei Organen für mehr als 24 Stunden. Oft findet man eine akute respiratorische Insuffizienz (adult respiratory distress syndrom) mit Hypoxämie und/oder akutem Nierenversagen. Weitere betroffene Organe sind Leber, Herz, ZNS und das blutbildende System. Die Organdysfunktionen können nacheinander innerhalb weniger Tage, oder nahezu gleichzeitig auftreten. Die Prognose ist von der Zahl der betroffenen Organe, der Dauer des Organversagens und dem Alter des Patienten abhängig (1;127).

Die Entwicklung eines Multiorganversagens als Folge eines hämorrhagischen Schocks wurde erstmals von Tilney (1973) und Baue (1975) bei Patienten mit rupturierten Bauchortenaneurysma beschrieben (11;157). Sie dokumentierten in der Literatur erstmalig, dass es auch nach einem primär nicht infektiösen Geschehen unter dem klinischen Bild einer Sepsis zum Organversagen kommen kann.

Obwohl in den letzten Jahren große therapeutische Erfolge im Bereich der Therapie des akuten Nierenversagens oder des Lungenversagens erzielt wurden, muss auch heute bei Versagen von drei oder mehr Organsystemen von einer Letalität von über 90% ausgegangen werden (77;85).

Das manifeste Leberversagen spielt im Rahmen des Multiorganversagens eine entscheidende Rolle. Zum einen durch die zentrale Bedeutung der Leber beim Postaggressionssyndrom, zum anderen wegen der weitgehend fehlenden therapeutischen Möglichkeiten des Leberersatzes. Aus diesem Grund besteht eine entsprechend schlechte Prognose (57;59;92;142). Das Auftreten eines MODS wird für Patienten, die sich einer Notfalloperation unterziehen müssen, mit bis zu 20% angegeben (45;48). Bei polytraumatisierten Patienten stellt die Entwicklung eines SIRS und konsekutiven MODS, nach Überleben der ersten posttraumatischen Stunden, den wichtigsten prognostischen Faktor für die Spätletalität im Rahmen der Schockfolgeerkrankungen nach Trauma dar (45;92;154). Häufig wird der Verlauf des abakteriellen SIRS im Rahmen einer posttraumatischen Dysfunktion des unspezifischen, wie des spezifischen Immunsystems durch sekundäre septische Komplikationen verschlimmert. Eine spezifische Therapie von SIRS und Sepsis zur Prophylaxe eines Organversagens ist im Moment noch nicht möglich (33;109).

2.3 Ischämie und Reperfusion

Der Schock, definiert als akutes Zirkulationsversagen mit resultierendem Missverhältnis von Sauerstoffangebot und (mitochondrialem) Sauerstoffbedarf lebenswichtiger Organe (49;82;97), stellt den prädisponierenden Faktor für die Entwicklung eines MODS dar. Das Kreislaufsystem hat nun die Aufgabe in Abhängigkeit von Herzfrequenz und Schlagvolumen die Versorgung aller lebenden Zellen des Organismus mit den ihrer Funktion entsprechenden Substraten zu übernehmen. Ebenso muss der Abtransport der entstehenden Metabolite gewährleistet werden, welcher im Bereich der kapillären Endstrombahn lokalisiert ist. Von klinischer Bedeutung für spätere Organschäden ist die hierbei beschriebene Persistenz von Mikrozirkulationsstörungen in einzelnen Bereichen des Kapillarbettes nach hypodynamen Schockzuständen. Stase bzw. Ischämie bleiben trotz therapeutischer Wiederherstellung der systemischen hämodynamischen Parameter, wie Herzzeitvolumen und arteriellem Blutdruck in Teilbereichen des Kapillarbettes bestehen (14;30;165). Dieses Phänomen wurde ursprünglich am Skelettmuskel beobachtet (52) und in der Folge in anderen Organen, wie der Niere (139) oder dem Gehirn (5) bestätigt. In der Leber spricht man von einer lobulären Heterogenität des Blutflusses, die auf Spasmen oder Embolien der Verteilungsgefäße zurückzuführen ist. Die sinusoidale Heterogenität beschreibt die Mikrozirkulationsstörung innerhalb eines Azinus. Dieses Phänomen bezeichnet man als „no-reflow“ und ist gekennzeichnet durch eine nach Ischämie gesteigerte Perfusionsheterogenität auf Ebene der Mikrozirkulation (119). Dies bedeutet, dass Abschnitte existieren, in denen die Perfusion fehlt oder stark eingeschränkt ist. Diese Areale können sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu anderen Abschnitten befinden, die normal oder verstärkt perfundiert werden. Man kann daher auch bei Wiederherstellung des Gesamtblutflusses nicht ausschließen, dass weiterhin fokale Ischämien bestehen bleiben (12;27). Die Ursache dieses „no-reflow“-Phänomens scheint in einer Permeabilitätsstörung mit Entwicklung eines interstitiellen Ödems zu liegen. Es kommt zu einer Verlängerung der Diffusionsstrecke und zu einer entsprechend dauerhaften Gewebhypoxie, die trotz einer bereits wiederhergestellten Perfusion mit einem größeren ischämischen Gewebeschaden einhergeht.

Eine weitere Ursache für Mikrozirkulationsstörungen stellt das „reflow-paradox“ (99) dar, wobei es nach Wiederherstellung des Blutflusses zunächst zu einer

Verschlimmerung des Gewebeschadens kommt. Man geht davon aus, dass hierbei eine in Folge der Reperfusion zustande kommende Interaktion zwischen neutrophilen Granulozyten und dem Gefäßendothel eine entscheidende Rolle spielt. Desweiteren werden für den entstehenden Gewebeschaden, die nach Reoxigenierung vermehrt entstehenden reaktiven Sauerstoffradikale „ROS“ (Superoxidanionen, Wasserstoffperoxid, Hydroxylradikale) verantwortlich gemacht, die als Folge des stufenweisen Abbaus von Adenosintriphosphat (ATP) zu Hypoxanthin entstehen. Im Ischämie/Reperfusionssyndrom konnte deutlich eine biphasische Bildung von reaktiven Sauerstoffradikalen gezeigt werden (46;63;99;126).

In den letzten Jahren wurden vasoaktive Mediatoren beschrieben, die unabhängig von anderen Mechanismen Veränderungen der Widerstands- und Durchblutungsverhältnisse bewirken. Dazu gehören kontrahierende (z.B. Endothelin) und dilatierende (z.B. Stickstoffmonoxid) Komponenten, die selbst in unmittelbarer benachbarten Sinusoiden zu unterschiedlichem Flussverhalten führen können. Auf dem Boden dieser unterschiedlichen Flussverhältnisse können sich trotz einer adäquaten Reperfusion Zellnekrosen ausbilden (15;27;30).

2.4 Leberanatomie und Leberhistologie

Die Leber ist das zentrale Stoffwechselorgan des Organismus. Hier finden wichtige Syntheseschritte statt. Ein großer Teil der Blut- und Gerinnungsproteine und des Cholesterins werden in der Leber gebildet und ins Blut abgegeben. Für Glukose dient die Leber als zentrales Speicherorgan (Glykogenspeicher). Daneben nimmt die Leber auch eine Monopolstellung bei Abbau und Entgiftung körpereigener und körperfremder Substanzen ein. Sie ist am Proteinstoffwechsel mit Synthese von Serumproteinen und Gerinnungsfaktoren, als auch an der Desaminierung von Aminosäuren beteiligt. Weiterhin speichert sie im Rahmen des Kohlenhydratstoffwechsels Glykogen, ist das Zentralorgan der Gluconeogenese, synthetisiert Blutfette und ist am Abbau und Konjugation von toxischen Substanzen beteiligt.

Eine Besonderheit stellt die duale Blutversorgung der Leber dar.

Die Leber erhält Blut aus zwei afferenten Gefäßen. Einerseits über die Arteria hepatica, die sauerstoffreiches Blut zur Leber transportiert, andererseits über die Pfortader, die nährstoffreiches, jedoch desoxygeniertes Blut aus dem Splanchnikusgebiet liefert.

Die intrahepatischen Äste dieser beiden Gefäße verlaufen mit den Gallengängen und bilden die Glissonsche Trias oder Periportalzonen.

Dieser Bereich wird als „upstream“-Region bezeichnet, in der das Blut zunächst anflutet. Venöses und arterielles Blut münden anschließend gemeinsam in den Lebersinus. Von dort gelangt es über die Zentralvenen in die Venae hepaticae und dann in die Vena cava inferior. Entsprechend der Periportalzone befindet sich im Gebiet der Zentralvene die perizentrale Zone oder auch „downstream“-Region genannt. Der Blutstrom in den Lebersinus ist damit unidirektional von der Leberperipherie zum Zentrum gerichtet. Unter Normalbedingungen ist die Durchblutung auf dieser Stufe relativ konstant und die Blutflussgeschwindigkeit ist identisch in Gefäßen gleicher Größe. Eine auftretende Heterogenität in diesen Bereichen ist somit pathologisch (115).

Von der Leberpforte aus zieht das Bindegewebe der Leberkapsel (Glissonsche-Kapsel) als periportales Bindegewebe mit den Gefäßen in das Leberinnere. Durch Septenbildung teilt es das Leberparenchym in die Leberläppchen. Diese sind mehrkernige (polygonale) Felder, die sternförmig in das Zentrum laufende Zellbalken zeigen. In der Mitte liegt ein kleiner Hohlraum, welcher der quergeschnittenen Zentralvene entspricht. Außen wird jedes Läppchen von Bindegewebe begrenzt. In diesem interlobulären Bindegewebe verlaufen Äste der Pfortader, Äste der Arteria hepatica und die kleinen Gallengänge. Den Verband aus diesen drei Gefäßen wird Glissonsche Trias genannt. Aufgrund dieser Tatsache und für die bessere Deutung pathologischer Befunde hat man sich inzwischen auch mit anderen Gliederungsmöglichkeiten befasst. Diejenigen Sinus und Leberzellbalken, die von dieser Trias versorgt werden, können auch als Portalläppchen bezeichnet werden. Der Portalkanal liegt hier in der Mitte der Baueinheit, während die abführenden Venen sich an den Ecken des dreieckigen Gebildes befinden. Der von der Endstrecke einer Trias versorgte Gewebekomplex wird als Leberazinus bezeichnet. Diese Gliederung erlaubt eine bessere Analyse und Deutung der Gradienten innerhalb des Lebergewebes.

Die Hepatozyten machen 50% der Zellzahl und 90% der Zellmasse der Leber aus und stellen damit die quantitativ bedeutsamste Zellpopulation dar. Entsprechend dem Weg des ankommenden Blutes erhalten die unmittelbar an die afferenten Gefäße des Azinus angrenzenden Partien des Lebergewebes das Blut mit dem höchsten Gehalt an Sauerstoff und Metaboliten aus dem Darm. Die sich in Richtung der Zentralvene anschließenden Bereiche bekommen dagegen weniger sauerstoff-, und metabolitreiches Blut. Der Sauerstoffpartialdruck fällt von ca. 65 mmHg periportal auf 35 mmHg perivenös ab (66) und wird als Hauptursache für den unterschiedlichen Enzymbesatz der Hepatozyten im Leberläppchen angesehen. Entsprechend dem hohen Sauerstoffangebot im Bereich der Periportalzone finden hier oxidative, energieverbrauchende Stoffwechselprozesse statt (Glukoneogenese, Glukosefreigabe, Glykogensynthese aus Pyruvat und Glykogenumwandlung zu Pyruvat und Liponeogenese). Auch in Bezug auf den Umbau der meisten Hormone während der Leberpassage und der Bildung von Mediatorsubstanzen, wie Peptiden, Cytokinen und Eikosanoiden, zeigen sich Unterschiede zwischen periportal und perivenösen Zellen. Das Verhältnis zwischen Insulin und seinem Antagonisten Glukagon und den Katecholaminen steigt, entsprechend dem veränderten Glukoseangebot, von der periportal zur perivenösen Zone an (67;69). Dagegen stellt sich der Abbau von Signalsubstanzen nicht in dieser uniformen Art und Weise entlang der Sinusoide dar. ATP (56) und Eikosanoide (54;55) werden überwiegend von einer kleinen Population distaler, perivenöser Hepatozyten eliminiert, während Anaphylatoxine hauptsächlich von proximalen, periportal Zellen aufgenommen werden (121).

Glutamin und Ammoniak werden zur Leber transportiert, und dort nahezu vollständig von den Periportalzellen aufgenommen und im Rahmen des Harnstoffzyklus zu Harnstoff verstoffwechselt. Dieses System besitzt eine hohe Kapazität, aber eine geringe Sensitivität, so dass geringe Mengen Ammoniak die perivenösen Zellen erreichen. Dort wird der verbleibende Rest von der Glutamin-Synthetase-1 unter der Bildung von Glutamin entgiftet. Dieses System besitzt im Gegensatz zu dem in den Periportalzellen eine geringere Kapazität, aber eine hohe Sensitivität (167). Aufgrund dieser Tatsache werden nach Rappaport (125) innerhalb der Leberazini drei metabolische Zonen unterschieden: Läppchenperipherie, Übergangszone und Läppchenzentrum. Da der Sauerstoffpartialdruck aufgrund des unidirektionalen Blutflusses unter physiologischen Bedingungen kontinuierlich vom Portalfeld zur

Zentralvene entlang der Sinusoide abnimmt, sind an den oxidativen Stoffwechsel gebundene energieverbrauchende Prozesse, wie die Glukoneogenese oder der Harnstoffzyklus periportal lokalisiert. Energieliefernde Prozesse, wie die Glutaminsynthese werden daher in der bereits unter physiologischen Bedingungen grenzwertig mit Sauerstoff versorgten Perizentralregion vorgefunden (64;167).

Reduzierter hepatischer Blutfluss („low-flow“-Ischämie) führt dazu, dass periportal gelegene Hepatozyten entsprechend ihres Bedarfes Sauerstoff aufnehmen und für „downstream“ Hepatozyten folglich weniger zur Verfügung steht. Entsprechend der Reduktion des Blutflusses kommt es zur Entwicklung von zentrolobulären oder midzonalen Nekrosen (13).

Traditionell gilt die „low-flow“- bedingte Zunahme des zonalen Sauerstoffgradienten mit der hieraus resultierenden Ischämie der perizentral gelegenen Hepatozyten, die mit einer persistierenden Abnahme des Leberflusses einhergeht, als primärer Schädigungsmechanismus des Leberparenchyms im und nach Überleben eines hämorrhagischen Schocks. Hiermit vereinbar findet sich im bioptischen Material typischerweise ein primär perizentraler Verteilungstyp nekrotischer Zellen (20). Dieser ist als klassische schockbedingte Schädigung der Leber bekannt und muss als direkte Hypoxiefolge angesehen werden (126;135). Im Rahmen einer Ischämie/Reperfusionssituation, wie sie beim primären erfolgreich behandelten Schock vorliegt, muss jedoch mit einer frühen midzonalen Schädigung gerechnet werden (90). Diese kann durch den massiven Anfall freier Sauerstoffradikale in dieser Region erklärt werden, die sich dadurch ergibt, dass die für eine Radikalgenerierung verantwortlichen Substrate (Xanthinoxidase, Hypoxanthin oder Xanthin) von portal nach perizentral zunehmen, während der Sauerstoffgradient in der gleichen Richtung abnimmt (93).

2.5 Glutamin-Synthetase 1

Die Ammonium-Elimination im Organismus erfolgt über zwei hintereinander geschaltete Enzymsysteme.

Der Harnstoffzyklus ist periportal lokalisiert und stellt eines der beiden Enzymsysteme dar. Dabei wird initial aus Ammonium und Bicarbonat durch die Carbamoylphosphat-Synthetase Carbamoylphosphat gebildet. Im nächsten Schritt wird Carbamoylphosphat mittels der Ornithin-Transcarbamoylase auf Ornithin übertragen, wodurch Citrullin entsteht. Citrullin kondensiert dann in einer folgenden Reaktion mit Aspartat durch die Argininosuccinat-Synthetase zu Argininosuccinat. Schließlich spaltet die Argininosuccinase das Argininosuccinat in Fumarat und Arginin. Arginin stellt die unmittelbare Vorstufe des Harnstoffs dar. Es wird durch die Arginase zu Harnstoff und Ornithin hydrolysiert. Der Harnstoff wird über die Nieren ausgeschieden und das Ornithin ist wieder frei für eine erneute Aufnahme von Carbamoylphosphat (Abb.1).

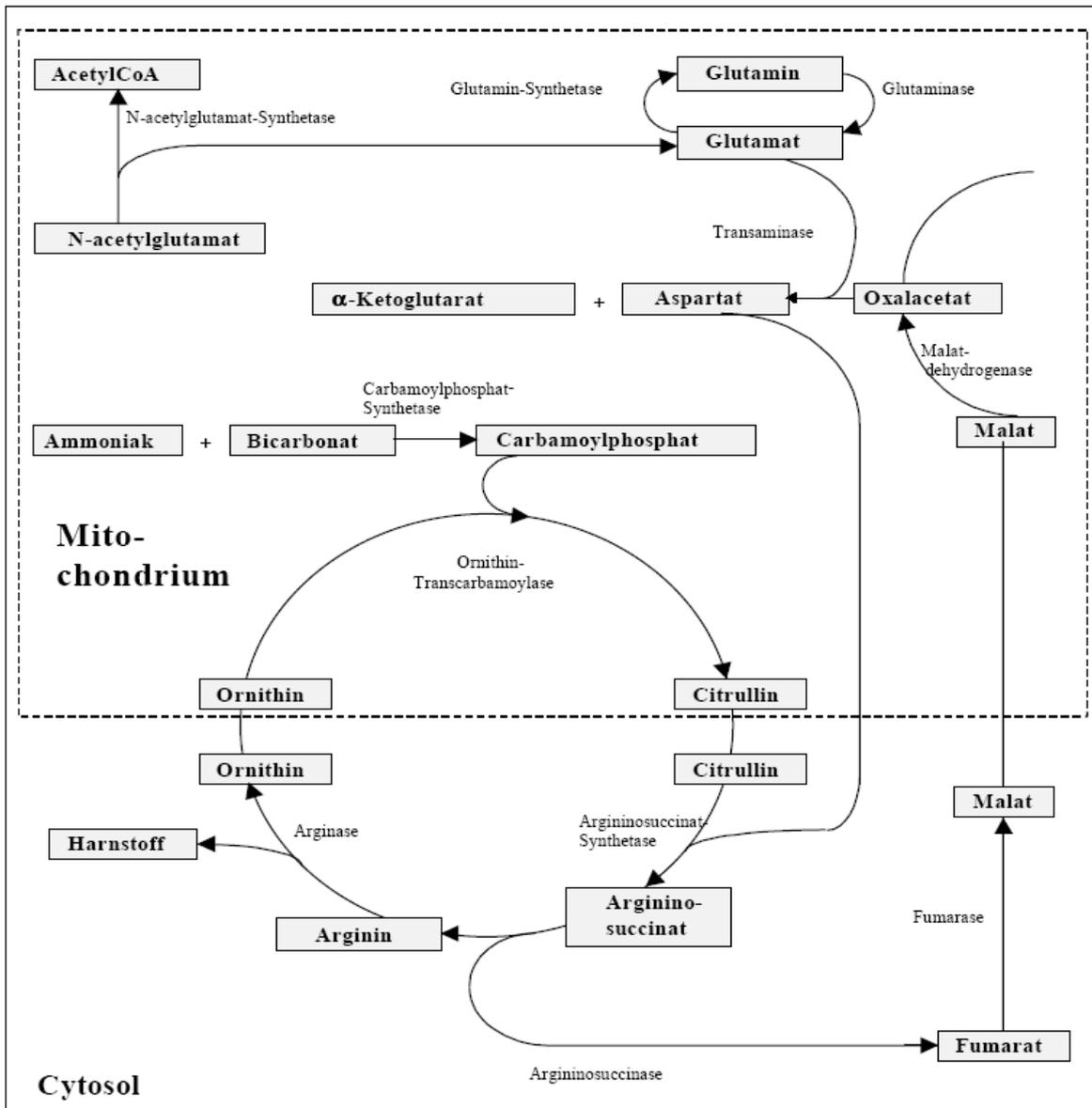


Abbildung 1: Schematische Darstellung des Glutaminzyklus und des Harnstoffzyklus (2).

Daneben fungiert die Glutamin-Synthetase 1 als hochaffines Entgiftungssystem in down-stream Hepatozyten der Zone 3. Die Glutamin-Synthetase 1 wird nur in 1-3 Zellreihen um die Zentralvene exprimiert (41). Hier wird Sauerstoff abhängig das Gen reguliert. Durch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck wird die Genexpression der Glutamin-Synthetase 1 induziert. Die Glutamin-Synthetase hat eine hohe Affinität jedoch eine niedrige Kapazität für Ammonium (Abb.2).

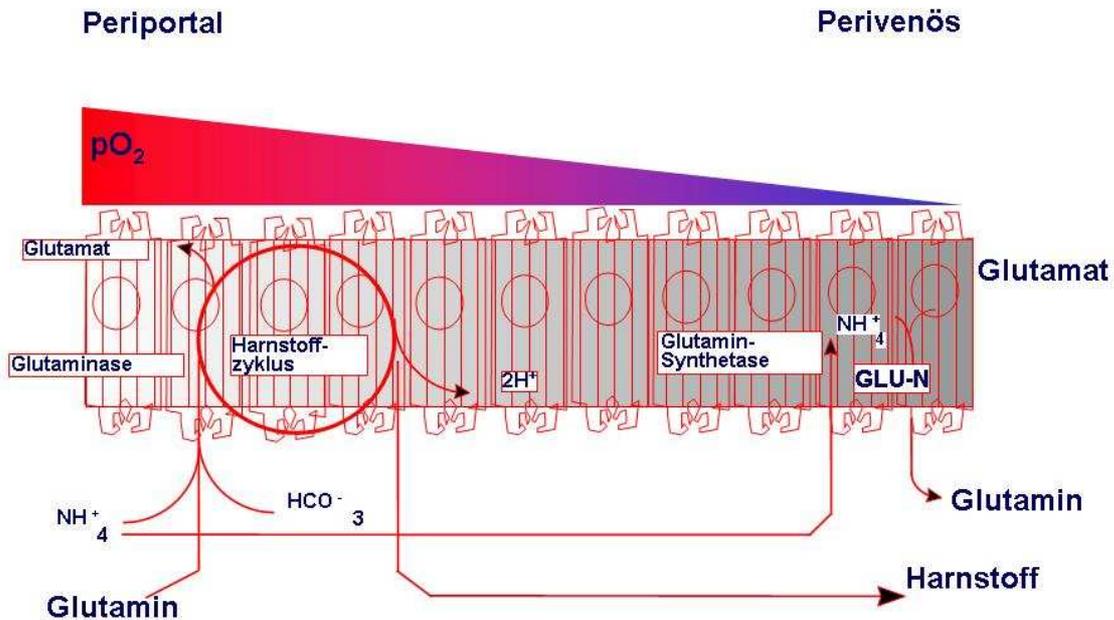


Abbildung 2 Gliederung hepatischer Enzyme, des Stoffwechsels und des Sauerstoffpartialdruckes (118)

Schlüsselenzyme, vor allem für die der Ammonium-Entgiftung des Harnstoffzykluses sowie der Glutamin-Synthetase, sind asymmetrisch im Leberazinus verteilt. Der Sauerstoffpartialdruck, welcher von periportal nach perivenös abnimmt, trägt maßgeblich zur Genexpression der Schlüsselenzyme bei. Dabei ist die Kapazität des oxidativen Energiestoffwechsels, der Gluconeogenese und des Harnstoffzykluses in der periportalen Zone höher, wohingegen die Kapazität für die Glucoseaufnahme oder Glutaminsynthese in der perivenösen Zone höher ist. Die Induktion der Glutamin-Synthetase 1 Genexpression erfolgt durch einen niedrigen Sauerstoffpartialdruck.

Die Ammoniumionen, die beim Blutstrom des Periportalblutes von periportal nach perivenös nicht über den Harnstoffzyklus extrahiert werden, werden in der perivenösen Zone des Leberazinus entgiftet. Auf diese Weise wird das Ammonium sowohl über die Bildung von Harnstoff als auch über die Glutaminsynthese eliminiert.(53)

2.6 Künstliche Sauerstoffträger

Hämoglobinlösung versus Perfluorocarbone

Grundsätzlich sind zwei Arten von künstlichen Sauerstoffträgern zu unterscheiden.

- hämoglobin-basierende Sauerstoffträger (hemoglobin based oxygen carriers, HbOC) und
- Perfluorocarbone (synthetische Kohlenwasserstoffverbindungen)

Bei Hämoglobin-basierenden Lösungen der neuen Generation handelt es sich um ein chemisch modifiziertes Hämoglobin-Molekül, welches weiterhin über Sauerstoff-transportierende Eigenschaften verfügt. Hergestellt werden diese aus abgelaufenen Erthrozyten-Konzentraten, Rinderhämoglobin oder gentechnologisch. Durch Hyposmose entsteht eine hämolytische Suspension, welche separiert und ultrafiltriert wird. Das daraus gewonnene „stroma-freie“ Hämoglobin wird weiter bearbeitet, so dass ein ultra-gereinigtes Hämoglobin-Tetramer entsteht, welches frei ist von Endotoxinen, Phospholipiden, Proteinen, pathogenen Viren und Prionen. Dadurch wird das Infektionsrisiko minimiert.

Klinische Studien haben jedoch gezeigt, dass es nach dem Einsatz von hämoglobin-basierenden Sauerstoffträgern zu erheblichen Nebenwirkungen, wie renale und myokardiale Toxizität, gastrointestinalen Nebenwirkungen, sowie zur Bildung von toxisch wirkenden Sauerstoff-Radikalen (3;19;37;136) kommen kann.

Ursächlich ist zum einen die Erhöhung der Sauerstoff-Affinität des freien Hämoglobins. Durch den Verlust von 2,3-Diphosphoglycerat kommt es zu einer Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve und zu einer verminderten Sauerstoffabgabe an das Gewebe (170).

Zum anderen führte die Infusion von isoliertem Hämoglobin zu einem spontanen Zerfall des Tetramers in seine Untereinheiten. Aufgrund der geringen Molekülgröße wurden die Mono- und Dimere glomerulär filtriert, was zu einer Präzipitation in den Tubuli und somit zu einer konsekutiven Niereninsuffizienz führte (131). Chemische Modifikationen können auf unterschiedliche Weise (z.B. durch intra- oder intermolekulare Quervernetzung) die Stabilität des Moleküls erhöhen. Bei diesen Hämoglobin-Lösungen der neuen Generation verhindert die Verbindung der verschiedenen Untereinheiten die Dissoziation und steigert dadurch die intravasale Verweildauer.

Klinische Untersuchungen bei Schlaganfall- (134) und traumatisierten Patienten (144) gingen mit einer erhöhten Letalität einher, woraufhin die Phase III-Studien abgebrochen wurde. Erklärt wurde dieser Umstand vor allem durch die Bindung des freien Hämoglobins an Stickstoffmonoxid, so dass die Vasodilatation reduziert wurde. Weitere beteiligte Faktoren sind die direkte Stimulation von Endothelin-1, sowie die Interaktion sympathoadrenerger Rezeptoren, was zu einer weiteren Vasokonstriktion führt.

Im Gegensatz dazu stellen Perfluorcarbone halogenierte Kohlenwasserstoffe dar, deren Wasserstoffatome in erster Linie durch Fluoratome, aber auch Brom ersetzt wurden (Abb.3).

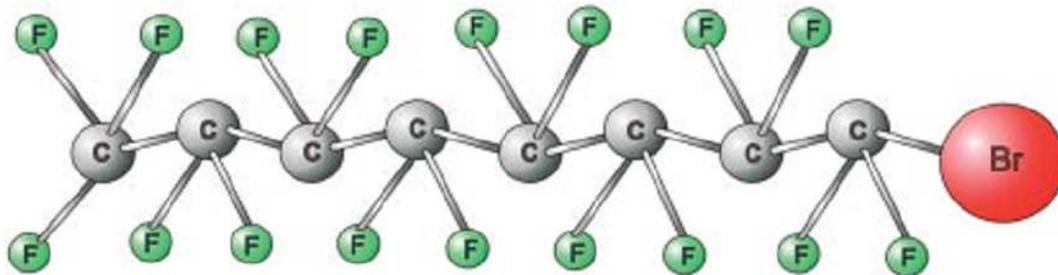


Abbildung 3 Perfluorooctylbromid (Perflubron) $C_8F_{17}Br$. (7)

Die hohe Elektronegativität der C-F-Bindungen trägt zur Stabilität des Moleküls bei. Weiterhin ist die Oberflächenspannung des Moleküls so gering, dass es Gase z.B. Sauerstoff und Kohlendioxid physikalisch lösen kann. Nach dem Gesetz von Henry und Dalton ist dabei die Menge des gelösten Gases dem Partialdruck direkt proportional.

Bei Perfluorcarbon handelt es sich um klare, farblose und geruchlose Flüssigkeiten, welche die zweifache Dichte von Wasser haben (25). Aufgrund ihres hydrophoben Verhaltens sind sie nicht in Wasser löslich (74) und benötigen zur intravenösen Applikation in der Regel einen Phosphorlipid-Emulgator.

Bislang wurden mehrere Perfluorcarbon-Präparate zur intravenösen Applikation entwickelt. In der vorliegenden Untersuchung wurde Perfluorooctylbromid (Perflubron; Oxygent™) verwendet.

Diese Perfluorcarbon-Emulsion setzt sich aus 58% Perfluorocetyl bromid und 2% Perfluordecetyl bromid zusammen und hat eine durchschnittliche Molekülgröße von 0,16-0,18 μm .

Nach intravenöser Gabe wird die Perfluorcarbon-Emulsion nach einiger Zeit in das retikuloendotheliale System (RES) aufgenommen. Die Aufnahme bestimmt die Halbwertszeit innerhalb des Gefäßsystems. Diese ist dosisabhängig und beträgt für Perflubron $9,2 \pm 2,2\text{h}$ für eine Dosis von $1,8\text{g/kg}$ Körpergewicht. Nach der ersten Aufnahme der Emulsion in das RES werden die Partikel langsam in ihre Bestandteile aufgespalten und an das Gefäßsystem abgegeben. Dort werden die Perfluorcarbone an Lipide gebunden und unverändert zur Lunge transportiert, wo die Perflubron-Moleküle, via Exhalation, ausgeschieden werden.

Der Sauerstofftransport und die Sauerstoffbindung der Perflubron-Emulsion unterscheiden sich grundlegend zu der des Hämoglobins. Während die Sauerstoffbindungskurve des Blutes sigmoidal verläuft, weist die Löslichkeit für Perflubron einen linearen Verlauf auf. Daraus folgt, dass die Sauerstoff-Transportkapazität allein vom Sauerstoff-Partialdruck des Blutes abhängig ist (Abb.4).

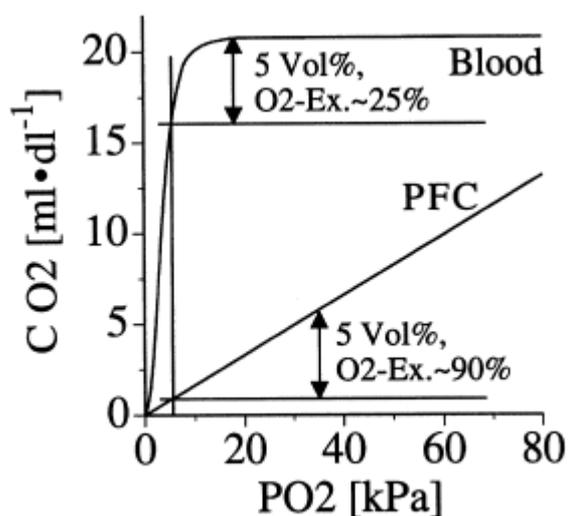


Abbildung 4 Sauerstoffbindungskurve von Hämoglobin (Blood) und Perfluorcarbon (PFC) (149)

Für eine optimale Sauerstoffversorgung ist daher unter Perfluorcarbon-Anwendung eine Beatmung mit 100% Sauerstoff notwendig. Während kurzer Beatmungszeiten mit reinem Sauerstoff (<8h) wurde keine Sauerstofftoxizität beobachtet (146).

Unter physiologischen Bedingungen wird die Mikrozirkulation durch die rheologischen Eigenschaften der Erythrozyten beeinflusst. Mit einem Größendurchmesser von rund 7-8 μm liegt die Größe der Erythrozyten in der Größenordnung der Kapillaren (4-15 μm). In den Arteriolen (<300 μm) richten sich die Erythrozyten hingegen stromlinienförmig aus.

Infolge einer Vasokonstriktion (z.B. während eines Schocks) kommt es zu einer Verringerung des Gefäßquerschnittes. Damit einher geht eine Sauerstoffminderversorgung der Gefäßperipherie, da die Erythrozyten die Kapillaren aufgrund ihrer Größe nicht mehr passieren können.

Um im Falle eines hämorrhagischen Schocks die Perfusion lebenswichtiger Organe (Gehirn, Niere) aufrecht zu erhalten, kommt es zu einer Vasokonstriktion der Lebersinusoide mit Umverteilung der Perfusion. Dies geschieht über die Ito-Zellen, welche über perisinusoidale Filamente an der Kontraktion der Lebersinusoide beteiligt sind (164). Wahrscheinlich führen lokale Mediatoren aus Makrophagen zu einer Kontraktion der Filamente (72;114).

Weiterhin kommt es im Rahmen des hämorrhagischen Schocks mit anschließender Substitution von gelagertem Fremdblut und Hydroxyethylstärke zu einer vermehrten Freisetzung des Vasokonstriktors Endothelin-1. Bestätigt wird dies durch die Daten von Kourembanas (80), welche darauf hinweisen, dass es durch einen verminderten Sauerstoffpartialdruck zu einer vermehrten Freisetzung von Endothelin aus den Endothelzellen kommt. Zudem führt freies Hämoglobin, welches durch die Lagerung von Erythrozytenkonzentraten entsteht, zu einer Bindung an CO und NO. Die reduzierte Verfügbarkeit von NO bewirkt zusätzlich eine verminderte sinusoidale Vasodilatation.

Die Effekte von Endothelin und NO addieren sich somit, was zu einer reduzierten Perfusion in den Lebersinusoiden führt.

Die gestörte Mikrozirkulation bedingt eine heterogene Oxygenierung innerhalb der Leber und resultiert damit in einer partiellen Hypoxie.

Ein wesentlicher Vorteil des Perfluorocarbons liegt in seiner geringen Partikelgröße (<0,2 μm Durchmesser). Solange noch ein minimaler Plasmafluss vorhanden ist, gelangen die Perfluorocarbon-Moleküle in die Gewebeabschnitte, welche durch die Erythrozyten nicht mehr erreicht werden können. Perfluorcarbone haben aufgrund ihrer Größe die Fähigkeit, kleinste Kapillaren zu passieren.

Ist aufgrund eines hämorrhagischen Schocks der Blutfluss vermindert, so kann eine Sauerstoff-Versorgung des Gewebes durch die Perfluorocarbon-Emulsion erfolgen, solange noch ein minimaler Plasmafluss vorhanden ist.

3. Material und Methoden

3.1 Chemikalien

Sofern nicht anders angegeben, wurden die verschiedenen Chemikalien von den Firmen Sigma (Deisenhofen, Deutschland) oder Roth (Karlsruhe, Deutschland) bezogen und waren von der jeweils höchsten erhältlichen Reinheit.

3.2 Operative Vorbereitung

Die Untersuchungen wurden nach der Genehmigung durch das zuständige Landratsamt an männlichen Sprague Dawley Ratten (Charles River, Sulzfeld, Deutschland; das Körpergewicht (KG) betrug 200-300g) durchgeführt.

Vor Versuchsbeginn wurde über Nacht eine Nahrungskarenz bei freiem Zugang zu Wasser eingehalten. Zum Ausschluss tageszeitlich bedingter Schwankungen des Stoffwechsels und des Hormonhaushaltes wurden alle Versuche am Morgen durchgeführt. Es wurden nur Tiere in die Versuchsserien aufgenommen, die keine Anzeichen von Erkrankungen, sowie ein normales Fress - und Putzverhalten zeigten. Die Tiere wurden durch eine intraperitoneale Injektion von Pentobarbital (50 mg/kg KG) narkotisiert.

Am enthaarten Hals wurde ein medialer Hautschnitt zwischen Mandibula und Manubrium sterni angelegt. Die Trachea wurde in Höhe der infrahyalen Muskulatur freigelegt. Nach Querinzision zwischen zwei Knorpelspannen wurde ein Plastiktubus (2,42 mm Außendurchmesser (AD), Portex, Hyth, England) über ungefähr 0,5 cm eingeführt und fixiert. Anschließend wurde die Arteria carotis communis sinistra unter sorgfältiger Schonung des mit ihr verlaufenden Nervus vagus zwischen Musculus sternocleidomastoideus und infrahyaler Muskulatur freipräpariert und vorsichtig aufgespannt. Die Arterie wurde distal (kranial) ligiert und proximal mit einer mikrochirurgischen Gefäßklemme versehen. Das Gefäß wurde mit einer Mikroschere inzidiert, eine Thermistorsonde (9490 E, Columbus Instruments, OH, USA) eingeführt, in den Aortenbogen vorgeschoben und fixiert. Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgte mittels transpulmonaler Thermodilution (Cardiotherm 500,

Columbus Instruments, Columbus, Ohio). Ein Zentralvenenkatheter wurde durch Kanülierung der Vena jugularis dextra nach ähnlichem Procedere gelegt. Eine Infusion von Ringerazetatlösung (10ml/kg/h) diente der Deckung des Basisbedarfs während des Eingriffs. Die Kanülierung der Arteria femoralis sinistra erfolgte zur kontinuierlichen invasiven Druckmessung (Hellige Servomed SMK 154-9, Freiburg) sowie zur Blutentnahme.

3.3 Versuchsablauf

Die operative Vorbereitung dauerte zwischen 35 und 45 Minuten. Es folgte eine Ruhephase von 15 Minuten, in der konstante Kreislaufverhältnisse beobachtet werden sollten. Währenddessen erhielten die Tiere unter Spontanatmung eine inspiratorische Sauerstoff-Konzentration von 1,0.

Als Basisdaten wurden in dieser Phase der mittlere arterielle Druck (MAP), die Herzfrequenz (HF) und Körpertemperatur bestimmt. Mittels der arteriellen Blutgasanalyse konnten Sauerstoffpartialdruck (p_aO_2), Kohlenstoffdioxidpartialdruck (p_aCO_2), pH-Wert, sowie die berechnete Abweichung der Pufferbasen (BE) kontrolliert werden. Außerdem wurde eine Serumprobe entnommen und bis zur weiteren Analyse bei $-70^\circ C$ tiefgefroren.

Nach Beendigung der Ruhephase wurde durch raschen arteriellen Blutentzug, der MAP innerhalb der ersten 5 Minuten auf 35 bis 40 mmHg gesenkt und durch weitere adaptierte Blutentnahme oder Applikation von kleinen Boli Ringerlösung (0,1-0,2 ml) für 120 Minuten auf diesem Niveau konstant gehalten. Das Blut wurde in Spritzen gesammelt und mit Zitrat-Phosphat-Dextroselösung (0,14ml/ml Blut) antikoaguliert. In dieser Phase wurden viertelstündlich Blutdruck, Herzfrequenz und Körpertemperatur dokumentiert.

Nach Ablauf der 120-minütigen Schockphase und erneuter Messung von HZV und Blutgasanalyse (BGA) wurde die Volumentherapie durchgeführt.

Die Gruppe I erhielt zur Volumentherapie des Schocks 21 Tage gelagertes Fremdblut. Dieses Fremdblut wurde durch sterile Kanülierung der abdominalen Aorta von Spendertieren gewonnen und mit Zitrat-Phosphat-Dextroselösung (0,14ml/ml Blut) antikoaguliert und bei $4-8^\circ C$ gelagert.

Die Gruppe II wurde mit Hydroxyethylstärke 6% (HAES) therapiert während die Gruppen III und IV Haes+Perflubron (Oxygent™) in unterschiedlicher Dosierung erhielten (Gruppe III Haes +2,7 g/kg PFB, die Gruppe IV Haes +5,4 g/kg PFB).

Folglich erhielten alle Tiere entsprechend 60% des zuvor entzogenen Volumens an gelagertem Fremdblut oder Kolloid-Lösung.

Zusätzlich wurde mit Beginn der Therapie 300% des entnommenen Blutvolumens in Form von Ringerazetatlösung über 2 Stunden infundiert.

Danach erhielten die Tiere der Schockgruppe eine konstante Infusion von Ringerazetatlösung gemäß ihres Basisbedarfes bis zum Ende des Versuchs.

Den scheinoperierten Kontrolltieren, die keinem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden, erhielten während des gesamten Experiments 10ml/kg KG Ringerazetatlösung zur Deckung ihres Basisbedarfs infundiert und atmeten ebenfalls 100% Sauerstoff über die Trachealkanüle.

Blutdruck und Herzfrequenz wurden in den ersten zwei Stunden alle 5 Minuten gemessen und im weiteren Verlauf alle 30 Minuten.

Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgte halbstündlich. Die Blutgasanalyse wurde zu Beginn des Versuchs, nach Ende des hämorrhagischen Schocks und nach Ende der Therapiezeit nach 6 Stunden durchgeführt.

Nach Abschluss des Protokolls wurde den Tieren eine weitere Serumprobe entnommen. Das hierfür entnommene Blut wurde bei 4000 U/min für 5 min zentrifugiert, das Serum abpipettiert und bis zur weiteren Untersuchung bei -70°C gelagert. Daraufhin wurden die Tiere laparotomiert und die Lebern entnommen. Ein Leberläppchen wurde zur ATP-Bestimmung mit Hilfe einer in flüssigem Stickstoff gekühlten Gefrierstopzange entnommen. Das restliche Lebergewebe wurde in flüssigem Stickstoff tiefgefroren und bis zu weiteren molekularbiologischen Analysen bei -70°C gelagert.

Ein weiteres Leberläppchen wurde in 4% Formalinlösung (pH= 7,0) überführt und dort bis zur weitem immunhistochemischen Aufbereitung bei Raumtemperatur gelagert.

3.4 Bestimmung des hepatischen ATP-Gehalts mittels ELISA und Biolumineszenz

3.4.1 ELISA

Um den ATP-Gehalt in der Leber zu bestimmen wurde das Lebergewebe am Ende des Experiments in eine in Stickstoff gekühlte Zange geklemmt und in flüssigen Stickstoff bei -80°C gefroren.

Die gefrorenen Proben wurden in 3%iger Sulfosalicylsäure mit einem Powergen 125 Gewebe-Homogenisator (Fisher Scientific, Pittsburgh, PA) homogenisiert.

Die ATP-Konzentration wurde im Überstand mit dem Sigma test kit 366-UV enzymatisch bestimmt. Eine Standard-Kurve aus gereinigtem ATP wurde zur Bestimmung der ATP-Gewebe-Konzentration genutzt. Da die Phagozytose von Perfluorocarbon-Emulsion-Partikeln besonders für die Kupffer-Zellen der Leber wichtig ist und damit das Gewebe-Gewicht beeinflussen kann wurde die ATP-Konzentration in nassem und in trockenem Zustand bestimmt. Um den Quotienten aus Nass- und Trocken-Gewicht abschätzen zu können, wurden 200mg des Leber-Gewebes vor und nach der für 72 stündigen Inkubation bei 60°C auf einer Präzisionswaage (Sartorius Research, Sartorius GmbH, Göttingen, Germany) gewogen.

3.4.2 Biolumineszenz

Zur Bestimmung des ATP-Gehalt der Leber wurden aus den bei -70°C gelagerten Gewebeproben 20 µm dicke Schnitte angefertigt. Diese wurden auf Objektträger überführt und über Nacht bei -20°C gefriergetrocknet.

Diese Schnitte wurden daraufhin mit einem 60 µm dicken Enzymblock beschichtet.

Um langsam erkalten zu können, wurden die Enzymblöcke bereits am Vortag fertiggestellt.

In 10 ml Na-Arsenat (100mM, pH 7,4) wurde 477mg HEPES (200mM) gelöst und der pH-Wert auf 7,6 eingestellt. Dieser Grundlösung wurden 200mg Gelatine, 100mg Glycerin und 100mg Polyninylpyrrolidon 40 zugefügt und dabei langsam auf 40°C erwärmt.

Nachdem die Lösung wieder auf 25°C abgekühlt war (Kontrolle mit Thermometer), wurde 260mg pulverisiertes FFT (Firefly Tails) hinzugefügt. Diese Lösungen wurden anschließend dreimal für einige Sekunden homogenisiert, danach in Glasgefäße

verteilt und zentrifugiert. Dem Überstand wurden 25 µm 1M MgCl₂ zugefügt. Alle Komponenten wurden in gekühlte Aluminiumförmchen gefüllt kühl gelagert. Nach ca.15 Minuten erfolgte über 3 Minuten in Methylbutan bei -70°C ein langsames Erkalten, damit die Blöcke nicht brüchig wurden. Die Blöcke wurden verpackt und bei -70°C gelagert.

Für die substratspezifische Biolumineszenzreaktion waren alle Enzyme, Coenzyme und Cofaktoren in den Enzymblöcken enthalten. Da ATP die zu ermittelnde Größe darstellt, wurde die Substanz dem Block nicht zugefügt.

Ein gefriergetrockneter und durch Hitze inaktivierter Leber-Schnitt wurde dann mit einem Enzymblock auf einen AGFA-Film (Agfaplan 100 ASA) aufgebracht, welche dann durch die Raumtemperatur aktiviert wurden. Der Film diente dazu, die Lumineszenz zu erfassen. Die Belichtungszeit betrug 30 Sekunden.

Anschließend wurde der Film 6 Minuten entwickelt (AGFA Rodinal 40 ml auf 11 ml Leitungswasser), 7 Minuten fixiert (Superfix, Art.Nr: 100474, 100 ml auf 700 ml Leitungswasser) und 1 Minute mit Leitungswasser gespült.

Die quantitative Auswertung der durch Biolumineszenz entstandenen Schwärzung erfolgte mittels computergesteuerter Dichtemessung.

3.5 Bestimmung der Glutamin-Synthetase 1- Expression mittels Western Blot

In einer hypotonen Zell-Lyse-Puffer-Lösung wurden ca.150mg des Lebergewebes im Verhältnis 1:10 homogenisiert. Diese Zell-Lyse-Lösung enthielt 10mM TRIS (pH 7,5), 10µM Ethylendiamidtetraacetat-Säure, 0,5% Triton X-100, 0,02% Natriumacetat und 1mM Phenylmethylsulfonylfluorid.

Das Homogenat wurde zentrifugiert und die Konzentration des gelösten Proteins gemäß Bradford bestimmt. Dabei wurde ein im Handel erhältliches „DYE“-Ragenz (Protein Assay Kit II, Bio Rad, Hercules, CA) verwendet, welches als Standard Rinderserum-Albumin enthält.

Die „ALIQUOTS“ der Leberproteine (100µg/Lane) wurden durch SDS-Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese aufgetrennt. Dabei erfolgte die Denaturierung mittels NuPAGE MOPS SDS Running Puffer (Novex, San Diego, CA).

Die Proteine wurden auf Polyvinylidene-Difluoride-Membranen (Wetran, Schleicher& Schuell, Dassel, Germany) übertragen und bei 4°C bis zur GluS-1 Protein Bestimmung innerhalb der nächsten 24h gelagert.

Die unspezifischen Bindungen wurden geblockt, indem die Membran zunächst mit 5% fettarmer Trockenmilch in Tris-Puffer-Lauge/ Tween (TBST; 20 mmol/l TRIS (pH 7,5), 0,5mol/l NaCl, 0,1% Tween 20) präinkubiert wurde, und danach eine Inkubation der Membran mit monoklonalem Maus-Anti-Ratten-Glutamin-Synthetase-1-Primär-Antikörper (1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA) durchgeführt.

Nach Waschen der Membran mit TBST, wurde ein Pferd-Anti-Maus-Antikörper im Verhältnis 1:10,000 zugegeben.

Nach wiederholtem Waschen der Membran mit TBST wurden die Antigen-Antikörper-Verbindungen mittels einer Chemilumineszenz-Reaktion, gemäß den Herstellerhinweisen, sichtbar gemacht. Alle Inkubationen wurden bei Raumtemperatur durchgeführt. Das Signal wurde, nach kurzer Exposition, durch einen Blaulichtsensitiven autoradiographischen Film (Hyperfilm ECL, Amersham, Pharmacia Biotech, Braunschweig, Germany) aufgezeichnet.

3.6 Immunhistochemische Bestimmung der Glutamin-Synthetase 1

Teile der Formalin-fixierten und in Parafin eingebetteten Leber wurden dazu genutzt, die zellspezifische Glutamin-Synthetase-Expression zu bestimmen.

Die Dünnschnitte wurden einem Antigen ausgesetzt und mittels Mikrowellen angeregt. Die endogene Peroxidase-Aktivität wurde durch Inkubation mit 3%igem H₂O₂/Methanol inaktiviert. Nach der Behandlung der Leber mit einem Pferde-Serum, wurden die Segmente für 1h bei 37°C mit dem Antikörper inkubiert, der schon bei der Western-Blot-Bestimmung verwendet wurde (monoklonaler Maus-Anti-Ratten-Glutamin-Synthetase-1-Primär-Antikörper; Verhältnis 1:200; Santa Cruz Biotechnology, Inc, Santa Cruz, CA).

Als Sekundärantikörper wurde ein biotinyliertes Pferde-Anti-Maus-Antikörper für die Streptavidin-Biotin-Komplex Peroxidase Anfärbung genutzt.

Schließlich wurden 3´3Diaminobenzidine und 3%ige CoCl₂ hinzugegeben, um die Schnitte mit Hemoxiphyllin zu kontrastieren.

3.7 ATP-Bestimmung im Leberhomogenat

Es wurden nur Proben verwendet, die mit der Gefrierstopzange entnommen wurden. Die Proben wurden bis zur Bestimmung bei -80°C tiefgefroren. 100-150 mg Leber wurden abgewogen, das Gewebe dabei permanent mit flüssigem Stickstoff gekühlt und anschließend auf Eis überführt. Nach dem Abwiegen wurde das zehnfache des Volumens an 3% Sulfosalicylsäure zugefügt, sofort homogenisiert und die Probe erneut für etwa 5 Minuten auf Eis überführt. Bei 4000U/min und einer Temperatur von 4°C wurde die Probe für 10 Minuten zentrifugiert, um den klaren proteinfreien Überstand zu erhalten. Während der Zentrifugation wurden die Testreagentien vorbereitet. Zu 2mg NADH wurden 2ml 0,01 N NaOH-Lösung zugegeben, das Pulver durch Schütteln aufgelöst und auf Eis gestellt. Anschließend wurden in eine 3 ml Plastikzuvette 0,3 ml NADH-Lösung, 1,0 ml gepufferte PGA-Lösung (3-Phosphoglycerinsäure, Magnesiumionen und EDTA), 1,2ml sterile Wasser und 0,5 ml Überstand pipettiert. Die Zuvette wurde mit Parafilm abgedeckt und mehrmals gut durchmischt.

Durch Bestimmung der Extinktionsabnahme bei 340nm, die infolge der Oxidation von NADH zu NAD^+ stattfindet, wurde die ursprüngliche vorhandene ATP-Menge bestimmt.

Die anfängliche Extinktion (Anfangswert A) bei 340nm wurde gegenüber Wasser als Vergleichswert abgelesen. Der Anfangswert A sollte nicht weniger als 0,6 betragen, da ein niedriger Wert auf einen NADH-Zerfall hinwies. Dann wurden 0,04ml GAPD/PGK-Enzymgemisch (Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase/Phosphoglycerat-Phosphokinase) in die Zuvette pipettiert und erneut durchmischt. Die Proben wurden ins Photometer zurückgestellt und nach 10 min (Mindestextinktionswert) erneut die Extinktion bei 340nm gegenüber Wasser als vergleichswert (Endwert A) abgelesen. Der ATP-Gehalt konnte dann aus der Differenz zwischen dem Ausgangswert A und dem Endwert A bestimmt werden ($\mu\text{mol/g Feuchtwicht} = 0,98 \times 9,35 \times \Delta A$). Der Faktor 0,98 wird folgendermaßen bestimmt: $0,98 = \frac{3,04}{6,22} \times 0,5$ (3,04: Gesamtvolumen der Zuvette; 6,22: millimolarer Extinktionskoeffizient von NADH bei 340nm; 0,5: Probevolumen). Der Faktor 9,35 stellt den Verdünnungskoeffizienten Gewebe/Sulfosalicylsäure dar.

Testprinzip:

ATP + 3-Phosphoglycerat $\xrightarrow{\text{PGK}}$ ADP + 1,3 Diphosphoglycerat

1,3-Diphosphoglycerat + NADH $\xrightarrow{\text{GAPD}}$ Glycerinaldehyd-3-P + NAD⁺ + P

3.8 Bestimmung der Leberenzyme

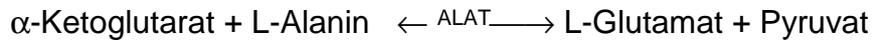
Zur Charakterisierung des Schweregrades der Einzelzellschädigung der Leber, erfolgte die Messung der Enzymaktivität von Alanin-Aminotransferase (ALAT), Aspartat-Aminotransferase (ASAT) und Glutamat-Dehydrogenase (GLDH). Mittels eines kommerziell erhältlichen Kits (Roche, Mannheim, Deutschland) wurde die Serumaktivität der Leberenzyme spektralphotometrisch bestimmt.

Untersucht wurden in allen Gruppen jeweils die Serumproben, welche zu Beginn und am Ende des Versuchszeitraumes entnommen wurden. Bis zur Analyse wurden die Proben bei -70°C aufbewahrt. Zur Serumgewinnung wurden die Blutproben für 5min bei 4000U/min zentrifugiert und das überstehende Serum abpipettiert.

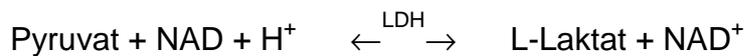
ALAT: Die Alanin-Aminotransferase gehört zur Gruppe der Transaminasen, welche durch Transfer von Aminogruppen die Umwandlung von Aminosäuren zu den entsprechenden α -Ketosäuren und umgekehrt katalysieren. Obwohl die höchsten Konzentrationen in der Leber auftreten, kommen geringere Aktivitäten der ALAT auch in der Niere, Herz, Skelettmuskel, Pankreas, Milz und Lungengewebe vor. Aktivitätserhöhungen der ALAT im Serum sind jedoch ein weitgehend spezifischer Befund für Leberparenchymschädigungen, wogegen die ASAT kein leberspezifisches Enzym ist.

Zu der jeweiligen Serumprobe wurde zunächst Puffer-Enzym-Coenzym-Gemisch (TRIS-Puffer: 280 mmol/l, pH 7,3; L-Alanin: 1400mmol/l; NADH: 0,53 mmol/l; LDH \geq 3,5U/ml; Konservierungsmittel) hinzugefügt. Anschließend wurde mit α -Ketoglutarat (94 mmol/l) der Start der Reaktion ausgelöst.

Testprinzip:



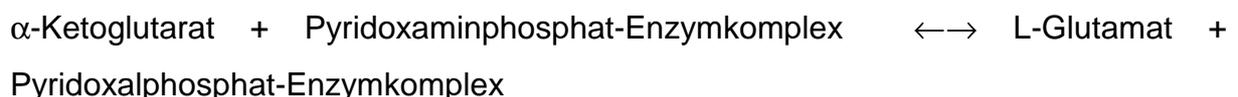
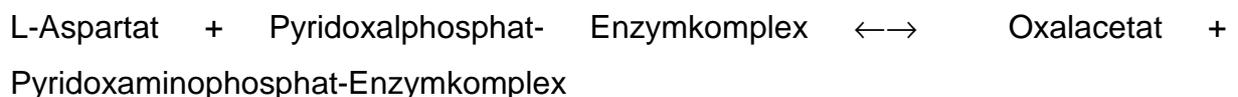
Das Enzym ALAT katalysiert diese Gleichgewichtsreaktion. Die Pyruvatzunahme wird in der gekoppelten, durch Laktat-Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion bestimmt.



Dabei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Die Geschwindigkeit der bei 340nm photometrisch gemessenen NADH-Abnahme ist direkt proportional der Bildungsgeschwindigkeit von Pyruvat und somit der ALAT-Aktivität.

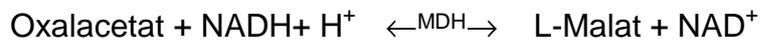
ASAT: Auch hier wurden zu den entsprechenden Serumproben zunächst ein Puffer-Enzym-Coenzym-Pyridoxalphosphat-Gemisch (TRIS-Puffer: 400mmol/l, pH 7,8, L-Aspartat: 1200 mmol/l, NADH:0,91mmol/l, MDH \geq 2,1 U/ml, LDH \geq 3,0U/ml; Pyridoxalphosphat \geq 0,52mmol/l, Konservierungsmittel) hinzugefügt. Ebenfalls wurde α -Ketoglutarat (75 mmol/l) für den Start der Reaktion benötigt.

Testprinzip:



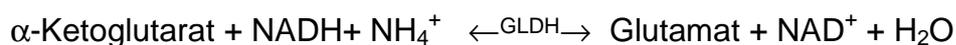
Pyridoxalphosphat dient als Coenzym für den Transfer der Aminogruppe von einer Aminosäure (Aspartat) über die entsprechende α -Ketosäure (α -Ketoglutarat), die dadurch in eine Aminosäure (L-Glutaminsäure) umgewandelt wird. Dabei entsteht das Oxalacetat. Das Hinzufügen von Pyridoxalphosphat zum Reaktionsgemisch garantiert die maximale katalytische Enzymaktivität. Die Zugabe von α -Ketoglutarat

sichert die Wiederfreisetzung von Pyridoxalphosphat, so dass die Transaminasenreaktion erneut in Gang gesetzt werden kann. Die Oxalacetatzunahme wird in der gekoppelten, durch Malat-Dehydrogenase katalysierten Indikatorreaktion bestimmt.



Dabei wird NADH zu NAD⁺ oxidiert. Die Geschwindigkeit der bei 340nm photometrisch gemessenen NADH-Abnahme ist direkt proportional der Bildungsgeschwindigkeit von Oxalacetat und somit der ASAT-Aktivität.

GLDH: Die Glutamat-Dehydrogenase ist ein weitgehend leberspezifisches Enzym, welches ausschließlich intramitochondrial lokalisiert ist und sich vorwiegend in den Azinus-zentralen Leberzellen findet. Andere Organe haben eine zu vernachlässigende GLDH-Aktivität. Die Aktivitätsbestimmungen dienen auch hier insbesondere zur Abschätzung des Schweregrades der Einzelzellschädigung. Nekrotisierende Leberschädigungen gehen mit relativ hohen GLDH-Aktivitäten im Serum einher. Zur Bestimmung der GLDH-Aktivität wurde zu den einzelnen Serumproben ein Puffer_EDTA-Ammoniumacetat-ADP-NADH-LDH-Gemisch (Triäthanolamin-Puffer: 60mmol/l; NADH:0,27 mmol/l; LDH ≥ 2,7 U/ml) hinzugefügt. Die Reaktion wurde auch hier mit α-Ketoglutarat gestartet.



Das Enzym GLDH katalysiert diese NADH-abhängige Reaktion, deren Gleichgewicht deutlich auf der Seite des Glutamat und NAD⁺ liegt. Die NADH-Abnahme ist direkt proportional der GLDH-Aktivität.

3.9 Statistische Auswertung

Die erhobenen Daten wurden als Mittelwerte mit Standardfehler des Mittelwertes (\pm S.E.M.) dargestellt. Die statistische Auswertung der Daten erfolgte nach Prüfung auf Normalverteilung (Kolmogorov-Smirnow-Test) und gleiche Varianz (Levene-Median-Test) unter Verwendung eines kommerziellen Softwarepaketes (Sigmastat[™] Jandel Scientific, San Rafael, CA, USA). Wenn die Kriterien für parametrische Testung erfüllt waren, wurde beim Vergleich zweier Gruppen der unpaare Student-t-Test verwendet. Im Falle des Vergleiches zwischen mehr als zwei Gruppen wurde nach einfaktorieller Varianzanalyse eine post-hoc Testung für multiple Vergleiche mittels des Stunden-Newman-Keuls Test vorgenommen. Der Vergleich mehrerer Zeitpunkte innerhalb der Gruppen erfolgte mittels Varianzanalyse für verbundene Stichproben und im Falle einer Signifikanz mittels post-hoc Student-Newman-Keuls test. Bei Verletzung der Kriterien für eine parametrische Testung wurden die entsprechenden verteilungsfreien Tests (Mann-Whitney-U-Test, Kruskal-Wallis-Test oder Friedman test) verwendet. Die Korrelationsanalyse erfolgte mittels „Pearson product moment correlation“ Test. Für alle statistischen Tests wurde das Signifikanzniveau auf $p < 0,05$ festgelegt.

4. Ergebnisse

4.1 Allgemeine Grundlagen

Scheinoperierte Kontrolltiere sowie Tiere, die einen hämorrhagischen Schock mit folgender Retransfusion ausgesetzt waren, wurden in gleicher Art und Weise präpariert. Alle Tiere der vier Versuchsgruppen überlebten den gesamten Versuchszeitraum.

Die Tatsache, dass in der Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere der mittlere arterielle Blutdruck, die Herzfrequenz, das Basendefizit und die Blutgase während des gesamten Experiments konstant im Normbereich lagen, spricht dafür, dass die Präparation diese Parameter nicht beeinflusste.

4.2 Hämodynamische Parameter

Als hämodynamische Parameter wurden die Herzfrequenz, der mittlere arterielle Blutdruck und das Herzzeitvolumen aufgezeichnet. Die entsprechenden Daten wurden von den Tieren aller Versuchsgruppen gewonnen.

4.2.1 Mittlerer arterieller Blutdruck

Zu Beginn des Versuches waren die Blutdruckwerte der einzelnen Gruppen vergleichbar, wobei die Ausgangswerte im Normbereich lagen.

Auch mit Beginn des hämorrhagischen Schocks, bei dem der mittlere arterielle Blutdruck für zwei Stunden bei 35-40 mmHg gehalten wurde, waren keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen zu erkennen.

Nach der Retransfusion erreichte der mittlere arterielle Druck bei den Tieren, die mit gelagertem Fremdblut und mit HAES + Perflubron reinfundiert wurden, nahezu den Ausgangswert. Auf diesem Niveau stabilisierten sie sich bis zum Versuchsende.

Nach der Retransfusion mit reiner HAES-Lösung, blieb der mittlere arterielle Druck in allen Fällen deutlich unterhalb des Ausgangsniveaus. Bei Versuchsende konnte der mittlere arterielle Druck nicht den Druck der Vergleichsgruppen erreichen.

Ein Unterschied zwischen den beiden Perfluorocarbon-Konzentrationen bezüglich des mittleren arteriellen Drucks konnte nicht beobachtet werden (Abb.5).

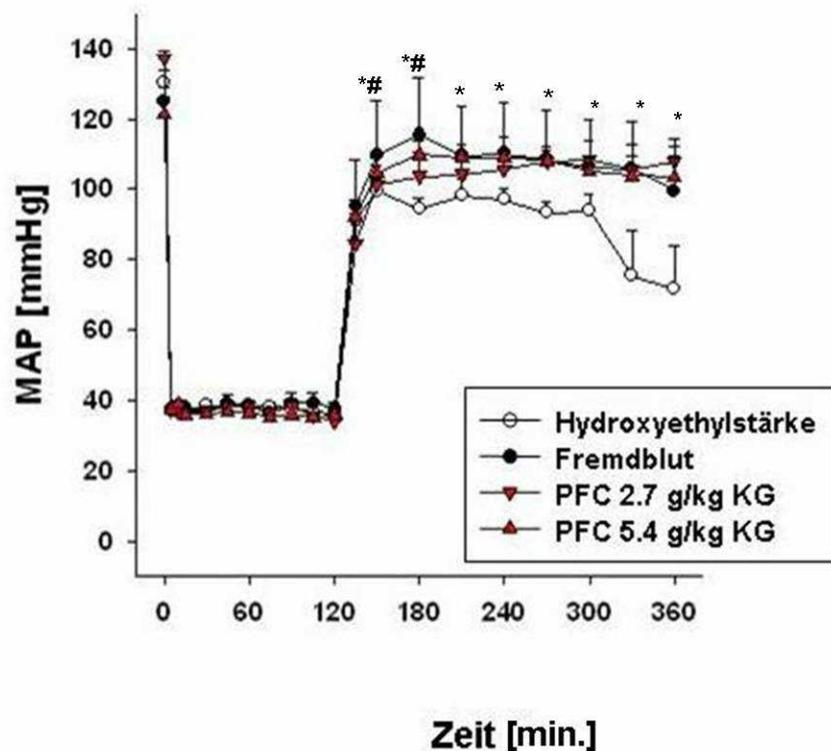


Abbildung 5 Mittlerer arterieller Druck (MAP)

Die Abbildung zeigt die MAP-Werte vor und während des hämorrhagischen Schocks, sowie während der Therapie.

Der mittlere arterielle Druck wurde durch Blutentnahme auf 35-40 mmHg abgesenkt und für 2 Stunden auf diesem Niveau gehalten. Die Therapie erfolgte durch die Gabe von gelagertem Fremdblut, HAES-Lösung oder HAES-Lösung in Kombination mit der unterschiedlich dosierten Perfluorocarbon-Emulsion (Perflubron 2,7 g/kg Körpergewicht oder Perflubron 5,4 g/kg Körpergewicht). Zusätzlich wurde allen Tieren Ringer-Lösung verabreicht. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

4.2.2 Herzzeitvolumen

Ähnlich dem Blutdruck, zeigten sich auch beim Herzzeitvolumen bei den Ausgangswerten der einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Das Ausgangsniveau lag jeweils bei ca. 150 ml/min. Während des Schocks sank das Auswurfvolumen auf ca. 50 ml/min ab.

Unmittelbar nach der Therapie mit gelagertem Fremdblut stieg das Herzzeitvolumen im Vergleich zu den Ausgangswerten um 50% an.

Wurde den Tieren nach Schock reine HAES-Lösung oder HAES-Lösung in Kombination mit Perflubron zugeführt, so überstieg das Herzzeitvolumen die Baseline-Werte um fast das Doppelte. Während das Herzminutenvolumen nach Gabe von reiner HAES-Lösung am Ende des Versuches (4 Stunden) auf Werte im Bereich des Ausgangsniveaus absank, blieb die hyperdynamische Zirkulation nach Perflubron-Gabe weiter bestehen (Abb.6).

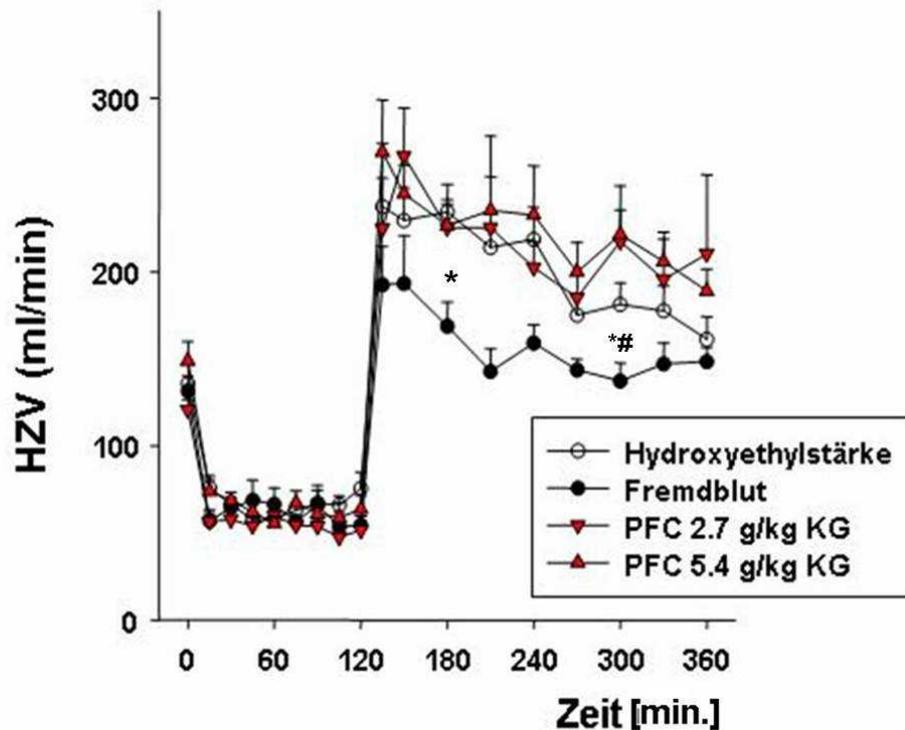


Abbildung 6 Herzzeitvolumen

Die Abbildung stellt das Herzzeitvolumen während des Schocks und der Therapiephase dar. Es wurde während des Schocks (Mittlerer arterieller Druck (MAP) 35-40 mmHg für 2 Stunden) und in der Therapiephase über transpulmonale Thermodilution gemessen. Die Therapie erfolgte durch die Gabe von gelagertem Fremdblut, HAES-Lösung oder HAES-Lösung in Kombination mit der Perfluorocarbon-Emulsion (PFC 2,7 g/kg Körpergewicht oder PFC 5,4 g/kg Körpergewicht). Zusätzlich wurde allen Tieren Ringer-Lösung verabreicht. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

4.3 Hämatokrit, Blutgase, Basendefizit und pH-Wert

Hämatokrit, Säure-Basen-Status, Blutgase, Basendefizit und pH-Wert wurden zu Versuchsbeginn, nach der Schockphase (2h, 35-40 mmHg) oder 2 Stunden nach Präparationsende (bei den Kontrolltieren) und zum Ende des Versuchs (6h) gemessen. Die Gruppen sind nach Arten der Therapie aufgeteilt. Die Therapie erfolgte durch die Gabe von gelagertem Fremdblut (n=8), HAES-Lösung (n=8) oder HAES-Lösung in Kombination mit der Perfluorocarbon-Emulsion (PFE 2,7 g/kg Körpergewicht (n= 8) oder 5,4 g/kg Körpergewicht (n= 8)). Zusätzlich wurde allen Tieren Ringer-Lösung verabreicht.

Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

4.3.1 Hämatokrit

Das Ausgangsniveau des Hämatokrit-Wertes ist bei allen Versuchsgruppen vergleichbar und für Ratten im Normbereich. Nach hämorrhagischem Schock sank der Hämatokrit ab. Im Vergleich zu den anderen Therapiegruppen kam es nach der Substitution von gelagertem Fremdblut zu einem Anstieg des Hämatokrit-Wertes. Dieser schwankte zwischen 20-29%. Verglichen mit den anderen Therapiegruppen kam es nach Transfusion von gelagertem Fremdblut (Fremdblut) zu einem Anstieg des Hämatokrits von ungefähr 9 Prozentpunkten. Nach der Substitution von HAES-Lösung blieb der Hämatokrit vergleichbar mit dem Wert nach hämorrhagischem Schock, wobei keine Unterschiede zu HAES und HAES in Kombination mit Perfluorocarbon bestand (Abb.7).

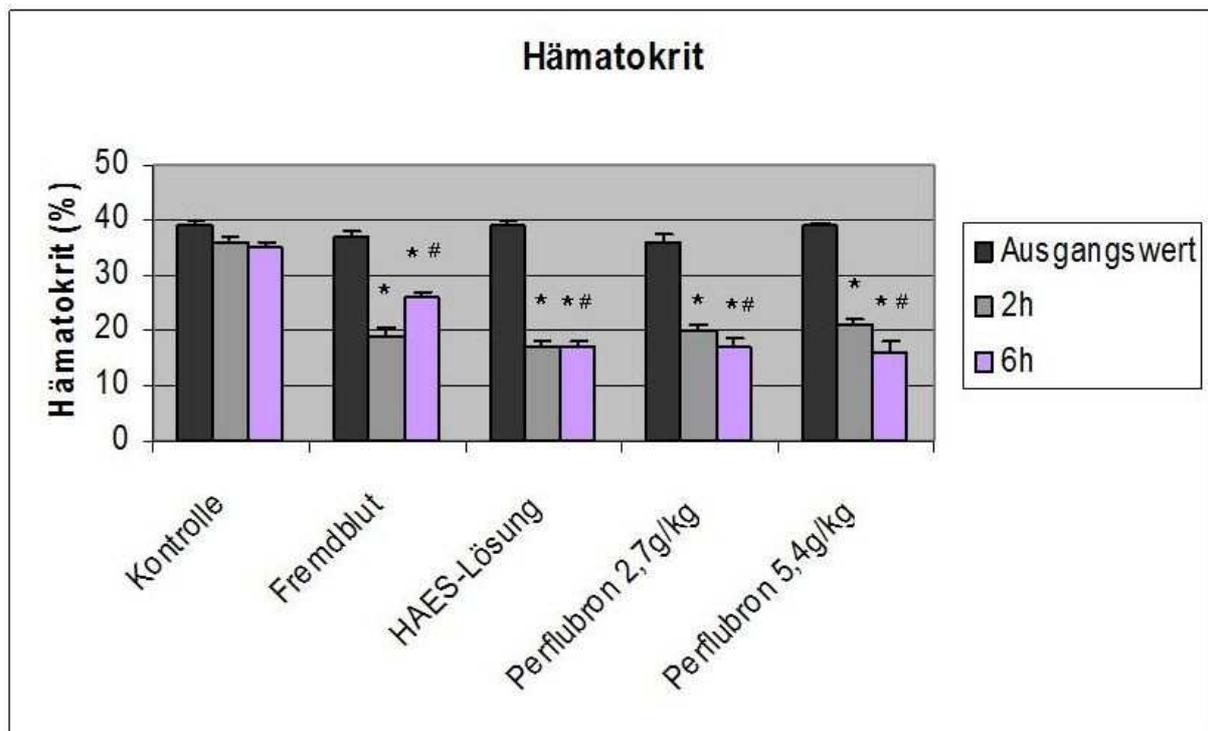


Abbildung 7 Hämatokrit (%)

Die Abbildung zeigt den Hämatokrit der einzelnen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn, nach der Schockphase (2h, 35-40 mmHg) oder 2 Stunden nach Präparationsende (bei den Kontrolltieren) und zum Ende des Versuchs (6h).

Die Gruppen wurden nach Art der Therapie aufgeteilt. Die Therapie erfolgte durch die Gabe von gelagertem Fremdblut (n=8), HAES-Lösung (n=8) oder HAES-Lösung in Kombination mit der Perfluorocarbon-Emulsion (PFE 2,7 g/kg Körpergewicht (n= 8) oder 5,4 g/kg Körpergewicht (n= 8)). Zusätzlich wurde allen Tieren Ringer-Lösung verabreicht. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* $p < 0,05$ Vergleich zu der Kontrolle-Gruppe

$p < 0,05$ Vergleich zu der Gruppe der Therapie mit gelagertem Fremdblut

4.3.2 Arterieller Sauerstoffpartialdruck (pO₂)

Zu Beginn des Versuchs zeigen die Werte der einzelnen Gruppen keine signifikanten Unterschiede. Der Sauerstoffpartialdruck lag zwischen 70 und 80mmHg.

Auch nach Schock waren die Werte zwischen den einzelnen Gruppen vergleichbar.

Bei den Tieren, welche einem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden, lag der Sauerstoff-Partialdruck nach zwei Stunden deutlich höher, als bei der Kontroll-Gruppe.

In der Kontrolle des Sauerstoffpartialdruckes nach 6 Stunden ergaben sich keine nennenswerten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Unter der Beatmung mit 100% Sauerstoff glich sich der Sauerstoffpartialdruck zwischen allen Gruppen an. Die Werte lagen zwischen 370 und 420mmHg.

Die unterschiedlichen Therapiegruppen zeigen bezüglich der pO₂ Werte keine signifikanten Unterschied (Abb.8).

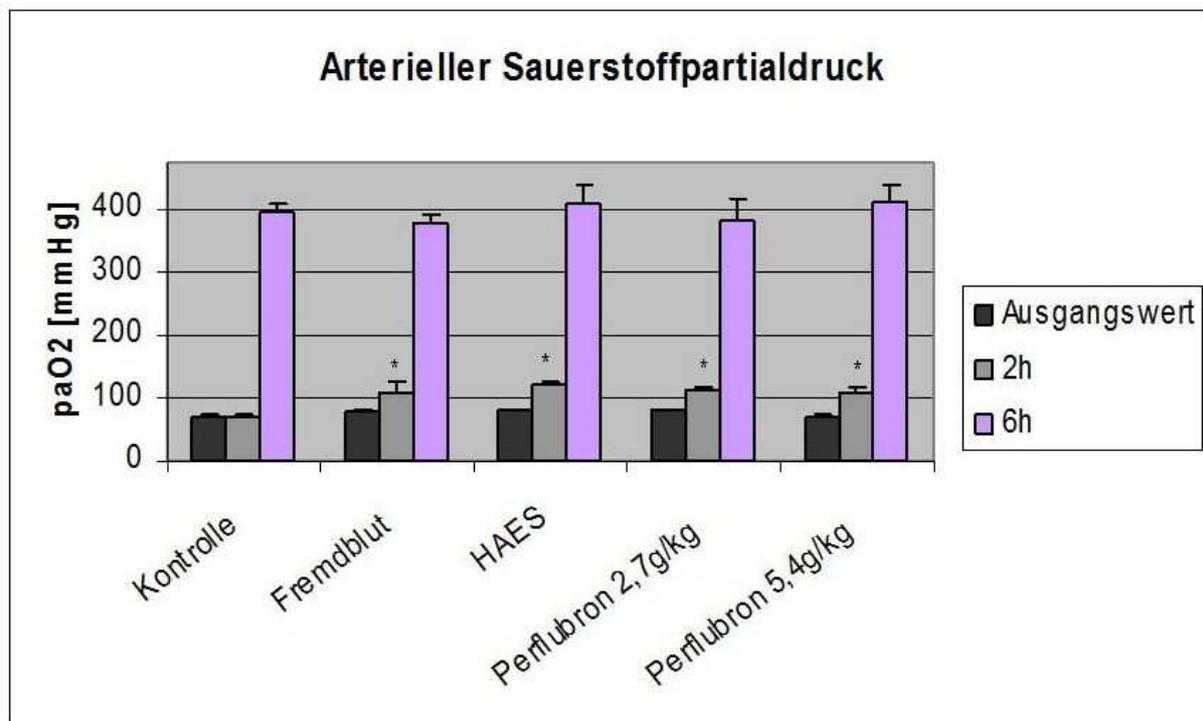


Abbildung 8 Sauerstoffpartialdruck

Die Abbildung stellt die Sauerstoffpartialdrücke der verschiedenen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn, nach der Schockphase (2h, 35-40 mmHg) oder 2 Stunden nach Präparationsende (bei den Kontrolltieren) und zum Ende des Versuchs (6h) dar. Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* p < 0,05 Vergleich zu der Kontrolle-Gruppe

p < 0,05 Vergleich zu der Gruppe der Therapie mit gelagertem Fremdblut

4.3.3 Arterieller Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂)

Die Ausgangswerte aller Gruppen sind vergleichbar. Während des hämorrhagischen Schocks kam es, als Folge der Hyperventilation, zu einem Abfall des Kohlenstoffdioxidpartialdrucks in allen Schockgruppen.

Nach zweistündigem Schock lagen die Werte zwischen 17 und 20 mmHg. Im Vergleich dazu betrug der pCO₂ der Kontrollgruppen aufgrund der fehlenden Hyperventilation 40 mmHg.

Nach 6 Stunden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den einzelnen Gruppen. Der pCO₂ lag zwischen 32 und 38 mmHg und war damit nahezu mit den Ausgangswerten vergleichbar (Abb.9).

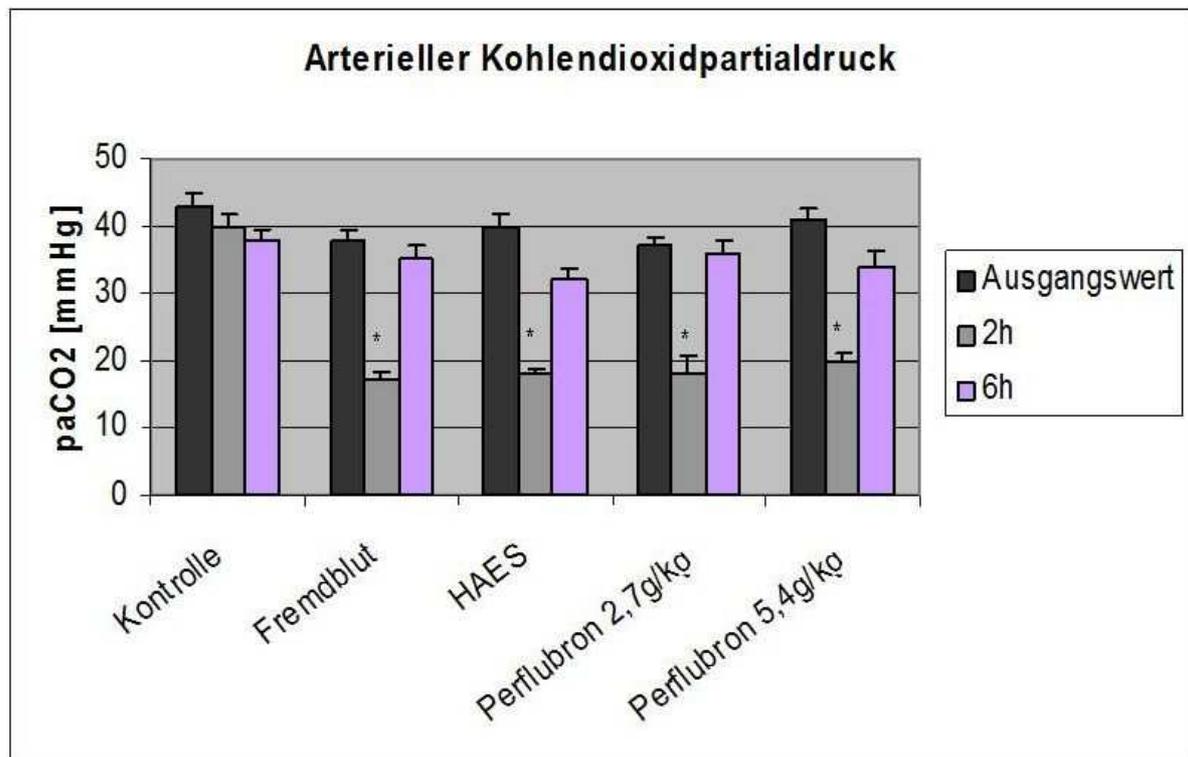


Abbildung 9 Kohlendioxidpartialdrücke

Die Abbildung zeigt den Kohlendioxidpartialdruck der unterschiedlichen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn, nach der Schockphase (2h, 35-40 mmHg) oder 2 Stunden nach Präparationsende (bei den Kontrolltieren) und zum Ende des Versuchs (6h). Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* p < 0,05 Vergleich zu der Kontrolle-Gruppe

p < 0,05 Vergleich zu der Gruppe der Therapie mit gelagertem Fremdblut

4.3.4 Basendefizit

Als Indikator für die ischämische Schädigung der Organe und Parameter zur Beurteilung des Schweregrades des Schockzustandes gilt die Basenabweichung.

Die Ausgangswerte der einzelnen Gruppen waren vergleichbar.

Am Ende der Schockphase (nach 2 Stunden) wurden die Parameter erneut bestimmt. Sie zeigten im Vergleich zur Kontrollgruppe deutliche Unterschiede.

Bei allen Schocktieren konnte hierbei ein ausgeprägtes Basendefizit verzeichnet werden.

Nach Ende der Reperfusionstherapie wurde eine erneute Bestimmung des Basendefizits vorgenommen.

Dabei zeigte der Parameter zwischen den einzelnen Gruppen kaum Unterschiede. In Abhängigkeit der Perflubron-Dosierung war das Basendefizit bei der höher dosierten Perflubron-Emulsion ($2,1 \pm 3,4$ mmol/l) tendenziell etwas geringer ausgeprägt als in der Gruppe der Tiere die mit gelagertem Fremdblut ($4,4 \pm 2,0$ mmol/l) oder der niedrigdosierten Perflubron-Dosierung ($3,1 \pm 2,7$ mmol/l) behandelt wurden. Der Unterschied ist jedoch statistisch nicht signifikant.

In allen Gruppen regenerierten sich die Werte fast auf das Ursprungsniveau. Sie lagen nach der Gabe der unterschiedlich konzentrierten Perflubron-Lösung leicht höher als die der anderen Reperfusionlösungen (Abb.10).

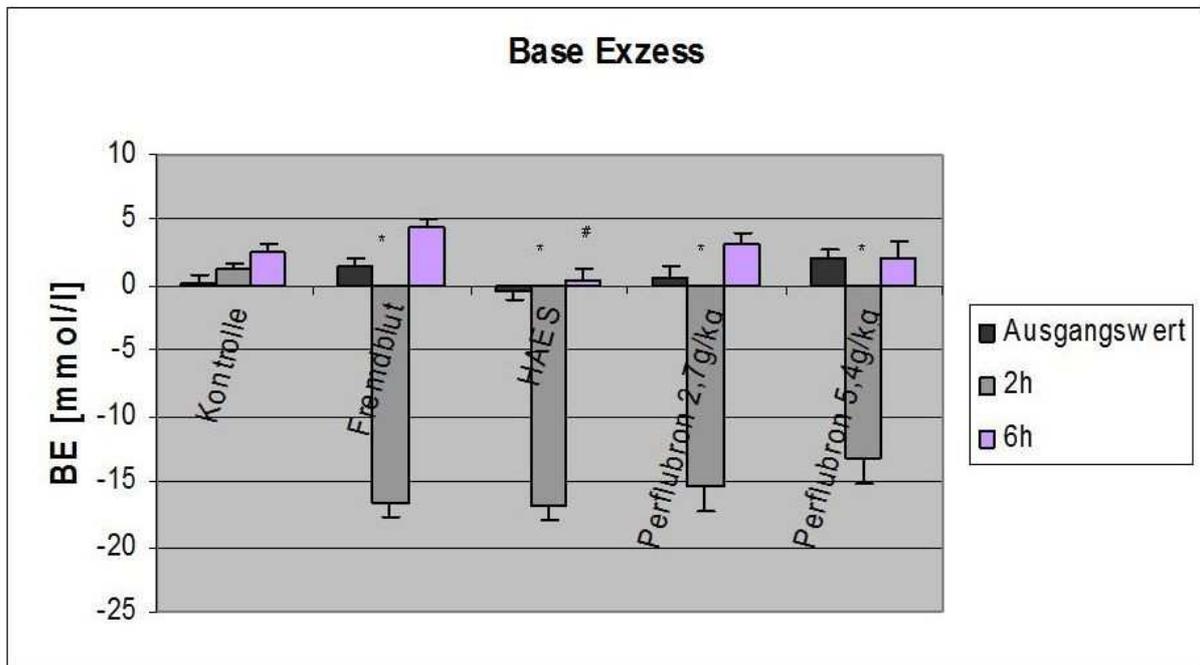


Abbildung 10 Basendefizit

Die Abbildung zeigt das Basendefizit der unterschiedlichen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn, nach der Schockphase (2h) oder 2 Stunden nach Präparationsende (bei den Kontrolltieren) und zum Ende des Versuchs (6h).

Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* $p < 0,05$ Vergleich zu der Kontrolle-Gruppe

$p < 0,05$ Vergleich zu der Gruppe der Therapie mit gelagertem Fremdblut

4.3.5 pH-Wert

Die Ausgangswerte der unterschiedlichen Therapiegruppen waren mit der Kontrollgruppe vergleichbar.

Im Vergleich zur Kontrollgruppe waren die pH-Werte nach hämorrhagischen Schock diskret verändert ($\pm 7,33$). Zwischen den einzelnen Gruppen gab es keine Unterschiede.

Nach der Reperfusionphase stimmten die pH-Werte in allen Gruppen überein (Abb.11).

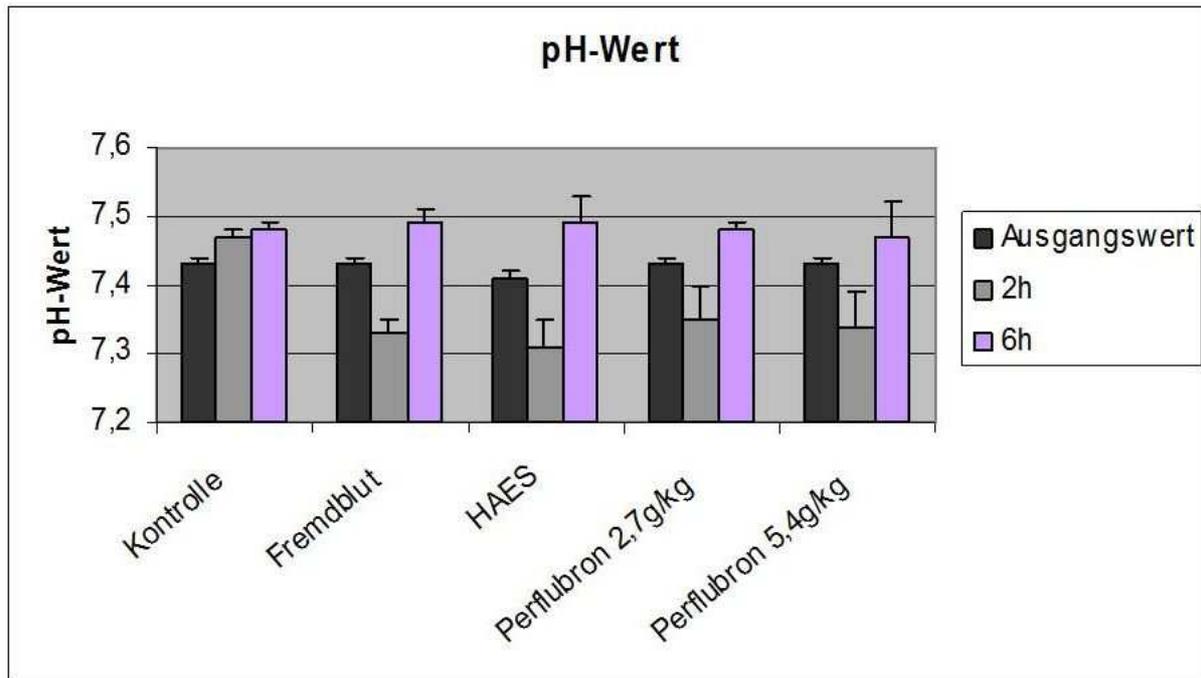


Abbildung 11 pH-Wert

Die Abbildung stellt den pH-Wert der unterschiedlichen Versuchsgruppen zu Versuchsbeginn, nach der Schockphase (2h, 35-40 mmHg) oder 2 Stunden nach Präparationsende (bei den Kontrolltieren) und zum Ende des Versuchs (6h) dar.

Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* $p < 0,05$ Vergleich zu der Kontrolle-Gruppe

$p < 0,05$ Vergleich zu der Gruppe der Therapie mit gelagertem Fremdblut

4.4. Wirkung der Reperfusion auf den hepatozellulären ATP-Gehalt nach hämorrhagischem Schock

In den folgenden Abbildungen ist der ATP-Gehalt nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion mit gelagertem Fremdblut oder HAES-Lösung mit oder ohne Perflubron-Emulsion dargestellt. Schwerer hämorrhagischer Schock und asanguinöse Volumentherapie oder auch die Gabe gelagerter Erythrozytenkonzentrate führten zu einer persistierenden Störung des Energiestoffwechsels. Die regionale ATP-Verteilung im Lebergewebe nach hämorrhagischem Schock ist dabei abhängig von der Art des Therapieregimes.

4.4.1. Enzymatische Bestimmung des ATP-Gehaltes im Leberhomogenat

Die enzymatische Bestimmung des ATP-Gehaltes im Leberhomogenat wurde am Ende des Versuches für feuchtes und trockenes Gewebe durchgeführt.

Nach der Reperfusion mit gelagertem Fremdblut und reiner HAES-Lösung lagen die bestimmten ATP-Werte sowohl für Trockengewebe als auch für das Feuchtgewebe deutlich unterhalb des der scheinoperierten Kontrollgruppe.

Wurde nach zweistündigem Schock die niedrigdosierte Perflubron-Emulsion perfundiert, konnten im Lebergewebe ein ATP-Gehalt gemessen werden, welcher sich auf dem Niveau der Kontrollgruppe bewegte.

Im Vergleich dazu lagen die gemessenen ATP-Werte nach Gabe von hochdosierter Perflubron-Lösung deutlich über dem der scheinoperierten Kontrolltiere und der niedrigdosierten Emulsion (Abb. 12).

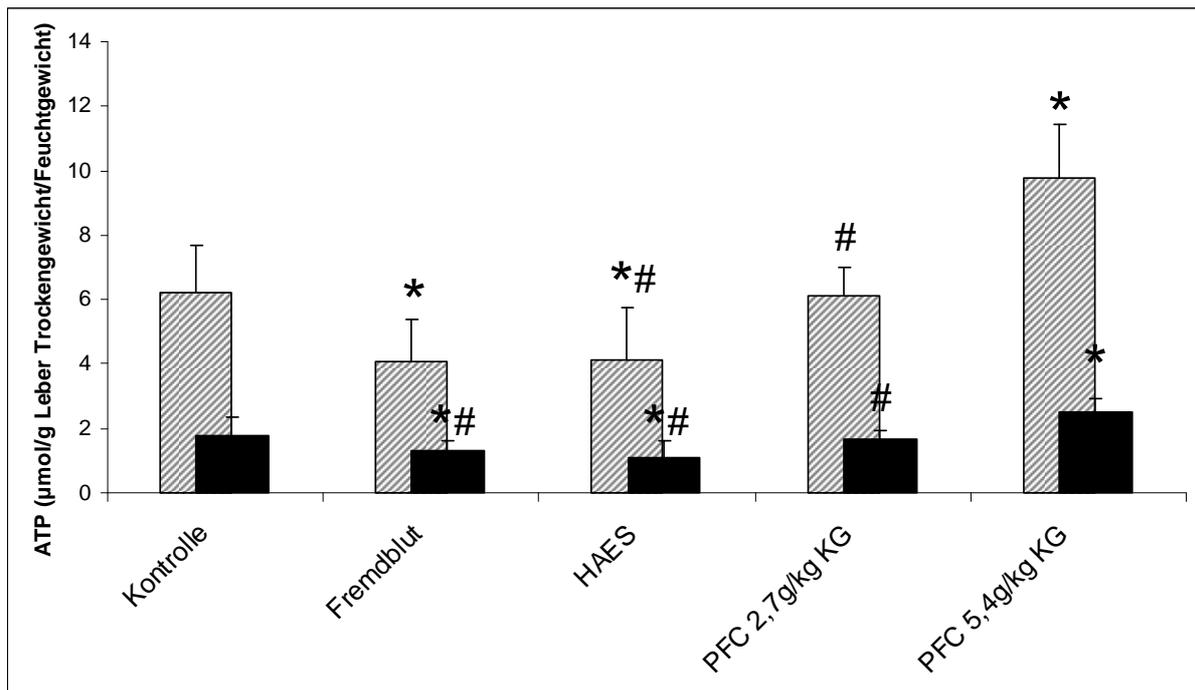


Abbildung 12 Enzymatisch gemessener-ATP-Gehalt im Leberhomogenat

Die Abbildung zeigt den enzymatisch gemessenen ATP-Gehalt im Lebergewebe für Feuchtgewebe (schwarze Felder) und für Trockengewebe (schraffierte Felder) der einzelnen Therapiegruppen zum Versuchsende (Schockphase (2h, 35-40 mmHg) oder 2 Stunden nach Präparationsende (bei den Kontrolltieren) mit sechsständiger Therapiephase). Die Gruppen wurden nach scheinoperierten Kontrolltieren (n= 8) und nach Art der Therapie aufgeteilt. Die Therapie erfolgte durch die Gabe von gelagertem Fremdblut (n=8), Hydroxyethylstärke-Lösung (n=8) oder Hydroxyethylstärke-Lösung in Kombination mit der unterschiedlich dosierten Perflubron-Emulsion (PFE 2,7 g/kg Körpergewicht (n=8) oder 5,4 g/kg Körpergewicht (n= 8)).

Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* p< 0,05 Vergleich zu der Kontrolle-Gruppe

p< 0,05 Vergleich zu der Gruppe der Therapie mit gelagertem Fremdblut

4.4.2. Bestimmung des ATP-Gehaltes mittels Biolumineszenz-Methode

Mit Hilfe einer Biolumineszenz-Methode wurde die regionale Verteilung des ATP-Gehaltes im Dünnschnitt semiquantitativ ausgewertet.

Die Tiere gehörten einer scheinoperierten Kontrollgruppe (A) an oder wurden einem zweistündigen hämorrhagischen Schock unterzogen.

Die Tiere der Gruppe (B) wurden mit gelagertem Fremdblut, die Gruppe (C) Hydroxyethylstärke-Lösung, Gruppe (D) HAES+ 2,7g/kg Perflubron und die Gruppe (E) HAES+ 5,4g/kg Perflubron reperfundiert.

Die Abbildung (A) demonstriert die Leber eines Kontrolltieres, welche keinem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden. Es zeigt eine relativ homogene ATP-Verteilung über den gesamten Leberlappen.

Nach hämorrhagischem Schock und der Substitution von gelagertem Fremdblut (B) kommt es zu einer inhomogeneren ATP-Verteilung, wobei nach Reperfusion nicht in allen Abschnitten des Leberlappens wieder ein ATP-Gehalt erreicht wurde, welcher mit den Ausgangsbedingungen, d.h. der Kontrollgruppe vergleichbar ist.

Die ATP-Werte, die nach Schock durch alleinige Gabe von Hydroxyethylstärke (C) am Ende der Reperfusion gemessen wurden, lagen erheblich unter denen der Kontrollgruppe. In einigen Arealen zeigt sich eine völlige Erschöpfung des ATP-Gehaltes. Auch bei dieser Gruppe wird eine inhomogene Verteilung der gemessenen ATP-Konzentration innerhalb des Leberlappens deutlich.

Erfolgte die Therapie des hämorrhagischen Schocks mit der niedrigdosierten Perflubron-Lösung (D), so konnte eine homogene Verteilung des ATP-Gehaltes in dem Leberlappen erreicht werden. Der Anteil an gemessenem ATP in den Leberläppchen entspricht dem der scheinoperierten Kontrolltiere

In der letzten Gruppe wurde eine Reperfusionstherapie mit der höherdosierten Perfluorocarbonkonzentration (5,4 g/kg Körpergewicht) durchgeführt. Die Biolumineszenz-Methode zeigt im Vergleich zu den anderen Therapiegruppen und vereinbar mit den Messungen im Homogenat deutlich höhere ATP-Werte in der Leber. Nach hämorrhagischem Schock und einer Therapie mit der hochdosierten Perflubron-Emulsion stellt sich eine homogene ATP-Verteilung im gesamten Leberläppchen dar, welche mit der Kontrollgruppe vergleichbar ist. In einigen Bereichen liegen die gemessenen ATP-Werte sogar im supranormalen Bereich (Abb.13).

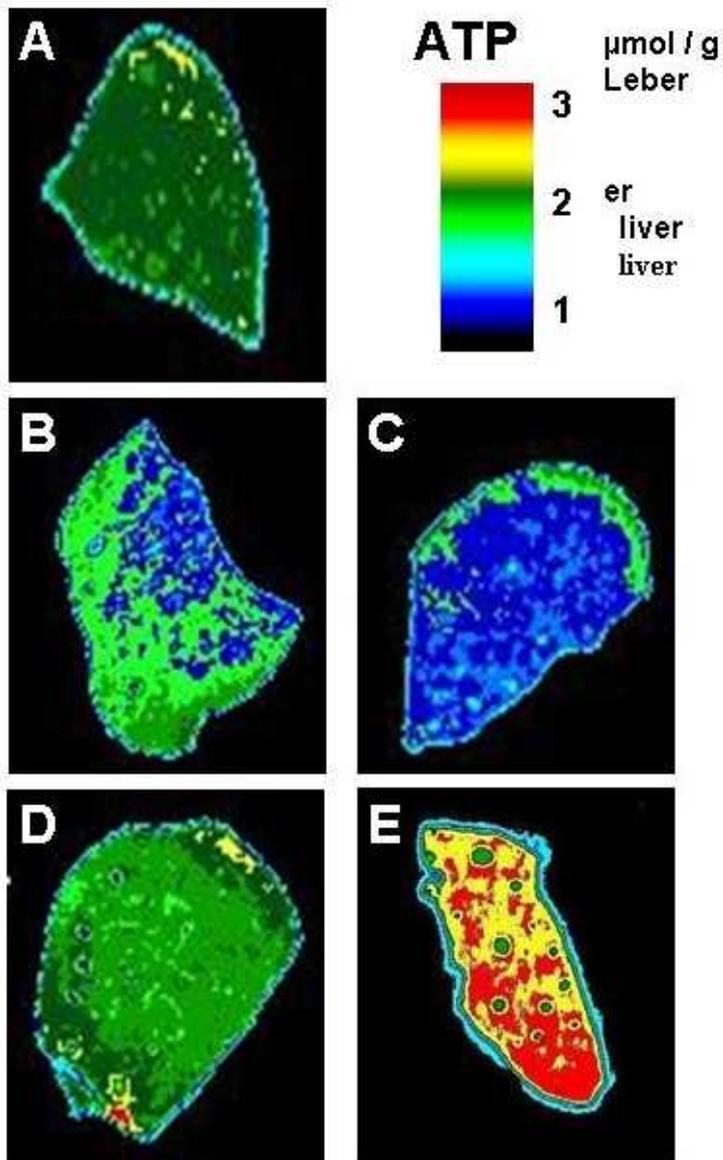


Abbildung 13 Verteilung des hepatischen Adenosintriphosphat (ATP)- Gehaltes nach Schock und Reperfusion

Das regionale Verteilungsmuster der hepatischen ATP-Konzentration nach Schock und Therapie wurde semiquantitativ in Dünnschnitten eines Leberläppchens dargestellt, mittels ATP-Biolumineszenzmethode quantifiziert.

Die Lebern der scheinoperierten Kontrolltiere (A) zeigten eine homogene Verteilung des ATP-Gehaltes über den gesamten Leberlappen. Nach der Therapie mit gelagertem Fremdblut (B) oder Hydroxyethylstärke-Lösung (C) wurde eine heterogene ATP-Verteilung, die auch Areale vollständigen Fehlens von ATP zeigen, dargestellt. Die Therapie mit der niedrigdosierten Perflubron-Emulsion (D) führte zu einer Wiederherstellung des ATP-Gehaltes nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion und einer nahezu homogenen Verteilung des ATP-Gehaltes, welche mit dem ATP-Gehalt der Kontrollgruppe vergleichbar ist. Die Therapie mit der hochdosierten Perfluorcarbondsosis (5,4 g/kg Körpergewicht) führt zu einem homogenen Anstieg der ATP-Konzentration über den gesamten Leberlappen, welcher die Werte der Kontrollgruppe wesentlich übersteigt.

4.5. Geneexpression der Glutamin-Synthetase-1 nach unterschiedlicher Reperfusion

4.5.1. Expression der Glutamin-Synthetase-1 (GluS-1) im Leberhomogenat

Der Nachweis des immunreaktiven Proteins Glutamin-Synthetase-1 (GluS-1) erfolgte am Ende des Versuchs mittels Western-Blot.

Die Abbildung 13 zeigt im oberen Teil die Darstellung des Western Blots mit zwei repräsentativen Beispielen für jede einzelne Gruppe. Im unteren Teil ist die densitometrische Analyse der Glutamin-Synthetase-1-Expression dargestellt. Unterteilt wurden die Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere und die Gruppen der unterschiedlichen Therapieregimes. Die Therapie erfolgte mit gelagertem Fremdblut, Hydroxyethylstärke-Lösung sowie mit Perflubron-Emulsion in unterschiedlicher Dosierung.

Ein hämorrhagischer Schock mit anschließender Substitution von gelagertem Fremdblut oder Hydroxyethylstärke führt zu einem deutlichen Anstieg der Glutamin-Synthetase-1-Expression. Im Western Blot zeigte sich eine Intensivierung des entsprechenden Signals in beiden Gruppen. Im Vergleich zu der Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere stellte sich in der densitometrischen Analyse eine Verdopplung der Glutamin-Synthetase-1-Expression dar.

Durch eine Therapie mit der niedrig- oder hochdosierten Perflubron-Emulsion konnte eine Zunahme der Glutamin-Synthetase 1-Expression vermieden werden. Sowohl die Darstellung durch den Western-Blot, als auch die Quantifizierung der Glutamin-Synthetase-1-Expression durch densitometrische Analyse bildet Werte ab, die mit denen der scheinoperierten Kontrollgruppe vergleichbar sind (Abb.14).

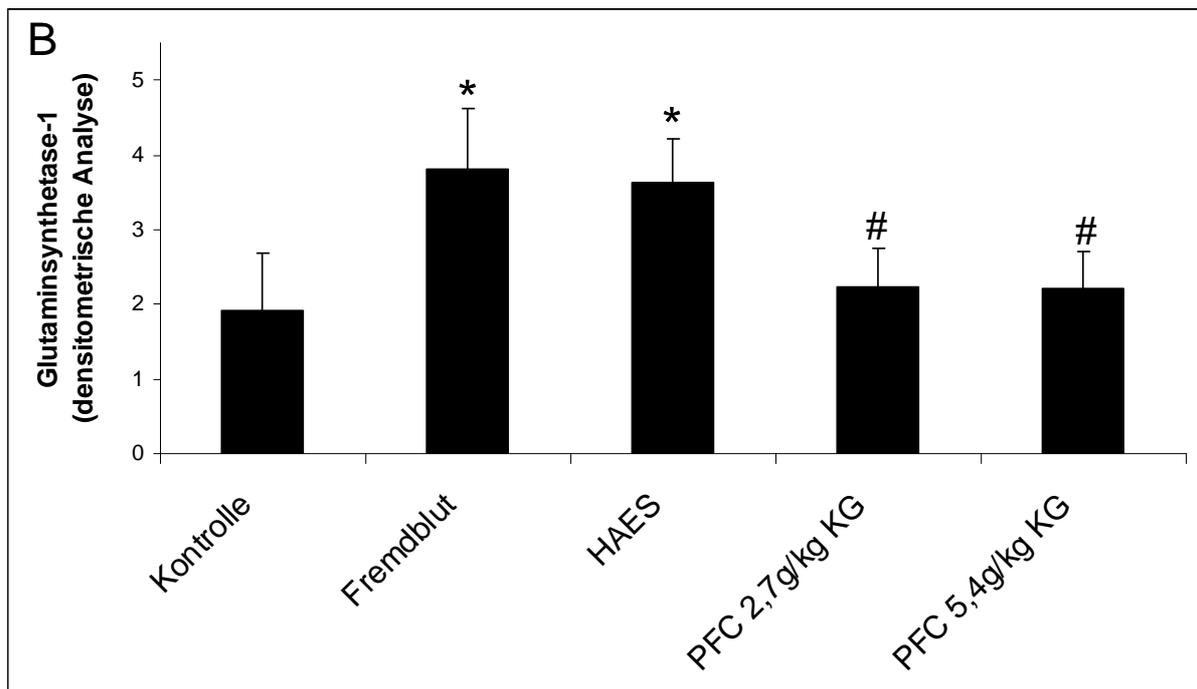
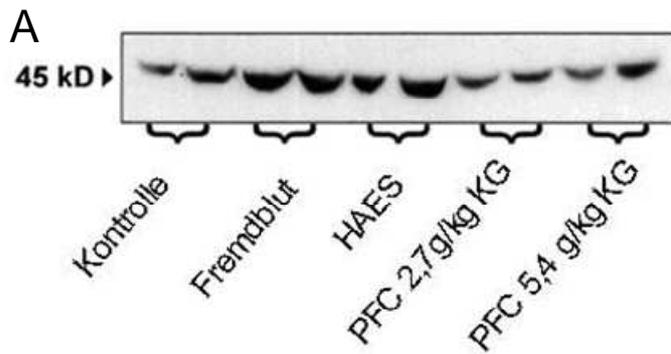


Abbildung 14 Darstellung der Expression der Glutamin-Synthetase-1 (GluS-1) im Leberhomogenat durch Western Blot und densitometrische Analyse

Im oberen Teil (A) zeigt die Abbildung die Darstellung der Expression der Glutamin-Synthetase durch den Western Blot mit zwei repräsentativen Beispielen zu jeder Gruppe. Die untere Abbildung (B) stellt die densitometrische Analyse der Glutamin-Synthetase-1-Expression im Lebergewebe dar. Die Therapie erfolgte durch die Gabe von gelagertem Fremdblut, Hydroxyethylstärke und Hydroxyethylstärke in Kombination mit der Perflubron-Emulsion (PFC 2,7 g/kg Körpergewicht oder 5,4 g/kg Körpergewicht). Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* $p < 0,05$ Vergleich zu der Kontrolle-Gruppe

$p < 0,05$ Vergleich zu der Gruppe der Therapie mit gelagertem Fremdblut

4.5.2. Immunhistochemischer Nachweis der Leberhypoxie durch Bestimmung der Glutamin-Synthetase-1 in Lebersemidünnschnitten

Der immunhistochemische Nachweis der Leberhypoxie erfolgte nach hämorrhagischer Hypotension und Reperfusion mittels paraffineingebetteten, entwachsenen Lebersemidünnschnitten. Es wurde ein Maus-Anti-Ratten-Antikörper zur Markierung verwendet, um die Glutamin-Synthetase-1 (Glu-S-1) darzustellen.

Der Leberschnitt der scheinoperierten Kontrolltiere zeigt in Abbildung (A) eine Leberstruktur ohne Zeichen eines Leberschadens. Hier ist die immunreaktive Glutamin-Synthetase-1 auf eine Hepatozytenzellreihe um die Zentralvene beschränkt.

Ein nahezu zweifacher Anstieg des Glutamin-Synthetase-1-Immunreaktiven-Proteins wurde nach Therapie mit gelagertem Fremdblut (Abb. B) und Hydroxyethylstärke-Lösung (Abb. C) beobachtet. Die Glu-S-1 ist nicht mehr auf eine Zellreihe um die Zentralvene begrenzt, sondern breitet sich in mehreren Zellreihen analog der zunehmenden Hypoxie um die Zentralvene aus.

Nach der Therapie mit Hydroxyethylstärke in Kombination mit 2,7g/kg oder 5,4g/kg Perflubron spiegelt die Glutaminsynthetase-1 ein physiologisches Expressionsmuster wider. Ebenso wie bei den scheinoperierten Kontrolltieren ist das Glu-S-1-Protein nach Therapie mit Perfluorocarbonzusatz in nur einer Zellreihe um die Zentralvene nachweisbar (Abb.15).

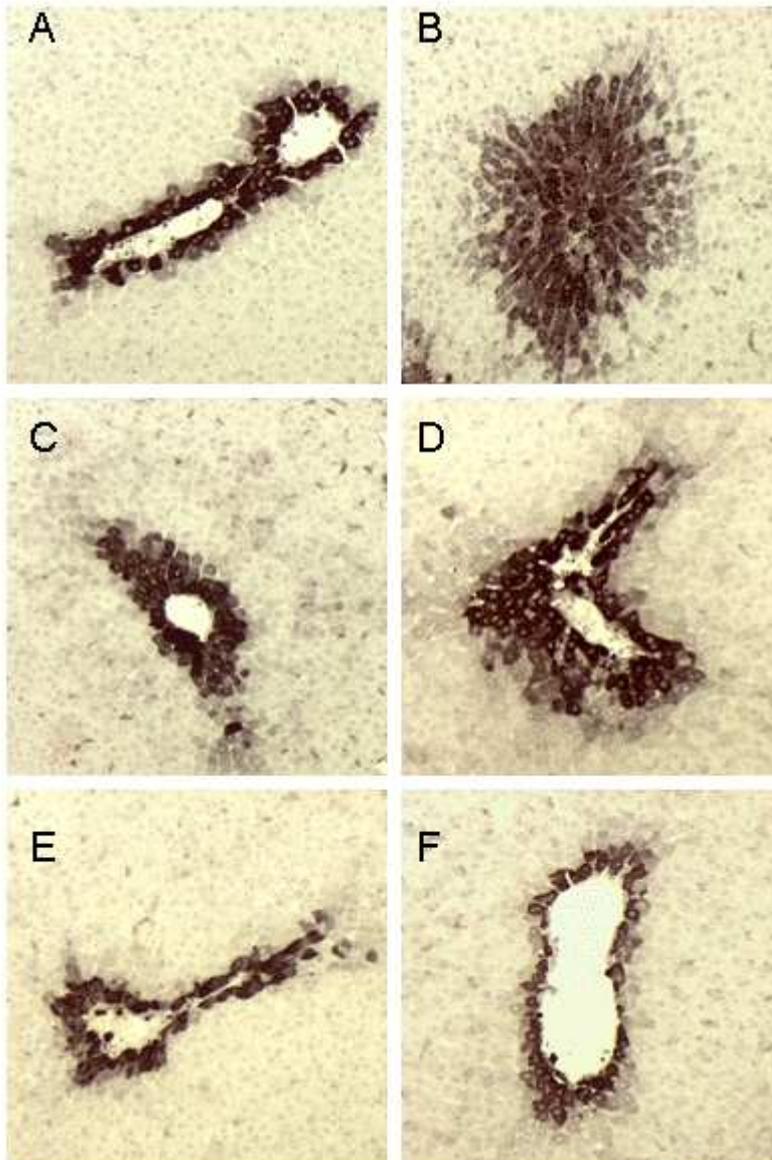


Abbildung 15 Immunhistochemischer Nachweis der Leberhypoxie durch Bestimmung der Glutaminsynthetase-1 in Lebersemidünnschnitten

Abbildung (A) zeigt das immunreaktive Protein Glutamin-Synthetase-1 (GluS-1) in der Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere. Das Protein ist dabei auf eine Reihe um die Zentralvene begrenzt. Die Abbildung (B) zeigt die Leber nach der Therapie mit gelagertem Fremdblut und (C) mit reiner Hydroxyethylstärke-Lösung (D). Beide Fälle führten zu einer Induktion der Glutamin-Synthetase-1-Expression in den perizentralen Hepatozyten.

Die Therapie mit der niedrigdosierten Perflubron-Emulsion (2,7 g/kg Körpergewicht) (E), als auch mit der hochdosierten Perflubron-Emulsion (5,4 g/kg Körpergewicht) (F) führt zu einem physiologischen Muster der Glutamin-Synthetase 1-Expression, welche mit jener der Kontrollgruppe vergleichbar ist.

4.6. Hepatozellulärer Schaden nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion

Um das Ausmaß des hepatozellulären Schadens zu quantifizieren, wurden nach hämorrhagischem Schock und Reperfusion die Plasmaaktivität der Alanin-Aminotransferase (ALT), der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Glutamatdehydrogenase (GLDH) bestimmt.

Der prolongierte Schock mit anschließender Reperfusion führte im Vergleich zu den scheinoperierten Tieren in allen Gruppen zu einer erhöhten Freisetzung der leberspezifischen Enzyme.

Zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen zeigten sich keine signifikanten Konzentrationsunterschiede für diese Parameter.

Ein wichtiger Parameter zur Quantifizierung des ischämischen hepatozellulären Schadens ist die Glutamat-Dehydrogenase (GLDH), ein Enzym der mitochondrialen Matrix.

Die Glutamat-Dehydrogenase-Konzentration war sowohl nach der Therapie mit Hydroxyethylstärke-Lösung, als auch nach Verabreichung der niedrigdosierten und hochdosierten Perflubron-Emulsion vergleichbar.

Im Gegensatz zu den anderen Therapiegruppen weist die Glutamat-Dehydrogenase nach Gabe von gelagertem Fremdblut im Mittel eine nahezu doppelt so hohe Serumaktivität auf (Abb.16/17/18).

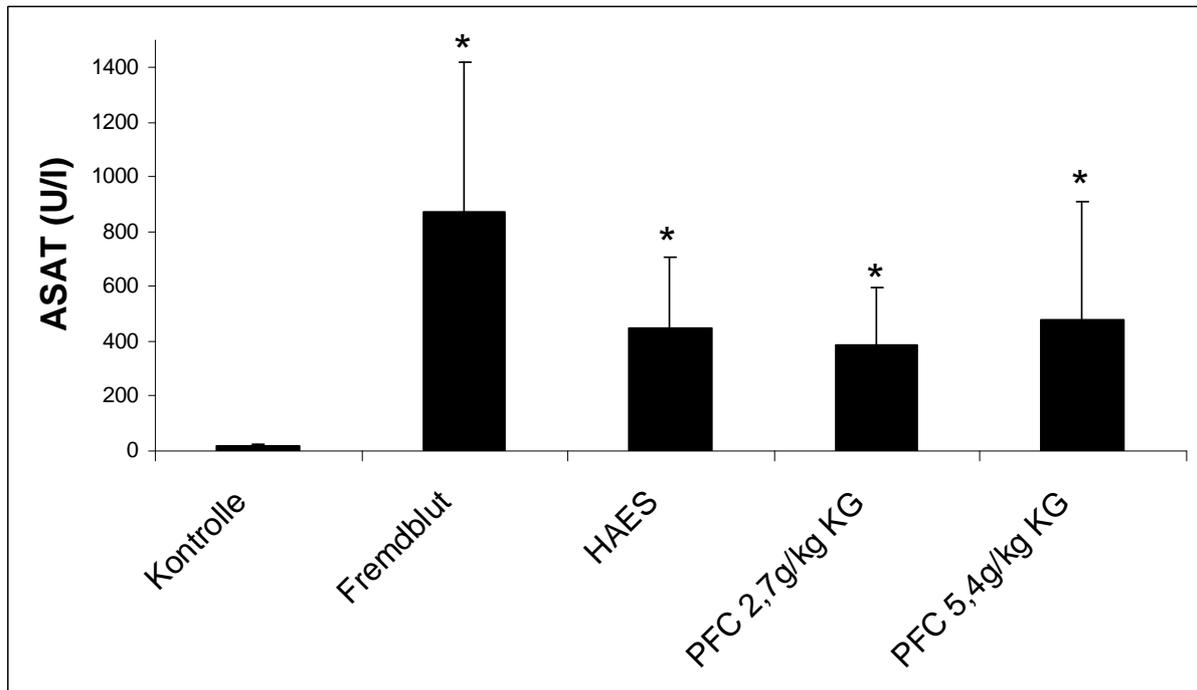


Abbildung 16 Serumenzymkonzentration der Aspartat-Aminotransferase (ASAT)

Die Serumaktivität der AST wurde nach hämorrhagischem Schock und jeweiliger Therapie gemessen, um den hepatozellulären Schaden zu quantifizieren.

Im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren zeigt sich in allen Therapiegruppen ein deutlicher Anstieg der Plasmaaktivität der Aspartat-Aminotransferase.

Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren

$p < 0,05$ im Vergleich zu der Therapie mit gelagertem Fremdblut

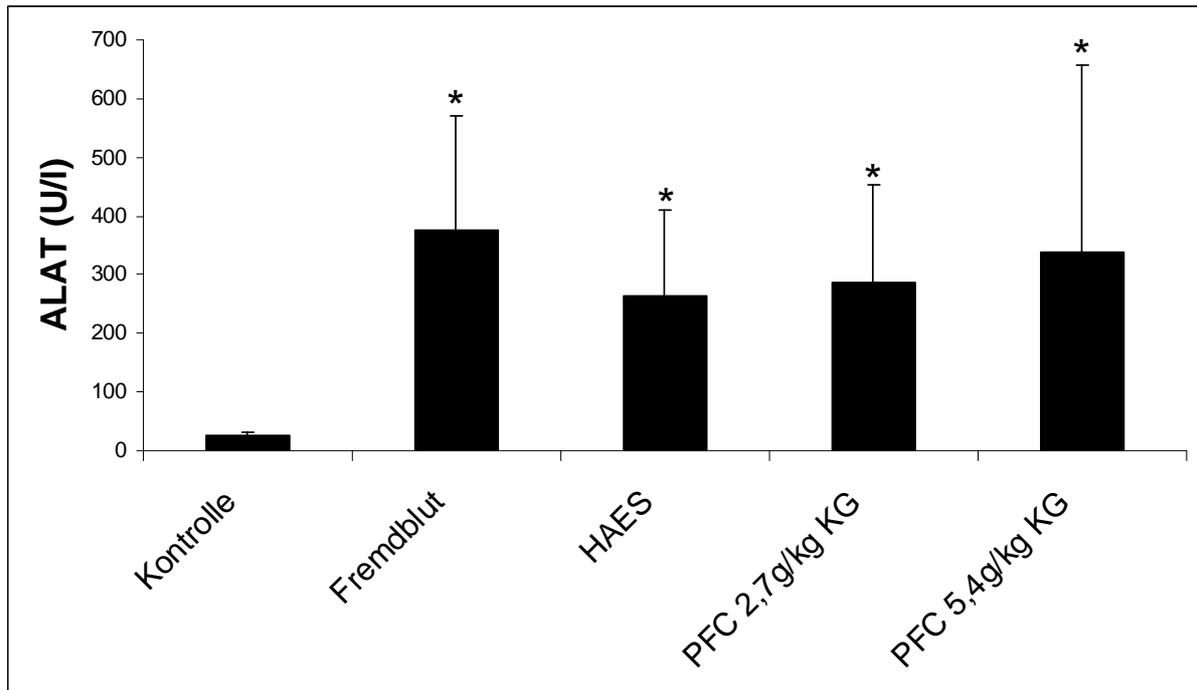


Abbildung 17 Serumenzymkonzentration der Alanin-Aminotransferase (ALAT)

Quantifizierung des hepatozellulären Schadens nach hämorrhagischem Schock und Therapie mittels Alanin-Aminotransferase.

Die Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere zeigt eine deutlich niedrigere Serumaktivität der ALT im Vergleich zu den unterschiedlichen Therapiegruppen.

Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren

$p < 0,05$ im Vergleich zu der Therapie mit gelagertem Fremdblut

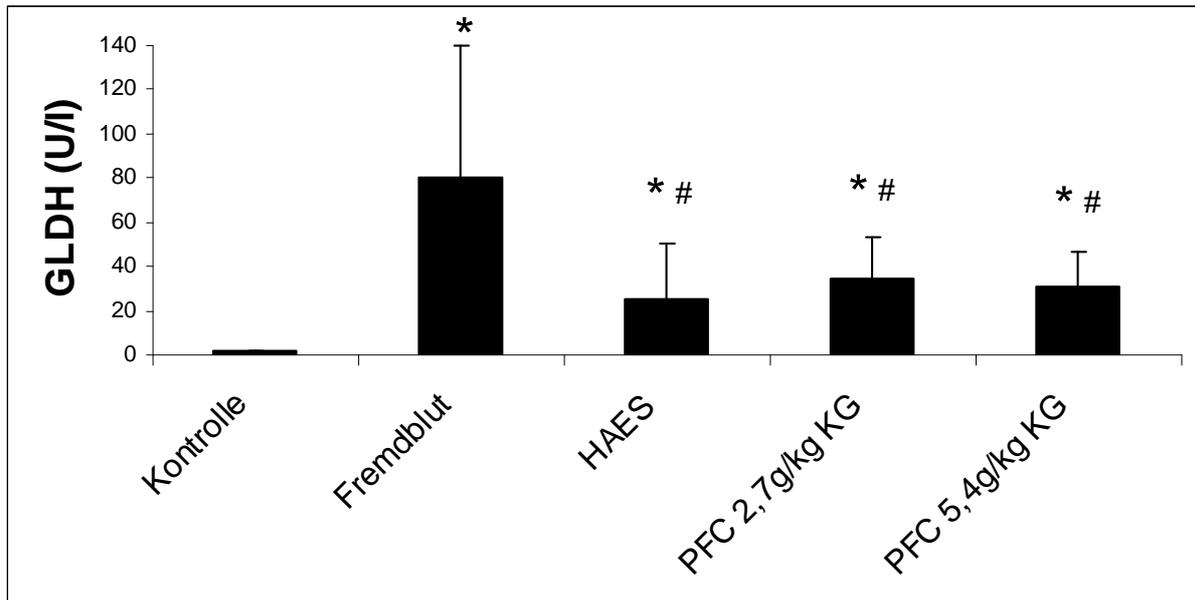


Abbildung 18 Serumentzymkonzentration der Glutamat-Dehydrogenase (GLDH)

Um einen weiteren Anhalt für den hepatozellulären Schaden zu haben, wurden neben der Alanin-Aminotransferase (ALT) und der Aspartat-Aminotransferase (AST) die Glutamat-Dehydrogenase- Aktivität im Serum bestimmt.

Die Abbildung zeigt eine nahezu doppelt so hohe Serumentzymaktivität der GLDH nach Therapie mit gelagertem Fremdblut im Vergleich zu der Therapie mit HAES-Lösung, der niedrigdosierten und der hochdosierten Perflubron-Emulsion.

Die Werte sind als Mittelwerte mit Standardfehlern angegeben.

* $p < 0,05$ im Vergleich zu den scheinoperierten Kontrolltieren

$p < 0,05$ im Vergleich zu der Therapie mit gelagertem Fremdblut

5. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, ob Perflubron (Oxygent™), ein artifizieller Sauerstoffträger der zweiten Generation, im Vergleich zur Standardvolumentherapie, einschließlich der Gabe gelagerter Erythrozyten, nach hämorrhagischem Schock mit Induktion eines persistierenden Mikrozirkulationsversagens zu einer Verbesserung der Sauerstoffversorgung in der Leber führt.

5.1 Organdysfunktion und Management des hämorrhagischen Schocks

Das Trauma mit konsekutivem hämorrhagischen Schock stellt die Haupttodesursachen der Personen zwischen 5 und 44 Jahren in den westlichen Ländern dar (71). Der hämorrhagische Schock ist dabei als ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf charakterisiert (119).

Geringe Blutverluste können durch die Substitution von Kristalloiden und ggf. auch Kolloiden ausgeglichen werden (36). Bei einem stärkeren Blutverlust ist der Organismus jedoch nicht mehr in der Lage, die Organe ausreichend mit Sauerstoff zu versorgen. Durch einen massiven Blutverlust (> 30%) resultiert eine hämodynamische Instabilität, eine Koagulopathie, eine Abnahme der Sauerstoffversorgung, sowie eine Abnahme der Perfusion (132).

Die dadurch bedingte unzureichende Gewebeoxygenierung führt zu einer zellulären Hypoxie mit einer konsekutiven Einschwemmung von Leukozytenaggregaten und Sauerstoffradikalbildung sowie einer Komplementaktivierung und Freisetzung pro-inflammatorischer Zytokine aus ischämisch geschädigtem Körpergewebe (6;24). In der Behandlung des hämorrhagischen Schocks ist es das Ziel, den Circulus vitiosus zwischen Gewebehypoxie und Zunahme der endothelialen Dysfunktion zu durchbrechen.

Klinische Parameter im Monitoring bei Patienten mit hämorrhagischem Schock sind Herzfrequenz, Blutdruck, Urinuntersuchung, Kapillardurchblutung, sowie der neurologische Status (147). Weiterhin werden die arterielle Blutgasanalyse, mit Bestimmung des Serum-Laktat-Wertes, sowie des Base Excess dazu benötigt, die Schwere des hämorrhagischen Schocks zu beurteilen (105;147;168).

In der Therapie des hämorrhagischen Schocks steht zunächst die Identifikation und Kontrolle der Blutungsquelle an erster Stelle. Zudem spielt die Aufrechterhaltung der Gewebepерfusion durch Flüssigkeitssubstitution sowie die Therapie der Gerinnungsstörung eine zentrale Rolle (147).

Kommt es im Rahmen eines Traumas zu einem Blutverlust von weniger als 30% so wird die Volumensubstitution mit Kristalloiden ggf. auch Kolloide durchgeführt (6). bei größeren Blutverlusten wird auch die Gabe von allogenen Bluttransfusionen empfohlen (23;141;147).

Der zeitnahe Einsatz von Erythrozyten-Konzentraten ist jedoch aufgrund der notwendigen Kompatibilität zwischen Spender und Empfänger und/oder logistischer Probleme häufig limitiert (70;172). Weiterhin ist bekannt, dass die Erythrozyten durch die Lagerung und den damit einhergehenden Verlust von 2,3-Diphosphoglycerat die Fähigkeit verlieren, das Gewebe adäquat mit Sauerstoff zu versorgen (79;137).

5.2 Probleme der Erythrozytenkonzentrate

In der Therapie des hämorrhagischen Schocks wird die Substitution von roten Blutkörperchen empfohlen (47;147). Deren primäre Funktion ist der Transport von Sauerstoff und somit die Prävention einer Gewebshypoxie.

In klinischen Studien wurde jedoch die Bedeutung von gelagertem Fremdblut zur Erhaltung der Sauerstoffversorgung von Organen und Geweben teilweise kritisch bewertet (84;89;137).

Vielerlei Faktoren sprechen dafür, dass die gelagerten Erythrozyten nicht in der Lage sind, eine ausreichende Versorgung des Gewebes mit Sauerstoff zu gewährleisten. Zudem hängt die Fähigkeit der Sauerstoffversorgung ebenfalls von der Lagerungsdauer und den Zusätzen in den Blutkonserven ab (158).

Die Lagerung der Erythrozytenkonzentrate führt zu einem Qualitätsverlust der Erythrozyten. Dieses Phänomen wird als sog „Lagerungsschaden“ der Erythrozyten bezeichnet. In Abhängigkeit von zugefügten Stabilisatoren bzw. Antikoagulans kommt es innerhalb des Erythrozyten zu Veränderungen der Membranstruktur, zu einer Abnahme der vasodilatatorischen Fähigkeit, einem Verlust von 2,3-Diphosphoglycerat und Störungen der Natrium/Kalium-Pumpe (84;159).

Die Lagerung der Erythrozytenkonzentrate führt zu einer Abnahme von Adenosintriphosphat (ATP) und zu einem Verlust der ursprünglichen Erythrozytenstruktur. Es bilden sich Sphäroechinozyten deren Verformbarkeit und damit auch deren Fähigkeit Kapillaren zu passieren eingeschränkt ist (128).

Dies hat wiederum eine Störung der Mikrozirkulation in den Endstromgebieten der Organe zu Folge. Durch die Veränderung der Erythrozytenmorphologie lagern die Erythrozyten einander an, verändern ihr rheologisches Verhalten und aggravieren die Gewebeischämie (4). Die beschriebene mangelnde Deformierbarkeit und die hinzukommende Endothelschwellung verstärken den Ischämie- und Reperfusionsschaden (95;96).

In der Mikrozirkulation nimmt der Erythrozyt eine regulierende Funktion ein. Hämoglobin agiert als Sauerstoffsensoren, über die Abgabe von ATP aus dem roten Blutkörperchen wird die NO-Signalkaskade aktiviert, was wiederum zu einer lokalen Vasodilatation und Verbesserung der Oxygenierung führt. (35;122).

Weiterhin hat die herabgesetzte Konzentration an 2,3 Diphosphoglycerat in den Erythrozyten eine Linksverschiebung der Sauerstoffbindungskurve zur Folge. Dies führt zu einer vermehrten Sauerstoffaffinität des Hämoglobins, und somit zu einer erschwerten Sauerstoffabgabe an das Gewebe (87).

Da es während der Lagerung zu einem Verlust an ATP kommt, sind Transportsysteme, antioxidative Reaktionen und anderer energieerfordernde Prozesse eingeschränkt. Aktuelle Studien haben gezeigt, dass es nach einer Lagerung der Erythrozytenkonzentrate von >5 Wochen zu einem Verlust von 60% des ATP kommt (43)

Nach Schockzuständen mit transienter Ischämie kam es trotz Wiedereinsetzen des mikrovaskulären Blutflusses und einer Wiederherstellung der systemisch-hämodynamischen Parameter, wie Herzzeitvolumen und Blutdruck, zu einer sekundären Stase (14;165). Vereinbar mit diesem Konzept konnte in der vorliegenden Untersuchung weder durch asanguinöse Volumentherapie (Hydroxyethylstärke, Kristalloide) noch durch die Gabe gelagerter Erythrozyten eine Wiederherstellung der hepatozellulären ATP-Konzentration erreicht werden.

Zu der Entstehung dieses Phänomens tragen unter anderem physikalische und hämorrheologische Faktoren bei. Unter anderem wird eine Schädigung des Endothels angenommen, bei der es zu Flüssigkeitsverlusten in den interstitiellen Raum und in die Endothelzellen kommt. Dies führt wiederum zu einer intravaskulären

Hämokonzentration, zur Endothelzellschwellung und zur interstitiellen Ödembildung, was eine weitere Abnahme der Perfusion bewirkt (18;94;101). Die meist nicht scharf trennbare Gewebeschädigung, die aus der Sequenz der Ischämie und Reperfusion resultiert, wird als Ischämie/Reperfusionssyndrom bezeichnet.

Multiple Studien haben sich mit dem Effekt von Bluttransfusionen beschäftigt. In einer experimentellen Arbeit zeigte sich nach hämorrhagischen Schock kein signifikanter Unterschied auf das Überleben beim Vergleich von Kristalloiden gegen Bluttransfusion (26;143). Eine große klinische Studie mit über 800 schwer kranken Patienten konnte keinen signifikanten Vorteil der Bluttransfusion gegenüber einem eher konservativen Vorgehen finden (58).

Trotzdem sieht die Behandlung des hämorrhagischen Schocks eine Transfusion von Erythrozytenkonzentraten vor, obwohl der Einsatz von Blutprodukten aufgrund der notwendigen Kompatibilität eingeschränkt ist und das gelagerte Fremdblut proinflammatorische Substanzen/Zytokine enthält, welche zu einer Überaktivität des Immunsystems /Hyperinflammation und somit zu einem Multiorganversagen führen können (23). Nach den aktuellen Leitlinien zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten wird eine restriktive Indikationsstellung zur Erythrozytentransfusion empfohlen. Dies führt zu einer verminderten Fremdblutexposition und geht nicht mit einer erhöhten Mortalität einher (163). Hier könnten künstliche Sauerstoffträger einen interessanten Einsatz finden.

5.3 Alternativen zu Erythrozytenkonzentraten

Die unzureichende Sauerstoffversorgung im hämorrhagischen Schock ist einer der Gründe warum seit Jahren nach alternativen Blutersatzstoffen gesucht wird (133). Zwei Substanzgruppen werden unterschieden: Man unterscheidet hämoglobin-basierte Sauerstoffträger von rein synthetisch hergestellten Kohlenwasserstoffen, den Perfluorocarbonen.

Die ersten Versuche mit hämoglobin-basierten Sauerstoffträgern wurden 1930 durchgeführt. Dabei wurde stromafreies Hämoglobin verwendet, welches als Sauerstofflieferant dient (104). Jedoch traten gravierende Probleme bei diesen Hämoglobin-Lösungen der 1. Generation auf. Zunächst kam es zu einer Dissoziation

des Hb-Moleküls in seine Untereinheiten und somit zu einer kurzen intravasalen Halbwertszeit von weniger als 1,5h. Der Zerfall in die Mono- und Dimere bedingte eine rasche glomeruläre Filtration und führte im Weiteren zu einer Präzipitation im Bereich der aufsteigenden Henle-Schleife mit konsekutivem nephrotoxischem Effekt (10).

Mit der Einführung chemisch modifizierter Hämoglobin-Moleküle wurde eine verlängerte intravasale Halbwertszeit erreicht und damit ein Rückgang der Nephrotoxizität (170). Jedoch kam es während der Transfusion zu einer ausgeprägten Vasokonstriktion. Dieser Effekt wurde auf die Affinität des Hämoglobin-Moleküls zu den vasodilatierenden Substanzen Stickstoffmonoxid und Kohlenstoffmonoxid zurückgeführt. Die Interaktion des freien Hämoglobins mit Stickstoffmonoxid (NO) führt zu einer Inaktivierung des Stickstoffmonoxids (NO Scavenging) (124). Daraus resultiert eine Vasokonstriktion mit konsekutivem Blutdruckanstieg. Weiterhin hatte die Transfusion einen Anstieg des pulmonalarteriellen Widerstandes und eine zunehmende Rechtsherzbelastung zur Folge (129).

Gesunde Probanden klagten über Übelkeit, Erbrechen, Bauchschmerzen und Durchfall. Auch diese Symptomatik wurde auf NO-Scavenging zurückgeführt (173). Das Fehlen des vasodilatierenden NO im Gastrointestinaltrakt verursacht eine Zunahme des gastrointestinalen Tonus, eine vermehrte Motilität sowie einen Anstieg des Sphinktertonus beispielsweise des Ösophagus, des Sphinkter Oddi oder des Analsphinkters (123).

Durch den Blutdruckanstieg steigt das Blutungsrisiko. Zudem führt die Vasokonstriktion zu einer Verschlechterung der Gewebedurchblutung u.a. auch zu Myokardschäden (108).

Weiterhin entstehen bei der Oxidation von Hämoglobin freie Sauerstoffradikale, die das Endothel schädigen(3;37;136).

Nach der Anwendung bei Schlaganfall-Patienten (134) und bei traumatisierten Patienten (144) kam es zu einer erhöhten Letalität, weshalb die Phase-III-Studien abgebrochen wurden.

1966 führten Clark und Gollan erste Experimente mit Perfluorcarbonen als künstliche Sauerstoffträger durch, indem sie Mäuse mehrere Stunden in einer mit Sauerstoff equilibrierten Perfluorcarbon-Lösung atmen ließen (28). In den folgenden Jahren

wurden Perfluorcarbone entwickelt, welche für den medizinischen Gebrauch anwendbar waren. So führte Geyer 1970 eine vollständige Austauschtransfusion durch (42).

Das zunächst entwickelte Fluosol-DA[®] setzte sich aus Perfluordecalin und Perfluorotripropylamin zusammen. In tierexperimentellen Versuchen war ein kompletter Blutaustausch überlebt worden (50). In einer weiteren tierexperimentellen Studie wurde zwar die Gewebenoxxygenierung verbessert, eine Senkung der Mortalität konnte jedoch nicht erreicht werden (153).

Durch die Weiterentwicklung und neuere Synthesemöglichkeiten wurde das Perfluorooctylbromid entwickelt. .

Dabei handelt es sich um einen linearen Kohlenwasserstoff, bei dem sämtliche Wasserstoff-Atome durch Fluor und endständig durch ein Brom-Atom ersetzt wurden. Durch die Fluor-Atome wird eine höhere Molekülstabilität erreicht. Daraus ergeben sich die niedrige Oberflächenspannung und eine hohe physikalische Löslichkeit für Gase (130). Das endständige Brom-Atom bedingt die leichte Lipophilie. Dadurch wird erreicht, dass Peflubron stabile Emulsionströpfchen bildet und somit intravenös anwendbar ist (148).

In der klinischen Anwendung traten bei den gesunden Probanden vereinzelt reversible, grippeähnliche Symptome, wie Fieber, Schüttelfrost, sowie Kopf-, und Gliederschmerzen auf (75). Diese Symptome wurden auf eine vermehrte Zytokinausschüttung nach Phagozytose der Emulsionspartikel zurückgeführt (38). Die Symptome ließen sich durch Zyklooxygenasehemmer und Cortikosteroide therapieren. Außerdem zeigte sich in der Laboruntersuchung ein passagerer Abfall der Thrombozyten ohne Verlängerung der Blutungszeit. Dieser regulierte sich jedoch innerhalb einer Woche.

Um eine ausreichende Sauerstoff-Versorgung zu gewährleisten ist jedoch eine möglichst hohe inspiratorische Sauerstoffkonzentration (FIO_2 0,5 bis 1,0) erforderlich. Damit eignet sich die Perflubron-Emulsion vor allem für lungengesunde, kontrolliert beatmete Patienten. Diese Einschätzung konnte auch in unserem Experiment bestätigt werden, wobei eine dosisabhängige Erhöhung des peripheren Sauerstoff-Angebotes bis hin zu supraphysiologischen Verhältnissen zu erzielen war.

Konkret äußerte sich dies in einer Zunahme des enzymatisch bestimmten ATP-Gehaltes im Leberhomogenat, sowie in einer Reduktion der Glutamin-Synthetase-1 Expression in den perizentralen Hepatozyten.

5.4 Makrohämodynamik und Blutgase

Die Erfassung der makrohämodynamischen Parameter dient einerseits der Steuerung des hämorrhagischen Schocks, da es sich um ein druckkontrolliertes Schockmodell handelt, und andererseits zur Überwachung der Tiere während des gesamten Versuches.

Die während der Präparation erhobenen Parameter wie mittlerer arterieller Druck (MAP), Herzzeitvolumens (cardiac output, CO) und Basendefizits waren mit denen der scheinoperierten Kontrolltiere vergleichbar, was für eine minimale Beeinträchtigung der Tiere durch die Präparation und eine ausreichende Deckung des basalen Flüssigkeitsbedarfs in Form von Ringerazetat-Lösung spricht.

Entsprechend dem druckkonstanten Schockmodell nach Wiggers und Ingraham (169) fanden sich bei den Tieren mit hämorrhagischem Schock während der Schockphase MAP-Werte zwischen 35-40 mmHg und signifikant erniedrigtem Herzzeitvolumen. Zur Aufrechterhaltung des Zieldrucks von 35 bis 40 mmHg waren über den gesamten Zeitraum des Schocks weitere fraktionierte Blutentnahmen erforderlich, um endogene Kompensationsmechanismen, die zur Erhöhung des MAP führten, zu überwinden. Die Tatsache der endogenen Regulationsversuche spricht dafür, dass es bei den Tieren, die einem hämorrhagischen Schock unterzogen wurden nicht zu einer kardiovaskulären Dekompensation kam.

Am Ende des Schocks lagen die Werte des Basendefizits zwischen -13 und -16mmol/l. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen dem Basendefizit der verschiedenen Schocktiere, was erkennen lässt, dass der Schweregrad des hämorrhagischen Schocks in den einzelnen Gruppen vergleichbar war. Da die Prognose nach hämorrhagischem Schock unter Volumentherapie unter anderem vom Basendefizit abhängig ist (112), sprechen die beobachteten Werte für einen bedeutsamen Schockzustand.

Die durch die Blutung entstehende Hypotension führt zu einem Abfall des Herzzeitvolumens. Ursächlich dafür ist eine verminderte Vorlast.

Durch den hämorrhagischen Schock entsteht im Organismus eine azidotische Stoffwechsellage. Diese ist durch den, aufgrund des Sauerstoffmangels, anaerob ablaufenden Glukosestoffwechsel und das daraus entstehende Milchsäure zu erklären (98). Die am Ende des Schocks beobachteten pH-Werte waren normal bis leicht erniedrigt. Diese Ergebnisse sind als Zeichen einer respiratorischen Teilkompensation der metabolischen Azidose zu werten (83).

Im Anschluss an die zweistündige Hypotensionsphase, sowie die Therapie lagen der mittlere arterielle Druck, das Herzzeitvolumen und der pH-Wert in den verschiedenen Gruppen, mit Ausnahme der asanguinösen Volumentherapie, wieder im Normbereich.

Durch die während des hämorrhagischen Schocks anfallenden sauren Stoffwechselprodukte kommt es zu einer respiratorischen Kompensation der metabolischen Azidose mit einer Hyperventilation und somit zu einem Anstieg des pO_2 und zum Abfall des pCO_2 . Aufgrund der Atmung von 100%igem Sauerstoff lagen die pO_2 -Werte in der Therapiephase bei ca. 400 mmHg. Die pCO_2 -Werte lagen im Normbereich. Ein Unterschied zu den scheinoperierten Kontrolltieren bestand nicht.

5.5 Effekt der Perflubron-Emulsion auf den Energiemetabolismus der Leber

In der vorliegenden Studie wurden verschiedene Formen der Reperfusion bei hämorrhagischen Schock anhand des Energiemetabolismus der Leber verglichen. Dabei wurde die Sauerstoffversorgung der Leber über den enzymatisch bestimmten hepatischen ATP-Gehalt quantifiziert, sowie über die Biolumineszenz –Methode der Leberzellen semiquantitativ und regional dargestellt.

Nach den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit unterscheiden sich der ATP-Gehalt und die ATP-Verteilung in Abhängigkeit von der Art der Therapie.

Die bisherige Standardtherapie des hämorrhagischen Schocks durch Volumentherapie mit Hydroxyethylstärke und gelagertem Fremdblut führt nicht immer zu einer Wiederherstellung des Energiemetabolismus einzelner Organe (23) und kann in der Folge zu einem Multiorganversagen führen.

Nach hämorrhagischen Schock und Therapie mit gelagertem Fremdblut und Hydroxyethylstärke lag der enzymatisch bestimmte ATP-Gehalt der Leber unterhalb dessen der Kontrollgruppe. Dieses Ergebnis ließ sich semiquantitativ mit der

Biolumineszenz-Methode bestätigen. Während in der Kontrollgruppe eine homogene Verteilung des ATP-Gehaltes vorlag, führte die Therapie durch Hydroxyethylstärke respektive gelagertem Fremdblut zu einem heterogenen Verteilungsmuster. In einigen Arealen der Leber fehlte ATP vollständig.

Im Rahmen des ischämisch bedingten Energiedefizites kommt es zu einem endothelialen Ödem, bedingt durch Natrium- und Wassereinstrom, was zu einer zusätzlichen Hypoperfusion führt („no reflow“) (51;101;161). Mazzoni und Kollegen haben gezeigt, dass es während eines hämorrhagischen Schocks zu einer Lumeneinengung durch Endothelzellschwellung im Skelettmuskel kommt (94).

Nach Therapie mit der niedrig dosierten Perflubron-Lösung war der ATP-Gehalt der Leber mit dem der Kontrollgruppe vergleichbar. Nach Steigerung der Perflubron-Dosis ließ sich dieser Effekt noch steigern und lag signifikant über dem der Kontrollgruppe.

In der Biolumineszenz-Methode bestätigten sich diese Ergebnisse, zudem zeigte sich eine homogene Verteilung der ATP-Konzentration über den gesamten Leberlappen.

Die bessere Gewebeoxygenierung kann auf die geringe Molekülgröße des Perflubrons von 0,16-0,18µm zurückzuführen sein. Die Moleküle gelangen auch noch bei einem minimalen Plasmafluss in die Kapillaren, um dort eine adäquate Sauerstoffversorgung gewährleisten zu können. Unter diesen Umständen kann die Perflubron-Emulsion in Kombination mit einer hohen inspiratorischen Sauerstoff-Konzentration die Sauerstoff-Versorgung der Gewebe erhalten. Durch eine erhöhte Sauerstoff-Transportfähigkeit können Mikrogefäße rekrutiert und somit der Fluss wiederhergestellt werden (22;74;103;152).

Wahrscheinlich sind der geringere zur Verfügung stehende Sauerstoff-Anteil und die Störung der Sauerstoffverwertbarkeit nach einer Therapie mit gelagertem Fremdblut und reiner HAES-Lösung für die persistierende Reduktion des hepatischen Energiemetabolismus verantwortlich.

5.6 Beurteilung des Leberschadens

Neben dem Energiemetabolismus spielt die Sauerstoff-Versorgung eine entscheidende Rolle bei der Regulation verschiedener Gene.

In der Leber werden in der periportalen und perivenösen Zone unterschiedliche Gene reguliert und exprimiert (29;65;66;162).

Die Schlüsselenzyme für den Glucose-Abbau und die Harnstoffsynthese werden in der periportalen Zone exprimiert. Diese Stoffwechselprozesse haben einen hohen Sauerstoffbedarf. Die Enzyme, die für die Glucose-Aufnahme und die Glutaminsynthese verantwortlich sind, sind vor allem in der perivenösen Zone lokalisiert. Schon unter physiologischen Bedingungen herrscht in diesem Bereich ein niedrigerer Sauerstoff-Partialdruck (66).

In dem vorliegenden Versuch konnte gezeigt werden, dass es nach Reperfusion mit gelagertem Fremdblut und HAES zu einer Zunahme der perivenös exprimierten Glutaminsynthetase-1 (GluS-1) kommt. Ursächlich hierfür kann die verminderte Gewebeoxygenierung, als Folge der verminderten Sauerstoffverfügbarkeit sein.

Im Gegensatz dazu wurde nach der Therapie mit der niedrig-, und der hochdosierten Perflubron-Emulsion die physiologische Gen-Expression der Glutaminsynthetase-1 (GluS-1) wieder hergestellt. Nach Therapie mit Perflubron und einer gleichzeitigen Beatmung mit 100%igem Sauerstoff wurde die GluS-1 in physiologischer Weise exprimiert.

In dem hier vorgestellten Modell konnte nach hämorrhagischen Schock und einer Therapie mit Perflubron gezeigt werden, dass es konzentrationsabhängig zu einer Wiederherstellung des hepatischen ATP-Gehaltes kommen kann.

Auch im Rahmen klinischer Studien wurde ein positiver Effekt, bezüglich der Gewebeoxygenierung durch Perflubron demonstriert (21;78;150;151).

Im Gegensatz zu diesen Ergebnissen kam es in der hier vorgelegten Arbeit jedoch nicht zu einer Minderung des frühen enzymatischen Leberzellschadens. Im Vergleich zu der Gruppe der scheinoperierten Kontrolltiere zeigte sich bei allen Therapieformen, auch unter Perflubron, ein deutlicher Anstieg der Serumaktivität für Alanin-Aminotransferase (ALT), der Aspartat-Aminotransferase (AST) und der Glutamat-Dehydrogenase (GLDH).

Für den Anstieg der Leberenzyme, trotz verbesserter Oxygenierung in der Therapie mit Perflubron, sind verschiedene Mechanismen vorstellbar.

Zum einen könnte die Dauer der Schocksituation vor einer Therapie bereits einen anhaltenden Schaden mit konsekutivem Enzymanstieg bedingt haben.

Die verbesserte Perfusion der Mikrostrombahn mittels Perflubron kann zur Verstärkung des „Auswaschphänomens“ mit konsekutiver Ausschwemmung hepatischer Enzyme in die Peripherie führen (44;116).

Dies führt jedoch auch zu einer Verstärkung des Reperfusionsschadens, welcher auf das so genannte „reflow paradox“ zurückzuführen ist (61;156). Das „reflow paradox“ resultiert aus einer Reihe von Reaktionen, welche in den reperfundierten Gefäßen durch Sauerstoff-Radikale, Leukotriene und Thromboxan ausgelöst werden. Durch diese Reaktionen kommt es zur Akkumulation polymorphkerniger Leukozyten, welche mit dem Gefäßendothel interagieren (102). Dies hat einen Verlust der Endothelfunktion zur Folge und es entsteht eine vermehrte Permeabilität des Gefäßendothels, sowie ein zunehmendes Ödem (99;100).

Ein Anstieg von Plasmaenzymen wurde ebenso nach alleiniger Perflubron-Gabe beschrieben (117;145). Dies könnte einen frühen Effekt der verbesserten Sauerstoff-Versorgung der Leber maskieren.

Bezogen auf die Verbesserung des Sauerstoff-Gehaltes zeigten sich nach Gabe der Perflubron-Emulsion eine deutliche Zunahme des ATP-Gehaltes in der Leber sowie eine Abnahme der Expression sauerstoff-abhängiger Gene im Vergleich zur Gabe von gelagertem Fremdblut.

Diese unvoreilhaften Effekte, die nach der Transfusion von gelagertem Fremdblut auftreten, resultieren wahrscheinlich aus der Beeinträchtigung des Immunsystems, der Abnahme von 2,3-Diphosphoglycerat sowie der abnehmenden Deformierbarkeit der Erythrozyten (76;159). Dies kann eine Zunahme postoperativer Infektionen zur Folge haben (88;171). Ursächlich ist eine verminderte Bildung des proinflammatorisch wirkenden Zytokins Tumornekrosefaktor α (TNF α) und einer Anreicherung des antiinflammatorischen Interleukins 10 (Il-10) (81). Es wurde zunächst vermutet, dass der Leukozyten-Gehalt in den Erythrozyten-Konzentraten für diese Reaktion verantwortlich ist (111;138). Bei Transfusion von Frischblut mit dem gleichen Leukozyten-Gehalt war es jedoch nicht zu einer Zytokin-Ausschüttung gekommen. Es wurde vermutet, dass der Zerfall von Leukozyten nach 28 Tagen zu einer Freisetzung bioaktiver Substanzen wie z.B. Histamin, Myeloperoxidase, eosinophiles Protein X führt (17). Diese Substanzen akkumulieren und sind dadurch

für die Gewebeerstörung und Immunsuppression verantwortlich (110). Aus diesem Grund schien die Leukozyten-Depletion ein gutes Konzept um eine transfusionsbedingte Immunsuppression zu verhindern (107). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass auch die Leukozyten-Depletion die Immunsuppression nicht vollständig verhindern kann (62;106).

Ursache hierfür können die noch wenigen in den Erythrozyten-Konzentraten verbleibenden Leukozyten sowie andere leukozyten-unabhängige Faktoren sein. Ein Beispiel sind Phospholipide der Erythrozytenmembran. Diese stimulieren Prostaglandine die ebenfalls einen Einfluss auf die Immunregulation haben (17).

Im Gegensatz dazu haben Perfluorcarbone keinen Einfluss auf die zirkulierende Immunglobuline, das Komplement-System, Zytokine, Tumor-Nekrose-Faktor- α oder Interleukin-1 (113). Das Potential sauerstofftransportierender Lösungen vermag darin zu liegen, keinen Effekt auf die Immunmodulation zu haben.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Perflubron-Emulsion in der Lage ist, im Vergleich zu kristalloiden/kolloidalen Lösungen bzw gelagertem Fremdblut die Sauerstoffversorgung der Organe zu verbessern. Die vorteilhaften Effekte auf die sauerstoffabhängigen Gene, sowie den hepatischen ATP-Gehalt mögen zusätzlich zu einem Überleben nach einem hämorrhagischen Schock ohne das Auftreten unerwünschter Transfusions-assoziiertes Nebenwirkungen beitragen.

6. Literaturverzeichnis

1. Abdulla W. Interdisziplinäre Intensivmedizin. Urban und Fischer; 1999.
2. Adrian Phillip Mundt. Beurteilung biochemischer Stoffwechselaktivitäten eines hybriden Leberunterstützungssystems während erster klinischer Anwendungen. [dissertation]. Medizinische Fakultät der Charité der Humboldt Universität zu Berlin ; 2002.
3. Alayash AI. Hemoglobin-based blood substitutes: oxygen carriers, pressor agents, or oxidants? *Nat.Biotechnol.* 1999;17(6):545-9.
4. Almac E, Ince C. The impact of storage on red cell function in blood transfusion. *Best.Pract.Res.Clin.Anaesthesiol.* 2007;21(2):195-208.
5. Ames A, III, Wright RL, Kowada M, Thurston JM, Majno G. Cerebral ischemia. II. The no-reflow phenomenon. *Am.J.Pathol.* 1968;52(2):437-53.
6. Angele MK, Schneider CP, Chaudry IH. Bench-to-bedside review: latest results in hemorrhagic shock. *Crit Care* 2008;12(4):218.
7. Arab A, Kuemmerer K, Wang J, Bode C, Hehrlein C. Oxygenated perfluorochemicals improve cell survival during reoxygenation by pacifying mitochondrial activity. *J.Pharmacol.Exp.Ther.* 2008;325(2):417-24.
8. Arumugam TV, Shiels IA, Woodruff TM, Granger DN, Taylor SM. The role of the complement system in ischemia-reperfusion injury. *Shock* 2004;21(5):401-9.
9. Bach F, Singer D, Schmiedl A, Bauer M, Larsen R. High energy phosphates and direct calorimetry as predictive parameters for metabolic recovery of the rat liver following ischemia. *Acta Anaesthesiol.Scand.* 1996;40(8 Pt 1):940-7.
10. Baker, S. L. et al. Obstruction of the renal tubules during Excretion of Hemoglobin. *Obstruction of the renal tubules during Excretion of Hemoglobin.* 1-1-1925.
11. Baue AE. Multiple, progressive, or sequential systems failure. A syndrome of the 1970s. *Arch.Surg.* 1975;110(7):779-81.
12. Bauer B, Simkhovich BZ, Kloner RA, Przyklenk K. Does preconditioning protect the coronary vasculature from subsequent ischemia/reperfusion injury? *Circulation* 1993;88(2):659-72.
13. Bauer I, Bauer M, Pannen BH, Leinwand MJ, Zhang JX, Clemens MG. Chronic ethanol consumption exacerbates liver injury following hemorrhagic shock: role of sinusoidal perfusion failure. *Shock* 1995;4(5):324-31.
14. Bauer M, Feucht K, Ziegenfuss T, Marzi I. Attenuation of shock-induced hepatic microcirculatory disturbances by the use of a starch-deferoxamine conjugate for resuscitation. *Crit Care Med.* 1995;23(2):316-22.

15. Bauer M, Paquette NC, Zhang JX, Bauer I, Pannen BH, Kleeberger SR et al. Chronic ethanol consumption increases hepatic sinusoidal contractile response to endothelin-1 in the rat. *Hepatology* 1995;22(5):1565-76.
16. Beal AL, Cerra FB. Multiple organ failure syndrome in the 1990s. Systemic inflammatory response and organ dysfunction. *JAMA* 1994;271(3):226-33.
17. Biedler AE, Schneider SO, Seyfert U, Rensing H, Grenner S, Girndt M et al. Impact of alloantigens and storage-associated factors on stimulated cytokine response in an in vitro model of blood transfusion. *Anesthesiology* 2002;97(5):1102-9.
18. Blaisdell FW. The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc.Surg.* 2002;10(6):620-30.
19. Burhop KE, Farrell L, Nigro C, Tan D, Estep T. Effects of intravenous infusions of diaspirin cross-linked hemoglobin (DCLHb) on sheep. *Biomater.Artif.Cells Immobilization Biotechnol.* 1992;20(2-4):581-5.
20. Bynum TE, Boitnott JK, Maddrey WC. Ischemic hepatitis. *Dig.Dis.Sci.* 1979;24(2):129-35.
21. Cabrales P, Carlos BJ. Delaying blood transfusion in experimental acute anemia with a perfluorocarbon emulsion. *Anesthesiology* 2011;114(4):901-11.
22. Cabrales P, Tsai AG, Frangos JA, Briceno JC, Intaglietta M. Oxygen delivery and consumption in the microcirculation after extreme hemodilution with perfluorocarbons. *Am.J.Physiol Heart Circ.Physiol* 2004;287(1):H320-H330.
23. Carrico CJ, Holcomb JB, Chaudry IH. Scientific priorities and strategic planning for resuscitation research and life saving therapy following traumatic injury: report of the PULSE Trauma Work Group. *Acad.Emerg.Med.* 2002;9(6):621-6.
24. Carrico CJ, Meakins JL, Marshall JC, Fry D, Maier RV. Multiple-organ-failure syndrome. *Arch.Surg.* 1986;121(2):196-208.
25. Chang TM. Modified hemoglobin blood substitutes: present status and future perspectives. *Biotechnol.Annu.Rev.* 1998;4:75-112.
26. Cherkas D. Traumatic hemorrhagic shock: advances in fluid management. *Emerg.Med.Pract.* 2011;13(11):1-19.
27. Chun K, Zhang J, Biewer J, Ferguson D, Clemens MG. Microcirculatory failure determines lethal hepatocyte injury in ischemic/reperfused rat livers. *Shock* 1994;1(1):3-9.
28. Clark LC, Jr., Gollan F. Survival of mammals breathing organic liquids equilibrated with oxygen at atmospheric pressure. *Science* 1966;152(730):1755-6.
29. Clemens MG, Bauer M, Gingalewski C, Miescher E, Zhang J. Hepatic intercellular communication in shock and inflammation. *Shock* 1994;2(1):1-9.
30. Clemens MG, Bauer M, Pannen BH, Bauer I, Zhang JX. Remodeling of hepatic microvascular responsiveness after ischemia/reperfusion. *Shock* 1997;8(2):80-5.

31. Curry N, Hopewell S, Doree C, Hyde C, Brohi K, Stanworth S. The acute management of trauma hemorrhage: a systematic review of randomized controlled trials. *Crit Care* 2011;15(2):R92.
32. Cutrn JC, Perrelli MG, Cavalieri B, Peralta C, Rosell CJ, Poli G. Microvascular dysfunction induced by reperfusion injury and protective effect of ischemic preconditioning. *Free Radic.Biol.Med.* 2002;33(9):1200-8.
33. Dellinger RP, Carlet JM, Masur H, Gerlach H, Calandra T, Cohen J et al. Surviving Sepsis Campaign guidelines for management of severe sepsis and septic shock. *Crit Care Med.* 2004;32(3):858-73.
34. Dewar D, Moore FA, Moore EE, Balogh Z. Postinjury multiple organ failure. *Injury* 2009;40(9):912-8.
35. Ellsworth ML. The red blood cell as an oxygen sensor: what is the evidence? *Acta Physiol Scand.* 2000;168(4):551-9.
36. Ertmer C, Kampmeier T, Rehberg S, Lange M. Fluid resuscitation in multiple trauma patients. *Curr.Opin.Anaesthesiol.* 2011;24(2):202-8.
37. Everse J, Hsia N. The toxicities of native and modified hemoglobins. *Free Radic.Biol.Med.* 1997;22(6):1075-99.
38. Flaim SF. Pharmacokinetics and side effects of perfluorocarbon-based blood substitutes. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 1994;22(4):1043-54.
39. Gando S. Disseminated intravascular coagulation in trauma patients. *Semin.Thromb.Hemost.* 2001;27(6):585-92.
40. Gando S, Sawamura A, Hayakawa M. Trauma, shock, and disseminated intravascular coagulation: lessons from the classical literature. *Ann.Surg.* 2011;254(1):10-9.
41. Gebhardt R. Heterogeneous intrahepatic distribution of glutamine synthetase. *Acta Histochem.Suppl* 1990;40:23-8.
42. Geyer RP. Whole animals perfusion with fluorocarbon dispersions. *Fed.Proc.* 1970;29(5):1758-63.
43. Gkoumassi E, Dijkstra-Tiekstra MJ, Hoentjen D, Wildt-Eggen J. Hemolysis of red blood cells during processing and storage. *Transfusion* 2011.
44. Glanemann M, Vollmar B, Nussler AK, Schaefer T, Neuhaus P, Menger MD. Ischemic preconditioning protects from hepatic ischemia/reperfusion-injury by preservation of microcirculation and mitochondrial redox-state. *J.Hepatol.* 2003;38(1):59-66.
45. Goris RJ, Draaisma J. Causes of death after blunt trauma. *J.Trauma* 1982;22(2):141-6.
46. Granger DN. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury. *Am.J.Physiol* 1988;255(6 Pt 2):H1269-H1275.

47. Grottke O, Spahn DR, Rossaint R. [Treatment of massive bleeding: summary of the updated European guidelines]. *Anaesthesist* 2011;60(6):546-54.
48. Gunst M, Ghaemmaghami V, Gruszecki A, Urban J, Frankel H, Shafi S. Changing epidemiology of trauma deaths leads to a bimodal distribution. *Proc.(Bayl.Univ Med.Cent.)* 2010;23(4):349-54.
49. Gutierrez G. Regional blood flow and oxygen transport: implications for the therapy of the septic patient. *Crit Care Med.* 1993;21(9):1263-4.
50. Hall JE, Karlson KH, DuRant RH. Massive transfusion of perfluorocarbon emulsion (Fluosol-DA) in newborn piglets. *Dev.Pharmacol.Ther.* 1987;10(3):163-73.
51. Hanboon BK, Ekataksin W, Alsfasser G, Schemmer P, Urbaschek B, McCuskey RS et al. Microvascular dysfunction in hepatic ischemia-reperfusion injury in pigs. *Microvasc.Res.* 2010;80(1):123-32.
52. Harmann JW. Local vascular phenomena induced in skeletal muscle by acute ischemia. *Fed.Proc.* 1947;6(1):393.
53. Haussinger D. Hepatic glutamine metabolism. *Beitr.Infusionther.Klin.Ernahr.* 1987;17:144-57.
54. Haussinger D. Regulation of hepatic metabolism by extracellular nucleotides and eicosanoids. The role of cell heterogeneity. *J.Hepatol.* 1989;8(2):259-66.
55. Haussinger D, Lenzen C, Soboll S. Acid-base regulation of hepatic glutamine degradation. *Contrib.Nephrol.* 1988;63:161-6.
56. Haussinger D, Stehle T, Gerok W, Tran-Thi TA, Decker K. Hepatocyte heterogeneity in response to extracellular ATP. *Eur.J.Biochem.* 1987;169(3):645-50.
57. Hawker F. Liver dysfunction in critical illness. *Anaesth.Intensive Care* 1991;19(2):165-81.
58. Hebert PC, Wells G, Blajchman MA, Marshall J, Martin C, Pagliarello G et al. A multicenter, randomized, controlled clinical trial of transfusion requirements in critical care. Transfusion Requirements in Critical Care Investigators, Canadian Critical Care Trials Group. *N.Engl.J.Med.* 1999;340(6):409-17.
59. Heuer M, Taeger G, Kaiser GM, Nast-Kolb D, Kuehne CA, Ruchholtz S et al. Prognostic factors of liver injury in polytraumatic patients. Results from 895 severe abdominal trauma cases. *J.Gastrointestin.Liver Dis.* 2009;18(2):197-203.
60. Hierholzer C, Billiar TR. Molecular mechanisms in the early phase of hemorrhagic shock. *Langenbecks Arch.Surg.* 2001;386(4):302-8.
61. Horie Y, Wolf R, Flores SC, McCord JM, Epstein CJ, Granger DN. Transgenic mice with increased copper/zinc-superoxide dismutase activity are resistant to hepatic leukostasis and capillary no-reflow after gut ischemia/reperfusion. *Circ.Res.* 1998;83(7):691-6.

62. Houbiers JG, van de Velde CJ, van de Watering LM, Hermans J, Schreuder S, Bijnen AB et al. Transfusion of red cells is associated with increased incidence of bacterial infection after colorectal surgery: a prospective study. *Transfusion* 1997;37(2):126-34.
63. Jaeschke H, Gujral JS, Bajt ML. Apoptosis and necrosis in liver disease. *Liver Int.* 2004;24(2):85-9.
64. Jungermann K, Katz N. Functional specialization of different hepatocyte populations. *Physiol Rev.* 1989;69(3):708-64.
65. Jungermann K, Kietzmann T. Zonation of parenchymal and nonparenchymal metabolism in liver. *Annu.Rev.Nutr.* 1996;16:179-203.
66. Jungermann K, Kietzmann T. Role of oxygen in the zonation of carbohydrate metabolism and gene expression in liver. *Kidney Int.* 1997;51(2):402-12.
67. Jungermann K, Thurman RG. Hepatocyte heterogeneity in the metabolism of carbohydrates. *Enzyme* 1992;46(1-3):33-58.
68. Kamiike W, Watanabe F, Hashimoto T, Tagawa K, Ikeda Y, Nakao K et al. Changes in cellular levels of ATP and its catabolites in ischemic rat liver. *J.Biochem.* 1982;91(4):1349-56.
69. Katz J, Lee WN, Wals PA, Bergner EA. Studies of glycogen synthesis and the Krebs cycle by mass isotopomer analysis with [U-13C]glucose in rats. *J.Biol.Chem.* 1989;264(22):12994-3004.
70. Kaur P, Basu S, Kaur G, Kaur R. Transfusion protocol in trauma. *J.Emerg.Trauma Shock* 2011;4(1):103-8.
71. Kauvar DS, Lefering R, Wade CE. Impact of hemorrhage on trauma outcome: an overview of epidemiology, clinical presentations, and therapeutic considerations. *J.Trauma* 2006;60(6 Suppl):S3-11.
72. Kawada N, Tran-Thi TA, Klein H, Decker K. The contraction of hepatic stellate (Ito) cells stimulated with vasoactive substances. Possible involvement of endothelin 1 and nitric oxide in the regulation of the sinusoidal tonus. *Eur.J.Biochem.* 1993;213(2):815-23.
73. Keel M, Trentz O. Pathophysiology of polytrauma. *Injury* 2005;36(6):691-709.
74. Keipert PE. Use of Oxygent, a perfluorochemical-based oxygen carrier, as an alternative to intraoperative blood transfusion. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 1995;23(3):381-94.
75. Keipert PE. Use of Oxygent, a perfluorochemical-based oxygen carrier, as an alternative to intraoperative blood transfusion. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 1995;23(3):381-94.
76. Kim-Shapiro DB, Lee J, Gladwin MT. Storage lesion: role of red blood cell breakdown. *Transfusion* 2011;51(4):844-51.

77. Knaus WA, Wagner DP, Draper EA, Zimmerman JE, Bergner M, Bastos PG et al. The APACHE III prognostic system. Risk prediction of hospital mortality for critically ill hospitalized adults. *Chest* 1991;100(6):1619-36.
78. Kocian R, Spahn DR. Haemoglobin, oxygen carriers and perioperative organ perfusion. *Best.Pract.Res.Clin.Anaesthesiol.* 2008;22(1):63-80.
79. Kor DJ, Van Buskirk CM, Gajic O. Red blood cell storage lesion. *Bosn.J.Basic Med.Sci.* 2009;9 Suppl 1:21-7.
80. Kourembanas S, McQuillan LP, Leung GK, Faller DV. Nitric oxide regulates the expression of vasoconstrictors and growth factors by vascular endothelium under both normoxia and hypoxia. *J.Clin.Invest* 1993;92(1):99-104.
81. Kristiansson M, Soop M, Shanwell A, Sundqvist KG. Prestorage versus bedside white blood cell filtration of red blood cell concentrates: effects on the content of cytokines and soluble tumor necrosis factor receptors. *J.Trauma* 1996;40(3):379-83.
82. Larsen R. Cardiocirculatory changes in various forms of shock. *Klin.Anesthesiol.Intensivther.* 1987;33:1-18.
83. Larsen R, Kleinschmidt S. Controlled hypotension. *Anaesthesist* 1995;44(4):291-308.
84. Lelubre C, Vincent JL. Red blood cell transfusion in the critically ill patient. *Ann.Intensive Care* 2011;1:43.
85. Lendemans S, Heuer M, Nast-Kolb D, Kuhne CA, Dammann M, Lefering R et al. [Significance of liver trauma for the incidence of sepsis, multiple organ failure and lethality of severely injured patients. An organ-specific evaluation of 24,771 patients from the trauma register of the DGU]. *Unfallchirurg* 2008;111(4):232-9.
86. Lier H, Krep H, Schochl H. [Coagulation management in the treatment of multiple trauma]. *Anaesthesist* 2009;58(10):1010-26.
87. Malmberg PO, Woodson RD. Effect of anemia on oxygen transport in hemorrhagic shock. *J.Appl.Physiol* 1979;47(4):882-8.
88. Mangalmurti NS, Xiong Z, Hulver M, Ranganathan M, Liu XH, Oriss T et al. Loss of red cell chemokine scavenging promotes transfusion-related lung inflammation. *Blood* 2009;113(5):1158-66.
89. Marik PE, Sibbald WJ. Effect of stored-blood transfusion on oxygen delivery in patients with sepsis. *JAMA* 1993;269(23):3024-9.
90. Marotto ME, Thurman RG, Lemasters JJ. Early midzonal cell death during low-flow hypoxia in the isolated, perfused rat liver: protection by allopurinol. *Hepatology* 1988;8(3):585-90.
91. Marubayashi S, Takenaka M, Dohi K, Ezaki H, Kawasaki T. Adenine nucleotide metabolism during hepatic ischemia and subsequent blood reflow periods and its relation to organ viability. *Transplantation* 1980;30(4):294-6.

92. Marzi I. The significance of the liver for the course of SIRS (Systemic Inflammatory Response Syndrome) following shock, trauma and during sepsis. *Anesthesiol.Intensivmed.Notfallmed.Schmerzther.* 1994;29(1):41-6.
93. Marzi I, Takei Y, Rucker M, Kawano S, Fusamoto H, Walcher F et al. Endothelin-1 is involved in hepatic sinusoidal vasoconstriction after ischemia and reperfusion. *Transpl.Int.* 1994;7 Suppl 1:S503-S506.
94. Mazzoni MC, Borgstrom P, Intaglietta M, Arfors KE. Luminal narrowing and endothelial cell swelling in skeletal muscle capillaries during hemorrhagic shock. *Circ.Shock* 1989;29(1):27-39.
95. Mazzoni MC, Borgstrom P, Warnke KC, Skalak TC, Intaglietta M, Arfors KE. Mechanisms and implications of capillary endothelial swelling and luminal narrowing in low-flow ischemias. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.* 1995;15(5):265-70.
96. Mazzoni MC, Warnke KC, Arfors KE, Skalak TC. Capillary hemodynamics in hemorrhagic shock and reperfusion: in vivo and model analysis. *Am.J.Physiol* 1994;267(5 Pt 2):H1928-H1935.
97. McLean JG, Lewis IM. Oxygen affinity responses to 2,3-diphosphoglycerate, and methaemoglobin formation in horse and human haemoglobins. *Res.Vet.Sci.* 1975;19(3):259-62.
98. Meisner FG, Habler OP, Kemming GI, Kleen MS, Pape A, Messmer K. Changes in p(i)CO(2) reflect splanchnic mucosal ischaemia more reliably than changes in pH(i) during haemorrhagic shock. *Langenbecks Arch.Surg.* 2001;386(5):333-8.
99. Menger MD, Lehr HA, Messmer K. Role of oxygen radicals in the microcirculatory manifestations of postischemic injury. *Klin.Wochenschr.* 1991;69(21-23):1050-5.
100. Menger MD, Richter S, Yamauchi J, Vollmar B. Role of microcirculation in hepatic ischemia/reperfusion injury. *Hepatogastroenterology* 1999;46 Suppl 2:1452-7.
101. Menger MD, Rucker M, Vollmar B. Capillary dysfunction in striated muscle ischemia/reperfusion: on the mechanisms of capillary "no-reflow". *Shock* 1997;8(1):2-7.
102. Menger MD, Vollmar B. Pathomechanisms of ischemia-reperfusion injury as the basis for novel preventive strategies: is it time for the introduction of pleiotropic compounds? *Transplant.Proc.* 2007;39(2):485-8.
103. Millard RW. Oxygen solubility, rheology and hemodynamics of perfluorocarbon emulsion blood substitutes. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 1994;22(2):235-44.
104. Miller DK, Rhoads CP. The effect of hemoglobin injections on erythropoiesis and erythrocyte size in rabbits rendered anemic by bleeding. *J.Exp.Med.* 1934;59(3):333-46.
105. Moore FA, McKinley BA, Moore EE, Nathens AB, West M, Shapiro MB et al. Inflammation and the Host Response to Injury, a large-scale collaborative project:

- patient-oriented research core--standard operating procedures for clinical care. III. Guidelines for shock resuscitation. *J.Trauma* 2006;61(1):82-9.
106. Mynster T. Effects of red cell storage and lysis on in vitro cytokine release. *Transfus.Apher.Sci.* 2001;25(1):17-23.
 107. Mynster T, Hammer JH, Nielsen HJ. Prestorage and bedside leucofiltration of whole blood modulates storage-time-dependent suppression of in vitro TNFalpha release. *Br.J.Haematol.* 1999;106(1):248-51.
 108. Natanson C, Kern SJ, Lurie P, Banks SM, Wolfe SM. Cell-free hemoglobin-based blood substitutes and risk of myocardial infarction and death: a meta-analysis. *JAMA* 2008;299(19):2304-12.
 109. Neugebauer E, Rixen D, Raum M, Schafer U. Thirty years of anti-mediator treatment in sepsis and septic shock--what have we learned? *Langenbecks Arch.Surg.* 1998;383(1):26-34.
 110. Nielsen HJ, Reimert CM, Dybkjaer E, Roed J, Alsbjorn B. Bioactive substance accumulation and septic complications in a burn trauma patient: effect of perioperative blood transfusion? *Burns* 1997;23(1):59-63.
 111. Nielsen HJ, Skov F, Dybkjaer E, Reimert CM, Pedersen AN, Brunner N et al. Leucocyte and platelet-derived bioactive substances in stored blood: effect of prestorage leucocyte filtration. *Eur.J.Haematol.* 1997;58(4):273-8.
 112. Nishida T, Fujita N, Nakao K. A multivariate analysis of the prognostic factors in severe liver trauma. *Surg.Today* 1996;26(6):389-94.
 113. Noveck RJ, Shannon EJ, Leese PT, Shorr JS, Flaim KE, Keipert PE et al. Randomized safety studies of intravenous perflubron emulsion. II. Effects on immune function in healthy volunteers. *Anesth.Analg.* 2000;91(4):812-22.
 114. Oshita M, Takei Y, Kawano S, Yoshihara H, Hijioka T, Fukui H et al. Roles of endothelin-1 and nitric oxide in the mechanism for ethanol-induced vasoconstriction in rat liver. *J.Clin.Invest* 1993;91(4):1337-42.
 115. Pannen BH, Bauer M. Differential regulation of hepatic arterial and portal venous vascular resistance by nitric oxide and carbon monoxide in rats. *Life Sci.* 1998;62(22):2025-33.
 116. Paxian M, Rensing H, Bauer I, Bauer M. Molecular mechanisms of hepatocellular injury after hemorrhagic shock (abstract). *Shock* 2001;15 (suppl 1)(17).
 117. Paxian M, Keller SA, Huynh TT, Clemens MG. Perflubron emulsion improves hepatic microvascular integrity and mitochondrial redox state after hemorrhagic shock. *Shock* 2003;20(5):449-57.
 118. Paxian M, Rensing H, Geckeis K, Bauer I, Kubulus D, Spahn DR et al. Perflubron emulsion in prolonged hemorrhagic shock: influence on hepatocellular energy metabolism and oxygen-dependent gene expression. *Anesthesiology* 2003;98(6):1391-9.

119. Peitzman AB, Billiar TR, Harbrecht BG, Kelly E, Udekwu AO, Simmons RL. Hemorrhagic shock. *Curr.Probl.Surg.* 1995;32(11):925-1002.
120. Poyck PP, Hoekstra R, Vermeulen JL, van Wijk AC, Chamuleau RA, Hakvoort TB et al. Expression of glutamine synthetase and carbamoylphosphate synthetase i in a bioartificial liver: markers for the development of zonation in vitro. *Cells Tissues.Organs* 2008;188(3):259-69.
121. Puschel GP, Oppermann M, Neuschaefer-Rube F, Gotze O, Jungermann K. Differential effects of human anaphylatoxin C3a on glucose output and flow in rat liver during orthograde and retrograde perfusion: the periportal scavenger cell hypothesis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 1991;176(3):1218-26.
122. Raat NJ, Ince C. Oxygenating the microcirculation: the perspective from blood transfusion and blood storage. *Vox Sang.* 2007;93(1):12-8.
123. Raat NJ, Liu JF, Doyle MP, Burhop KE, Klein J, Ince C. Effects of recombinant-hemoglobin solutions rHb2.0 and rHb1.1 on blood pressure, intestinal blood flow, and gut oxygenation in a rat model of hemorrhagic shock. *J.Lab Clin.Med.* 2005;145(1):21-32.
124. Raat NJ, Liu JF, Doyle MP, Burhop KE, Klein J, Ince C. Effects of recombinant-hemoglobin solutions rHb2.0 and rHb1.1 on blood pressure, intestinal blood flow, and gut oxygenation in a rat model of hemorrhagic shock. *J.Lab Clin.Med.* 2005;145(1):21-32.
125. Rappaport AM. The microcirculatory hepatic unit. *Microvasc.Res.* 1973;6(2):212-28.
126. Redl H, Gasser H, Schlag G, Marzi I. Involvement of oxygen radicals in shock related cell injury. *Br.Med.Bull.* 1993;49(3):556-65.
127. Regel G, Grotz M, Weltner T, Sturm JA, Tscherne H. Pattern of organ failure following severe trauma. *World J.Surg.* 1996;20(4):422-9.
128. Reinhart WH, Chien S. Red cell rheology in stomatocyte-echinocyte transformation: roles of cell geometry and cell shape. *Blood* 1986;67(4):1110-8.
129. Resta TC, Walker BR, Eichinger MR, Doyle MP. Rate of NO scavenging alters effects of recombinant hemoglobin solutions on pulmonary vasoreactivity. *J.Appl.Physiol* 2002;93(4):1327-36.
130. Riess JG, Krafft MP. Fluorinated materials for in vivo oxygen transport (blood substitutes), diagnosis and drug delivery. *Biomaterials* 1998;19(16):1529-39.
131. Rogers MS, Ryan BB, Cashon RE, Alayash AI. Effects of polymerization on the oxygen carrying and redox properties of diaspirin cross-linked hemoglobin. *Biochim.Biophys.Acta* 1995;1248(2):135-42.
132. Rossaint R, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, Gordini G et al. Key issues in advanced bleeding care in trauma. *Shock* 2006;26(4):322-31.
133. Santry HP, Alam HB. Fluid resuscitation: past, present, and the future. *Shock* 2010;33(3):229-41.

134. Saxena R, Wijnhoud AD, Carton H, Hacke W, Kaste M, Przybelski RJ et al. Controlled safety study of a hemoglobin-based oxygen carrier, DCLHb, in acute ischemic stroke. *Stroke* 1999;30(5):993-6.
135. Schlag G, Redl H. Morphology of the microvascular system in shock: lung, liver, and skeletal muscles. *Crit Care Med.* 1985;13(12):1045-9.
136. Schubert A, O'Hara JF, Jr., Przybelski RJ, Tetzlaff JE, Marks KE, Mascha E et al. Effect of diaspirin crosslinked hemoglobin (DCLHb HemAssist) during high blood loss surgery on selected indices of organ function. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 2002;30(4):259-83.
137. Shah DM, Gottlieb ME, Rahm RL, Stratton HH, Barie PS, Paloski WH et al. Failure of red blood cell transfusion to increase oxygen transport or mixed venous PO₂ in injured patients. *J.Trauma* 1982;22(9):741-6.
138. Shanwell A, Kristiansson M, Remberger M, Ringden O. Generation of cytokines in red cell concentrates during storage is prevented by prestorage white cell reduction. *Transfusion* 1997;37(7):678-84.
139. Sheehan H, Davis J. Renal ischaemia with good reflow. *J.Pathol.Bacteriol.* 1959;78:351-77.
140. Shinozawa Y, Koike K. [Pathophysiologies of ischemic/reperfusion injuries associating with hemorrhagic shock and up-to-date treatment]. *Nihon Geka Gakkai Zasshi* 2003;104(12):835-9.
141. Shoemaker SA, Gerber MJ, Evans GL, Archer-Paik LE, Scoggin CH. Initial clinical experience with a rationally designed, genetically engineered recombinant human hemoglobin. *Artif.Cells Blood Substit.Immobil.Biotechnol.* 1994;22(3):457-65.
142. Siegel JH, Mason-Gonzalez S, Dischinger PC, Read KM, Cushing BM, Badellino MC et al. Causes and costs of injuries in multiple trauma patients requiring extrication from motor vehicle crashes. *J.Trauma* 1993;35(6):920-31.
143. Singh G, Chaudry KI, Chaudry IH. Crystalloid is as effective as blood in the resuscitation of hemorrhagic shock. *Ann.Surg.* 1992;215(4):377-82.
144. Sloan EP, Koenigsberg M, Brunett PH, Bynoe RP, Morris JA, Tinkoff G et al. Post hoc mortality analysis of the efficacy trial of diaspirin cross-linked hemoglobin in the treatment of severe traumatic hemorrhagic shock. *J.Trauma* 2002;52(5):887-95.
145. Spahn DR. Blood substitutes. *Crit Care* 1999;3(5):R91-R92.
146. Spahn DR. Blood substitutes. Artificial oxygen carriers: perfluorocarbon emulsions. *Crit Care* 1999;3(5):R93-R97.
147. Spahn DR, Cerny V, Coats TJ, Duranteau J, Fernandez-Mondejar E, Gordini G et al. Management of bleeding following major trauma: a European guideline. *Crit Care* 2007;11(1):R17.
148. Spahn DR, Kocian R. Artificial O₂ carriers: status in 2005. *Curr.Pharm.Des* 2005;11(31):4099-114.

149. Spahn DR, Pasch T. Physiological properties of blood substitutes. *News Physiol Sci.* 2001;16:38-41.
150. Spahn DR, van Brempt R, Theilmeier G, Reibold JP, Welte M, Heinzerling H et al. Perflubron emulsion delays blood transfusions in orthopedic surgery. European Perflubron Emulsion Study Group. *Anesthesiology* 1999;91(5):1195-208.
151. Spahn DR, Waschke KF, Standl T, Motsch J, Van Huynegem L, Welte M 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(6):1338-49.
152. Spiess BD. Perfluorocarbon emulsions as a promising technology: a review of tissue and vascular gas dynamics. *J.Appl.Physiol* 2009;106(4):1444-52.
153. Stern SA, Dronen SC, McGoron AJ, Wang X, Chaffins K, Millard R et al. Effect of supplemental perfluorocarbon administration on hypotensive resuscitation of severe uncontrolled hemorrhage. *Am.J.Emerg.Med.* 1995;13(3):269-75.
154. Sturm J. Traumatic aortic rupture. *Ann.Thorac.Surg.* 1979;27(4):390.
155. Szebeni J, Baranyi L, Savay S, Gotze O, Alving CR, Bunger R et al. Complement activation during hemorrhagic shock and resuscitation in swine. *Shock* 2003;20(4):347-55.
156. Tauber S, Menger MD, Lehr HA. Microvascular in vivo assessment of reperfusion injury: significance of prostaglandin E(1) and I(2) in postischemic "no-reflow" and "reflow-paradox". *J.Surg.Res.* 2004;120(1):1-11.
157. Tilney NL, Bailey GL, Morgan AP. Sequential system failure after rupture of abdominal aortic aneurysms: an unsolved problem in postoperative care. *Ann.Surg.* 1973;178(2):117-22.
158. van Bommel J, de Korte D, Lind A, Siegemund M, Trouwborst A, Verhoeven AJ et al. The effect of the transfusion of stored RBCs on intestinal microvascular oxygenation in the rat. *Transfusion* 2001;41(12):1515-23.
159. van de WL. Red cell storage and prognosis. *Vox Sang.* 2011;100(1):36-45.
160. Van Way CW, Dhar A, Reddy R, Evans L, Wogahn B, Helling TS. Changes in adenine nucleotides during hemorrhagic shock and reperfusion. *J.Surg.Res.* 1996;66(2):159-66.
161. Vollmar B, Glasz J, Leiderer R, Post S, Menger MD. Hepatic microcirculatory perfusion failure is a determinant of liver dysfunction in warm ischemia-reperfusion. *Am.J.Pathol.* 1994;145(6):1421-31.
162. Vollmar B, Menger MD. The hepatic microcirculation: mechanistic contributions and therapeutic targets in liver injury and repair. *Physiol Rev.* 2009;89(4):1269-339.
163. Vorstand der Bundesärztekammer auf Empfehlung des Wissenschaftlichen Beirats. Querschnitts-Leitlinien (BÄK) zur Therapie mit Blutkomponenten und Plasmaderivaten [dissertation]. 2008.

164. Wake K, Sato T. Intralobular heterogeneity of perisinusoidal stellate cells in porcine liver. *Cell Tissue Res.* 1993;273(2):227-37.
165. Wang P, Hauptman JG, Chaudry IH. Hemorrhage produces depression in microvascular blood flow which persists despite fluid resuscitation. *Circ.Shock* 1990;32(4):307-18.
166. Wang P, Hauptman JG, Chaudry IH. Hepatocellular dysfunction occurs early after hemorrhage and persists despite fluid resuscitation. *J.Surg.Res.* 1990;48(5):464-70.
167. Watford M. Glutamine and glutamate metabolism across the liver sinusoid. *J.Nutr.* 2000;130(4S Suppl):983S-7S.
168. West MB, Hill BG, Xuan YT, Bhatnagar A. Protein glutathiolation by nitric oxide: an intracellular mechanism regulating redox protein modification. *FASEB J.* 2006;20(10):1715-7.
169. Wiggers H, Ingraham R. Hemorrhagic shock; definition and criteria for its diagnosis. *J.Clin.Invest* 1946;25:30-6.
170. Winslow RM. Blood substitutes. *Adv.Drug Deliv.Rev.* 2000;40(3):131-42.
171. Yazdanbakhsh K, Bao W, Zhong H. Immunoregulatory effects of stored red blood cells. *Hematology.Am.Soc.Hematol.Educ.Program.* 2011;2011:466-9.
172. Young PP, Cotton BA, Goodnough LT. Massive transfusion protocols for patients with substantial hemorrhage. *Transfus.Med.Rev.* 2011;25(4):293-303.
173. Yu B, Shahid M, Egorina EM, Sovershaev MA, Raheer MJ, Lei C et al. Endothelial dysfunction enhances vasoconstriction due to scavenging of nitric oxide by a hemoglobin-based oxygen carrier. *Anesthesiology* 2010;112(3):586-94.

Die Arbeit wurde in Teilen bereits veröffentlicht:

Perflubron emulsion in prolonged hemorrhagic shock: influence on hepatocellular energy metabolism and oxygen-dependent gene expression.

Paxian M, Rensing H, Geckeis K, Bauer I, Kubulus D, Spahn DR, Bauer M.

Anesthesiology. 2003 Jun;98(6):1391-9.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. R. Larsen danke ich für die Ermöglichung dieser Arbeit im Labor seiner Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin des Universitätsklinikums des Saarlandes, Homburg/Saar.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. med. Michael Bauer für die Möglichkeit der Durchführung dieser Arbeit und die Überlassung des Themas.

Für die Betreuung und die Unterstützung möchte ich mich bei Herrn PD Dr. med. Markus Paxian bedanken, dessen konstruktive Kritik und die unermüdlichen Korrekturarbeiten schlussendlich zur Fertigstellung dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt allen Mitarbeitern des Forschungslabors der Anästhesie in Homburg, für die stets nette und kompetente Zusammenarbeit.

Weiterhin möchte ich mich bei meinem Lebengefährten Dr. med. Michael Bell bedanken, durch dessen stetige Ermunterung und Motivation diese Arbeit erst zu einem Ende gekommen ist.