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

Elektronenmikroskopische Analyse des Einflusses von Hydroxyethylstärke auf die endotheliale Permeabilität während des frühen akuten Lungenschadens *in vivo*

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von
Annika Basedow
aus Kiel
Hamburg 2010

Angenommen von der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 10.11.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der

Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. A.E. Goetz

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter/in: Prof. Dr. D.A. Reuter

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter/in: Prof. Dr. D. Singer



Inhaltsverzeichnis

1	Einle	tung	.1		
	1.1	Epidemiologie des akuten Lungenschadens1			
	1.2	Pathogenese des akuten Lungenschadens	. 1		
		1.2.1 Physiologie der alveolokapillären Barriere	.2		
		1.2.2 Pathophysiologie der alveolokapillären Barriere	.3		
	1.3	Einfluss der Volumentherapie auf die pulmonale mikrovaskuläre Permeabilität	.5		
	1.4	Methoden zur Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität	.8		
2	Arbe	shypothese und Fragestellung	.9		
3	Mate	Material und Methoden			
	3.1	Tierschutz1	10		
	3.2	Versuchstiere10			
	3.3	Anästhesie und Beatmung10			
	3.4	Makrohämodynamisches Monitoring1	11		
		3.4.1 Herzfrequenz, arterieller und zentralvenöser Druck	11		
		3.4.2 Herzzeitvolumen1	12		
	3.5	Blutgasanalyse13			
	3.6	Wet /dry weight ratio14			
	3.7	Goldmarkiertes Kaninchen-Serumalbumin (Au-RSA)1	15		
		3.7.1 Herstellung1	15		
		3.7.2 Absorptionsmaximum und Standardkurve der Absorption 1	18		
		3.7.3 Applikation und Bestimmung der <i>Plasma Disappearance Rate</i> (PDR)1	19		
	3.8	Elektronenmikroskopie			
		3.8.1 Gewinnung von Gewebeproben und Fixierung2	20		
		3.8.2 Einbettung und Kontrastierung2	20		
		3.8.3 Gemessene und berechnete Parameter	22		
	3.9	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)2	27		

		3.9.1	Isolierung von mRNA	27	
		3.9.2	Bestimmung der RNA-Konzentration	28	
		3.9.3	Synthese komplementärer DNA (cDNA)	28	
		3.9.4	Amplifizierung der cDNA: PCR	29	
		3.9.5	Identifizierung der PCR-Produkte: Gelelektrophorese	29	
		3.9.6	Quantifizierung der Gelelektrophoresebanden	30	
	3.10	Applizi	erte Substanzen	31	
		3.10.1	Endotoxin	31	
		3.10.2	Physiologische Kochsalzlösung	31	
		3.10.3	Hydroxyethylstärke	31	
	3.11	Zielpaı	rameter der Volumentherapie	32	
	3.12	Aussch	hlusskriterien	32	
	3.13	Studie	nprotokoll	32	
	3.14	Daten	verarbeitung und Statistik	34	
4	Erge	bnisse		35	
	4.1	Makrol	hämodynamik	35	
	4.2	Blutga	sanalyse	37	
	4.3	Wet/dry weight ratio41			
	4.4	Goldm	arkiertes Kaninchen-Serumalbumin (Au-RSA)	42	
		4.4.1	Applizierte Goldmenge	42	
		4.4.2	Plasma Disappearance Rate (PDR)	43	
	4.5	Elektro	onenmikroskopie	45	
		4.5.1	Alveolokapilläre Septendicke	46	
		4.5.2	Endothelzelldicke	47	
		4.5.3	Epithelzelldicke	48	
		4.5.4	Goldpartikelkonzentration im Plasma	49	
		4.5.5	Goldpartikelkonzentration im Endothel	50	
		4.5.6	Konzentration und Anteil der freien Goldpartikel	51	
		4.5.7	Konzentration der goldtragenden Vesikel (GCV)	53	
		4.5.8	GCV-Durchmesser	54	
		4.5.9	Goldpartikelkonzentration in GCV	55	

	4.6	Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)57			
		4.6.1	GAPDH	58	
		4.6.2	Aquaporin-1 (AQP-1)	59	
		4.6.3	Caveolin-1 (Cav-1)	60	
5	Disk	ussion		61	
	5.1	Methodenkritik			
		5.1.1	Versuchstiere	61	
		5.1.2	Makrohämodynamik und Blutgasanalyse	62	
		5.1.3	Induktion des akuten Lungenschadens mit Endotoxin	63	
		5.1.4	Gravimetrische Permeabilitätsanalyse: Wet/dry weight ratio	65	
		5.1.5	Elektronenmikroskopische Permeabilitätsanalyse: Applikation von goldmarkiertem Albumin	66	
		5.1.6	rt-PCR: Expression von Aquaporin-1 und Caveolin-1	70	
		5.1.7	Applizierte Substanzen	71	
			5.1.7.1 Endotoxin	71	
			5.1.7.2 Physiologische Kochsalzlösung	72	
			5.1.7.3 Hydroxyethylstärke	73	
	5.2	Diskussion der Ergebnisse			
		5.2.1	Makrohämodynamik und Blutgasanalyse	75	
		5.2.2	Wet/dry weight ratio	76	
		5.2.3	Elektronenmikroskopie und Plasma Disappearance Rate	77	
			5.2.3.1 Physiologische Determinanten der mikrovaskulär Permeabilität		
			5.2.3.2 Die mikrovaskuläre Permeabilität im akuten Lungenschaden	78	
			5.2.3.3 Einfluss von HES auf die mikrovaskuläre Permeabilität im akuten Lungenschaden	82	
		5.2.4	rt-PCR	87	
			5.2.4.1 Expression von Aquaporin-1	87	
			5.2.4.2 Expression von Caveolin -1	88	
	5.3	Bedeu	tung der Studie	90	
6	7 1192	mment	ร็สรรมทิต	91	

7	Lite	94	
8	Anhang1		
	8.1	Danksagung	105
	8.2	Lebenslauf	106
	8.3	Eidesstattliche Versicherung	107

Abkürzungsverzeichnis

AaDO₂ alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz

ALI Acute Lung Injury

Alv Alveole

AQP Aquaporin

ARDS Acute Respiratory Distress Syndrome

Au-RSA goldmarkiertes Kaninchenserumalbumin

BALF bronchoalveoläre Lavage-Flüssigkeit

BE Basenüberschuss

BGA Blutgasanalyse

BM Basalmembran

bp Basenpaare

C_{Au} Goldpartikelkonzentration im Endothel

C_{Au/GCV} Goldpartikelkonzentration in GCV

C_{fAu} Konzentration der freien Goldpartikel im Endothel

C_{GCV} Konzentration der goldtragenden Vesikel im Endothel

C_P Goldpartikelkonzentration im Plasma

Cav-1 Caveolin-1

cDNA komplementäre DNA

CI Herzzeitvolumen-Index

CVP zentralvenöser Druck

D_{En} Endothelzelldicke

D_{Ep} Epithelzelldicke

D_{GCV} GCV-Durchmesser

D_S alveolokapilläre Septendicke

DNA Desoxyribonukleinsäure

En Kapillarendothel

Ep Alveolarepithel

Fa Firma

GAPDH Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase

GCV goldtragende Vesikel

HCO₃ Bicarbonat

HES Hydroxyethylstärke

HLMVEC humane mikrovaskuläre Lungenendothelzellen

HR Herzfrequenz

HZV Herzzeitvolumen

FiO₂ inspiratorische Sauerstofffraktion

i.v. intravenös

Kap Kapillare

KG Körpergewicht

LPS Lipopolysaccharid

MAD mittlerer arterieller Druck

mRNA messenger RNA

n Anzahl

NF-κB nuclear factor-κB

p Signifikanzniveau

PaCO₂ arterieller Kohlendioxidpartialdruck

PaO₂ arterieller Sauerstoffpartialdruck

pCO₂ Kohlendioxidpartialdruck

PDR Plasma Disappearance Rate

PEEP Positive Endexspiratory Pressure

pO₂ Sauerstoffpartialdruck

RNA Ribonukleinsäure

RSA Kaninchenserumalbumin

rt-PCR reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion

SaO₂ arterielle Sauerstoffsättigung

ScvO₂ zentralvenöse Sauerstoffsättigung

TNF Tumornekrosefaktor

vWF von Willebrand-Faktor

W/D wet/dry weight ratio

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie des akuten Lungenschadens

Der akute Lungenschaden (*Acute Lung Injury*, ALI) und das *Acute Respiratory Distress Syndrome* (ARDS), seine schwerste Form, sind lebensbedrohliche Krankheitsbilder, die sich als akut einsetzendes und rasch progredientes Lungenversagen manifestieren. Klinisch imponiert hierbei vor allem eine ausgeprägte Verschlechterung des Gasaustausches mit zunehmender Hypoxämie, Hyperkapnie, respiratorischer Azidose und Ausbildung eines Lungenödems. Ursächlich können sowohl eine direkte Schädigung der Lunge, zum Beispiel durch Aspiration, Pneumonie oder Inhalation von Rauchgasen, als auch eine indirekte Lungenschädigung zum Beispiel im Rahmen von Polytrauma, Massentransfusion oder Verbrennung zur Entwicklung eines akuten Lungenschadens führen [18, 103, 119]. Die häufigste Ursache für die Ausbildung eines akuten Lungenschadens ist die Sepsis [119].

Epidemiologische Studien geben für den akuten Lungenschaden (ALI) eine Inzidenz von bis zu 78,9 Fällen pro 100 000 Einwohnern pro Jahr an, jedes Jahr treten weltweit mehrere hunderttausend Fälle auf, die mit einer Mortalität von bis zu 60 % einhergehen. Auch die überlebenden Patienten müssen eine erhebliche Einschränkung ihrer Lebensqualität hinnehmen [34, 97, 119]. Die mit der Behandlung der Patienten verbundenen Kosten sind immens.

Derzeit existiert keine kausale Therapie für den akuten Lungenschaden oder das *Acute Respiratory Distress Syndrome*. Neben der Vermeidung iatrogener Komplikationen und der Behandlung der auslösenden Ursache ist das Ziel der Therapie, die CO₂-Elimination aus dem Organismus und die Sauerstoffaufnahme in der Lunge zu unterstützen, und damit die Sauerstoffversorgung lebenswichtiger Organe aufrechtzuerhalten [56, 124].

1.2 Pathogenese des akuten Lungenschadens

Die Untersuchung von Patienten im fortgeschrittenen Stadium des akuten Lungenschadens zeigt neben der klinischen Symptomatik auch typische radiologische Veränderungen in Form von disseminierten feinfleckigen Verschattungen beider Lungen. Ursache hierfür ist eine diffuse Infiltration von Entzündungszellen, sowie eine erhöhte Permeabilität für Makromoleküle und Wasser, was zur Entwicklung eines Lungenödems führt. Mikroskopisches Korrelat des Lungenödems ist eine Störung der zellulären Barriere zwischen Alveolen und Kapillaren, über die der Gasaustausch stattfindet.

1.2.1 Physiologie der alveolokapillären Barriere

Die alveolokapilläre Barriere setzt sich aus dem pulmonalen Kapillarendothel, der gemeinsamen Basallamina und dem Alveolarepithel zusammen. Eine schematische Darstellung des alveolokapillären Septums zeigt Abbildung 1. Unter physiologischen Bedingungen besitzt das mikrovaskuläre Endothel der Lunge die Eigenschaften einer semipermeablen Membran. Es kontrolliert die Passage von Flüssigkeit und Makromolekülen zwischen Blut und interstitiellem Raum und ist damit essentiell für den Erhalt einer möglichst dünnen Diffusionsstrecke und einen ungehinderten Gasaustausch zwischen Kapillare und Alveole [66]. Für den Transport von Stoffen über die intakte Endothelbarriere gibt es prinzipiell zwei unterschiedliche Möglichkeiten: den parazellulären und den transzellulären Weg. interzellulären Verbindungen des pulmonalen Endothels unter physiologischen Bedingungen dicht verschlossen sind, treten nur geringe Mengen Wasser und kleine Moleküle mit einem Durchmesser von weniger als 3 nm parazellulär aus. Wasser passiert das Endothel außerdem über wasserspezifische Membrankanäle, die sogenannten Aquaporine (AQP), wobei für das mikrovaskuläre Endothel der Lunge Aguaporin-1 typisch ist [114]. Der Transport von Makromolekülen wie Albumin findet ausschließlich transzellulär in Form von Vesikeln statt [32, 68, 99, 118]. Für die Vesikelbildung und damit auch für den Transport von Albumin ist das Caveolin-1 essentiell. Es stellt die Hauptproteinkomponente der Vesikel dar [69, 70, 87, 88, 112]. Der Transport von Albumin über die Endothelbarriere ist von besonderem Interesse, da die Gewebskonzentration dieses Plasmaproteins den onkotischen Druck des Gewebes und damit die Flüssigkeitsbalance zwischen extra- und intravasalem Raum in erheblichen Maße beeinflusst. Das Endothel reguliert seinerseits den Transport von Albumin und kontrolliert auf diese Weise den transendothelialen onkotischen Druckgradienten, der für die Flüssigkeitsresorption verantwortlich ist [57, 66].

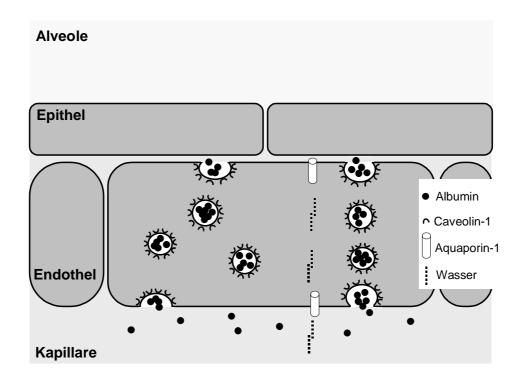


Abbildung 1: Schematische Darstellung der alveolokapillären Barriere und transendothelialer Transportmechanismen unter physiologischen Bedingungen.

1.2.2 Pathophysiologie der alveolokapillären Barriere

Im Initialstadium des akuten Lungenschadens als häufige Komplikation eines septischen Krankheitsbildes kommt es zu einer Steigerung der endothelialen Permeabilität. Zahlreiche inflammatorische Mediatoren, deren Ausschüttung unter anderem durch eine Endotoxinämie oder von aktivierten Leukozyten initiiert wird, schädigen das Endothel und damit seine Barrierefunktion. Der unkontrollierte Austritt von Flüssigkeit und Plasmaproteinen wie Albumin führt zur Verbreiterung der Gasaustauschstrecke und letztlich zur Entstehung eines Lungenödems, das die Diffusionskapazität und damit den Gasaustausch zwischen Alveolen und Kapillaren massiv behindert [16, 64, 75].

Der Mechanismus, der dieser Permeabilitätszunahme zugrunde liegt, ist bislang nur unvollständig geklärt. Für einige der inflammatorischen Mediatoren konnte *in vitro* gezeigt werden, dass sie über verschiedene Signalwege zu einer Zerstörung von Zellkontakten zwischen den Endothelzellen führen und so die parazelluläre Permeabilität erhöhen [19, 57, 58, 109]. Solche interzellulären Lücken konnten jedoch im akuten Stadium des ARDS *in vivo* nicht nachgewiesen werden [4, 5].

BACHOFEN et al. [5] untersuchten das Lungengewebe von Patienten, die in verschiedenen Stadien des sepsisinduzierten ARDS verstorben waren. Bei den beobachteten Gewebsveränderungen des akuten Stadiums, die innerhalb von 20 Stunden bis zu vier Tagen Erkrankungsdauer auftraten, handelte es sich vorwiegend um interstitielle und alveoläre Ödeme, sowie Zellinfiltrate. Bachofen beschreibt außerdem eine irreguläre Schwellung und das Auftreten großer Vakuolen in den Endothelzellen. Trotz der offensichtlichen Zeichen einer Permeabilitätszunahme wurden jedoch keine interendothelialen Lücken nachgewiesen, sodass andere Mechanismen ursächlich an der Ödembildung beteiligt sein müssen.

Bedeutung der Transzytose Die als Mechanismus der Flüssigkeitsund Proteinexsudation im Rahmen der inflammatorischen Veränderung der Endothelbarriere ist bis heute kaum untersucht. Eine Beteiligung des transzellulären Wegs an der erhöhten endothelialen Permeabilität insbesondere während des frühen Stadiums der Inflammation ist jedoch wahrscheinlich [31, 44, 66, 110]. TIRUPPATHI et al. zeigten in einer aktuellen Studie, dass es unter dem Einfluss von Endotoxin zu einer gesteigerten Caveolin-1- Expression kam, was eine Zunahme von Caveolae und eine erhöhte transendotheliale Permeabilität für Albumin zur Folge hatte [110]. Die Untersuchung dieser initialen Mechanismen ist von entscheidender Bedeutung, da die frühe Phase der Erkrankung ein essentielles therapeutisches Fenster darstellt: Ausschließlich innerhalb der ersten Stunden, beziehungsweise vor dem Auftreten manifester Organschädigungen, besteht die Möglichkeit die Überlebenswahrscheinlichkeit zu verbessern [49].

Wir vermuten, dass insbesondere im Initialstadium eine aktive Reaktion der noch vitalen Endothelzellen eine entscheidende Rolle für die pathophysiologische Entwicklung des akuten Lungenschadens einnimmt. Hypothese der vorliegenden Studie ist eine im Rahmen der Inflammation auftretende Zunahme des transendothelialen vesikulären Transports infolge einer gesteigerten Caveolin-1-Expression im Sinne einer frühen aktiven Reaktion des Endothels auf einen inflammatorischen Stimulus. Als Ursache einer endothelialen Ödembildung vermuten wir außerdem eine inflammationsbedingte Beeinträchtigung der Vesikelqualität, die mit der Abschnürung größerer, instabiler Vesikel einhergeht, die ihren Inhalt in das Zytoplasma freisetzen und so zu einer Zunahme von Flüssigkeit und freien Makromolekülen wie Albumin in der Endothelzelle führen. Aufgrund osmotischer

Kräfte kommt es in der Folge zu einem vermehrten Flüssigkeitseinstrom in die Endothelzelle. Ein inflammationsbedingt gesteigerter Einbau von Aquaporinen kann diesen Effekt durch die Erleichterung des Wassereinstroms verstärken. Abbildung 2 zeigt eine schematische Darstellung der beschriebenen möglichen Veränderungen der alveolokapillären Barriere im Rahmen der Inflammation.

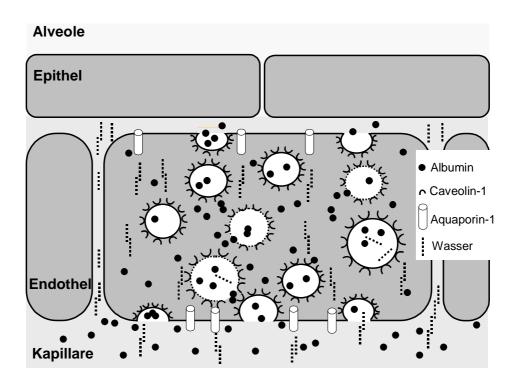


Abbildung 2: Schematische Darstellung der alveolokapillären Barriere unter inflammatorischen Bedingungen und mögliche pathophysiologische Veränderungen des transendothelialen Transports.

1.3 Einfluss der Volumentherapie auf die pulmonale mikrovaskuläre Permeabilität

Im Rahmen des akuten Lungenschadens als Folge einer systemischen Inflammation kommt es nicht nur in der Lunge, sondern im gesamten Organismus zu einer erhöhten Gefäßdurchlässigkeit für Flüssigkeit und Plasmaproteine wie Albumin, sowie zu einer Vasodilatation [16, 75]. Beide Faktoren führen zu einem relevanten intravaskulären Volumendefizit bis hin zu einer Schocksymptomatik, so dass eine Volumentherapie erforderlich ist. Entscheidend für die Therapie ist, dass diese früh und zielgerichtet erfolgt, da dies nachweislich die Mortalität verringert [95]. Für die Volumentherapie im akuten Lungenschaden stehen kristalloide und kolloidale

Lösungen zur Verfügung, über eine "Therapie der Wahl" besteht jedoch bis heute kein Konsens [86, 113]. Laut aktueller Leitlinien wird sowohl der Einsatz von Kristalloiden als auch von Kolloiden empfohlen [15].

Kristalloide Lösungen wie NaCl- oder Ringer-Lösung sind isoton und enthalten nur Wasser und Elektrolyte. Zum Ausgleich eines Volumenmangels müssen sie in relativ großer Menge appliziert werden, da der überwiegende Anteil aufgrund des fehlenden onkotischen Drucks schnell aus dem intravasalen Raum in das Gewebe austritt und die intravasale Volumenwirkung infolge dessen nur kurz ist [62, 116]. Die Bildung eines Ödems kann auf diese Weise verstärkt werden. Im Rahmen klinischer Studien war die Restriktion kristalloider Lösungen mit einer Verbesserung der Lungenfunktion und Senkung der Mortalität von ARDS-Patienten assoziiert [102, 125].

Da kolloidale Lösungen einen substanzabhängig hohen onkotischen Druck besitzen, kann durch die Infusion kleinerer Mengen in kürzerer Zeit ein stärkerer Volumeneffekt als mit kristalloiden Lösungen erreicht werden.

Das einzige natürliche Kolloid stellt Albumin dar. Im Vergleich zu kristalloiden Lösungen zeigte die Behandlung mit Albumin keine eindeutigen Vorteile [1, 27, 117]. Zudem ist die Albuminsubstitution mit hohen Kosten verbunden, so dass sie derzeit nicht für die Volumentherapie empfohlen wird [2].

Gelatine und Dextran sind synthetische Kolloide. Das geringe Molekulargewicht von Gelatine hat eine rasche renale Elimination zur Folge, so dass die Volumenwirkung nur von kurzer Dauer ist [81]. Dextrane können zu Gerinnungsstörungen führen [6]. Beide Kolloide führen vergleichsweise häufig zu anaphylaktischen beziehungsweise anaphylaktoiden Reaktionen [6]. Aufgrund dieser wesentlichen Nachteile kommen sowohl Gelatine-, als auch Dextranpräparate zunehmend seltener zur Anwendung [81].

Auch die Anwendung des synthetischen Kolloids Hydroxyethylstärke (HES) ist nicht unumstritten [86]. Ältere Hydroxyethylstärkepräparate mit einem hohen Molekulargewicht führen dosisabhängig zu Nierenfunktionsstörungen [14]. Die VISEP-Studie (Volume Substitution and Insulin Therapy in Severe Sepsis) untermauert dies und stellt unter dem Einfluss von Hydroxyethylstärke 200/0,5 eine erhöhte Inzidenz von akutem Nierenversagen fest [9]. Hierbei muss jedoch berücksichtigt werden, dass die genannte Studie aufgrund methodischer Mängel des

angewandten Studienprotokolls stark umstritten ist, da unter anderem vom Hersteller angegebene Kontraindikationen missachtet und Maximaldosen überschritten wurden [128]. In der Therapie der Sepsis sollte eine hochdosierte und ausschließliche Applikation von HES 200/0,5 in jedem Fall vermieden werden. Eine ausreichende Flüssigkeitszufuhr ist unerlässlich. zusätzliche kristalloide Vor allem Niereninsuffizienz ist auf die Verwendung von hyperonkotischer Hydroxyethylstärke zu verzichten. Unter Beachtung dieser Bedingungen und der Kontraindikationen mittleren werden moderne Hydroxyethystärkeprodukte Molekulargewichts nebenwirkungsarm im intensivmedizinischen Alltag eingesetzt [81, 98]. In einigen klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass Hydroxyethylstärke im Vergleich zu anderen Volumenersatzmitteln die mikrovaskuläre Permeabilität vermindern kann und die Lungenfunktion sowie den Gasaustausch verbessert [3, 93, 94, 113].

Die Ergebnisse experimenteller Studien stützen diese Erkenntnisse:

In tierexperimentellen Studien verminderte Hydroxyethylstärke 130/0,4 die pulmonale kapilläre Permeabilität, die im Rahmen einer durch Ligation und Punktion des Zökums polymikrobiell induzierten Sepsis [23, 24, 25] oder einer Endotoxinämie [42] auftrat. Sowohl in einem verbrennungsinduzierten [129], als auch in einem ischämisch [84] oder septisch [63] hervorgerufenen Modell des Endothelschadens reduzierte verschiedene Hydroxyethylstärkepräparate die Extravasation von Makromolekülen und Flüssigkeit. Auch in vitro konnte Hydroxyethylstärke 130/0,4 die induzierte gesteigerte Gefäßdurchlässigkeit Hypoxie und akute Entzündungsreaktion vermindern [17]. Eine strukturelle Analyse der durch Inflammation hervorgerufenen morphologischen Veränderungen der Gasaustauschstrecke zeigte, dass durch die Behandlung mit Hydroxyethylstärke 130/0,4 eine Abnahme der Alveolarseptendicke und eine geringere Ödembildung erreicht werden konnte [23].

Eine mögliche Erklärung für die permeabilitätssenkende Wirkung von Hydroxyethylstärke gibt die Vorstellung, dass Hydroxyethylstärkemoleküle die durch eine Endothelschädigung entstandenen kapillären Lücken "verstopfen" und so neben dem osmotischen Effekt auch direkt okklusiv wirken [115]. Auch antiinflammatorische Effekte [17, 23, 24, 25, 36, 59, 92, 107, 108] und eine Inhibition der Endothelzellaktivierung [8, 13, 94] sind wahrscheinlich an der endothelprotektiven

Wirkung der Hydroxyethylstärke beteiligt. Andere Mechanismen, insbesondere der transzelluläre Transport, spielen möglicherweise auch während der Inflammation eine entscheidende Rolle für die Extravasation von Plasmakomponenten [31, 44, 110]. Der Einfluss von Hydroxyethylstärke auf diese Mechanismen ist jedoch unbekannt.

1.4 Methoden zur Bestimmung der mikrovaskulären Permeabilität

Für die Untersuchung der mikrovaskulären Permeabilität existieren vielfältige Beispiel die Verwendung von radioaktiv markierten Methoden. wie zum Markermolekülen, die Proteinbestimmung in der bronchoalveolären Flüssigkeit oder auch gravimetrische Techniken, zu denen die Bestimmung des Quotienten aus Feucht- und Trockengewicht (wet/dry weight ratio) zählt [85]. Eine genaue Analyse mikroanatomischen Veränderungen, die einer Permeabilitätssteigerung zugrunde liegen, erlaubt jedoch ausschließlich die Elektronenmikroskopie, da nur hier einzelne Zellen und ihre Ultrastruktur dargestellt werden können. Goldmarkiertes Albumin, das im Elektronenmikroskop eindeutig zu identifizieren ist, wurde einst für die Untersuchung der pulmonalen mikrovaskulären Perfusion genutzt [52], es ermöglicht zudem eine genaue Bestimmung der Extravasation von Makromolekülen und damit eine Quantifizierung der mikrovaskulären Permeabilität [39]. Die Verwendung von goldmarkiertem Albumin für die elektronenmikroskopischen Analyse der frühen Phase des akuten Lungenschadens in vivo ermöglicht die einzigartige Verbindung, die mikrostrukturellen Veränderungen und transendothelialen Transportmechanismen exakt zu visualisieren, und gleichzeitig die mikrovaskuläre Permeabilität zu quantifizieren.

2 Arbeitshypothese und Fragestellung

Ein entscheidender Schritt in der Pathogenese des akuten Lungenschadens ist eine Zunahme der pulmonalen Gefäßdurchlässigkeit, die zum Austritt proteinreicher Flüssigkeit führt und zur Entstehung eines Lungenödems beiträgt.

Für die vorliegende Studie wurde folgende Hypothese aufgestellt: In der Initialphase des endotoxininduzierten akuten Lungenschadens kommt zu einer inflammationsbedingten Zunahme des transendothelialen vesikulären Transports infolge einer gesteigerten Caveolin-1-Expression. Zusätzlich führt eine im Rahmen der Inflammation auftretende Beeinträchtigung der Vesikelqualität zur Abschnürung größerer, instabiler Vesikel, die ihren Inhalt in das Zytoplasma freisetzen und so zu einer Zunahme freier Makromoleküle wie Albumin in der Endothelzelle führen. Aufgrund osmotischer Kräfte kommt es in der Folge zu einem vermehrten Flüssigkeitseinstrom in die Endothelzelle. Ein inflammationsbedingt gesteigerter Einbau von Aquaporinen kann diesen Effekt durch die Erleichterung des Wassereinstroms verstärken. Es resultiert eine endotheliale Zellschwellung als Korrelat einer pulmonalen Ödembildung, die mit einer Einschränkung des Gasaustausches einhergeht.

Die Applikation von Hydroxyethylstärke zur Volumentherapie könnte durch eine Beeinflussung der Caveolin-1-Expression und des vesikulären Transports, sowie der Expression von Aquaporin-1 die pulmonale Ödembildung reduzieren und so den Gasaustausch verbessern.

Ziel der vorliegenden Studie war es, den Einfluss einer Volumensubstitution mit Hydroxyethylstärke während des frühen akuten Lungenschadens auf die pulmonale Ödembildung, die mikrovaskuläre, transzelluläre Permeabilität, die Expression von Caveolin-1 und Aquaporin-1, sowie auf den Gasaustausch zu untersuchen.

3 Material und Methoden

3.1 Tierschutz

Die tierexperimentellen Untersuchungen wurden gemäß des "Guide for the Care and Use of Laboratory Animals" von 1996 des National Research Council, Institute of Laboratory Animal Resources, Comission on Life Science, durchgeführt [78]. Nach Begutachtung durch die Tierschutzkommission erfolgte die Genehmigung für diese Versuche durch das Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz – Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg (Antragsnummer 72/05).

3.2 Versuchstiere

Bei den Versuchstieren handelte es sich um "Weiße Neuseeländer" Kaninchen mit einem Gewicht von 1,9 – 3,2 kg. Für die Studie wurden insgesamt 24 Tiere von der Firma Charles River Deutschland GmbH, Kißlegg, bezogen. Die Kaninchen wurden artgerecht nach den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in den Ställen der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf gehalten. Die Haltungsbedingungen waren konstant bei einer Temperatur von 24°C, einer relativen Luftfeuchtigkeit von 50% und einem 12-stündigen Hell-Dunkel-Rhythmus. Die Tiere hatten freien Zugang zu Futter und Wasser. Der Transport der Kaninchen in die Laborräume der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie erfolgte unmittelbar vor der Durchführung der Versuche in einer Transportbox.

3.3 Anästhesie und Beatmung

Zu Beginn der Versuche erhielten die Tiere einen 22G Verweilkatheter (Insyte-W, Becton Dickinson, Heidelberg) in die hintere Ohrvene. Über diesen Katheter wurde die Narkose durch fraktionierte Applikation von 20 mg/kg Thiopental (Trapanal, Firma Byk Gulden, Konstanz) und 2 mg/kg Ketamin eingeleitet. Eine ausreichende Narkosetiefe konnte durch Überprüfung des Ausbleibens des Kornealreflexes sichergestellt werden.

Die Tiere wurden an Hals- und Thoraxvorderseite sowie an der linken Leiste enthaart. Für die anschließende Tracheotomie wurde die Trachea unterhalb des Kehlkopfes durch einen medialen Längsschnitt und stumpfe Präparation freigelegt. Es folgte eine quere Inzision zwischen zwei infraglottischen Knorpelringen, durch die ein auf etwa 10 cm gekürzter nicht blockbarer 5 mm Baby-Trachealtubus (Code 520, Firma Vygon) 2 cm in das Lumen eingeführt werden konnte. Dieser wurde mit Zwirnfäden (1-Leinenzwirn, Firma Ethicon, Norderstedt) am Trachealsaum fixiert.

Die Beatmung erfolgte maschinell druckgesteuert (Infant Ventilator IV-100, Sechrist Industries, Inc., Anaheim, USA) mit einem inspiratorischen Spitzendruck von 8 cmH₂O. Um möglichen beatmungsbedingten Mikroatelektasen vorzubeugen, wurde ein positiver endexpiratorischer Druck (PEEP) von 2 cmH₂O ausgewählt. Die inspiratorische Sauerstofffraktion (FiO₂) betrug 0,4, das Verhältnis von Inspiration zu Expiration 1:2. Anhand der Höhe des arteriellen Kohlendioxidpartialdrucks (PaCO₂) und des arteriellen pH-Werts wurde die Atemfrequenz gesteuert. Ziel war hierbei ein PaCO₂ von 35 mmHg sowie ein pH von ca. 7,4. Das hierfür erforderliche Atemminutenvolumen wurde über die Variation der Atemfrequenz (25-30/min) reguliert.

Die Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte durch eine kontinuierliche Infusion von 50 mg/kg KG α -D-(+)-Gluco-Chloralose (Merck, Darmstadt) und 0,1 mg/kg Fentanyl. Die Versuchstiere erhielten außerdem 5 ml/h physiologische Kochsalzlösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9%, B. Braun, Melsungen).

3.4 Makrohämodynamisches Monitoring

3.4.1 Herzfrequenz, arterieller und zentralvenöser Druck

Im Anschluss an die Tracheotomie wurde über den medialen Halszugang sowohl die rechte Arteria carotis, als auch die rechte Vena jugularis interna durch stumpfe Präparation freigelegt. Jedes der Gefäße wurde kranial mit einer Ligatur aus Leinenzwirn (3.0-Leinenzwirn, Firma Ethicon, Norderstedt) versehen. Kaudal wurden die Gefäße mit einem Microclip (Firma Aesculap, Tuttlingen) abgeklemmt. Zwischen Ligatur und Mikroclip wurde eine Inzision vorgenommen, durch welche in jedes Gefäß ein mit phyiologischer Kochsalzlösung gefüllter Katheter (Cavatheter 1,1 x 1,7 mm, Fresenius AG, Bad Homburg) eingeführt werden konnte. Nach Entfernung des

Mikroclips konnten die Katheter herzwärts vorgeschoben und mit 3.0 Leinenzwirn (Firma Ethicon, Norderstedt) durch Fixierung gesichert werden. Der Hautschnitt wurde vernäht (3.0-Ethibond, Firma Ethicon, Norderstedt).

Sowohl der über die Arteria carotis eingeführte arterielle, als auch der über die Vena jugularis interna eingeführte zentralvenöse Katheter wurden mittels einer mit physiologischer Kochsalzlösung (Isotone Kochsalzlösung 0,9%, B. Braun, Melsungen) gefüllten Druckmessleitung mit einem Druckwandler (Medex Mx960, Fa. Medex) verbunden. Über zwischengeschaltete Dreiwegehähne konnten aus den Kathetern jederzeit Blutproben entnommen oder Substanzen appliziert werden. Die von dem Druckwandler empfangenen Signale wurden kontinuierlich in Echtzeit auf einem Monitor (Marquette Tram-rac 4, Tram 600SL, Fa. Marquette) dargestellt. So konnten systolischer, diastolischer und mittlerer arterieller Druck, Herzfrequenz und zentralvenöser Druck zu jedem Zeitpunkt abgelesen werden.

3.4.2 Herzzeitvolumen

Zur Messung des Herzzeitvolumens (HZV) wurde die linke Leistenregion mit einem inguinalen Längsschnitt eröffnet und die Arteria femoralis stumpf freipräpariert. Entsprechend der Katheterisierung der Arteria carotis wurde das Gefäß zunächst distal legiert (3.0-Leinenzwirn, Firma Ethicon, Norderstedt), proximal wurde es mit einem Microclip (Firma Aesculap, Tuttlingen) abgeklemmt. Zwischen Ligatur und Microclip wurde eine Stichinzision vorgenommen. In das Gefäß wurde anschließend eine 5F Temperatursonde (Thermistor, Firma Arrow, Erding) eingeführt und nach Entfernung des Micoclips bis in den Aortenbogen herznah vorgeschoben. Nach Fixierung der Temperatursonde an der Eintrittstelle wurde der Hautschnitt mit einer Naht (3-0 Prolene, Firma Ethicon, Norderstedt) verschlossen.

Die Messung des Herzzeitvolumens erfolgte nach der Thermodilutionsmethode. Dieses Verfahren wurde erstmals von FEGLER et al. [20] beschrieben, der das Prinzip der Indikatordilution nach STEWART [104] anwendete. Hierbei wurde über einen zentralvenösen Katheter 1ml einer kalten physiologischen Kochsalzlösung als Indikator appliziert. Die Temperatur dieses Indikators wurde von einer Temperatursonde (Firma Baxter) an der Spitze des zentralvenösen Katheters gemessen und an einen HZV-Computer (Vigilance, Firma Baxter) übermittelt. Simultan wurde durch den über den femoralen Zugang eingeführten Thermistoren

die Temperatur des aortalen Blutes registriert. Der Computer errechnete aus dem Verlauf der Temperaturkurve über die Zeit nach Injektion des Indikators das an der aortalen Sonde vorbeigeflossene Blutvolumen. Die computergestützte Berechnung des Herzzeitvolumens erfolgte anhand der modifizierten Stewart-Hamilton-Gleichung [7]:

$$HZV = \frac{V_I x (T_B - T_I) x C_I x S_I x 60 x C_T}{C_B x S_B x \int_{0}^{\infty} \Delta T_B(t) dt}$$

Formel 1: Modifizierte Stewart-Hamilton-Gleichung zur Berechnung des Herzzeitvolumens

HZV: Herzzeitvolumen [I/min]

 V_1 : Volumen des Injektats [ml] $T_{B/l}$: Temperatur Blut/Injektat [\mathfrak{C}]

S_{B/l}: Dichte Blut/Injektat [kg/m³]

C_{B/I}: spezifische Wärmekapazität Blut/Injektat [J/kg K]

C_T: Katheterkonstante

 $\int\limits_{0}^{\infty}\!\Delta T_{_{B}}(t)dt$: Integral der Thermodilautionskurve [°C/sec]

Wird das Herzzeitvolumen auf das Körpergewicht bezogen, ergibt sich daraus der Herzzeitvolumen-Index (*Cardiac Index*, CI). Die Angabe des CI erfolgt in ml/kg/min.

3.5 Blutgasanalyse

Sowohl während der Präparation als auch zu definierten Zeitpunkten während des Versuchs wurden Blutgasanalysen (BGA) durchgeführt. Hierzu wurde den Tieren jeweils 1 ml arterielles und gemischtvenöses Blut entnommen. Mit Hilfe eines BGA-Gerätes (ABL505 und OSM3, Fa. Radiometer) wurden die Parameter gemessen. Aus den arteriellen Proben wurden arterieller Sauerstoffpartialdruck (paO₂), Kohlendioxidpartialdruck (pCO₂), pH-Wert, Bicarbonatkonzentration (HCO₃⁻), Basenüberschuss (BE) und arterielle Sauerstoffsättigung (SaO₂) ermittelt, aus dem gemischtvenösen Blut die zentralvenöse Sauerstoffsättigung (ScvO₂).

Die Parameter der Blutgasanalyse dienten der Untersuchung der pulmonalen Funktion anhand des Gasaustauschs sowie der Kontrolle des Säure-Basen-Haushalts. Um die Diffusionseigenschaften der Lunge genauer zu beschreiben, wurde die alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz (AaDO₂) hinzugezogen. Die alveolo-

arterielle Sauerstoffdifferenz (AaDO₂) gibt das Verhältnis zwischen dem Sauerstoffgehalt der Alveolarluft und dem arteriellen Sauerstoffpartialdruck an. Der Parameter spiegelt die Diffusions- beziehungsweise Gasaustauschfähigkeiten der Lunge wider. Mit Hilfe der AaDO₂ kann die Schwere des akuten Lungenschadens charakterisiert werden [124]. Diese wurde mit Hilfe der folgenden Formel errechnet:

$$AaDO_2 \approx \left[FiO_2 x \left(P_{Bar} - P_{H_2O} \right) - \frac{pCO_2}{0.8} \right] - pO_2$$

Formel 2: Berechnung der alveolo-arteriellen Sauerstoffdifferenz

AaDO2: alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz

FiO₂: inspiratorische Sauerstofffraktion P_{Bar}: Luftdruck zum Versuchszeitpunkt

Рн.о: Wasserdampfdruck unter Sättigungsbedingungen (47 mmHg)

pCO₂: arterieller Kohlendioxidpartialdruck pO₂: arterieller Sauerstoffpartialdruck

3.6 Wet /dry weight ratio

Nach Versuchsende wurde den Versuchtieren jeweils eine etwa 1 cm³ große Gewebeprobe aus den Lungen entnommen und auf einer Präzisionswaage (Sartorius Genius Analysenwaage, Sartorius AG, Göttingen) das Feuchtgewicht (weightwel) bestimmt. Anschließend wurde das Lungengewebe im Wärmeschrank (Heraeus Instruments GmbH, Hanau) bei 100℃ für ach t Stunden getrocknet und danach zur Bestimmung des Trockengewichts (weightdry) erneut gewogen. Aus den gemessenen Werten wurde nach folgender Formel die wet/dry weight ratio (W/D) als Parameter der Ödembildung in der Lunge berechnet [51]:

$$W/D = \frac{weight_{wet} - weight_{dry}}{weight_{wet}} x100$$

Formel 3: Berechnung der wet/dry weight ratio

3.7 Goldmarkiertes Kaninchen-Serumalbumin (Au-RSA)

In der vorliegenden Studie wurde goldmarkiertes Kaninchen-Serumalbumin als elektronenmikroskopischer Plasmamarker zur Untersuchung der pulmonalen mikrovaskulären Permeabilität während des frühen akuten Lungenschadens verwendet.

3.7.1 Herstellung

Die Herstellung von goldmarkiertem Kaninchen-Serumalbumin (Au-RSA) erfolgte nach der von König et al. [52] beschriebenen Methode. Hierbei werden Golpartikel mit einer Durchmesser von 8 nm mit Kaninchen-Serumalbumin (RSA) komplexiert. Dazu mussten zunächst zwei Lösungen angesetzt werden:

- Lösung A: 790 ml Milli-Q-Wasser
 (Milli-Q UF, Millipore Corporation, Badford, MA, USA)
 - 10 ml 1% Goldchlorid-Lösung
 (Goldchlorid AuCl₄H, Fluka, Buchs, Schweiz)
- Lösung B: 150 ml Milli-Q-Wasser
 - 40 ml 1% Tri-Natrium-Citrat-Lösung
 (Tri-Natrium-Citrat C₆H₅Na₃O₇ 2H₂O, Merck, Darmstadt)
 - 2 ml 1% Tannicsäure-Lösung
 (Tannic-Acid, Mallinckrodt, Paris, KY, USA)

Sowohl von Lösung A als auch von Lösung B wurden jeweils 6 Ansätze hergestellt. Die beiden Lösungen wurden auf $60\%\pm2\%$ erhitzt. Nach Erreichen der erzielten Temperatur wurden beide Lösungen unter ständigem starken Rühren zusammengegossen. Je zwei Portionen (ca. 2000 ml) des nun dunkelroten Lösungsgemisches wurden unter weiterem Rühren bis auf 95% erhitzt. Bei dieser Temperatur wurde das Lösungsgemisch solange gekocht, bis sich die Menge der Flüssigkeit auf 25% des Ausgangsvolumens (500 ml) reduziert hatte. Nachdem das Lösungsgemisch auf Raumtemperatur abgekühlt war, wurden 25 ml 0,2 M Natrium-Phosphat-Puffer, pH 6,1 (Natriumdihydrogenphosphat NaH₂PO₄ • H₂O und di-Natriumhydrogenphosphat Na₂HPO₄ • 2H₂O, Merck, Darmstadt) unter starkem Rühren hinzugegeben.

Die Ermittlung der minimalen Kaninchen-Serumalbuminkonzentration, die notwendig ist, um die gesamten Goldpartikel zu binden, wurde mit Hilfe einer Verdünnungsreihe durchgeführt. Hierzu wurde 5% RSA-Lösung aus RSA (Sigma, Deisenhofen) und 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer hergestellt. Zur Verdünnung wurde ebenfalls 10 mM Natrium-Phosphat-Puffer verwendet. Es wurden Verdünnungen von 1:2 bis 1:2¹⁵ von je 50 µl gebildet. Anschließend wurden jeder Verdünnungsstufe 500 µl Goldlösung und 700 µl physiologische Kochsalzlösung zugefügt. Die Stufe, in der gerade noch kein Farbumschlag von rot nach bläulich-farblos zu erkennen war, wurde als optimale RSA-Konzentration für die folgende Komplexierung eingesetzt. Die benötigte Menge RSA-Lösung für 525 ml Goldlösung konnte anhand dieses Ergebnisses berechnet werden. Es ergab sich eine Menge von etwa 700 µl.

Die stabile und gleichmäßige Bindung der Goldpartikel an das RSA wurde durch die rasche Zugabe von 525 ml Goldlösung zu den 700 µl RSA-Lösung in einem 1 l Becherglas unter vorsichtigem Rühren erreicht. Die erfolgreiche Komplexbildung wurde jeweils kontrolliert. Dies erfolgte durch Zugabe von einigen Tropfen physiologischer Kochsalzlösung zu 0,2 ml der Au-RSA-Lösung. Blieb die Probe rot, so war dies der Nachweis für die vollständige Bindung des Goldes an das Albumin.

Um die gewonnene Au-RSA-Lösung zu konzentrieren, wurde sie zunächst für 100 min bei 18 000 RpM und einer Temperatur von 4℃ zen trifugiert (RC5C Sorvall Instruments, DuPont, Rotor: LA-1500). Anschließend wurden die Überstände abgesaugt und eine erneute Zentrifugation der Niederschläge für 150 min bei 17 000 RpM durchgeführt. Nach Absaugen des Überstands wurde die hochkonzentrierte Au-RSA-Lösung in einen Dialyseschlauch (MWCO 12-14 000, Spectra/Por, Faust) eingebracht, der mit Klemmen verschlossen wurde.

Um Dialyseschläuche vorzubereiten, mussten zuvor zwei Lösungen angesetzt werden:

- Lösung 1: 1 mM EDTA in 2% Natriumhydrogencarbonat:
 - 0,74 g Triplex III (EDTA Na₂-Salz 2H₂O, Merck, Darmstadt)
 - 40,0 g Natriumhydrogencarbonat
 (NaHCO₃, Merck, Darmstadt)
 - 2000 ml H₂O dest.

- Lösung 2: 1 mM EDTA:
 - 0,37 g Triplex III
 - 1000 ml H₂O dest.

Beide Lösungen hatten einen pH-Wert von 8. Die zu etwa 15 cm langen Stücken geschnittenen Dialyseschläuche wurden für etwa zehn Minuten in Lösung 1 gekocht. Nach Spülung mit destilliertem Wasser wurden sie für weitere 10 Minuten in Lösung 2 gekocht. Die Schläuche wurden in der Lösung belassen und abgekühlt. Vor der Füllung der Schläuche mit Au-RSA-Lösung wurden diese gründlich mit destilliertem Wasser gespült.

Die in den Dialyseschlauch überführte Au-RSA-Lösung wurde nun für 48 Stunden bei 4℃ gegen Ringer-Lösung (pH 7,4) dialysiert. Die Ringer-Lösung wurde hergestellt aus: - 48,0 g Natriumchlorid (NaCl, Merck, Darmstadt)

- 1,59 g Calciumchlorid
 (CaCl₂ 2H₂O, Merck, Darmstadt)
- 1,2 g Kaliumchlorid (KCl, Merck, Darmstadt)
- 6,0 g Natriumhydrogencarbonat
 (NaHCO₃, Merck, Darmstadt
- 6000 ml H₂O dest.

Im Anschluss an die Dialyse konnte das fertige Au-RSA-Konzentrat tropfenweise in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei −80℃ gela gert werden.

3.7.2 Absorptionsmaximum und Standardkurve der Absorption

Anhand der fertigen Lösungen bekannter Gold- und Albuminkonzentration wurde eine Absorptionskurve erstellt, um die Wellenlänge mit maximaler Absorption der Lösung zu ermitteln. Hierzu wurden n=30 Lösungen der Konzentration 100 μM Au³⁺ im Wellenlängenbereich 460-600 nm in Schritten von 5 nm photometrisch gemessen und die zugehörigen Absorptionen gemessen (Photometer: Genesys 6, Firma Thermo). Es ergab sich ein Absorptionsmaximum von 525 nm (siehe Abbildung 3).

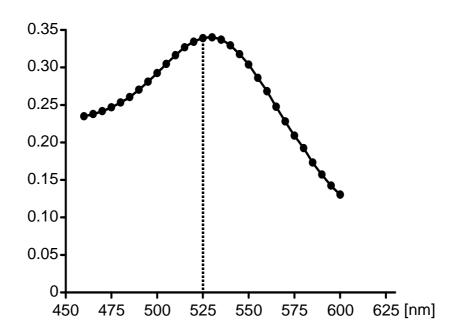


Abbildung 3: Absorptionskurve einer 100 µmol Goldlösung. Absorptionsmaximum bei 525 nm.

Zusätzlich wurde aus je n=15 Lösungen der Konzentration 560 μ M, 280 μ M, 140 μ M, 70 μ M, 35 μ M und 17,5 μ M eine Standardkurve erstellt, die es ermöglichte, die Goldkonzentrationen der Lösungen unmittelbar vor Applikation, sowie die Goldkonzentration im Plasma zu quantifizieren. Die ermittelte Standardkurve zeigt Abbildung 4.

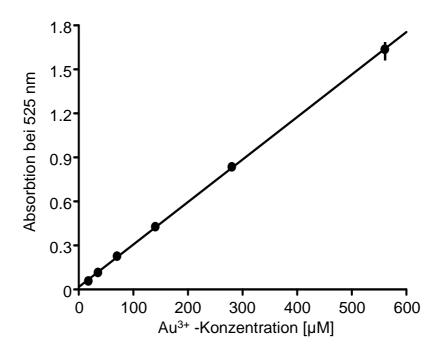


Abbildung 4: Standardkurve der Absorption von Au₃⁺

3.7.3 Applikation und Bestimmung der *Plasma Disappearance Rate* (PDR)

Vor der Applikation wurde die Goldkonzentration jeder Lösungsportion anhand der ermittelten Standardkurve bestimmt. Den Tieren wurden 4-5 ml der angewärmten Au-RSA-Lösung durch einen 0,2 µm Sterilfilter (Minisort 0,2 µm, Sartorius AG, Göttingen) langsam so injiziert, dass jedes Tier eine definierte Goldmenge von 500 µmol/kg KG erhielt. Aus Blutproben, die den Kaninchen 2 und 10 Minuten nach Applikation der Goldlösung entnommen wurden, wurde die Goldkonzentration im Plasma ebenfalls photometrisch durch Messung der Absorption bei einer Wellenlänge von 525 nm (OD₅₂₅) (Photometer: Genesys 6, Fa. Thermo) anhand der Standardkurve bestimmt. Für den Zeitpunkt 2 min wird eine homogene Vermischung des Indikators mit dem Plasma angenommen. Als *blank* diente eine vor der Goldapplikation entnommene Blutprobe. Ziel dieser Messung war die Bestimmung der *Plasma Disappearance Rate* (PDR), die angibt, wie viel Prozent der applizierten Goldpartikel pro Minute den Intravasalraum verlassen. WAYPA et al. [120] zeigte für die der PDR entsprechenden *Albumin Clearance*, dass diese eine Funktion erhöhter Filtration und gesteigerter Permeabilität darstellt.

3.8 Elektronenmikroskopie

Der endotoxininduzierte Lungenschaden wurde anhand der Extravasation von goldmarkiertem Albumin, sowie der Veränderung der Gasaustauschstrecke insbesondere bezüglich Alterationen der endothelialen Zelldicke und Vesikelmorphologie elektronenmikroskopisch untersucht. Die Aufbereitung des Gewebes sowie die Durchführung der Elektronenmikroskopie erfolgte durch Frau Elke Schäfer aus dem Institut für Anatomie des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf.

3.8.1 Gewinnung von Gewebeproben und Fixierung

Nach Beendigung der Versuche wurden den Tieren die Lungen entnommen. In den Alveolarraum wurde mit einem Druck von 25 cmH₂O über den Tubus 1% Glutaradehydlösung (Glutaraldehyd, Sigma, Deisenhofen) in 0,1 M Natrium-Kakodylat-Puffer (Na-Kakodylate, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) mit einem pH-Wert von 7,4 zur Vorfixierung eingebracht. Aus jeder Lunge wurden von beliebig ausgewählten Stellen sowohl parapleurale als auch zentrale Gewebestücke mit einem Durchmesser von ungefähr 2-4 mm gewonnen. Diese wurden anschließend in die Fixierlösung gegeben. Durch die geringe Größe der Gewebepartikel wurde eine vollständige Durchtränkung mit den Lösungen gewährleistet.

Die Nachfixierung des Gewebes erfolgte mit 1% Osmiumtetroxidlösung (Osmium tetroxide OsO₄, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) in 0,1 M Natriumphosphat-Puffer mit Saccharose (Natriumdihydrogenphosphat Monohydrat, di-Natriumhydrogenphosphat Heptahydrat, Saccharose, Merck, Darmstadt) für zwei Stunden.

3.8.2 Einbettung und Kontrastierung

Die Einbettung des Gewebes für die Elektronenmikroskopie erfolgte in Kunstharz, da dieses Material im Vakuum des Elektronenmikroskops nicht flüchtig ist. Es wurde eine Glycidether-Mischung verwendet, die sich aus verschiedenen Bestandteilen zusammensetzt: Glycidether (Serva, Heidelberg), DDSA (Dodecanylsuccinic acid anhydride, Serva, Heidelberg), MNA (Methylnadicanhydrid, Serva, Heidelberg) und 2% Accelerator (2,4,6-Tris(dimethylaminomethyl)phenol, Merck, Darmstadt), der die Polymerisation des Kunstharzes beschleunigt. Kunstharz ist nicht mit Wasser mischbar. Zellen bestehen jedoch zu einem großen Anteil aus Wasser, weshalb sie

zu Beginn der Einbettung entwässert werden müssen. Der zelluläre Wasseranteil wird hierbei durch ein organisches Lösungsmittel ersetzt.

Die Gewebestücke wurden in einer stufenweise konzentrierter werdenden Alkoholreihe entwässert, in jeder Konzentration verblieben sie für jeweils 15 Minuten: 35% Ethanol, 50% Ethanol, 70% Ethanol, 96% Ethanol, 100% Ethanol (Ethanol 96%, Ethanol absolut, Merck, Darmstadt). Anschließend wurde das Gewebe für 2 x 15 Minuten in Propylenoxid (Propylene oxide, Serva, Heidelberg) gebracht, das als Zwischenmedium dient. Die Kunstharzinfiltration erfolgte in mehreren Schritten: Zunächst wurden die Proben für 60 Minuten in eine 1:1 Lösung, anschließend für 10 Stunden in eine 1:3 Lösung aus Propylenoxid und Glycidether-Mischung übertragen. Zuletzt wurden sie in kleine Gießformen mit reiner Glycidether-Mischung gegeben. In diesen Formen erfolgte für 24 Stunden bei 60°C im Wärmeschrank die Aushärtung.

Um die ausgehärteten Blöcke ultradünnschneiden zu können, mussten sie zuvor getrimmt, das heißt zu einer Block-Pyramide mit trapezförmiger Oberfläche zurechtgeschnitten werden. Von den getrimmten Blöcken wurden Ultradünnschnitte mit einer durchschnittlichen Dicke von 70 nm am Ultramikrotom (Sorvall MT2-B Ultra Microtome) angefertigt. Diese wurden auf Kupfer-Grids (Gilder 200 mesh Cu, parallele Stege, 3,05 mm, Plano GmbH, Wetzlar) aufgeschwemmt, die als Objektträger dienten.

Durch Bindung von Schwermetallionen an die Schnitte wurde die Elektronenbeugung und damit der Kontrast verstärkt.

Zur Kontrastierung der Schnitte wurde zunächst auf jedes Grid ein Tropfen Uranylacetat (Uranylacetat-Dihydrat, Merck, Darmstadt) aufgetragen. Nach 30 Minuten wurde mit Aqua dest. gespült. Das Auftragen eines Tropfens Bleicitrat für 5 Minuten und anschließendes Spülen schlossen die Kontrastierung ab. Das Bleicitrat wurde zuvor aus Blei(II)-nitrat (Merck, Darmstadt), tri-Natriumcitrat-Dihydrat (Merck, Darmstadt) und Natronlauge (Merck, Darmstadt) hergestellt.

Die elektronenmikroskopische Untersuchung der Präparate (Philips CM 100 transmission electrone microscope) sowie die Auswahl der Aufnahmen für die Abzüge auf Fotopapier erfolgte verblindet durch Frau Elke Schäfer aus dem Anatomischen Institut.

3.8.3 Gemessene und berechnete Parameter

Abbildung 5 zeigt eine exemplarische elektronenmikroskopische Aufnahme des alveolokapillären Septums. Es setzt sich aus Alveolarepithelzelle, gemeinsamer Basalmembran und Kapillarendothelzelle zusammen und bildet die Barriere zwischen der Atemluft in der Alveole und dem Blutplasma, über die der Gasaustausch stattfindet.

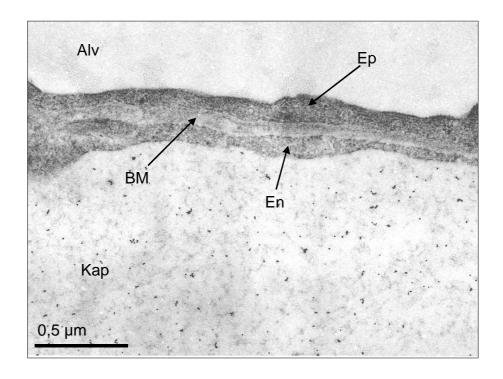


Abbildung 5: Elektronenmikroskopische Aufnahme des alveolokapillären Septums. Alv: Alveole, BM: Basalmembran, Ep: Alveolarepithel, En: Kapillarendothel, Kap: Kapillare.

Zur Bestimmung der im Folgenden dargestellten Parameter wurde den Versuchstieren wie beschrieben jeweils 500 µmol/kg KG der hergestellten Goldlösung appliziert und die Plasmakonzentration nach der von König et al. [52] etablierten Methode photometrisch bestimmt. Die Auswertung der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte anhand des auf den Abzügen in µm angegebenen Maßstabs.

 Alveolokapilläre Septendicke (Ds): Als Indikator eines beginnenden Lungenödems wurde die alveolokapilläre Septendicke gemessen. Es wurde sowohl die Länge (L) als auch die Fläche (A) des jeweiligen Abschnitts in Pixel ausgemessen. Die Umrechnung in nm erfolgte mittels Division durch den vorher bemessenen Maßstab. Die Berechnung der durchschnittlichen Dicke (D) erfolgte mit Hilfe der folgenden Formel:

$$D = \frac{A}{L}$$

Formel 4: Berechnung der durchschnittlichen Dicke

D: Dicke
A: Fläche
L: Länge
Einheit: µm

- Endothelzelldicke (D_{En}) und Epithelzelldicke (D_{Ep}): Um die Genese der pulmonalen Ödembildung während des frühen akuten Lungenschadens genauer untersuchen zu können, wurde zusätzlich zur Messung der Dicke des gesamten Septums jeweils einzeln die durchschnittliche Endothel- und Epithelzelldicke berechnet. Die Bestimmung dieser Parameter ermöglicht eine genaue Lokalisation der initialen Ödembildung. Die Berechnung erfolgte analog zur Messung der Septendicke. Es wurde jeweils derselbe Abschnitt wie für die Septendicke ausgewertet.
- Goldpartikelkonzentration im Plasma (C_P): Als Bezugsgröße für die elektronenmikroskopische Permeabilitätsanalyse wurde die Konzentration des goldmarkierten Albumins im Plasma bestimmt. Für die Berechnung wurden auf jeder Abbildung eine 1 μm² große Fläche aufgesucht und die darin vorhandenen Goldpartikel, die sich als 8 nm große, kreisrunde schwarze Punkte darstellen, gezählt. Die Goldkonzentration ergab sich aus:

$$C = \frac{P}{A}$$

Formel 5: Berechnung der Goldpartikelkonzentration

C: Goldpartikelkonzentration

P: Anzahl der Partikel

A: Fläche Einheit:: 1/µm²

- Goldpartikelkonzentration im Endothel (C_{Au}): Während des Lungenschadens kommt es im Rahmen einer inflammationsbedingt gesteigerten endothelialen Permeabilität zu einer vermehrten Extravasation Makromolekülen. Da im Initialstadium die interendothelialen Verbindungen fest verschlossen sind, ist ein transendothelialer Austritt der Makromoleküle naheliegend. Ein gesteigerter Gehalt an Makromolekülen im Endothel erhöht den intraendothelialen kolloidosmotischen Druck, was zu einem osmotischen Flüssigkeitseinstrom und damit zu einer Zellschwellung führt. Aus diesem Grund stellt die C_{Au} einen geeigneten Surrogatparameter der endothelialen Permeabilität dar, der im Rahmen der vorliegenden Studie eingeführt wird. Es wurden zu diesem Zweck alle auf einem Abzug als Endothelflächen identifizierbare Abschnitte ausgemessen und die darin vorhandenen Goldpartikel, sowohl freie als auch in Vesikeln aufgenommene, gezählt. Die Berechnung der Konzentration erfolgte analog zur Goldpartikelkonzentration im Plasma.
- Konzentration der freien Goldpartikel im Endothel (C_{fAu}) und Anteil der freien Goldpartikel in **Prozent** (%C_{fAu}): Analog zur Bestimmung Goldpartikelkonzentration im Endothel wurde die Konzentration der freien Goldpartikel bestimmt. Hierbei wurden ausschließlich frei im Endothel vorliegende Goldpartikel gezählt, nicht aber in Vesikel aufgenommene Partikel. Zusätzlich wurde der prozentuale Anteil der freien Goldpartikel an den gesamten Goldpartikeln im Endothel berechnet. Ziel der Bestimmung von CfAu und %CfAu war die differenzierte Analyse der Teilaspekte einer endothelialen Permeabilitätszunahme: Der Einstrom von Flüssigkeit aus dem Plasma in die Endothelzelle ist abhängig von der osmotischen Druckdifferenz zwischen Intrazellulär- und Plasmaraum, die durch die semipermeable Zellmembran

voneinander getrennt werden. Die Teilchen, die innerhalb von Vesikeln in der Zelle vorliegen, sind von der Vesikelmembran umschlossen, so dass sich zwischen intravesikulärem und zytoplasmatischem Kompartiment ein eigenes osmotisches Gefälle ergibt. Die von einer Vesikelmembran umschlossenen Makromoleküle können folglich für die osmotische Druckdifferenz über der Zellmembran nur eine untergeordnete Rolle spielen. Der Parameter C_{fAu} ermöglicht so die gesonderte Beurteilung der Bedeutung der freien Partikel für die endotheliale Permeabilität.

- Konzentration der goldtragenden Vesikel (GCV) im Endothel (C_{GCV}): Ziel der Bestimmung von C_{GCV} war es, den Einfluss der Inflammation auf den vesikulären transendothelialen Transport im Sinne einer gesteigerten Aufnahme von Makromolekülen und damit dessen Beteiligung an einer endothelialen Permeabilitätszunahme zu untersuchen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte analog zur Berechnung der Goldpartikelkonzentration. Hierbei wurde die Anzahl der goldtragenden Vesikel durch die Endothelzellfläche geteilt (Einheit: 1/µm²).
- GCV-Durchmesser (D_{GCV}): Die Messung des Vesikeldurchmessers erfolgte um eine Veränderung der Vesikelmorphologie im Rahmen der Inflammation zu untersuchen, da eine qualitative Veränderung der Vesikel im Sinne einer Größenzunahme zur endothelialen Ödembildung beitragen könnte: Die Makromoleküle, die in Vesikeln transportiert werden, liegen stets in einer flüssigen Phase vor, dass heißt je größer das Vesikel (bei gleichbleibender Zahl der Makromoleküle), desto größer die flüssige Phase und damit die in das Endothel aufgenommene Flüssigkeit. Hierbei wurde der Durchmesser aller für die GCV-Konzentration gezählten Vesikel gemessen und der durchschnittliche GCV-Durchmesser durch Berechnung des Mittelwerts bestimmt (Einheit: nm).
- Goldpartikelkonzentration in GCV (C_{Au/GCV}): Die Goldpartikelkonzentration in den goldtragenden Vesikeln wird aus der Anzahl der transportierten Partikel im Verhältnis zur Vesikelgröße berechnet. Bei einer großen flüssigen Phase des Vesikels ist die C_{Au/GCV} also gering, ein kleines konzentriertes Vesikel, das die transportierten Partikel eng umschließt und nur einen geringen Anteil flüssiger Phase besitzt, ist die C_{Au/GCV} dementsprechend hoch. Die C_{Au/GCV} lässt folglich Rückschlüsse auf die Konzentrationsfähigkeit der Endozytosemechanismen und

damit indirekt auf die ins Endothel aufgenommene Flüssigkeit als entscheidender Faktor der endothelialen Ödembildung zu. Um die Goldpartikelkonzentration in GCV zu berechnen, wurde aus dem jeweiligen GCV-Durchmesser (D_{GCV}) gemäß der Formel zur Bestimmung eines Kugelvolumens zunächst das GCV-Volumen (V_{GCV}) berechnet:

$$V_{GCV} = \left(\frac{D_{GCV}}{2}\right)^3 x \frac{4}{3} x \pi$$

Formel 6: Berechnung des GCV-Volumens

V_{GCV}: GCV-Volumen

 D_{GCV} : GCV-Durchmessern

Einheit: µm³

Anschließend wurde die Partikelzahl durch das GCV-Volumen dividiert und so die Konzentration bestimmt (Einheit: 1/µm³).

3.9 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)

Um zu untersuchen, ob Caveolin-1 (Cav-1) und Aquaporin-1 (AQP-1) an der pulmonalen Ödembildung beteiligt sind, wurde ihre Expression mittels rt-PCR bestimmt. Hierfür wurde nach Versuchsende Lungengewebe homogenisiert und daraus die mRNA isoliert. Mittels reverser Transkriptase wurde die mRNA in komplementäre (cDNA) umgeschrieben und anschließend durch PCR-Technik amplifiziert. Hierfür wurden spezifische Oligonukleotid-Primer für Cav-1 und AQP-1 verwendet. Zur Auftrennung und Visualisierung der PCR-Produkte wurde eine Gelelektrophorese auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1% Agarosegel durchgeführt. Als Kontrollgen wurde die GAPDH (Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase) verwendet, die in allen Gruppen gleich exprimiert sein sollte. Die einzelnen Schritte werden im Folgenden ausführlich beschrieben.

3.9.1 Isolierung von mRNA

Die mRNA aus den Lungengewebeproben wurde mittels eines Kits (Rneasy Kit, Quaigen, Hilde) isoliert. Dabei wurde zur Homogenisierung das Rnase-freie Lungengewebe für 20-40 sec in 350 μl eines RLT-Puffers inkubiert, dem zu diesem Zweck 2-Mercaptoethanol (Serva, Heidelberg) in einer Konzentration von 10 Ml/ml zugefügt wurde. Durch eine Zentrifugation (Centrifuge 5415C, Eppendorf-Netheler-Hinz GmbH, Köln) über 3 min bei 10000 U/min wurden Gewebereste aus den Homogenisaten entfernt. Dem mRNA-reichen Überstand wurden 350 μl 70% Ethanol zugegeben und anschließend 700 μl dieser Lösung über eine Membran zentrifugiert (15 sec bei 10000 U/min), an welche die RNA gebunden wurde. Die Membran wurde dreimal durch Zentrifugation (15 sec bei 10000 U/min) gewaschen, davon einmal mit 700 μl eines RW-1-Puffers und zweimal mit je 500 μl eines RPE-Puffers. Durch erneute Zentrifugation (2 min bei 10000 U/min) wurde die Membran getrocknet. Die RNA wurde durch Zentrifugation von 40 μl Rnase-freiem H₂O (1 min bei 10000 U/min) über die Membran von der Membran gelöst.

Die Reinheit der isolierten RNA wurde mittels Gelelektrophorese auf einem mit Ethidiumbromid gefärbten 1% Agarosegel kontrolliert.

3.9.2 Bestimmung der RNA-Konzentration

Damit bei der anschließenden cDNA-Synthese jeder Probe die gleiche Menge RNA zugesetzt werden konnte, war es notwendig, die RNA-Konzentration in der gewonnenen Lösung zu bestimmen. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte photometrisch (Photometer: Genesvs 6. Fa. Thermo) in einer Präzisionsquarzglasküvette (Suprasil, Fa. Hellma), wobei 100 µl Rnase-freies H₂O als Leerwert dienten. 2 µl der jeweiligen Probe wurden mit 98 µl Rnase-freiem H₂O verdünnt. Die Absorption wurde bei 260 nm und 280 nm gemessen und daraus die RNA-Konzentration berechnet. Hierbei entspricht eine Absorption von 1,0 bei 260 nm einer RNA-Konzentration von 50 µg/ml. Die RNA-Menge [µl] wurde durch Division von 2 µg totaler RNA durch die RNA-Konzentration der Lösung [µg/µl] berechnet. Aus dem Quotienten der Absorption bei 260 nm und 280 nm (A₂₆₀/A₂₈₀) konnte auch ein Hinweis für die Reinheit der RNA-Lösung gewonnen werden: Ein Quotient zwischen 1,85-2,1 zeigt eine reine RNA-Lösung an, ein Quotient von 1,8-1,85 ist typisch für DNA, ein Quotient <1,8 ist ein Indiz für eine Verunreinigung der Probe mit Protein.

3.9.3 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Zur Synthese komplementärer DNA (cDNA) wurden in Rnase-freien 0,5 ml PCR-Reaktionsgefäßen (BiozymDiagnostik, Hess, Oldendorf) je 15, 7 μl der verdünnten RNA-Lösungen (entsprechend 2 μg RNA) in einem Thermocycler (Px2 Thermal Cycler, Fa. Thermo) für 3 min bei 75℃ inkubiert und auf Eis gekühlt. Jede RNA-Probe wurde mit 14,3 μl cDNA-Synthese-Mix: 1 μl 45 μM Oligo p(dT)₁₅-Primer (Fa. Roche Applied Science); 6 μl 5x First-Strand-Buffer (GibcoBRL, Eggenstein); 3 μl 0,1 M Dithiothreitol (DTT, Fa. Roche Applied Science); 1,5 μl 0,5 mM dNTP-Mix (Boehringer, Mannheim) und 2,0 μl 400 U Omniskript RT reverse transcriptase (Fa. Quiagen) versetzt, für 60 min bei 37℃ im Thermocycler inkubiert, anschließend zur Inaktivierung des Synthesemixes für 10 min auf 95℃ erhitzt und bei –80℃ eingefroren.

3.9.4 Amplifizierung der cDNA: PCR

Aus der synthetisierten cDNA wurde nun mittels PCR die Cav-1, AQP-1 und GAPDH spezifische cDNA amplifiziert. Für jeden PCR-Ansatz wurden je 3 μl der cDNA-Proben mit 47 μl eines PCR-Synthese-Reagenz vermischt. Das PCR-Reagenz setzt sich aus 1 μl 0,5 mM dNTP-Mix (Boehringer, Mannheim), 0,2 μl 1 U Taq DNA Polymerase (HotStarTaq DNA Polymerase, Fa. Quiagen), je 5 μl eines für Cav-1, AQP-1 oder GAPDH spezifischen sense und antisense Oligonukleotid-Primers, sowie 5 μl 10x-Puffer (Boehringer, Mannheim) und 30,8 μl H₂O zusammen.

Primer-Sequenzen:

Cav-1 [55]: 5´ACG AGG TGA ACG AGA AGC (sense)

5'ATG CAA AAG ATG GTA GAC AG (antisense)

AQP-1 [11]: 5'CCA TGA CCC TCT TCG TCT TC (sense)

5 TGG GCG ATG ATG TAC AGG AC (antisense)

GAPDH [79]: 5 TCA CCA TCT TCC AGG AGC GA (sense)

5 TCC AGG AGG ACA TGC AGC AC (antisense)

In einem PCR-Cycler (Px2 Thermal Cycler, Fa. Thermo) wurden die cDNA-Proben zunächst bei 94℃ für 60 min denaturiert. Die spezi fischen Sequenzen wurden mit 33 (Cav-1), 32 (AQP-1) oder 28 (GAPDH) der folgenden Zyklen amplifiziert: 45 sec Denaturierung bei 94℃, 30 sec Primeranlagerung bei 55℃ und 35 sec Kettenverlängerung bei 72℃. Abschließend werden die PCR-Produkte bei 4℃ gelagert.

3.9.5 Identifizierung der PCR-Produkte: Gelelektrophorese

Zur Herstellung des für die Gelelektrophorese benötigten 1% Agarosegels wurden 83 μl einer Tris-Acetat-EDTA-Lösung (TAE-Lösung), 333 mg Agarose (Promega, Madison, WI, USA), 1,66 μl Ethidiumbromid (Promega, Madison, WI, USA) und 33 ml des PCR-Laufpuffers (10 mM Tris; 0,35% Eisessig; 1 mM EDTA) unter Rühren zu einem klaren Gel gekocht. Nach Abkühlen auf 60°C wurde es in eine Elektrophoresekammer (Blue Marine 200, Serva, Heidelberg) und kühlte bis zur vollständigen Polymerisation ab.

In die zuvor angelegten Taschen des Gels wurde je 2 μ l Loading-Puffer (6x Loading Dye, MBI Fermentas) und 4 μ l der jeweiligen PCR-Produkte pipettiert. Zur Identifizierung der Produkte wurde in den beiden äußersten Taschen je 1 μ l eines Molekulargewichtsmarkers (100 bp DNA Ladder, MBI Fermentas) mit 1 μ l Loading-Puffer und mit 4 μ l H₂O verdünnt aufgetragen. Das Gel wurde mit PCR-Laufpuffer überschichtet und die Elektrophorese mit 120 V, 70 mA und einer Laufzeit von 25-30 min gestartet. Die Identifizierung der spezifischen Banden von Cav-1 (226 bp), AQP-1 (244 bp) und GAPDH (290 bp) erfolgte mittels UV-Licht Visualisierung (Gene Genius Bio Imaging System, Syngene, Cambridge, UK). Dabei können PCR-Produkte als Banden mittels eines Molekulargewichtsstandards (PCR Marker 50-2000 bp, Novagen, Madison, WI, USA) identifiziert werden. Die Gele wurden digital dokumentiert.

3.9.6 Quantifizierung der Gelelektrophoresebanden

Mittels Densitometrie wurden die Konzentrationsunterschiede der Banden auf den Elektrophoresegelen quantifiziert. Die densitometrische Auswertung der digitalisierten Gele wird mittels eines Konzentrationsstandards (500 bp DNA Quantitation Standard, ABgene, Epsom, UK) und einer speziellen Software (Genesnap / Genetools, Syngene, Cambridge, UK) durchgeführt. Anhand der quantitativen Messung der Farbdichte konnte auf diese Weise ein Rückschluss auf die Konzentration in den untersuchten Banden gezogen werden.

3.10 Applizierte Substanzen

3.10.1 Endotoxin

Die Infusion von Endotoxin ist eine etablierte Methode, um eine sytemische Entzündungsreaktion und damit einen akuten Lungenschaden hervorzurufen [33]. Hierbei wurde hochgereinigtes Endotoxin von Escherichia coli Serotyp 0111:B4 (Lipopolysaccharide from Escherichia coli Serotype 0111:B4, Sigma Chemical, St. Louis, USA) verwendet. Das Endotoxin wurde in 10 ml physiologischer Kochsalzlösung gelöst und den Kaninchen intravenös über die Ohrvene verabreicht. Es wurde zunächst ein Bolus von 25 μg/kg KG injiziert, für restliche Dauer des Versuchs wurden kontinuierlich 25 μg/kg/h verabreicht. Die Dosisfindung erfolgte anhand der vorangegangenen Studien der Arbeitsgruppe [39, 50].

3.10.2 Physiologische Kochsalzlösung

Bei der physiologische Kochsalzlösung (NaCl 0,9%, B.Braun, Melsungen) handelt es sich um eine Elektrolytlösung, deren Osmolarität mit 308 mosmol/l annähernd der des Plasmas entspricht. Sie stellt eine Standardsubstanz der klinischen Flüssigkeitsersatztherapie dar. Die Basisflüssigkeitstherapie betrug bei allen Tieren unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit 5 ml/kg/h zum Ausgleich von nicht messbaren Flüssigkeitsverlusten zum Beispiel durch Beatmung oder Urinausscheidung. Die Flüssigkeits- und Volumentherapie in der Kontroll- und NaCl-Gruppe wurde ausschließlich mit NaCl-Lösung durchgeführt.

3.10.3 Hydroxyethylstärke

Zur Untersuchung des Einflusses von Hydroxyethylstärke (HES) auf die Permeabilität mikrovaskuläre des pulmonalen Endothels während des endotoxininduzierten akuten Lungenschadens, wurde einem Teil der Tiere die kolloidale Lösung verabreicht. Hierbei wurde in einer Gruppe 6% HES 130/0,4 (Voluven, Fresenius Kabi, Bad Homburg) eingesetzt, das kontinuierlich in einer Dosierung von 7,5 ml/kg/h infundiert wurde. In einer zweiten Gruppe wurde 10% HES 200/0,5 (HAES steril 10%, Fresenius Kabi, Bad Homburg) mit 5 ml/kg/h appliziert. Die applizierten Mengen beider HES-Spezies entsprechen einer Dosierung von 500 mg/kg/h.

3.11 Zielparameter der Volumentherapie

Die Zielparameter der Volumentherapie waren ein arterieller Mitteldruck von über 70 mmHg, ein Herzzeitvolumen-Index von über 100 ml/kg/min, sowie eine zentralvenöse Sättigung von mindestens 65%.

3.12 Ausschlusskriterien

Versuchstiere, die nach der chirurgischen Präparation nennenswerte Blutverluste, einen arteriellen Mitteldruck unter 70 mmHg, einen Herzzeitvolumen-Index unter 100 ml/kg/min oder eine zentralvenöse Sättigung von weniger als 65% aufwiesen, wurden aus der Studie ausgeschlossen. Insgesamt konnten 62,5% der Versuchstiere in die Studie aufgenommen werden.

3.13 Studienprotokoll

Im Anschluss an die Präparation der Tiere wurden die Ausgangswerte der makrohämodynamischen Parameter (arterieller und zentralvenöser Druck, Herzfrequenz, Herzzeitvolumen) registriert und Blutproben für die Blutgasanalyse entnommen.

Per Los erfolgte die Zuteilung zu einer der in Tabelle 1 dargestellten vier Gruppen:

Gruppe	Applizierte Substanzen	Dosierung	Versuchstiere
Kontrolle	NaCl 0,9%	10 ml/kg/h	7
NaCl	Endotoxin NaCl 0,9%	25μg/kg + 25 μg/kg/h 10 ml/kg/h	7
HES 130	Endotoxin 6% HES 130/0,4	25μg/kg + 25 μg/kg/h 500 mg/kg/h	5
HES 200	Endotoxin 10% HES 200/0,5	25μg/kg + 25 μg/kg/h 500 mg/kg/h	5

Tabelle 1: Einteilung der Versuchsgruppen

Mit Ausnahme der Kontrolltiere erhielten alle Kaninchen Endotoxin. Bei Bedarf wurde unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit physiologische Kochsalzlösung zur hämodynamischen Stabilisierung infundiert.

Wie in Abbildung 6 dagestellt, wurden in Abständen von 30 Minuten die Messungen der makrohämodynamischen Parameter wiederholt und Blutgasanalysen durchgeführt.

Das für die elektronenmikroskopische Auswertung benötigte goldmarkierte Kaninchen-Serumalbumin (Au-RSA) wurde zehn Minuten vor Versuchsende appliziert. Die Gesamtversuchsdauer betrug zwei Stunden. Nach Durchführung der letzten Untersuchungsreihe wurden die Tiere durch Injektion gesättigter Kaliumchlorid-Lösung (KCI, Merck, Darmstadt) getötet und die Lungen für die elektronenmikroskopische Gewebeaufbereitung entnommen.

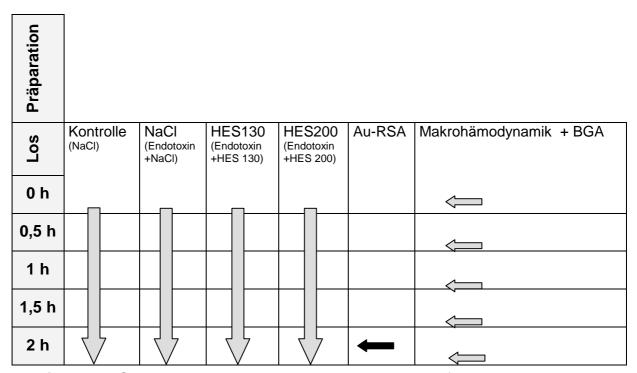


Abbildung 6: Schematische Darstellung des Versuchsablaufs

3.14 Datenverarbeitung und Statistik

Zur Auswertung wurden die elektronenmikroskopischen Bilder digitalisiert und mit Bildverarbeitungsprogramm (MetaMorph Imaging Software, einem Devices Corporation, Downingtown, PA, USA) verarbeitet, auf DVD archiviert und quantifiziert. Es wurden je zehn Bilder pro Versuchstier analysiert. Zu Beginn jeder Auswertung wurde zunächst der auf allen Abzügen in um abgebildete Maßstab vermessen. Die so erhaltene Pixelangabe diente als Grundlage für alle nachfolgend in Pixel gemessenen Größen, da sie auf diese Weise in µm umgerechnet werden konnten. Die gemessenen Werte, sowie die Daten von Makrohämodynamik, Blutgasanalyse und wet/dry weight ratio wurden das Tabellenkalkulationsprogramm MS Excel (Microsoft GmbH, München) eingegeben, mit welchem auch die berechneten Werte erstellt und zusammen mit den entsprechenden Stammdaten wie Versuchsnummer, Gruppenzuordnung und Bildnummer abgespeichert wurden.

Die statistische Auswertung erfolgte computergestützt mittels des Statistikprogramms SigmaStat (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA). Für die Untersuchung von Gruppenunterschieden wurde eine *Kruskal-Wallis* Varianzanalyse durchgeführt. Der Vergleich von Daten zweier Zeitpunkte innerhalb einer Versuchsgruppe erfolgte mit Hilfe des *Wilcoxon Signed Rank Test*. Für den Vergleich von Daten mit drei oder mehr Zeitpunkten innerhalb einer Gruppe wurde die *Friedman Repeated Measures* Varianzanalyse verwendet. Das Signifikanzniveau wurde auf p < 0,05 festgesetzt. Die Daten wurden als Median und Quartilsabstand $(Q_{25} - Q_{75})$ angegeben.

4 Ergebnisse

4.1 Makrohämodynamik

Über die gesamte Versuchsdauer von zwei Stunden wurden kontinuierlich Messungen der makrohämodynamischen Parameter durchgeführt. Unter Ausgangsbedingungen gab es hinsichtlich des mittleren arteriellen Drucks (MAD), des zentralvenösen Drucks (CVP), der Herzfrequenz (HR) und des Herzzeitvolumen-Index (CI) keine Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Alle gemessenen Parameter lagen im physiologischen Bereich. Im Sinne der Einschlusskriterien blieben die Versuchstiere über den gesamten Versuchszeitraum von zwei Stunden makrohämodynamisch stabil. Die im Rahmen des makrohämodynamischen Monitorings erhobenen Parameter werden in Tabelle 2 zusammengefasst dargestellt:

MAP [mmHg]					
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200	
0 h	88 (83-99)	96 (83-100)	84 (75-97)	94 (90-98)	
1 h	84 (77-91)	83 (74-89) ^x	79 (77-88)	89 (84-103)	
2 h	89 (79-97)	81 (77-86) ^x	84 (79-88)	89 (69-94)	
CVP [mmHg]					
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200	
0 h	3 (2-5)	3 (2-4)	3 (1-4)	3 (1-4)	
1 h	2 (1-5)	3 (3-5)	2 (1-2)	4 (4-5)	
2 h	2 (1-4)	3 (2-3)	2 (1-3)	4 (2-5)	
HF [1/min]					
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200	
0 h	242 (224-245)	236 (208-252)	241 (220-261)	219 (210-233)	
1 h	204 (196-235)	196 (190-235)	207 (188-220)	217 (192-240)	
2 h	213 (194-230)	205 (189-231) ^x	211 (202-236)	215 (190-228)	
CI [ml/kg/min]					
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200	
0 h	180 (143-188)	145 (123-177)	145 (138-179)	151 (131-159)	
1 h	165 (119-183)	119 (111-148)	150 (133-182)	193 (166-213) ^x	
2 h	170 (133-173)	130 (118-153)	125 (119-176)	192 (174-195) ^x	

Tabelle 2: Makrohämodynamische Parameter

Median und Quartilsabstand (Q₂₅ – Q₇₅)

MAP: mittlerer arterieller Druck [mmHg] x: p<0,05 vs. 0h

CVP: zentralvenöser Druck [mmHg]

HF: Herzfrequenz [1/min]

CI: Herzzeitvolumen-Index [ml/kg/min]

4.2 Blutgasanalyse

Die Ergebnisse der Parameter des Säure-Basen-Haushalts aus der Blutgasanalyse sind in Tabelle 3 zusammengefasst. In der Kontrollgruppe blieben die gemessenen Parameter des Säure-Basen-Haushalts über den gesamten Versuchszeitraum von zwei Stunden stabil. Alle Werte lagen sowohl unter Ausgangsbedingungen, als auch während der Dauer des Versuchs im physiologischen Bereich. In der NaCl- und HES 200-Gruppe kam es schon nach 1h zur Ausbildung einer Azidose, die bis zum Versuchszeitpunkt 2h weiter zunahm und sich als kombinierte respiratorische und metabolische Störung des Säure-Basen-Haushalts mit pH-Abfall, CO₂-Retention, Abnahme der Bicarbonatkonzentration und des Basenüberschusses manifestierte. Auch in der HES 130-Gruppe wurde eine kombinierte respiratorische und metabolische Azidose beobachtet, die jedoch erst zum Versuchszeitpunkt 2h auftrat. Der Basenüberschuss war nach 2h in allen Gruppen signifikant gegenüber 0h erniedrigt, in der Kontrollgruppe war die Abnahme jedoch weniger stark ausgeprägt als in den übrigen Gruppen. In der NaCl-Gruppe war der Basenüberschuss zum Zeitpunkt 2h im Vergleich zur Kontrollgruppe signifikant niedriger.

Eine Zusammenfassung der Werte der pulmonalen Gasaustauschfunktion zeigt Tabelle 4: Arterieller Sauerstoffpartialdruck und arterielle Sauerstoffsättigung blieben in der Kontrollgruppe über den gesamten Versuchszeitraum stabil. Sowohl in der NaCl-, als auch in der HES 200-Gruppe kam es zu einem signifikanten Abfall des Sauerstoffpartialdrucks und der arteriellen Sauerstoffsättigung zum Versuchszeitpunkt 2h. In der HES 130-Gruppe zeigten paO₂ und SaO2 während des Versuchs keine Abnahme, zum Zeitpunkt 2h waren beide Parameter signifikant höher als in der NaCl-Gruppe. Die Zentralvenöse Sauerstoffsättigung war in allen Gruppen sowohl unter Ausgangsbedingungen, als auch über den gesamten Versuchszeitraum im physiologischen Bereich.

рН						
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200		
0 h	7,38(7,37-7,41)	7,40(7,37-7,41)	7,41(7,39-7,44)	7,40(7,35-7,43)		
1 h	7,34(7,32-7,39)	7,25(7,23-7,28) ^x	7,37(7,32-7,40)	7,29(7,27-7,31) ^x		
2 h	7,36(7,32-7,36)	7,20(7,19-7,22) ^{x†}	7,27(7,21-7,28) ^x	7,21(7,14-7,22) ^{x†}		
pCO₂ [mmHg]						
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200		
0 h	40 (36-42)	36 (33-37)	33 (32-36)	34 (30-36)		
1 h	43 (39-47)	47 (42-54) ^x	37 (43-44)	47 (43-48) ^x		
2 h	42 (41-47)	48 (42-59) ^x	47 (45-55) ^x	55 (49-57) ^x		
	HCO ₃ ⁻ [mmol/l]					
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200		
0 h	23 (22-24)	21 (19-22)	21 (19-21)	19 (18-21)		
1 h	23 (22-24)	21 (19-23)	20 (19-21)	22 (20-23)		
2 h	23 (22-23)	18 (16-22) ^{x†}	18 (17-19) [׆]	20 (16-22)		
BE [mmol/l]						
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200		
0 h	-1,0(-1,40,5)	-3,4(-4,11,9)	-2,3(-4,41,6)	-3,7(-5,91,3)		
1 h	-2,3(-3,11,5)	-6,4(-8,23,6)	-2,9(-6,22,7)	-3,5(-7,63,2)		
2 h	-2,2(-3,91,8) ^x	-9,8(-12,99,4) ^{x†}	-9,7(-10,26,5) ^{x†}	-7,2(-13,16,1) ^{x†}		

Tabelle 3: Blutgasanalyse 1 (Parameter des Säure-Basen-Haushalts)

Median und Quartilsabstand ($Q_{25} - Q_{75}$)

pCO₂: Kohlendioxidpartialdruck x: p<0,05 vs. 0h

pH: pH-Wert †: p<0,05 vs. Kontrolle

HCO₃: Bicarbonatkonzentration

BE: Basenüberschuss

PaO₂ [mmHg]						
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200		
0 h	166 (147-177)	169 (144-181)	177 (155-183)	189 (176-196)		
1 h	164 (154-188)	118 (103-128)	172 (158-191)	170 (134-176)		
2 h	168 (150-178)	109 (90-129) ^{x†}	149 (136-204) [‡]	130 (115-146) ^x		
SaO ₂ [%]						
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200		
0 h	98 (97-99)	99 (99-98)	99 (98-99)	97 (97-97) +		
1 h	97 (97-98)	96 (95-99)	99 (98-99)	96 (95-97)		
2 h	97 (97-99)	93 (90-94) ^{x†}	98 (98-99) [‡]	95 (94-96) ^x		
	ScvO ₂ [%]					
	Kontrolle	NaCl	HES 130	HES 200		
0 h	77 (75-83)	78 (71-84)	88 (87-89) [†]	82 (81-86)		
1 h	73 (69-76)	69 (57-77)	83 (80-83)	75 (58-81)		
2 h	70 (69-80)	67 (62-75)	77 (72-80) ^x	77 (65-80)		

Tabelle 4: Blutgasanalyse 2 (Parameter des Gasaustauschs)

Median und Quartilsabstand (Q₂₅ – Q₇₅)

pa O_2 : Sauerstoffpartialdruck x: p < 0.05 vs. 0h

SaO₂: arterielle Sauerstoffsättigung \dagger : p < 0.05 vs. Kontrolle

ScvO₂: gemischtvenöse Sauerstoffsättigung ‡:p < 0.05 vs. NaCl

+: p < 0.05 vs. HES 130

Die Ergebnisse der alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz (AaDO₂) zeigt Abbildung 7. Nach zwei Stunden war die AaDO₂ in der NaCl-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. In der HES 130-Gruppe war die AaDO₂ nach zwei Stunden signifikant niedriger als in der NaCl-Gruppe und lag damit im Normbereich. In der HES 200-Gruppe kam es zu keiner signifikanten Veränderung der alveolo-arteriellen Sauerstoffdifferenz.

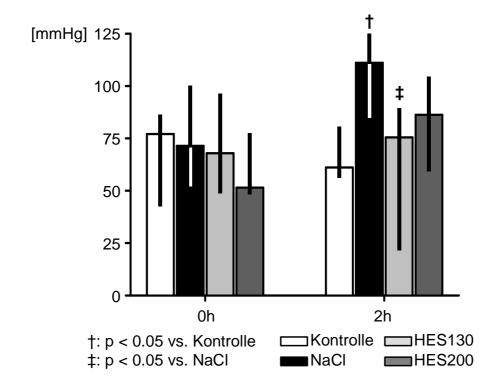


Abbildung 7: Alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz (AaDO₂) [mmHg]. Median und Quartilsabstand ($Q_{25} - Q_{75}$) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe unter Ausgangsbedingungen (0h) und 2h nach Endotoxinapplikation.

4.3 Wet/dry weight ratio

Als Maß der pulmonalen Ödembildung wurde die wet/dry weight ratio (W/D) bestimmt. Abbildung 8 zeigt die Ergebnisse der Untersuchung in graphischer Darstellung. Die Berechnung der wet/dry weight ratio ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

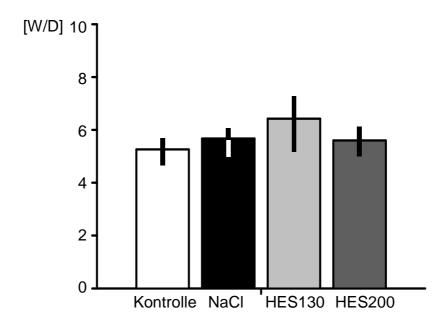


Abbildung 8: Wet/dry weight ratio

4.4 Goldmarkiertes Kaninchen-Serumalbumin (Au-RSA)

4.4.1 Applizierte Goldmenge

Um zu gewährleisten, dass jedes Versuchstier die gleiche Menge des goldmarkierten Albumins erhielt, wurde vor der Applikation die Goldkonzentration jeder Lösungsportion anhand der ermittelten Standardkurve bestimmt und die gewichtsadaptierte Lösungsmenge verabreicht. Jedes Tier erhielt so eine definierte Goldmenge von 500 µmol/kg KG. Abbildung 9 zeigt die applizierte Goldmenge je Gruppe.

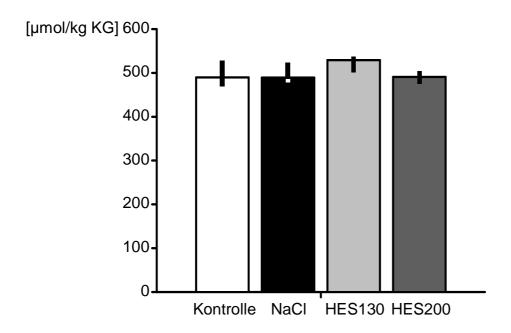


Abbildung 9: Applizierte Goldmenge [μ mol/kg KG] Median und Quartilsabstand ($Q_{25}-Q_{75}$) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe.

4.4.2 Plasma Disappearance Rate (PDR)

Aus Blutproben, die den Versuchstieren 2 und 10 Minuten nach Applikation der Goldlösung entnommen wurden, wurde die Goldkonzentration im Plasma photometrisch anhand der Standardkurve bestimmt. Abbildung 10 zeigt die Ergebnisse dieser Messungen. Sowohl zum Zeitpunkt 2 min, als auch zum Zeitpunkt 10 min war die Goldkonzentration im Plasma in allen Endotoxingruppen (NaCl, HES 130 und HES 200) signifikant geringer als in der Kontrollgruppe. Zum Zeitpunkt 10 min war die Konzentration in der NaCl- und in der HES 200-Gruppe signifikant gegenüber dem Zeitpunkt 2 min verringert. Die Goldkonzentration in der HES 130-Gruppe unterschied sich zum Zeitpunkt 10 min nicht signifikant vom Zeitpunkt 2 min.

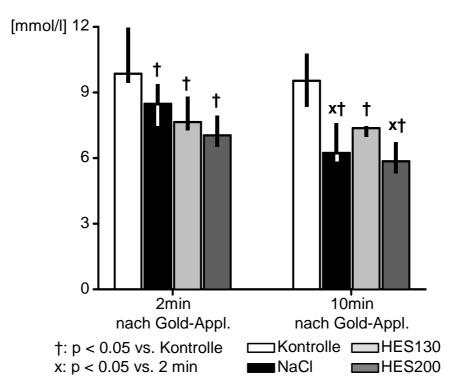


Abbildung 10: Goldkonzentration im Plasma [mmol/l]

Aus den Ergebnissen der Goldkonzentration im Plasma wurde die *Plasma Disappearance Rate* (PDR) bestimmt. Sie gibt an, wie viel Prozent der applizierten Goldpartikel pro Minute den Intravasalraum verlassen. Die PDR ist also ein Maß für die Elimination der Goldpartikel aus dem Plasma und damit der Extravasation des goldmarkierten Albumins. Abbildung 11 zeigt die Ergebnisse der PDR. Die PDR nahm in der NaCl-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe zu, während sich in der HES 130-Gruppe eine signifikant geringere PDR im Vergleich zur NaCl-Gruppe zeigte. Die HES 200-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der Kontroll- oder NaCl-Gruppe.

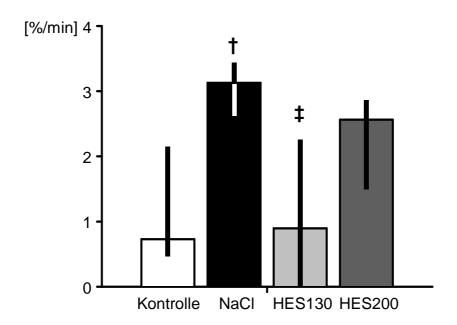


Abbildung 11: Plasma Disappearance Rate [%/min]

4.5 Elektronenmikroskopie

Um den Einfluss von Hydroxyethylstärke auf die pulmonale Ödembildung während der Endotoxinämie zu analysieren, wurde im Rahmen der vorliegenden Studie eine elektronenmikroskopische Untersuchung der alveolokapillären Septen durchgeführt. Abbildung 12 zeigt repräsentative Aufnahmen der Septen aus allen vier Gruppen: Abgebildet ist jeweils oben eine Alveole, nach unten folgen Alveolarepithelzelle, Kapillarendothelzelle und Blutkapillare. Das goldmarkierte Albumin ist in Form von schwarzen runden Strukturen mit einem Durchmesser von 8 nm im Plasma zu sehen. In der Kontrollgruppe zeigt sich eine normale Mikroanatomie mit dünnem Septum, die Struktur ist hier schlank und regelmäßig. In der NaCl-Gruppe ist eine deutliche Zunahme der Septendicke zu sehen, die auf eine Ödembildung hinweist. Insbesondere die Endothelzelle ist reich vakuolisiert, die Zellmembran zeigt unregelmäßige Aufwerfungen. Es sind hier auch Goldpartikel im Endothel zu sehen. Besonders in der HES 130-Gruppe sind diese Veränderungen weniger stark ausgeprägt. Das Septum ist deutlich schmaler, das Endothel hat eine ruhige Binnenstruktur und ist weniger vakuolisiert, die Zellgrenzen sind glatt abgrenzbar.

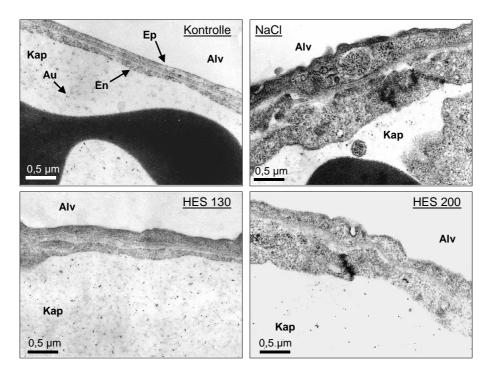
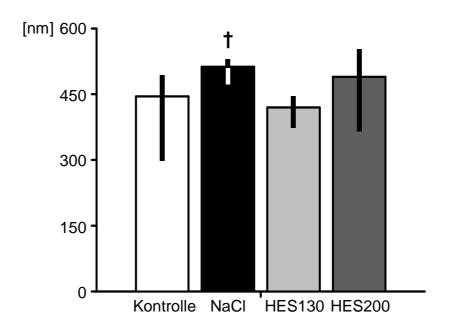


Abbildung 12: Elektronenmikroskopie der Lunge

Exemplarische Aufnahmen der alveolokapillären Septen aus Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe. Alv: Alveole, Ep: Alveolarepithelzelle, En: Kapillarendothelzelle, Kap: Blutkapillare, Au: goldmarkiertes Albumin.

4.5.1 Alveolokapilläre Septendicke

Zur Untersuchung der pulmonalen Ödembildung wurde die alveolokapilläre Septendicke bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 13. Die alveolokapilläre Septendicke nahm in der NaCl-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant zu. Sowohl in der HES 130-Gruppe, als auch in der HES 200-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe.

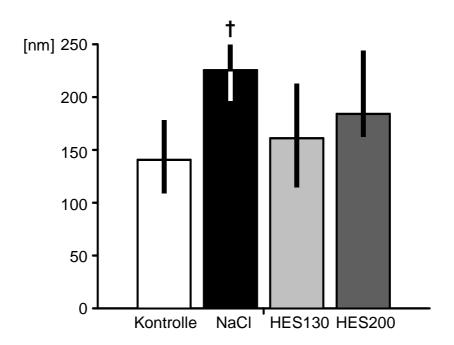


†: p < 0.05 vs. Kontrolle

Abbildung 13: Alveolokapilläre Septendicke [nm]

4.5.2 Endothelzelldicke

Abbildung 14 zeigt die Ergebnisse der Messung der Endothelzelldicke. Die Endothelzelldicke nahm in der NaCl-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant zu. Sowohl in der HES 130-Gruppe, als auch in der HES 200-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe.



†: p < 0.05 vs. Kontrolle

Abbildung 14: Endothelzelldicke [nm]

4.5.3 Epithelzelldicke

Die Ergebnisse der Messung der Epithelzelldicke sind in Abbildung 15 dargestellt. Die Auswertung ergab zwischen den Gruppen keine signifikanten Unterschiede.

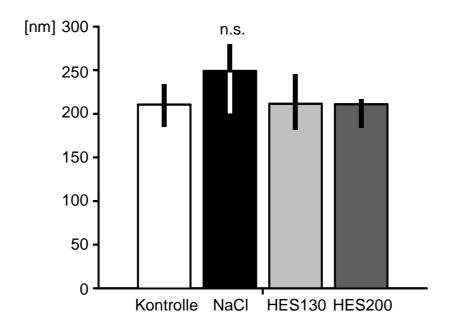


Abbildung 15: Epithelzelldicke [nm]

4.5.4 Goldpartikelkonzentration im Plasma

Als Bezugsgröße für die elektronenmikroskopische Permeabilitätsanalyse wurde die Goldpartikelkonzentration im Plasma bestimmt. Abbildung 16 stellt die Ergebnisse graphisch dar. Die Goldpartikelkonzentration im Plasma zeigte keinen signifikanten Unterschied zwischen den Gruppen.

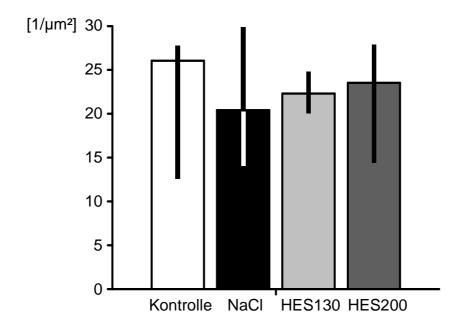


Abbildung 16: Goldpartikelkonzentration im Plasma [$1/\mu m^2$] Median und Quartilsabstand ($Q_{25}-Q_{75}$) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe.

4.5.5 Goldpartikelkonzentration im Endothel

Zur quantitativen Analyse der endothelialen Permeabilität wurde die Goldpartikelkonzentration im Endothel bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 17. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen den Gruppen nicht.

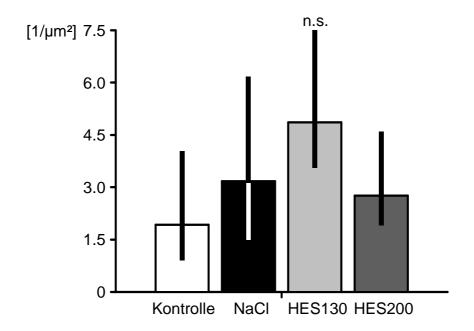
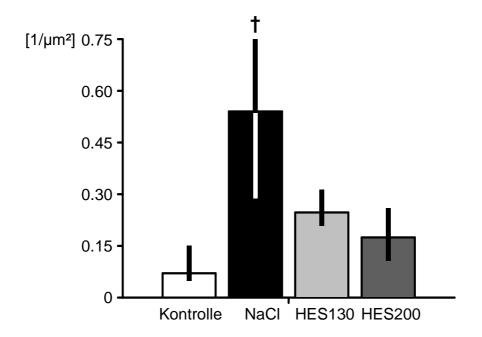


Abbildung 17: Goldpartikelkonzentration im Endothel [$1/\mu m^2$] Median und Quartilsabstand ($Q_{25}-Q_{75}$) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe.

4.5.6 Konzentration und Anteil der freien Goldpartikel

Ausgehend von der Hypothese, dass frei im Endothel vorliegende Makromoleküle sich stärker auf eine endotheliale Ödembildung auswirken, als in Vesikeln vorliegende Partikel, wurde die Konzentration freier Goldpartikel im Endothel bestimmt. Abbildung 18 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse. Die Konzentration der freien Goldpartikel im Endothel nahm in der NaCl-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant zu. Sowohl in der HES 130-Gruppe, als auch in der HES 200-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe.



†: p < 0.05 vs. Kontrolle

Abbildung 18: Konzentration der freien Goldpartikel im Endothel [$1/\mu$ m²] Median und Quartilsabstand ($Q_{25}-Q_{75}$) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe.

Der prozentuale Anteil der freien Goldpartikel an den gesamten Goldpartikeln im Endothel ist in Abbildung 19 dargestellt. In der NaCl-Gruppe nahm der Anteil freier Goldpartikel gegenüber der Kontrollgruppe signifikant zu, während sich in der HES 130-Gruppe ein signifikant niedrigerer Anteil freier Goldpartikel gegenüber der NaCl-Gruppe zeigte. Die HES 200-Gruppe unterschied sich nicht von der Kontroll- oder NaCl-Gruppe.

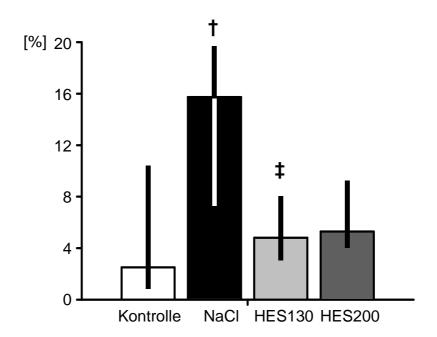


Abbildung 19: Anteil der freien Goldpartikel im Endothel [%] Median und Quartilsabstand ($Q_{25}-Q_{75}$) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe.

4.5.7 Konzentration der goldtragenden Vesikel (GCV)

Zur Untersuchung einer Veränderung des endothelialen vesikulären Transports im Rahmen der Inflammation und unter der Applikation von Hydroxyethylstärke wurde die Konzentration der goldtragenden Vesikel untersucht. Die Ergebnisse der Untersuchung zeigt Abbildung 20. Signifikante Unterschiede ergaben sich zwischen den Gruppen nicht.

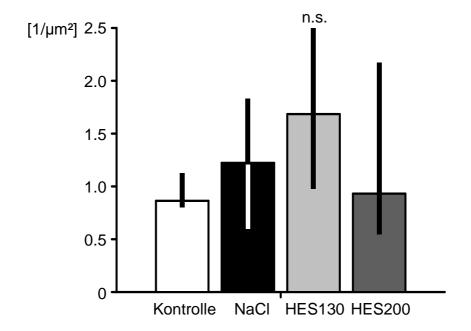
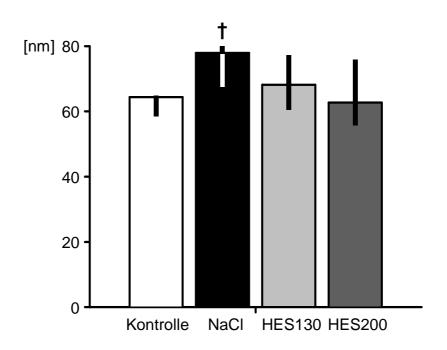


Abbildung 20: Konzentration der goldtragenden Vesikel im Endothel [$1/\mu m^2$] Median und Quartilsabstand ($Q_{25}-Q_{75}$) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe.

4.5.8 GCV-Durchmesser

Um die Vesikelmorphologie zu untersuchen, wurde der mittlere Durchmesser der goldtragenden Vesikel (GCV) im Endothel bestimmt. Abbildung 21 zeigt die graphische Darstellung der Ergebnisse. Der Durchmesser der goldtragenden Vesikel nahm in der NaCl-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe signifikant zu. Sowohl in der HES 130-Gruppe, als auch in der HES 200-Gruppe zeigten sich keine signifikanten Veränderungen gegenüber der Kontrollgruppe.

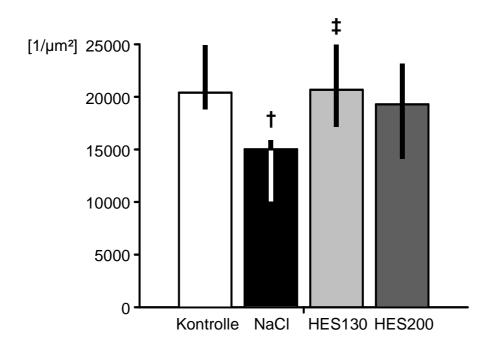


†: p < 0.05 vs. Kontrolle

Abbildung 21: GCV-Durchmesser [nm]

4.5.9 Goldpartikelkonzentration in GCV

Als Parameter zur Beschreibung einer qualitativen Veränderung des vesikulären Transports und der Konzentrationsfähigkeit des Endothels wurde die Goldpartikelkonzentration in den GCV bestimmt. Die Ergebnisse zeigt Abbildung 22. Die Goldpartikelkonzentration in den goldtragenden Vesikel nahm in der NaCl-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe ab, während sich in der HES 130-Gruppe eine signifikant höhere Goldpartikelkonzentration in den GCV gegenüber der NaCl-Gruppe zeigte. Die HES 200-Gruppe unterschied sich nicht signifikant von der Kontroll- oder NaCl-Gruppe.



†: p < 0.05 vs. Kontrolle ‡: p < 0.05 vs. NaCl

Abbildung 22: Goldpartikelkonzentration in GCV [1/μm²]

Abbildung 23 zeigt exemplarisch elektronenmikroskopische Ausschnitte der Endothelzellen aus der Kontroll- und HES130-Gruppe zur Demonstration der unterschiedlichen Qualitäten der goldtragenden Vesikel. Während in der NaCl-Gruppe überwiegend dem in der Abbildung ähnliche große Vesikel mit einer geringen Konzentration von Goldpartikeln zu sehen waren (1), stellten sich die Vesikel insbesondere in der HES130-Gruppe klein und folglich deutlich höher konzentriert dar (3). In der Aufnahme der NaCl-Gruppe sind zusätzlich frei im Endothel vorliegende Goldpartikel zu sehen (2).

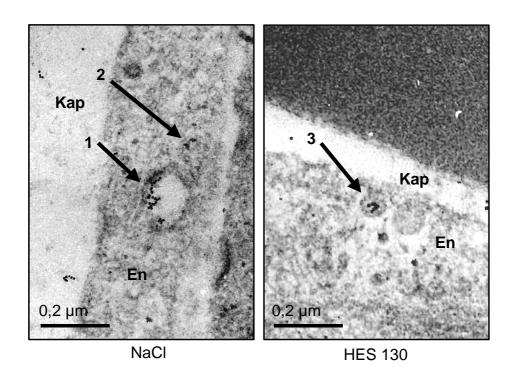


Abbildung 23: Elektronenmikroskopie der Lunge

Darstellung endothelialer goldtragender Vesikel aus NaCl- und HES130-Gruppe.

En: Kapillarendothelzelle, Kap: Blutkapillare, 1: großes gering konzentriertes Vesikel,

2: freie Goldpartikel, 3: kleines konzentriertes Vesikel

4.6 Reverse Transkriptase Polymerasekettenreaktion (rt-PCR)

Abbildung 24 zeigt repräsentative Gelelektrophoresen der rt-PCR-Produkte GAPDH, Aquaporin-1 und Caveolin-1 aus allen vier Versuchsgruppen. Dabei findet sich die GAPDH als solitäre Bande bei 290 bp. Das Aquaporin-1-Produkt stellt sich als Bande bei 244 bp, das Caveolin-1-Produkt bei 226 bp dar. Während sich die Banden der GAPDH zwischen den Gruppen nicht unterscheiden, scheint das Caveolin-1 in der NaCl-Gruppe etwas stärker exprimiert zu sein als in der Kontrollgruppe, was in den HES-Gruppen nicht der Fall ist. Ähnlich wie beim Cav-1 stellt sich auch die AQP-1-Bande in der NaCl-Gruppe dunkler dar, während die Banden der HES-Gruppen eher blasser als die der Kontrolle erscheinen.

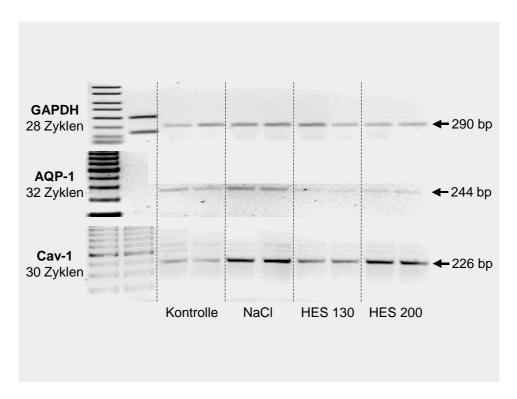


Abbildung 24: Repräsentative Gelelektrophoresen der rt-PCR Produkte von GAPDH, Aquaporin-1 (AQP-1) und Caveolin-1 (Cav-1) aus Kontroll-, NaCl-, HES130-und HES200-Gruppe. Banden von links nach rechts: Bande 1: Molekulargewichtsmarker; Bande 2: Konzentrationsstandard für die semiquantitative Auswertung; Bande 3,4: Kontrolle, Bande 5,6: NaCl-Gruppe; Bande 7,8: HES 130-Gruppe; Bande 9,10: HES 200-Gruppe. Zeile oben: GAPDH; Zeile Mitte: AQP-1; Zeile unten: Cav-1.

4.6.1 GAPDH

Als Kontrollgen wurde von allen Versuchstieren eine rt-PCR der GAPDH durchgeführt. Abbildung 25 zeigt die Ergebnisse der densitometrischen Auswertung der rt-PCR-Gele. Es ergab sich hier kein Konzentrationsunterschied für die Kontrolle GAPDH, die in allen Gruppen gleich stark exprimiert ist.

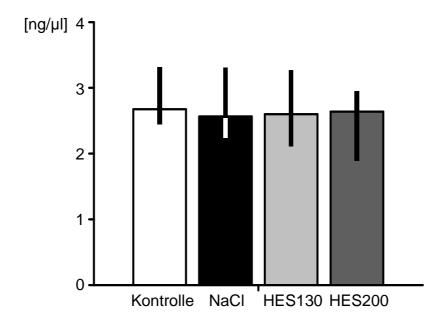
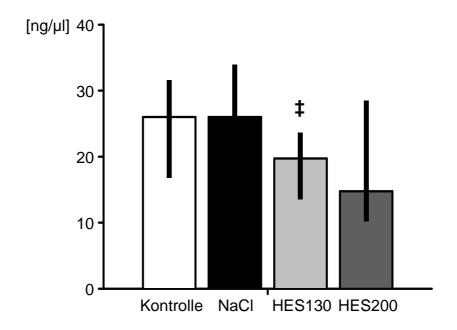


Abbildung 25: Densitometrische Auswertung der rt-PCR: GAPDH [ng/ μ l] Median und Quartilsabstand (Q₂₅ – Q₇₅) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200- Gruppe.

4.6.2 Aquaporin-1 (AQP-1)

Ausgehend von der Hypothese, dass ein Zusammenhang zwischen der endothelialen Ödembildung und der Expression von Aquaporin-1 besteht, wurde eine rt-PCR durchgeführt. In der densitometrischen Auswertung (siehe Abbildung 26) zeigte das Aquaporin-1 in der NaCl-Gruppe keine signifikante Veränderung gegenüber der Kontrolle, ebenso wie in der HES 200-Gruppe. Allein in der HES 130-Gruppe war die Konzentration signifikant niedriger als in der NaCl-Gruppe.

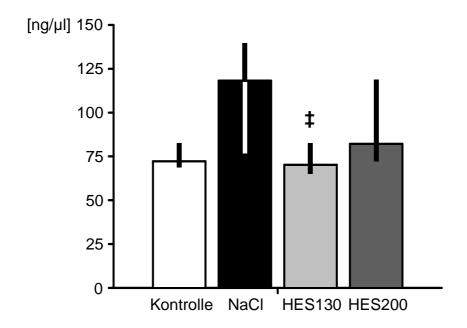


‡: p < 0.05 vs. NaCl

Abbildung 26: Densitometrische Auswertung der rt-PCR: AQP-1 [ng/ μ l] Median und Quartilsabstand (Q₂₅ – Q₇₅) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe.

4.6.3 Caveolin-1 (Cav-1)

Um den Einfluss der Inflammation und der Volumentherapie mit Hydroxyethylstärke auf den vesikulären Transport zu untersuchen, wurde die Expression von Caveolin-1 mittels rt-PCR bestimmt. Die densitometrische Auswertung der Caveolin-1-Produkte (siehe Abbildung 27) ergab keinen signifikanten Unterschied zwischen NaCl- und Kontrollgruppe. Im Gegensatz zur HES 200-Gruppe war die Konzentration in der HES 130-Gruppe signifikant geringer als in der Kontrolle.



‡: p < 0.05 vs. NaCl

Abbildung 27: Densitometrische Auswertung der rt-PCR: Cav-1 [ng/ μ l] Median und Quartilsabstand (Q₂₅ – Q₇₅) der Kontroll-, NaCl-, HES130- und HES200-Gruppe.

5 Diskussion

Die Sepsis stellt eine häufige Ursache des akuten Lungenschadens dar und tritt in den letzten Jahren mit steigender Inzidenz auf [34, 119]. Die Mortalität dieses akut auftretenden schweren Krankheitsbildes ist dabei erheblich [97]. Für die Art der Volumentherapie sprechen auch aktuelle Leitlinien derzeit keine explizite Empfehlung aus [15].

Im vorliegenden Versuch wurde der therapeutische Einfluss von Hydroxyethylstärke auf die pulmonale endotheliale Permeabilität in der frühen Phase des akuten Lungenschadens im Tiermodell untersucht. Hierzu wurde unter experimentellen Bedingungen durch die intravenöse Applikation von Endotoxin ein Endothelzellschaden hervorgerufen und die Permeabilitätsveränderungen anhand der alveolokapillären Septendicke und der Extravasation von goldmarkiertem Kaninchen-Serumalbumin (Au-RSA) elektronenmikroskopisch analysiert.

5.1 Methodenkritik

5.1.1 Versuchstiere

Für die vorliegende Studie wurden Kaninchen als Versuchstiere ausgewählt. Ihre Körpergröße erlaubt im Gegensatz zu kleineren Tieren, wie zum Beispiel Mäusen oder Hamstern, die genaue Bestimmung makrohämodynamischer Parameter wie mittlerem arteriellem Druck und zentralvenösem Druck durch das Einbringen von arteriellen und zentralvenösen Kathetern. Zusätzlich kann bei Kaninchen mittels einer aortal platzierten Thermodilutionssonde das Herzzeitvolumen gemessen werden. Dies ist bei Ratten und kleineren Versuchstieren nicht möglich. Das makrohämodynamische Monitoring war für die Durchführung der vorliegenden Studie essentiell, um eine frühe und zielgerichtete Volumentherapie gemäß der Leitlinien für die Sepsistherapie [15] und damit der Einschlusskriterien (MAP > 70 mmHg, HZV-Index > 100 ml/kg/min, ScvO₂ > 65%) praktizieren zu können. Zudem ist das zirkulierende Blutvolumen von Kaninchen ausreichend groß, so dass wiederholte Entnahmen für die Blutgasanalyse ohne eine Beeinträchtigung der Makrozirkulation erfolgen können.

Die Herstellung des goldmarkierten Kaninchen-Serumalbumins erfordert den Ansatz großer Mengen der Ausgangslösungen, wobei die resultierende Menge der fertigen Goldlösung relativ gering ist. Die Herstellung ist zudem äußerst aufwändig. Größere Versuchstiere, wie zum Beispiel Schweine, schienen aus diesem Grund ungeeignet, da sehr viel größere Mengen der Goldlösung hätten appliziert werden müssen, um eine ausreichende Plasmakonzentration zu erreichen.

5.1.2 Makrohämodynamik und Blutgasanalyse

Im Rahmen einer systemischen Inflammation kommt es zu einer gesteigerten endothelialen Permeabilität im gesamten Organismus. Dies bedingt den transendothelialen Verlust von Flüssigkeit und Makromolekülen, was als capillary leak bezeichnet wird. Zudem tritt eine Vasodilatation und ein venöses Pooling des zirkulierenden Blutvolumens auf. Zusammen führen diese Faktoren zu einem Volumendefizit, mit nachfolgendem intravasalen Absinken des arteriellen Mitteldrucks und Anstieg der Herzfrequenz. Das Herzzeitvolumen kann im Rahmen eines septischen Syndroms sowohl erniedrigt, als auch gesteigert sein. Auch im Falle einer Steigerung ist es jedoch in den meisten Fällen nicht ausreichend, um den gesteigerten Sauerstoffbedarf zu decken. Es kommt zum Schock, der gekennzeichnet ist durch ein Missverhältnis zwischen Sauerstoffangebot und Sauerstoffbedarf. Die in Folge der eintretenden Gewebshypoxie gesteigerte anaerobe Glykolyse führt zu einer zunehmend azidotischen Stoffwechsellage. Eine adäquate Volumentherapie ist in diesem Zusammenhang für die Aufrechterhaltung der Mikrozirkulation somit zwingend erforderlich.

In der vorliegenden Studie wurde die systemische Inflammation durch die Applikation von Endotoxin induziert. Dabei sollten die endotoxinbedingten endothelialen Veränderungen analysiert werden. Um konstante Versuchsbedingungen zu schaffen, sollten arterieller Mitteldruck, Herzfrequenz und Herzminutenvolumen der Versuchstiere über die gesamte Versuchsdauer stabil gehalten werden. Zudem war das makrohämodynamische Monitoring für die Durchführung einer frühen und zielgerichteten Volumentherapie, wie sie bei der Sepsis indiziert ist, unverzichtbar [15, 95]. Hierzu wurden arterieller Mitteldruck, zentralvenöser Druck, zentralvenöse Sauerstoffsättigung, Herzfrequenz und Herzminutenvolumen durch die Implantation von Kathetern kontinuierlich überwacht.

Gleichzeitig führt die Permeabilitätssteigerung in der Lunge zu einer Ödembildung der alveolokapillären Septen. Diese Verbreiterung der Gasaustauschstrecke bedingt eine Verschlechterung des Gasaustausches, die sich zunächst in einem erniedrigten arteriellen Sauerstoffpartialdruck in der Blutgasanalyse niederschlägt. Ein Parameter, der sich sehr gut für die Charakterisierung einer Diffusionsstörung eignet und eine Beurteilung des Schweregrads des akuten Lungenschadens ermöglicht, ist die alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz (AaDO₂), die das Verhältnis zwischen Sauerstoffgehalt der Alveolarluft und arteriellem Sauerstoffpartialdruck angibt [124].

Um den in der vorliegenden Studie mittels Endotoxinapplikation induzierten Lungenschaden zu objektivieren und quantifizieren wurden in Abständen von 30 Minuten Blutgasanalysen durchgeführt.

5.1.3 Induktion des akuten Lungenschadens mit Endotoxin

Für die Induktion des akuten Lungenschadens im Tiermodell stehen verschiedene Methoden zur Verfügung. Entweder wird die Lunge hierbei im Rahmen einer systemischen Inflammation indirekt geschädigt oder durch Einbringung eines Stoffes von tracheal ein direkter Lungenschaden hervorgerufen.

MURAKAMI et al. induzierten in ihrer Studie den akuten Lungenschaden bei Schafen durch die Inhalation von Rauch [74]. Auch die intratracheale Applikation von Bleomycin [45] oder Bakterien wie Pseudomonas aeruginosa [96] ruft einen akuten Lungenschaden hervor. Der von trachealer Seite induzierte Schaden führt primär zu einem Angriff der epithelialen Schicht der alveolokapillären Barriere. Im vorliegenden Versuch stand jedoch die Untersuchung der endothelialen Beteiligung am Barriereverlust im Mittelpunkt. Für diesen Zweck ist eine Induktion des Lungenschadens von tracheal ungeeignet.

Die experimentelle Induktion einer abdominellen Entzündung durch einen Infektionsherd führt durch deren Ausbreitung zu einer Sepsis. Hierbei ist der gesamte Organismus von der Inflammation betroffen, so dass die mikroskopischen und funktionellen Veränderungen in entfernt liegenden Organen, insbesondere der Lunge, untersucht werden können. Dieses Modell ähnelt klinischen Situationen, bei denen der akute Lungenschaden zum Beispiel als Komplikation einer Peritonitis auftreten kann. Gardinali et al. lösten einen akuten Lungenschaden durch die

intraperitoneale Injektion einer Suspension aus Zymosan und Mineralöl aus [30], FENG et al. durch Ligation und Punktion des Zökums [23, 24, 25]. In Studien von MARX et al. wurde zu diesem Zweck Faeces in die Bauchhöhle eingebracht [62, 63].

Durch die intravenöse Applikation von Endotoxin wird ebenfalls eine systemische Entzündungsreaktion hervorgerufen. Endotoxine sind bakteriellen Ursprungs: Die äußere Membran bestimmter Bakterien, wie zum Beispiel gramnegativer Escherichia coli, enthält Lipopolysaccharide (LPS), die beim Zerfall der Bakterien als Endotoxine freigesetzt werden und stark toxisch wirken [41]. Bei Patienten mit akutem Lungenversagen (ARDS) ist häufig eine Infektion mit solchen gramnegativen Bakterien ursächlich an der Entstehung des schwerwiegenden klinischen Krankheitsbildes beteiligt [22]. Die klinischen Merkmale des ARDS, wie zum Beispiel die Entstehung eines Lungenödems infolge einer Permeabilitätszunahme der alveolokapillären Membran, gleichen dabei denen, die im Rahmen einer experimentellen Endotoxinämie auftreten, so dass die Infusion von Endotoxin im Tiermodell sich zu einer etablierten und weitverbreiteten Methode entwickelt hat, um die pathophysiologischen Vorgänge des akuten Lungenschadens zu untersuchen [33, 39, 42, 50, 59, 107].

Gegenüber den Modellen der Sepsisinduktion durch einen Infektionsherd ist die intravenöse Endotoxinapplikation von Vorteil, da die standardisierte Verabreichung genau definierbarer Mengen den Versuchsablauf steuerbar und damit die Ergebnisse vergleichbar macht. Zudem ist die Beobachtung eines kürzeren Versuchszeitraumes möglich, da eine sofortige Verteilung des Toxins über den gesamten Organismus stattfindet.

Mit der Übertragung der Ergebnisse einer Studie der experimentellen Endotoxinämie im Tierversuch auf andere Spezies muss jedoch vorsichtig umgegangen werden. Die Reaktion, die Endotoxin hervorruft, wird durch zahlreiche Entzündungsmediatoren und Zellen des Immunsystems vermittelt, und stellt somit keine eindimensionale Ursache-Wirkungs-Beziehung dar, sondern vielmehr eine facettenreiche, komplexe Reaktion des gesamten Organismus. Hierbei muss in Betracht gezogen werden, dass unterschiedliche Spezies nicht auf die gleiche Weise reagieren [33] und das Modelle der endotoxininduzierten Sepsis die Komplexität eines infektionsbedingten septischen Status unter humanen Bedingungen nicht adäquat widerspiegeln [64, 91].

5.1.4 Gravimetrische Permeabilitätsanalyse: Wet/dry weight ratio

Der akute Lungenschadens geht mit einer Zunahme der endothelialen Permeabilität einher. Die Entstehung eines Lungenödems und eine Verschlechterung des Gasaustausches sind die Folge [33, 89].

Für die quantitative Analyse dieser pulmonalen Permeabilitätssteigerung gibt es unterschiedliche Techniken [85].

Eine gravimetrische Methode zur Quantifizierung eines Lungenödems stellt die Ermittlung des Quotienten aus Feucht- und Trockengewicht (*lung wet/dry weight ratio*, W/D) dar. Eine Zunahme des Wassergehaltes der Lunge im Rahmen eines Lungenödems hat einen Anstieg der W/D zur Folge. Um die Differenz zu ermitteln wird die gesamte Lunge, ein einzelner Lappen oder Segmente peripherer Lungenareale entnommen und gewogen. Anschließend wird das Gewebe in einem Ofen getrocknet, bis ein konstantes Gewicht erreicht wird. Die Dauer dieses Vorgangs hängt vom Ausgangsgewicht und dem Wassergehalt der Lunge ab [85]. Koshika et al. stellten sechs Stunden nach Induktion eines Endotoxinschocks bei Hunden einen signifikanten Anstieg der W/D des unteren linken Lungenlappens fest [53].

Auch die Analyse der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit (BALF) kann zur Untersuchung der alveolokapillären Barrierefunktion herangezogen werden. Unter physiologischen Bedingungen sind inflammatorische Zytokine, inflammatorische Zellen und Plasmaproteine, wie zum Beispiel Albumin, in so geringer Menge im Alveolarraum vorhanden, dass diese praktisch nicht messbar sind. Ein signifikanter Anstieg dieser Substanzen in der BALF zeigt einen Verlust der alveolokapillären Barrierefunktion an [85]. OLSON et al. konnten bei Schweinen endotoxininduzierten signifikanten Anstieg der Albuminkonzentration in der bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit messen [83]. Eine Zunahme von Albumin in der BALF bedeutet jedoch einen ausgeprägten Schaden, da die alveolokapilläre Membran in ihrer Gesamtheit (Endothel, Interstitium, Epithel) gestört sein muss.

Für den Nachweis einer Permeabilitätszunahme in der frühen Phase des akuten Lungenschadens ist weder eine Bestimmung der Differenz zwischen Feucht- und Trockengewicht, noch die Messung der Albuminkonzentration in der

bronchoalveolären Lavage-Flüssigkeit sensibel genug. Dies zeiat eine vorangegangene Studie unserer Arbeitsgruppe [39]: Beide Methoden lieferten in einem Modell des endotoxininduzierten frühen Lungenschadens keinen Nachweis für Permeabilitätszunahme. während in der intravitaleine und elektronenmikroskopischen Untersuchung eindeutig ein Ödem der Alveolarsepten festgestellt werden konnte. Ebenso ergaben die Ergebnisse der wet/dry weight ratio in der vorliegenden Studie keinen Unterschied zwischen den Gruppen.

5.1.5 Elektronenmikroskopische Permeabilitätsanalyse: Applikation von goldmarkiertem Albumin

Die Permeabilitätssteigerung im Rahmen des akuten Lungenschadens lässt sich auch mit Hilfe unterschiedlicher Permeabilitätsmarker untersuchen. Hierbei wird der Marker entweder direkt appliziert oder verbunden mit einem plasmaeigenen Protein, wie zum Beispiel Albumin, verabreicht.

Eine Möglichkeit ist die Messung der Extravasation von *Evans-blue*-Färbung. Hierbei wird den Versuchstieren etwa 15 Minuten vor Versuchsende Evans-blue-Lösung intravenös appliziert und nach Entnahme des Lungengewebes durch Inkubation in Formamidlösung extrahiert. Die des extrahierten Farbstoffs wird Menge anschließend spektrophotometrisch bei 620 nm ermittelt [107]. Je größer die pulmonale kapilläre Permeabilität, desto höher der Gehalt des Farbstoffs im Extrakt. Die Ergebnisse dieser Methode korrelieren gut denen des Quotienten aus Nass- und Trockengewicht (W/D). FENG [25] untersuchte den akuten Lungenschaden bei Ratten in einem Modell der durch Ligation und Punktion des Zökums induzierten Sepsis, während TIAN [107] den Lungenschaden durch die Infusion von Endotoxin induzierte. Beide konnten eine signifikante Zunahme der pulmonalen kapillären Permeabilität anhand der erhöhten Evans-blue Extravasation nachweisen. gleichzeitig zeigte auch die W/D eine signifikante Steigerung.

Die vaskuläre Permeabilität für Proteine kann durch die Verwendung von radioaktiv markiertem Albumin bestimmt werden. Hierbei kann nach Infusion des radioaktiv markierten Albumins durch die Messung der Plasmakonzentration und Gewebeakkumulation in der Lunge auf die Permeabilität der alveolokapillären Membran geschlossen werden [29, 71, 77]. Diese Methode erlaubt eine zuverlässige

und genaue Quantifizierung der vaskulären Permeabilität, dies jedoch nur im Gesamtorgansystem.

Auch die Verwendung eines Intravitalmikroskops ermöglicht eine Permeabilitätsanalyse. Die Implantation eines transparenten thorakalen Fensters eröffnet den Blick auf die Lungenoberfläche. Mit dem Intravitalmikroskop können subpleurale Kapillaren und Alveolen dargestellt werden. Als Plasmamarker wird Albumin mit Fluorescein isothiocyanate (FITC) markiert und intravenös appliziert. Die Zunahme der Extravasation von fluoreszenzmarkiertem Albumin indiziert eine gesteigerte Permeabilität. In der Fluoreszenzdarstellung sind die Gefäße als helle, die Alveolen als dunkle Areale zu sehen. Eine Veränderung des Kontrasts zwischen diesen Flächen bedeutet eine Steigerung der vaskulären Permeabilität, der Grad der Steigerung wird durch die Messung der relativen Fluoreszenz von Kapillaren und Alveolen bestimmt [10, 28, 65, 72]. Eine Ödembildung kann intravitalmikroskopisch auch durch die Messung der Alveolarseptenbreiten guantifiziert werden [39, 54]. Die Auflösung der intravitalmikroskopischen Darstellung ist jedoch begrenzt. Die Unterscheidung einzelner Septenanteile, sowie die Analyse der ultrastrukturellen Zellmorphologie ist im Rahmen dieser Methode nicht möglich.

Keine der oben genannten Methoden erlaubt einen Rückschluss auf die Lokalisation und Form der zugrundeliegenden Veränderungen, da eine ultrastrukturelle Betrachtung des Gewebes nicht möglich ist. Auch die Lichtmikroskopie kann nur grobe strukturelle Veränderungen, wie zum Beispiel eine erhebliche Zunahme der Alveolarseptendicken und eine Akkumulation von Leukozyten, darstellen [85].

Die einzige Möglichkeit strukturelle Veränderungen auf zellulärer Ebene qualitativ zu untersuchen bietet die elektronenmikroskopische Darstellung, da nur hier eine so große Auflösung erreicht werden kann, dass zelluläre und subzelluläre Strukturen genau visualisiert werden können. Im Gegensatz zur Intravitalmikroskopie, die lediglich die Analyse subpleuraler, oberflächlicher Kapillaren und Alveolen zulässt, können im Rahmen der Elektronenmikroskopie Ausschnitte aus allen Teilen der Lunge, sowohl oberflächliche als auch tiefe Areale, eingeschlossen werden. Die Ergebnisse sind aus diesem Grund repräsentativ für das gesamte Organ. Durch die Messung der alveolokapillären Septendicke auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen kann schon eine dezente Ödembildung registriert werden. Webb et al.

nutzen diese Methode um den Einfluss verschiedener kolloidaler Lösungen auf die pulmonale kapilläre Durchlässigkeit zu untersuchen [121, 122]. Zusätzlich ermöglicht die hohe Auflösung die separate Messung der Epithel- und Endothelzelldicke, so dass der primäre Ort der Ödementstehung genauer lokalisiert werden kann. In der vorliegenden Studie wurden für die Untersuchung der pulmonalen mikrovaskulären Permeabilität Abschnitte der alveolokapillären Septen ausgewählt, die sich aus nicht mehr als den folgenden drei Schichten zusammensetzten: Kapillarendothelzelle, gemeinsame Basallamina und Alveolarepithelzelle. Die ausgewählten Areale stellen die dünnsten Anteile der Blut-Luft-Schranke dar, an denen der überwiegende Teil des Gasaustausches stattfindet. Sie machen etwa die Hälfte der Alveolaroberfläche aus [5]. Eine Veränderung der Permeabilität und damit eine Verbreiterung Diffusionsstrecke an diesen Stellen hat also einen erheblichen Einfluss auf den Gasaustausch.

Eine gleichzeitige Quantifizierung der pulmonalen kapillären Permeabilität erlaubt eine von unserer Arbeitsgruppe entwickelte Methode [39]. Hierbei wird nach einem von König et al. [52] entwickelten Verfahren Kaninchen-Serumalbumin (RSA) mit kolloidalen Goldpartikeln komplexiert. Zur Quantifizierung der pulmonalen kapillären Permeabilität kann auf den elektronenmikroskopischen Aufnahmen die Anzahl der extravasierten Goldpartikel in den unterschiedlichen Kompartimenten des Alveolarseptums bestimmt werden [39].

Die Herstellung von Komplexen aus kolloidalen Goldpartikeln und Makromolekülen ist eine etablierte und weitverbreitete Methode, die sich insbesondere für elektronenmikroskopische Analysen ausgezeichnet eignet [37, 43, 73, 80, 101]. KÖNIG et al. [52] wählten zur Untersuchung der pulmonalen Perfusionsverhältnisse goldmarkiertes Kaninchen-Serumalbumin (Au-RSA) als Marker aus, da es besonders vorteilhafte Eigenschaften besitzt: Im Elektronenmikroskop sind die Goldpartikel bei moderater Vergrößerung als 8 nm große, kreisrunde schwarze Punkte leicht erkennbar, so dass eine eindeutige Kennzeichnung der Kapillaren unter Einschluss des gesamten kapillären Umfelds möglich ist. Der Marker ist in ausreichend hohen Plasmakonzentrationen messbar, ohne dabei Nebenwirkungen, wie zum Beispiel Blutdruckschwankungen, allergische oder toxische Reaktionen, hervorzurufen.

Nach der Infusion von 4-5 ml Goldlösung konnten König et al. [52] nach der von KEHLE [48] entwickelten Methode spektrophotometrisch bei einem Absorptionsmaximum von 525 nm eine Plasmakonzentration von etwa 400 Partikeln/µm³ messen. Diese Konzentration fiel langsam ab, die Halbwertszeit betrug etwa 30 Minuten. In der hier vorliegenden Studie wurde die Plasma Disappearance Rate (PDR) ermittelt, die unter Kontrollbedingungen etwa 1% betrug, das heißt, dass etwa 1% des Albumins pro Minute den Intravasalraum verlässt. Die Halbwertszeit beträgt folglich circa 50 Minuten. Die Goldapplikation erfolgte zehn Minuten vor Versuchsende. Der gewählte Zeitpunkt gewährleistet eine ausreichend hohe Konzentration der Goldpartikel im Plasma und eine homogene Verteilung im gesamten Gefäßsystem. Durch die standardisierte Herstellung und normierte Applikation der Goldlösung bei allen Versuchstieren konnten die Ergebnisse zwischen den Versuchsgruppen verglichen werden.

Die elektronenmikroskopische Analyse hat jedoch auch nachteilige Aspekte. So sind die untersuchten Ausschnitte klein und liefern keinen Gesamtüberblick der Lungenstrombahn. Zudem ist eine kontinuierliche Messung, also eine Analyse der Veränderungen im Zeitverlauf nicht möglich. Die Ergebnisse spiegeln lediglich Momentaufnahmen eines Zeitpunktes innerhalb eines dynamischen Prozesses wider. Aus diesem Grund kann eine quantitative Aussage nur mit Einschränkung gemacht werden.

Zur Diskussion steht auch, inwieweit die beobachteten Ergebnisse der Extravasation des goldmarkierten Albumins auf die Eigenschaften von nativem Albumin übertragbar sind. Beispielsweise besitzt das goldmarkierte Albumin mit etwa 340000 g/mol ein deutlich höheres Molekulargewicht als das native Albumin mit 66000 g/mol. Zudem unterscheiden sie sich bezüglich des molekularen Durchmessers und der Verteilung der elektrischen Ladungen [37]. Ein Einfluss dieser Merkmale auf die Extravasationsgeschwindigkeit ist denkbar. Möglich ist auch, dass die in ihren physikalischen Eigenschaften veränderten goldmarkierten Proteine nicht zwangsweise den gleichen intrazellulären Pfaden wie natives Albumin folgen.

Beachtet werden muss außerdem, dass unklar ist, ob und in welchem Umfang das goldmarkierte Albumin möglicherweise in andere Organsysteme extravasiert oder gar gespeichert wird. Im Falle eines extrapulmonalen Austritts der Goldpartikel, könnte dies die in der Lunge beobachteten Konzentrationen beeinflussen.

Die elektronenmikroskopische Analyse der pulmonalen mikrovaskulären Permeabilität unter Verwendung von goldmarkiertem Albumin als in vivo Marker ermöglicht durch die hohe Auflösung die detaillierte Darstellung der alveolokapillären Barriere. Da Albumin durch die Goldmarkierung visualisiert wird, können die transendothelialen Transportwege untersucht werden.

5.1.6 rt-PCR: Expression von Aquaporin-1 und Caveolin-1

Der akute Lungenschaden geht mit einer endothelialen Permeabilitätssteigerung einher, wobei der zugrunde liegende Mechanismus bis heute nicht vollständig aufgeklärt ist. Die Entstehung von interendothelialen Lücken konnte insbesondere im frühen Stadium des akuten Lungenschadens strukturell nicht nachgewiesen werden [4, 5], so dass hier die Beteiligung transzellulärer Transportmechanismen an der Zunahme der Gefäßdurchlässigkeit wahrscheinlich ist [31, 44, 110]. Das Caveolin-1 bildet die Hauptproteinkomponente der Vesikel, ohne das eine Bildung von Vesikeln nicht möglich ist [69, 70, 87, 88, 112]. Aus diesem Grund eignet es sich gut als Marker für den transzellulären vesikulären Transport. Ob der für das pulmonale Endothel der Lunge typische Wassermembrankanal Aquaporin-1 für die Ödembildung eine Rolle spielt, ist Gegenstand aktueller Forschung [114]. Aufgrund seiner Funktion und Lokalisation ist eine Beteiligung an der Flüssigkeitshomöostase der alveolokapillären Barriere jedoch mehr als wahrscheinlich.

Aus diesem Grund wurde in der vorliegenden Studie die Expression von Caveolin-1 und Aquaporin-1 auf der Transkriptionsebene durch eine rt-PCR untersucht und quantitativ durch eine densitometrische Messung ausgewertet. Als Kontrollgen wurde die GAPDH (Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase) verwendet. Die GAPDH ist ein Enzym der Glykolyse, das in jeder tierischen Zelle vorkommt und deshalb in allen Gruppen gleichermaßen exprimiert wird.

Die rt-PCR wurde nach einem standardisierten Verfahren mittels eines Kits durchgeführt, so dass bei der Isolierung der RNA eine hohe Qualität erreicht werden konnte. Es muss jedoch bei der Interpretation der Ergebnisse berücksichtigt werden,

dass das Endothel aus dem Lungengewebe nicht isoliert wurde, sondern eine vollständige Lungengewebsprobe für die RNA-Isolation verwendet wurde.

5.1.7 Applizierte Substanzen

5.1.7.1 Endotoxin

Im vorliegenden Versuch wurde einem Teil der Tiere hochgereinigtes Endotoxin von Escherichia coli Serotyp 0111:B4 verabreicht. Die Kaninchen erhielten zu Beginn jeweils ein Bolus von 25 µg/kg Körpergewicht, im Anschluss wurde über die gesamte Versuchsdauer von zwei Stunden kontinuierlich eine Menge von 25 µg/kg/h infundiert. Die verwendete Dosis erscheint bei der Betrachtung anderer tierexperimenteller Studien verhältnismäßig gering. So werden zum Beispiel bei Versuchen an kleineren Nagetieren regelhaft sehr viel höhere Dosen eingesetzt. HOFFMANN et al. beobachteten eine Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität in der intravitalmikroskopischen Untersuchung einer Haut-Muskel-Kammer Goldhamstern, die einen Bolus von 2 mg/kg Escherichia coli Endotoxin erhalten hatten [42]. Bei Ratten wurde eine Permeabilitätszunahme der pulmonalen Kapillaren im akuten Lungenschaden durch die Infusion von 6 mg/kg Escherichia coli Endotoxin beobachtet [107]. Die Applikation von 5 mg/kg Escherichia coli Endotoxin führte bei Ratten zu einer signifikanten Zunahme proinflammatorischer Zytokine [59]. Die Bestimmung des Endotoxin-Plasmaspiegels bei septischen Patienten betrug im Vergleich durchschnittlich nur etwa 60 pg/ml [35].

Die Endotoxinempfindlichkeit verschiedener Tierspezies steht offenbar nicht im Zusammenhang mit ihrer Körpergröße. HELLYER et al. induzierten bei Schweinen durch die Infusion von nur 5 µg/kg Escherichia coli Endotoxin in der ersten Stunde, beziehungsweise 2 µg/kg bis zur vierten Stunde des Versuchs eine Endotoxinämie, die bei den Kontrolltieren zu einer hämodynamischen Instabilität führte [40]. Die gleiche Dosis hatte bei Schweinen in einer zweiten Studie dieser Arbeitsgruppe bereits nach drei Stunden einen ausgeprägten Lungenschaden zur Folge, der sich unter anderem in einer Permeabilitätszunahme der alveolokapillären Membran, einem Lungenödem und einer ausgeprägten Hypoxie zeigte [82].

Kaninchen zeigen eine hohe Endotoxinempfindlichkeit. So kann die Applikation eines einzelnen Bolus von 0,5 mg/kg Escherichia coli Endotoxin bereits zum Exitus letalis führen [126]. Die Untersuchung des Einflusses von Endotoxin beziehungsweise

Hydroxyethylstärke auf die mikrovaskuläre Permeabilität erfordert jedoch die makrohämodynamische Stabilität der Tiere während der gesamten Versuchsdauer, da die beobachteten Veränderungen andernfalls keinen Rückschluss auf die zulassen. sondern durch Kreislaufapplizierten Substanzen auch und Volumenschwankungen induziert sein könnten. In einer Studie von NAKAGAWA et al. wurde der akute Lungenschaden bei Kaninchen durch die Gabe eines Escherichia coli Endotoxin-Bolus von 50 µg/kg induziert. In vorangegangenen Studien derselben Arbeitsgruppe hatten höhere Dosen von 100 oder 150 µg pro Kaninchen zu einer hohen Mortalität geführt, die durch die Wahl der niedrigeren Dosis von 50 µg/kg stark gesenkt werden konnte [76]. MIKAWA et al. induzierten in ihrer Studie einen akuten Lungenschaden bei Kaninchen durch die Infusion eines Bolus von 30 µg/kg KG [67]. In früheren Studien unserer Arbeitsgruppe, bei denen das Ziel war, die Leukozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation zu analysieren, wurde den Kaninchen zur Induktion eines akuten Lungenschadens jeweils ein Bolus von 100 μg, über die restliche Versuchsdauer eine kontinuierliche Dosis von 20 μg/kg/h infundiert [39, 50]. Im vorliegenden Versuch wurde diese Dosierung modifiziert: Der initiale Bolus betrug 25 µg/kg, während die kontinuierliche Gabe auf 25 µg/kg/h Diese erhöht wurde. Dosierung ermöglichte die Untersuchung der endotoxinbedingten Endothelschädigung bei Erfüllung der Zielkriterien Volumentherapie.

5.1.7.2 Physiologische Kochsalzlösung

Im der vorliegenden Studie wurde die Infusionstherapie der Versuchstiere der Kontroll- und NaCl-Gruppe ausschließlich mit kristalloider Kochsalzlösung (NaCl-Lösung) durchgeführt. Die Dosierung betrug hierbei 10 ml/kg/h. Zusätzlich erhielten die Tiere unabhängig von der Gruppenzugehörigkeit bei Bedarf NaCl-Lösung zur hämodynamischen Stabilisierung.

NaCI-Lösung besitzt eine Osmolarität von 308 mosmol/I und ist damit isoton. Ein Liter NaCI-Lösung enthält dabei 154 mmol Natrium und 154 mmol Chlorid, jedoch keine onkotisch wirksamen Teilchen, so dass sie sich im intravasalen und extravasalen Raum verteilt. Aus diesem Grund verlassen etwa 70% des infundierten Volumens innerhalb von zwei Stunden den Intravasalraum, weshalb im Rahmen der Infusionstherapie relativ große Mengen verabreicht werden müssen. Da NaCI-Lösung weder Albumin, noch andere onkotisch wirksame Teilchen enthält, kommt es

im Rahmen der Infusion zu einer Verdünnung des Plasma-Albumins und damit zu einer Hypalbuminämie und einem Absinken des kolloidosmotischen Drucks. Auf diese Weise kann eine Ödembildung verstärkt werden. NaCl-Lösung enthält einen unphysiologisch hohen Anteil an Chloridionen, so dass die Infusion größerer Mengen zu einer Hyperchlorämie führen kann. Folge dieser Elektrolytveränderung kann eine renale Vasokonstriktion mit Abnahme der glomerulären Filtrationsrate, sowie eine Suppression des Renin-Aldosteron-Systems mit Abfall des Blutdrucks sein [127]. NaCl-Lösung ist zudem eine unbalancierte Lösung, das heißt sie enthält kein Bikarbonat oder Bikarbonat-Äquvalent, wie zum Beispiel Acetat, als Pufferbase. Im Rahmen der Infusion von Kochsalzlösung kommt es folglich zu einer Dilution von Bikarbonat im Extrazellulärraum und damit zu einer Verminderung der Bikarbonat-Konzentration. Folge dieser Verdünnung ist die Ausbildung einer Dilutions-Azidose [127]. Ob auch diese Effekte einen Einfluss auf die mikrovaskuläre Permeabilität haben können ist bislang unbekannt.

5.1.7.3 Hydroxyethylstärke

Zur Untersuchung der Effekte von Hydroxyethylstärke auf die mikrovaskuläre Permeabilität wurde einem Teil der Versuchstiere in der vorliegenden Studie entweder isoonkotisches 6% HES 130/0,4, das eine Volumenwirkung von 100% besitzt, oder hyperonkotisches 10% HES 200 0,5 mit einer Volumenwirkung von 167% in einer Dosierung von 500 mg/kg/h appliziert.

Hydroxyethylstärke ist eine aus Amylopektin hergestellte Volumenersatzlösung. Um einen schnellen Abbau und damit die Ausscheidung zu verzögern, werden die Hydroxylgruppen des Amylopektins mit Hydroxyethylgruppen substituiert. Der Substitutionsgrad gibt dabei den Anteil der mit Hydroxyethylgruppen substituierten Glucosemoleküle Verschiedene HES-Lösungen an. werden durch den Substitutionsgrad (0,4/0,5) und das mittlere Molekulargewicht charakterisiert (130.000/200.000). Die Elimination von Hydroxyethylstärke erfolgt nach Spaltung durch die Serumamylase überwiegend renal. Es findet sich jedoch auch eine Restspeicherung im retikuloendothelialen System, dessen Bedeutung bis heute nicht abschließend geklärt ist.

Aktuelle Studien belegen, dass hyperonkotische Lösungen (wie zum Beispiel 10% HES 200/0,5) zu einer erhöhten Rate an Niereninsuffizienz führen können und die

Mortalität bei Sepsis und Schock steigern [9, 100]. Das Auftreten Nierenfunktionsstörungen stellt insbesondere bei der Verabreichung älterer Hydroxyethylstärkepräparate mit einem hohen Molekulargewicht eine Gefahr dar [14]. Beide in der Studie verwendeten HES-Präparate enthalten zudem ähnlich wie NaCl-Lösung einen unphysiologisch hohen Anteil an Chlorid und sind unbalancierte Lösungen, so dass es auch hier zur Ausbildung einer Hyperchlorämie und Dilutions-Azidose kommen kann. Bei fachgerechter Dosierung und ausreichender kristalloider Flüssigkeitszufuhr, sowie unter Beachtung von Kontraindikationen ist die Nebenwirkungsrate moderner niedermolekularer HES-Präparate jedoch gering [81, 98]. Anaphylaktoide Reaktionen sind äußerst selten, Störungen der Hämostase werden lediglich bei hochmolekularen HES-Lösungen beobachtet. Insgesamt ist Hydroxyethylstärke, insbesondere isoonkotisches 6% HES 130/0,4, ein im klinischen Alltag häufig verwendetes und nebenwirkungsarmes Präparat die Volumenersatztherapie.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Makrohämodynamik und Blutgasanalyse

Zur Kontrolle der Makrohämodynamik wurden in der vorliegenden Studie kontinuierlich die folgenden makrohämodynamischen Parameter bestimmt: mittlerer arterieller Druck, zentralvenöser Druck, Herzfrequenz und Herzzeitvolumen. Alle Versuchstiere waren unter Ausgangsbedingungen und über den gesamten Versuchszeitraum von zwei Stunden im Sinne der Einschlusskriterien (mittlerer arterieller Druck > 70 mmHg, Herzzeitvolumen-Index > 100 ml/kg/min, zentralvenöse Sauerstoffsättigung > 65%) makrohämodynamisch stabil. Früher mit diesem Versuchsmodell erhobene Daten stimmen mit den Werten der vorliegenden Studie überein [38, 39, 50, 54].

Aufgrund der makrohämodynamischen Stabilität der Versuchstiere lassen die in der Elektronenmikroskopie beobachteten Veränderungen der Lungenstruktur einen Rückschluss auf die Auswirkungen des applizierten Endotoxins, beziehungsweise der Hydroxyethylstärke zu, da Kreislauf- und Volumenschwankungen als Ursache mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden können.

Um Lungenfunktion und Gasaustausch zu überwachen, wurde über den gesamten Versuchszeitraum im Abstand von 30 Minuten Blutproben entnommen und Blutgasanalysen erstellt. Schon nach einer Stunde Versuchsdauer kam es in der NaCl- und HES 200-Gruppe zur Ausbildung einer deutlichen Azidose, die bis zum Versuchsende weiter zunahm und das Bild einer kombinierten respiratorischen und metabolischen Störung des Säure-Basen-Haushalts mit pH-Abfall, CO₂-Retention, Abnahme der Bicarbonatkonzentration und des Basenüberschusses zeigte. Auch unter dem Einfluss von HES 130 wurde eine kombinierte respiratorische und metabolische Azidose beobachtet, die jedoch erst nach zwei Stunde manifest wurde und weniger stark ausgeprägt war. Auch in der Kontrollgruppe kam es am Versuchsende zu einem gering ausgeprägten Abfall des Basenüberschusses. Ursache für die kombinierte Störung des Säure-Basen-Haushalts ist zum einen die Verschlechterung des pulmonalen Gasaustauschs im Rahmen des endotoxininduzierten akuten Lungenschadens, der eine CO2-Retention und damit respiratorische Azidose bedingt. Zum anderen waren metabolische eine

Veränderungen durch die Verwendung nicht balancierter Lösungen, die eine Dilutions-Azidose hervorrufen, bedingt, wodurch auch der Abfall des Basenüberschusses in der Kontrollgruppe erklärt wird. Sowohl die Verminderung des Sauerstoffpartialdrucks und der arteriellen Sauerstoffsättigung, als auch die Zunahme der alveolo-arteriellen Sauerstoffdifferenz in der NaCl-Gruppe sprechen für eine Abnahme der pumonalen Gasaustauschkapazität und eine eingeschränkte Diffusion zwischen Alveolarraum und Lungenkapillaren. Durch die Applikation von Hydroxyethylstärke konnte eine Verbesserung dieser Funktionsparameter gegenüber der NaCl-Gruppe erzielt werden, die in der HES 130-Gruppe stärker ausgeprägt war, als in der HES 200-Gruppe. Hydroxyethylstärke verbesserte den Gasaustausch während des endotoxininduzierten Lungenschadens signifikant gegenüber rein kristalloid behandelten Versuchstieren.

5.2.2 Wet/dry weight ratio

Die Berechnung der wet/dry weight ratio ließ in der vorliegenden Studie keine Gruppenunterschiede erkennen, obgleich sowohl im Rahmen der Blutgasanalyse, als auch mittels Elektronenmikroskopie signifikante Veränderungen Gasaustauschs und der alveolokapillären Septendicke demonstriert werden konnten. Der Feucht-/Trockengewichtsquotient (wet/dry weight ratio) dient als Parameter der pulmonalen extravaskulären Flüssigkeitsansammlung, er korreliert jedoch nicht immer mit dem Ausmaß des Schädigungsbildes [21]. Insbesondere für die Analyse geringer Unterschiede scheint er nicht sensitiv genug zu sein [39, 90]. Zudem analysierten alle Studien, in denen die wet/dry weight ratio eine signifikante Veränderung zeigte, deutlich spätere Zeitpunkte als in der vorliegenden Studie [25, 107].

5.2.3 Elektronenmikroskopie und *Plasma Disappearance Rate*

5.2.3.1 Physiologische Determinanten der mikrovaskulären Permeabilität

Unter physiologischen Bedingungen tragen verschiedene Faktoren zur Aufrechterhaltung der empfindlichen Flüssigkeitsbalance zwischen intra- und extravasalem Raum bei. Der Großteil des Flüssigkeitstransports hängt von der Balance der Starling-Kräfte nach der folgenden Formel ab [66]:

$$J_V = (L_p S)[(P_c - P_i) - \sigma(\pi_c - \pi_i)]$$

Formel 7: Starling-Gesetz

J_V: filtriertes Flüssigkeitsvolumen (ml/min)

L_p: hydraulische Leitfähigkeit des Endothels (cm/min xmmHg)

S: Filtrationsfläche (cm²)

σ: osmotischer Reflexionskoeffizient

Pc: hydrostatischer Druck in der Kapillare (mmHg)

P_i: hydrostatischer Druck im Interstitium (mmHg)

 Π_c : osmotischer Druck in der Kapillare (mmHg)

Π_i: osmotischer Druck im Interstitium (mmHg)

Der hydrostatischen Druckdifferenz zwischen Kapillare und Interstitium (P_c - P_i) steht die osmotische Druckdifferenz (Π_c - Π_i) entgegen, wobei sowohl der osmotische Druck des Plasmas, als auch der des Gewebes maßgeblich durch den Gehalt an Makromolekülen wie Albumin bestimmt wird. Das Endothel ist in der Lage durch den Transport von Plasmaproteinen den transendothelialen osmotischen Druckgradienten (Π_c - Π_i) zu regulieren. Diese semipermeablen Eigenschaften des Endothels sind entscheidend für das Flüssigkeitsgleichgewicht des Gewebes [66]. Die Transzytose von Albumin ist deshalb von entscheidender Bedeutung, da eine Veränderung der Albuminkonzentration im Gewebe mit einer Beeinflussung der Flüssigkeitshomöostase einhergeht [66].

Die endotheliale Permeabilität für ein bestimmtes Protein ist neben den spezifischen Barriereeigenschaften des Endothels abhängig von dessen molekularer Größe [66]. Kleine Moleküle wie gelöste Ionen passieren das Endothel überwiegend parazellulär mittels passiver Transportmechanismen, während Wasser die Endothelbarriere sowohl parazellulär, als auch transzellulär durch wassertransportierende

Membrankanäle, die sogenannten Aquaporine, überquert [114]. Diese erleichtern den Abbau von osmotischen Gradienten, indem sie die Permeabilität einer Membran für Wasser erhöhen [114]. Makromoleküle, insbesondere Albumin, werden über den vesikulären transzellulären Weg durch das Endothel transportiert [32, 68, 70, 87, 99]. Unter physiologischen Bedingungen findet der Transport von Albumin mit großer Wahrscheinlichkeit ausschließlich über den transzellulären Pfad in Form von Vesikeln statt [44, 66, 87]. Die Transportvesikel schnüren sich aus membranständigen kleinen Einstülpungen, den Caveolae ab, dessen Hauptstrukturprotein das Caveolin-1 darstellt, das für die Regulation der Vesikelformation eine Rolle spielt [66, 88]. Dabei wird die Transzytose von Albumin durch seine Bindung an einen spezifischen Caveolae-assoziierten Rezeptor, das albuminbindende Protein Gp60 aktiviert [69, 70, 112, 118]. Der Transport von Albumin via Caveolae findet entweder rezeptorgebunden an Gp60 oder frei in der flüssigen Phase der Vesikel statt, letzterer trägt den größten Anteil am Albumintransport via Transzytose [47, 69].

In der vorliegenden Studie zeigte die Kontrollgruppe eine intakte Struktur der alveolären Septen. Das Endothel war kontinuierlich und lag der Basallamina an, epitheliale Schäden konnten nicht festgestellt werden. Zeichen pathologischer Veränderungen wie Ödeme oder zelluläre Infiltrate lagen nicht vor. Goldmarkiertes Kaninchen-Serumalbumin wurde lediglich in kleinen klar abgrenzbaren endothelialen Vesikeln gefunden, was für den rein vesikulären Transport von Albumin unter physiologischen Bedingungen spricht. Die *Plasma Disappearance Rate* betrug in der Kontrollgruppe etwa 1% und ist Ausdruck des physiologischen Austauschs von Albumin zwischen intravasalem und extravasalem Kompartiment [61].

5.2.3.2 Die mikrovaskuläre Permeabilität im akuten Lungenschaden

BACHOFEN und WEIBEL [5] analysierten in einer elektronenmikroskopischen Studie die morphologischen Veränderungen des Gasaustauschapparates im Rahmen des sepsisinduzierten ARDS. Hierzu wurde Lungengewebe von neun Patienten, die in unterschiedlichen Stadien des ARDS verstorben waren, entnommen und anhand morphologischer Kriterien untersucht. Im initialen Stadium des Lungenschadens fanden sich vor allem ausgedehnte interstitielle und alveoläre Ödeme. Die Alveolarsepten waren aufgrund des interstitiellen Ödems verdickt, wobei ihre Architektur intakt zu sein schien. Das kapilläre Endothel war gut erhalten, teilweise

war es durch zytoplasmatische Schwellung oder große Vakuolen verbreitert. Endotheliale Lücken oder offene Zellverbindungen in der Endothelschicht konnten nicht gefunden werden. Die beschriebenen Veränderungen traten bei den untersuchten Patienten in zwei Fällen innerhalb von 24 Stunden, in einem Fall innerhalb von vier Tagen nach Beginn von respiratorischen Symptomen auf.

Den morphologischen Veränderungen im Rahmen des akuten Lungenschadens liegt pathogenetisch eine verstreute Infiltration von neutrophilen Granulozyten und die Freisetzung von inflammatorischen Mediatoren zu Grunde, die zu einer Permeabilitätssteigerung der alveolokapillären Membran und zur Extravasation proteinreicher Flüssigkeit führen [124]. Die Ansammlung von Ödemflüssigkeit innerhalb der alveolären Septen hat eine Zunahme der Diffusionsstrecke zwischen Alveolarraum und Kapillare und damit eine Störung des Gasaustausches zur Folge [124].

Für die Zunahme der mikrovaskulären Permeabilität gibt es grundsätzlich zwei mögliche Ursachen: 1. Eine Zunahme der parazellulären Permeabilität oder 2. eine Zunahme der transzellulären Permeabilität.

Einige Studien deuten darauf hin. dass mikrovaskulären einer Permeabilitätszunahme die Entstehung von interendothelialen Lücken zugrunde liegt [19, 57, 60, 66, 109]. Das generelle Konzept der inflammationsbedingten Lückenbildung etablierten Majno und Palade [60], die den Einfluss von Histamin und Serotonin auf die mikrovaskuläre Permeabilität nach subkutaner Injektion in den Cremaster-Muskel der Ratte untersuchten. Mittels elektronenmikroskopischer Aufnahmen konnten sie schon nach zwölf Minuten erste endotheliale Lücken und die interstitielle Anreicherung des verwendeten Plasmamarkers Quecksilbersulfid feststellen. Neuere Studien weisen darauf hin, dass hierbei ein Anstieg der zytosolischen Kalziumkonzentration zu einer Kontraktion der Endothelzellen und zur Öffnung von interzellulären Verbindungen führt [19, 57, 66, 109]. Die offenen Zellverbindungen geben eine plausible Erklärung für eine Steigerung des parazelluläre Transports für Makromoleküle im Rahmen der Inflammation. In einer elektronenmikroskopischen Analyse stellte sich die mikrovaskuläre Ultrastruktur bei erhöhter Extravasation von Makromolekülen jedoch normal dar [106]. Auch strukturelle Analysen des ARDS lieferten wiederholt keinen direkten Nachweis für interendotheliale Lücken [4, 5].

Für die elektronenmikroskopische Untersuchung der pulmonalen mikrovaskulären Permeabilität wurde in der vorliegenden Studie durch die intravenöse Applikation von Endotoxin über einen Zeitraum von zwei Stunden ein akuter Lungenschaden induziert. Ein Vergleich der hier vorliegenden elektronenmikroskopischen Ergebnisse mit den von Bachofen und Weibel [5] erhoben Befunden zeigt interessante Parallelen: Auf den untersuchten Abschnitten aus der NaCl-Gruppe stellte sich die Architektur der alveolokapillären Septen unter Endotoxineinfluss insgesamt gut erhalten und intakt dar. Die Endothelzellschicht war kontinuierlich und wies insbesondere keine offenen Zellverbindungen oder größere Lücken auf. Die Ergebnisse der vorliegenden Studie geben also analog zu den Untersuchungen von Bachofen und Weibel [5] keinen Hinweis auf die inflammatorisch bedingte Entstehung von interendothelialen Lücken im Rahmen des frühen akuten Lungenschadens.

In der NaCl-Gruppe fand sich weder im Interstitium des alveolokapillären Septums, noch in den Alveolarepithelzellen goldmarkiertes Kaninchen-Serumalbumin. Es konnte jedoch endotoxinbedingt eine signifikante Zunahme der alveolokapillären Septendicke gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt werden, die nicht durch eine interstitielle Verbreiterung, sondern durch die ödematöse Zunahme der Endothelzelldicke hervorgerufen wurde, während die Epithelzellen keine relevante Veränderung hinsichtlich der Dicke zeigten. Auch die *Plasma Disappearance Rate* war in der NaCl-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Die systemische Inflammation führte also zu einer Steigerung der endothelialen Permeabilität.

Anders als Bachofen und Weibel [5], die neben einem partiell verdickten Endothel auch ein interstitielles Ödem der alveolären Septen feststellen konnten, zeigen die vorliegenden Ergebnisse ausschließlich eine endotheliale Ödembildung. Eine mögliche Erklärung für die abweichenden Ergebnisse geben die Unterschiede hinsichtlich des Zeitraumes der Pathogenese, der in der vorliegenden Studie mit zwei Stunden deutlich kürzer war, als bei den verstorbenen Patienten, deren Lungengewebe von Bachofen und Weibel [5] untersucht wurde. Die initiale

Permeabilitätssteigerung der pulmonalen Kapillaren geht also möglicherweise von einer Veränderung der Durchlässigkeit der endothelialen Membran aus und ist nicht primär durch die Ausbildung von interendothelialen Lücken bedingt.

Es wurde außerdem eine signifikante Zunahme der Konzentration der freien Goldpartikel im Endothel, sowie eine vierfache Zunahme des Anteils freier Goldpartikel in der NaCl-Gruppe gegenüber der Kontrollgruppe festgestellt, während sich die Gesamtkonzentration der Goldpartikel im Endothel zwischen den Gruppen nicht unterschied. Im Zusammenhang mit der Zunahme der Endothelzelldicke, die mit einer ödematösen Schwellung vereinbar ist, kann ein verstärkter Einfluss der freien Goldpartikel im Sinne einer osmotischen Wirkung auf den Einstrom von Flüssigkeit in die Zelle angenommen werden. Goldpartikel, die von einer Vesikelmembran umschlossen in der Zelle vorliegen, wirken sich dementsprechend möglicherweise weniger oder kaum auf eine Ödembildung aus.

Hinweise auf die Ursache der endothelialen Ödementstehung gibt die Untersuchung des vesikulären Transports:

Hinsichtlich der Konzentration der goldtragenden Vesikel im Endothel konnte keine signifikante Veränderung im Zuge der systemischen Inflammation festgestellt werden, so dass eine Stimulation im Sinne einer Steigerung des vesikulären Makromolekülen unter inflammatorischem Transports von Einfluss nicht nachgewiesen werden konnte. In einer aktuellen Studie zeigte TIRUPPATHI et al. [110] in vitro nach vierstündiger Exposition mit Endotoxin eine fünffache Zunahme der Caveolin-1 Expression in Endothelzellen, sowie den 2,6-fachen Anstieg der Vesikelzahl. Diese Resultate sprechen für eine inflammatorisch bedingte Zunahme des vesikulären Transports. Eine mögliche Erklärung für die unterschiedlichen Ergebnisse gibt die ungleiche Form der Endotoxinexposition: Die Endothelzellen standen im Rahmen der in vitro Studie über vier Stunden in direktem Kontakt mit der Endotoxinlösung, während in der vorliegenden in vivo Studie eine intravenöse Endotoxinapplikation über zwei Stunden erfolgte, so dass hier von einer weniger starken Wirkung ausgegangen werden kann.

Es zeigte sich aber eine qualitative Veränderung der goldtragenden Vesikel: Der Durchmesser der goldtragenden Vesikel war in der NaCl-Gruppe signifikant höher als in der Kontrollgruppe, während die Goldpartikelkonzentration in den Vesikeln

signifikant abnahm. Sowohl der unter Endotoxineinfluss vergrößerte Durchmesser der goldtragenden Vesikel, als auch die verringerte Konzentration der Goldpartikel in den Vesikeln sind mit einem gesteigerten Wassertransport vereinbar, so dass ein Zusammenhang mit der ödematösen Veränderung der Endothelzelle nahe liegt. Auch die gesteigerte Konzentration freier Goldpartikel könnte in Verbindung mit der veränderten Vesikelqualität stehen. Möglicherweise führt die systemische Inflammation also zu einer Beeinträchtigung der Vesikelbildung, was die Abschnürung größerer, instabiler Vesikel, eine gesteigerte Mitnahme von Flüssigkeit, sowie die Freisetzung des Vesikelinhalts in das Zytoplasma und eine konsekutive Ödembildung der Endothelzelle zur Folge hat.

5.2.3.3 Einfluss von HES auf die mikrovaskuläre Permeabilität im akuten Lungenschaden

Erste Hinweise auf eine Beeinflussung der mikrovaskulären Permeabilität durch eine Volumensubstitution mit Hydroxyethylstärke gaben die Veröffentlichungen von ZIKRIA et al. [129, 130]. Es konnte unter experimentellen Bedingungen im Modell des verbrennungs- [129] und ischämieinduzierten [130] Endothelschadens Wadenmuskel der Ratte die Extravasation von Albumin, sowie die Ödembildung durch die Applikation von Hydroxyethylstärke reduziert werden. Die Ergebnisse anderer tierexperimenteller Studien lieferten weitere Belege für eine permeabilitätsmindernde Wirkung von Hydroxyethylstärke: Hydroxyethylstärke verringerte im Vergleich zu kristalloider Lösung die Extravasation von Fluorescein isothiocyanate (FITC) markiertem Dextran sowohl im Rahmen einer ischämischen [84], Cremastermuskels Ratte Schädigung des der als auch nach endotoxininduzierter mikrovaskulärer Permeabilitätssteigerung in einer dorsal präparierten Hautmuskelkammer beim Goldhamster [42]. Auch in vitro konnte Hydroxyethylstärke eine hypoxieinduzierte Steigerung der endothelialen Permeabilität senken [17]. Da die Zunahme mikrovaskulären Gefäßdurchlässigkeit in der Pathogenese des akuten Lungeschadens eine entscheidende Rolle spielt. ist die Untersuchung Einflusses des Hydroxyethylstärke auf die endotheliale Permeabilität in diesem Zusammenhang von besonderem Interesse. FENG et al. [23, 24, 25] riefen bei der Ratte durch die Ligation und Punktion des Zökums einen sepsisinduzierten Lungenschaden hervor. Die lichtmikroskopische Analyse zeigte, dass Hydroxyethylstärke 130/0,4 den Grad des

Lungenschadens deutlich verringerte. Gegenüber der Gruppe, die kristalloide Lösungen erhalten hatte, fand sich in der Hydroxyethylstärke-Gruppe weniger Ödembildung und alveoläre Stauung, sowie eine geringere Verdickung der alveolären Septen [23]. Im Einklang mit diesen Befunden konnte sowohl unter dem Einfluss von Hydroxyethylstärke 130/0,4 [23, 24, 25], als auch Hydroxyethylstärke 200/0,5 [107] eine Reduktion der pulmonalen kapillären Permeabilität, die mittels der Extravasation von Evans-blue-Färbung und der Berechnung des Quotienten aus Nass- und Trockengewicht (wet/dry weight ratio) bestimmt wurde, nachgewiesen werden. Neben diesen experimentellen Untersuchungen liegen die Ergebnisse einiger klinischer Studien vor: Allison et al. [3] untersuchten in einer randomisierten klinischen Studie an 45 Traumapatienten die Effekte einer Volumentherapie mit Hydroxyethylstärke oder Gelatine. Gegenüber den mit Gelatine behandelten Patienten zeigten die Patienten, die Hydroxyethylstärke erhalten hatten, einen verbesserten Gasaustausch und eine verminderte kapilläre Permeabilität, die anhand der Albuminexkretion im Urin bestimmt wurde. Analog stellten RITTOO et al. [93, 94] bei Patienten, die an einem abdominalen Aortenaneurysma operiert wurden, eine Verbesserung von Lungenfunktion und Gasaustausch, sowie eine Senkung der mikrovaskulären Permeabilität unter der Behandlung mit Hydroxyethylstärke im Vergleich zu Gelatine fest. Auch in einer kürzlichen Studie an 67 gefäß- und herzchirurgischen Patienten konnte Hydroxyethylstärke die pulmonale kapilläre Permeabilität verbessern [113].

Analog zu den aufgeführten Studien verhinderte die Applikation von Hydroxyethylstärke in der vorliegenden Studie die endotoxinbedingte Zunahme der Endothelzelldicke. Zudem unterschied sich die *Plasma Disappearance Rate* (PDR) in den HES-Gruppen nicht signifikant von der Kontrolle. In der HES 130-Gruppe war die PDR sogar signifikant geringer als in der NaCl-Gruppe. Unter dem Einfluss von Hydroxyethylstärke, insbesondere HES 130, kam es also zu einer Reduktion der endothelialen Permeabilität, die sich in einer verminderten Ödembildung zeigte.

der Übereinstimmung Trotz der oben Ergebnisse hatte genannten Hydroxyethylstärke in zwei tierexperimentellen Untersuchungen keine Auswirkung auf die Gefäßdurchlässigkeit: Ferrara et al. [26] untersuchten den Effekt von Hydroxyethylstärke (6% Pentafraction) auf die mikrovaskuläre Permeabilität für Makromoleküle Quotienten anhand des aus der Lymphund

Plasmaproteinkonzentration in einem Modell der thermischen Verletzung an den Hinterpfoten von Hunden. Die Kontrollgruppe erhielt keine Hydroxyethylstärke. Es konnte kein Unterschied zwischen den Gruppen festgestellt werden. Die Applikation von Hydroxyethylstärke erfolgte erst 30 Minuten nach Induktion des Schadens. Su et al. [105] verglichen die Wirkung von Hydroxyethylstärke (6% HES 130/0,4), Albumin, Ringerlösung und Gelatine an Schafen im Rahmen eines durch fäkale Peritonitis induzierten septischen Schocks. Zwar verbesserte Hydroxyethylstärke hämodynamische Parameter, eine positive Auswirkung auf Gasaustausch, Ödembildung oder Überleben ergab sich jedoch im Vergleich zu kristalloider Lösung nicht. Auch in dieser Studie wurde mit der Applikation der Lösungen erst vier Stunden nach Induktion des septischen Schocks begonnen, so dass zu diesem Zeitpunkt von einem hochgradigen kapillären Schaden ausgegangen werden kann. Möglicherweise hätte ein früherer Beginn der Infusion zu signifikanten Unterschieden geführt.

Durch welchen Mechanismus Hydroxyethylstärke die Durchlässigkeit von Gefäßen beeinflusst, ist bis heute nicht geklärt. Zur Diskussion steht, ob die aufgezeigten positiven Effekte von Hydroxyethylstärke auf eine spezifische Wirkung der Lösung oder auf die vorteilhaften hämodynamischen Auswirkungen der effektiveren Volumentherapie zurückzuführen sind. Ein makrohämodynamisches Monitoring gibt nur bedingt Aufschluss: Auch unter der Stabilität makrohämodynamischer Parameter wie arteriellen Blutdruck oder Herzzeitvolumen dem dem können mikrohämodynamische Schwankungen persistieren [116]. VINCENT [115] stellte die Hypothese auf, dass Hydroxyethylstärke nicht nur durch osmotische Kräfte auf die Permeabilität einwirkt, endotheliale sondern die Hydroxyethylstärkemoleküle schadhafte Stellen im Endothel "verstopfen" und somit auch direkt okklusiv wirken. Eine Wechselwirkung zwischen Hydroxyethylstärkemolekülen und der Glykokalyx ist hierbei denkbar. Die Glykokalyx, welche die luminale Seite des kapillären Endothels auskleidet, scheint zur Barrierefunktion des Endothels beizutragen, indem sie die Passage von Makromolekülen an die endotheliale Oberfläche verhindert [66]. Hierbei spielen die Ladungen der Moleküle eine wichtige Rolle, die mit der negativen Ladung der Glykokalyx interferieren. Es besteht die Möglichkeit, dass durch die Bindung von Makromolekülen die Struktur und Ladungsverteilung der Glykokalyx verändert und so die Permeabilität für Plasmaproteine wie Albumin beeinflusst wird [66]. Die

Ergebnisse mehrerer experimenteller Studien weisen auf eine antiinflammatorische Wirkkomponente von Hydroxyethylstärke hin: Sowohl in vitro [17, 36] als auch im Rahmen einer intravitalmikroskopischen Untersuchung in vivo [42] reduzierte Hydroxyethylstärke die Adhäsion von Leukozyten als Zeichen einer akuten Inflammation. Collis et al. [13] verglichen in einer in vitro Studie die Effekte von Hydroxyethylstärke und Albumin auf die Freisetzung des von Willebrand-Faktors (vWF) als Indikator der endothelialen Aktivierung nach Stimulation mit Endotoxin. Im Gegensatz zu Albumin verhinderte Hydroxyethylstärke dosisabhängig die vWF-Freisetzung. Eine Dämpfung der vWF-Plasmakonzentration im Sinne einer verringerten endothelialen Aktivierung konnte analog auch in einer klinischen Studie durch die Verwendung von Hydroxyethylstärke erreicht werden [94]. Die Analyse von proinflammatorischen Mediatoren, die im Zuge einer systemischen Entzündungsreaktion vermehrt exprimiert und freigesetzt werden, ergaben ebenfalls Anhaltspunkte für einen antiinflammatorischen Einfluss von Hydroxyethylstärke: Hydroxyethylstärke reduzierte in vivo die sepsisbedingte Zunahme von TNF-α, Interleukin-1 und Interleukin-6 und führte zu einer verminderten Aktivierung von NFκΒ [23, 24, 25, 59, 107, 108], wobei NF-κB ein ubiquitärer Transkriptionsfaktor ist, der die Expression von Genen steuert, die unter anderem für zahlreiche proinflammatorische Zytokine und Adhäsionsmoleküle kodieren [11]. Auch im Rahmen klinischer Studien senkte Hydroxyethylstärke im Vergleich zu kristalloiden die Plasmakonzentrationen Lösungen [8] und Gelatine [94] der Entzündungsparameter CRP und Interleukin-6. An der permeabilitätsmindernden Wirkung von Hydroxyethylstärke könnte also neben osmotischen Kräften und okklusiven Mechanismen auch eine Hemmung der Entzündungsreaktion beteiligt sein, die mit der Inhibition von NF-κB assoziiert ist. Ob Hydroxyethylstärke sich auch durch die Beeinflussung transzellulärer Transportmechanismen auf die endotheliale Permeabilität auswirkt ist bislang unbekannt. TIRUPPATHI et al. [110] zeigten in vitro, dass die Expression von Caveolin-1, und damit der vesikuläre Transport, ebenfalls durch den Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert wird, so dass eine Interaktion Hydroxyethylstärke, NF-κB und transzellulärem Transport nicht zwischen unwahrscheinlich ist.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von Hydroxyethylstärke auf die transzelluläre Extravasation von goldmarkiertem Albumin im frühen akuten

Lungenschaden elektronenmikroskopisch analysiert. Im Gegensatz zur NaCl-Gruppe, in der es endotoxinbedingt zu einer Zunahme der Konzentration und des Anteils der freien Goldpartikel im Endothel, einer Vergrößerung der goldtragenden Vesikel und einer Abnahme der Goldpartikelkonzentration in den Vesikeln kam, verhinderte Hydroxyethylstärke diese im Rahmen der Inflammation beobachteten Veränderungen. Die Konzentration der freien Goldpartikel war in beiden HES-Gruppen unverändert im Vergleich zur Kontrollgruppe. In der HES 130-Gruppe war der Anteil freier Goldpartikel sogar signifikant geringer als in der NaCl-Gruppe. Auch der Durchmesser der goldtragenden Vesikel unterschied sich hier nicht von der Kontrolle. Im Gegensatz zu HES 200/0,5 führte die Applikation von HES 130/0,4 gegenüber der NaCl-Gruppe zu einer signifikant höheren Goldpartikelkonzentration in den Vesikeln. Die Resultate der elektronenmikroskopischen Messungen weisen darauf hin, dass Hydroxyethylstärke im Vergleich zu rein kristalloider NaCl-Lösung einer Ödembildung im frühen akuten Lungenschaden entgegenwirkt, was möglicherweise in Zusammenhang mit einer Beeinflussung der Vesikelbildung steht. HES 130/0,4 scheint in höherem Maße als HES 200/0,5 den vesikulären Transport von Makromolekülen und Wasser zu beeinflussen, wobei eine endotoxinbedingte Vergrößerung der Vesikel, die gesteigerte Flüssigkeitsmitnahme und die Freisetzung des Vesikelinhalts in das Zytoplasma durch HES 130/0,4 verhindert wird. Das mittlere Molekulargewicht und der Substitutionsgrad der applizierten Hydroxyethylstärkelösung sind maßgebend für deren pharmakokinetisches Profil [123] und könnten von entscheidender Bedeutung für die protektive und therapeutische Wirksamkeit sein.

5.2.4 rt-PCR

Während des akuten Lungenschadens kommt es zu einer Schädigung des mikrovaskulären Endothels, die mit eine erhöhten Gefäßdurchlässigkeit einhergeht. Welche Bedeutung die transzellulären Permeabilitätsmechanismen in diesem Zusammenhang haben, ist bislang weitgehend unbekannt.

5.2.4.1 Expression von Aquaporin-1

Aquaporin-1 ist ein für das pulmonale Kapillarendothel typischer hochselektiver Wassermembrankanal [114]. Da er sowohl in der luminalen als auch in der abluminalen Endothelzellmembran exprimiert ist, stellt er einen transzellulären Passageweg für Wasser dar [66]. Da Aquaporin-1 den passiven Einstrom von Wasser in die Endothelzelle erleichtert, könnte eine vermehrte Expression zur Entwicklung eines Endothelzellödems beitragen.

TOWNE et al. [111] zeigten in ihrer Studie an Mäusen, dass es nach intratrachealer viraler Infektion zum Auftreten eines Lungenödems bei einer verminderten Expression von Aquaporin-1 kam. Ähnliche Ergebnisse erbrachte eine Studie von JIAO et al. [46], bei der ein akuter Lungenschaden bei Ratten mittels intratrachealer Endotoxinapplikation induziert wurde. Die Autoren vermuten einen Zusammenhang zwischen verminderter Aquaporin-1 Expression und Lungenödem.

In der vorliegenden Studie zeigte sich in der NaCl-Gruppe, in der elektronenmikroskopisch eine deutliche endotheliale Ödembildung nachgewiesen werden konnte, die Aquaporin-1 Expression unverändert gegenüber der Kontrolle. Lediglich in der HES 130-Gruppe, in der keine endotheliale Ödembildung auftrat, war die Expression signifikant geringer als in der NaCl-Gruppe.

Eine mögliche Erklärung für die von TOWNE [111] und JIAO [46] abweichenden Ergebnisse gibt der vollkommen unterschiedliche Studienaufbau: Die Induktion des Lungenschadens erfolgte in beiden Fällen von tracheal, zum einen durch virale Infektion, zum anderen durch Endotoxininstallation. Die Versuchsdauer war in beiden Studien deutlich länger als zwei Stunden. Zudem wurde das Lungenödem mittels wet/dry weight ratio quantifiziert, welche in der vorliegenden Studie keine signifikanten Ergebnisse erbrachte. Keine der beiden Studien führte funktionelle

Parameter des Gasaustausches auf. Ein Vergleich der Ergebnisse ist aus diesen Gründen nur sehr eingeschränkt möglich.

Der Einfluss der Inflammation auf die Expression von Aquaporin-1 und dessen Bedeutung für die pulmonale Ödembildung bleiben also weiterhin unklar. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass HES 130 die Aquaporin-1 Expression vermindert, was möglicherweise im Zusammenhang mit der permeabilitätsmindernden Wirkung steht.

5.2.4.2 Expression von Caveolin -1

Caveolin-1 stellt die Hauptproteinkomponente der endothelialen Vesikel dar, das für die Bildung von Vesikeln und damit für den vesikulären Transport essentiell ist [69, 70, 87, 88, 112]. Eine Veränderung der Caveolin-1 Expression kann deshalb auf eine Steigerung oder Verminderung des transendothelialen vesikulären Transports hinweisen.

Bis heute existieren nur wenige Studien, die eine mögliche Beteiligung des Transports an den Permeabilitätsveränderungen während Inflammation untersuchen. TIRUPPATHI et al. [110] zeigten kürzlich an humanen mikrovaskulären Lungenendothelzellen (HLMVEC), dass unter dem Einfluss von Endotoxin die durch den Transkriptionsfaktor NF-κB vermittelte Expression von Caveolin-1 um das fünffache des Ausgangswertes anstieg. Im Zuge dessen wurde mittels elektronenmikroskopischer Untersuchung der Zellen ein signifikanter Anstieg der Vesikelzahl festgestellt, der mit einer Zunahme der vesikelvermittelten Permeabilität für Albumin verbunden war. In einer vorhergehenden Studie der Arbeitsgruppe zeigten Caveolin-1-Knockout-Mäuse eine signifikante Reduktion des endotoxininduzierten Anstiegs der pulmonalen endothelialen Permeabilität, die anhand des kapillären Filtrationskoeffizienten und des Quotienten aus Nass- und Trockengewicht quantifiziert wurde [31]. Diese Ergebnisse sprechen für eine entzündungsbedingte Steigerung des vesikulären Transports und dessen Beteiligung an der Zunahme der endothelialen Permeabilität. Morphologische Studien, die den Einfluss einer systemischen Inflammation auf die transzelluläre Permeabilität des pulmonalen Endothels in vivo untersuchen, fehlen bislang.

Die Ergebnisse der vorliegenden Studie zeigten in der NaCl-Gruppe keine Veränderung der Caveolin-1 Expression gegenüber der Kontrolle. Dies könnte, wie schon oben bezüglich der Vesikelbildung erwähnt, durch das grundsätzlich andere

Studiendesign begründet sein. Jedoch führte die Applikation von HES 130 zu einer signifikant geringeren Caveolin-1 Expression als in der NaCl-Gruppe. In der oben genannten Studie zeigten TIRUPPATHI et al. [110] in vitro, dass die Expression von Caveolin-1, und damit der vesikuläre Transport, durch den Transkriptionsfaktor NF-κB reguliert wird. In einigen tierexperimentellen Studien hatte wiederum die Applikation von Hydroxyethylstärke eine verminderte Aktivierung von NF-κB zur Folge [23, 24, 25, 107, 108] Eventuell nimmt Hydroxyethylstärke also über den Transkriptionsfaktor NF-κB Einfluss auf die Expression von Caveolin-1 und damit auf den vesikulären Transport.

5.3 Bedeutung der Studie

Das Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS) als schwerste Form des akuten Lungenschadens ist eine häufige Komplikation septischer Krankheitsbilder. Bis heute existiert für diese häufige Erkrankung keine kausale Therapie und die Mortalität ist mit bis zu 60% erschreckend hoch. Ein wichtiger Pfeiler in der Therapie stellt eine adäquate Volumentherapie dar, die zu einer hämodynamischen Stabilität beitragen und gleichzeitig die mikrovaskuläre Integrität aufrechterhalten sollte, um einer Ödembildung entgegen zu wirken. Über die Art der Infusionstherapie besteht derzeit jedoch kein Konsens. Um zur Klärung dieser Frage beizutragen wurde im Rahmen der vorliegenden Studie die Auswirkung von Hydroxyethylstärke auf die mikrovaskuläre Permeabilität während des akuten Lungenschadens elektronenmikroskopisch untersucht. Zudem wurde erstmals der Einfluss von HES auf den endothelialen vesikulären Transport und damit neue Aspekte der mikrovaskulären Pathophysiologie untersucht.

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass Hydroxyethylstärke im Gegensatz zu kristalloider NaCl-Lösung während der systemischen Inflammation zu einer Verminderung der pulmonalen endothelialen Ödembildung führt. Zudem wirkte sich die Applikation von HES 130/0,4 auf den vesikulären Transports sowie auf die Expression von Caveolin-1 und Aquaporin-1 aus. Bislang fehlen morphologische Studien, die den Einfluss einer systemischen Inflammation auf vesikuläre Transportmechanismen in vivo untersuchen, so dass ein wissenschaftlicher Vergleich der Ergebnisse nicht möglich ist.

Der vesikuläre Transport ist ein wichtiges Element für die Regulation der endothelialen Barrierefunktion und ist möglicherweise an der Pathogenese verschiedener inflammatorischer und vaskulärer Erkrankungen beteiligt. Die Ergebnisse der Studie lassen vermuten, dass Hydroxyethylstärke sich modulatorisch auf den transendothelialen Transport auswirkt und damit möglicherweise zur Integrität der mikrovaskulären Barriere beiträgt. Eine weitere strukturelle und funktionelle Analyse der Veränderungen des transendothelialen Transports unter pathogenen und therapeutischen Einflüssen könnte daher von erheblicher klinischer Relevanz sein, um für Prophylaxe und Therapie des akuten Lungenschadens ein geeignetes Volumenersatzregime entwickeln zu können.

6 Zusammenfassung

Die Inzidenz und die Letalität systemischer inflammatorischer Erkrankungen sind in den vergangenen Jahren stetig gestiegen. Die Entwicklung eines Lungenschadens als lebensbedrohliche Komplikation im Rahmen eines akuten Multiorganversagens steht dabei häufig im Vordergrund. In der Initialphase einer systemischen Inflammation kommt es zu einer generalisierten und pulmonalen Extravasation von Makromolekülen und Wasser. Hieraus resultiert ein therapiepflichtiger intravaskulärer Volumenmangel. Eine effektive Volumentherapie, die intravaskulären Volumenstatus, die hämodynamische Stabilität und die pulmonale mikrovaskuläre Integrität aufrechterhält, ist ein wesentliches Therapieziel und von klinischer Relevanz. Die Rolle des transzellulären Transportes von Makromolekülen während der Frühphase des akuten Lungenschadens sowie der Einfluss von Hydroxyethylstärke (HES) darauf sind bisher unklar.

Hypothese der Studie war, dass inflammationsbedingt die Extravasation von Albumin infolge eines gesteigerten transendothelialen vesikulären Transportes zunimmt und hieraus eine endotheliale Ödembildung und damit eine Verschlechterung des Gasaustausches resultiert. Die Applikation von Hydroxyethylstärke zur Volumentherapie könnte die endotheliale Permeabilität und pulmonale Ödembildung reduzieren und so den Gasaustausch verbessern.

Ziel der Studie war die Untersuchung des Einflusses von Hydroxyethylstärke (6% HES 130/0,4 und 10% HES 200/0,5) während des frühen akuten Lungenschadens *in vivo* auf die endotheliale Permeabilität, die pulmonale Ödembildung, die Expression von Caveolin-1 (Cav-1) und Aquaporin-1 (AQP-1), die für die endotheliale Vesikelbildung und den Transport von Wasser von Bedeutung sind, sowie auf den Gasaustausch.

Für die Versuche wurde bei weißen Neuseeländer Kaninchen durch Endotoxinapplikation ein akuter Lungenschaden induziert und goldmarkiertes Albumin als elektronenmikroskopischer Permeabilitätsmarker appliziert. Die Einteilung der Versuchstiere erfolgte bei erfüllten definierten Einschlusskriterien randomisiert in (1) die Kontrollgruppe, (2) die NaCl-Gruppe, (3) die HES 130-Gruppe

und (4) die HES 200-Gruppe. Während der gesamten Versuchsdauer von zwei Stunden wurde eine frühe und zielgerichtete Volumentherapie zur Stabilisierung der makrohämodynamischen Parameter durchgeführt. Anhand der elektronenmikroskopischen Bilder erfolgte die Untersuchung der alveolokapillären Septen, sowie der Extravasation des goldmarkierten Albumins. Die Expression von Caveolin-1 und Aquaporin-1 wurde mittels rt-PCR untersucht.

Im Rahmen der vorliegenden Studie konnten folgende Ergebnisse erzielt werden:

- Im Rahmen der durchgeführten zielgerichteten Volumentherapie lagen alle gemessenen makrohämodynamischen Parameter über den gesamten Versuchszeitraum im physiologischen Bereich.
- 2. Nach einer Versuchsdauer von zwei Stunden kam es unter Endotoxineinfluss in der NaCl-Gruppe zu einer deutlichen Verschlechterung des Gasaustauschs. Hier war die alveolo-arterielle Sauerstoffdifferenz (AaDO₂) signifikant gegenüber der Kontrollgruppe erhöht. Die Applikation von HES 130 führte zu einer Verbesserung des Gasaustausches, so dass die AaDO₂ nach zwei Stunden im Normbereich lag.
- 3. Die *Plasma Disappearance Rate* (PDR) als Maß für die Extravasation des goldmarkierten Albumins und damit für die endotheliale Permeabilität nahm im Rahmen der Endotoxinämie in der NaCl-Gruppe signifikant gegenüber der Kontrollgruppe zu, während die Volumentherapie mit HES 130 diese Permeabilitätszunahme verhinderte.
- 4. Als Zeichen einer pulmonalen Ödembildung führte die Endotoxinapplikation in der NaCl-Gruppe zu einer deutlichen Verbreiterung der alveolokapillären Septen, die durch eine Endothelzellschwellung bedingt wurde. Die Volumentherapie mit HES verhinderte die endotheliale Ödembildung.
- 5. Ausgehend von der Hypothese, dass frei im Endothel vorliegende Makromoleküle sich stärker auf eine endotheliale Ödembildung auswirken, als in Vesikeln vorliegende Partikel, wurde die Konzentration freier Goldpartikel, sowie ihr Anteil an den gesamten Partikeln im Endothel bestimmt. Parallel zu der Zunahme der Endothelzelldicke kam es in der NaCl-Gruppe während der Endotoxinämie sowohl zu einer deutlichen Zunahme der Konzentration, als auch des Anteils freier

Goldpartikel im Endothel. Insbesondere HES 130 verminderte den Anteil frei vorliegender Partikel.

- 6. Die Goldpartikelkonzentration in den goldtragenden Vesikeln wurde aus der Anzahl der transportierten Partikel im Verhältnis zur Vesikelgröße berechnet. Sie lässt folglich Rückschlüsse auf die Konzentrationsfähigkeit der Endozytosemechanismen und damit indirekt auf die ins Endothel aufgenommene Flüssigkeit als entscheidender Faktor der endothelialen Ödembildung zu. Endotoxinämie nahm die Goldpartikelkonzentration in Während der den Vesikel in der NaCl-Gruppe signifikant goldtragenden gegenüber der Kontrollgruppe ab. Die Volumentherapie mit HES 130 verhinderte hingegen die Abnahme der Goldpartikelkonzentration in den goldtragenden Vesikeln.
- 7. Caveolin-1 stellt die Hauptproteinkomponente der endothelialen Transportvesikel dar. Die Applikation von HES 130 führte gegenüber der NaCl-Gruppe zu einer Reduktion der Expression von Caveolin-1. Dies könnte folglich eine Verminderung des transendothelialen Transportes bewirken.
- 8. Analog zur Reduktion der endothelialen Zellschwellung führte die Volumentherapie mit HES 130 gegenüber NaCl zu einer Verminderung der Expression des wasserspezifischen Membrankanals Aquaporin-1. Dies könnte ursächlich für die nachgewiesene reduzierte endotheliale Ödembildung in der HES 130 Gruppe sein.

Schlussfolgernd zeigen die Ergebnisse, dass eine rein kristalloide Volumensubstitution während der Initialphase einer systemischen Inflammation zu einer gesteigerten endothelialen Ödembildung führt. Ursächlich könnten ein kolloidosmotischer Gradient durch die Extravasation von Makromolekülen sowie ein gesteigerter vesikulärer Flüssigkeitstransport sein. Die Applikation von Hydroxyethylstärke reduziert im Gegensatz dazu die pulmonale endotheliale Permeabilität und Ödembildung während der systemischen Inflammation. HES 130/0,4 scheint im Gegensatz zu HES 200/0,5 den vesikulären Transport von Flüssigkeit zu reduzieren und nimmt in diesem Zusammenhang Einfluss auf die Expression von Caveolin-1 und Aquaporin-1. Die molekulare Struktur der applizierten HES-Lösung könnte folglich von entscheidender Bedeutung für die Stabilität der endothelialen Barriere während entzündlicher und septischer Krankheitsbilder sein.

7 Literaturverzeichnis

- Human albumin administration in critically ill patients: systematic review of randomised controlled trials. Cochrane Injuries Group Albumin Reviewers. BMJ 317: 235-240, 1998.
- 2. Alderson P, Bunn F, Lefebvre C, Li WP, Li L, Roberts I, Schierhout G. Human albumin solution for resuscitation and volume expansion in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev* CD001208, 2004.
- 3. Allison KP, Gosling P, Jones S, Pallister I, Porter KM. Randomized trial of hydroxyethyl starch versus gelatine for trauma resuscitation. *J Trauma* 47: 1114–1121, 1999.
- 4. Anderson WR, Thielen K. Correlative study of adult respiratory distress syndrome by light, scanning, and transmission electron microscopy. *Ultrastruct Pathol* 16: 615-628, 1992.
- 5. Bachofen M, Weibel ER. Alterations of the gas exchange apparatus in adult respiratory insufficiency associated with septicemia. *Am Rev Respir Dis* 116: 589-615, 1977.
- 6. Barron ME, Wilkes MM, Navickis RJ. A systematic review of the comparative safety of colloids. *Arch Surg* 139: 552-563, 2004.
- 7. Bayer A. Inhalation von Stickstoffmonoxid: Einfluss auf die Thrombozytenkinetik in der pulmonalen Mikrozirkulation. *Med. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*, 2004.
- 8. Boldt J, Ducke M, Kumle B, Papsdorf M, Zurmeyer EL. Influence of different volume replacement strategies on inflammation and endothelial activation in the elderly undergoing major abdominal surgery. *Intensive Care Med* 30: 416–422, 2004.
- Brunkhorst FM, Engel C, Bloos F, Meier-Hellmann A, Ragaller M, Weiler N, Moerer O, Gruendling M, Oppert M, Grond S, Olthoff D, Jaschinski U, John S, Rossaint R, Welte T, Schaefer M, Kern P, Kuhnt E, Kiehntopf M, Hartog C, Natanson C, Loeffler M, Reinhart K; German Competence Network Sepsis (SepNet). Intensive insulin therapy and pentastarch resuscitation in severe sepsis. N Engl J Med 358: 125-139, 2008.
- Carter MB, Wilson MA, Wead WB, Garrison RN.Pentoxifylline attenuates pulmonary macromolecular leakage after intestinal ischemia-reperfusion. Abstract. Arch Surg 130: 1337-1344, 1995.
- Chantry-Darmon C, Rogel-Gaillard C, Bertaud M, Urien C, Perrocheau M, Chardon P, Haves H. 133 new gene localizations on the rabbit cytogenetic map. Cytogenet Genome Res 103: 192-201, 2003.

- Chen F, Castranova V, Shi X, Demers LM. New insights into the role of nuclear factor-κB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases. *Clin Chem* 45: 7-17, 1999.
- 13. Collis RE, Collins PW, Gutteridge CN, Kaul A, Newland AC, Williams DM et al. The effect of hydroxyethyl starch and other plasma volume substitutes on endothelial cell activation; an in vitro study. *Intensive Care Med* 20: 37–41, 1994.
- 14. Davidson IJ. Renal impact of fluid management with colloids: a comparative review. *Eur J Anaesthesiol* 23: 721-738, 2006.
- Dellinger RP, Levy MM, Carlet JM, Bion J, Parker MM, Jaeschke R, Reinhart K, Angus DC et al. Surviving Sepsis Campaign: international guidelines for management of severe sepsis and septic shock: 2008. Crit Care Med 36: 296-327, 2008.
- Demling RH. Acute Respiratory Distress Syndrome (ARDS). In: Shepro D (ed) Microvascular Research Biology and Pathology. Elsevier Academic Press, USA, Vol I, Ch. 92, 611-616, 2006.
- 17. Dieterich HJ, Weissmuller T, Rosenberger P, Eltzschig HK. Effect of hydroxyethyl starch on vascular leak syndrome and neutrophil accumulation during hypoxia. Crit Care Med 34: 1775–1782, 2006.
- 18. Doyle RL, Szaflarski N, Modin GW, Wiener-Kronisch JP, Matthay MA. Identification of patients with acute lung injury: predictors of mortality. *Am J Respir Crit Care Med* 157: 1818-1824, 1995.
- 19. Dudek SM and Garcia JG. Cytoskeletal regulation of pulmonary vascular permeability. *J Appl Physiol* 91: 1487–1500, 2001.
- 20. Fegler G. Measurement of cardiac output in anaesthetized animals by a thermo-dilution method. Q *J Exp Physiol* 39: 153-164, 1954.
- 21. Fehrenbach A, Fehrenbach H, Wittwer T, Ochs M, Wahlers T, Richter J. Evaluation of pulmonary edema: stereological versus gravimetrical analysis. *Eur Surg Res* 33: 270-278, 2001.
- Fein AM, Lippmann M, Holtzman H, Eliraz A, Goldberg SK. The risk factors, incidence, and prognosis of ARDS following septicemia. *Chest* 83: 40-42, 1983.
- 23. Feng X, Liu J, Yu M, Zhu S, Xu J. Hydroxyethyl starch, but not modified fluid gelatine, affects inflammatory response in a rat model of polymicrobial sepsis with capillary leakage. *Anesth Analg* 104: 624-630, 2007.
- Feng X, Ren B, Xie W, Huang Z, Liu J, Guan R, Duan M, Xu J. Influence of hydroxyethyl starch 130/0.4 in pulmonary neutrophil recruitment and acute lung injury during polymicrobial sepsis in rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 50: 1081-1088, 2006.

- 25. Feng X, Yan W, Liu X, Duan M, Zhang X, Xu J. Effects of hydroxyethyl starch 130/0.4 on pulmonary capillary leakage and cytokines production and NF-κB activation in CLP-induced sepsis in rats. *J Surg Res* 135: 129-136, 2006.
- 26. Ferrara JJ, Dyess DL, Collins JN, Fish JM, Ardell JL, Townsley MI, Taylor AE, Flint LM. Effects of pentafraction administration on microvascular permeability alterations induced by graded thermal injury. *Surgery* 115: 182-189, 1994.
- 27. Finfer S, Bellomo R, Boyce N, French J, Myburgh J, Norton R. A comparison of albumin and saline for fluid resuscitation in the intensive care unit. *N Engl J Med* 350: 2247-2256, 2004.
- 28. Fingar VH, Taber SW, Wieman TJ. A new model for the study of pulmonary microcirculation: determination of pulmonary edema in rats. *J Surg Res* 57: 385-393, 1994.
- 29. Folkesson HG, Nitenberg G, Oliver BL, Jayr C, Albertine KH, Matthay MA. Upregulation of alveolar epithelial fluid transport after subacute lung injury in rats from bleomycin. *Am J Physiol* 275: L478-490, 1998.
- 30. Gardinali M, Borrelli E, Chiara O, Lundberg C, Padalino P, Conciato L, Cafaro C, Lazzi S, Luzi P, Giomarelli PP, Agostoni A. Inhibition of CD11-CD18 complex prevents acute lung injury and reduces mortality after peritonitis in rabbits. *Am J Respir Crit Care Med* 161: 1022-1029, 2000.
- 31. Garrean S, Gao XP, Brovkovych V, Shimizu J, Zhao YY, Vogel SM, Malik AB. Caveolin-1 regulates NF-kappaB activation and lung inflammatory response to sepsis induced by lipopolysaccharide. *J Immunol* 177: 4853-4860, 2006.
- 32. Ghitescu L, Fixman A, Simionescu M, and Simionescu N. Specific binding sites for albumin restricted to plasmalemmal vesicles of continuous capillary endothelium: receptor mediated transcytosis. *J Cell Biol* 102: 1304–1311, 1986.
- 33. Ghosh S, Latimer RD, Gray BM, Harwood RJ, Oduro A. Endotoxin-induced organ injury. *Crit Care Med* 21: 19-24, 1993.
- 34. Goss CH, Brower RG, Hudson LD, Rubenfeld GD, ARDS Network. Incidence of acute lung injury in the United States. *Crit Care Med* 2003; 31: 1607–1611, 2003.
- 35. Guidet B, Barakett V, Vassal T, Petit JC, Offenstadt G. Endotoxemia and bacteremia in patients with sepsis syndrome in the intensive care unit. *Chest* 106: 1194-1201, 1994.
- Handrigan MT, Burns AR, Donnachie EM, Bowden RA. Hydroxyethyl starch inhibits neutrophil adhesion and transendothelial migration. Shock 24: 434 – 439, 2005.

- 37. Hasting RH, Folkesson HG, Petersen V, Ciriales R, Matthay MA. Cellular uptake of albumin from lungs of anesthetized rabbits. *Am J Physiol* 269: L453-L462,1995.
- 38. Heckel K. In vivo Analyse des Einflusses der Poly-(ADP-Ribosyl)-Synthetase (PARS) auf die Pathogenese des Endotoxin-induzierten akuten Lungenschadens. *Med. Dissertation, Ludwig-Maximilians-Universität München*, 2004.
- 39. Heckel K, Kiefmann R, Dörger M, Stoeckelhuber M, Goetz AE. Colloidal gold particles as a new in vivo marker of early acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 287: L867-L878, 2004.
- 40. Hellyer PW, Meyer RE, Olson NC. Resuscitation of anesthetized endotoxemic pigs by use of hypertonic saline solution containing dextran. *Am J Vet Res* 54: 280-286, 1993.
- 41. Hof H, Dörries R. Medizinische Mikrobiologie. Thieme, Stuttgart, 3. Aufl., p 275, 2005.
- 42. Hoffmann JN, Vollmar B, Laschke MW, Inthorn D, Schildberg FW, Menger MD. Hydroxyethyl starch (130 kD), but not crystalloid volume support, improves microcirculation during normotensive endotoxemia. *Anesthesiology* 97: 460–470, 2002.
- 43. Horisberger M and Rosset J. Colloidal gold, a useful marker for transmission and scanning electron microscopy. *J Histochem Cytochem* 25: 295–305, 1977.
- 44. Hu G, Place AT, Minshall RD. Regulation of endothelial permeability by Src kinase signaling: Vascular leakage versus transcellular transport of drugs and macromolecules. *Chem Biol Interact* 171: 177-189, 2008.
- 45. Jenkins RG, Su X, Su G, Scotton CJ, Camerer E, Laurent GJ, Davis GE, Chambers RC, Matthay MA, Sheppard D. Ligation of protease-activated receptor 1 enhances alpha(v)beta6 integrin-dependent TGF-beta activation and promotes acute lung injury. *J Clin Invest* 116: 1606-1614, 2006.
- 46. Jiao G, Li E, Yu R. Decreased expression of AQP1 and AQP5 in acute injured lungs in rats. *Chin Med J (Engl)* 115: 963-967, 2002.
- 47. John TA, Vogel SM, Tiruppathi C, Malik AB, Minshall RD. Quantitative analysis of albumin uptake and transport in the rat microvessel endothelial monolayer. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 284: L187–L196, 2003.
- 48. Kehle T, Herzog V. Interactions between protein-gold complexes and cell surfaces: a method for precise quantitation. *Eur J Cell Biol* 45: 80-87, 1987.
- 49. Kern JW, Shoemaker WC. Meta-analysis of hemodynamic optimization in high-risk patients. *Crit Care Med* 30:1686-1692, 2002.

- 50. Kiefmann R, Heckel K, Schenkat S, Dörger M, Goetz AE. Role of P-Selectin in platelet sequestration in pulmonary capillaries during endotoxemia. *J Vasc Res* 43: 473-481, 2006.
- 51. Klinzing S, Lesser T, Schubert H, Bartel M, Klein U. Wet-to-dry ratio of lung tissue and surfactant outwash after one-lung flooding. *Res Exp Med* 200: 27-33, 2000.
- König MF, Lucocq JM, Weibel ER. Demonstration of pulmonary vascular perfusion by electron and light microscopy. *J Appl Physiol* 75: 1877-1883, 1993.
- 53. Koshika T, Ishizaka A, Nagatomi I, Sudo Y, Hasegawa N, Goto T. Pretreatment with FK506 improves survival rate and gas exchange in canine model of acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med* 163: 79-84, 2001.
- 54. Kuhnle GE, Kiefmann R, Sckell A, Kuebler WM, Groh J, Goetz AE. Leukocyte sequestration in pulmonary microvessels and lung injury following systemic complement activation in rabbits. *J Vasc Res* 36: 289-298, 1999.
- 55. Liu HM, Zhao XF, Guo LN, Tan Z, Wang TH. Effects of caveolin-1 on the 17beta-estradiol-mediated inhibition of VSMC proliferation induced by vascular injury. *Life Sci* 80: 800-812, 2007.
- 56. Luh S, Chiang C. Acute lung injury / acute respiratory distress syndrome (ALI / ARDS): the mechanism, present strategies and future perspectives of therapies. *J Zhejiang Univ Sci B* 8: 60-69, 2007.
- 57. Lum H, Malik AB. Regulation of vascular endothelial barrier function. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 267: L223–L241, 1994.
- 58. Lum H, Malik AB. Mechanisms of increased endothelial permeability. *Can J Physiol Pharmacol* 74: 787–800, 1996.
- Lv R, Zhou W, Zhang LD, Xu JG. Effects of hydroxyethyl starch on hepatic production of cytokines and activation of transcription factors in lipopolysaccharide-administered rats. *Acta Anaesthesiol Scand* 49: 635–642, 2005.
- 60. Majno G, Palade GE. Studies on inflammation. 1. The effect of histamine and serotonin on vascular permeability: an electron microscopic study. *J Biophys Biochem Cytol* 11: 571–605, 1961.
- 61. Margarson MP, Soni NC. Effects of albumin supplementation on microvascular permeability in septic patients. *J Appl Physiol* 92: 2139-2145, 2002.
- 62. Marx G, Pedder S, Smith L, Swaraj S, Grime S, Stockdale H, Leuwer M. Resuscitation from septic shock with capillary leakage: Hydroxyethyl starch (130 KD), but not Ringer's solution maintains plasma volume and systemic oxygenation. *Shock* 21: 336-341, 2004.

- 63. Marx G, Pedder S, Smith L, Swaraj S, Grime S, Stockdale H, Leuwer M. Attenuation of capillary leakage by hydroxyethyl starch (130/0.42) in a porcine model of septic shock. *Crit Care Med* 34: 3005-3010, 2006.
- 64. Matthay MA, Zimmerman GA, Esmon C, Bhattacharya J, Coller B, Doerschuk CM, Floros J, Gimbrone MA Jr, Hoffman E, Hubmayr RD, Leppert M, Matalon S, Munford R, Parsons P, Slutsky AS, Tracey KJ, Ward P, Gail DB, Harabin AL. Future research directions in acute lung injury: summary of a National Heart, Lung, and Blood Institute working group. Am J Respir Crit Care Med 167: 1027-1035, 2003.
- 65. McCormack DG, Mehta S, Tyml K, Scott JA, Potter R, Rohan M. Pulmonary microvascular changes during sepsis: evaluation using intravital videomicroscopy. *Microvasc Res* 60: 131-140, 2000.
- 66. Metha D, Malik AB. Signaling mechanisms regulating endothelial permeability. *Physiol Rev* 86: 279-367, 2006.
- 67. Mikawa K, Maekawa N, Nishina K, Takao Y, Yaku H, Obara H. Effect of lidocaine pretreatment on endotoxin-induced lung injury in rabbits. Anesthesiology 81: 689-699, 1994.
- 68. Milici AJ, Watrous NE, Stukenbrok H, and Palade GE. Transcytosis of albumin in capillary endothelium. *J Cell Biol* 105: 2603–2612, 1987.
- 69. Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, and Malik AB. Vesicle formation and trafficking in endothelial cells and regulation of endothelial barrier function. *Histochem Cell Biol* 117: 105–112, 2002.
- 70. Minshall RD, Tiruppathi C, Vogel SM, Niles WD, Gilchrist A, Hamm HE, and Malik AB. Endothelial cell-surface gp60 activates vesicle formation and trafficking via G(i)-coupled Src kinase signaling pathway. *J Cell Biol* 150: 1057–1070, 2000.
- 71. Miotla JM, Jeffery PK, Hellewell PG. Platelet-activating factor plays a pivotal role in the induction of experimental lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 18: 197-204, 1998.
- 72. Mitsuoka H, Sakurai T, Unno N, Kaneko H, Suzuki S, Nakamura S, Baba S, Terakawa S. Intravital laser confocal microscopy of pulmonary edema resulting from intestinal ischemia-reperfusion injury in the rat. *Crit Care Med* 27: 1862-1868, 1999.
- 73. Moats RK, Ramirez VD. Electron microscopic visualization of membranemediated uptake and translocation of estrogen-BSA:colloidal gold by hep G2 cells. *J Endocrinol* 166: 631-647, 2000.
- 74. Murakami K, Bjertnaes LJ, Schmalstieg FC, McGuire R, Cox RA, Hawkins H, Herndon Dn, Traber LD, Traber DL. A novel animal model of sepsis after acute lung injury in sheep. *Crit Care Med* 30: 2083-2090, 2002.

- 75. Murakami K, Traber DL. Microvascular Responses to Acute Lung Injury. In: Shepro D (ed) Microvascular Research Biology and Pathology. Elsevier Academic Press, USA, Vol I, Ch. 124, 835-839, 2006.
- Nakagawa M, Ohgami M, Ando N, Wakabayashi G, Kitajima M. Effects of steroids on the lung accumulation of neutrophil and monocyte in rabbits with endotoxemia. Chest 109: 1339-1345, 1996.
- 77. Nathens AB, Bitar R, Davreux C, Bujard M, Marshall JC, Dackiw AP, Watson RW, Rotstein OD. Pyrrolidine dithiocarbamate attenuates endotoxin-induced acute lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 17: 608-616, 1997.
- 78. National Research Council, I. o. L. A. R., Commission on Life Sciences. Guide for the Care and Use of Laboratory Animals. *National Academy Press, Washington, D.C.*; 1996.
- Natsu-Ume T, Majima T, Reno C, Shrive NG, Frank CB, Hart DA. Menisci of the rabbit knee require mechanical loading to maintain homeostasis: cyclic hydrostatic compression in vitro prevents derepression of catabolic genes. *J Orthop Sci* 10: 396-405, 2005.
- 80. Nishimura T, Nakano T. Nuclear localization of gold labeled-hydrocortisone-bovine serum albumin conjugate injected intravenously into the hormone-target cells of rat. *Cell Struct Funct* 24: 227-235, 1999.
- 81. Nolan J. Fluid resuscitation for the trauma patient. *Resuscitation* 48: 57-69, 2001.
- 82. Olson NC, Kruse-Elliott KT, Johnson L. Effect of LY171883 on endotoxin-induced lung injury in pigs. *J Appl Physiol* 260: H1455-1465, 1991.
- 83. Olson NC, Salzer WL, McCall CE. Biochemical, physiological and clinical aspects of endotoxemia. *Mol Aspects Med* 10: 511-629, 1988.
- 84. Oz MC, Fitzpatrick MF, Zikria BA, Pinsky DJ, Duran WN. Attenuation of microvascular permeability dysfunction in postischemic striated muscle by hydroxyethyl starch. *Microvasc Res* 50: 71–79, 1995.
- 85. Parker JC, Townsley MI. Evaluation of lung injury in rats and mice. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 286: L231–L246, 2004.
- 86. Perel P, Roberts I. Colloids versus crystalloids for fluid resuscitation in critically ill patients. *Cochrane Database Syst Rev* 17: CD000567, 2007.
- 87. Predescu D, Palade GE. Plasmalemmal vesicles represent the large pore system of continuous microvascular endothelium. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 265: H725–H733, 1993.
- 88. Predescu SA, Predescu DN, Malik AB. Molecular determinants of endothelial transcytosis and their role in endothelial permeability. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 293: L823–L842, 2007.

- 89. Pugin J, Verghese G, Widmer M-C, Matthay MA. The alveolar space is the site of intense inflammatory and profibrotic reactions in the early phase of acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med* 27: 304-312, 1999.
- 90. Ratto G, Toma S, Civalleri D, Passerone GC, Esposito M, Zaccheo D, Canepa M, Romano P, Palumbo R, De Cian F, Scarano F, Vannozzi M, Spessa E, Fantino G. Isolated lung perfusion with platinum in the treatment of pulmonary metastases from soft tissue sarcomas. *J Thorac Cardiovasc Surg* 112: 614-622, 1996.
- 91. Remick DG, Ward PA. Evaluation of Endotoxin models for the study of sepsis. *Shock* 24: 7-11, 2005.
- 92. Rittoo D, Gosling P, Bonnici C, Burnley S, Millns P, Simms MH, Smith SR, Vohra RK. Splanchnic oxygenation in patients undergoing abdominal aortic aneurysm repair and volume expansion with eloHAES. *Cardiovasc Surg* 10:128-133, 2002.
- 93. Rittoo D, Gosling P, Burnley S, Bonnici C, Millns P, Simms MH, Smith SRG, Vohra RK. Randomized study comparing the effects of hydroxyethyl starch solution with Gelofusine on pulmonary function in patients undergoing abdominal aortic aneurysm surgery. *Br J Anaesth* 92: 61-66, 2004.
- 94. Rittoo D, Gosling P, Simms MH, Smith SRG, Vohra RK. The effects of hydroxyethyl starch solution compared with gelofusine on activated endothelium and the systemic inflammatory response following aortic aneurysm repair. *Eur J Vasc Endovasc Surg* 30: 520-524, 2005.
- 95. Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock. *N Engl J Med* 345: 1368-1377, 2001.
- 96. Robriquet L, Collet F, Tournoys A, Prangère T, Nevière R, Fourrier F, Guery BP. Intravenous administration of activated protein C in Pseudomonas-induced lung injury: impact on lung fluid balance and the inflammatory response. *Respir Res* 7: 41, 2006.
- 97. Rubenfeld GD, Caldwell E, Peabody E, Weaver J, Martin DP, Neff M, Stern EJ, Hudson LD. Incidence and outcomes of acute lung injury. *N Engl J Med* 353: 1685-1693, 2005.
- 98. Sakr Y, Payen D, Reinhart K, Sipmann FS, Zavala E, Bewley J, Marx G, Vincent JL. Effects of hydroxyethyl starch administration on renal function in critically ill patients. *Br J Anaesth* 98: 216-224, 2007.
- 99. Schnitzer JE. Gp60 is an albumin-binding glycoprotein expressed by continuous endothelium involved in albumin transcytosis. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 262: H246-H254, 1992.

- 100. Schortgen F, Girou E, Deye N, Brochard L; CRYCO Study Group. The risk associated with hyperoncotic colloids in patients with shock. *Intensive Care Med* 34: 2157-2168, 2008.
- 101. Schubert W, Frank PG, Razani B, Park DS, Chow C, Lisanti MP. Caveolae-deficient endothelial cells show defects in the uptake and transport of albumin in vivo. *J Biol Chem* 276: 48619-48622, 2001.
- 102. Schuller D, Mitchell JP, Calandrino FS, Schuster DP. Fluid balance during pulmonary edema. Is fluid gain a marker or a cause of poor outcome? *Chest* 100: 1068-1075, 1991.
- 103. Sloane PJ, Gee MH, Gottlieb JE, Albertine KH, Peters SP, Burns JR, Machiedo G, Fish JE. A multicenter registry of patients with acute respiratory distress syndrome. Physiology and outcome. *Am Rev Respir Dis* 146: 419-426, 1992.
- 104. Stewart GN. Researches on the circulation time and on the influences which offset it. IV. The output of the heart. *J Physiol* 22: 159-183, 1897.
- 105. Su F, Wang Z, Cai Y, Rogiers P, Vincent JL. Fluid resuscitation in severe sepsis and septic shock: albumin, hydroxyethyl starch, gelatin or ringer's lactate-does it really make a difference? *Shock* 27: 520-526, 2007.
- 106. Suval WD, Duran WN, Boric MP, Hobson RW, Berendsen PB, Ritter AB. Microvascular transport and endothelial cell alterations preceding skeletal muscle damage in ischemia and reperfusion injury. Am J Surg 154: 211–218, 1987.
- 107. Tian J, Lin X, Guan R, Xu JG. The effects of hydroxyethyl starch on lung capillary permeability in endotoxic rats and possible mechanisms. *Anesth Analg* 98: 768 –74, 2004.
- 108. Tian J, Lin X, Li YH, Xu JG. Influence of hydroxyethyl starch on lipopolysaccharide-induced tissue nuclear factor kappa B activation and systemic TNF-alpha expression. Acta Anaesthesiol Scand 49: 1311–1317, 2005.
- 109. Tiruppathi C, Minshall RD, Paria BC, Vogel SM, and Malik AB. Role of Ca2_signaling in the regulation of endothelial permeability. *Vasc Pharmacol* 39: 173–185, 2002.
- 110. Tiruppathi C, Shimizu J, Miyawaki-Shimizu K, Vogel SM, Bair AM, Minshall RD, Predescu D, Malik AB. Role of NF-kB-dependent caveolin-1 expression in the mechanism of increased endothelial permeability induced by LPS. *J Biol Chem* 283: 4210-4218, 2008.
- 111. Towne JE, Harrod KS, Krane CM, Menon AG. Decreased expression of aquaporin (AQP)1 and AQP5 in mouse lung after acute viral infection. *Am J Respir Cell Mol Biol* 22: 34-44, 2000.

- 112. Tuma PL, Hubbard AL. Transcytosis: crossing cellular barriers. *Physiol Rev* 83: 871–932, 2003.
- 113. Verheij J, van Lingen A, Raijmakers PG, Rijnsburger ER, Veerman DP, Wisselink W, Girbes AR, Groeneveld AB. Effect of fluid loading with saline or colloids on pulmonary permeability, oedema and lung injury score after cardiac and major vascular surgery. *Br J Anaesth* 96: 21-30, 2006.
- 114. Verkman AS. Role of aquaporins in lung liquid physiology. *Respir Physiol Neurobiol* 159: 324-330, 2007.
- 115. Vincent JL. Plugging the leaks? New insights into synthetic colloids. Crit Care Med 19: 316-318, 1991.
- 116. Vincent JL. The pros and cons of hydroxyethyl starch solutions. *Anesth Analg* 104: 484-486, 2007.
- 117. Vincent JL, Sakr Y, Reinhart K, Sprung CL, Gerlach H, Ranieri VM; 'Sepsis Occurence in Acutely III Patients' Investigators. Is albumin administration in the acutely ill associated with increased mortality? Results of the SOAP study. *Crit Care* 9: R745-754, 2005.
- 118. Vogel SM, Minshall RD, Pilipovic M, Tiruppathi C, and Malik AB. Albumin uptake and transcytosis in endothelial cells in vivo induced by albumin-binding protein. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 281: L1512–L1522, 2001.
- 119. Ware LB, Matthay MA. The Acute Respiratory Distress Syndrome. *N Engl J Med* 342: 1334-1349, 2000.
- 120. Waypa GB, Morton CA, Vincent PA, Mahoney JR Jr, Johnston WK 3rd, Minnear FL. Oxidant-increased endothelial permeability: prevention with phosphodiesterase inhibition vs. cAMP production. *J Appl Physiol* 88: 835-842, 2000.
- 121. Webb AR, Moss RF, Tighe D, Mythen MG, al-Saady N, Joseph AE, Bennett ED. A narrow range, medium molecular weight pentastarch reduces structural organ damage in a hyperdynamic porcine model of sepsis. *Intensive Care Med* 18: 348–355, 1992.
- 122. Webb AR, Tighe D, Moss RF, al-Saady N, Hynd JW, Bennett ED. Advantages of a narrow-range, medium molecular weight hydroxyethyl starch for volume maintenance in a porcine model of fecal peritonitis. *Crit Care Med* 19: 409–416, 1991.
- 123. Westphal M, James MF, Kozek-Langenecker S, Stocker R, Guidet B, Van Aken H. Hydroxyethyl starches: different products different effects. *Anesthesiology* 111: 187-202, 2009.
- 124. Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review. *Lancet* 369, 1553-1564, 2007.

- 125. Wiedemann HP, Wheeler AP, Bernard GR, Thompson BT, Hayden D, deBoisblanc B, Connors AF Jr, Hite RD, Harabin AL. Comparison of two fluid-management strategies in acute lung injury. N Engl J Med 354: 2564-2575, 2006.
- 126. Wiel E, Costecalde ME, Lebuffe G, Corseaux D, Jude B, Bordet R, Tavernier B, Vallet B. Activated protein C increases sensitivity to vasoconstriction in rabbit Escherichia coli endotoxin-induced shock. *Crit Care* 10: R47, 2006.
- 127. Zander R. Flüssigkeitstherapie. Download: www.physioklin.de. *Bibliomed,* Melsungen, 2006.
- 128. Zander R, Boldt J, Engelmann L, Mertzlufft F, Sirtl C, Stuttmann R. The design of the VISEP trial. Critical appraisal. *Anaesthesist* 56: 71-77, 2007.
- 129. Zikria BA, King TC, Stanford J, Freeman HP. A biophysical approach to capillary permeability. Surgery 105: 625–631, 1989.
- 130. Zikria BA, Subbarao C, Oz MC, Shih ST, McLeod PF, Sachdev R, Freeman HP, Hardy MA. Macromolecules reduce abnormal microvascular permeability in rat limb ischemia-reperfusion injury. *Crit Care Med* 17: 1306 –1309, 1989.

8 Anhang

8.1 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz für die Überlassung des Themas und die Aufnahme in sein wissenschaftliches Labor. Durch seine fortwährende, freundliche und intensive Unterstützung und Förderung hat er diese Arbeit an der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf ermöglicht.

Herrn Dr. med. R. Kiefmann danke ich für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe und seine kritischen Anregungen.

Ganz besonders danke ich Herrn Dr. med. Kai Heckel für die hervorragende wissenschaftliche Betreuung, sein unermüdliches persönliches Engagement, die tatkräftige Unterstützung und großartige Motivation.

Herzlicher Dank gilt Herrn Björn Winkelmann, der während der Tierversuche mit Kai Heckel unerschöpflichen Einsatz gezeigt hat.

Herrn Prof. Dr. Udo Schumacher und Frau Elke Schäfer aus dem Anatomischen Institut danke ich für die exzellente Zusammenarbeit sowie für die großzügige Assistenz während der Anfertigung der elektronenmikroskopischen Gewebeschnitte und der Ausführung der Elektronenmikroskopie.

Ich danke Frau Monika Weber, Claudia Lüchau, Kirsten Pfeiffer-Drenkhahn und Sonja Schuppart für die freundliche Aufnahme im Labor, sowie für die praktische Durchführung des "Goldkochens" und der rt-PCR.

Ich danke meiner Familie und meinen Freunden für die liebevolle Unterstützung und Stärkung.

8.2 Lebenslauf

PERSÖNLICHE DATEN

Name: Annika Basedow

Geburtsdatum: 01. Mai 1984

Geburtsort: Kiel

Staatsangehörigkeit: Deutsch

SCHULBILDUNG

1990-1992 Brüder-Grimm-Schule Kronshagen

1992-1994 Grund- und Hauptschule Suchsdorf, Kiel

1994-2003 Ernst-Barlach-Gymnasium, Kiel

2003 Abitur

STUDIUM

2003 Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg

2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

03/2006 Famulatur: Innere Medizin

Klinikum der Universität München -Innenstadt-

08/2006 Famulatur: Thorax- und Gefäßchirurgie

Asklepios Klinik Altona

09/2006 Famulatur: Kardiologie, Endokrinologie, Gastroenterologie

Praxis PD Dr. med. U. Desaga, Dr. med. E. Barth

09/2007 Famulatur: Pädiatrische Anästhesiologie

Altonaer Kinderkrankenhaus gGmbH

08/2008-07/2009 Praktisches Jahr:

Anästhesiologie, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Innere Medizin, Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg

Chirurgie, Asklepios Klinik St. Georg, Hamburg

11/2009 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung

BERUFLICHER WERDEGANG

seit 01/2010 Assistenzärztin in der Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

8.3 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Annika Basedow