

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Anästhesiologie und Intensivmedizin
Klinik und Poliklinik für Anästhesiologie

Prof. Dr. med. Alwin E. Goetz

Vergleichende Untersuchung zum Einfluss von 6 % HES 130/0,4 und 10 % HES 200/0,5 auf die pulmonale Mikrozirkulation während enzymatischer Degradation der endothelialen Glykokalyx

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von
Anika Bornscheuer
aus Aurich

Hamburg 2013

Veröffentlicht mit Genehmigung der medizinischen Fakultät
der Universität Hamburg

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 31.10.2013

Prüfungsausschuss:

Vorsitzender: Prof. Dr. Alwin E. Goetz

2. Gutachter/in: PD Dr. Oliver Mann

3. Gutachter/in: PD Dr. Stefan Kluge

Tag der mündlichen Prüfung: 31.10.2013

Gewidmet meinen Eltern

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	6
1.1 Vorbemerkung	6
1.2 Zielsetzung und Fragestellung	8
1.3 Endotheliale Glykokalyx und ESL	8
1.3.1 Struktureller Aufbau	8
1.3.2 Funktion	10
1.3.3 Ursache und Folgen einer geschädigten Glykokalyx	12
1.4 Akuter Lungenschaden	13
1.4.1 Epidemiologie	13
1.4.2 Pathogenese	14
1.4.3 Pathophysiologie	15
1.5 Hydroxyethylstärke	16
1.5.1 Struktureller Aufbau	16
1.5.2 Eigenschaften und Nomenklatur der HES-Generationen	17
1.5.3 Klinische Verwendung von HES	19
2 Material und Verfahren	20
2.1 Das Modell der isoliert perfundierten Mäuselunge	20
2.1.1 Versuchstiere	20
2.1.2 Präparation und Organentnahme	20
2.1.3 Extrakorporales Perfusionssystem	22
2.1.4 Aufbereiten des Blutes	23
2.2 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie	24
2.2.1 Aufbau des Mikroskops	24
2.2.2 Färbung des Perfusats mit Fluoreszeinisothiocyanat	24
2.2.3 Mikroskopieareal und Analyse der Bilddaten	25
2.3 Erfassung von Messgrößen	25
2.3.1 Gemessene Parameter	25
2.3.2 Erythrozytenfließgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation	26
2.3.3 Ödembildung	26
2.3.4 Viskosität der Perfusionslösung	27
	3

2.3.5 Fluorescence Activated Cell Sorting-Analyse	27
2.4 Applizierte Substanzen	28
2.4.1 Heparinase I	28
2.4.2 HES 130/0,4	28
2.4.3 HES 200/0,5	29
2.5 Einschlusskriterien	29
2.6 Versuchsprotokoll	30
2.6.1 Kontrollversuche (n=5)	30
2.6.2 Versuche unter Zugabe von Heparinase I (n=5)	30
2.6.3 Versuche unter Zugabe von 6 % HES 130/0,4 und Heparinase I (n=5)	30
2.6.4 Versuche unter Zugabe von 10 % HES 200/0,5 und Heparinase I (n=5)	31
2.7 Rezeptteil	31
2.7.1 Reagenzien/Pharmaka	31
2.7.2 Infusionslösung	32
2.7.3 Perfusionslösung	32
2.7.4 Pufferlösungen	33
2.7.5 Materialien	33
2.8 Statistische Verfahren	34
3 Ergebnisse der Perfusionsversuche	35
3.1 Verhalten der Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten in subpleuralen Lungengefäßen	35
3.1.1 Fließgeschwindigkeit in Arteriolen zum Zeitpunkt null Minuten	35
3.1.2 Fließgeschwindigkeit in Kapillaren zum Zeitpunkt null Minuten	36
3.1.3 Fließgeschwindigkeit in Venolen zum Zeitpunkt null Minuten	37
3.1.4 Fließgeschwindigkeit in Arteriolen zum Zeitpunkt 90 Minuten	38
3.1.5 Fließgeschwindigkeit in Kapillaren zum Zeitpunkt 90 Minuten	39
3.1.6 Fließgeschwindigkeit in Venolen zum Zeitpunkt 90 Minuten	40
3.2 Verhalten der Perfusionsdrücke	43
3.3 Ödembildung	44
3.4 Ergebnisse der Viskositätsbestimmung	46
3.5 Ergebnisse der Heparansulfatbestimmung	47

4 Diskussion	48
4.1 Videofluoreszenzmikroskopie	48
4.2 Enzymatische Degradation als Modell für Glykokalyx-Schädigung	49
4.3 Abfall der mikrovaskulären Perfusion nach Glykokalyx-Degradation	52
4.4 Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks nach Glykokalyx-Degradation	54
4.5 Ausbildung interstitieller Ödeme nach Glykokalyx-Degradation	55
4.6 Präventive Wirkung einer Vorbehandlung durch HES	56
5 Zusammenfassung	61
5.1 Einleitung	61
5.2 Material und Verfahren	61
5.3 Ergebnisse der Perfusionsversuche	62
5.4 Diskussion	62
6 Anhang	63
6.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen	63
6.2 Literaturverzeichnis	66
6.3 Danksagung	84
6.4 Eidesstattliche Versicherung	85
6.5 Veröffentlichung in SHOCK 2012; 38(5): 559–566.	86

1 Einleitung

1.1 Vorbemerkung

Der Gasaustausch in der Lunge hängt entscheidend von der Diffusionsdistanz und der verfügbaren Kontaktfläche zwischen den Alveolen und den pulmonalen Mikrogefäßen ab (Thews 1997). Es ist bekannt, dass sowohl eine Verlängerung der Diffusionsdistanz, wie sie durch interstitielle Ödeme hervorgerufen wird, als auch die Reduktion der Kontaktfläche, ausgelöst durch eine Verminderung des perfundierten Gefäßquerschnitts, zu einer Reduzierung der pulmonalen Sauerstoffaufnahme führt (Hardaway 2006). Beides sind potenzielle Folgen einer Schädigung der Glykokalyx. Eine reduzierte Sauerstoffkonzentration im Blut, verminderter Sauerstofftransport zu den Organen und eine gestörte Verteilung innerhalb des Körpers sind die bedeutendsten Probleme kritisch kranker Patienten (Chappell *et al.* [et alia] 2009b). Die genauen Auswirkungen einer geschädigten Glykokalyx auf die Mikrozirkulation in einzelnen Organen sind kaum erforscht. Insbesondere liegen derzeit keine Studien zum Einfluss einer Glykokalyx Degradation auf die pulmonale Mikrozirkulation vor.

Die luminale Membran des vaskulären Endothels wird von transmembranösen Syndekanen und membrangebundenen Glypikanen bedeckt, die zusammen die endotheliale Glykokalyx bilden und ein intaktes Blutgefäß auskleiden. Hauptbestandteile der Glykokalyx sind Hyaluronsäure, Heparansulfat und Chondroitinsulfat (Pries und Kuebler 2006). Die physiologische Wirkform der Glykokalyx ist die *Endothelial Surface Layer* (ESL), die durch die dynamische Anbindung von Plasmaproteinen und einem ständigen Austausch von membrangebundenen Molekülen entsteht (Jacob *et al.* 2007; Pries *et al.* 2000; Reitsma *et al.* 2007; Pries und Kuebler 2006). Die physiologische Funktion der Glykokalyx ist Gegenstand intensiver wissenschaftlicher Diskussionen und konnte bis heute nicht umfassend geklärt werden. Betrachtet man derzeitige Untersuchungen, scheint die Glykokalyx in mindestens zwei Aspekte der Gefäßfunktion eingebunden. Erstens ist sie ein wichtiger Teil der Gefäßbarriere, und zweitens wirkt sie bei der endothelialen Mechanotransduktion mit (Nieuwdorp *et al.* 2005; Reitsma *et*

al. 2007; van den Berg *et al.* 2006; Chappell *et al.* 2008a). Aus diesen Gründen und dadurch, dass die ESL die Kontaktfläche zwischen vaskulärem Endothel und zirkulierenden Immunzellen des Blutplasmas bildet (Pries *et al.* 2000), scheint die intakte Glykokalyx eine entscheidende Rolle für die Blutzirkulation zu spielen. Es wird angenommen, dass sie eine Bedeutung für Erkrankungen wie Diabetes, Arteriosklerose, metastasierenden Erkrankungen, Ischämie/Reperfusion sowie Entzündungen hat (Nieuwdorp *et al.* 2005; Nieuwdorp *et al.* 2006; Nelson *et al.* 2008; Rehm *et al.* 2007). In experimentellen und klinischen Studien konnte gezeigt werden, dass die Zerstörung der Glykokalyx zu einem Zusammenbruch der vaskulären Barriere, mit einer Erhöhung der Permeabilität und nachfolgender Ausbildung von Gewebeödemen führt und ein Organversagen zur Folge haben kann (van den Berg *et al.* 2003; Chappell *et al.* 2007).

In der Lunge können Ischämie/Reperfusion, Sepsis oder eine *Acute Lung Injury* (ALI) anderer Genese zu einer Zerstörung der Glykokalyx führen. Hierdurch werden Zytokine, wie Interleukin-I und Tumornekrosefaktor α ausgeschüttet, die die Barrierefunktion des Endothels schädigen (Janeway *et al.* 2001; Moore *et al.* 2002). In der hier vorgelegten Studie nutzten wir die enzymatische Degradation der Glykokalyx mittels Heparinase I, um eine dieser pathologischen Situationen zu simulieren. Ebenfalls imitiert diese enzymatische Zerstörung die Situation von Patienten mit Sepsis oder Zustand während einer Ischämie/Reperfusion, da hier erhöhte Werte von Heparansulfat im Serum gefunden werden (Rehm *et al.* 2007; Nelson *et al.* 2008). In unseren Experimenten führten wir eine *Fluorescence Activated Cell Sorting*-Analyse mit mikrovaskulären Endothelzellen der menschlichen Lunge durch, um die Spaltungsaktivität von Heparinase I gegenüber Heparansulfat verifizieren zu können.

Klinische Beobachtungen zeigen, dass Plasmaersatzprodukte, wie Hydroxyethylstärke, einen positiven Effekt auf die Perfusion von Organen und deren Mikrozirkulation haben können. Hydroxyethylstärke 130/0,4 erhöhte die Oxygenierung sowohl in Geweben von gesunden Probanden (Standl *et al.* 2003) als auch bei Patienten, die sich einer großen Bauchoperation unterziehen mussten (Marik *et al.* 1997). In Bezug auf die Barrierefunktion der Glykokalyx wiesen Chappell *et al.* darauf hin, dass Hydroxyethylstärke mit einem Molekulargewicht von 130 kDa in der Lage ist, die vaskuläre Barriere in ischämischen Myokard-

zellen des Rattenherzens zu schützen (Chappell *et al.* 2007). Ob Hydroxyethylstärke einen Einfluss auf die pulmonale Mikrozirkulation während enzymatischer Degradierung hat, ist unklar.

1.2 Zielsetzung und Fragestellung

Ziel dieser Arbeit ist es, die Auswirkung einer Glykokalyx Degradation auf die pulmonale Mikrozirkulation zu untersuchen. Anhand des *ex-vivo* perfundierten Modells der Mäuselunge soll quantitativ bestimmt werden, ob eine enzymatische Degradation mittels Heparinase I einen Einfluss auf die Fließgeschwindigkeit roter Blutzellen in subpleuralen Mikrogefäßen hat. Hierfür nutzen wir die Videofluoreszenzmikroskopie. Ebenfalls wird die Ausbildung eines interstitiellen Ödems und das Verhalten des pulmonalarteriellen Drucks nach Zerstörung der Glykokalyx untersucht. Zusätzlich sollen der protektive Einfluss zweier verschiedener Hydroxyethylstärke-Generationen auf die pulmonale Mikrozirkulation geprüft und die Effekte verglichen werden.

1.3 Endotheliale Glykokalyx und ESL

1.3.1 Struktureller Aufbau

Die endotheliale Glykokalyx wurde vor 70 Jahren erstmals beschrieben (Danielli 1940). Sie bedeckt die luminalen Seite aller gesunden Blutgefäße (Pries *et al.* 2000) und besteht aus einer kohlenhydratreichen Schicht auf dem vaskulären Endothel (Chappell *et al.* 2008a). Diese Schicht wird aus membranösen Glykoproteinen wie Syndecan-I sowie Glykosaminoglykanen gebildet, in die lösliche Proteine plasmatischer oder endothelialer Herkunft eingebunden sind. Hyaluronsäure, Heparansulfat und Chondroitinsulfat sind Hauptbestandteile der Glykokalyx (siehe Abbildung 1). Sowohl Heparansulfat wie auch Chondroitinsulfat tragen negativ geladene Sulfatgruppen und sind kovalent mit transmembranen Proteoglykanen verbunden. Die Fähigkeit der Proteoglykane und Glykoproteine, Glykosaminoglykane zu binden, kann variieren (Reitsma *et al.* 2007). Die

Rate von Heparansulfat zu Chondroitinsulfat ist etwa 4:1 und ihr Grad an Sulfatierung hängt vom physiologischen Umfeld ab (Rapraeger 1989; Vogl-Willis und Edwards 2004). Hyaluronsäure ist das einzige Glykosaminoglykan, das keine Sulfatgruppe trägt und nicht kovalent mit einem Protein verbunden ist (Laurent und Fraser 1992). Heparansulfate und Chondroitinsulfate werden im Golgi-Apparat synthetisiert, wohingegen Hyaluronsäure-Synthasen plasmamembran-assoziiert sind (Prehm 1989). Für Hyaluronsäure gibt es verschiedene Wege, in die Glykokalyx integriert zu werden. Es wird angenommen, dass der primäre Rezeptor in der Glykokalyx hierfür CD44 (*Cluster of Differentiation*) ist (Aruffo *et al.* 1990), gemeinsam mit dem Hyaluronsäure-Bindungsprotein (Toole 1990). Die Hyaluronsäure-Seitenketten werden durch räumliche Interaktion in das zufällig angeordnete, feinfaserige Netzwerk eingefügt (Scott und Heatley 1999). Unter physiologischen Bedingungen ist die Struktur der Glykokalyx stabil. Die Dicke und die Zusammensetzung hängen von der Balance zwischen Biosynthese und enzymatischem oder *Shear Stress* bedingtem Abspalten der einzelnen Glykokalyxbestandteile von ihrem Grundgerüst ab (Chappell *et al.* 2008a). Die Dynamik dieses ständigen Auf- und Abbaus ist bisher nicht vollständig geklärt (Lipowsky 2005), daher lässt sich die geometrische Struktur zurzeit nur als statisches Bild darstellen (Reitsma *et al.* 2007). Die physiologische Wirkform der Glykokalyx ist die ESL, die durch die dynamische Anbindung von Plasma-proteinen und einem ständigen Austausch von membrangebundenen Molekülen entsteht (Jacob *et al.* 2007; Pries *et al.* 2000; Reitsma *et al.* 2007; Pries und Kuebler 2006). In der Vergangenheit ging man davon aus, dass die Glykokalyx nur eine Dicke von einigen Nanometern besitzt. Ein Grund hierfür mag die schwierige Visualisierung sein, da die Glykokalyx äußerst fragil ist und bei herkömmlicher Gewebefixierung bereits vor Durchführung der Elektronenmikroskopie nahezu vollständig zerstört wird. Es wurde jedoch gezeigt, dass die Schicht intraluminal bis zu 0,5–3 µm groß ist (van den Berg *et al.* 2003). Durch eine moderne Markierungstechnik auf Lanthanbasis konnte eine intakte endotheliale Glykokalyx mit einem Durchmesser von etwa 0,5 µm dargestellt werden (Chappell *et al.* 2007; Chappell *et al.* 2008a; Rehm *et al.* 2004; Jacob *et al.* 2006). Studien, die mithilfe der Konfokalmikroskopie arbeiten, lassen sogar ver-

muten, dass die Dicke der Glykokalyx in großen arteriellen Gefäßen bis zu 4 µm betragen kann (Barker *et al.* 2004).

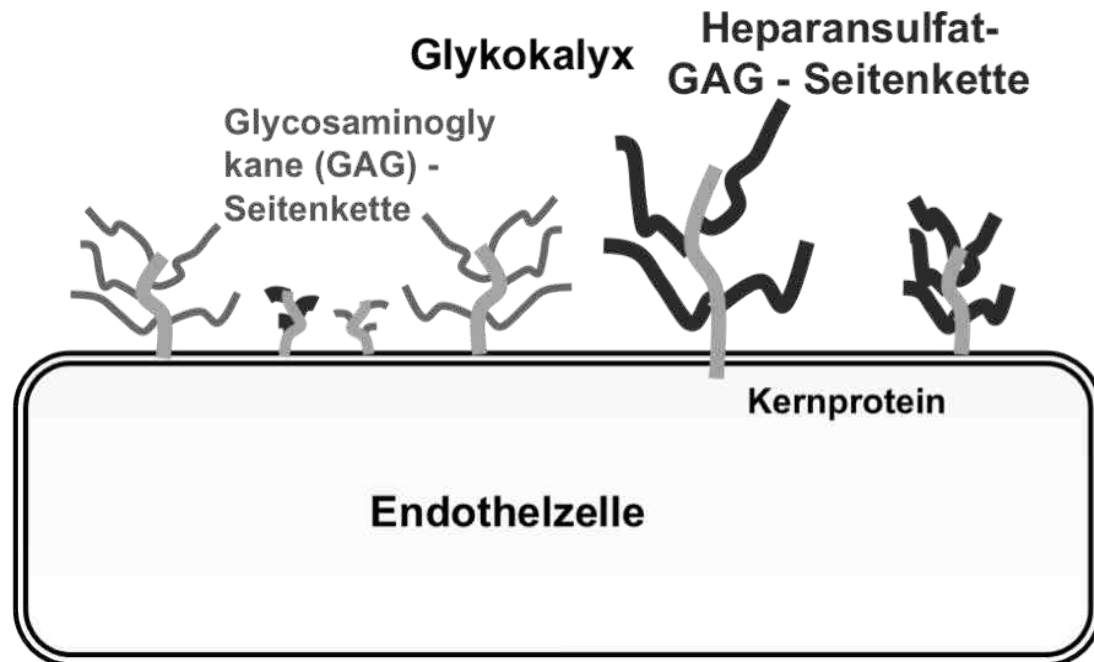


Abbildung 1: Schematischer Aufbau der endothelialen Glykokalyx

1.3.2 Funktion

Die physiologisch wahrscheinlich zentralste Funktion der Glykokalyx ist die Aufrechterhaltung der Gefäßbarriere. Unter physiologischen Bedingungen fungiert die Glykokalyx als molekularer Filter, der Proteine zurückhält und den onkotischen Druck innerhalb der ESL erhöht. Verschiedene Studien konnten zeigen, dass eine Abnahme der Glykokalyxdicke zu einer erhöhten Permeabilität der Gefäßwand gegenüber Makromolekülen führt (Chappell *et al.* 2007; Jacob *et al.* 2006; Rehm *et al.* 2004). In der Vergangenheit wurde die vaskuläre Barrierefunktion mit dem von Starling beschriebenen Prinzip erklärt. Demnach besteht ein ausgeprägter kolloidosmotischer Konzentrationsgradient zwischen dem Intravasalraum, in dem ein hoher kolloidosmotischer Druck herrscht, und dem Extravasalraum, mit einem niedrigen kolloidosmotischen Druck. Die Barrierefunktion wird durch den kolloidosmotischen Gradienten zwischen den beiden Räu-

men aufrechterhalten und das Plasma somit im Gefäßsystem gebunden. Starling ging davon aus, dass die Endothelzellen allein die vaskuläre Barriere bilden (Starling 1896). In den letzten Jahren konnte jedoch gezeigt werden, dass die Barriere ungeachtet der Tatsache aufrechterhalten wird, dass die interstitielle Proteinkonzentration der intravasalen nahezu gleicht (Adamson *et al.* 2004; Jacob *et al.* 2007; Jacob *et al.* 2006; Rehm *et al.* 2004). Die Endothelzelle kann also nicht die einzige Struktur sein, die den osmotischen Gradienten unterhält. Auf der Grundlage dieser Erkenntnis entwickelten Rehm *et al.* das *Double Barrier*-Konzept (Rehm *et al.* 2004). In diesem Modell stellen sich zwei kompetente Barrieren dem Ausstrom von Kolloiden entgegen. Die Endothelzellen und die endotheliale Glykokalyx. Nach diesem Konzept befindet sich der kolloidosmotische Konzentrationsgradient, der für die vaskuläre Integrität verantwortlich ist, nicht zwischen intra- und extravasal, sondern innerhalb der ESL. Theoretische und experimentelle Studien konnten zeigen, dass die lokale Proteinkonzentration und der kolloidosmotische Druck direkt abluminal der Glykokalyx viel geringer sind als die entsprechende Konzentration und der Druck im Interstitium (Hu *et al.* 2000; Hu und Weinbaum 1999). Der kolloidosmotische Gradient bildet sich in Bezug auf die endotheliale Glykokalyx somit lediglich innerhalb der ESL aus, die nach auswärts strömende Proteine filtert (Chappell *et al.* 2008a).

Die Glykokalyx ist ebenfalls am Gerinnungssystem beteiligt, etwa in der Generierung von Thrombin und der Hemmung der Fibrinolyse (Levi *et al.* 2004; Pearson und Lipowsky 2004). Alle Faktoren, die unter physiologischen Bedingungen die Bildung von Thrombin minimieren, sind in der endothelialen Glykokalyx lokalisiert (Esmon 2003). Es konnte gezeigt werden, dass die spezifische Zerstörung der Glykokalyx innerhalb weniger Minuten zu einer Thrombinbildung und einer Plättchenadhäsion führt (Vink *et al.* 2000). Verschiedene Koagulationsstimuli, wie proinflammatorische Zytokine, haben einen Effekt auf die Synthese der Glykokalyxbestandteile, wie etwa Heparansulfat und Hyaluronsäure (Rosenberg *et al.* 1997; Henry und Duling 2000). Ebenfalls stellt die endotheliale Glykokalyx wahrscheinlich eine Barriere für Leukozytenadhäsion dar, da ihre Dimension bei Weitem die Größe der Adhäsionsmoleküle überschreitet, wie die des intrazellulären Adhäsionsmoleküls-I und des P- und L-Selektins (Mulivor und Lipowsky 2002).

Als apikalste Struktur der Endothelzelle nimmt die Glykokalyx *Shear Stress* durch vorbeifließendes Blut wahr und ist an der Mechanotransduktion beteiligt (Dull *et al.* 2003; Dull *et al.* 2007; Tarbell und Ebong 2008). Dabei fungiert Hyaluronsäure als Mechanosensor (Weinbaum *et al.* 2003; Mochizuki *et al.* 2003; Florian *et al.* 2003; Thi *et al.* 2004). Als Antwort kommt es zur charakteristischen *Shear Stress*-induzierten Freisetzung von Stickstoffmonoxid (NO) durch die Endothelzellen. In einer Studie von Florian *et al.* konnte durch die enzymatische Abspaltung von Heparansulfat von der Zelloberfläche die Freisetzung von NO vollständig verhindert werden. Als Enzym wurde hierbei Heparinase verwendet (Florian *et al.* 2003).

Ebenfalls kann die Glykokalyx Enzyme binden. So ist die extrazelluläre Superoxiddismutase (SOD) an Heparansulfat, einem in der Glykokalyx vorkommenden Proteoglykan, gebunden. Entsprechend zeigten Maczewski *et al.*, dass eine Zerstörung der Glykokalyx zu einem vermehrten *Shedding* der Superoxiddismutase führt (Maczewski *et al.* 2004). SOD ist ein Enzym, das Sauerstoffradikale in Wasserstoffperoxid überführt (Li *et al.* 1998).

1.3.3 Ursache und Folgen einer geschädigten Glykokalyx

Unter *Shedding* versteht man das Abspalten der einzelnen Glykokalyxbestandteile von der Endothelmembran oder dem Grundgerüst der Glykokalyx (Chappell *et al.* 2008a). In einer Vielzahl von Studien wurde gezeigt, dass das *Shedding* der endothelialen Glykokalyx diverse Ursachen haben kann. Eine Rolle spielen Inflammation (Henry und Duling 2000; Mulivor und Lipowsky 2004), Hyperglykämie (Zuurbier *et al.* 2005), Blutvergiftung und septischer Schock (Hofmann-Kiefer *et al.* 2009), die Präsenz von oxidiertem LDL ([*Low Density Lipoprotein*], Constantinescu *et al.* 2001), Tumornekrosefaktor α (Chappell *et al.* 2009a) und atriales natriuretisches Peptid (Bruegger *et al.* 2005), abnormaler *Shear Stress* im Blut (Gouverneur *et al.* 2006; Haldenby *et al.* 1994), Ischämie/Reperfusion (Mulivor und Lipowsky 2004) und eine Bypass-Operation (Rehm *et al.* 2007, Svennevig *et al.* 2008). Diese Beobachtungen führten zu der Hypothese, dass es eine grundlegende Verbindung zwischen der Integrität der Glykokalyx und der vaskulären Homöostase gibt (Mulivor und Lipowsky 2004; Zuurbier *et al.* 2005). Die zellulären Signalkaskaden zwischen den genannten

pathologischen Bedingungen und dem *Shedding* der Glykokalyx sind bis heute nicht gänzlich verstanden (Gao und Lipowsky 2010). Jedoch gibt es Hinweise darauf, dass verschiedene Schlüsselenzyme, wie etwa die Matrix Metalloprotease, direkt verantwortlich für das *Shedding* von Glykokalyxbestandteilen sein könnten (Mulivor und Lipowsky 2009).

Als direkte Auswirkung einer Zerstörung der Glykokalyx beobachteten Rehm *et al.* bei gefäßchirurgischen Patienten mit globaler oder regionaler Ischämie massiv erhöhte Werte von zirkulierendem Syndecan-I und Heparansulfat im Blut (Rehm *et al.* 2007). Folge des *Sheddings* der Glykokalyx kann auch eine gesteigerte Gerinnung sein, da endotheliale Adhäsionsmoleküle von der intakten ESL bedeckt werden. Eine Degradation der bedeckenden Glykokalyx würde einen direkten Kontakt der Adhäsionsmoleküle mit immunkompetenten Zellen des Blutplasmas erlauben und somit eine stabile Leukozytenadhäsion hervorrufen (Chappell *et al.* 2008a). Abgespaltene Heparansulfate wirken zusätzlich chemotaktisch auf Leukozyten und fördern im Fall einer Entzündungsreaktion deren Akkumulation (Bernfield *et al.* 1999). Ebenfalls beobachteten Chappell *et al.* 2007 an isolierten Meerschweineherzen, dass die Zerstörung der Glykokalyx zu einem erheblichen Gewebeödem führt. Der ubiquitäre Zusammenbruch der vaskulären Barriere führt zu einer Erhöhung der Permeabilität und nachfolgender Ausbildung von generalisierten Gewebeödemen. Dies kann ein Organversagen zur Folge haben (van den Berg *et al.* 2003; Chappell *et al.* 2007) und stellt ein wesentliches intensivmedizinisches Problem bei der Behandlung kritisch kranker Patienten dar. Die Glykokalyx spielt ebenfalls eine Rolle bei Krankheitsprozessen wie Diabetes (Nieuwdorp *et al.* 2006), Sepsis (Nelson *et al.* 2008), Arteriosklerose (Nieuwdorp *et al.* 2005), Ischämie/Reperfusion (Rehm *et al.* 2007) und Tumormetastasierung (Vlodavsky 2007).

1.4 Akuter Lungenschaden

1.4.1 Epidemiologie

Erstmals beschrieben Ashbaugh *et al.* 1967 das *Adult Respiratory Distress Syndrome* (ARDS). Ashbaugh war der Erste, der beobachtete, dass eine Viel-

zahl von Schädigungen zu dem von ihm beschriebenen Syndrom führen können. 1994 schlug die amerikanisch-europäische Konsensus-Konferenz vor, das ARDS in *Acute Respiratory Distress Syndrome* umzubenennen, da sich das Krankheitsbild nicht nur auf Erwachsene beschränke. Die genaue Inzidenz des ARDS ist unbekannt (Weinacker und Vaszar 2001). 1972 wurde sie von den *National Institutes of Health* der Vereinigten Staaten von Amerika (USA) auf jährlich 75 pro 100.000 Personen geschätzt (Hudson und Steinberg 1999). Andere Studien, welche die Definition des Konsensus von 1994 mit einbeziehen, haben eine Inzidenz zwischen 1,5 und 8,4 pro 100.000 geschätzt (Weinacker und Vaszar 2001). Nach jüngsten Untersuchungen liegt die Inzidenz des ARDS bei 17–64/100.000 für die USA und bei 17–34/100.000 für Europa und Australien (MacCallum und Evans 2005). Eine andere Definition des Akuten Lungenschadens beschreibt die ALI. Diese ist mit einer beträchtlichen Morbidität assoziiert. In Krankenhäusern liegt die Sterblichkeitsrate bei 38 % bis 50 %. Allein in den USA verursacht sie 74.500 Todesfälle pro Jahr (Rubenfeld *et al.* 2005). Dies übersteigt die Rate von Todesfällen durch Brustkrebs oder HIV(Humanes Immundefizienz-Virus)-Infektionen bei Weitem. Unter den Patienten, die überlebten, waren nur 34 % in der Lage, direkt wieder nach Hause entlassen zu werden. Es wird geschätzt, dass sich die jährliche Erkrankungsrate der ALI in den nächsten 25 Jahren verdoppeln wird. Dies ist bedingt durch die immer älter werdende Bevölkerung. Akutes Lungenversagen ist die häufigste Form von Organversagen bei Intensivpatienten (Tang *et al.* 2009). Eine effektive, pharmakologische Therapie des ARDS steht momentan nicht zur Verfügung (Matthay und Zemans 2011).

1.4.2 Pathogenese

In der Pathogenese des ARDS wird grundsätzlich zwischen direkter und indirekter Schädigung der Lunge unterschieden. Wesentliche direkte Auslöser sind sich diffus ausbreitende, pulmonale Infektionen durch Bakterien, Viren, Pilze oder Protozoen, Aspiration von Mageninhalt, Süß- oder Salzwasser, Lungenkontusion, Inhalation von toxischen Gasen wie Stickstoffdioxid (NO₂), Ozon oder Rauchgas oder Medikamente wie Amiodaron oder Bleomycin. Wesentliche indirekte Auslöser sind Sepsis und SIRS (*Systemic Inflammatory Response*

Syndrome), beispielsweise ausgehend von einer Pankreatitis, von einem Polytrauma, Blutungsschock mit Massentransfusion, einer disseminierten intravasalen Gerinnung, Embolie durch Luft oder Fruchtwasser, einem Schädel-Hirn-Trauma und einem dadurch bedingten, neurogenen Lungenödem sowie von schweren Verlaufsformen von Malaria (Walmrath und Seeger 2006). Weitere Auslöser können Verbrennungen, arterielle Hypoxie, Hyperoxie und die Toxine Paraquat und Heroin sein (Bause und Friedrich 2006). Die Faktoren, die zur Ausbildung eines ARDS führen können, sind auch dafür bekannt, die Glykokalyx zu schädigen (Walmrath und Seeger 2006). Damit könnte in der Lunge eine Glykokalyx Degradation jedweder Genese einen Auslöser für ein ARDS darstellen. In unseren Versuchen ist die Zerstörung der Glykokalyx mittels Heparinase I stellvertretend für diese pathophysiologische Situation zu sehen.

1.4.3 Pathophysiologie

Der zeitliche Ablauf eines ARDS kann in drei Phasen aufgeteilt werden. Die erste Phase bildet ein symptomfreies Intervall von ein bis drei Tagen, in dem die Endothelläsion im Vordergrund steht. In dieser Frühphase beobachtet man eine massive Anhäufung von polymorphkernigen Granulozyten in der Lunge. Sie setzen eine Reihe von endothelschädigenden und den pulmonal-vaskulären Widerstand erhöhenden Substanzen frei, die den Ausgangspunkt für die kaskadenartige Aktivierung verschiedener biologischer Mediatorsysteme bilden (Bause und Friedrich 2006). Verursacht wird dieser erhöhte Widerstand durch prä- und postkapilläre Vasokonstriktion sowie Mikroembolisationen (Walmrath und Seeger 2006). Dieser ersten Phase folgt die exsudative Phase, die etwa eine Woche andauert und durch ein alveoläres Ödem gekennzeichnet ist. Dieses ist durch die gestörte kapillar-endotheliale und alveolo-epitheliale Schrankenfunktion bedingt, die zu einer erhöhten Permeabilität für Wasser und Plasmaproteine führt (Walmrath und Seeger 2006). Nach zwei Wochen beginnt die proliferative Phase mit Beginn der Fibrosierung, die sich im Endstadium des ARDS in einer narbig, zystischen Fibrose manifestiert (Weinacker und Vaszar 2001).

1.5 Hydroxyethylstärke

1.5.1 Struktureller Aufbau

Hydroxyethylstärke (HES) gehört zu der Klasse der synthetischen Kolloide die aus natürlichen, modifizierten Polysacchariden bestehen und Ähnlichkeit zu dem im menschlichen Körper vorkommenden Glykogen aufweisen. Als Ursprung für HES dient Kartoffel- oder Maisstärke. Maisderivate zeigen einen höheren Verzweigungsgrad und einen weitaus niedrigeren Grad an Veresterung mit Phosphorsäure im Vergleich zur HES aus Kartoffelderivaten. HES aus Kartoffelderivaten besitzen einen geringeren Anteil an Amylopektin (etwa 80 %) im Vergleich zu Maisderivaten (etwa 99 %). Entsprechend enthält HES auf Kartoffelbasis etwa 20 % lineare Amyloseketten im Gegensatz zur HES auf Maisbasis, welche etwa 1 % Amylose enthält (Lehmann *et al.* 2007). Der Grad der Verzweigung in Produkten auf Kartoffelbasis ist somit geringer (Westphal *et al.* 2009). Als Lösungsmittel kommen einerseits unbalancierte Mittel auf Salzbasis, andererseits balancierte Mittel auf plasmaähnlicher Basis zum Einsatz.

Die polymerisierten D-Glukose-Einheiten der Stärke sind im Wesentlichen durch α 1-4-Bindungen gebunden. Natürliche Stärke kann allerdings nicht als Plasmaersatz verwendet werden, da sie instabil ist und rasch von der im Blut zirkulierenden α -Amylase hydrolysiert wird. Werden jedoch die Hydroxylgruppen der Stärke durch Hydroxyethylgruppen ersetzt, entsteht HES, die eine erhöhte Stabilität besitzt und die Hydrolyse durch die Bindung von α -Amylase hemmt. Hierfür werden die HES-Bindungen chemikalisch modifiziert, indem die Glukose an den Untereinheiten der Kohlenstoffatome hydroxyethyliert wird. Die Hydroxyethylgruppen werden hauptsächlich an den Kohlenstoff-Positionen C₂ und C₆ und im geringeren Maße auch an C₃ eingeführt. Das Resultat ist eine Modifikation der natürlich vorkommenden, polydispersen Zusammensetzung von Polymeren des Amylopektins (Jungheinrich und Neff 2005).

1.5.2 Eigenschaften und Nomenklatur der HES-Generationen

Die unterschiedliche Aufbereitung von HES wird durch die Konzentration, den Substitutionsgrad, die C_2/C_6 -Rate der Substitution, das Molekulargewicht, das Lösungsmittel und den Ursprung der Stärke bestimmt. Die Klassifizierung von HES geschieht über die Konzentration, das Molekulargewicht und den Substitutionsgrad. Hierbei gibt die erste Nummer der Bezeichnung die Konzentration der Lösung, die zweite Nummer das Molekulargewicht in Kilodalton (kDa) und die dritte Nummer den Substitutionsgrad an.

Wie alle synthetischen Kolloide ist HES ein polydisperses System, dass Partikel mit einer weiten Spanne an molekularer Masse enthält. Verfügbare Produkte haben ein Molekulargewicht von 70 kDa bis 670 kDa (Westphal *et al.* 2009). Grundlegend ist zu sagen, dass aus einem höheren Molekulargewicht, einem höheren Substitutionsgrad und einer höheren C_2/C_6 -Rate eine langsamere Metabolisierung resultiert (Jungheinrich und Neff 2005). Frühere HES-Produkte zeigen eine langsamere Clearance mit dem Resultat, dass HES der ersten und zweiten Generation binnen 24 Stunden nicht komplett aus der Blutzirkulation eliminiert wird (Asskali und Förster 1999; Weidler *et al.* 1991).

Die osmotische Effektivität von HES-Produkten richtet sich nach der Anzahl der Partikel und nicht nach der molekularen Größe. Die Exkretion kleinerer Partikel reduziert fortlaufend den osmotischen Effekt der infundierten Lösung. Dieser Effekt wird durch das kontinuierliche Angebot von onkotisch aktiven Molekülen kompensiert, die durch die Degradierung von größeren Fragmenten entstehen. Das Molekulargewicht von HES hat jedoch Einfluss auf die physiochemischen Eigenschaften, den Metabolismus und die Exkretion der HES (Westphal *et al.* 2009). In vitro ist die Beeinflussung der Plasma-Akkumulation durch das Molekulargewicht gering. Es gibt aber signifikante Unterschiede in den pharmakologischen Eigenschaften von HES-Produkten gleicher molekularer Masse, aber mit unterschiedlichem Substitutionsgrad wie z. B. HES 200/0,62 und HES 200/0,5 (Asskali und Förster 1999).

Der Substitutionsgrad von HES hängt von den zugefügten Anhydroglukose-Partikeln innerhalb des Polymers ab und variiert stark von Generation zu Generation. Er beschreibt die durchschnittliche Anzahl von Hydroxyethyl-Residuen pro Glukose-Untereinheit. Die Substitution erhöht die Löslichkeit der Stärke in

Wasser und inhibiert in unterschiedlicher Ausprägung den Abbau des Stärkopolymers durch das Enzym- α -Amylase. Es kann mehr als eine Substitution an jedem Anhydroglykose-Residuum erfolgen. Lösungen mit sieben Hydroxyethyl-Residuen pro zehn Glukoseeinheiten werden Hetastärke-Lösungen genannt, ihr Substitutionsgrad wird mit 0,7 beziffert. Entsprechend werden auch andere Substitutionslevel bezeichnet. So hat Hexastärke-Lösung einen Substitutionsgrad von 0,6, Pentastärke-Lösung einen Substitutionsgrad von 0,5 und Tetrastärke-Lösung einen Substitutionsgrad von 0,4. Je höher der Grad an substituierten Hydroxyethylgruppen ist, desto langsamer wird die Stärke enzymatisch abgebaut und die intravaskuläre Retentionsrate wird verlängert. Dies erklärt, warum ältere HES-Generationen mit hohem Substitutionsgrad, wie Hetastärke-Lösungen, im Vergleich zu modernen Tetrastärke-Lösungen zu Akkumulation im Plasma neigen (Westphal *et al.* 2009).

Das Muster, mit dem die Hydroxyethylgruppen an die Glukose gebunden werden, beschreibt die C_2/C_6 -Rate. C_2 und C_6 beschreibt die Position der Kohlenstoffatome, an die die Gruppen gebunden werden. Diese Rate hat einen signifikanten Einfluss auf die Pharmakokinetik der HES, auch wenn dieser teilweise unterschätzt wird, da die üblichen Produkteigenschaften, wie Molekulargewicht und Substitutionsgrad, nicht mit den durch die Rate bedingten Effekten übereinstimmen (Westphal *et al.* 2009). Hydroxyethylgruppen an Position des C_2 -Atoms inhibieren den Abbau von HES durch α -Amylase effektiver als Hydroxyethylgruppen an Position C_6 (Yoshida *et al.* 1984). Folglich werden HES-Produkte mit einer hohen C_2/C_6 -Rate langsamer degradiert. Dies konnten auch verschiedene Studien belegen. In der Studie von Jung *et al.* von 1993 wurden zwei HES-Lösungen gleichen molekularen Gewichts und gleichen Substitutionsgrads (HES 200/0,5), aber unterschiedlicher C_2/C_6 -Rate, an sechs Freiwilligen verglichen. Die Plasmakonzentration von HES war in der Gruppe höher, die das Produkt mit einer hohen C_2/C_6 -Rate infundiert bekam. Somit scheint eine hohe C_2/C_6 -Rate die Hydrolyse durch α -Amylase zu erniedrigen. Zum gleichen Ergebnis kamen auch Treib *et al.* 1995. In ihrer Studie wurden Patienten mit cerebrovaskulären Erkrankungen mit HES-Produkten (HES 200/0,5) behandelt, die sich nur in ihrer C_2/C_6 -Rate unterschieden. Nach drei Tagen war die Plasmakonzentration in der Gruppe, die die Lösung mit niedriger C_2/C_6 -Rate erhielt,

niedriger als in der Vergleichsgruppe, und das *in-vivo*-Molekulargewicht im Plasma war deutlich erniedrigt.

1.5.3 Klinische Verwendung von HES

Mehr als 20 Jahre lang war HES 200/0,5, mit einigen lokalen Ausnahmen (HES 200/0,62, 70/0,5 und 450/0,7) das am meisten verwendete HES-Produkt in Europa. Generell ist HES das am meisten verwendete intravasale Volumenersatzmittel in Europa (Waitzinger *et al.* 2003). In den USA dagegen werden seit den sechziger Jahren, wenn überhaupt, ausschließlich die Hetastärke-Lösungen HES 450/0,7 oder 670/0,75 für die Volumenersatztherapie verwendet. HES wird nicht ausschließlich als Volumenersatzmittel verwendet, sondern auch zur Optimierung der Mikrozirkulation, wie etwa beim Einsatz in der Therapie eines akuten Hörsturzes (Klemm *et al.* 2007).

2 Material und Verfahren

2.1 Das Modell der isoliert perfundierten Mäuselunge

2.1.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere dienten 20 männliche C57 BL/6 Mäuse mit einem Körpergewicht von 25–32 g. Sie entstammten einer hauseigenen Zucht der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Versuche wurden dem Amt für Gesundheit und Verbraucherschutz-Lebensmittelsicherheit und Veterinärwesen der Behörde für Wissenschaft und Gesundheit der Freien und Hansestadt Hamburg angezeigt (Antragsnummer 81/08) und gemäß der Tierschutzbestimmungen an Wirbeltieren durchgeführt. Bis zu den Versuchen wurden die Tiere entsprechend den Richtlinien des deutschen Tierschutzgesetzes in der Versuchstierhaltung des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf in Käfigen mit freiem Zugang zu Wasser und Trockenfutter unter konstanten Bedingungen bei 24 °C, 50 % Luftfeuchtigkeit und einem zwölfstündigen Tag/Nachtrhythmus gehalten.

2.1.2 Präparation und Organentnahme

Um die Lunge isoliert perfundieren und ventilieren zu können, mussten Herz und Lunge en bloc aus der Maus explantiert werden. Zu Beginn erfolgte die Anästhesie des Versuchstiers. Diese wurde zunächst mittels Isofluran (Forene®, Abbott, Wiesbaden, Deutschland) *per inhalationem* eingeleitet. Zur Aufrechterhaltung der Narkose erfolgte die intraperitoneale Injektion von 0,04 mg S-Ketamin (Ketanest-S®, Fa. [Firma] Pfizer Pharma GmbH [Gesellschaft mit beschränkter Haftung], Karlsruhe, Deutschland) und 0,016 mg Xylazin (Rompun 2%®, Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland) pro Gramm Körpergewicht. Zusätzlich wurden 40 I.U. Heparin (Liquemin®, Hoffmann La Roche, Grenzach-Wyhlen, Schweiz) pro Gramm Körpergewicht injiziert. Nach Erreichen einer ausreichenden Narkosetiefe wurde die Maus zur Organentnahme auf den Rücken gelagert und an den Extremitäten fixiert. Anschließend erfolgte

die Freilegung der Trachea über einen medialen Längsschnitt der Haut kaudal des Larynx. Die Trachea wurde stumpf präpariert, indem die prätracheale Muskulatur auseinandergezogen wurde, um im Folgenden eine Ligatur (3.0 Leinenzwirn, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) unterhalb der Trachea hindurchführen zu können. Diese diente der Fixation des durch eine Tracheotomie eingeführten Polyvinylchlorid-Schlauches (Polythene Tubing 0.58 mm ID [innerer Durchmesser], 0.96 mm OD [äußerer Durchmesser], Fa. SIMS Portex Ltd. [Limited], Hythe, Vereinigtes Königreich) der ca. (circa) 4 mm in das Lumen vorgeschoben wurde. Nach Sicherung des Atemwegs wurde die Maus volumenkontrolliert mit Raumluft beatmet (Inspira asv, Harvard Apparatus, Holliston, Massachusetts, USA). Die Beatmung erfolgte konstant mit einer Frequenz von 100 Hüben pro Minute und einem Volumen von 0,6 cc je Hub (FiO_2 [Sauerstoffkonzentration]: 0,21, Endexpiratorischer Druck: 3 mmHg). Der Thorax wurde nun per Längssternotomie bis zur Tracheotomieinzision eröffnet und der rechte Ventrikel zur langsame Injektion von 400 I.U. Heparin punktiert (Fa. B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland). Anschließend wurde dem Tier via Herzpunktion ca. 1 ml Blut entnommen, das zur späteren Gewinnung von Erythrozyten aufbewahrt wurde.

Um eine extrakorporale Perfusion und ein kontinuierliches, hämodynamisches Monitoring einzurichten, wurden der linke Ventrikel und der *Truncus pulmonalis* katheterisiert. Hierfür wurde zunächst der Thymus entfernt, um die *Aorta ascendens*, den *Arcus aortae* und den *Truncus pulmonalis* darzustellen. Der *Truncus pulmonalis* wurde mit einer gebogenen Pinzette kurz oberhalb des Pulmonalisklappenniveaus unterfahren und mit einer losen Ligatur (3.0 Leinenzwirn, Fa. Ethicon, Norderstedt, Deutschland) versehen. Zur Katheterisierung wurde das Myokard des rechten Ventrikels an der vorhandenen Punktionsstelle eröffnet, ein Silikonkatheter (Polythene Tubing 0.58 mm ID, 0.96 mm OD, Fa. SIMS Portex Ltd., Hythe, Vereinigtes Königreich) orthograd in den *Truncus pulmonalis* vorgeschoben und anschließend mittels Ligatur fixiert. Der Katheter wurde durch die Füllung mit modifiziertem Krebs-Henseleit-Puffer sorgfältig luftblasenfrei gehalten. Zur Katheterisierung des linken Ventrikels wurde zunächst die Herzspitze mit einer stumpfen Pinzette gegriffen und ebenfalls mit einer losen Ligatur (2.0 Leinenzwirn, Fa. Ethicon, Norderstedt,

Deutschland) versehen. Anschließend erfolgte die Eröffnung des Myokards der linken Kammer, und ein Katheter (Polythene Tubing 0.75 mm ID, 1.22 mm OD, Fa. SIMS Portex Ltd., Hythe, Vereinigtes Königreich) wurde orthograd bis in die Aorta vorschoben. Auch hier erfolgte die Fixation mittels Ligatur.

Das Herz-Lungen-Präparat wurde nun entlang der Wirbelsäule aus dem Thorax präpariert, zusammen mit den Beatmungs- und Perfusionsschläuchen entnommen und direkt an das extrakorporale Perfusionssystem angeschlossen.

2.1.3 Extrakorporales Perfusionssystem

Das Herz-Lungen-Präparat wurde an das *ex-vivo*-Perfusionssystem angeschlossen und die Lungen, wie zuvor von Kieffmann *et al.* 2008 beschrieben, perfundiert. Hierfür wurde der endotracheale Tubus mit einem Flowmeter (Rotameter® MFG Co. [Compagnie] Ltd., England) verbunden. Unter Monitoring des Beatmungsdrucks wurden alle makroskopisch sichtbaren, atelektatischen Bereiche durch vorsichtiges Rekrutieren wieder entfaltet. Anschließend wurden die Lungen anstelle einer periodischen In- und Expiration mit einem kontinuierlichen Sauerstofffluss belüftet, um eine ebene, stillstehende Fläche für die spätere Mikroskopie zu gewährleisten. Hierfür wurde ein Gasgemisch verwendet, das die fehlende Produktion von Kohlendioxid durch den Körper ersetzte (0,6 l/min Sauerstoff; 1,2 l/min Stickstoff; 0,1 l/min Kohlendioxid). Während des gesamten Experiments wurde der Atemwegsdruck durch ein druckkontrolliertes Ventil am Flowmeter auf 8–10 mmHg gehalten.

Die Katheter aus dem *Truncus pulmonalis* und dem linken Ventrikel wurden über Plastikleitungen zu einem Kreislauf zusammengeschlossen. Die Leitungen waren über eine Luftblasenfalle, ein Reservoir und eine Rollerpumpe (ISM 833C, Ismetec, Glattburg, Schweiz) mit den explantierten Organen verbunden, und zwischengeschaltete Druckmesser erfassten die Werte für den pulmonalarteriellen- und den linksatrialen Druck (siehe Abbildung 2). Das Reservoir diente als Vorrats- und Auffangbehälter für das rezirkulierende Perfusat. Um physiologische Temperaturen zu gewährleisten, wurde das gesamte Perfusionssystem durch einen parallel laufenden und mit *Aqua destillata* gefüllten Wärmekreislauf auf etwa 38 °C erwärmt.

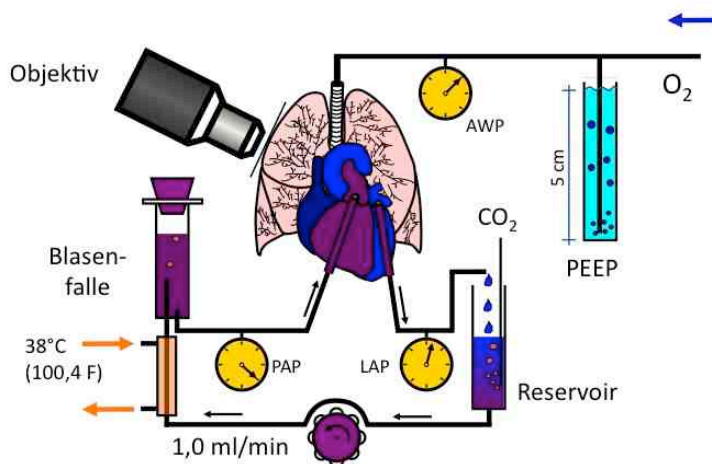


Abbildung 2: Perfusionssystem

AWP: Atemwegsdruck

LAP: Linksatrialer Druck

PAP: Pulmonalarterieller Druck

PEEP: Positiver endexpiratorischer Druck

2.1.4 Aufbereiten des Blutes

Das *via* Herzpunktion entnommene Vollblut wurde direkt nach Entnahme aus der rechten Herzkammer, wie zuvor von Kieffmann *et al.* 2008 beschrieben, sofort mit 2000 g bei 4 °C für 10 Minuten (Minispin, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert, um Plasmabestandteile von zellulären Anteilen des Blutes zu separieren. Der Plasmaüberstand sowie der Leukozytenfilm wurden vorsichtig abgesaugt. Im Anschluss erfolgte eine erneute Zentrifugation mit 40 g in Alsevers Pufferlösung. Dieser Vorgang wurde dreimal wiederholt und diente der Isolation und Reinigung der autologen Erythrozyten, bevor sie in die Krebs-Henseleit-Pufferlösung gegeben und dem Perfusionssystem beigelegt wurden. Bei Lungen, die mit Hydroxyethylstärke behandelt wurden, wurde ein Drittel der Krebs-Henseleit-Pufferlösung durch 6 % HES 130/0,4 oder 10 % HES 200/0,5 ersetzt.

2.2 Intravitale Videofluoreszenzmikroskopie

2.2.1 Aufbau des Mikroskops

Nach Anschluss der Lunge an das Perfusionssystem wurde diese unter ein Auflichtfluoreszenzmikroskop (Axiotech Vario, modifiziert, Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) positioniert. Als Lichtquelle des Mikroskops diente eine 100 W Quecksilber-Lampe (HBO 100 W, Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland). Die Videosequenzen wurden durch ein 20x Objektiv (Achromplan 20x/0,50 W Ph2, Fa. Zeiss, Göttingen, Deutschland) mit einer hochauflösenden und gekühlten Digitalkamera (CoolSNAP-HQ, Photometrics, Tucson, Arizona, USA) aufgenommen.

2.2.2 Färbung des Perfusats mit Fluoreszeinisothiocyanat

Zur Visualisierung der autologen, isolierten Erythrozyten wurde die Perfusionslösung mit 20 µl/ml Fluoreszeinisothiocyanat ([FITC], Fluorescein Isothiocyanate Isomer I Nummer F7250, Sigma Chemical Company, Saint Louis, USA) angefärbt, indem dieses direkt in die zirkulierende Lösung gegeben wurde. FITC (siehe Abbildung 3) ist ein wasserlöslicher, fluoreszierender Farbstoff, welcher nach Anregung mit blauem Licht (Absorptionsmaximum 496 nm) grünes Licht emittiert (520–530 nm). Der Farbstoff ist inert und biologisch harmlos (Römpf 1992). Nach Anfärben erscheinen die Erythrozyten in dem grün fluoreszierenden Perfusat als gut abgrenzbare, dunkle, runde Schatten (siehe Abbildung 12 und 15) und zeigen somit gut perfundierte Arteriolen, Venolen und Kapillaren an. Nicht perfundierte Mikrogefäße erscheinen entsprechend dunkel.

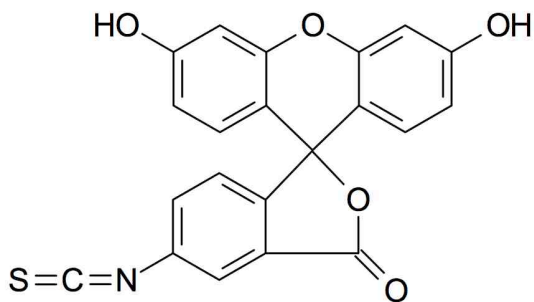


Abbildung 3: Fluoreszeinisothiocyanat (FITC)

2.2.3 Mikroskopieareal und Analyse der Bilddaten

Um die Erythrozyten gut darstellen zu können, wurden pro Experiment jeweils zwei Areale der Lunge untersucht, in denen Arteriolen, Kapillaren und Venolen besonders gut zu fokussieren und klar vom restlichen Lungengewebe abzugrenzen waren. Mithilfe der im Computer gespeicherten Koordinaten konnten die untersuchten Areale jederzeit exakt wieder aufgefunden werden. Bei jedem Experiment wurden zu den Zeitpunkten null und 90 Minuten pro Mikrogefäß jeweils 20-sekündige Videosequenzen aufgenommen.

Die Videosequenzen wurden von der Kamera an einen Personal Computer übertragen, mittels einer *Software* (MetaMorph® Imaging Software, Molecular Devices Corporation, Downingtown, Pennsylvania, USA) digital aufgezeichnet und auf DVD (*Digital Versatile Disc*) archiviert. Die Auswertung der videomikroskopischen Sequenzen erfolgte *off line* in einer computergestützten Einzelbildanalyse mithilfe des digitalen Bildverarbeitungssystems MetaMorph® (MetaMorph®, Molecular Devices Corporation, Downingtown, Pennsylvania, USA).

2.3 Erfassung von Messgrößen

2.3.1 Gemessene Parameter

Während der Versuche wurden der pulmonalarterielle Druck, der Atemwegsdruck und der linksventrikuläre Druck kontinuierlich bestimmt. Der linksventrikuläre Druck ist in unseren Versuchen dem linksatrialen Druck gleichzusetzen, da die Klappenebene aufgrund der Katheterisierung des linken Ventrikels permanent offen blieb. Die Messung des Kohlendioxid- und Sauerstoffpartialdrucks sowie des pH-Werts erfolgte diskontinuierlich aus Perfusatproben mittels Blutgasanalysator (Radiometer ABL 505, Radiometer OSM 3, Radiometer Copenhagen, Willich, Deutschland). Der Hämatokrit wurde bei jedem Versuch durch Zentrifugation (Hettich Haematokrit, Hettich, Tullingen, Deutschland) einer Perfusatprobe bestimmt und betrug bei allen Experimenten ca. 5 %.

2.3.2 Erythrozytenfließgeschwindigkeit in der Mikrozirkulation

Die Bestimmung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{RBC}) erfolgte zu den Versuchszeitpunkten null und 90 Minuten in je zwei Arteriolen, Kapillaren und Venolen pro Versuch. Hierfür wurden die jeweiligen Videoabschnitte in der von Kuhnle *et al.* beschriebenen modifizierten Methode analysiert (Kuhnle *et al.* 1995). In den entsprechenden Bildsequenzen wurde die von den Erythrozyten zurückgelegte Wegstrecke Δs und das dafür benötigte Zeitintervall Δt gemessen. Die Geschwindigkeit der einzelnen Erythrozyten v_{RBC} ergab sich als Quotient aus Wegstrecke Δs und der dafür benötigten Zeit Δt (siehe Gleichung 1). Es wurden pro Gefäß mindestens zehn Erythrozyten beobachtet und analysiert. Die dargestellten Erythrozytengeschwindigkeiten sind das harmonische Mittel der Einzelgeschwindigkeiten.

$$\overline{V}_{\text{RBC}} = n \times \frac{1}{\sum \frac{1}{v_{1, \dots, n}}}$$

Gleichung 1: Berechnung der Erythrozytenfließgeschwindigkeit

- v_{RBC} : harmonisches Mittel der Einzelgeschwindigkeiten
- n : Anzahl der gemessenen Erythrozyten
- $v_{1, \dots, n}$: Geschwindigkeit der Einzelerthrozyten

2.3.3 Ödembildung

Die pulmonale Ödembildung wurde mithilfe von Fluoreszenzmikroskopie qualitativ bestimmt. Ödematöse, interstitielle Regionen der Lunge leuchten unter dem Fluoreszenzmikroskop durch die Extravasation von FITC, während der Farbstoff in Lungen ohne Ödembildung intravaskulär bleibt.

Als Marker für interstitielle Ödembildung wurde die Breite des Interstitiums zwischen zwei Alveolen gemessen. Hierfür wurden die fluoreszenzmikroskopischen Videosequenzen jeder Versuchsgruppe nach 90-minütiger Perfusion *off line* mit einer Bildbearbeitungssoftware (MetaMorph®, Molecular Devices,

Downingtown, Pennsylvania, USA) ausgewertet. Im Standbild wurden die Außenwände der benachbarten Alveolen graphisch markiert und die Distanz mithilfe eines digitalen Maßstabs ausgemessen. Dies geschah in drei verschiedenen Arealen jeder Lunge. Die Weite der Alveolarsepten wurde als harmonisches Mittel aus 15 Einzelmessungen beschrieben.

2.3.4 Viskosität der Perfusionslösung

Am Ende jedes Experiments wurden Proben aus der Perfusionslösung genommen und mit 40 g (Minispin, Eppendorf, Hamburg, Deutschland) zentrifugiert. Hierdurch wurden die roten Blutkörperchen von der Lösung separiert. Im Anschluss konnte die Viskosität mittels Kapillarviskosimeter (Rheomat, Fresenius, Bad Homburg, Deutschland) bestimmt werden.

2.3.5 *Fluorescence Activated Cell Sorting*-Analyse

Um den Effekt von Heparinase auf die Degradation der Glykokalyx verifizieren und einen Einfluss von HES bzw. (beziehungsweise) der Perfusionslösung auf die Aktivität des Enzyms ausschließen zu können, führten wir eine *Fluorescence Activated Cell Sorting*-Analyse (FACS-Analyse) durch. Hierfür wurden mikrovaskuläre Endothelzellen der menschlichen Lunge (HPMEC [C-12282, PromoCell GmbH, Heidelberg, Deutschland]) unter Standardbedingungen kultiviert und mittels Accutase®-Lösung (Sigma, Saint Louis, USA) isoliert. Anschließend wurden die Zellen für 12 Stunden, bei 37 °C und unter 5 % CO₂, in der von uns verwendeten Perfusionslösung inkubiert. Zusätzlich wurde der Perfusionslösung einer Zellkultur das in den Perfusionsversuchen verwendete HES 130/0,4 (Voluven®, Dosis entsprechend den Versuchen) beigemischt. Beide Zellkulturen wurden jeweils mit und ohne Heparinase I behandelt (0,2 mU/ml Heparinase I). Um den Gehalt an Heparansulfat Epitopen als Bestandteil der Glykokalyx ermitteln zu können, wurden 300.000 Zellen mit Anti-humanen Heparansulfat(10E4 Epitope-)Antikörpern der Maus (US Biological, Swampscott, Massachusetts, USA) über Nacht, bei 4 °C inkubiert. Zur Isotypen-Kontrolle wurden IgM, K (BioLegend, San Diego, USA) verwendet. Diese beiden Zellreihen wurden danach für 30 Minuten auf Eis mit Anti-Maus K-FITC-

Antikörpern (Rockland, Gilbertsville, USA) behandelt. Nach jedem Schritt wurden die Zellen zweifach mit *PBS/0.1% bovine serum albumin* (BSA [Biochrom AG Berlin, Deutschland; Sigma, Saint Louis, USA]) in 0,05 % Natriumazid-Lösung (Sigma, Saint Louis, USA) gewaschen.

2.4 Applizierte Substanzen

2.4.1 Heparinase I

Das Enzym Heparinase I des *Flavobacterium Heparinum* degradiert die endotheliale Glykokalyx, indem es selektiv Heparansulfate vom Grundgerüst abspaltet (Chappell *et al.* 2008b). In unseren Experimenten wurde der Perfusionslösung 1 mU/ml (= 6 Sigma-Units/ml) Heparinase I (Heparinase I, Sigma, Saint Louis, USA) zugegeben (siehe Abbildung 5). Die genaue Wirkungsweise von Heparinase I ist im entsprechenden Abschnitt dieser Arbeit beschrieben (siehe Kapitel 4.2).

2.4.2 HES 130/0,4

Für eine Versuchsgruppe wurde die Tetrastärke-Lösung 6 % HES 130/0,4 (Voluven®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verwendet, indem sie der Perfusionslösung direkt zugefügt wurde (siehe Abbildung 5).

Voluven zeigt ein mittleres molekulares Gewicht von 130 kDa und einen mittleren Substitutionsgrad von 0,4. Die von uns verwendete Lösung hat eine Konzentration von 6 % und ist somit normoonkotisch. Die C₂/C₆-Rate beträgt 9:1. Das verwendete Lösungsmittel ist unbalanciert, somit ist diese HES in salzhaltiger Lösung gelöst. Die maximale Tagesdosis für den Menschen beträgt 50 ml/kg Körpergewicht. Bei 6 % HES 130/0,4 beträgt die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) 3,7 mg/ml, die initiale Halbwertszeit (T_{1/2a}) 1,39 Stunden und die terminale Halbwertszeit (T_{1/2b}) 12,1 Stunden. Die Halbwertszeit für die Elimination aus dem zentralen Kompartiment (T_{1/2central}) beträgt 1,55 Stunden bei einer Clearance von 31,4 ml/min (Waitzinger *et al.* 1998). Voluven® hat ihren Ursprung in wachsartiger Maisstärke. Eine erwachsene Person mit einem Kör-

pergewicht von 80 kg kann etwa 4000 ml Voluven® oder 2400 ml HES-steril® (siehe Kapitel 2.3.4) pro Tag erhalten. Das wäre mehr als ein Drittel des Blutvolumens von ca. 70 ml/kg Körpergewicht. Aus diesem Grund wurde ein Drittel der Perfusionslösung der entsprechenden Versuchsreihen gegen HES 130/0,4 oder HES 200/0,5 ausgetauscht, da so eine realistische Simulation der Therapie eines hypovolämen Patienten geschaffen wurde. Wir gaben HES vor Schädigung der Glykokalyx, wie es auch klinisch bei seinem Einsatz vor Reperfusion, etwa bei Bypass-Operationen, Organtransplantationen und Thrombektomien, gegeben wird (Rehm *et al.* 2007).

2.4.3 HES 200/0,5

In der anderen Versuchsgruppe wurde die Pentastärke-Lösung 10 % HES 200/0,5 (HES-steril®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) verwendet. Diese zeigt ein hohes molekulares Gewicht von 200 kDa und einen hohen Substitutionsgrad von über 0,5. Die verwendete Lösung hat eine Konzentration von 10 % und ist somit hyperonkotisch. Die C_2/C_6 -Rate beträgt 5:1. Das verwendete Lösungsmittel ist unbalanciert, somit ist auch diese HES in salzhaltiger Lösung gelöst. Die maximale Tagesdosis für den Menschen beträgt 20 ml/kg Körpergewicht. Bei 10 % HES 200/0,5 beträgt die maximale Plasmakonzentration (C_{max}) 8,0 mg/ml, die initiale Halbwertszeit ($T_{1/2a}$) 3,35 Stunden und die terminale Halbwertszeit ($T_{1/2b}$) 30,6 Stunden. Die Halbwertszeit für die Elimination aus dem zentralen Kompartiment ($T_{1/2central}$) beträgt 7,12 Stunden bei einer Clearance von 9,24 ml/min (Weidler *et al.* 1991). HES-steril hat ihren Ursprung in wachsartiger Maisstärke.

2.5 Einschlusskriterien

Die Lungen wurden zunächst unter Monitoring des pulmonalarteriellen Drucks schrittweise mit Krebs-Henseleit-Pufferlösung reperfundiert. Im Anschluss erfolgte eine kontinuierliche Perfusion mit rezirkulierender Krebs-Henseleit-Pufferlösung (1 ml/min). Für die Experimente wurden nur Organe verwendet, die während einer *Steady State*-Periode von zehn Minuten physiologische und

stabile pulmonalarterielle Drücke zeigten und weder persistierenden Atelektasen noch sichtbare Parenchymschäden aufwiesen. Wurde diese Phase entsprechend der gestellten Anforderungen durchlaufen, wurden die Lungen randomisiert in fünf Gruppen (jede Gruppe n=5 [Umfang der Stichprobe]) eingeteilt, und es schloss sich mit dem Zeitpunkt null beginnend die eigentliche Versuchszeit an. Die Lungen aller Versuchsgruppen wurden 90 Minuten mit einer konstanten Rate von 1 ml/min mit Erythrozyten enthaltender Krebs-Henseleit-Pufferlösung rezirkulierend perfundiert. Dabei wurde dem Perfusionssystem bis Versuchende kein frisches Perfusat mehr beigemischt.

2.6 Versuchsprotokoll

2.6.1 Kontrollversuche (n=5)

In dieser Versuchsgruppe wurden die Lungen, nach Durchlaufen der *Steady State*-Periode, 90 Minuten lang ohne weitere Interventionen mit Erythrozyten enthaltender Krebs-Henseleit-Pufferlösung perfundiert (siehe Abbildung 4).

2.6.2 Versuche unter Zugabe von Heparinase I (n=5)

Bei gleichen Bedingungen wie in der Kontrollgruppe wurden zum Zeitpunkt 15 Minuten zusätzlich 5 U/ml (Sigma-Units) Heparinase I (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) in das Perfusionssystem injiziert (siehe Abbildung 4).

2.6.3 Versuche unter Zugabe von 6 % HES 130/0,4 und Heparinase I (n=5)

In dieser Versuchsgruppe wurde vor dem Zeitpunkt null Minuten ein Drittel der Perfusatlösung gegen 6 % Hydroxyethylstärke 130/0,4 (Voluven ®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) ausgetauscht. Wieder wurde zum Zeitpunkt 15 Minuten 5 U/ml (Sigma-Units) Heparinase I (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) zugegeben (siehe Abbildung 4).

2.6.4 Versuche unter Zugabe von 10 % HES 200/0,5 und Heparinase I (n=5)

Bei sonst identischem Vorgehen wie in der dritten Versuchsgruppe wurde statt 6 % HES 130/0,4, nun ein Drittel 10 % HES 200/0,5 (HES-steril ®, Fresenius Kabi, Bad Homburg, Deutschland) der Perfusatlösung beigelegt. Auch hier wurde zum Zeitpunkt 15 Minuten 5 U/ml (Sigma-Units) Heparinase I (Sigma, Saint Louis, Missouri, USA) zugegeben (siehe Abbildung 4).

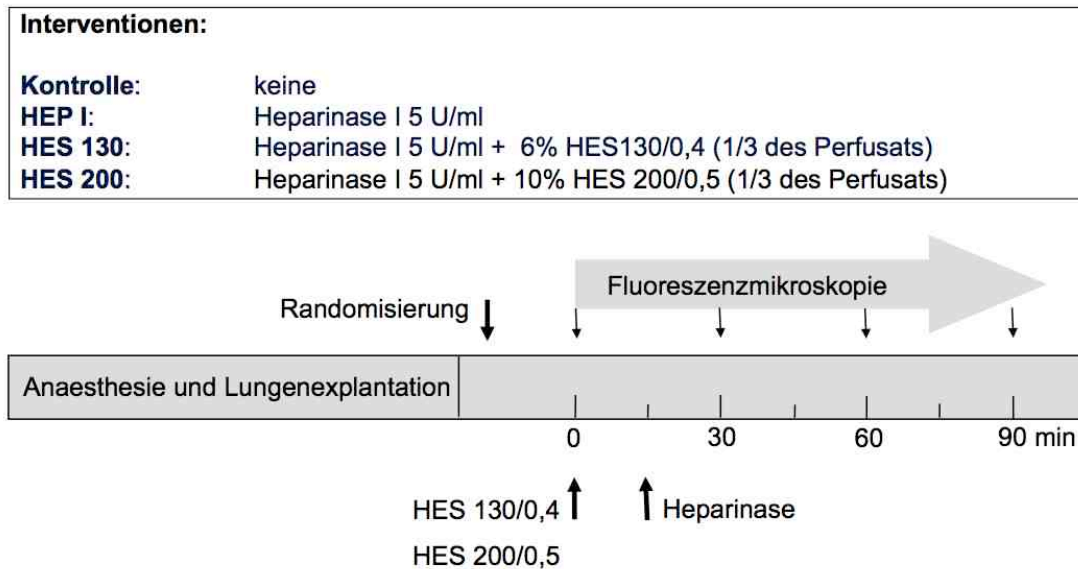


Abbildung 4: Versuchsprotokoll

2.7 Rezeptteil

2.7.1 Reagenzien/Pharmaka

Isofluran	Forene ®, (Abbott, Wiesbaden, Deutschland)
S-Ketamin	Ketanest-S ®, (Fa. Pfizer Pharma GmbH, Karlsruhe, Deutschland)
Xylazin	Rompun 2 % ®, (Fa. Bayer Vital GmbH, Leverkusen, Deutschland)

2.7.4 Pufferlösungen

45 ml Alsever Pufferlösung enthalten:

Glukose	20,5 g
Natriumcitrat	8,0 g
Zitronensäure	0,6 g
H ₂ O ad 1000 ml	

Bicine Puffer bei einem pH-Wert von 8,3:

Bicine	3,264 g
NaCl	8,766 g
NaOH	10 ml 1 N
H ₂ O ad 1000 ml	

2.7.5 Materialien

Trachealtubus	Portex Non Sterile Polythene Tubing 0.58 mm ID; 0.96 mm OD, Fa. SIMS Portex Ltd., Sigma, Hythe, Vereinigtes Königreich
<i>Arteria pulmonalis</i> -Katheter	Portex Non Sterile Polythene Tubing 0.58 mm ID; 0.96 mm OD, Fa. SIMS Portex Ltd, Sigma, Hythe, Vereinigtes Königreich
Linksventrikulärer Katheter	Portex Non Sterile Polythene Tubing 0.75 mm ID; 1.22 mm OD, Fa. SIMS Portex Ltd., Sigma, Hythe, Vereinigtes Königreich

2.8 Statistische Verfahren

Die Datenauswertung erfolgte mit dem Statistikprogramm SigmaStat[®] von Jandel (Erkrath, Deutschland). Die Daten sind als Medianwerte +25 %/75 % Quartilsintervall oder, falls die Daten normalverteilt sind, als Mittelwert +/- Standardabweichung angegeben. Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen wurden durch multiplen, paarweisen Vergleich und ANOVA on Ranks ermittelt und Werte für p (Signifikanzwert) $< 0,05$ als signifikant gewertet. Die graphische Darstellung erfolgte mithilfe des Programms StatGraphics[®] (Statpoint Technologies, Warrenton, Virginia, USA).

3 Ergebnisse der Perfusionsversuche

3.1 Verhalten der Fließgeschwindigkeit von Erythrozyten in subpleuralen Lungengefäßen

3.1.1 Fließgeschwindigkeit in Arteriolen zum Zeitpunkt null Minuten

Unter Standardbedingungen emittierten die Arteriolen aller Versuchsgruppen, durch das zirkulierende FITC, grünes Licht und wurden somit als perfundierte Gefäße identifiziert. In der Kontrollgruppe wurde eine Erythrozytenfließgeschwindigkeit (v_{RBC}) von 599 $\mu\text{m/s}$ (447–707) in den Arteriolen gemessen. In der Gruppe, die 15 Minuten nach Versuchsbeginn mit Heparinase I behandelt wurde, betrug die v_{RBC} in den Arteriolen zum Zeitpunkt null Minuten 465 $\mu\text{m/s}$ (365–645). In der mit HES 130 behandelten Gruppe betrug die v_{RBC} 483 $\mu\text{m/s}$ (381–586) und in der mit HES 200 behandelten Gruppe 289 $\mu\text{m/s}$ (255–380) (siehe Abbildung 5). Hieraus ergibt sich für die mit HES 200 behandelten Organe zum Zeitpunkt null Minuten eine signifikant ($p < 0,05$) langsamere Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in Arteriolen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Die v_{RBC} in den anderen Versuchsgruppen unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

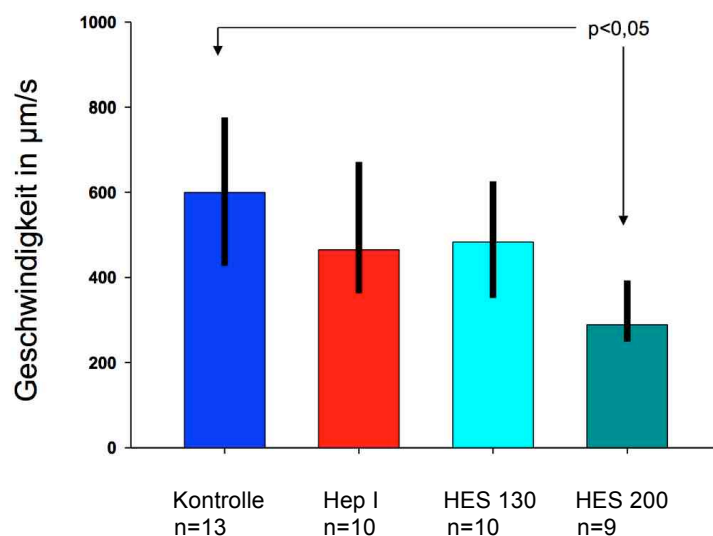


Abbildung 5: Fließgeschwindigkeit in Arteriolen zum Zeitpunkt null Minuten

3.1.2 Fließgeschwindigkeit in Kapillaren zum Zeitpunkt null Minuten

In den Kapillaren der Kontrollgruppe betrug die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten, unter Standardbedingungen zum Zeitpunkt null Minuten 553 $\mu\text{m/s}$ (464–643). In der Hep I Gruppe wurde 15 Minuten vor Injektion des Enzyms eine Geschwindigkeit von 580 $\mu\text{m/s}$ (546–598), in der mit HES 130 behandelten Gruppe eine Geschwindigkeit von 565 $\mu\text{m/s}$ (522–590) und in der mit HES 200 behandelten Gruppe eine Geschwindigkeit von 444 $\mu\text{m/s}$ (289–511) gemessen (siehe Abbildung 6). Die v_{RBC} war in allen Versuchsgruppen vergleichbar.

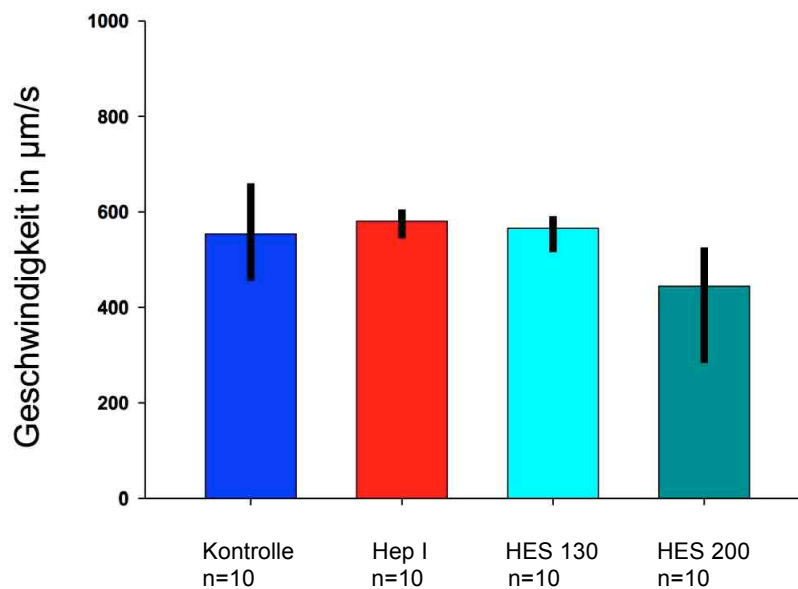


Abbildung 6: Fließgeschwindigkeit in Kapillaren zum Zeitpunkt null Minuten

3.1.3 Fließgeschwindigkeit in Venolen zum Zeitpunkt null Minuten

Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in den Venolen betrug zum Zeitpunkt null Minuten unter Standardbedingungen 1162 $\mu\text{m/s}$ ($\pm$ 361). In der Hep I-Gruppe betrug die v_{RBC} , 15 Minuten vor Injektion des Enzyms, 1024 $\mu\text{m/s}$ ($\pm$ 275). In den mit HES 130 behandelten Organen betrug die v_{RBC} 1037 $\mu\text{m/s}$ ($\pm$ 263) und in den mit HES 200 731 $\mu\text{m/s}$ ($\pm$ 304) (siehe Abbildung 7). Hieraus ergibt sich eine signifikant höhere Fließgeschwindigkeit in den Venolen aller Versuchsreihen im Vergleich zu der Geschwindigkeit der Erythrozyten in den Arteriolen und Alveolarkapillaren (siehe Abbildung 11). Wie auch in Arteriolen, war die v_{RBC} in den Venolen der HES 200-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) langsamer im Vergleich zur Kontrollgruppe. Zusätzlich war der Blutfluss inkonstant während der Versuchszeit. Die Geschwindigkeiten der Erythrozyten in der Kontroll-, Heparinase I- und der HES 130-Gruppe unterschieden sich nicht signifikant voneinander.

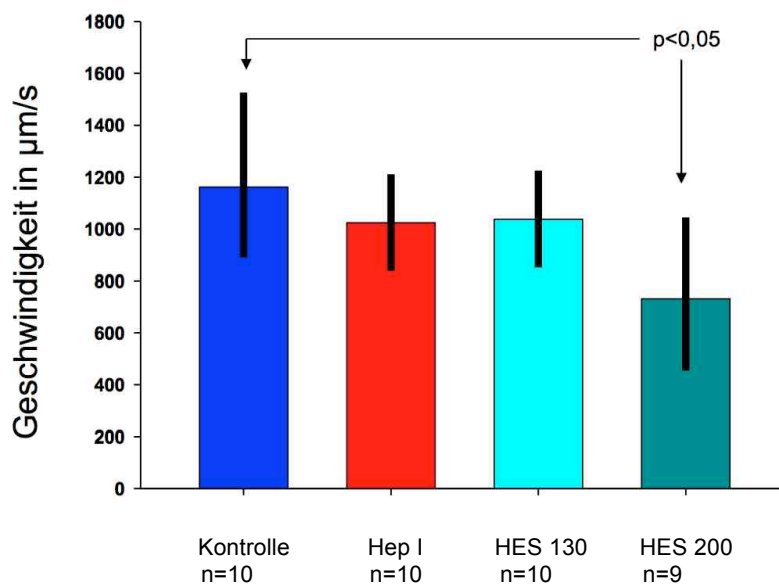


Abbildung 7: Fließgeschwindigkeit in Venolen zum Zeitpunkt null Minuten

3.1.4 Fließgeschwindigkeit in Arteriolen zum Zeitpunkt 90 Minuten

In der Kontrollgruppe wurde zum Zeitpunkt 90 Minuten eine Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten von 406 $\mu\text{m/s}$ (362–680) in Arteriolen gemessen. In der HES 130-Gruppe betrug die Geschwindigkeit 502 $\mu\text{m/s}$ (0–702) und in der HES 200-Gruppe 292 $\mu\text{m/s}$ (0–452). In der mit Heparinase I behandelten Gruppe wurde eine komplette Stase des Perfusatflusses beobachtet (siehe Abbildung 8). Das Enzym wurde 15 Minuten nach Versuchsbeginn in der Hep I-, der HES 130- und der HES 200-Gruppe direkt in die Perfusionslösung gegeben. Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in der Kontrollgruppe unterschied sich nicht signifikant von der v_{RBC} in der HES-130 Gruppe. Ebenfalls unterschieden sich die v_{RBC} in der mit Heparinase I und der mit HES 200 behandelten Gruppe nicht signifikant voneinander. Die Erythrozytengeschwindigkeit in der Kontrollgruppe und der mit HES 130 behandelten Gruppe war signifikant ($p < 0,05$) höher als die Erythrozytengeschwindigkeit in der Hep I-Gruppe. Im Vergleich zu den unter Standardbedingungen gemessenen Geschwindigkeiten fiel die v_{RBC} der Kontrollgruppe um 193,5 $\mu\text{m/s}$ ab. In der Hep I-Gruppe kam es zur Stase. Die v_{RBC} der HES 130-Gruppe stieg um 19 $\mu\text{m/s}$ an und die v_{RBC} der HES 200-Gruppe um 3,5 $\mu\text{m/s}$ (siehe Abbildung 11). Somit ergibt sich nur für die Hep I-Gruppe aufgrund der Stase eine signifikant veränderte v_{RBC} im Vergleich zum Zeitpunkt null Minuten.

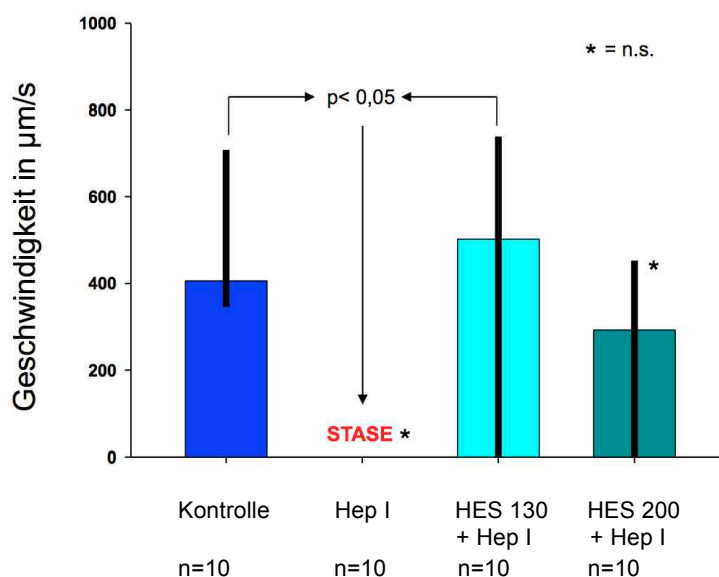


Abbildung 8: Fließgeschwindigkeit in Arteriolen zum Zeitpunkt 90 Minuten

3.1.5 Fließgeschwindigkeit in Kapillaren zum Zeitpunkt 90 Minuten

In der Kontrollgruppe wurde eine v_{RBC} von 502 $\mu\text{m/s}$ (451–671) erreicht und in der mit HES 130 behandelten Gruppe eine Geschwindigkeit von 490 $\mu\text{m/s}$ (382–520). Die Geschwindigkeit in der mit HES 200 behandelten Gruppe betrug 275 $\mu\text{m/s}$ (0–437). Auch in Kapillaren kam es in der mit Heparinase I behandelten Gruppe nach Injektion des Enzyms zum Zeitpunkt 15 Minuten zu einer kompletten Stase (siehe Abbildung 9). Das Enzym wurde in der Hep I-, der HES 130- und der HES 200-Gruppe direkt in die Perfusionslösung gegeben. Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in der Kontrollgruppe unterschied sich nicht signifikant von der in der HES 130-Gruppe gemessenen v_{RBC} . Auch unterschieden sich die v_{RBC} in der mit Heparinase I und der mit HES 200 behandelten Gruppe nicht signifikant voneinander. In der Kontrollgruppe und der HES 130 behandelten Gruppe war die Erythrozytengeschwindigkeit signifikant ($p < 0,05$) höher als die v_{RBC} in der Heparinase I-Gruppe. Im Vergleich zu den unter Standardbedingungen gemessenen Geschwindigkeiten fiel die v_{RBC} der Kontrollgruppe um 51,5 $\mu\text{m/s}$ ab. In der Hep I-Gruppe kam es zur Stase. Die v_{RBC} der HES 130-Gruppe fiel um 75,5 $\mu\text{m/s}$ und die v_{RBC} der HES 200-Gruppe um 169,5 $\mu\text{m/s}$ ab (siehe Abbildung 11). Hieraus ergibt sich für die Hep I-Gruppe aufgrund der Stase eine signifikant veränderte v_{RBC} im Vergleich zum Zeitpunkt null Minuten.

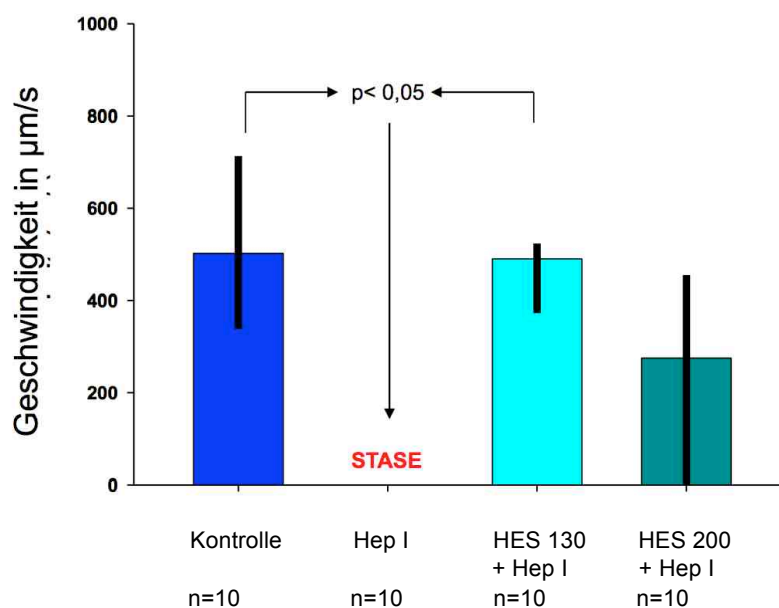


Abbildung 9: Fließgeschwindigkeit in Kapillaren zum Zeitpunkt 90 Minuten

3.1.6 Fließgeschwindigkeit in Venolen zum Zeitpunkt 90 Minuten

Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in Venolen war inkonstant und nach 90 Minuten meist langsamer als nach Beginn des Experiments. Es waren teilweise Venolen zu beobachten, die nach zeitweiliger kompletter Stase wieder reperfundiert wurden. Da diese mikroskopischen Beobachtungen nur in den bewegten Videosequenzen sichtbar sind, lassen sie sich nur schwer statistisch darstellen. Die Analyse ergab eine v_{RBC} von 169 $\mu\text{m/s}$ (0–758) in der Kontrollgruppe und eine v_{RBC} von 467 $\mu\text{m/s}$ (0–779) in der HES 130-Gruppe. In der HES 200-Gruppe zeigten die Erythrozyten eine v_{RBC} von 246 $\mu\text{m/s}$ (0–626). Erneut zeigte sich in der überwiegenden Zahl der Venolen eine komplette Stase in der Hep I-Gruppe (siehe Abbildung 10). Das Enzym war 15 Minuten nach Versuchsbeginn in der Hep I-, der HES 130- und der HES 200-Gruppe direkt in das Perfusionssystem injiziert worden. Erythrozyten in Kontroll- und mit HES 130 behandelten Lungen flossen signifikant ($p < 0,05$) schneller als Erythrozyten in mit Heparinase I behandelten Lungen. Die v_{RBC} in der mit Hep I und der mit HES 200 behandelten Gruppe unterschieden sich nicht signifikant voneinander. Im Vergleich zu den unter Standardbedingungen gemessenen Geschwindigkeiten fiel die v_{RBC} der Kontrollgruppe um 992,3 $\mu\text{m/s}$ ab. In der Hep I-Gruppe kam es zur Stase. Die v_{RBC} der HES 130-Gruppe fiel um 570 $\mu\text{m/s}$ und die der HES 200-Gruppe um 485,33 $\mu\text{m/s}$ ab (siehe Abbildung 11).

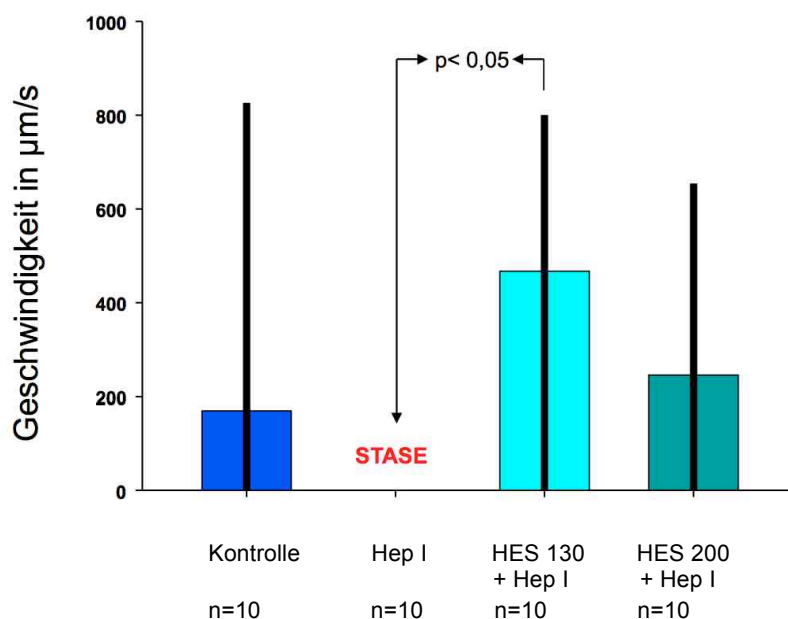
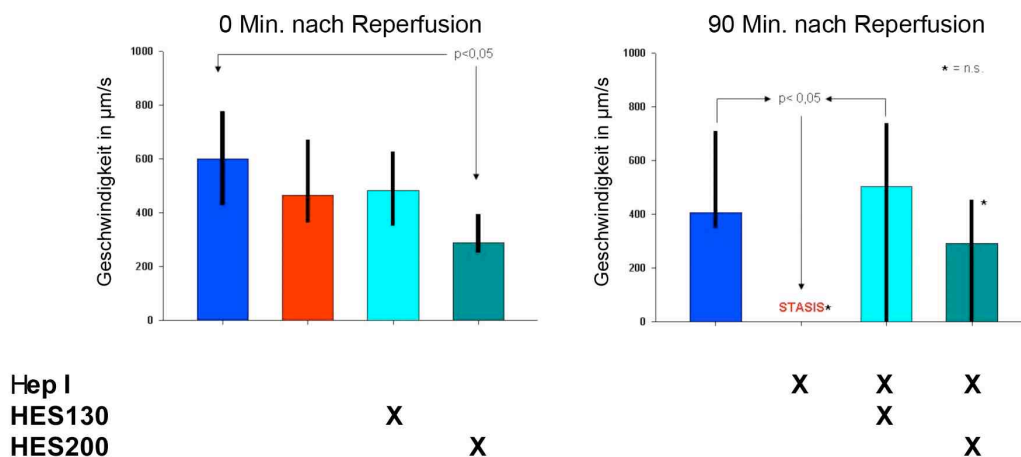
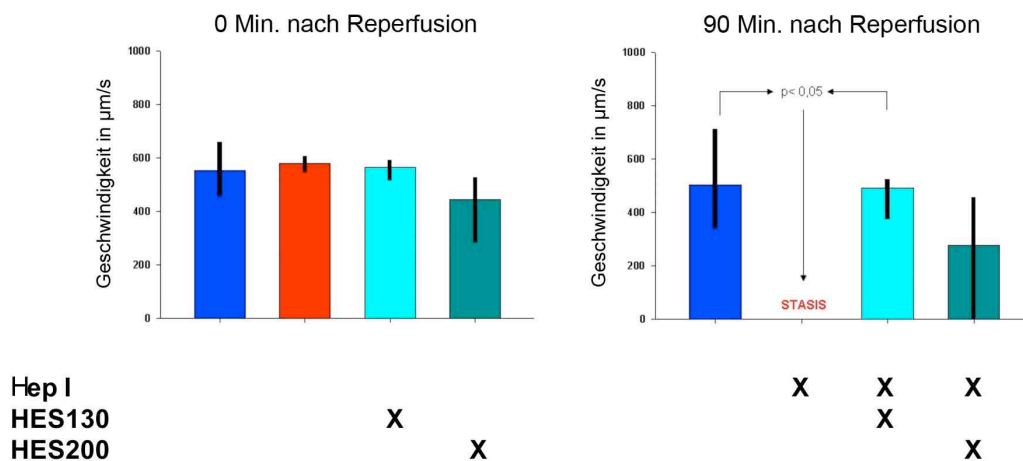


Abbildung 10: Fließgeschwindigkeit in Venolen zum Zeitpunkt 90 Minuten

Fließgeschwindigkeit in Arteriolen



Fließgeschwindigkeit in Kapillaren



Fließgeschwindigkeit in Venolen

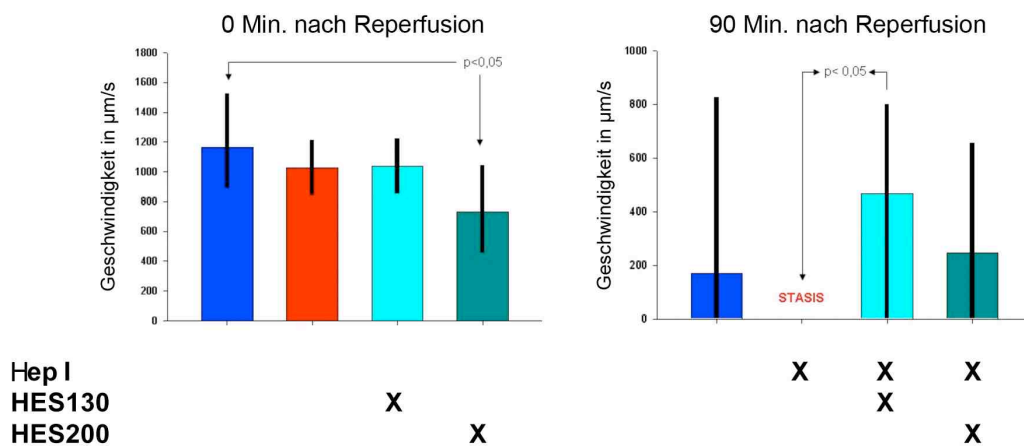


Abbildung 11: Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten im Vergleich

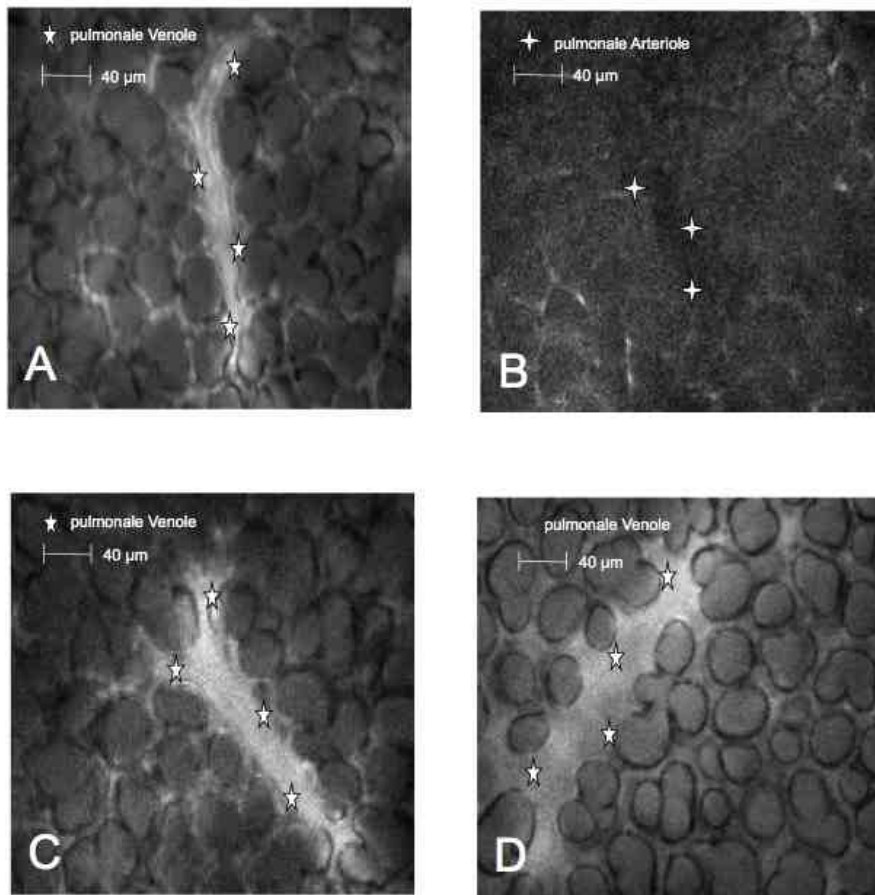


Abbildung 12: Exemplarische videomikroskopische Bilder 90 Minuten nach Re-perfusion :

A) Kontrollgruppe: subpleurale Venole. Charakteristische Negativkontrast-Spuren im FITC-gefärbten Perfusat zeigen eine hohe Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten an.

B) Heparinase I-Gruppe: subpleurale Arteriole. Fehlende FITC-Fluoreszenz zeigt ein nicht perfundiertes Gebiet an.

C) HES 130-Gruppe: subpleurale Venole: Charakteristische Negativkontrast-Spuren zeigen eine hohe Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten wie in der Kontrollgruppe (A) an.

D) HES 200-Gruppe: subpleurale Venole: Langsam fließende Erythrozyten hinterlassen keine Negativkontrast-Spuren im FITC-gefärbten Perfusat.

3.2 Verhalten der Perfusionsdrücke

Während aller Versuche wurden kontinuierlich der pulmonalarterielle Druck, der linksventrikuläre Druck und der Atemwegsdruck gemessen. Da der Atemwegsdruck auf 8–10 mmHg eingestellt wurde, blieb dieser während aller Versuchsreihen konstant. Der linksventrikuläre Druck schwankte in allen Versuchsreihen von 0–2 mmHg. Der pulmonalarterielle Mitteldruck lag bei Versuchsbeginn zwischen 10–14 mmHg und veränderte sich über die Versuchszeit in der Kontrollgruppe und in den mit HES 130 und 200 behandelten Lungen nicht signifikant. In den mit Heparinase I behandelten Organen verdoppelte sich der pulmonalarterielle Druck bis zu Versuchsende auf 19 mmHg und höher, nachdem das Enzym der Perfusionslösung zugegeben wurde (siehe Abbildung 13). Der pulmonalarterielle Mitteldruck war nach 90-minütiger Perfusion in der Heparinase I-Gruppe signifikant höher ($p < 0,05$) als in den andern drei Versuchsgruppen, die sich voneinander nicht signifikant unterschieden.

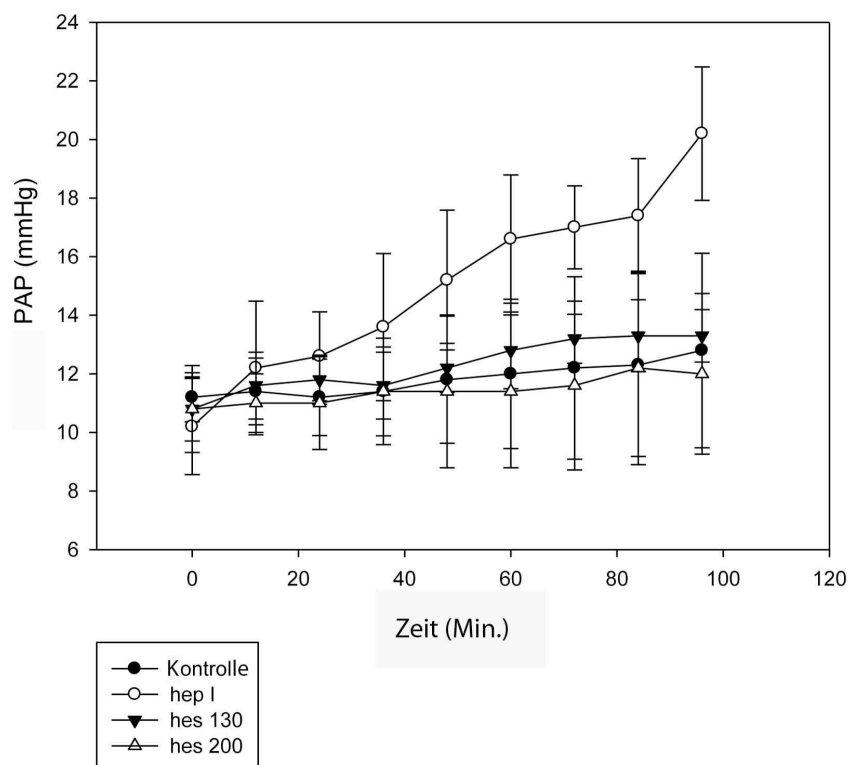


Abbildung 13: Pulmonalarteriendruck

3.3 Ödembildung

Die Breite des Interstitiums zwischen zwei benachbarten Alveolen betrug in der Kontrollgruppe zum Zeitpunkt 90 Minuten 19 μm (+/- 4). In der mit HES 130 behandelten Gruppe betrug die Alveolarseptenbreite 18 μm (+/- 3) und in der mit HES 200 behandelten Gruppe 19 μm (+/- 5). Es zeigte sich kein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit HES 130 bzw. 200 behandelten Gruppen. Im Gegensatz dazu vergrößerte sich die Distanz der Alveolen signifikant ($p < 0,05$) auf 26 μm (+/- 9) in der mit Heparinase I behandelten Gruppe (siehe Abbildung 14) und zeigte somit die Ausprägung eines interstitiellen Ödems der Lunge an. Ebenso erschien das Interstitium durch den Austritt von FITC in der Heparinase I-Gruppe unter dem Fluoreszenzmikroskop erleuchtet. Bei Gruppen, die keine Heparinase I erhielten oder die mit HES vorbehandelt wurden, blieb der Farbstoff intravasal, und somit erschien das Interstitium dunkel (siehe Abbildung 15).

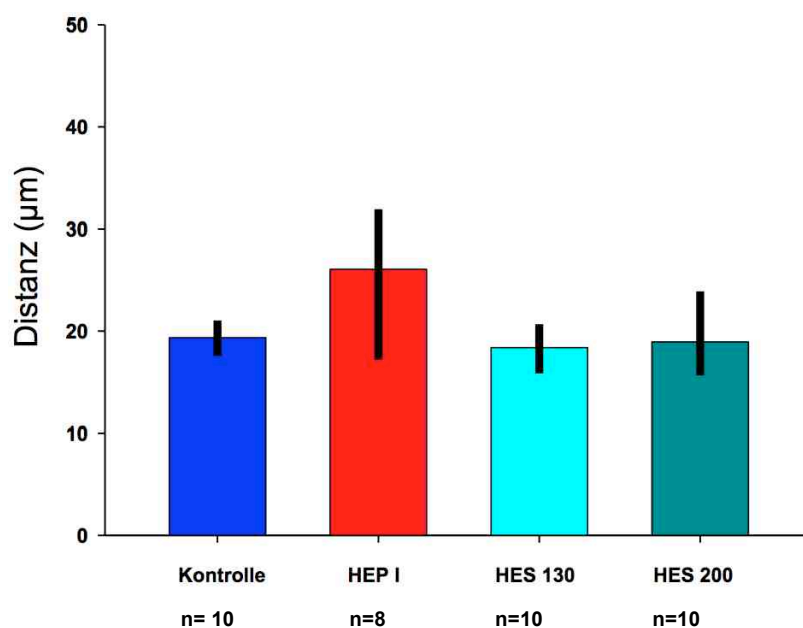


Abbildung 14: Breite des Interstitiums zwischen benachbarten Alveolen nach 90 Minuten

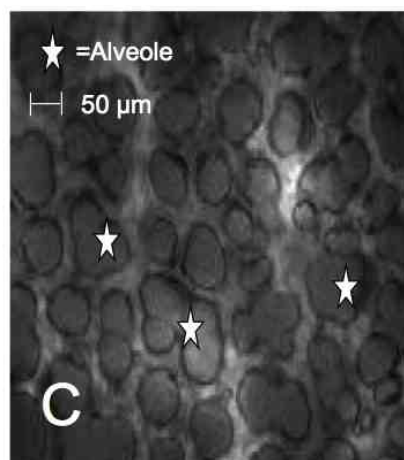
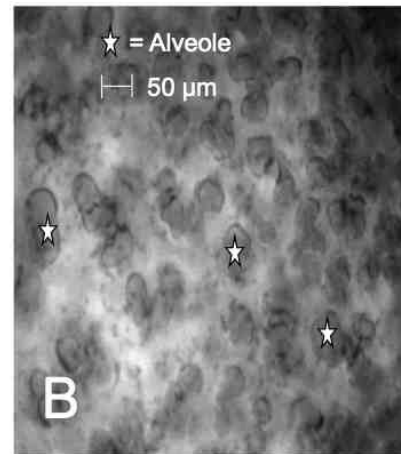
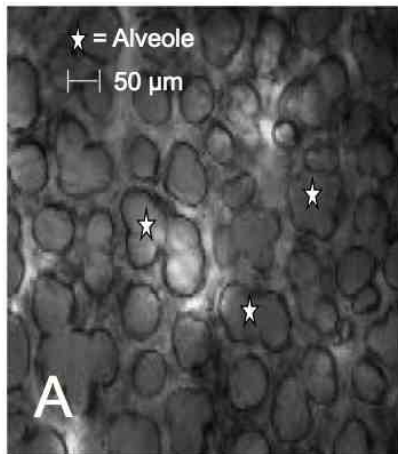


Abbildung 15: Exemplarische videomikroskopische Bilder nach 90-minütiger Perfusion:

A) Kontrollgruppe: Ein schmales Interstitium zwischen den Alveolen spricht gegen das Vorliegen eines interstitiellen Ödems.

B) Heparinase I: Eine große Distanz zwischen zwei benachbarten Alveolen und die Extravasation von FITC als Zeichen eines interstitiellen Ödems.

C) HES 130-Gruppe: Die Weite der Alveolarsepten ist vergleichbar mit der Weite der Septen unter Ausgangsbedingungen (A).

3.4 Ergebnisse der Viskositätsbestimmung

Nach 90 Minuten betrug die Viskosität der Perfusionslösung der Kontrollgruppe 1,008 mPa*s ($\pm 0,015$). In der mit Heparinase I behandelten Gruppe verringerte sich die Viskosität signifikant auf 0,868 mPa*s ($\pm 0,013$). Sowohl in der mit HES 130 (0,958 mPa*s $\pm 0,015$) als auch in der mit HES 200 (0,996 mPa*s $\pm 0,017$) vorbehandelten Gruppe war die Viskosität signifikant höher im Vergleich zu der mit Heparinase I behandelten Gruppe (siehe Abbildung 16).

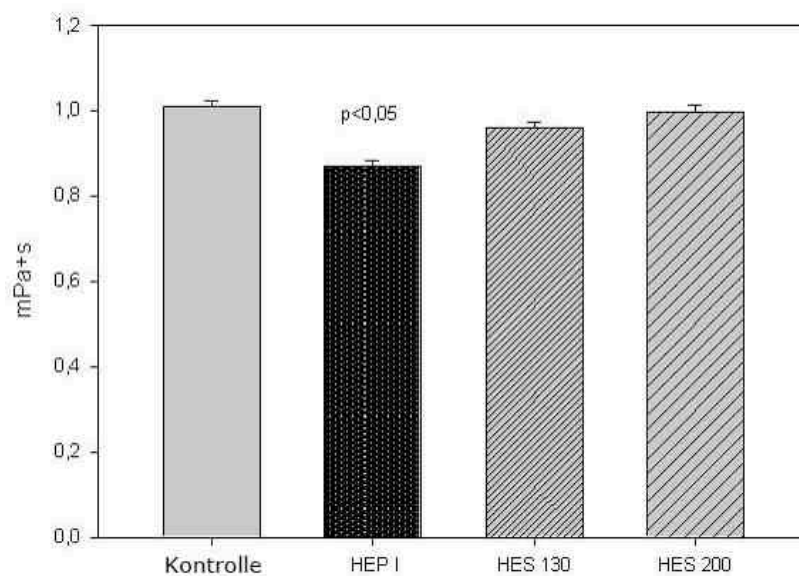


Abbildung 16: Viskosität der Perfusionslösung nach 90-minütiger Perfusion

3.5 Ergebnisse der Heparansulfatbestimmung

Um einen Einfluss der verwendeten Substanzen auf die Wirkung von Heparinase ausschließen zu können, wurden FACS-Analysen der Perfusionslösung in Anwesenheit und in Abwesenheit von HES 130/0,4 durchgeführt (siehe Kapitel 2.3.5). Anti-Heparansulfat-Antikörper markierte mikrovaskuläre Endothelzellen der menschlichen Lunge (HPMEC) zeigten hierbei keine Differenz in der mittleren Fluoreszenzintensität (4860 ± 117 vs. 4993 ± 99 [dimensionslos]). Nach Behandlung mit Heparinase I zeigten die HPMEC eine signifikant schwächere mittlere Fluoreszenzintensität in beiden Versuchsgruppen (3827 ± 111 vs. 4860 ± 117 und 3608 ± 115 vs. 4993 ± 99 [siehe Abbildung 17]). Da die FITC-markierten sekundären Antikörper an die Anti-Heparansulfat-Antikörper gebunden waren, die wiederum an die Heparansulfat-Seitenketten gebunden waren, zeigt dies ein Abspalten von Heparansulfat von den HPMEC an. Dies war sowohl in Zellkulturen, die ausschließlich in Perfusionslösung, wie auch in Zellkulturen, die zusätzlich mit HES 130/0,4 inkubiert wurden, zu beobachten (3827 ± 111 vs. 3608 ± 115). Somit zeigt die FACS-Analyse, dass weder die Perfusionslösung noch HES 130/0,4 einen Einfluss auf die Heparinaseaktivität haben. Ebenso konnte die Fähigkeit von Heparinase, Heparansulfat abzuspalten, verifiziert werden.

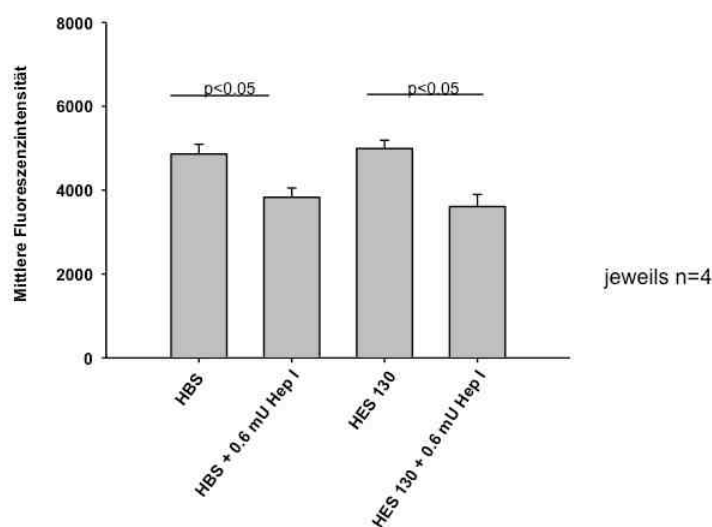


Abbildung 17: FACS-Analyse von HPMEC

4 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit konnte am Modell der isoliert ventilierten und perfundierten Mäuselunge gezeigt werden, dass eine Schädigung der vaskulären, endothelialen Glykokalyx zu einer dramatischen Beeinträchtigung der pulmonalen Mikrozirkulation führt. Nach enzymatischer Degradation der Glykokalyx verminderte sich die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten in subpleuralen Mikrogefäßen bis hin zur kompletten Stase des Perfusatflusses, während der pulmonalarterielle Mitteldruck anstieg und sich ein interstitielles Lungenödem ausbildete. Eine Vorbehandlung mit Hydroxyethylstärke 130/0,4 verhinderte diese Konsequenzen, während eine Vorbehandlung mit Hydroxyethylstärke 200/0,5 nur die Ödembildung hemmen konnte. Da die Mäuselungen *ex-vivo* nicht mit Blut, sondern mit einer Pufferlösung perfundiert wurden, die lediglich autologe, isolierte Erythrozyten enthielt, ist die Evidenz dieser Studie limitiert. Ebenfalls limitierend wirkt die Tatsache, dass die Lungen anstelle einer periodischen Beatmung mit einem Gasgemisch kontinuierlich ventiliert wurden. Diese Einschränkungen mussten wir für unsere Studie akzeptieren, da nur unter den oben genannten Bedingungen die idealen Voraussetzungen für valide videofluoreszenzmikroskopische Messungen geschaffen werden konnten.

4.1 Videofluoreszenzmikroskopie

Um die Perfusion der pulmonalen Mikrogefäße und die Fließgeschwindigkeit der roten Blutkörperchen bestimmen zu können, nutzten wir in unseren Experimenten die Videofluoreszenzmikroskopie, wie zuvor von Kuhnle *et al.* 1995 beschrieben. Im Gegensatz zu der Methode von Kuhnle *et al.* für die *in-vivo*-Messung der Fließgeschwindigkeit wurde in unseren *ex-vivo*-Experimenten die Perfusionslösung mit FITC angefärbt, und nicht die Blutkörperchen selbst. Durch das Mikroskop beobachtet ließen sich die Erythrozyten als dunkle, runde Objekte in der hell fluoreszierenden Perfusionslösung identifizieren (siehe Abbildung 12). Ebenfalls nutzten wir keinen weiteren Farbstoff, wie etwa Rhodamin, zum Anfärben der Blutkörperchen, da in unseren *ex-vivo*-Versuchen mar-

kierte Zellen sehr viel mehr zu Adhäsion an der Gefäßwand neigten, als ungefärbte Zellen. Diese Beobachtung erklären wir uns durch die Explantation der Lunge aus dem Körperkreislauf und dem somit fehlenden physiologischen Abbau von rigiden Erythrozyten durch die Milz.

4.2 Enzymatische Degradation als Modell für Glykokalyx-Schädigung

Während unserer Versuche nutzten wir den enzymatischen Abbau der endothelialen Glykokalyx als generelles Modell für pathologische Situationen, die zu einer Schädigung der Glykokalyx führen. Hierfür injizierten wir Heparinase I, zum Zeitpunkt 15 Minuten, direkt in das Perfusionssystem. Heparinase I, ein Enzym von *Flavobacterium heparinum*, ist ein bakterielles Analogon zu der Endoglycosidase Heparanase bei Säugetieren. Die proteolytische Prozessierung von Heparanase findet intrazellulär in Endosomen und Lysosomen statt (Nadav *et al.* 2002; Goldschmidt *et al.* 2002a und b; Gingis-Velitski *et al.* 2004; Vreys *et al.* 2005; Zetser *et al.* 2004). Heparanase ist dort an der Prozessierung und Wiederverwertung von Heparansulfat internalisierter Proteoglykane beteiligt. Das Enzym ist jedoch nicht auf diese Lokalisation begrenzt. Es kommt auch im Nukleus, der perinuklearen Region und der Plasmamembran vor (Marchetti *et al.* 2000; Goldshmidt *et al.* 2001, 2002a und b, 2003). Heparanase spaltet einen Hauptbestandteil der Glykokalyx, die Heparansulfate, von der Endotheloberfläche ab und spielt bei angiogenesebezogenen Zellgeschehen wie Migration, Adhäsion, Proliferation und Differenzierung eine wichtige Rolle. Es fördert Zellinvasion bei Krebsmetastasen und Entzündungsreaktionen und ist am Abbau und Umbau der extrazellulären Matrix beteiligt (Myler und West 2002; Vlodavsky *et al.* 2007). In Studien konnte gezeigt werden, dass die Expression von Heparanase mit dem metastatischen Potenzial von Tumoren korreliert (Parish *et al.* 2001; Vlodavsky *et al.* 2007). Shafat *et al.* konnten 2006 erhöhte Konzentrationen von Heparanase in Blut und Urin von Patienten mit aggressiven metastasierenden Tumoren feststellen. Die bedeutendste Rolle des Enzyms in Bezug auf Tumormetastasierung wurde in Mäuseversuchen nachgewiesen. Nach Transfektion und Überexpression des Heparanasegens kam es zu deutlich erhöhter Lungen- und Leberbesiedlung mit Mausmelanomen, Lymphomen und

Prostatakarzinomen (Vlodavsky *et al.* 2002). Wurden Zellen mit hoher endogener Heparanaseaktivität mit einem Heparanaseblocker (Anti-hpa-siRNA [*Small interfering Ribonukleinsäure*]) behandelt, konnte deren metastatisches Potenzial deutlich gesenkt werden. Ebenfalls zeigten Tumorzellen, die mit Anti-Heparanase-Ribosomen oder siRNA transfiziert wurden, eine geringere Vaskularisierung und eine geringere Metastasierung (Edovitsky *et al.* 2004).

Das bakterielle Analogon Heparinase I spaltet selektiv Heparansulfate, nicht aber Syndekan-I aus der endothelialen Glykokalyx und besitzt keine unspezifische Proteaseaktivität. Somit degradiert Heparinase I das Gerüst der Glykokalyx und vermindert ihre ursprüngliche Dicke von schätzungsweise 220 nm bis auf etwa 20 nm. Die verbleibenden Reste des Gerüsts sind nicht mehr in der Lage, eine funktionale ESL aufrechtzuerhalten (Chappell *et al.* 2008b). Heparinase katalysiert auch die Elimination von Antithrombin III (Horrow und Fitch 2000) und wird *in vitro* zur Neutralisation von Heparin verwendet (Ho *et al.* 2003). Eine potenzielle Elimination von Heparin hat keinen Einfluss auf unsere Experimente, da dieses für Heparinase I unzugänglich war. Einerseits wurden vermutlich geringe Mengen von Heparin an Thrombin gebunden, als dieses der Maus injiziert wurde. Andererseits wurde der größte Teil des Heparins während der zehnminütigen *Steady-State* Phase durch die Pufferlösung aus der explantierten Lunge gewaschen. Selbst wenn eine geringe Menge von Heparin in der Perfusionslösung verblieben sein sollte, ist dieses ohne die physiologischen Kofaktoren, wie etwa Koagulationsfaktor X, wirkungslos.

Eine Vielzahl von Studien identifizierte verschiedenste Agenzien und pathologische Situationen, die die Dicke der ESL mindern und das Gerüst der Glykokalyx beeinträchtigen können. Beschriebene Faktoren sind Ischämie/Reperfusion, große Operationen und inflammatorische Mediatoren (Rehm *et al.* 2004; Hardaway 2006; Chappell *et al.* 2008a; Henry und Duling 2000). In einem genuinen Schweineherz-Modell demonstrierten Chappell *et al.* eine dreißigfach erhöhte Ablösung von Heparansulfat aus der Glykokalyx nach postischämischer Reperfusion (Chappell *et al.* 2007). Diese experimentellen Daten konnten durch eine klinische Studie bestätigt werden. Rehm *et al.* fanden erhöhte Werte von Syndekan-I und Heparansulfat im Plasma von Patienten mit globaler oder regionaler Ischämie, im Zuge großer gefäßchirurgischer Operationen. In ihrer Studie

war der Abbau der Glykokalyx proportional zu der Dauer der Ischämie (Rehm *et al.* 2007). Neben der Schädigung durch Ischämie bzw. Reperfusion sind verschiedene zirkulierende Mediatoren bekannt dafür, eine Degradation der Glykokalyx zu initiieren. Tumornekrosefaktor α , oxidierte Lipoproteine, Zytokine, Proteasen und Heparanase von aktivierten Mastzellen sind gut beschriebene Faktoren einer systemisch inflammatorischen Reaktion, die zu einer Reduktion der ESL führen kann (Chappell *et al.* 2008a, Chappell *et al.* 2009a). Die klinische Konsequenz dieser Degradation wurden durch eine Studie von Nelson *et al.* gezeigt, welche erhöhte Level von Glykosaminoglykanen im Plasma septischer Patienten beobachtete. Die mittlere Konzentration von Glykosaminoglykanen war bei Patienten, welche die Sepsis nicht überlebten, erhöht im Vergleich zu Patienten, die sich davon wieder erholten. Zusätzlich war die Konzentration von Syndekan-I im Blut der Patienten zehn- bis hundertfach erhöht und korrelierte mit deren *SOFA Score*-Wert ([*Sequential Organ Failure Assessment*], Nelson *et al.* 2008). Interessanterweise führt auch Hypervolämie zu einer Degradation der ESL und der Glykokalyx. Dies zeigte eine Studie von Bruegger *et al.* an isolierten genuinen Schweineherzen. Ein Abbau der Glykokalyx wurde durch das atriale natriuretische Peptid hervorgerufen, welches von Zellen des Herzvorhofes bei Hypervolämie freigesetzt wird (Bruegger *et al.* 2005).

In Bezug auf die Lunge wissen wir seit Jahren, dass Ischämie/Reperfusion, Inflammation, Sepsis oder akute Lungenschädigung anderer Genese durch Freisetzung von Zytokinen, Interleukin-I und Tumornekrosefaktor α dazu führen, dass die endotheliale Gefäßbarriere der Lunge geschädigt wird (Janeway *et al.* 2001; Moore *et al.* 2002). Die enzymatische Degradation der Glykokalyx kann in unseren Experimenten deshalb als stellvertretendes Modell einer Degradierung durch einen oder mehrere der erwähnten Trigger angesehen werden. Die Degradation der Glykokalyx durch Heparinase I wurde bereits in einigen Untersuchungen als Modell für eine generelle Glykokalyx-Schädigung genutzt und ihr Effekt durch andere Autoren verifiziert (Rehm *et al.* 2004; Desjardins und Duling 1990; Chappell *et al.* 2008b). Um einen Einfluss der Perfusionslösung oder HES auf Heparinase I ausschließen zu können, versuchten wir, die Aktivität des Enzyms zu bestimmen. Hierfür verwendeten wir zwei verschiedene Verfahren. Einerseits versuchten wir, den Gehalt an Heparinase I direkt aus archivierten

Perfusatproben durch photometrische Messungen zu bestimmen (Heparinase I Assay, Sigma, Saint Louis, USA). Da sich das Enzym jedoch in der Krebs-Henseleit-Pufferlösung befand, die selbst eine hohe Lichtextinktionskapazität besaß, konnten wir keine validen Daten erfassen. Somit wendeten wir alternativ die FACS-Analyse an (siehe Kapitel 2.3.5). Die Daten der FACS-Analyse sicherten einen fehlenden Einfluss der Perfusionslösung und HES auf die Heparinase I-Aktivität in unseren Experimenten und verifizierten zusätzlich die Menge an abgespaltetem Heparansulfat durch das Enzym (siehe Abbildung 17).

4.3 Abfall der mikrovaskulären Perfusion nach Glykokalyx-Degradation

Durch die Zugabe von Heparinase I in das Perfusionssystem kam es zu einer kompletten Stase der mikrovaskulären Perfusion. Qualitativ wurde dies durch Videofluoreszenzmikroskopie bestimmt (siehe Kapitel 2.2.2). Mikrogefäße, die zuvor durch den Farbstoff FITC fluoreszierten und somit perfundiert waren, erschienen nach Injektion von Heparinase I in das Perfusionssystem dunkel (siehe Abbildung 12). Dies zeigte an, dass 90 Minuten nach Versuchsbeginn kein fluoreszierendes Perfusat mehr durch die untersuchten Mikrogefäße floss und somit diese Arteriolen, Venolen und Kapillaren nicht mehr perfundiert waren. Im Gegensatz dazu wurde ein vergleichbarer Abfall der Perfusion nur in wenigen Arteriolen und Venolen der Kontroll- und HES-Gruppen beobachtet, wobei nur die HES 200-Gruppe keinen signifikanten Unterschied in der v_{RBC} im Vergleich zur Hep I-Gruppe zeigte. Alle Kapillaren der Kontroll- und HES 130-Gruppe waren über den kompletten Versuchszeitraum von 90 Minuten perfundiert. Die beobachtete Stase der Hep I-Gruppe könnte man durch eine mögliche hämodynamische Umverteilung des Blutflusses zwischen verschiedenen Arealen der Lunge begründen. Wäre dies der Fall, hätte es jedoch auch in der Mehrzahl der beobachteten Mikrogefäße der Kontroll- und HES-Gruppen zu einer Stase des Blutflusses kommen müssen. Da aber in allen Kapillaren der Kontroll- und HES 130-Gruppe und in den meisten Arteriolen und Venolen der Kontroll- und HES-Gruppen keine Stase des Blutflusses zu beobachten war, ist dies unwahrscheinlich.

Um den Einfluss einer Degradation der Glykokalyx auf die Bedingungen des Blutflusses der pulmonalen Mikrozirkulation quantitativ beschreiben zu können, wurde die Erythrozytenfließgeschwindigkeit, wie zuvor beschrieben, bestimmt (siehe Kapitel 2.3.2, S. 26). Lungen, die mit Heparinase I behandelt wurden, zeigten einen signifikanten Abfall der Fließgeschwindigkeit der roten Blutzellen bis hin zur kompletten Stase des Perfusatflusses (siehe Abbildung 8–11). Die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten der Kontroll- und HES 130-Gruppe zeigte unterschiedliches Verhalten. Auf das Gerinnungssystem bezogen, beschrieben Vink *et al.*, dass die spezifische Zerstörung der Glykokalyx zu einer Thrombin-Generierung und einer Plättchen-Adhäsion innerhalb weniger Minuten führt (Vink *et al.* 2000). Diese Koagulation hat für unsere Versuche keine Bedeutung, da die von uns verwendete Perfusionslösung lediglich isolierte Erythrozyten enthielt. Studien, die sich direkt mit den Konsequenzen einer veränderten Glykokalyx auf die Organmikrozirkulation oder die Erythrozytenfließgeschwindigkeit beschäftigen, liegen zurzeit nicht vor. Die derzeitige Forschung beschäftigt sich zum größten Teil mit der Rolle der Glykokalyx als sekundäre Barriere gegen Flüssigkeitsverlust und Extravasation von Proteinen (Rehm *et al.* 2004; Dull *et al.* 2007; Nieuwdorp *et al.* 2006; Van den Berg *et al.* 2003; Chappell *et al.* 2007; Chappell *et al.* 2008a). Man geht davon aus, dass eine Schädigung der endothelialen Glykokalyx zu einem Zusammenbruch der ESL führt und dies wiederum zum Versagen der Endothelzellen in ihrer Funktion als vaskuläre Barriere (Van den Berg *et al.* 2003; Chappell *et al.* 2008a). In Anbetracht dieser Erkenntnisse kann der Perfusionsstopp, der in unseren Experimenten beobachtet wurde, durch den Verlust einer funktionalen vaskulären Barriere der untersuchten Mikrogefäße erklärt werden.

Ein indirekter Hinweis darauf, dass die Zerstörung der Glykokalyx die Mobilität von Erythrozyten in Mikrogefäßen beeinträchtigt, wurde durch die Studie von Desjardins und Duling gegeben. Diese zeigte, dass die enzymatische Degradierung der Glykokalyx den physiologisch niedrigeren Hämatokrit in Kapillaren nahezu auf Werte erhöhte, wie sie in großen Blutgefäßen vorkommen. Dies war durch die starke Extravasation von Flüssigkeit aus den Gefäßen bedingt (Desjardins und Duling 1990). Theoretisch geht hierbei ein erhöhter Hämatokrit mit einer erhöhten Blutviskosität und einer daraus folgenden reduzierten Erythrozy-

tenfließgeschwindigkeit einher (Chien 1975). Diese Beobachtung erklärt auch die Entstehung von Blutgerinnseln in den Mikrogefäßen der Lungen, die mit Heparinase I behandelt wurden. Der Verlust von roten Blutkörperchen in Areale, die nicht perfundiert wurden, führte zu einer signifikant erniedrigten Viskosität der mit Heparinase I behandelten Perfusionslösung im Vergleich zu anderen Versuchsgruppen (siehe Abbildung 16). Dies erklären wir uns ebenfalls durch einen relevanten Verlust von Proteinen und zellulären Bestandteilen des Perfusionssystems in den extravaskulären Raum und in nicht perfundierte Abschnitte der Lunge.

4.4 Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks nach Glykokalyx-Degradation

Der pulmonalarterielle Druck stieg während der 90-minütigen Versuchsphase in Lungen, die mit Heparinase I behandelt wurden, signifikant an. Organe der Kontroll- und der HES-Gruppen zeigten einen physiologischen PAP (siehe Abbildung 13). Wie bereits erwähnt, wurde die Perfusionsrate in unserem Mausmodell konstant bei 1 ml/min gehalten (siehe Kapitel 2.5, S. 30). Nach Zerstörung der Glykokalyx kam es zu einem Perfusionsstopp durch Gerinnsel im Großteil der subpleuralen Mikrogefäße. Der pulmonalarterielle Druck musste steigen, da das gleiche Minutenvolumen durch eine reduzierte Anzahl an perfundierten Mikrogefäßen fließen musste. Diese Annahme wird durch die Beobachtung unterstützt, dass Lungen, deren Perfusion zumindest geringfügig bestehen blieb, keine PAP-Anstieg zeigten, obwohl die Erythrozytenfließgeschwindigkeit erniedrigt wurde. Ebenfalls spricht die erniedrigte Viskosität der Perfusionslösung der Heparinase I-Gruppe für einen Verlust von zellulären Bestandteilen aus dem zirkulierenden Perfusionssystem, bedingt durch die Bildung von Gerinnseln aus roten Blutkörperchen in den Mikrogefäßen. Diese bedingten wiederum einen PAP-Anstieg, da der Gesamtquerschnitt der Gefäße durch die Thromben reduziert wurde. Obwohl es in der HES 200-Gruppe zu einem Abfall der Fließgeschwindigkeit roter Blutzellen kam, verhielt sich der PAP wie in der Kontroll- und der HES 130-Gruppe. Folglich lässt sich der positive Einfluss von HES 130/0,4

auf die Mikrozirkulation, im Vergleich zur HES 200-Gruppe, nicht durch die Prävention des PAP-Anstiegs erklären.

4.5 Ausbildung interstitieller Ödeme nach Glykokalyx-Degradation

Nach 90-minütiger Perfusion wurde in den Lungen der Heparinase I-Gruppe zum einen eine deutliche Extravasation von FITC beobachtet, zum anderen war der interstitielle Raum zwischen zwei benachbarten Alveolen signifikant größer im Vergleich zu den Lungen der Kontroll- und HES-Gruppen. Die Kombination dieser beiden Beobachtungen ist pathognomonisch für ein interstitiellen Lungenödem als Folge der enzymatischen Degradation der Glykokalyx. Einer der beiden Gründe, warum es zur Ausbildung eines interstitiellen Ödems nach der Gabe von Heparinase I kam, ist (siehe Abbildung 14 und 15), dass ein erhöhter Pulmonalarteriendruck mit einem erhöhten hydrostatischen Druck und einem daraus resultierenden erhöhten transkapillären Filtrationsdruck einhergeht (Thews 1997). Der zweite Grund für die Entstehung eines interstitiellen Lungenödem ist die erhöhte vaskuläre Permeabilität, bedingt durch die enzymatische Degradation der Glykokalyx. Heparinase I vermindert die Dicke der Glykokalyx auf etwa ein Zehntel des ursprünglichen Umfangs (Chappell 2008b). Eine ausschließlich rudimentär vorhandene Glykokalyx verliert einen Großteil ihrer Fähigkeit, als zusätzliche Barriere gegen den Flüssigkeitsausstrom aus den Blutgefäßen zu dienen. Diese Beobachtung wird durch mehrere Studien bestätigt (Rehm *et al.* 2004; Chappell *et al.* 2008a; Henry und Duling 2000). Darüber hinaus konnte experimentell gezeigt werden, dass das Proteoglykan Heparansulfat, ein Hauptbestandteil der Glykokalyx, bei der Induzierung eines inflammatorischen Signalwegs eine Rolle spielt. Dieser führt zu einer zytoskeletalen Reorganisation mit anschließender Dysfunktion der vaskulären Barriere. Heparansulfate sind auch an einer barosensiblen Mechanotransduktion beteiligt, die ebenfalls zu einer Barrieredysfunktion führen kann (Dull *et al.* 2003; Dull *et al.* 2007). Beide Aspekte können schließlich zur Ausbildung interstitieller Ödeme führen. Da ein Lungenödem sowohl durch die Behandlung mit HES 130/0,4 wie auch mit HES 200/0,5 verhindert werden konnte, ist dies nicht der Schlüsselmechanismus der verbesserten Mikrozirkulation durch HES 130/0,4.

4.6 Präventive Wirkung einer Vorbehandlung durch HES

In unserer Untersuchung konnten wir feststellen, dass eine Verminderung der Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten und sogar ein Perfusionsstopp nach Glykokalyx-Degradierung verhindert wurde, wenn dem Perfusat eine niedermolekulare Tetrastärke-Lösung vor Injektion von Heparinase I zugegeben wurde. Eine hochmolekulare Pentastärke-Lösung hatte keinen protektiven Effekt.

In unseren Experimenten verwendeten wir die Tetrastärke-Lösung Voluven®, eine wachsartige Maisstärkelösung, die hauptsächlich aus verzweigten Amylopektinketten besteht. Voluven® hat einen Substitutionsgrad von 0,4 und ein Molekulargewicht von 130 kDa (Sommermeyer *et al.* 2007). Im Gegensatz dazu hat die Pentastärke-Lösung HES-steril® einen Substitutionsgrad von 0,5 und ein Molekulargewicht von 200 kDa (Westphal *et al.* 2009). Diese beiden Lösungen werden im Klinikalltag in Europa am häufigsten verwendet, wobei heutzutage 6 % HES 130/0,4 (Voluven®) dem zuvor verwendeten 10 % HES 200/0,5 (HES-steril®) vorgezogen wird. Die beiden Lösungen haben unterschiedliche Charakteristika sowie pharmakodynamische Eigenschaften, welche intensiv in verschiedenen experimentellen und klinischen Studien analysiert wurden (Jungheinrich *et al.* 2002; Jungheinrich und Neff 2005; Westphal *et al.* 2009; Treib *et al.* 1999). So ruft HES potenzielle unerwünschte Nebenwirkungen wie allergische Reaktionen (Fisher und Brady 1990), Änderungen der Hämostase mit einhergehendem erhöhten Blutungsrisiko (deJonge und Levi 2001; Treib *et al.* 1999; MacIntyre *et al.* 1985; Claes *et al.* 1992; Kozek-Langenecker 2005; Scharbert *et al.* 2004; Mittermayr *et al.* 2007), Beeinträchtigung der Nierenfunktion (Kief und Engelbart 1966; Chinitz *et al.* 1971; Cittanova *et al.* 1996; Wiedermann 2008; Davidson 2006), Akkumulation und Juckreiz hervor. Die Reduktion von Molekulargewicht und Substitutionsgrad hat zu Produkten mit kürzerer Halbwertszeit, verbesserter Pharmakokinetik und Pharmakodynamik und weniger Nebenwirkungen geführt (Sommermeyer *et al.* 2007).

Alle Kolloide zur intravasalen Volumentherapie, einschließlich des natürlichen Kolloids Albumin, haben das Potenzial, anaphylaktische bzw. allergische Reaktionen hervorzurufen (Fisher und Brady 1990). Eine große klinische Studie an etwa 20.000 Patienten hat gezeigt, dass die Wahrscheinlichkeit einer allergi-

schen Reaktion bei Volumensubstitution mit HES nur gering ist. Sie liegt sogar signifikant unter dem Potenzial anderer Kolloide (Laxenaire *et al.* 1994).

In Bezug auf den Effekt von HES auf die Koagulation konnten Studien zeigen, dass HES mit hohem Molekulargewicht (Hetastärke-Lösungen) die Blutungswahrscheinlichkeit erhöht (deJonge und Levi 2001; Treib *et al.* 1999). Es wurde sowohl *in-vivo*, wie auch *in-vitro* festgestellt, dass schneller abbaubare HES-Produkte weitaus weniger Effekte auf den Koagulationsprozess ausüben als ältere Produkte (MacIntyre *et al.* 1985; Claes *et al.* 1992). HES-Makromoleküle interagieren mit Thrombozyten und der Gerinnungskaskade mit dem Resultat einer Erniedrigung von Von-Willebrand-Faktor und Faktor VIII. Der genaue Mechanismus konnte bisher noch nicht geklärt werden (Kozek-Langenecker 2005). In einer prospektiven klinischen Studie wurde von Scharbert *et al.* 2004 beobachtet, dass HES 200 einen größeren Effekt auf die Hemmung der Thrombozytenfunktion hat als HES 130. HES 130 senkte jedoch die durch Adenosindiphosphat (ADP) und Epinephrine induzierte Plättchenfunktion signifikant. Diese Veränderungen waren allerdings nur statistisch und nicht klinisch relevant. Ein weiterer negativer Effekt von HES 130/0,4 wurde in einer Studie zu orthopädischen Operationen gezeigt, da HES 130/0,4 hier eine ausgeprägte Beeinträchtigung der Fibrinogen/Fibrin-Polymerisation im Vergleich zu Gelatine und Ringer ®-Lösung zeigte (Mittermayr *et al.* 2007). Die beobachteten Einflüsse auf das zelluläre und das plasmatische Gerinnungssystem spielen für unsere *ex-vivo*-Experimente jedoch keine Rolle, da wir lediglich isolierte Erythrozyten im Perfusionssystem verwendeten. Hierdurch ist ein Einfluss der Zellen des Gerinnungssystems auf den Perfusatfluss ausgeschlossen.

Klinische Studien zeigen widersprüchliche Ergebnisse zum Einfluss von HES auf die Nierenfunktion. In einer retrospektiven Studie berichten Legendre *et al.* 1993 von einer Rate von 80 % an *Osmotic Nephrosis Like Lesions* bei transplantierten Nieren, nachdem HES mit mittlerem und hohem Molekulargewicht den hirntoten Spendern infundiert worden war. Dieser Effekt hatte allerdings keinen negativen Einfluss auf die Funktion der Nieren nach der Transplantation. Im Gegensatz dazu zeigten Cittanova *et al.* 1996 eine klinisch relevante Beeinträchtigung der Nierenfunktion bei transplantierten Empfängern, nachdem die hirntoten Spender mit 6 % HES 200/0,62 behandelt worden waren. Zwei Me-

taanalysen von Wiedermann 2008 und von Davidson 2006 an Patienten mit und ohne bestehender Nierenfunktionsstörung, die eine Volumentherapie mit HES unbestimmter Präparation erhielten, kamen zu dem Schluss, dass HES einen negativen Effekt auf die Nierenfunktion hat. Im Gegensatz dazu konnte eine Beobachtungsstudie an 3147 intensivmedizinischen Patienten zeigen, dass die 1075 Patienten, die HES erhielten, keine höhere Rate an akutem Nierenversagen aufwiesen (Sakr *et al.* 2007). Unterschiede zwischen den HES-Generationen und Langzeitfolgen einer HES-Therapie auf die Nierenfunktion konnten wiederum in einer retrospektiven Studie von Blasco *et al.* 2008 festgestellt werden. In dieser Studie war die Therapie mit HES 130/0,4 mit einem besseren Effekt auf die Nierenfunktion der Empfänger vergesellschaftet als die Therapie mit HES 200/0,62. Das Serumkreatinin war in der Gruppe, deren Spender HES 130/0,4 erhalten hatten, ein Jahr nach Transplantation signifikant niedriger als in der Vergleichsgruppe. Selbst bei Patienten mit bereits mild bis stark eingeschränkter Nierenfunktion hatte die Infusion von 500 ml HES 130/0,4 keinen zusätzlichen negativen Effekt (Jungheinrich *et al.* 2002). Durch die beobachteten Effekte auf das Organsystem der Niere ließen sich keine Rückschlüsse auf die von uns untersuchten Lungen schließen.

Obwohl Hydroxyethylstärke nicht ausschließlich als Volumenersatzmittel verwendet wird, sondern auch zur Optimierung der Mikrozirkulation, wie etwa bei ihrem Einsatz in der Therapie eines akuten Hörsturzes (Klemm *et al.* 2007), ist die genauere Interaktion von Hydroxyethylstärke mit der ersten Kontaktfläche von Blut und Gewebe, der ESL, bisher nicht untersucht worden. Dennoch ergeben sich aus klinischen Beobachtungen vermehrt Hinweise darauf, dass bestimmte Plasmaersatzmittel einen positiven Effekt auf die Organperfusion und Mikrozirkulation haben. So erhöht 6 % HES 130/0,4 die Oxygenierung des Gewebes sowohl bei gesunden Freiwilligen (Standl *et al.* 2003) als auch bei Patienten, die sich einer großen Bauchoperation unterziehen mussten (Marik *et al.* 1997). In unserer Studie konnten wir beobachten, dass HES 130/0,4 nicht nur den kompletten Zusammenbruch der pulmonalen Mikrozirkulation nach einer Degradation der Glykokalyx verhindert (siehe Abbildung 12), sondern auch den damit assoziierten Anstieg des pulmonalarteriellen Drucks (siehe Abbildung 13). Auch war das interstitielle Lungenödem nach Behandlung mit Heparinase I in

den mit HES 130/0,4 behandelten Organen geringer ausgeprägt (siehe Abbildung 14 und 15). Eine Erklärung für diesen Effekt kann aus dem Einfluss von Hydroxyethylstärke auf die Blutviskosität abgeleitet werden. So vermuten etwa Neff *et al.*, dass HES mit einem geringeren Substitutionsgrad die Erythrozytenaggregation herabsetzen und dadurch die sogenannte *Low Shear*-Viskosität des Blutes reduzieren könnte (Neff *et al.* 2005). *Low Shear*-Viskosität wird hauptsächlich durch Erythrozytenaggregation hervorgerufen (Chien 1975). Diese entsteht durch makromolekulare Brückenbildung von benachbarten Zellen, welche die abstoßenden Kräfte der beidseits negativ geladenen Zelloberfläche überwinden können. Große Makromoleküle, wie HES 200/0,5, haben eine größere Bindungskapazität als kleinere Moleküle. Ein Grund hierfür ist, dass kleinere Moleküle an die Oberflächen von Zellen gebunden werden und das Aggregieren von Bindungsmolekülen beeinflussen (Reinhart und Nagy 1995). Neff *et al.* nahmen 2005 an, dass das Molekül HES 130/0,4 zu klein sei, um Brücken zwischen Erythrozyten zu bilden. Andererseits interferiere HES 130/0,4 mit der physiologischen Brückenbildung von Fibrinogen und Globulinen und erhöhe somit die Erythrozytenaggregation (Neff *et al.* 2005). Diese Effekte könnten auch in unseren Experimenten eine Rolle spielen. In der Tat war die Fließgeschwindigkeiten der Erythrozyten in Arteriolen und Venolen der mit HES 200/0,5 behandelten Lungen bereits zum Zeitpunkt null Minuten im Vergleich zu der Kontroll- und HES 130-Gruppe signifikant ($p < 0,05$) verlangsamt. Ebenfalls war die Viskosität der Perfusionslösung in der Kontrollgruppe und den beiden HES-Gruppen identisch, aber in der mit Heparinase I behandelten Gruppe signifikant erniedrigt (siehe Abbildung 16). Diese Beobachtung spricht für einen geringeren Gehalt an Zellen und Proteinen in der Perfusionslösung von Lungen, die mit dem Enzym behandelt wurden. Wir nehmen an, dass Erythrozyten, die sich langsam durch die Blutbahn bewegen, leichter in der Abwesenheit von HES 130/0,4 aggregieren und Gerinnsel in Mikrogefäßen bilden. Hierdurch erhöhen sich der Hämatokrit und die Viskosität in den Kapillaren, wohingegen die Gesamtviskosität der Perfusionslösung im System herabgesetzt wird. HES 200/0,5 hat keinen protektiven Effekt auf die Fließgeschwindigkeit roter Blutzellen nach Glykokalyx-Degradation (siehe Abbildung 12). Wir gehen davon aus, dass HES 200/0,5 aufgrund der bereits beschriebenen höheren Bindungskapazität

zität und der damit verbundenen vermehrten Brückenbildung zwischen den Erythrozyten einen negativen Einfluss auf die Erythrozytenfließgeschwindigkeit hat. Jedoch ist es trotzdem imstande, eine komplette Stase in der pulmonalen Mikrozirkulation zu verhindern (Reinhard und Nagy 1995).

Sowohl HES 130/0,4 wie auch HES 200/0,5 konnten in unseren Experimenten die Entstehung eines Lungenödems verhindern (siehe Abbildung 14 und 15). Heckel *et al.* zeigten in ihrem *in-vivo*-Modell am Kaninchen anhand einer Lipopolysaccharide-induzierten systemischen Inflammation, dass Tetrastärke-Lösung dazu in der Lage ist, die Entstehung eines pulmonalen Ödems zu mindern. Dies wird dadurch erklärt, dass durch die Gabe von Tetrastärke-Lösung der Gesamtquerschnitt der perfundierten Gefäße erhöht wird, und der dadurch bedingte erniedrigte Perfusionsdruck der pulmonalen Mikrogefäße zu einem erniedrigten hydrostatischen Filtrationsdruck führt. Entsprechend wird die Ausbildung eines pulmonalen Ödems vermindert (Heckel *et al.* 2012). In Bezug auf die Funktion als vaskuläre Barriere zeigten Chappell *et al.* anhand ihres Ischämie/Reperfusion-Modells, dass Hydrocortison die endotheliale Glykokalyx myokardialer Zellen des Rattenherzes schützt und die Entstehung interstitieller Ödeme reduziert (Chappell *et al.* 2007). In unserem Maus-Modell führte die Vorbehandlung mit HES 130/0,4 zu einer Aufrechterhaltung der Barrierefunktion. In der Tat können Kolloide einen onkotischen Gradienten an der endothelialen Oberfläche aufbauen, welcher der druckpassiven Flüssigkeitsfiltration entgegensteht (Jakob *et al.* 2007). Ob Hydroxyethylstärke in der Lage ist, ein beeinträchtigtes Glykokalyx-Gerüst direkt wieder anzureichern, konnte mit unserem Versuchsmodell nicht untersucht werden und ist die Fragestellung zukünftiger Versuche.

5 Zusammenfassung

5.1 Einleitung

Eine intakte, endotheliale Glykokalyx ist entscheidend für die Aufrechterhaltung einer vaskulären Barriere. Die Folgen einer Degradation der Glykokalyx auf die pulmonale Mikrozirkulation sind nicht untersucht. Diese wird durch verschiedensten Trigger wie inflammatorische Mediatoren, die beispielsweise bei einem akuten Lungenschaden ausgeschüttet werden, ausgelöst. In der vorliegenden Studie wurden die Auswirkungen der Degradation der endothelialen Glykokalyx auf die Fließgeschwindigkeit roter Blutkörperchen, die Alveolarseptenweite und den pulmonalarteriellen Druck untersucht. Aufgrund der Annahme, dass HES einen protektiven Effekt auf die Mikrozirkulation von Geweben haben kann, untersuchten wir die Konsequenzen einer Vorbehandlung durch zwei verschiedene HES-Generationen.

5.2 Material und Verfahren

Die Lungen von 20 C57 BL/6 Mäusen wurden explantiert und mit einer Mäuseerythrozyten enthaltenden (Hkt 5 %) Krebs-Henseleit-Pufferlösung bei einer konstanten Rate von 1 ml/min rezirkulierend *ex-vivo* perfundiert. Die Perfusion der Mikrogefäße und die Fließgeschwindigkeit der Erythrozyten wurden zu den Zeitpunkten null und 90 Minuten mittels Videofluoreszenzmikroskopie quantifiziert. Zur Bestimmung der interstitiellen Ödembildung wurde die Weite zweier benachbarter Alveolarsepten gemessen. Der pulmonalarterielle Druck, der Atemwegsdruck und der linksventrikuläre Druck wurden kontinuierlich erfasst. Die Lungen wurden randomisiert in vier Versuchsgruppen eingeteilt (jeweils n=5): (1) Kontrollgruppe: ohne Behandlung. (2) Hep 1: Heparinase I Injektion (1 mU/ml) zur Degradierung der Glykokalyx. (3) HES 130 und (4) HES 200: Ein Drittel des Perfusats wurde vor Heparinase I-Injektion durch 6 % HES 130/0,4 oder 10 % HES 200/0,5 ersetzt. Die Messwerte wurden durch ANOVA *on ranks* und paarweisen Vergleich analysiert ($p < 0,05$).

5.3 Ergebnisse der Perfusionsversuche

Unter Standardbedingungen waren alle untersuchten Mikrogefäße perfundiert und die v_{RBC} der Kontroll-, Hep I- und HES 130-Gruppe unterschied sich in Arterio-
len und Kapillaren nicht. Unter Zugabe von HES 200 war die v_{RBC} in Arterio-
len und Venolen, im Vergleich zur Kontrollgruppe, signifikant langsamer (siehe
Abbildung 11). Die Zugabe von Heparinase I zum Zeitpunkt 15 Minuten führte
zu einem Perfusionsstopp in allen Mikrogefäßen der Hep I-Gruppe (siehe Ab-
bildung 11). Zum Zeitpunkt 90 Minuten zeigte die v_{RBC} in den Gefäßen der HES
130-Gruppe, auch nach Behandlung mit Heparinase I, keinen signifikanten Un-
terschied im Vergleich zum Zeitpunkt null Minuten. Die v_{RBC} in der HES 200-
Gruppe war signifikant langsamer im Vergleich zum Zeitpunkt null Minuten.
Zum Zeitpunkt 90 Minuten war der pulmonalarterielle Druck in der Hep I-Gruppe
im Vergleich zu den anderen Versuchsgruppen signifikant erhöht (siehe Abbil-
dung 13). Ebenfalls war die Distanz zwischen den Alveolarsepten zum Zeit-
punkt 90 Minuten in der Hep I-Gruppe signifikant höher im Vergleich zu den
anderen Versuchsgruppen (siehe Abbildung 14).

5.4 Diskussion

Nach Degradation der Glykokalyx wurde in den untersuchten Mäuselungen ein
Versagen der Perfusion in den Mikrogefäßen, ein interstitielles Ödem und ein
erhöhter pulmonalarterieller Druck im Vergleich zu Lungen, die nicht mit Heparin-
ase I behandelt wurden, beobachtet. Wir nehmen an, dass die Beobachtungen
durch einen Zusammenbruch der Barrierefunktion der Mikrogefäße bedingt
sind. Eine Vorbehandlung mit HES 130/0,4 verhinderte diese Effekte. HES
200/0,5 hatte keinen protektiven Einfluss auf die Mikrozirkulation, verhinderte
jedoch die Erhöhung des pulmonalarteriellen Drucks und ein interstitielles
Ödem. Dies ist vermutlich durch die geringer Bindungskapazität roter Blutzellen
an HES 130/0,4, im Vergleich zu HES 200/0,5, zu erklären.

6 Anhang

6.1 Verzeichnis der verwendeten Abkürzungen

°C	Grad Celsius
ADP	Adenosindiphosphat
ALI	<i>Acute Lung Injury</i>
ARDS	<i>Acute Respiratory Distress Syndrome</i>
AWP	Atemwegsdruck
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
C	Kohlenstoff
ca.	circa
CaCl ₂	Calciumchlorid
ccm	Kubikzentimeter
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
C _{max}	maximale Plasmakonzentration
Co.	Compagnie
d	Tag
DVD	<i>Digital Versatile Disc</i>
ESL	<i>Endothelial Surface Layer</i>
et al.	<i>et alia</i>
F	Fahrenheit
Fa.	Firma
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i>
FiO ₂	Sauerstoffkonzentration
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
g	Gramm
GAG	Glykosaminoglykane
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
H ₂ O	Wasser
Hep	Heparinase

HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinethanesulfonsäure
HES	Hydroxyethylstärke
HIV	Human Immunodefizienz-Virus
HPMEC	humane pulmonale mikrovaskuläre Endothelzellen
I. U.	Internationale Einheit
ID	Innendurchmesser
KCl	Kaliumchlorid
kDa	Kilodalton
kg	Kilogramm
l	Liter
LAD	linksatrialer Druck
LDL	<i>Low Density Lipoprotein</i>
Ltd.	<i>Limited</i>
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Stoffmengenkonzentration
mmHg	Millimeter-Quecksilbersäule
mPa*s	Millipascalsekunde
N	Teilchenzahl
n	Umfang der Stichprobe
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
nm	Nanometer
NO	Stickstoffmonoxid
NO ₂	Stickstoffdioxid
OD	Außendurchmesser
p	Signifikanzwert
PAP	pulmonalarterieller Druck

PEEP	positiver endexpiratorischer Druck
s	Sekunde
siRNA	<i>Small Interfering Ribonukleinsäure</i>
SIRS	<i>Systemic Inflammatory Response Syndrome</i>
SOD	Superoxiddismutase
SOFA Score	<i>Sequential Organ Failure Assessment Score</i>
$T_{1/2a}$	initiale Halbwertszeit
$T_{1/2b}$	terminale Halbwertszeit
$T_{1/2\text{central}}$	zentrales Kompartiment
U	<i>Unit</i>
USA	Vereinigte Staaten von Amerika
V_{RBC}	Erythrozytenfließgeschwindigkeit
W	Watt
μg	Mikrogramm
μm	Mikrometer

6.2 Literaturverzeichnis

Adamson RH, Lenz JF, Zhang X, Adamson GN, Weinbaum S, Curry FE. *Oncotic pressures opposing filtration across non-fenestrated rat microvessels.* J Physiol 2004; 557: 889–907.

Aruffo A, Stamenkovic I, Melnick M, Underhill CB, Seed B. *CD44 is the principal cell surface receptor for hyaluronate.* Cell 1990; 61: 1303–1313.

Ashbaugh DG, Bigelow DB, Petty TL, Levine BE. *Acute respiratory distress in adults.* Lancet 1967; 2: 319–332.

Asskali F, Förster HL. *The accumulation of different substituted hydroxyethyl starches (HES) following repeated infusions in healthy volunteers.* Anasthesiol Intens Notfall Schmerz 1999; 34: 537–541.

Barker AL, Konopatskaya O, Neal CR, Macpherson JV, Whatmore JL, Winlove CP, Unwin PR, AC Shore. *Observation and characterisation of the glycocalyx of viable human endothelial cells using confocal laser scanning microscopy.* Phys Chem Chem Phys 2004; 6: 1006–1011.

Bause W, Friederich P. *Intensivmedizin.*
In: Anästhesie: Intensivmedizin, Notfallmedizin, Schmerztherapie. Schulte am Esch J, Bause W, Kochs E, Scholz J, Standl T, Werner C (Hrg.) 3. Aufl., Thieme, Stuttgart 2006; 477–480, 496.

Bernfield M, Gotte M, Park PW, Reizes O, Fitzgerald ML, Lincecum J, Zako M. *Functions of cell surface heparan sulfate proteoglycans.* Annu Rev Biochem 1999; 68: 729–777.

Blasco V, Leone M, Antonini F, Geissler A, Albanese J, Martin C. *Comparison of the novel hydroxyethylstarch 130/0.4 and hydroxyethylstarch 200/0.6 in brain-dead donor resuscitation on renal function after transplantation.*

Br J Anaesth 2008; 100: 504–508.

Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. *Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts.*

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2005; 289: H1993–H1999.

Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, Welsch U, Becker BF. *Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx.*

Anesthesiology 2007; 107: 776–784.

Chappell D, Jacob M, Becker BF, Hoffmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M. *Expedition glycocalyx: a newly discovered ‘Great Barrier Reef’.*

Anaesthesist 2008a; 57: 959–969.

Chappell D, Jacob M, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. *Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx.*

Biol Chem 2008b; 389: 79–82.

Chappell D, Hofmann-Kiefer K, Jacob M, Rehm M, Briegel J, Welsch U, Conzen P, Becker BF. *TNF-alpha induced shedding of the endothelial glycocalyx is prevented by hydrocortisone and antithrombin.*

Basic Res. Cardiol. 2009a; 104: 78–89.

Chappell D, Westphal M, Jacob M. *The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness.*

Curr Opin Anaesthesiol 2009b; 22: 155–162.

Chien S. Biophysical behavior of red cells in suspension. In: Surgeneor Med. *The red blood cell*.

New York: Academic Press 1975; 1031–1133.

Chinitz JL, Kim KE, Onesti G, Swartz C. *Pathophysiology and prevention of dextran-40-induced anuria*.

J Lab Clin Med 1971; 77: 76–87.

Cittanova ML, LeBlanc I, Legendre C, Mouquet C, Riou B, Coriat P. *Effects of hydroxyethyl starch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients*.

Lancet 1996; 348: 1620–1622.

Claes Y, van Hemelrijck J, van Gerven M, Arnout J, Vermeylen J, Weider B, Van Aken H. *Influence of hydroxyethyl starch on coagulation in patients during the perioperative period*.

Anesth Analg 1992; 75: 24–30.

Constantinescu AA, Vink H, Spaan JA. *Elevated capillary tube hematocrit reflects degradation of endothelial cell glycocalyx by oxidized LDL*.

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2001; 280: H1051–H1057.

Danielli JF. *Capillary permeability and oedema in the perfused frog*.

J Physiol 1940; 98: 109–129.

Davidson IJ. *Renal impact of fluid management with colloids: a comparative review*.

Eur J Anaesthesiol 2006; 23: 721–738.

deJonge E, Levi M. *Effects of different plasma substitutes on blood coagulation: a comparative review*.

Crit Care Med 2001; 29: 1261–1267.

Desjardins C, Duling BR. *Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit.*

Am J Physiol 1990; 258: H647–H654.

Dull RO, Dinavahi R, Schwartz L, Humphries DE, Berry D, Sasisekharan R, Garcia JG. *Lung endothelial heparan sulfates mediate cationic peptide-induced barrier dysfunction: a new role for the glycocalyx.*

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2003; 285(5): L986–L995.

Dull RO, Mecham I, McJames S. *Heparan sulfates mediate pressure-induced increase in lung endothelial hydraulic conductivity via nitric oxide/reactive oxygen species.*

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2007; 292: L1452– L1458.

Edovitsky E, Elkin M, Zcharia E, Peretz T, Vlodavsky I. *Heparanase gene silencing, tumor invasiveness, angiogenesis and metastasis.*

J Natl Cancer Inst 2004; 96: 1219–1230.

Esmon CT. *Inflammation and thrombosis.*

J Thromb Haemost 2003; 1:1343–1348.

Fisher MM, Brady PW. *Adverse reactions to plasma volume expanders.*

Drug Saf 1990; 5: 86–93.

Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, O. Dull R, Tarbell JM. *Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells.*

Circ Res 2003; 93: E136–E142.

Gao L, Lipowsky HH. *Composition of the endothelial glycocalyx and its relation to its thickness and diffusion of small solutes.*

Microvasc Res 2010; 80: 394– 401.

Gingis-Velitski S, Zetser A, Kaplan V, Ben-Zaken O, Cohen E, Levy-Adam F, Bashenko Y, Flugelman MY, Vlodavsky I, Ilan N. *Heparanase uptake is mediated by cell membrane heparan sulfate proteoglycans.*

J Biol Chem 2004; 279: 44084–44092.

Goldshmidt O, Zcharia E, Aingorn H, Guatta-Rangini Z, Atzmon R, Michal I, Pecker I, Mitrani E, Vlodavsky I. *Expression pattern and secretion of human and chicken heparanase are determined by their signal peptide sequence.*

J Biol Chem 2001; 276: 29178–29187.

Goldshmidt O, Nadav L, Aingorn H, Irit C, Feinstein N, Ilan N, Zamir E, Geiger B, Vlodavsky I, Katz BZ. *Human heparanase is localized within lysosomes in a stable form.*

Exp Cell Res 2002a; 281: 50–62.

Goldshmidt O, Zcharia E, Abramovitch R, Metzger S, Aingorn H, Friedmann Y, Schirrmacher V, Mitrani E, Vlodavsky I. *Cell surface expression and secretion of heparanase markedly promote tumor angiogenesis and metastasis.*

Proc Natl Acad Sci USA 2002b; 99: 10031–10036.

Goldshmidt O, Zcharia E, Cohen M, Aingorn H, Cohen I, Nadav L, Katz BZ, Geiger B, Vlodavsky I. *Heparanase mediates cell adhesion independent of its enzymatic activity.*

FASEB J 2003; 17: 1015–1025.

Gouverneur M, Spaan JA, Pannekoek H, Fontijn RD, Vink H. *Fluid shear stress stimulates incorporation of hyaluronan into endothelial cell glycocalyx.*

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2006; 290: H458–2.

Haldenby KA, Chappell DC, Winlove CP, Parker KH, Firth JA. *Focal and regional variations in the composition of the glycocalyx of large vessel endothelium.*

J Vasc Res 1994; 31: 2–9.

Hardaway RM. *A brief overview of acute respiratory distress syndrome.*
World J Surg 2006; 39 (10): 1829–1834.

Heckel K, Winkelmann B, Strunden MS, Basedow A, Schuster A, Schumacher U, Kiefmann R, Reuter DA, Goetz AE. *Tetrastarch sustains pulmonary micro-vascular perfusion and gas exchange during systemic inflammation.*
Crit Care Med 2012; 40: 518–531.

Henry CB, Duling BR. *TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx.*
Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 279: H2815–H2823.

Ho AM, Lee A, Ling E, Daly A, Teoh K, Warkentin TE. *Agreements Between the Prothrombin Times of Blood Treated In Vitro with Heparinase During Cardiopulmonary Bypass (CPB) and Blood Sampled After CPB and Systemic Protamine.*
Anesth Analg 2003; 96: 15–20.

Hofmann-Kiefer KF, Kemming GI, Chappell D, Flondor M, Kisch-Wedel H, Hauser A, Pallivathukal S, Conzen P, Rehm M. *Serum heparan sulfate levels are elevated in endotoxemia.*
Eur J Med Res 2009; 14: 526–531.

Horrow JC, Fitch JCK. *Management of coagulopathy associated with cardiopulmonary bypass. In Cardiopulmonary bypass: principles and practice.*
Gravelee GP, Davis RF, Utley JR (Hrg.) 2. Aufl., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia 2000; 436–466.

Hu X, Weinbaum S. *A new view of Starling's hypothesis at the microstructural level.*
Microvasc Res 1999; 58: 281–304.

Hu X, Adamson RH, Liu B, Curry FE, Weinbaum S. *Starling forces that oppose filtration after tissue oncotic pressure is increased.*

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2000; 279: H1724–H1736.

Hudson LD, Steinberg KP. *Epidemiology of acute lung injury and ARDS.*

Chest 1999; 116: 74S–82S.

Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. *Contrasting effects of colloid and crystalloid resuscitation fluids on cardiac vascular permeability.*

Anesthesiology 2006; 104: 1223–1231.

Jacob M, Bruegger D, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF. *The endothelial glycocalyx affords compatibility of Starling's principle and high cardiac interstitial albumin levels.*

Cardiovasc Res 2007; 73: 575–586.

Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchick M. *Immunobiology: The Immune System in Health and Disease.*

Janeway (Hrg.) 5. Auflg., Garland Science, New York 2001; 20.

Jungheinrich C, Scharpf R, Wargenau M, Bepperling F, Baron JF. *The pharmacokinetics and tolerability of an intravenous infusion of the new hydroxyethyl starch 130/0.4 (6%, 500 mL) in mild-to-severe renal impairment.*

Anesth Analg 2002; 95: 544–551.

Jungheinrich C, Neff TA. *Pharmacokinetics of hydroxyethyl starch.*

Clin Pharmacokinet 2005; 44: 681–699.

Kief H, Engelbart K. *Reabsorptive Vacuolisation der gewundenen Nierenhauptstuecke (sog. osmotische Nephrose).*

Frankf Z Pathol 1966; 75: 53–59.

Kieffmann R, Rifkind JM, Nagababu E, Bhattacharya J. *Red blood cells induce hypoxic lung inflammation.*

Blood 2008; 111: 5205–5214.

Klemm E, Bepperling F, Burschka MA, Mösges R. *Hemodilution therapy with hydroxyethyl starch solution (130/0.4) in unilateral idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a dose-finding, double-blind, placebo-controlled, international multicenter trial with 210 patients.*

Otol Neurotol 2007; 28: 157–170.

Kozek-Langenecker S. *Effects of hydroxyethyl starch solutions on hemostasis.*

Anesthesiology 2005; 103: 654–660.

Kuhnlé GE, Kuebler WM, Groh J, Goetz AE. *Effect of blood flow on the leukocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels.*

Am J Respir Crit Care Med 1995; 152: 1221–1228.

Laurent TC, Fraser JR. *Hyaluronan.*

FASEB J 1992; 6: 2397–2404.

Laxenaire M, Charpentier C, Feldman L. *Reactions anaphylactoides aux substituts colloïdaux du plasma: incidence, facteurs de risque, mécanismes.*

Ann Fr Anest Reanimat 1994; 13: 301–310.

Legendre C, Thervet E, Page B, Percheron A, Noël LH, Kreis H. *Hydroxyethylstarch and osmotic-nephrosis-like lesions in kidney transplantation.*

Lancet 1993; 342: 248–249.

Lehmann G, Marx G, Förster H. *Bioequivalence comparison between hydroxyethyl starch 130/0.42/6:1 and hydroxyethyl starch 130/0.4/9:1.*

Drugs R D 2007; 8: 229–240.

Levi M, van der Poll T, Buller HR. *Bidirectional relation between inflammation and coagulation.*

Circulation 2004; 109: 2698–2704.

Li Q, Bolli R, Qiu Y, Tang XL, Murphree SS, French BA. *Gene therapy with extracellular superoxide dismutase attenuates myocardial stunning in conscious rabbits.*

Circulation 1998; 98: 1438–1448.

Lipowsky HH. *Microvascular rheology and hemodynamics.*

Microcirculation 2005; 12: 5–15.

MacCallum NS, Evans TW. *Epidemiology of acute lung injury.*

Curr Opin Crit Care 2005; 11: 43–49.

MacIntyre E, Mackie IJ, Ho D, Tinker J, Bullen C, Machin SJ. *The haemostatic effects of hydroxyethyl starch (HES) used as a volume expander.*

Intensive Care Med 1985; 11: 300–303.

Maczewski M, Duda M, Pawlak W, Beresewicz A. *Endothelial protection from reperfusion injury by ischemic preconditioning and diazoxide involves a SODlike anti-O₂-mechanism.*

J Physiol Pharmacol 2004; 55: 537–550.

Marchetti D, Li J, Shen R. *Astrocytes contribute to the brainmetastatic specificity of melanoma cells by producing heparanase.*

Cancer Res 2000; 60: 4767–4770.

Marik PE, Iglesias J, Maini B. *Gastric intramucosal pH changes after volume replacement with hydroxyethyl starch or crystalloid in patients undergoing elective abdominal aortic aneurysm repair.*

J Crit Care 1997; 12: 51–55.

Matthay MA, Zemans RL. *The acute respiratory distress syndrome: pathogenesis and treatment.*

Annu Rev Pathol 2011; 6: 147–163.

McKenzie EA. *Heparanase: a target for drug discovery in cancer and inflammation.*

Br J of Pharmacol. 2007; 151: 1–14.

Mittermayr M, Streif W, Haas T, Fries D, Velik-Salchner C, Klingler A, Oswald E, Bach C, Schnapka-Koepf M, Innerhofer P. *Hemostatic changes after crystalloid or colloid fluid administration during major orthopedic surgery: the role of fibrinogen administration.*

Anesth Analg 2007; 105: 905–917.

Mochizuki S, Vink H, Hiramatsu O, Kajita T, Shigeto F, Spaan JA, Kajiya F. *Role of hyaluronic acid in shearinduced endothelium derived nitric oxide release.*

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285: H722–H726.

Moore TM, Shirah WB, Khimenko PL, Paisley P, Lausch RN, Taylor AE. *Involvement of CD40-CD40L signaling in postischemic lung injury.*

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol 2002; 283: L1255–L1262.

Mulivor AW, Lipowsky HH. *Role of glycocalyx in leukocyte-endothelial cell adhesion.*

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2002; 283: H1282–H1291.

Mulivor AW, Lipowsky HH. *Inflammation- and ischemia-induced shedding of venular glycocalyx.*

Am J Physiol Heart Circ Physiol 2004; 286: H1672–H1680.

Mulivor AW, Lipowsky HH. *Inhibition of glycan shedding and leukocyteendothelial adhesion in postcapillary venules by suppression of matrix metalloprotease activity with doxycycline.*

Microcirculation 2009; 16: 657–666.

Myler HA, West JL. *Heparanase and platelet factor-4 induce smooth muscle cell proliferation and migration via bFGF release from the ECM.*

J Biochem (Tokyo) 2002; 131: 913–922.

Nadav L, Eldor A, Yacoby-Zeevi O, Zamir E, Pecker I, Geiger B, Vlodavsky I, Katz BZ. *Activation, processing and trafficking of extracellular heparanase by primary human fibroblasts.*

J Cell Sci 2002; 115: 2179–2187.

Neff TA, Fischler L, Mark M, Stocker R, Reinhart WH. *The influence of two different hydroxyethyl starch solutions (6% HES 130/0.4 and 200/0.5) on blood viscosity.*

Anesth Analg 2005; 100: 1773–1780.

Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M. *Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma.*

Shock 2008; 30: 623–627.

Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelein JJ, Stroes ES. *The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease.*

Curr Opin Lipidol 2005; 16: 507–511.

Nieuwdorp M, Haeften TW van, Gouverneur MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Levi M, Meijers JC, Holleman F, Hoekstra JB, Vink H, Kastelein JJ, Stroes ES. *Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation in vivo.*

Diabetes 2006; 55: 480–486.

Parish CR, Freeman C, Hulett MD. *Heparanase: a key enzyme involved in cell invasion.*

Biochim Biophys Acta 2001; 1471: M99–M108.

Pearson MJ, Lipowsky HH. *Effect of fibrinogen on leukocyte margination and adhesion in postcapillary venules.*

Microcirculation 2004; 11: 295–306.

Prehm P. *Identification and regulation of the eukaryotic hyaluronate synthase.*

Ciba Found Symp 1989; 143: 21–30.

Pries AR, Secomb TW, Gaehtgens P. *The endothelial surface layer.*

Pflugers Arch 2000; 440: 653–666.

Pries AR, Kuebler WM. *Normal endothelium.*

Handb Exp Pharmacol 2006; 1: 1–40.

Rapraeger A. *Transforming growth factor (type beta) promotes the addition of chondroitin sulfate chains to the cell surface proteoglycan (syndecan) of mouse mammary epithelia.*

J Cell Biol 1989; 109: 2509–2518.

Rehm M, Zahler S, Loetsch M, Welsch U, Conzen P, Jacob M, Becker BF. *Endothelial glycocalyx as an additional barrier determining extravasation of 6% hydroxyethyl starch or 5% albumin solutions in the coronary vascular bed.*

Anesthesiology 2004; 100: 1211–1223.

Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappell D, Stoekelhuber M, Welsch U, Reichart B, Peter K, Becker BF. *Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia.*

Circulation 2007; 116: 1896–1906.

Reinhart WH, Nagy C. *Albumin affects erythrocyte aggregation and sedimentation.*

Eur J Clin Invest 1995; 25: 523–528.

Reitsma S, Slaaf DW, Vink H, van Zandvoort MA, oude Egbrink MG. *The endothelial glycocalyx: composition, functions and visualization.*

Pflugers Arch 2007; 454: 345–359.

Rosenberg RD, Shworak NW, Liu J, Schwartz JJ, Zhang L. *Heparan sulfate proteoglycans of the cardiovascular system. Specific structures emerge but how is synthesis regulated?*

J Clin Invest 1997; 100 (11 Suppl.): S67–S75.

Rozich JD, Paul RV. *Acute renal failure precipitated by elevated colloid osmotic pressure.*

Am J Med 1989; 87: 358–360.

Römpp H, Falbe J, Regitz M. *Römpp Lexikon Chemie.*

Falbe J, Regitz M. (Hrg.) 9. Aufl., Thieme, Stuttgart 1992.

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 2005 Oct 20; 353(16): 1685–1693.

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 2007; 98: 216–224.

Scharbert G, Deusch E, Kress HG, Greher M, Gustorff B, Kozek-Langenecker SA. *Inhibition of platelet function by hydroxyethyl starch solutions in chronic pain patients undergoing peridural anesthesia.*

Anesth Analg 2004; 99: 823–827.

Scott JE, Heatley F. *Hyaluronan forms specific stable tertiary structures in aqueous solution: a ¹³C NMR study.*

Proc Natl Acad Sci USA 1999; 96: 4850–4855.

Shafat I, Zcharia E, Nisman B, Nadir Y, Nakhoul F, Vlodavsky I, Ilan N. *An Biochem Biophys Res Commun* 2006; 341: 958–963.

Sommermeyer K, Cech F, Schossow R. *Differences in chemical structures between waxy maize- and potato-starch-based hydroxyethyl starch volume therapeutics.*

Transfus Altern Transfus Med 2007; 9: 127–133.

Standl T, Burmeister MA, Schroeder F, Currlin E, Schulte am Esch J, Freitag M, Schulte am Esch J. *Hydroxyethyl starch (HES) 130/0,4 provides larger and faster increase in tissue oxygen tension in comparison with prehemodilution values than HES 70/0,5 or HES 200/0,5 in volunteers undergoing acute normovolemic hemodilution.*

Anesth Analg 2003; 96: 936–943.

Starling E. *On the absorption of fluid from the connective tissue spaces.*

J Physiol (Lond) 1896; 19: 312–326.

Svennevig K, Hoel T, Thiara A, Kolset S, Castelheim A, Mollnes T, Brosstad F, Fosse E, Svennevig J. *Syndecan-1 plasma levels during coronary artery bypass surgery with and without cardiopulmonary bypass.*

Perfusion 2008; 23: 165–171.

Tang BMP, Craig JC, Eslick GD, Seppelt I, McLean AS. *Use of corticosteroids in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: A systematic review and meta-analysis.*

Crit Care Med 2009; 37: 1594–1603.

Tarbell JM, Ebong EE. *The Endothelial Glycocalyx: A Mechano-Sensor and -Transducer.*

Sci Signal 2008; 1: 8.

Thews G. *Lungenatmung*.

In: Physiologie des Menschen. Schmidt RF, Thews G (Hrg.) 27. Aufl., Springer-Verlag, Berlin Heidelberg 1997; 565–591.

Thi MM, Tarbell JM, Weinbaum S, Spray DC. *The role of the glycocalyx in reorganization of the actin cytoskeleton under fluid shear stress: a bumper-car model*.

Proc Natl Acad Sci USA 2004; 101: 16483–16488.

Toole BP. *Hyaluronan and its binding proteins, the hyaladherins*.

Curr Opin Cell Biol 1990; 2: 839–844.

Treib J, Haass A, Pindur G, Seyfert U, Treib W, Grauer M, Jung F, Wenzel E, Schimrigk K. HES 200/0.5 is not HES 200/0.5. *Influence of the C2/C6 hydroxyethylation ratio of hydroxyethyl starch (HES) on hemorheology, coagulation and elimination kinetics*.

Thromb Haemost 1995; 74: 1452–1456.

Treib J, Baron JF, Grauer MT, Strauss RG. *An international view of hydroxyethyl starches*.

Intensive Care Med 1999; 25: 258–268.

Van den Berg BM, Vink H, Spaan JA. *The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema*.

Circ Res 2003; 92: 592–594.

Van den Berg BM, Nieuwdorp M, Stroes ES, Vink H. *Glycocalyx and endothelial (dys) function: from mice to men*.

Pharmacol Rep. 2006; 58 Suppl: 75–80.

Vink H, Duling BR. *Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes and leukocytes within mammalian capillaries*.

Circ Res 1996; 79: 581–589.

Vink H, Constantinescu AA, Spaan JA. *Oxidized lipoproteins degrade the endothelial surface layer: implications for platelet-endothelial cell adhesion.*

Circulation 2000; 101: 1500–1502.

Vlodavsky I, Goldshmidt O, Zcharia E, Atzmon R, Rangini-Guatta Z, Elkin M, Peretz T, Friedmann Y. *Mammalian heparanase: involvement in cancer metastasis, angiogenesis and normal development.*

Semin Cancer Biol 2002; 12: 121–129.

Vlodavsky I, Ilan N, Nadir Y, Brenner B, Katz BZ, Naggi A, Torri G, Casu B, Sasisekharan R. *Heparanase, heparin and the coagulation system in cancer progression.*

Thromb Res 2007; 120 [Suppl 2]: S112–S120.

Vogl-Willis CA, Edwards IJ. *High-glucose-induced structural changes in the heparan sulfate proteoglycan, perlecan, of cultured human aortic endothelial cells.*

Biochim Biophys Acta 2004; 1672: 36–45.

Vreys V, Delande N, Zhang Z, Coomans C, Roebroek A, Dürr J, David G. *Cellular uptake of mammalian heparanase precursor involves low density lipoprotein receptor-related proteins, mannose 6-phosphate receptors, and heparan sulfate proteoglycans.*

J Biol Chem 2005; 280: 33141–33148.

Waitzinger J, Bepperling F, Pabst G, Opitz J, Müller M, Baron J: *Pharmacokinetics and tolerability of a new hydroxyethyl starch (HES) specification [HES (130/0.4)] after single-dose infusion of 6% or 10% solutions in healthy volunteers.*

Clin Drug Investig 1998; 16: 151–160.

Waitzinger J, Bepperling F, Pabst G, Opitz J. *Hydroxyethyl starch (HES) [130/0.4], a new HES specification: pharmacokinetics and safety after multiple infusions of 10% solution in healthy volunteers.*

Drugs R D 2003; 4: 149–157.

Walmrath H-D, Seeger W. *Akutes Atemnotsyndrom (ARDS).*

In: Intensivmedizin. Van Aken H, Reinhart K, Zimpfer M, Welte T (Hrg.) 2. Aufl., Thieme, Stuttgart 2006; 872–880.

Weidler B, von Bormann B, Sommermeyer K, Lohmann E, Peil J, Hempelmann G. *Pharmacokinetic parameters as criteria for clinical use of hydroxyethyl starch preparations.*

Arzneimittelforschung 1991; 41: 494–498.

Weinacker AB, Vaszar LT. *Acute respiratory distress syndrome: physiology and new management strategies.*

Annu Rev Med 2001; 52: 221–237.

Weinbaum S, Zhang X, Han Y, Vink H, Cowin SC. *Mechanotransduction and flow across the endothelial glycocalyx.*

Proc Natl Acad Sci USA 2003; 100: 7988–7995.

Westphal M, James M F M, Kozek-Langenecker S, Stocker R, Guidet B, Aken van H. *Hydroxyethyl starches.*

Anesthesiology 2009; 111: 187–202.

Wiedermann CJ. *Systematic review of randomized clinical trials on the use of hydroxyethyl starch for fluid management in sepsis.*

BMC Emerg Med 2008; Jan 24; 8:1.

Yoshida M, Minami Y, Kishikawa T. *A study of hydroxyethyl-starch: Part III. Comparison of metabolic fates between 2-O-hydroxyethyl starch and 6-O-hydroxyethyl starch in rabbits.*
Stärke 1984; 36: 209–212.

Zetser A, Levy-Adam F, Kaplan V, Gingis-Velitski S, Bashenko Y, Schubert S, Flugelman M. Y, Vlodavsky I, Ilan N. *Processing and activation of latent heparanase occurs in lysosomes.*
J Cell Sci 2004; 117: 2249–2258.

Zuurbier C.J, Demirci C, Koeman A, Vink H, Ince C. *Short-term hyperglycemia increases endothelial glycocalyx permeability and acutely decreases lineal density of capillaries with flowing red blood cells.*
J Appl Physiol 2005; 99: 1471–1476.

6.3 Danksagung

Ich bedanke mich bei Herrn Prof. Dr. med. A. E. Goetz für die freundliche Aufnahme in die Klinik für Anästhesiologie, dessen wissenschaftlich produktive Atmosphäre er maßgeblich prägt, und für das mir entgegengebrachte Vertrauen.

Mein Dank gilt PD Dr. med. R. Kiefmann und Dr. med. K. Heckel für ihre Aufnahmen in den Arbeitskreis Lungenmikrozirkulation. Ihre freundliche Kompetenz, wissenschaftliche Erfahrung und ihr Ideenreichtum weckten und förderten meine Freude an der Forschung.

Besonderer Dank gilt Dr. med. M. S. Strunden für die hervorragende Einführung in die Videofluoreszenzmikroskopie, sein Engagement bei der praktischen Durchführung der Versuche und für seine zahlreichen Anregungen. Seine Unterstützung hat entscheidend zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Frau A. Schuster und Frau M. Weber möchte ich für die präzise Einführung in die molekularbiologischen Arbeitstechniken und die stets kompetente und uneigennützte Unterstützung danken.

Ebenfalls danke ich allen medizinisch-technischen Angestellten für ihr Engagement und Entgegenkommen bei den laborchemischen Arbeiten und allen dabei auftretenden Fragen sowie allen Mitarbeitern und Freunden des Instituts für Anästhesiologie für ihre unkomplizierte Hilfsbereitschaft und ihren Beitrag für die kollegiale Arbeitsatmosphäre, die dieses Institut kennzeichnet.

Meiner Großmutter Karoline Knöppel danke ich für ihre Hilfe und Begleitung durch mein Medizinstudium. Sie war mir in vielerlei Hinsicht ein Vorbild.

Für seine bedingungslose Unterstützung möchte ich Dimitry Bohlen danken.

6.4 Eidesstattliche Versicherung

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

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

Unterschrift:

6.5 Veröffentlichung in SHOCK 2012; 38(5): 559–566.

SHOCK, Vol. 38, No. 5, pp. 559–566, 2012

GLYCOCALYX DEGRADATION CAUSES MICROVASCULAR PERFUSION FAILURE IN THE *EX VIVO* PERFUSED MOUSE LUNG: HYDROXYETHYL STARCH 130/0.4 PRETREATMENT ATTENUATES THIS RESPONSE

Mike Sebastian Strunden,^{*,†} Anika Bornscheuer,^{*} Anke Schuster,^{*,†}
Rainer Kiefmann,^{*,†} Alwin E. Goetz,^{*} and Kai Heckel^{*,†}

^{*}Department of Anesthesiology and [†]Cardiovascular Research Center, University Medical Center
Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany

Received 28 Apr 2012; first review completed 22 May 2012; accepted in final form 14 Aug 2012

ABSTRACT—The endothelial glycocalyx (GLX) is pivotal to vascular barrier function. We investigated the consequences of GLX degradation on pulmonary microvascular perfusion and, prompted by evidence that hydroxyethyl starch (HES) improves microcirculation, studied the effects of two HES preparations during GLX diminution. C57 BL/6 black mice lungs were explanted and perfused with 1-mL/min buffer solution containing autologous erythrocytes (red blood cells) at a hematocrit of 5%. Microvessel perfusion was quantified by video fluorescence microscopy at 0 and 90 min. To register interstitial edema, alveolar septal width was quantified. Pulmonary artery pressure (PAP), airway pressure, and left atrial pressure were recorded continuously. Lungs were randomly assigned to four groups (each $n = 5$): (i) control: no treatment, (ii) HEP1: heparinase I (1 mU/mL) was injected for GLX degradation, (iii) HES 130, and (iv) HES 200: one third of perfusion fluid was exchanged for 6% HES 130/0.4 or 10% HES 200/0.5 before GLX degradation. Analysis of variance on ranks and pairwise multiple comparisons were used for statistics, $P < 0.05$. Compared with control, GLX degradation effected perfusion failure in microvessels, increased PAP, and facilitated interstitial edema formation after a 90-min period of perfusion. In contrast to HES 200/0.5, pretreatment with HES 130/0.4 attenuated all of these consequences. Sequelae of GLX degradation in lung include perfusion failure in microvessels, interstitial edema formation, and increase in PAP. We assume that these effects are a consequence of vascular barrier dysfunction. Beneficial effects of HES 130/0.4 are presumably a result of its lower red blood cell bridging capacity compared with HES 200/0.5.

KEYWORDS—Glycocalyx, lung microcirculation, fluorescence microscopy, hydroxyethyl starch

ABBREVIATIONS—ESL—endothelial surface layer; FACS—fluorescence-activated cell sorting; FITC—fluorescein isothiocyanate; GLX—endothelial glycocalyx; HEP1—heparinase I; HPMECs—human pulmonary microvascular endothelial cells; HES—hydroxyethyl starch; HS—heparan sulfate; PAP—pulmonary artery pressure; MFI—mean fluorescence intensity; RBC—red blood cell; V_{RBC} —red blood cell velocity

INTRODUCTION

Endothelial glycocalyx

Healthy vascular endothelium is coated with syndecans and glypicans containing branching heparan sulfate (HS) side chains, which together form the endothelial glycocalyx (GLX) (1). Bound plasma proteins constitute the GLX to the endothelial surface layer (ESL), which, with a thickness of approximately 1 μm , is partially thicker than the endothelial cell itself (1, 2). Current basic research data demonstrate at least two fundamental tasks of the ESL: contributing to vascular barrier function and to endothelial mechanotransduction.

Under physiological conditions, the GLX increases the oncotic pressure within the ESL by retaining proteins and thus limits fluid loss across the vascular barrier (3). As the most apical structure on the endothelial cell, the GLX participates in mechanotransduction by sensing shear stress of flowing blood (4–7) and is involved in diseases such as diabetes, arteriosclerosis, metastatic disease, ischemia/reperfusion injury, and inflammation (8–11).

Degradation of the endothelial GLX

Deterioration of the ESL has serious consequences: Collapse of the vascular barrier dramatically increases capillary permeability, which results in tissue edema formation and complete organ dysfunction (12, 13). Concerning the lung, ischemia/reperfusion injury and sepsis, both capable to degrade the GLX, are known to damage the endothelial barrier of pulmonary vessels (4, 5, 14–16). Although extension of the diffusion distance, as caused by interstitial edema, or reduction of the contact area, as induced by depletion of perfused microvessels, will decrease pulmonary oxygen uptake (17), a major problem of critically ill patients (18), the impact of GLX degradation on pulmonary microvascular perfusion has not been investigated. While on the one hand GLX destruction may deteriorate blood distribution by increasing capillary hematocrit and blood viscosity (19, 20), degradation of the highly negative charged GLX, which may retard blood flow

Address reprint requests to Mike Sebastian Strunden, MD, DESA, Department of Anesthesiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Martinistrasse 52, D-20246 Hamburg, Germany. E-mail: m.strunden@uke.de.

Authors' contribution: M.S.S. carried out the animal experiments and drafted the manuscript. A.B. participated in the animal experiments and acquired the data. A.S. carried out the fluorescence-activated cell sorting analysis. M.S.S. and K.H. implemented the statistical analysis and the interpretation of data. K.H., R.K., and A.E.G. conceived of and designed the study and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

This study was supported by the Else Kröner-Fresenius-Stiftung, Bad Homburg v.d.Höhe, Germany (grant P38/08//A26/08), and institutionally by the Department of Anesthesiology, University Medical Center Hamburg-Eppendorf, Hamburg, Germany.

The authors have no competing interests.

DOI: 10.1097/SHK.0b013e31826f2583

Copyright © 2012 by the Shock Society

by electrokinetic effects (21), might be beneficial regarding microvascular perfusion on the other hand. The present experiments are the first to investigate the consequences of GLX diminution in *ex vivo* perfused lungs and to identify the aftermath on microvascular perfusion, pulmonary artery pressure (PAP), and interstitial edema formation. The high-grade enzymatic GLX degradation, as used in our experiments, imitates GLX deterioration in patients during ischemia/reperfusion or sepsis, where profoundly increased levels in serum HS were found (10, 11). We used fluorescence-activated cell sorting (FACS) of human pulmonary microvascular endothelial cells (HPMECs) to verify this HS-cleaving activity of the GLX-degrading enzyme heparinase I (HEP1).

Ratio for the use of hydroxyethyl starch

Regarding microcirculation, hydroxyethyl starch (HES) solutions have beneficial effects on organ perfusion (22, 23) and, concerning the GLX, may contribute in sustaining the vascular barrier function (13). Whether HES administration has impact on pulmonary microcirculation during GLX degradation is unclear. Here we investigated whether the tetrastarch 6% HES 130/0.4 (Voluven; Fresenius Kabi, Bad Homburg, Germany), primarily used for volume resuscitation in European countries, has effects on microvessel perfusion, PAP, and interstitial edema formation during GLX degradation in the *ex vivo* perfused lung and compared it with the use of 10% HES 200/0.5 (HAES-steril). Again, FACS analysis of HPMECs was used to test whether HES has influence on the GLX-degrading heparinase activity. Our study is a pretreatment model that reflects particular clinical situations in which HES is administered before GLX deterioration. Examples are cardiac surgery, organ transplantation, or reperfusion after thrombectomy.

METHODS

Animal preparation

All animals received care in accordance with the guidelines on protection of laboratory animals. Experiments were submitted to and approved by the state authority of health, veterinary, and food supervision in Hamburg (application no. 81/08). Male C57 BL/6 black mice (body weight from 25 to 32 g) were anesthetized with isoflurane (Forene; Abbott, Wiesbaden, Germany) and following intraperitoneal injection of 40 µg S-ketamine (Ketanest-S; Pfizer Pharma, Karlsruhe, Germany), 16 µg xylazine (Rompun; Bayer Vital, Leverkusen, Germany) and 40 IU heparin (Liquemin; Hoffmann La Roche, Grenzach-Wyhlen, Switzerland) per gram of body weight. Animals were tracheotomized and mechanically ventilated using volume control (Inspira asv; Harvard Apparatus, Holliston, Mass) with a constant rate of 100 per min and a volume of 0.6 mL per pass (Fio₂ 0.21; end-expiratory airway pressure 3 mmHg). Following median thoracotomy, 400 IU heparin was injected into the right heart ventricle before 1 mL blood was extracted for later use. At that time, cardiac arrest emerged. For extracorporeal perfusion and continuous hemodynamic monitoring, catheters were placed into the pulmonary artery and the left heart ventricle (Portex nonsterile polythene tubing; SIMS Portex Ltd, Hythe, UK; 0.58-mm internal diameter for pulmonary artery and 0.75-mm internal diameter for the left ventricle). Finally, the heart-lung package was carefully dissected and explanted *en bloc*, as described previously (24).

Ex vivo perfusion

The heart-lung package was transferred to the *ex vivo* perfusion system, and lungs were perfused as described by Kieffmann et al. (24). The endotracheal tube was connected to a flow meter (Rotameter Mfg Co Ltd, Bath, England), and lungs were carefully inflated until all observable atelectatic zones were recruited. Organs were aerated with a gas mixture emulating the missing carbon dioxide production of the body (0.6 L/min oxygen, 1.2 L/min nitrogen, 0.1 L/min carbon dioxide). Continuous gas flow rather than intermittent mandatory ventilation is essential for achieving the planar, immobile lung surface necessary to enable video fluorescence microscopic imaging to be performed.

During the whole experiment, airway pressure was adjusted between 8 and 10 mmHg by regulating gas flow. To determine PAP and left atrial pressure, the perfusion catheters were attached to pressure transducers, which connected a roller pump (ISM 833C; Ismatec, Glattbrugg, Switzerland) to the explanted organ via a bubble trap and a reservoir. The whole system was heated by tubes containing warm sterile distilled water at 40°C. All lungs were perfused at a predetermined, constant rate of 1 mL/min with recirculating buffer solution containing autologous mouse erythrocytes (hematocrit 5%) during all experiments. pH values were assayed by gas analysis from perfusion solution samples (Radiometer ABL 505, Radiometer OSM 3; Radiometer Copenhagen, Willich, Germany). Pulmonary artery pressure and left atrial pressure were recorded continuously to assess hemodynamics.

Perfusion solution

As described previously (24), lungs were perfused with a buffer solution containing: H₂O (500 mL), HEPES 2.383 (20 mM), CaCl₂ 0.0555 g (1 mM), MgCl₂ 0.5 mL (1 mM), KCl 0.1865 g (5 mM), NaCl 4.385 g (150 mM), D-glucose 0.9 g (10 mM), 4% dextran 70, and 1% bovine serum albumin (BSA), pH 7.4. In lungs treated with HES, one third of the perfusion solution was exchanged against either 6% HES 130/0.4 (Voluven) or 10% HES 200/0.5 (HAES-steril). The tetrastarch solution Voluven is composed of highly branched amylopectin. It has a molar substitution factor of 0.4 and a molecular weight of 130 kD. HAES-steril is a pentastarch solution with a molecular weight of 200 kD and a molar substitution factor of 0.5. To avoid potential immunologic reactions, autologous mouse erythrocytes were isolated and added to the perfusion solution to maintain a hematocrit of 5%. Hematocrit was assayed by centrifugation of perfusion solution samples (Hettich Haematokrit; Hettich, Tuttlingen, Germany).

Red blood cell preparation

As described previously (24), 1 mL of blood was withdrawn from the animal by puncture of the right heart ventricle and immediately centrifuged (2,000g at 4°C for 10 min). The supernatant and the buffy coat were siphoned off to separate blood plasma and white blood cells from the remaining red blood cell (RBC) pellet. Following this, pellet was resuspended with Alsevers buffer and centrifuged again. This procedure was repeated three times before suspension of the RBCs with perfusion buffer solution and their administration into the perfusion system.

Viscosity of the perfusion solution

Samples of the perfusion solution were collected at the end of each experiment and centrifuged at 40g for 10 min (Minispin; Eppendorf, Hamburg, Germany) to separate RBCs from the buffer solution. Then, viscosity was determined with a capillary hose viscometer (Rheomat; Fresenius).

Degradation of the endothelial GLX

The enzyme HEP1 sheds HS, the major constituent, from the GLX and reduces its scaffolding to a 10th of its original thickness, which results in a biologically widely inactive relict of the ESL (28). We administered 1 mU/mL HEP1 (HEP1; Sigma, St Louis, Mo) directly into the perfusion system. Although HEP1 degrades heparin in solution, a possible degradation of heparin did not influence our results because it was unavailable to the enzyme in the experiments. Whereas small amounts of heparin were probably bound to thrombin after injection into the mouse, the bigger part was washed out of the explanted lung during the 10-min-long steady-state buffer perfusion. Even if completely remaining, heparin could not have any effects in buffer solution without its physiologic cofactors (eg, blood coagulation factor X).

Fluorescence-activated cell sorting

Proliferating HPMECs were delivered by PromoCell (C-12282; PromoCell GmbH, Heidelberg, Germany), cultured under standard conditions, and detached with Accutase solution (Sigma). Cells were incubated for 12 h at 37°C and 5% CO₂ in HBS buffer solution (as described above under Perfusion Solution) with and without admixture of HES 130/0.4 (Voluven, ratio as used for lung perfusion) and with and without heparinase treatment, respectively (0.2 mU/mL HEP1). For detection of GLX HS epitopes, 300,000 cells were incubated with mouse anti-human HS (10E4 epitope) antibody (US Biological, Swampscott, Mass) overnight at 4°C. IgM K (BioLegend, San Diego, Calif) was used as isotype control. A second step with anti-mouse K-fluorescein isothiocyanate (FITC) antibody (Rockland, Gilbertsville, Pa) was performed for mouse-anti-human HS (10E4 epitope) antibody and IgM K-stained cells for 30 min on ice. After each staining step, cells were washed twice in phosphate-buffered saline/0.1% BSA (Biochrom AG [Berlin, Germany], Sigma) with 0.05% sodium azide (Sigma).

Determination of microvascular perfusion and RBC velocity by fluorescence microscopy

To assess perfusion of subpleural pulmonary microvessels by video fluorescence microscopy, the perfusion solution was stained with 20 $\mu\text{L/mL}$ FITC, emitting green light (520–530 nm) after excitation (Sigma). Thus, microvessel perfusion could be qualitatively detected by the intravascular FITC fluorescence, whereas nonperfused microvessels remained dark. Using FITC for negative contrast, RBCs were detected as dark objects in the fluorescent dye. Red blood cell velocity (V_{RBC}) was assessed in two separate subpleural arterioles, capillaries, and venules per mouse lung by capturing 20-s-long video fluorescence microscopy clips (microscope: Zeiss Axiovert; Carl Zeiss GmbH [Jena, Germany]; camera: Photometrics Coolsnap HQ, Photometrics [Tucson, Ariz]) at the beginning of the experiment and after 90 min of perfusion. We restricted the measurements to these two points in time to avoid excessive bleaching of FITC during the exposure times. The captured video clips were evaluated offline from the video recording using a digital image-processing system (MetaMorph; Molecular Devices, Downingtown, Pa), and V_{RBC} was determined as described and discussed in detail previously (25). In brief, the velocity of each labeled RBC crossing a defined vessel section was calculated as the distance in the axial direction of the vessel that the RBCs passed per time. We assessed mean V_{RBC} in observed vessels as the harmonic mean of at least 10 single RBC velocities ($V_{\text{RBC}} = n \times (1/V_{\text{RBC}-1} + 1/V_{\text{RBC}-2} + \dots + 1/V_{\text{RBC}-n})^{-1}$ [$\mu\text{m s}^{-1}$]).

Determination of interstitial pulmonary edema

Interstitial pulmonary edema was qualitatively assessed by fluorescence microscopy. Edematous interstitial regions appear bright in fluorescence microscopy images because of the extravasation of FITC, whereas the dye remains intravascular in lungs without pronounced interstitial edema. Edema formation was quantitatively assessed measuring alveolar septal width, as a surrogate representing tissue edema, using offline image processing (MetaMorph; Molecular Devices) of fluorescence microscopy images taken after 90 min of perfusion. The outer wall of the alveoli was outlined, and alveolar septal width was described as the harmonic mean of 15 measurements of the distance between two adjacent alveoli at three different areas in each lung.

Experimental protocol

Only organs showing stable hemodynamic values and clearly perfused (FITC fluorescent) subpleural microvessels during a 10-min steady-state period of buffer perfusion were used for the experiments. These lungs were randomly divided into four groups (each $n = 5$) and *ex vivo* perfused for 90 min. Video fluorescence microscopy was performed at the beginning of the experiment (at 0 min) and after 90 min of perfusion (Fig. 1).

- Group 1 “control”: lungs were perfused with buffer solution for 90 min without any further treatment.
- Group 2 “HEP1”: lungs were perfused under identical conditions as the control group, but 1 mU/mL HEP1 (Sigma) was injected directly into the perfusion system 15 min into the trial.

- Groups 3 “HES 130” and 4 “HES 200”: In HES-treated lungs, one third of the perfusion solution was exchanged for either 6% HES 130/0.4 (Voluven; Fresenius Kabi) or 10% HES 200/0.5 (HAES-steril; Fresenius Kabi) 15 min before injection of HEP1.

Exchanging one third of the perfusion solution against Voluven or HAES-steril in our experiments reflects the clinical situation of massive volume resuscitation.

Statistical analysis

All data are represented as median (interquartile range) or mean (SEM) if data were normally distributed. Statistical data analysis was performed using SigmaStat (Jandel, Erkrath, Germany). Differences between the groups were tested using analysis of variance on ranks followed by pairwise multiple comparison. Results were considered statistically significant when $P < 0.05$.

RESULTS

PAP, left atrial pressure, and airway pressure

Pulmonary artery pressure ranged from 10 to 14 mmHg and remained constant in lungs of control group (group 1) and HES-treated lungs in groups 3 and 4 during the whole experiment. In organs treated with heparinase only (group 2), PAP significantly increased to 19 mmHg and greater after administration of the enzyme.

Left atrial pressure showed values between 0 and +2 mmHg in all groups and did not change over time. Airway pressure was adjusted between 8 and 10 mmHg in all groups (Fig. 2).

Viscosity of the perfusion solution

After 90 min of perfusion, viscosity of the perfusion solution was 1.008 mPa $\cdot$ s (± 0.015) in the control group. In heparinase-treated lungs, viscosity significantly decreased to 0.868 mPa $\cdot$ s (± 0.013). In both the HES 130 group (0.958 ± 0.015) and HES 200 group (0.996 ± 0.017), viscosity was significantly higher than that in the HEP1 group (Fig. 3).

Fluorescence-activated cell sorting

Anti-HS antibody-marked HPMECs in HEPES buffer solution with (control) and without admixture of HES 130/0.4 (Voluven) did not differ in mean fluorescence intensity (MFI) ($4,860 \pm 117$ vs. $4,993 \pm 99$ [dimensionless]). After treatment with

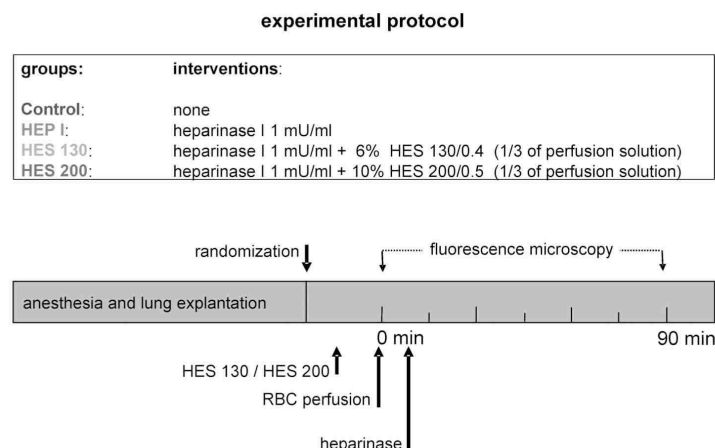


Fig. 1. Experimental protocol.

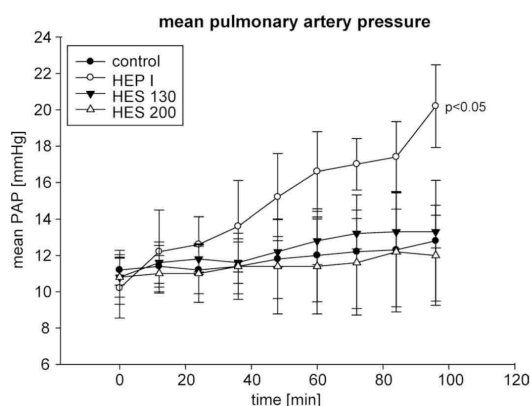


Fig. 2. **Changes in PAP.** Pulmonary artery pressure significantly increased in heparinase-treated lungs but remained at physiological levels in all other experimental groups.

HEP1, MFI of HPMECs decreased significantly in both groups ($3,827 \pm 111$ vs. $4,860 \pm 117$ and $3,608 \pm 115$ vs. $4,993 \pm 99$) (Fig. 4). These data verify the HS-cleaving activity of HEP1 and demonstrate GLX degradation on the HPMEC surface. The decreased MFI levels after GLX degradation did not differ between control group cells and HES-processed cells ($3,827 \pm 111$ vs. $3,608 \pm 115$) (Fig. 4), which indicates that the GLX-degrading activity of HEP1 was not lowered in the presence of HES 130/0.4. Therefore, inhibitory influence on heparinase can be ruled out as a possible explanation for beneficial effects seen with HES 130/0.4.

Perfusion of subpleural pulmonary microvessels and RBC velocity

Under baseline conditions, all observed microvessels showed FITC fluorescence intravascularly and were therefore identified as perfused vessels. Mean RBC velocity (V_{RBC}) in lung arterioles and capillaries was similar in all experimental groups at

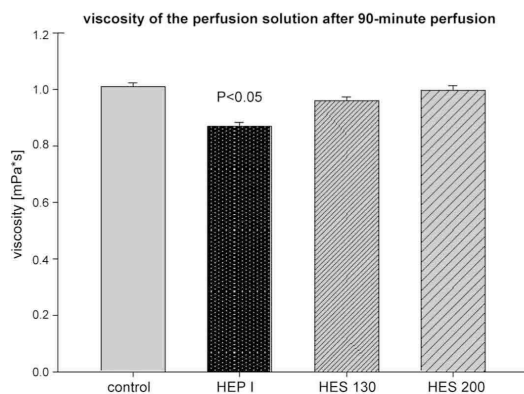


Fig. 3. **Viscosity of the perfusion solution after 90 min of ex vivo perfusion.** In comparison to the control group and HES-treated lungs, viscosity of the perfusion solution was significantly decreased in lungs treated with HEP1 only.

0 min and after 90 min of perfusion (Fig. 5). In venules, V_{RBC} was significantly higher in the control group, HEP1 group, and HES 130-treated organs at 0 min than it was in arterioles and capillaries. In contrast, in HES 200-treated lungs, V_{RBC} was significantly slower in venules at 0 min. After 90 min of perfusion, V_{RBC} in venules showed widely spread values and was lower than at 0 min (Fig. 5). Glycocalyx degradation led to a complete abolition of FITC fluorescence in the microvasculature. Clots of RBCs were evident in all arterioles, capillaries, and venules observed, representing a complete cessation of microvascular perfusion. In contrast, in lungs pretreated with HES 130/0.4, FITC fluorescence was as well demonstrable in the microvessels after 90 min of perfusion (Fig. 6). No significant differences were found when comparing V_{RBC} under baseline conditions to the time 90 min (Fig. 5). Pretreatment with HES 200/0.5 had no such effects. Compared with baseline conditions, RBCs in lungs of the HES 200 group flowed significantly more slowly after 90 min of perfusion. In addition, complete stasis was seen in some of the observed vessels. Thus, values achieved from heparinase-treated lungs did not differ statistically from the V_{RBC} data found in organs pretreated with HES 200/0.5 (Fig. 5). Whereas V_{RBC} measured in arterioles and venules after GLX degradation showed widespread changes, data from capillaries demonstrate a clear difference between V_{RBC} in the exclusively heparinase-treated lungs and the organs that received HES pretreatment (Fig. 5).

Interstitial lung edema and alveolar septal width

After 90 min of perfusion, the interstitium of heparinase-treated lungs (group 2) showed intense FITC fluorescence indicating extravasation of FITC. In contrast, in organs that did not undergo GLX destruction or were treated with HES (groups 1, 3, and 4), FITC fluorescence was detectable mainly

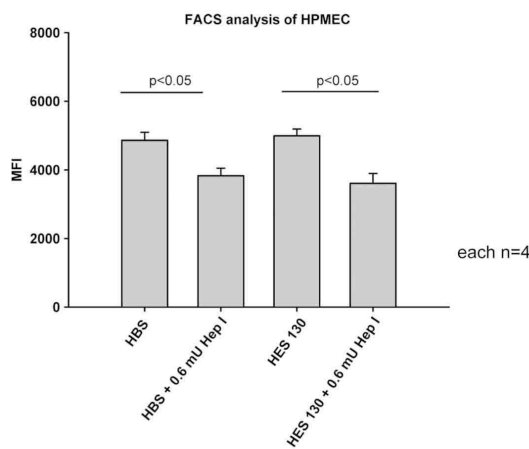


Fig. 4. **Fluorescence-activated cell sorting analysis of HPMECs.** Primary antibody: mouse anti-human HS (10E4 epitope) antibody; secondary antibody: rabbit anti-mouse K-FITC-conjugated antibody. Antibody-marked HPMECs in HEPES buffer solution (control) and HES 130 (HEPES buffer solution + Voluven) do not differ in MFI. Heparinase treatment lowered MFI in both control group and HES 130 group significantly. Fluorescence-activated cell sorting data verify the missing influence of Voluven on the analysis and the HS-cleaving activity of HEP1.

red blood cell velocity (RBC) in lung microvessels

RBC velocity in arterioles

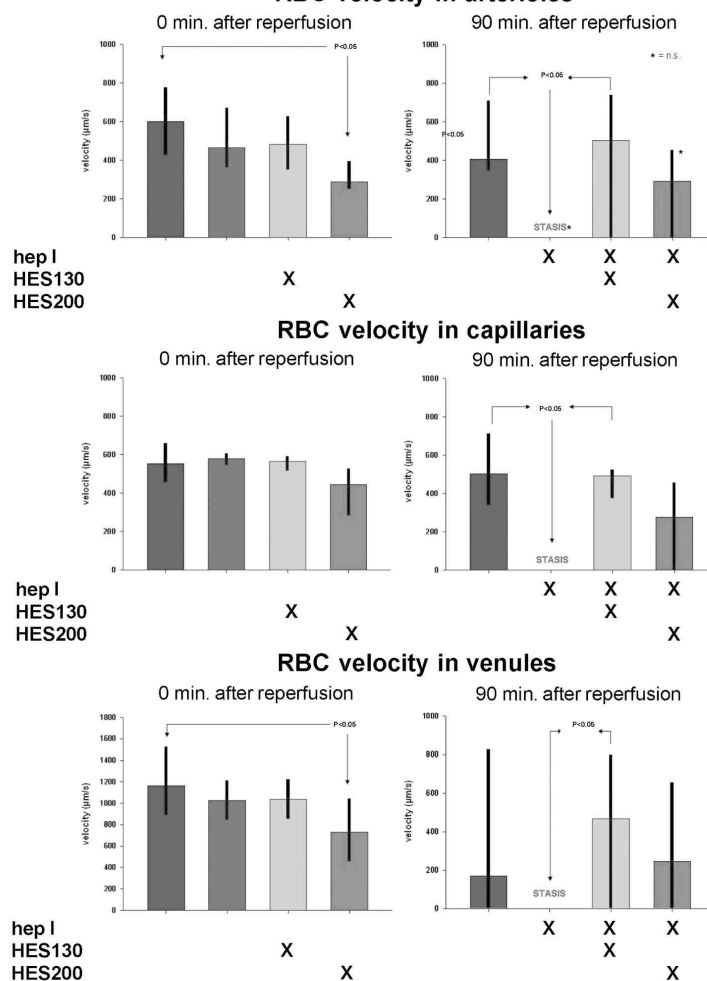


FIG. 5. **Impact of GLX degradation on microvessel perfusion and V_{RBC} in pulmonary microcirculation.** Compared with control and HES-treated organs, enzymatic GLX degradation by heparinase leads to an extreme decrease in V_{RBC} up to a stop of perfusion in microvessels.

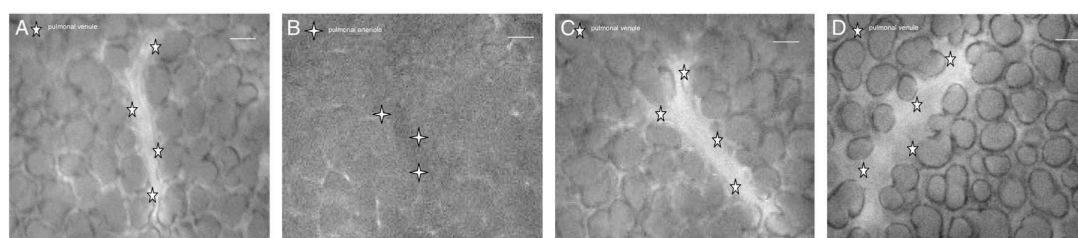


FIG. 6. **Exemplary videomicroscopic images after 90 min of *ex vivo* perfusion.** A, Control: subpleural venule. Characteristic contrast traces in the FITC fluorescent venule indicate a perfused vessel and a high V_{RBC} . B, HEP I: subpleural arteriole. Missing FITC fluorescence in the dependent microvascular vessels indicates a nonperfused area. C, HES 130: subpleural venule. Characteristic contrast traces indicate a perfused vessel and a high V_{RBC} as seen in the control group. D, HES 200: subpleural venule. Missing contrast traces in the FITC fluorescent buffer indicate a perfused vessel, but a low V_{RBC} . White bars indicate 100 μ m.

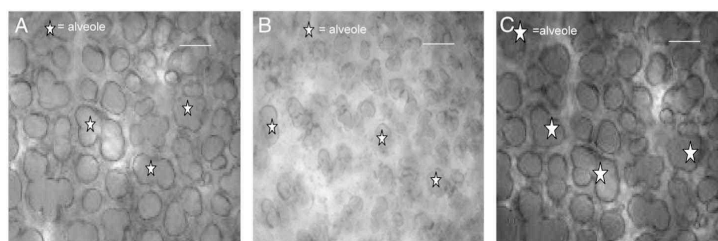


Fig. 7. Exemplary videomicroscopic photographs after 90 min of *ex vivo* perfusion. A, Control: small alveolar septal width and absence of FITC extravasation in the lung directly after reperfusion indicating no distinctive edema formation. B, HEP I: large distances between two adjacent pulmonary alveoli and extravasation of FITC fluorescent buffer indicating interstitial edema formation. C, HES 130: alveolar septal width after 90 min of *ex vivo* perfusion is comparable to values achieved at 0 min (A). White bars indicate 50 μ m.

intravascular (Fig. 7). Alveolar septal width was significantly expanded in the HEP1 group (group 2) compared with organs of the control group and HES groups. Whereas the distance between two adjacent pulmonary alveoli was on average 26 μ m ($\pm$ 9) in the HEP1 group, in the control group and HES-treated organs only 19 μ m ($\pm$ 4) was measured after 90 min of perfusion, representing a more distinct development of interstitial lung edema in the HEP1 group (Fig. 8). Values obtained from the control group and HES-treated lungs did not differ from each other (Fig. 8).

DISCUSSION

Our data demonstrate the aftermath of GLX degradation on pulmonary microcirculation in the *ex vivo* perfused mouse lung and their attenuation by HES 130/0.4 pretreatment. Limitations to the present study include that lungs were perfused with a buffer solution containing RBCs instead of blood and were statically inflated instead of being periodically ventilated. These limitations, however, must be accepted to obtain ideal conditions for video fluorescence microscopic measurements.

Video fluorescence microscopy

Video fluorescence microscopy was described and discussed in detail previously (25). In contrast to the technique described

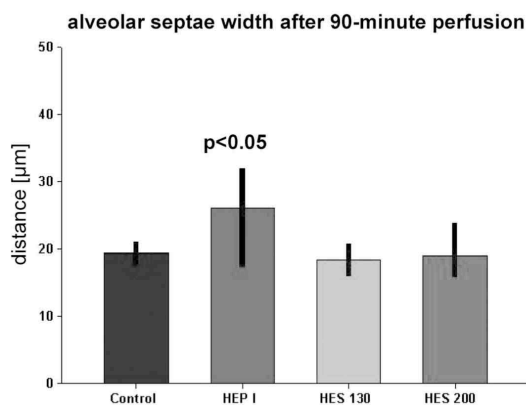


Fig. 8. Alveolar septal width after 90 min of *ex vivo* perfusion. Interstitial space between pulmonary alveoli is significantly more expanded in lungs treated with heparinase exclusively compared with organs of the control group and HES groups.

for *in vivo* measurement of V_{RBC} (25), we did not stain the RBCs, but the perfusion solution to use FITC fluorescence as a qualitative marker for microvascular perfusion. Fluorescein isothiocyanate is used for various experimental purposes and is biologically harmless (26). Furthermore, we did not stain RBCs with a second dye (eg, rhodamine), because in our *ex vivo* experiments, stained RBCs were more adhesive to the vascular wall than undyed cells, which is most likely a consequence of the missing splenic sequestration of rigid cells.

Enzymatic degradation as a model for GLX destruction

Heparinase I, a bacterial analog to human heparanase from *Flavobacterium heparinum* (27), specifically sheds HS from the GLX without any nonspecific protease activity. Being used for experimental GLX diminution before, its GLX-degrading effects were verified repetitively (19, 28). Treatment with HEP1 degrades the GLX scaffolding to a relic of a 10th of its original thickness, which is unable to sustain a biologically relevant ESL (28). Enzymatic destruction was chosen as a model generally representing the consequences of a GLX degradation initiated by different pathologic situations such as exposure to inflammatory mediators, ischemia/reperfusion, major surgery, or hypervolemia (10, 11, 13, 17, 29–31). We excluded influences of the perfusion solution or HES on HEP1 activity by FACS analysis. Determination of HEP1 activity during lung perfusion by spectrophotometric determination (HEP1 Assay; Sigma) failed because of the high light extinction capacity of the perfusion fluid.

Impairment of microvascular perfusion after GLX degradation

Studies directly examining the impact of GLX degradation on microvessel perfusion or V_{RBC} in the lung are currently not available. The perfusion failure observed after GLX diminution can hardly only be a result of blood flow redistribution phenomena between different lung areas, because flow stasis should then occur in capillaries and in the majority of microvessels of the control group and HES-treated organs as well. Instead, perfusion failure can be explained by a loss of vascular barrier function after GLX destruction in the examined microvessels (12, 29). The resulting extreme fluid extravasation increases capillary hematocrit (19), which goes along with an increase in blood viscosity and therefore reduces V_{RBC} in microvessels (20). This mechanism also explains the RBC

clots inhibiting microvessel perfusion in heparinase-treated lungs and is supported by the significantly lowered viscosity of the perfusion solution (Fig. 3), which indicates a relevant loss of proteins from the vasculature and a trapping of RBCs in no longer perfused lung areas.

Increase in PAP after GLX destruction

Based on the constant perfusion rate in our experiments, PAP must increase to compensate the reduced overall cross section of perfused microvessels by RBC clots after GLX degradation (Figs. 2, 5, and 6). In HES-treated lungs, showing nearly no RBC clots, no significant PAP increase was observed (Figs. 2 and 5). Although HES 200/0.5 did not improve V_{RBC} compared with the HEP 1 group, PAP was equal to results of the control group and HES 130/0.4-treated lungs. Thus, prevention of PAP increase does not explain the benefit on microcirculation seen with HES 130/0.4 over HES 200/0.5.

Interstitial edema formation after GLX destruction

The extravasation of FITC combined with a significantly wider interstitial space after GLX destruction is pathognomonic for interstitial lung edema, which can be explained by two mechanisms: First, endothelial permeability increases with deterioration of the GLX (28, 29) because a rudimentary GLX scaffolding is unable to act as a barrier against vascular leakage (29, 30). Second, increase in PAP results in elevated intravascular hydrostatic pressure and therefore enhances transcapillary fluid filtration additionally. Prevention of interstitial edema was evident in both HES groups, so it is not the key mechanism for the benefit on microcirculation seen with HES 130/0.4 over HES 200/0.5.

Preventive effect of HES pretreatment

Six percent HES 130/0.4 (Voluven) and 10% HES 200/0.5 (HAES-steril) are used for volume resuscitation in European countries, whereas 6% HES 130/0.4 (Voluven) is used primarily. To discuss their different characteristics and pharmacodynamics extensively is beyond the scope of this article. Respecting the maximum permissible doses for Voluven and HAES-steril in humans, an adult (80 kg) can receive approximately 4,000 mL Voluven or 2400 mL HAES-steril per day, which is more than one third of the circulating blood volume (approximately 70 mL/kg body weight). Thus, exchanging one third of the perfusion solution against HES in our experiments reflects volume resuscitation in human. This study is a pre-treatment model. In clinical routine, HES is given before GLX deterioration unconsciously. During cardiac bypass surgery, organ transplantation or reperfusion after thrombectomy HES is infused before reperfusion injury, which is a major mechanism of GLX destruction (10). Although HES is used for improvement of microcirculation (32), the interaction between the ESL and HES has not yet been directly studied. An explanation for the observed preventive effects of HES 130/0.4 is the influence of HES on blood viscosity. Hydroxyethyl starch solutions with lower molecular substitution factors decrease erythrocyte aggregation and thereby reduce low-shear viscosity of the blood (33), which is determined by macromolecular bridging of neighboring cells. Large macromole-

cules, such as HES 200/0.5, have a higher bridging capacity than smaller ones (34). Hydroxyethyl starch 130/0.4 is too small for bridging RBCs but at the same time is capable of interfering with the physiological bridging and thereby decreases erythrocyte aggregation (33). These effects are reflected in our results, because under basic conditions V_{RBC} in arterioles and venules of HES 200/0.5-treated lungs was significantly lower than in microvessels of the control group or HES 130/0.4-treated lungs. We assume that slow floating RBCs aggregate more easily in the absence of HES 130/0.4, are trapped in microvessels, and increase capillary viscosity but decrease systemic viscosity of the perfusion solution (Fig. 3). With the use of HES 130/0.4 more microvessels are perfused as without, the overall perfused vessel cross section is enlarged, and a compensatory PAP increase is prevented. The higher bridging capacity (34) may as well be the reason why interstitial edema formation and PAP increase were attenuated, but V_{RBC} was not improved with the use of HES 200/0.5. Interstitial lung edema after GLX degradation was lessened with both HES solutions. Described previously, HES 130/0.4 augmented the protection of the vascular barrier by hydrocortisone and reduced interstitial edema formation experimentally (13). Furthermore, HES sustained pulmonary microvascular perfusion and gas exchange in rabbit lungs during systemic inflammation (35).

CONCLUSIONS

We have demonstrated that destruction of the GLX impairs pulmonary microcirculation to a great extent. This is reflected by the cessation of microvascular perfusion, increase in PAP, and formation of interstitial lung edema in the *ex vivo* perfused mouse lung. We assume these effects to be a consequence of vascular barrier failure in microvessels. Second, we indicate that HES 130/0.4 is able to attenuate the shown responses to GLX destruction.

ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Mrs. M. Weber and Mrs. K. Pfeiffer-Drenckhahn for their technical assistance.

REFERENCES

- Vink H, Duling BR: Identification of distinct luminal domains for macromolecules, erythrocytes, and leukocytes within mammalian capillaries. *Circ Res* 79(3):581–589, 1996.
- Pries AR, Secomb TW, Gaetgens P: The endothelial surface layer. *Pflugers Arch* 440:653–666, 2000.
- Adamson RH, Clough G: Plasma proteins modify the endothelial cell glycocalyx of frog mesenteric microvessels. *J Physiol* 445:473–486, 1992.
- Dull RO, Dinavahi R, Schwartz L, Humphries DE, Berry D, Sasisekharan R, Garcia JG: Lung endothelial heparan sulfates mediate cationic peptide-induced barrier dysfunction: a new role for the glycocalyx. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 285(5):L986–L995, 2003.
- Dull RO, Mecham I, McJames S: Heparan sulfates mediate pressure-induced increase in lung endothelial hydraulic conductivity via nitric oxide/reactive oxygen species. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 292(6):L1452–L1458, 2007.
- Tarbell JM, Ebong EE: The endothelial glycocalyx: a mechano-sensor and -transducer. *Sci Signal* 1(40), (pt 8), 2008.
- Florian JA, Kosky JR, Ainslie K, Pang Z, Dull RO, Tarbell JM: Heparan sulfate proteoglycan is a mechanosensor on endothelial cells. *Circ Res* 93:e136–e142, 2003.

8. Nieuwdorp M, Meuwese MC, Vink H, Hoekstra JB, Kastelin JJ, Strokes ES: The endothelial glycocalyx: a potential barrier between health and vascular disease. *Curr Opin Lipidol* 16:507–511, 2005.
9. Nieuwdorp M, Haefen TW, van Gouverneur MC, Mooij HL, van Lieshout MH, Levi M, Meijers JC, Holleman F, Hoekstra JB, Vink H, et al.: Loss of endothelial glycocalyx during acute hyperglycemia coincides with endothelial dysfunction and coagulation activation *in vivo*. *Diabetes* 55:480–486, 2006.
10. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, Chappel D, Stoeckelhuber M, Welsch U, Reichart B, et al.: Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation* 116:1896–1906, 2007.
11. Nelson A, Berkestedt I, Schmidtchen A, Ljunggren L, Bodelsson M: Increased levels of glycosaminoglycans during septic shock: relation to mortality and the antibacterial actions of plasma. *Shock* 30:623–627, 2008.
12. van den Berg BM, Vink H, Spaan JA: The endothelial glycocalyx protects against myocardial edema. *Circ Res* 9:592–594, 2003.
13. Chappell D, Jacob M, Hofmann-Kiefer K, Bruegger D, Rehm M, Conzen P, Welsch U, Becker BF: Hydrocortisone preserves the vascular barrier by protecting the endothelial glycocalyx. *Anesthesiology* 107:776–784, 2007.
14. Janeway CA, Travers P, Walport M, Shlomchik M: *Immune Biology: The Immune System in Health and Disease*. 5th ed. New York: Garland, 20, 2001.
15. Moore TM, Shirah WB, Khimenko PL, Paisley P, Lausch RN, Taylor AE: Involvement of CD40-CD40L signaling in postischemic lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 283:L1255–L1262, 2002.
16. Strieter RM, Kunkel SL, Standiford TJ: *Chemokines in the Lung: Lung Biology in Health and Disease*. New York: Dekker, 2003.
17. Hardaway RM: A brief overview of acute respiratory distress syndrome. *World J Surg* 39(10):1829–1834, 2006.
18. Chappell D, Westphal M, Jacob M: The impact of the glycocalyx on microcirculatory oxygen distribution in critical illness. *Curr Opin Anaesthesiol* 22:155–162, 2009.
19. Desjardins C, Duling BR: Heparinase treatment suggests a role for the endothelial cell glycocalyx in regulation of capillary hematocrit. *Am J Physiol* 258:H647–H654, 1990.
20. Chien S: Biophysical behavior of red cells in suspension. In: Surgeneor M, ed. *The Red Blood Cell*. New York: Academic Press, 1031–1133, 1975.
21. Liu M, Yang J: Electrokinetic effect of the endothelial glycocalyx layer on two-phase blood flow in small blood vessels. *Microvasc Res* 78(1):14–19, 2009.
22. Standl T, Burmeister MA, Schroeder F, et al.: Hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4 provides larger and faster increase in tissue oxygen tension in comparison with prehemodilution values than HES 70/0.5 or HES 200/0.5 in volunteers undergoing acute normovolemic hemodilution. *Anesth Analg* 96:936–943, 2003.
23. Marik PE, Iglesias J, Maini B: Gastric intramucosal pH changes after volume replacement with hydroxyethyl starch or crystalloid in patients undergoing elective abdominal aortic aneurysm repair. *J Crit Care* 12(2):51–55, 1997.
24. Kiefmann R, Rifkind JM, Nagababu E, Bhattacharya J: Red blood cells induce hypoxic lung inflammation. *Blood* 111(10):5205–5214, 2008.
25. Kuhnle GE, Kuebler WM, Groh J, Goetz AE: Effect of blood flow on the leukocyte-endothelium interaction in pulmonary microvessels. *Am J Respir Crit Care Med* 152:1221–1228, 1995.
26. Römpf H, Falbe J, Regitz M: *Römpf Lexikon Chemie*. 9. Auflage. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1992.
27. Myler HA, West JL: Heparanase and platelet factor-4 induce smooth muscle cell proliferation and migration via bFGF release from the ECM. *J Biochem* 131:913–922, 2002.
28. Chappell D, Jacob M, Rehm M, Stoeckelhuber M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: Heparinase selectively sheds heparan sulphate from the endothelial glycocalyx. *Biol Chem* 389:79–82, 2008.
29. Chappell D, Jacob M, Becker BF, Hofmann-Kiefer K, Conzen P, Rehm M: Expedition glycocalyx: a newly discovered “Great Barrier Reef”. *Anaesthesist* 57:959–969, 2008.
30. Henry CB, Duling BR: TNF-alpha increases entry of macromolecules into luminal endothelial cell glycocalyx. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 279:H2815–H2823, 2000.
31. Bruegger D, Jacob M, Rehm M, Loetsch M, Welsch U, Conzen P, Becker BF: Atrial natriuretic peptide induces shedding of endothelial glycocalyx in coronary vascular bed of guinea pig hearts. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 289:H1993–H1999, 2005.
32. Klemm E, Bepperling F, Burschka MA, et al.: Hemodilution therapy with hydroxyethyl starch solution (130/0.4) in unilateral idiopathic sudden sensorineural hearing loss: a dose-finding, double-blind, placebo-controlled, international multicenter trial with 210 patients. *Otol Neurotol* 28(2):157–170, 2007.
33. Neff TA, Fischler L, Mark M, Stocker R, Reinhart WH: The influence of two different hydroxyethyl starch solutions (6% HES 130/0.4 and 200/0.5) on blood viscosity. *Anesth Analg* 100:1773–1780, 2005.
34. Reinhart WH, Nagy C: Albumin affects erythrocyte aggregation and sedimentation. *Eur J Clin Invest* 25:523–528, 1995.
35. Heckel K, Winkelmann B, Strunden MS, Basedow A, Schuster A, Schumacher U, Kiefmann R, Reuter DA, Goetz AE: Tetra starch sustains pulmonary microvascular perfusion and gas exchange during systemic inflammation. *Crit Care Med* 40(2):518–531, 2012.

