

3 MATERIALIEN UND METHODEN

In diesem Kapitel werden alle für die Versuche verwendeten Materialien aufgeführt und ihre genaue Durchführung von Anfang bis Ende des Versuches erklärt.

Es ist darauf hinzuweisen, daß die hämodynamischen Versuche und Messungen von Deja et al., 2002 durchgeführt worden sind, und der von mir durchgeführte experimentelle Anteil der Arbeit in der histologischen und biochemischen Charakterisierung der Lugengewebe liegt.

3.1 Materialien

3.1.1 Versuchstiere

24 Minipigs	Merck AG, Mannheim, Deutschland
	Boehringer, Mannheim, Deutschland
	Sigma, Seelze, Deutschland

3.1.2 Geräte

Trachealtubus	Innerer Durchmesser 8.0 mm
Beatmungsgerät	Siemens-Elema, Solna, Schweden
SERVO 300 A/NO Ventilator	
Pulmonalkatheter (Swan- Ganz- Katheter)	Modell 93A 431-7.5Fr; Baxter Healthcare Corp, Irvine, CA, U.S.A.
arterieller Katheter	Modell 18G; Vygon, Ecoen; France
Hewlett Packard monitoring System	Modell 66S, Hewlett Packard, Böblingen, Deutschland
Standard - Blutgas - Elektroden	Blutgasanalyse; ABL 520; Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Spektralphotometrie, Hemoximeter	Modell OSM 3; Radiometer; Kopenhagen, Dänemark
ultrasound nebulizer	Servo Ultra Nebulizer 345, Siemens-Elema
Chemilumineszenz Analysierer	CLD 700 AL; ECO physics, Duernten, Switzerland

Leitz - Mikroskop	Orthoplan; 871461
Mikroskop Olympus mit Fotokamera	BO 71, mit exposure control unit
Mikrowelle	Panasonic
Pipetten	Im Bereich 50µl bis 1000µl; Mehrkanalpipette; Eppendorf
Mikrotiterplatten	TNFα : K 9610MTP (12x8 wells) IL-1β :part 30161 (96 Wells) IL-6:part 30131; Abazyme, U.S.A.
Mikrotiterplattenphotometer	450 nm
Mikro-Dismembrator	
Zentrifuge	Heraeus Biofuge 13
Mikrotom	Leitz

3.1.3 Pharmaka

Azaperon	Pyridazinderivat
	Butyrphenon-Derivat
Atropin	Alkaloide
	Racematmischung von d-Hyoscyamin und l-Hyoscyamin
Thiopental	Barbiturat
Fentanyl	synthetisches Opioid
Pancuronium Bromid	nicht depolarisierendes Muskelrelaxans
Endothelinantagonist LU-135252	Geliefert von Knoll AG, Ludwigshafen, Deutschland

3.1.4 Chemikalien

Kunststoffeinwegmaterial	Firmen Greiner, Baxter, Brand und Nunc
Silikonlösung	Für den Laborgebrauch
Formalin	4%; Zur Fixation der Lungengewebeproben für 24h
Paraffin	zur Einbettung der Lungengewebeproben nach Fixation in Formalin

Roticlear	zur Präinkubation bei Färbung der Lungenschnitte; Carl Roth; Karlsruhe; Germany
Eindeckmittel	Aquamont, 50 ml, Fa. BDH, Code 362262 H., Dauerpräparat "Gurr"

3.1.5 Antikörper

- Sekundärer biotynilierter goat anti-mouse und goat anti-rabbit-Antikörper:

K0673; DAKO, Kopenhagen, Dänemark

- primärer monoklonaler Antikörper gegen Leukozytenantigen L1:

MAC387; DAKO, Kopenhagen, Dänemark

- primärer polyklonaler Antikörper gegen CD3:

N1580; DAKO, Kopenhagen, Dänemark

- Kit zur Endothelinbestimmung:

Polyklonaler Kaninchen-Anti-Endothelin-Antikörper (immunaffinitätschromatographisch gereinigt, auf Mikrotiterplatte beschichtet); Immundiagnostik, Bensheim, Germany
Lyophilisierter, monoklonaler Detektions-anti-Endothelin-Antikörper; Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany

Anti-Maus IgG-Antikörper, gekoppelt an Peroxidase; Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany (Konjugat)

- Kits zur TNF α , IL-1 β und IL-6 -Bestimmung:

polyklonaler Erstantikörper Maus anti hTNF- α ; K 9610A1 1.; Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany

monoklonaler Detektionsantikörper Maus anti TNF α -Antikörper, Peroxidasemarkiert; K 9610K Konjugat, Immundiagnostik AG, Bensheim, Germany

monoklonaler IL-1 β /IL-6-Erstantikörper; part 30131/30161; Abazyme, U.S.A.

Anti-IL-1 β /IL-6 - monoklonaler Antikörper, biotinyliert; part 30162/30132, Abazyme; U.S.A.

3.2 Methoden

3.2.1 Versuchsablauf

Alle hämodynamischen Experimente und Messungen wurden so durchgeführt wie bei Deja et al. beschrieben (DEJA et al., 2002).

Es wurden insgesamt 24 Schweine untersucht, welche zunächst alle - nach entsprechender Prämedikation - narkotisiert und intubiert worden sind (siehe 3.2.2.1).

Nach fünf bis zehn Minuten künstlicher Beatmung wurde allen Tieren ein experimentelles ALI nach dem Verfahren von Lachmann et al. induziert (siehe Kapitel "ALI im Tiermodell"). Dieser Zeitpunkt wurde im Versuchsablauf als Zeitpunkt "0" festgelegt. Ab diesem Punkt wurden alle hämodynamischen Werte stündlich gemessen.

Die Versuchstiere wurden randomisiert in zwei Gruppen geteilt: die Interventionsgruppe erhielt einen gasförmigen ETA-Rezeptorantagonisten LU-135252 (Knoll AG, Ludwigshafen, Deutschland) in einer Dosierung von *0.3 mg/kg KG für 30 min. (ALI-Gruppe: n = 16)*.

Diese Applikationen erfolgten zwanzig Minuten nach Induktion des ALI, also zwanzig Minuten nach dem Zeitpunkt "0".

Sechs Stunden nach Induktion des ALI wurden die Schweine dann getötet durch Blutentzug und Lungengewebsproben zur weiteren Untersuchung entnommen. Die Proben wurden halbiert, der eine Teil bei -80 °C gelagert, der andere Teil in Paraffin eingebettet nach einer Fixierung in 4%igem Formalin für mindestens 24 Stunden.

Die eingefrorenen Schnitte wurden mit dem Enzymimmunoassay weiter untersucht, um Werte der inflammatorischen Reaktion wie TNFalpha, IL-1beta, IL-6 und Endothelinwerte zu gewinnen. Der andere Teil wurde mit immunhistochemischen Verfahren untersucht, um die Makrophagen- und CD3-Zellzahl zu erfassen.

Die einzelnen experimentellen Verfahren werden in den folgenden Kapiteln ausführlicher beschrieben und erklärt.

Alle Testtiere waren für experimentelle Versuche geeignet und wurden von der Merck AG Mannheim, Boehringer Mannheim oder Sigma Seelze, Deutschland gestellt.

3.2.2 Physiologische Methoden

3.2.2.1 Narkotisierung und Vorbereitung der Tiere

Die Narkotisierung und Vorbereitung der Tiere wurde durchgeführt wie bei Deja et al., 2002, beschrieben:

es wurden 24 Schweine untersucht, alle Tiere hatten ein Körpergewicht von 24 ± 2 kg.

Nach einer Prämedikation mit Azaperon (5mg/kg KG , *intramuskulär*) und Atropin (0.05 mg/kg KG , *intramuskulär*) wurde die Anästhesie mit Thiopental und Fentanyl durchgeführt, Thiopental in einer Dosis von 10 mg/kg KG (*intravenös*) und Fentanyl mit Initialdosis von $5\text{ }\mu\text{g/kg KG}$.

Die folgende kontinuierliche Infusion enthielt eine Thiopentaldosierung von 0.13 mg/kg KG/min . und eine Fentanyldosierung von $0.05\text{-}0.08\text{ }\mu\text{g/kg KG/min}$.

Die Muskelrelaxation wurde mit Pancuroniumbromid durchgeführt. Hierfür wurde eine Dosierung von 0.15 mg/kg KG als intravenöser Bolus gewählt, gefolgt von einer kontinuierlichen Infusion von $2.5\text{ }\mu\text{g/kg KG/min}$.

Sofort nach Induktion des Muskelrelaxantiums wurden die Tiere intubiert.

Die Tiere wurden für das weitere Vorgehen in eine entspannte Position gebracht und anschließend in volumenkontrolliertem Modus mit 100% Sauerstoff beatmet (*Atemvolumen $12 \pm 2\text{ ml/kg KG}$, 16 Atemzüge pro Minute, O_2 -Inspirationsfraktion (FiO_2) 1.0; inspiratorische/expiratorische Ratio 1:1, positiver endexpiratorischer Druck $5\text{ cmH}_2\text{O}$*). Die Kerntemperatur der Tiere schwankte zwischen $\pm 5\text{ }^\circ\text{C}$ von den Werten vor Beginn des Experimentes.

Während des gesamten Experiments wurden den Tieren keine anderweitigen kardiotonischen oder vasoaktiven Substanzen verabreicht.

Es wurde bei jedem Schwein ein Pulmonalkatheter in die Femoralvene gelegt, in die Femoralarterie legte man einen arteriellen Katheter. Diese beiden Katheter dienten zur Blutprobenentnahme (*Bestimmung von paO_2 , $paCO_2$, Qs/Qt*) und für alle hämodynamischen Messungen (*ZVD, MPAP, MAP, HF*).

Gleichzeitig wurden nichtinvasiv die Herzfrequenz, der arterielle Blutdruck und der pulmonalarterielle Druck mit einem Hewlett Packard Monitoring System aufgezeichnet. Das Herzzeitvolumen wurde bestimmt durch die Thermodilutionstechnik. Es wird angegeben als Mittelwert aus vier verschiedenen Messungen zu unterschiedlichen Phasen des Atemzyklus. Der intrapulmonale Shunt (Qs/Qt) wurde errechnet durch Gebrauch einer Standardformel.

Die Blutproben für Blutgasanalysen wurden unter anaerobischen Bedingungen gesammelt und sofort analysiert mit dem ABL 520 Radiometer. Die arterielle Sauerstoffsättigung (paO_2) und die gemischte venöse Sauerstoffsättigung wurden durch Spektrophotometrie mit dem Radiometer gemessen (dieser war auf Schweineblut kalibriert).

3.2.2.2 Induktion des ALI

Die Induktion des akuten Lungenversagens erfolgte wie bei Lachmann et al. beschrieben (LACHMANN et al., 1980), nämlich durch eine bilaterale Lungenlavage, durch welche sich in vivo ein Surfactant-Defizit herstellen läßt.

Wie in der Einleitung schon erläutert simuliert diese Technik sehr gut den Zustand des akuten Lungenversagens und sie läßt sich gut einsetzen bei der Evaluation von Pharmaka und verschiedenen Arten von künstlicher Beatmung, welche zur Funktionalität der Behandlung des ALI geprüft werden sollen (LACHMANN et al., 1980).

Nach fünf bis zehn Minuten künstlicher Beatmung mit 100% Sauerstoff und Vorbereitung der Schweine (siehe oben), wurden die Tiere einer bilateralen Lungenlavage mit physiologischer Kochsalzlösung ausgesetzt (37°).

Die Menge an Salzlösung, die verwendet wurde, entsprach bei jedem Waschgang 80-90 % der Vitalkapazität der Schweinelungen (dies entsprach 35 ml/kg).

Die Vitalkapazität wurde definiert als das Luftvolumen, welches die Lungen fassen konnten bei einem Druck von 35 cmH₂O.

Während des Waschens (Dauer einer Lavage ca. 20 sec.) wurde kontinuierlich der Druck in der Trachea gemessen, welcher nie über 40 cmH₂O steigen durfte. Die Lavage wurde zehnmalig wiederholt, in fünfminütigen Intervallen. Zwischen den einzelnen Durchgängen wurden die Tiere beatmet wie im vorherigen Kapitel beschrieben. Zwanzig Minuten nach Induktion des ALI erfolgte die inhalative Applikation von LU-135252, bzw. des Kochsalzpuffers.

Sechs Stunden nach Induktion des ALI erfolgte die Tötung der Tiere und anschließend die weitere histologische sowie biochemische Untersuchung. Diese Methoden werden im folgenden Kapitel beschrieben.

3.2.3 Histologische Methoden

3.2.3.1 Fixierung

Es wurden von jedem Versuchstier drei Gewebeproben aus verschiedenen Lungenabschnitten gewonnen, je eine Probe aus dem medialen, dorsalen und ventralen Bereich der Lungen.

Durch die Fixierung der Organe werden das Auftreten postmortaler Veränderungen und eine Herauslösung von Zellbestandteilen während histochemischer Reaktionen verhindert. Dies wird durch eine Quervernetzung von Proteinen und eine dadurch eintretende Gewebestabilisierung erreicht. Desweiteren wird das Gewebe durch eine Inaktivierung von Enzymen härter, was wichtig für das Erstellen von Schnitten ist.

Die Gewebeproben wurden in 4%igem phosphatgepuffertem Formaldehyd für die Einbettung in Paraffin fixiert. Genaugenommen führt Formaldehyd zur Bildung von Methylbrücken zwischen freien Aminogruppen der Proteine, was eine Blockade dieser Aminogruppen zur Folge hat.

Dadurch kommt es zur Vernetzung der Eiweiße.

3.2.3.2 Paraffineinbettung und Schneiden

Die formalinfixierten Präparate wurden in einer aufsteigenden Alkoholreihe (*70%iges, 80%iges, 2x 96%iges und 3x absolutes Ethanol*) für je 1 h entwässert, anschließend für 4 h in Xylol überführt. Dieser Vorgang wurde 2x mit einer frischen Xylol-Lösung wiederholt. Die Entwässerung ist notwendig, da das Paraffin wasserunlöslich ist.

Danach wurden die Präparate in Tissue Tek Unikassetten für 1 h in reines geschmolzenes Paraffin bei 56°C gegeben, danach nochmals für 2 h in ein weiteres Paraffinbad überführt.

Die Verhärtung des Gewebes entsteht bei der Einbettung durch Polymerisationsvorgänge.

Diese Schritte wurden über Nacht automatisch in einer Histokinette durchgeführt.

Nach dem Erkalten des Paraffins waren die Präparate schnittfähig.

Am Mikrotom wurden 4µm dicke Gewebeschnitte hergestellt.

3.2.3.3 Immunhistochemie

Das Testverfahren erfolgte nach den Anweisungen und Instruktionen der Firma DakoCytomation, Hamburg. Es handelt sich um ein Streptavidin-Biotin2-System, eine Modifikation der Avidin-Biotin-Methode (LAB-Methode).

Prinzip:

Mit Hilfe von Immunhistochemie lässt sich in Geweben auf einzelnen Zellen eine Vielzahl von Zielstrukturen (Epitopen) spezifisch nachweisen. Durch Kombination mehrerer Verfahren lassen sich auch Doppelmarkierungen mehrerer Antigene auf und in der gleichen Zelle mit verschiedenen Färbungen realisieren. Bei der hier angewandten Streptavidin-Biotin-Methode bindet zunächst ein Primärantikörper an das Antigen, an diesen heftet sich dann der biotinylierte Sekundärantikörper. Über das Biotin des Sekundärantikörpers bindet dann das mit dem horseradish-Peroxidase-Enzym markierte Streptavidin, was durch die enzymatische Reaktion mit dem Chromogen/Substrat zu unlöslichem, farbigem Präzipitat wird.

Mittels dieses Verfahrens wurde im Gewebe der Versuchstiere das Leukozytenantigen L1 (auf Makrophagen) und CD3 (auf T-Zellen) nachgewiesen. Makrophagen sind mit Abstand die häufigsten Leukozytenantigen-L1-tragenden Zellen, sie sind zur Phagozytose großer Partikel und deren Elimination oder Speicherung fähige mononukleäre Zellen des Monozyten – Makrophagen – Systems. Sie finden sich gehäuft bei inflammatorischen Prozessen wegen ihrer wichtigen Funktion in der unspezifischen Immunabwehr. Ihr immunhistochemischer Nachweis erfolgt über einen monoklonalen primären Leukozytenantigen-L1-Antikörper. CD3 ist ein Komplex aus nicht variablen Transmembranproteinen, welcher mit dem T – Zell- Rezeptor assoziiert ist. Er setzt die Bindung von Peptidproteinen an den Rezeptor in intrazelluläre Signale um. Mit dem Messen der CD3-positiven Zellen haben wir das Gewebe somit auf ein vermehrtes Vorkommen von T-Zellen gescannt durch immunhistochemische Methode und den Einsatz eines polyklonalen CD3-Antikörpers. Das vermehrte Vorkommen von T-Zellen ist typisch für ein entzündliches Geschehen, wie es beim akuten Lungenversagen vorliegt.

Reagenzien und Puffer:

Ethanol	Konzentrationen 96% und 70%
Isopropanol	Konzentration 97,7%
Citratpuffer	0,01M, pH 6,0
Pepsinlösung	1 mg Pepsin ad 1 ml 0,5 M Essigsäure; 3 ml Essigsäure + 97 ml A.dest. + 100 mg Pepsin
BSA/PBS-Puffer (phosphate buffered saline)	1,5 mM KH_2PO_4 0,2% BSA 8,1 mM $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 0,14 NaCl 7,7 mM KCl pH 7,5
H_2O_2 Perhydrollösung	10 ml 30%ige H_2O_2 -Lösung mit A. dest. Auf 100 ml aufgefüllt
Streptavidin-HRP	horseradish Peroxidase; LSAB2 System
DAB Chromogen	DAKO K3465; 3'3-Diaminobenzidin in Chromogenlösung
Hämalaunblau	

Durchführung:

Zunächst wurden die Schnitte nach folgendem Schema entparaffiniert:

Wiederholungen	Dauer (min)	Lösung
1x	Über Nacht	Roticlear
2x	10 min.	Roticlear
2x	5 min.	Isopropanol 99,7%
2x	5 min.	Ethanol 96%
2x	5 min.	Ethanol 70%
3x	5 min.	A. dest.

Anschließend folgte die Inkubation in Citratpuffer (0.01M, pH 6.1). Die Gewebeschnitte wurden 1x für 10 min. in der Mikrowelle auf 700 Watt, im Folgenden noch zweimal fünf Minuten auf 600 Watt demaskiert. Danach folgte ein 2x 5minütiges Waschen mit TBS-Puffer und ein 1x 5minütiges Spülen mit A. dest.

Danach wurde wiederholt demaskiert durch Proteasevorbehandlung für 1x 5min. in Pepsinlösung, anschließend 2x 5 minütiges Waschen mit TBS-Puffer und 1x 5 minütiges Spülen mit Aqua dest.

Es folgte die Blockierung der endogenen Peroxidase mit 3% Perhydrol bei Raumtemperatur.

Danach wurden bei der Makrophagenfärbung der primäre monoklonale Antikörper gegen Leukozytenantigen - L1, oder bei der CD3-Färbung der polyklonale Antikörper gegen CD3, aufpipettiert, je 75:100 der Gebrauchslösung (eine zu niedrige Verdünnung kann eine komplette Absättigung des Brücken-Antikörpers bewirken, höhere Verdünnungen führen daher häufig zu deutlich besseren Ergebnissen).

Es folgten 30min. Inkubation in der feuchten Kammer. Darauf dann Spülen 3 x 2min. mit TBS-Puffer.

Die Schnitte wurden zweimalig mit 0.05% Tween/TBS-Waschpuffer gewaschen und weitere 30 Minuten inkubiert mit dem sekundären biotinillierten Brückenantikörper in einer feuchten Kammer. Anschließend wurde die enzymmarkierte Streptavidin-Peroxidase (Streptavidin-HRP) hinzugefügt und 30min. in der feuchten Kammer belassen.

Danach folgte das Färben der Schnitte mit DAB Chromogenlösung in der Dosierung ein Tropfen pro ml. Anschließend wurde gegengefärbt mit Hämalaun (Mayers), verdünnt 1:5 in Aquadest.

Die Schnitte wurden eingedeckt mit wässrigem Eindeckmittel (TBS/Glycerin 1+2), Dauerpräparat „Gurr“, Aquamont, 50 ml, Fa. BDH, Code 362262 H.

Im Anschluß konnten die Gewebeschnitte unter dem Mikroskop bei 320-Feld-Vergrößerung betrachtet und untersucht werden.

Auswertung:

Die gefärbten Zellschnitte wurden mit dem Mikroskop Olympus mit Fotokamera fotografiert und auf einen Power Mac (Macintosh) übertragen. Dort wurden sie mit Hilfe des Counterprogrammes Image Programm NIH 1.61pp sichtbar gemacht und nach dem Auszählen ihr Mittelwert bestimmt.

Die Bilder wurden nach folgender Technik erstellt: pro Lungenschnitt (pro Tier jeweils ein medialer, dorsaler und ventraler Lungenabschnitt) wurden zehn zufällige Felder ausgewählt und fotografiert. Es erfolgte in diesen zehn Feldern ein separates Zählen von allen negativen und allen positiven Zellen (also alle angefärbten Zellen und alle gegengefärbten Zellen).

Das Image Programm NIH 1.61pp rechnete die Mengenangaben gegeneinander auf und ermittelte so das Verhältnis von gefärbten und ungefärbten Zellen.

3.2.4 Biochemische Methoden

3.2.4.1 Enzymimmunoassay zur Endothelinbestimmung

Die Endothelinwerte wurden alle mit einem ELISA kit der Firma Immundiagnostik, Bensheim bestimmt (Produktnummer KB1140/KB 9610).

Die Durchführung erfolgte nach den Instruktionen der Herstellerfirma.

Prinzip:

Der für Endothelin-1 spezifische "Sandwich"-ELISA verwendet einen auf Mikrotiterplatten beschichteten immunaffinitätschromatographisch gereinigten polyklonalen Erstantikörper. Ein für Endothelin hochspezifischer monoklonaler Detektionsantikörper wird gleichzeitig mit der Probe zugegeben und bildet mit dem in der Probe vorhandenen Endothelin und dem gebundenen Erstantikörper ein Sandwich. Nach einem Waschschrift, der alle nicht spezifisch gebundenen Substanzen entfernt, wird die Menge an gebundenem monoklonalem Antikörper bestimmt. Sie entspricht der Menge an in der Probe vorhandenem Endothelin. In diesem Schritt wird ein mit Peroxidase konjugierter Anti-Maus-Antikörper eingesetzt. Nach abermaligem Waschen wird Tetramethylbenzidin als Substrat zugegeben. Die in einem ELISA-Photometer messbare Farbentwicklung ist direkt proportional der Konzentration an Endothelin in der Probe.

Reagenzien und Puffer:

Assaypuffer	zum Auflösen des Detektionsantikörpers
Endothelin Standards in Plasma ("stock")	synthetisches, humanes ET-1, in Puffer lyophilisiert, enthält 10 fmol/ml ET
Waschpufferkonzentrat	82,2g Na ₂ HPO ₄ ; 14,9 NaH ₂ PO ₄ x 1 H ₂ O ad 1l Aqua dest. pH auf 7,4
Kontrollen	synthetisches, humanes ET-1, lyophilisiert in Humanplasma
TMB-Substrat	für 150 µl Substrat mit 15ml Gallati - Puffer versehen
TMB-Standard	240 mg Tetramethylbenzidin in 5ml Dimethylsulfoxid + 5ml Ethanol lösen

Gallati - Puffer

8,4g Zitronensäure x 1H₂O in 160 ml Aqua dest.
 auflösen; pH auf 3,95 einstellen ad 200 ml Aqua dest.;
 68 µl 30% H₂O₂ zufügen

ELISA Stopplösung

gebrauchsfertig

Durchführung:

Die gefrorenen Lungengewebeproben wurden zunächst homogenisiert:

Die Gewebeproben waren bei -80°C gelagert. Sie wurden (ab 200 mg) aus dem flüssigen Stickstoff entnommen und in dem vorgefrorenen Schüttelbehälter im Micro-Dismembrator (30 Sek./1500RPM) pulverisiert.

Mit 1 ml Phosphatpuffer wurden sie homogenisiert. Nach der Ultra-Zentrifugation (1 h/100.000 x g) zum Zellpartikel entfernen, konnten im Überstand die Endothelinkonzentration bestimmt werden (ELISA „Biomedica“ Kat. Nr. BI-20052):

Der Endothelin "stock" Standard wurde zunächst in 2ml Zellkulturmedium aufgelöst und 30min. bei Raumtemperatur belassen. Davon wurde folgende Verdünnungsreihe mit Waschpuffer hergestellt:

10 fmol/ml	5 fmol/ml	2,5 fmol/ml	1,25 fmol/ml	0,625 fmol/ml
------------	-----------	-------------	--------------	---------------

Das Zellkulturmedium wurde als Nullstandard eingesetzt.

Dann wurde der Detektionsantikörper in 5,5ml Assaypuffer aufgelöst, 30 min. bei Raumtemperatur belassen und gut gemischt. Die Kontrollen wurden auch in 1,5ml Assaypuffer aufgelöst und 30min. bei Raumtemperatur belassen.

Die Leerwerte, Standards und Proben wurden nun auf dem Protokollblatt markiert, je 2 Wells für den Leerwert reserviert.

Dann wurde je 200µl Standard, Kontrolle und Probe in die entsprechenden Wells pipettiert. Es wurde je 50µl Detektionsantikörper in alle Wells außer dem Leerwert pipettiert, geschüttelt und anschließend alles abgedeckt über Nacht bei Raumtemperatur inkubiert. Danach wurde der Inhalt der Wells verworfen und es folgte fünfmaliges Waschen mit 350 µl verdünntem Waschpuffer. Anschließend wurden 200µl Konjugat in alle Wells pipettiert und alles eine Stunde bei 37° im Schüttler inkubiert. Im Anschluß wiederholtes Verwerfen der Wellsinhalte und

Waschen mit 350µl verdünntem Waschpuffer. Die Zugabe von 150 µl Substrat (TMB) leitete die enzymatische Reaktion ein. Nach 5 min. Inkubationsdauer bei RT wurde die Reaktion gestoppt durch Zugabe von 50 µl 4NH₂SO₄ (Stoplösung) und die Extinktion sofort bei einer Wellenlänge von 450 nm in Photometer gemessen.

Auswertung:

Der Absorptionswert des Leerwertes wurde von allen anderen Meßwerten abgezogen. Sodann wurde aus einer Standardkurve nach Instruktionen des Herstellers eine Eichkurve erstellt. Die Meßwerte der Proben wurden anhand dieser Eichkurve errechnet. Die Nachweisgrenze für ET lag bei 0,05 fmol/l.

3.2.4.2 Bestimmung von TNF- α , IL-1 β und IL-6

Die Werte von TNF- α wurden mit ELISA kits der Firma Immunodiagnostik, Bensheim bestimmt (Produktnummer KB1140), die von IL-1 β und IL-6 mit kits der Firma Abazyme, U.S.A. Sie erfolgten nach den Instruktionen und Anweisungen der Herstellerfirma.

Prinzip:

In diesem Assay wird TNF- α , IL-1 β oder IL-6 aus den Proben an monoklonale, auf Mikrotiterplatten fixierte Antikörper gebunden. Die Quantifizierung des gebundenen TNF α (IL-1 β /IL-6) erfolgt nach einem Waschvorgang durch Zugabe eines 2. monoklonalen biotinylierten Antikörpers, der mit Peroxidase markiert (POD-AK) ist. Die gebundene Enzymmenge ist dem TNF- α (IL-1 β /IL-6) Gehalt direkt proportional. Als Substrat für die Peroxidase wird TMB eingesetzt. Die gebildete, chromogene Verbindung kann photometrisch bei 450 nm gemessen werden.

Reagenzien und Puffer:

ELISA Waschpufferkonzentrat	K 9610WP (1:10 in A.bidest verdünnt)
Beschichtungspuffer	gebrauchsfertig; K 9610Be (Verdünnung des Erstantikörpers)
Blockierungspuffer	gebrauchsfertig; K 9610BP
Standardkonzentrat TNFα	(1000 pg/ml), lyophilisiert; K 9610ST
IL-1 β/IL-6-Standard	(PART 30164; PART 30134)
Standardverdünnungspuffer	gebrauchsfertig; K 9610PV
TMB Substrat	(Tetramethylbenzidin), gebrauchsfertig; K 9610TMB
ELISA Stoplösung	gebrauchsfertig 1 x 7 ml; K 9610AC

Durchführung:

Zunächst wurden vom lyophilisierten jeweiligem Standard Verdünnungsreihen hergestellt nach folgendem Schema:

1000 pg/ml Standard wurde mit 800 µl Standardverdünnungspuffer rekonstituiert, vorsichtig gemischt und zum Lösen mind. 10 Minuten stehen gelassen. Die weiteren Standards sind aus dem Standardkonzentrat (S=1000 pg/ml) seriell durch 1:2 Verdünnungen in Standardverdünnungspuffer verdünnt:

S 1 = 500 µl S + 500 µl Standardverdünnungspuffer
S 2 = 500 µl S1 + 500 µl Standardverdünnungspuffer
S 3 = 500 µl S2 + 500 µl Standardverdünnungspuffer
S 4 = 500 µl S3 + 500 µl Standardverdünnungspuffer
S 5 = 500 µl S4 + 500 µl Standardverdünnungspuffer
S 6 = 500 µl S5 + 500 µl Standardverdünnungspuffer

Es wurden 100 µl verdünnte Antikörperlösung (jeweils für TNF- α /IL-1 β /IL-6) in die Vertiefungen pipettiert.

Dann wurde die TNF- α - Platte 1 Stunde bei Raumtemperatur inkubiert, die IL-1 β /IL-6-Platten über Nacht bei RT. Anschließend wurden die Inhalte der Platten dann verworfen. Es wurden 200 µl Blockierungslösung in alle Vertiefungen pipettiert und 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Der Inhalt der Platten wurde wieder verworfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen. Es wurden 100 µl der entsprechenden Standards und Proben in die Vertiefungen pipettiert.

2 Std. bei Raumtemperatur wurde danach unter Schütteln, im Dunklen inkubiert, danach folgte wiederholtes Verwerfen des Inhalts der Platten und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer waschen. Dann wurde 100 µl verdünnte Konjugatlösung (POD gekoppelte Antikörper) pro Vertiefung pipettiert. Danach wurde wieder 2 Std. bei Raumtemperatur unter Schütteln, im Dunklen inkubiert, der Inhalt der Platten verworfen und 5 x mit je 250 µl Waschpuffer gewaschen. Dann 100 µl TMB-Substrat in alle Platten pro Vertiefung pipettiert, danach 10-20 Minuten (entsprechend der Farbdifferenzierung) bei Raumtemperatur inkubiert. 50 µl der Stopplösung wurden zugesetzt und kurz gemischt. Die Extinktionen wurden sofort im Mikrotiterplattenphotometer bei 450 nm gegen die Referenzwellenlänge 620 nm (oder 690 nm) gemessen.

3.2.5 Statistik

Alle Daten außer den Daten zum Überleben der Tiere sind präsentiert als Mittelwert \pm Standardfehler des Mittelwertes, denn alle Daten waren normalverteilt.

Die Differenzen zwischen den Gruppen der Überlebensdaten wurden berechnet mit dem Log-Rank-Test.

Die Werte vor der Bronchiallavage und die Werte bei Induktion des ALI wurden verglichen mit dem Wilcoxon-Test.

Die Signifikanzen wurden alle mit dem unpaired Student's – T-Test berechnet.

Als Signifikanzniveau wurde $p < 0,05$ festgelegt.

Die Normalverteilung wurde nach dem Kolmogorof-Smirnov-Anpassungstest bestimmt.

Alle Daten wurden mit SPSS 10.0 analysiert (statistical package of the social sciences, SPSS Inc., Chicago, Illinois, USA).