

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Patienten

Nach Zustimmung der lokalen Ethikkommission wurde nach der Patientenaufklärung die schriftliche Zustimmung von Patienten, die sich orthopädischen (Ref.nr. 1454/2000) und herzchirurgischen (Ref.nr. 1123/99) Eingriffen unterzogen, eingeholt. Einschlusskriterien waren Alter > 18 Jahre und elektive koronare oder endoprothetische Operationen. Ausschlusskriterien waren Schwangerschaft, perioperative Reanimation, schwere Leberfunktionsstörungen (Child B), insulinabhängiger Diabetes mellitus und systemische, chronisch entzündliche Erkrankungen. Patienten mit HLM wurden mit 350 U/kg Heparin (Liquemin® Hoffmann-La-Roche, Grenzach-Wyhlen, Switzerland) antikoaguliert. Um eine ACT (activated clotting time) von 480 sec einzuhalten wurden weitere Boli von 50 U/kg verabreicht, wenn nötig. Weiterhin erhielten diese Patienten Aprotinin (Trasylol® 50,000 IU/kg, Bayer, Leverkusen, Germany). Die Vorbereitung vor Anschluss an die HLM beinhaltete die Gabe von HAES 10 % (500mL, Fresenius Kabi, Substitutionsgrad 0.4 - 0.55, mittleres MW 200,000), Elektrolytlösung (Thomaejonin®, 500 mL, Delta Pharma GmbH, Pfullingen, Germany) und Heparin (8,000 U). Die HLM wurde unter leicht hypothermen Bedingungen (34.5 - 35.5 °C) mit einem Membranoxygenator (Quadrox®, Jostra, Hirrlingen, Germany) durchgeführt. Die Zentrifugalpumpe (Bio-Medicus®, Medtronic, Indianapolis, Minnesota, USA) wurde auf einen Fluss eingestellt der 120% des berechneten Cardiac Index (2l/min/m<sup>2</sup>) betrug. In Übereinstimmung mit der ACCP/SCCM Klassifikation wurde SIRS diagnostiziert wenn zwei oder mehr der folgenden Zeichen vorlagen: Abweichung der Körpertemperatur (>38 °C oder <36 °C), Tachykardia (HF > 90/min), Tachypnoe oder Hyperventilation (AF > 20/min oder PaCO<sub>2</sub> <32 mm/Hg und Leukozytose oder Leukopenie (WBC > 12 Gpt/l oder < 4 Gpt/l). Die SIRS Klassifikation wurde am ersten postoperativen Tag um 8.00 Uhr, unter Beachtung des gesamten postoperativen Verlaufs, vorgenommen.

### 2.1.1 Serumproben

Präoperative Blutproben (T1) wurden venös unmittelbar vor dem Hautschnitt abgenommen. Postoperative Blutproben (T2) wurden vier Stunden nach Beendigung des Eingriffs abgenommen. Unmittelbar danach wurden die Proben in flüssigem Stickstoff gelagert.

## 2.2 Endothelzellen

### 2.2.1 Art der verwendeten Endothelzellen

Humane aortale endotheliale Zellen (HAEC, Clonetics™, Cambrex, Nottingham, UK) wurden, wie vom Hersteller empfohlen, gelöst und in verschiedenen Behältern ausgesät. Für die Experimente wurden die Zellen auf Glasplättchen bis zur Subkonfluenz kultiviert. Die Inkubation mit Serumproben erfolgte für zwei Stunden mit 20% der jeweiligen Probe und 80% EGM-2 (einem serumfreien Wachstumsmedium für Endothelzellen, Clonetics™) bei 37°C.

### 2.2.2 Zellkultur

#### 2.2.2.1 Materialien

Als Nährmedium wurde EGM-2 (Clonetics™, Cambrex, Nottingham, U.K.) unter Zusatz von fötalem Kälberserum (10%, Sigma™) verwendet.

#### 2.2.2.2 Kultivierung und Passagierung

Die Zelllinie wurde in einem Brutschrank (Forma Scientific™, Marietta, USA) bei einer Temperatur von 37,0 °C, in einer Luftfeuchtigkeit von 90% und einem atmosphärischen Kohlendioxidgehalt von 5% in Flaschen (75 ml, Falcon™, Heidelberg, Deutschland) kultiviert.

Monolayer-Kulturen wurden gegen Ende der logarithmischen Wachstumsphase mehrfach mit 5 ml PBS gewaschen, mit 5 ml EDTA-Trypsin (2,5 mg/ml) überschichtet und nach ein bis zwei Minuten suspendiert. Entsprechend ihrer Populations-Verdopplungszeit (ca. 36 h) wurden die Zellen verdünnt, in Kulturflaschen ausgesät, am folgenden Tag erneut gewaschen und mit Medium versetzt.

### 2.2.2.3 Kryokonservierung

Die Zelllinie wurden unter Zusatz von 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) in flüssigem Stickstoff bei –180 °C eingefroren (N2-Tank XC 47/11, Escher, Duisburg, Deutschland). Nach einer Woche wurde eine Probe der Linie wieder aufgetaut und rekultiviert, um die Vitalität der eingefrorenen Zellen anhand des Trypanblauexklusionstests zu prüfen.

## 2.3 Kalziummessung

### 2.3.1 Beladung der EZ mit FURA2-AM

Für intrazelluläre Kalziumbestimmungen wurde der Fluoreszenzfarbstoff FURA2-AM (1µM, Calbiochem™, Darmstadt, Germany) verwendet.

Alle Messungen wurden in einer Pufferlösung durchgeführt (127 mmol/L NaCl, 5mmol/L KCl, 2 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 0,5 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> und 10 mmol/l D-Glucose, pH 7,4) Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> wurde zur Einstellung des pH -Wertes benutzt. Zusätzlich enthielt der Puffer je nach Versuchsbedingung CaCl<sub>2</sub> (1,8 mmol/L) oder EGTA (2 mmol/L). Mn<sup>2+</sup>-

Verdrängungsversuche wurden in einer speziellen Pufferlösung durchgeführt (127 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM D-Glucose, 1mM MnCl<sub>2</sub> and 5 mM HEPES bei pH 7,4).

Vor jeder Messung wurden die subkonfluent bewachsenen Glassplättchen viermal mit Pufferlösung gewaschen und anschliessend mit FURA2-AM (1  $\mu\text{mol/L}$ ) bei Raumtemperatur für 30-40 Minuten beladen. Die vorbereiteten Glasplättchen wurden in eine spezielle Messkammer eingelegt und mit 1 ml Pufferlösung bedeckt.

## 2.3.2 Versuchsaufbau der Einzelzellmessungen

### 2.3.2.1 Prinzip der Kalziummessung mit FURA2-AM

Die Fluoreszenzeigenschaften von FURA2-AM sind abhängig von der umgebenden Kalziumkonzentration. Bei steigender Kalziumkonzentration wird die Emission (510 nm Emissionsmaximum bei 22°C) bei einer Anregung mit UV-Licht der Wellenlänge von 340 nm stärker, bei 380 nm schwächer und bei 360 nm bleibt die Emission in Bezug auf die Kalziumänderung konstant. Liegt das FURA2-AM als ungebundenes Anion vor, also völlig ungesättigt mit Kalziumionen, ist das Absorptionsmaximum 360 nm, in einem FURA-Kalzium-Komplex 340 nm. Setzt man also voraus, dass die zu untersuchende Zelle homogen mit FURA2-AM beladen ist, so zeigt eine Veränderung der mit 360 nm angeregten Emissionsintensität eine Veränderung der FURA2-AM Konzentration in der sonst nicht veränderten EZ, nicht aber eine Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  an. Somit ist der Verlauf des 360 nm-Signals eine gute Kontrolle, um festzustellen, ob bei Veränderungen der 340 und 380 nm-Signale tatsächlich eine Verschiebung der Kalziumverhältnisse stattgefunden hat [46]. Für die Darstellung der relativen Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  wurde der Quotient der gemessenen Emissionsintensität der Exzitationswellenlängen 340 nm und 380 nm benutzt (340/380 Ratio). Durch diesen mathematischen Schritt ist es möglich, die Kalziumverhältnisse unabhängig von der FURA2-AM Konzentration aufzuzeigen und damit eine bessere Vergleichsmöglichkeit der einzelnen Versuche untereinander zu ermöglichen. Die Änderung des Absolutwertes dieser Quotienten ist proportional zur Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$ . In den Beschreibungen der Versuchsergebnisse wurde eine Änderung der Ratio mit Änderungen der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  gleichgesetzt. Intrazelluläre Kalziummessungen sind nach Abzug der Fluoreszenz im Hintergrund als Fluoreszenzeinheiten angegeben. Die Glassplättchen wurden nur einmal gemessen wobei mindestens 5 auswertbare EZ nach Zugabe des Stimulus vorhanden sein mussten. In jeder experimentellen Gruppe wurden mindestens 10 Glasplättchen analysiert.

### 2.3.2.2 Meßsysteme

Regionale Kalziumänderungen wurden mit Hilfe eines digitalen Bildanalyse-Systems (T.I.L.L. Photonics, Planegg, Deutschland) untersucht. Dieses System ist mit einem Inversionsmikroskop (DMIRB, Leica) und einem Zeiss Fluor 40x/1.30 Öl-Immersionsobjektiv ausgestattet. Die Exzitationswellenlängen (340 nm, 360 nm, 380 nm) wurden von einem Monochromator erzeugt und Bilder die einen 395 nm dichroitischen Spiegel und einen 520 nm Bandpassfilter passierten wurden mit Hilfe einer „slow scan CCD“-Kamera digital registriert und in einer nachfolgenden Rechneinheit bearbeitet. Die Frequenz mit der die Messungen durchgeführt sind in dem jeweiligen Abschnitt angegeben.

### 2.4 Kommerziell verwendete Pharmaka und Substanzen

ATP war von Boehringer (Mannheim, Deutschland). Cyclopiazonsäure, SKF-36965, TMB-8 und Fura-2/AM erhielten wir von Calbiochem (Darmstadt, Deutschland).  $MnCl_2$ , Nifedipine und EGTA wurden von Sigma (St. Louis, USA) gekauft.  $CaCl_2$ , NaCl,  $NaHPO_4$ , Glucose,  $MgCl_2$ , KCl,  $NaHCO_3$  und DMSO waren von Merck (Darmstadt, Deutschland). Alle Substanzen waren vom höchsten erhältlichen Reinheitsgrad

### 2.5 Interleukin-6 Bestimmung

Interleukin 6 aus dem Überstand der Patientenserum wurde über einen handelsüblichen ELISA bei Raumtemperatur in 96-Loch-Platten bestimmt (R&D,) Zuerst erfolgte eine Kalibrierung des Systems mit definierten IL-6 Konzentrationen. Nach Bestückung der Platte mit Überstand oder Kontrolle (jeweils 100  $\mu$ l) und zwei Stunden Inkubation erfolgte nach viermaligen Waschen mit 400  $\mu$ l Puffer die Zugabe von 200  $\mu$ l Enzym-markierten IL-6 Antikörpern. Nach 2 Stunden Inkubation und einem weiteren Waschschrift wurden 200 $\mu$ l Farbindikator (Tetramethylbenzidin) zugegeben. 50  $\mu$ l Stopplösung wurden nach 20 Minuten Inkubation zugegeben und die photometrische Bestimmung bei 450 nm durchgeführt (Labystems, Multiskan, Finnland)

## 2.6 Statistische Analyse

Unsere Untersuchung war als Pilotstudie geplant. Ausgehend von vorherigen Untersuchungen spekulierten wir, dass etwa 70% der herzchirurgischen Patienten SIRS entwickeln und die Mehrheit der Patienten erhöhte IL-6 Werte aufweisen würden [37]. Eine relevante Veränderung der  $\text{Ca}^{2+}$ -Signalcharakteristik würde etwa in den Bereich von 15-20% fallen. Eine willkürliche Nummer von 30 Patienten wurde gewählt, da wir keine Daten bezüglich  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  Änderungen aus ex-vivo Experimenten mit Inkubation perioperativer Seren hatten. Von den 30 Patienten mussten 4 ausgeschlossen werden, weil die Menge des Serums nach Aufbereitung nicht mehr ausreichend war, um alle nötigen Untersuchungen durchzuführen. Da wir in der orthopädischen Gruppe nicht mit dem Auftreten von SIRS rechneten, bestand diese Gruppe nur aus halb so vielen Patienten. Von jeder einzelnen Zelle wurde die Änderung der  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  und der Maximalanstieg nach Zugabe des jeweiligen Stimulus aufgezeichnet. Die Fläche unter der Kurve (AUC, Area under Curve) wurde berechnet in dem alle gemessenen Fluoreszenzwerte in der angegebenen Zeitperiode addiert wurden. Vergleiche zwischen prä- und postoperativen Mittelwerten (AUC, Maximum, absoluter Anstieg vom der Ausgangs  $[\text{Ca}^{2+}]_i$  bis zum Maximum = delta) wurden mit dem einfachen t-test gemacht, nachdem eine Normalverteilung mit dem Kolmogorov-Smirnov-test bestätigt wurde. Unterschiede zwischen den jeweiligen Werten wurden als signifikant gewertet wenn der p-Wert  $< 0,05$  war. Wenn nicht anders angegeben sind Mittelwerte  $\pm$  Standardfehler (S.E.M.) angegeben.