

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Generierung der Rohdaten der pulmonalvaskulären Druck-Fluss-Kurven

2.1.1. Tiere

Nach Genehmigung durch die Zuständige Tierschutzkommission wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit im Modell der isoliert-perfundierten Mäuselunge die Druck-Fluss-Kurven von insgesamt 70 männlichen C57BL/6-Mäusen (Jackson Laboratory, Bar Harbour, ME, USA) mit einem Körpergewicht zwischen 20 und 35 Gramm untersucht.

2.1.2. *Isoliert-perfundierte und ventilierte Mäuselunge*

Die Mäuse wurden mit einer intraperitonealen Injektion Pentobarbital (200 mg/kgKG) euthanasiert. Danach wurden sie in einer von Wasser umgebenden Kammer (Isoliert-perfundierte Lunge, Größe 1, Typ 839, Hugo-Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) platziert. Nach Tracheotomie erfolgte die volumen-kontrollierte Beatmung der Lungen mit einem Tidalvolumen von 10 ml/kgKG, einer Atemfrequenz von 90/min. und einem end-expiratorischen Beatmungsdruck von 2 cmH₂O (MiniVent, Type 845, Hugo Sachs Elektronik, March-Hugstetten, Deutschland) mit einer Gasmischung bestehend aus 21% Sauerstoff, 5% Kohlendioxid und 74% Stickstoff (Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland). Nach Exposition von Herz und Lungen über eine mediane Sternotomie wurden jeweils eine Perfusionskanüle (innerer Durchmesser jeweils 1 mm) über den rechten Ventrikel in den Pulmonalarterien-Hauptstamm sowie über den linken Ventrikel retrograd durch die Mitralklappe in den linken Vorhof platziert.

Als Perfusat diente eine modifizierte Salzlösung (Hanks`Balanced Salt Solution, Life Technologies Ltd., Paisley Scotland). Zur Vermeidung einer Ödembildung wurde der Lösung 5% bovines Albumin (Serva, Heidelberg, Deutschland), 5% Dextran (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) und 30 µmol Indomethacin (Sigma-Aldrich, Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) beigemischt [124]. Natriumbikarbonat wurde hinzu gegeben, um die Lösung in einem pH-Bereich von 7.34 – 7.43 stabil zu halten.

Über einen Seitenanschluss an den Perfusionskanülen wurden der pulmonalarterielle Druck (PAP) und der linksatriale Druck (LAP) über Kochsalz-gefüllte Membrandruckwandler (Medex Medical GmbH & CoKG, Klein-Winterheim, Deutschland) gemessen und über einen Verstärker (Typ TBM4M, World Precision Instruments, Berlin, Deutschland) und einen Analog-Digital-Wandler (DI-220/222, Dataq Instruments, Akron, OH, USA) auf einem Personalcomputer aufgezeichnet. Durch eine Wasserfallvorrichtung wurde der LAP während der gesamten Länge der Experimente bei 2 mmHg konstant gehalten.

Die Perfusion der Lungen wurden mit einer Rollerpumpe (Ismatec[®] Reglo-analog-Roller-Pumpe, Laboratoriumstechnik GmbH, Wertheim-Monfeld, Deutschland) zunächst bei einem konstanten Fluss von 50 ml/kgKG/min in einem nicht rezirkulierendem System bei 37°C realisiert. Dabei wurde der Perfusat-Fluss mit Hilfe einer Inline-Sonde und einem Flowmeter (Transonic Systems Inc., Ithaca, NY, USA) geregelt. Auch dieses Fluss-Signal wurde über o.g. Analog-Digital-Wandler im PC aufgezeichnet.

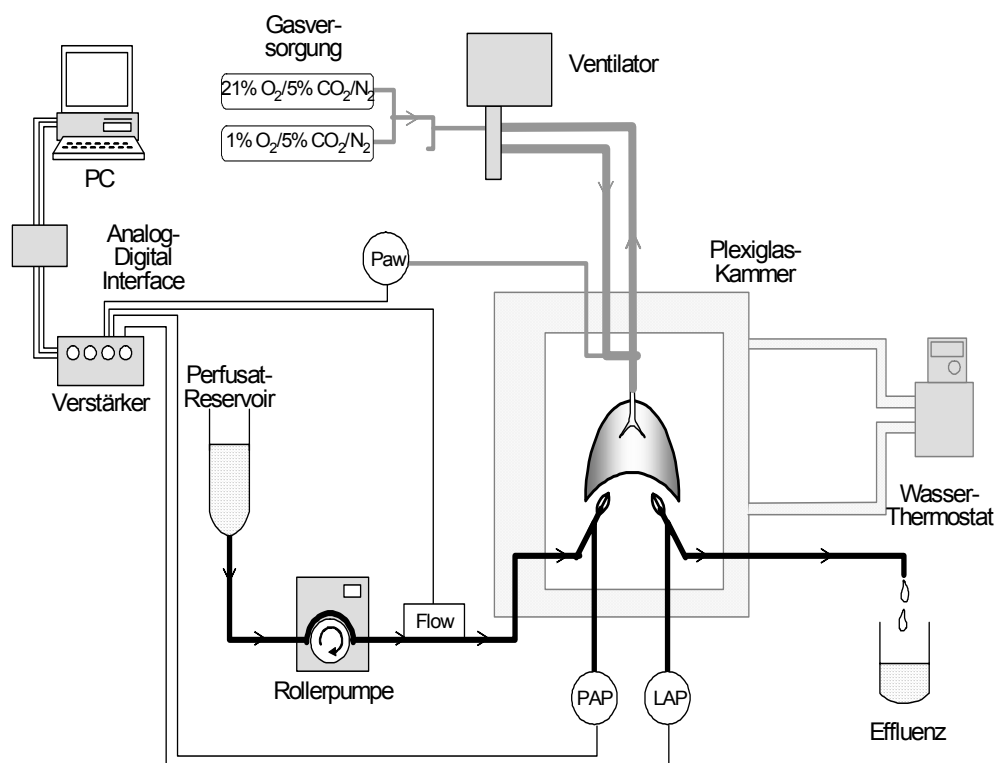


Abbildung 5: Schematische Darstellung des Modells der isoliert-perfundierten Mäuselunge (Details siehe Text).

Während hypoxischer Ventilation wurde das inspiratorische Gasgemisch auf eine Mischung aus 1% O₂, 5% CO₂ und 94% N₂ aus einer zweiten Gasflasche (Messer Griesheim GmbH, Krefeld, Deutschland) gewechselt.

Das Modell der isoliert-perfundierten und ventilierten Mäuselunge ist schematisch in Abbildung 5 und das Labor-Setup in Abbildung 6 der nachfolgenden Seiten gezeigt



Abbildung 6: Labor-Setup

2.1.3. Versuchsprotokoll

Nach einer initialen Baseline-Perfusionperiode von 10 Minuten mit einem Perfusionsfluss von 50 ml/kgKG/min, wurden die Druck-Fluss-Kurven (Q/P) generiert. Dabei wurde jede Lunge jeweils für 30 Sekunden mit 25, 50, 75 und 100 ml/kgKG/min perfundiert und der pulmonalarterielle Druck (PAP) jeweils am Ende jeder Flussstufe gemessen. Die Reihenfolge der vier verschiedenen Flussstufen wurde randomisiert. Die sich so ergebenden 4 Druck-Fluss-Punkte wurden anschließend wie unten beschrieben analysiert.

Danach wurde der Perfusionsfluss wieder auf 50 ml/kgKG/min gesetzt und nach weiteren 3 min Baseline-Perfusion von normoxischer (21% O₂) auf hypoxische (1% O₂) Ventilation gewechselt. Nach 6 Minuten hypoxischer Ventilation wurde erneut eine 4-Punkt Druck-Fluss-Kurve generiert wie oben beschrieben. Nun wurde wieder auf normoxische Ventilation gewechselt und die Rückkehr des PAP auf Baseline-Werte abgewartet. In allen Experimenten unterschied sich der Perfusionsdruck am Ende der

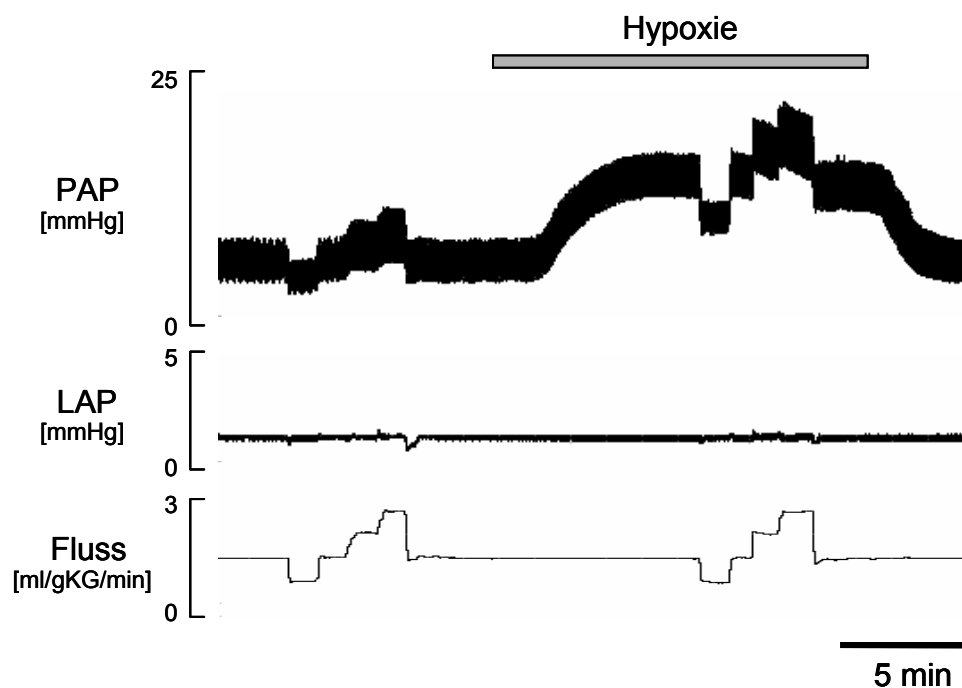


Abbildung 7: Originalregistrierung eines typischen Experiments (Details siehe Text)

Versuche um nicht mehr als 20% zu den Ausgangswerten. Eine typische Original-Registrierung eines solchen Versuches ist in Abbildung 7 zu sehen.

2.1.4. Versuchsgruppen

Während durch die Messung des PAP während 4 verschiedener Perfusionsflüsse (25, 50, 75 und 100 ml/kgKG/min) unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen der Einfluss der hypoxisch pulmonalen Vasokonstriktion (HPV) auf die pulmonal-vaskuläre Druck-Fluss-Beziehung jeweils (intraindividuell) in 7 Experimenten untersucht werden konnte, wurden in einem zweiten Schritt nochmals 7 Mäuselungen nach oben beschriebenen Versuchsprotokoll untersucht, während deren Perfusion nun jedoch 1 mM L-NAME (NG-Nitro-L-Arginin-Methylester; Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, Deutschland) zur non-selektiven Blockade der endogenen NO-Synthese dem Perfusat zugesetzt wurde [46,51,98,124].

2.2. Analyse der pulmonalen Druck-Fluss-Kurve

Aus den jeweils unter normoxischen und hypoxischen Bedingungen gemessenen 4

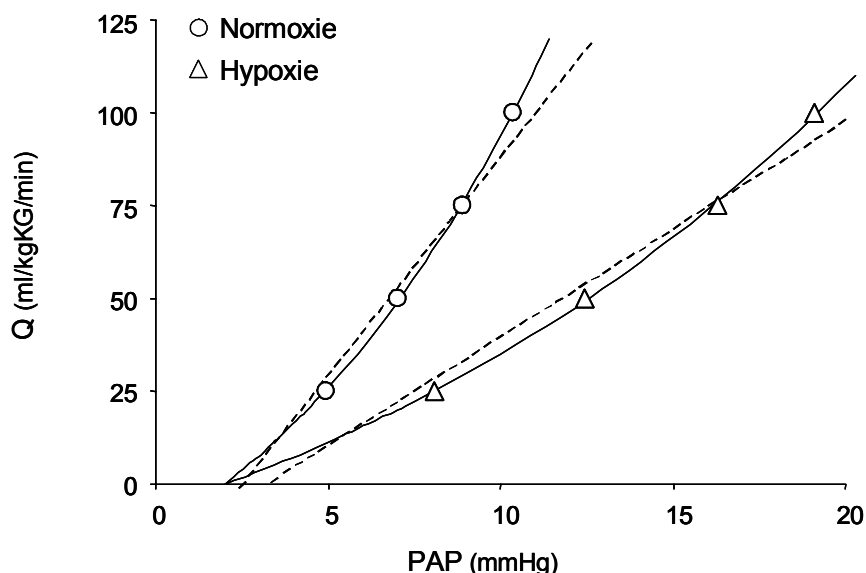


Abbildung 8: Beispiel einer 4-Punkt Druck-Fluss-Kurve generiert während isolierter Perfusion einer Mäuselunge mit 25, 50, 75 und 100 ml/kgKG/min Perfusatfluss (Q) während normoxischer (O) und hypoxischer (Δ) Ventilation. Die Kurven wurden dann mittels linearer (- - -) oder non-linearer (—) Regression analysiert.

Druck-Fluss-Punkten wurde nun mittels zwei verschiedener Regressionsmodelle eine „best-fit“-Kurve hergeleitet, welche die pulmonalvaskuläre Druck-Fluss-Beziehung beschreibt. Oben sind die Kurven exemplarisch dargestellt.

Das lineare Regressionsmodell, welches auf der Vorstellung eines partiell kollaptischen Gefäßbettes basiert (Starling-Resistor), und aus dem sich als Determinanten der Druck-Fluss-Beziehung nach Permut und Riley [92] der so genannte „Critical-Closing-Pressure“ (P_{ZF} = Schnittpunkt der Regressionsgeraden mit der Druckachse; über die gesamte Strombahn gemittelter Druck, bei dessen Unterschreiten kein Fluss generiert wird = kritischer Verschlussdruck) und der statische Gefäßwiderstand (R_{LIN} = Steigung der Regressionsgeraden; mittlerer Ohm'scher Gefäßwiderstand) nach der folgenden Formel ergibt:

$$PAP = R_{LIN} \cdot Q + P_{ZF}$$

Das non-lineare Regressionsmodell von Linehan et al. [71], welches die Dehnbarkeit („Distensible-Vessel-Model“) der pulmonalen Gefäße mit einbezieht und so als Determinanten einen Dehnbarkeitsfaktor α und einen „basalen“ Widerstandsfaktor R_0 einführt. Die mathematische Beziehung ist gemäß der Literatur folgendermaßen hergeleitet:

Beginnend mit der initialen Formel wird der pulmonalarterielle Druck wie folgt beschrieben

$$PAP = \frac{\left[(1 + \alpha LAP)^5 + 5\alpha R_0 Q \right]^{1/5} - 1}{\alpha}$$

Dabei beschreibt α die Beziehung zwischen dem Gefäßdurchmesser und dem herrschenden Druck (P), wenn der Durchmesser (D_i) normalisiert wird auf den Durchmesser (D_{0i}), der unter Bedingungen eines Null-Druck existieren würde. Dies ist in der Formel

$$\frac{D_i}{D_{0i}} = 1 + \alpha P$$

ausgedrückt, während R_0 den Gefäßwiderstand beschreibt, den die Gefäße bei einem Druck von Null hätten.

Um nun den Druckabfall an jedem Ort des arteriellen Einlasses bis zum venösen Auslasses zu bestimmen, wird die Formel

$$dP = -R \dot{Q} dQ$$

angewendet.

Dabei ist \dot{Q} der Fluss, P stellt den lokalen Perfusionsdruck dar und dP ist der Druckabfall am Ort Q . Dieser Ort Q ist das kumulative Gefäßvolumen, das vom Beginn des arteriellen Einflusses bis zu dem venösen Gefäßausfluss gemessen wird. Damit ist R der lokale Gefäßwiderstand pro Volumeneinheit.

Weiterhin benötigt man die Gefäßleitfähigkeit \dot{G} unter Berücksichtigung des Gefäßwiderstandes

$$\dot{G} = 1/R$$

oder als

$$\dot{G} = \sum \frac{\gamma_i}{\mu}$$

ausgedrückt.

Dabei ist μ die Blutviskosität und γ_i ist ein lokaler geometrischer Faktor der Gefäße mit dem entsprechenden Durchmesser D_i .

Der lokale Widerstand ist umgekehrt proportional zu der 4. Potenz des Gefäßdurchmessers. Gleichzeitig wird der lokale geometrische Faktor bei einem Perfusionsdruck gleich null als γ_{0i} definiert. Damit ergibt sich der lokale geometrische Faktor bei einem bestimmten lokalen Druck als

$$\gamma_i = \gamma_{0i} \left(\frac{D_i}{D_{0i}} \right)^4$$

Um nun die Gefäßdehnbarkeit α zu berücksichtigen und eine lineare Durchmesser-Druck Beziehung herzustellen, wird die Formel

$$\frac{D_i}{D_{0i}} = 1 + \alpha P$$

verwendet. Anschließend erfolgt die Übernahme der beiden letztgenannten Gleichungen in die Gleichung der Gefäßleitfähigkeit $\dot{G} = \sum \frac{\gamma_i}{\mu}$

$$\dot{G} = (1 + \alpha P)^4 \sum \frac{\gamma_i}{\mu} = (1 + \alpha P)^4 \dot{G}_0$$

Das Verhältnis zwischen dem mittleren Widerstand und dem Widerstand R_0 bei einem Durchmesser gleich null, D_0 , lässt sich folgendermaßen darstellen:

$$\frac{R}{R_0} = (1 + \alpha P)^4$$

Wenn man nun R mittels der Gleichungen $dP = -R \dot{Q} dQ$ und $\frac{R}{R_0} = (1 + \alpha P)^4$ eliminiert, erhält man die Gleichung

$$(1 + \alpha P)^4 dP = - \dot{Q} R_0 dQ.$$

Anschließend erfolgt das Integral über den gesamten Perfusionsfluss in der Lunge

$$\int_{P_v}^{P_a} (1 + \alpha P)^4 dP = \dot{Q} \int_0^{Q_L} R_0 dQ$$

Das Integral der rechten Seite ergibt den gesamten pulmonalvaskulären Widerstand R_0 bei einem Gefäßdurchmesser von D_0 .

$$R_0 = \int_0^{Q_L} R_0 dQ$$

Wird aber die linke Gleichungsseite der Gleichung $\int_{P_v}^{P_a} (1 + \alpha P)^4 dP = \dot{Q} \int_0^{Q_L} R_0 dQ$

integriert, so erhält man

$$(1 + \alpha P)^5 - (1 + \alpha P_v)^5 = 5\alpha R_0 \dot{Q}$$

Diese Gleichung wird nach P_a aufgelöst und man erhält die zentrale Gleichung für das Gefäßdehnbarkeitsmodell nach Linehan et al.

$$PAP = \frac{[(1 + \alpha P_v)^5 + 5\alpha R_0 \dot{Q}]^{\frac{1}{5}} - 1}{\alpha}$$

2.3. Statistische Analyse

Für jedes einzelne Experiment (mit und ohne L-NAME im Perfusat) wurde aus den jeweils unter Normoxie und Hypoxie gemessenen vier Druck-Fluss-Datenpunkten durch lineare und non-lineare Regressionanalyse nach oben genannten Formeln P_{ZF} und R_{LIN} bzw. α und R_0 ermittelt (Statistica for Windows, SatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Diese wurden als Mittelwerte \pm Standardabweichung (SD) dargestellt.

Um die gebildeten Gruppen zu vergleichen wurde eine Varianzanalyse (two-sided ANOVA) durchgeführt. Wurden signifikante Unterschiede mit Hilfe der ANOVA detektiert, kam ein post-hoc „least-significant-difference“ (LSD) Test zum Einsatz (Statistica for Windows, SatSoft, Inc., Tulsa, OK, USA). Statistische Signifikanz wurde bei einem p-Wert < 0.05 angenommen.