

2. MATERIALIEN UND METHODEN

2.1. Versuchsanordnung

Die Tierversuchsreihen wurden in der Abteilung für experimentelle Anästhesiologie der Erasmus-Universität Rotterdam (Niederlande) durchgeführt, deren tierethisches Komitee die vorliegende Studie genehmigte. Die Behandlung der Tiere erfolgte in Übereinstimmung mit den Richtlinien der Europäischen Gemeinschaft (86/609/EC). Es wurden insgesamt 125 260 ± 40 g schwere männliche Sprague Dawley Ratten als Versuchstiere (IFFA Credo, Niederlande) verwendet. Diese wurden randomisiert 13 Gruppen zugeordnet. Eine Übersicht der verschiedenen experimentellen Gruppen wird nachfolgend in Tabelle 1 gegeben.

Gruppe	Applikation von	Beatmungsmodus PIP/PEEP	n
1	5 ml/kgKG NaCl intratracheal	45 / 0	10
2	5 ml/kgKG NaCl intratracheal	45 / 10	10
3	15 ml/kgKG NaCl intraperitoneal	45 / 0	10
4	15 ml/kgKG NaCl intraperitoneal	45 / 10	10
5	5 ml/kgKG LPS intratracheal	45 / 0	10
6	5 ml/kgKG LPS intratracheal	45 / 10	10
7	15 ml/kgKG LPS intraperitoneal	45 / 0	10
8	15 ml/kgKG LPS intraperitoneal	45 / 10	10
9	Surfactant 400 mg/kgKG + 5 ml/kgKG LPS intratracheal	45 / 0	10
10	Surfactant 400 mg/kgKG + 5 ml/kgKG LPS intratracheal	45 / 10	10
11	Surfactant 400 mg/kgKG + 15 ml/kgKG LPS intraperitoneal	45 / 0	10
12	Surfactant 400 mg/kgKG + 15 ml/kgKG LPS intraperitoneal	45 / 10	10
13	Keine Applikation	Spontanatmung	5

Tabelle 1.

Übersicht über die randomisierten Gruppen.

2.2. Operative Verfahren und Vorbereitung des Experiments

Bei allen Tieren erfolgte die Einleitung der Narkose mit einem 65%NO₂/35%O₂/2% Isofluran-Gasgemisch (Pharmachemie BV, Haarlem, Niederlande).

Intratracheale Applikationsweise

Anschließend wurde bei allen Tieren, bei denen eine intratracheale Applikation vorgesehen war (Gruppen 1, 2, 5, 6, 9, 10), die Trachea freipräpariert, eine Tracheotomie durchgeführt und eine sterile Metallkanüle in die Trachea eingeführt. Das Operationsgebiet wurde mit 30 mg/kgKG Lidocain (Xylocain; Astra Pharmaceutical BV, Rijswijk, Niederlande) betäubt. Über die Trachealkanüle wurden den spontan atmenden Tieren der Gruppen 1, 2, 5, 6 entweder LPS (1 mg/ml Salmonella Abortus Equi S Form, Metalon, Wusterhausen, Deutschland) oder Kochsalzlösung (5 ml/kgKG) über einen Zeitraum von 5 Minuten verabreicht. Die Tiere erwachten aus der Narkose und atmeten in den anschließenden 90 Minuten spontan.

Intraperitoneale Applikationsweise

Die Tiere, bei denen sich eine intraperitoneale Applikation anschloss (Gruppen 3, 4, 7, 8, 11, 12), erhielten entweder LPS oder Kochsalzlösung (15ml/kg) mit Hilfe einer Spritze in die Bauchhöhle verabreicht. Alle Tiere erholten sich von der Narkose und atmeten ebenfalls in den anschließenden 90 Minuten spontan. Vor dem Beginn der maschinellen Beatmung wurden die Tiere unter oben beschriebener Inhalationsanästhesie tracheotomiert und es wurde eine sterile Metallkanüle in der Trachea platziert.

Applikation von Surfactant

Die Tiere der Gruppen 9 bis 12 erhielten nach Narkoseeinleitung mit den oben beschriebenen Inhalationsanästhetika und der Tracheotomie über die in die Trachea eingeführte Metallkanüle exogenen Surfactant (Leo Pharmaceuticals, Kopenhagen, Dänemark) in einer Dosierung von 400 mg/kgKG und gelöst in ca. 2 ml Kochsalz (Konzentration 50 mg/ml) über einen Zeitraum von 5 Minuten appliziert. Während dieser Periode atmeten die Tiere spontan und wurden außerdem auf den Rücken, Bauch und beide Seiten gedreht, um eine vollständige Verteilung des Präparates in der Lunge zu gewährleisten. Der für die vorliegende Studie benutzte Surfactant ist ein natürliches

Surfactant, welches aus Schweinelungen isoliert wurde. Es enthält die beiden Surfactantproteine B und C, jedoch nicht Protein A und D.

Alle Tiere erwachten aus der Narkose. Nach 60 Minuten schloss sich je nach Gruppenzugehörigkeit (erläutert in Tabelle 1) die entsprechende intratracheale oder intraperitoneale Applikation von LPS an.

Kontrollgruppe

Die Kontrollgruppe (Gruppe 13) erhielt keine Administration von LPS oder Kochsalzlösung und wurde nicht beatmet. Die Zeit von Beginn der Experimente bis zur Tötung der Tiere betrug ca. 150 Minuten. Nach diesem Zeitraum von 2 ½ Stunden erfolgte bei den Kontrolltieren wie unter 2.1. beschrieben die Einleitung der Narkose und die Intubation sowie die Katheterisierung der Arteria carotis.

Nach Abnahme der Blutproben wurden die Kontrolltiere durch intraarterielle Applikation einer Überdosis Pentobarbital getötet.

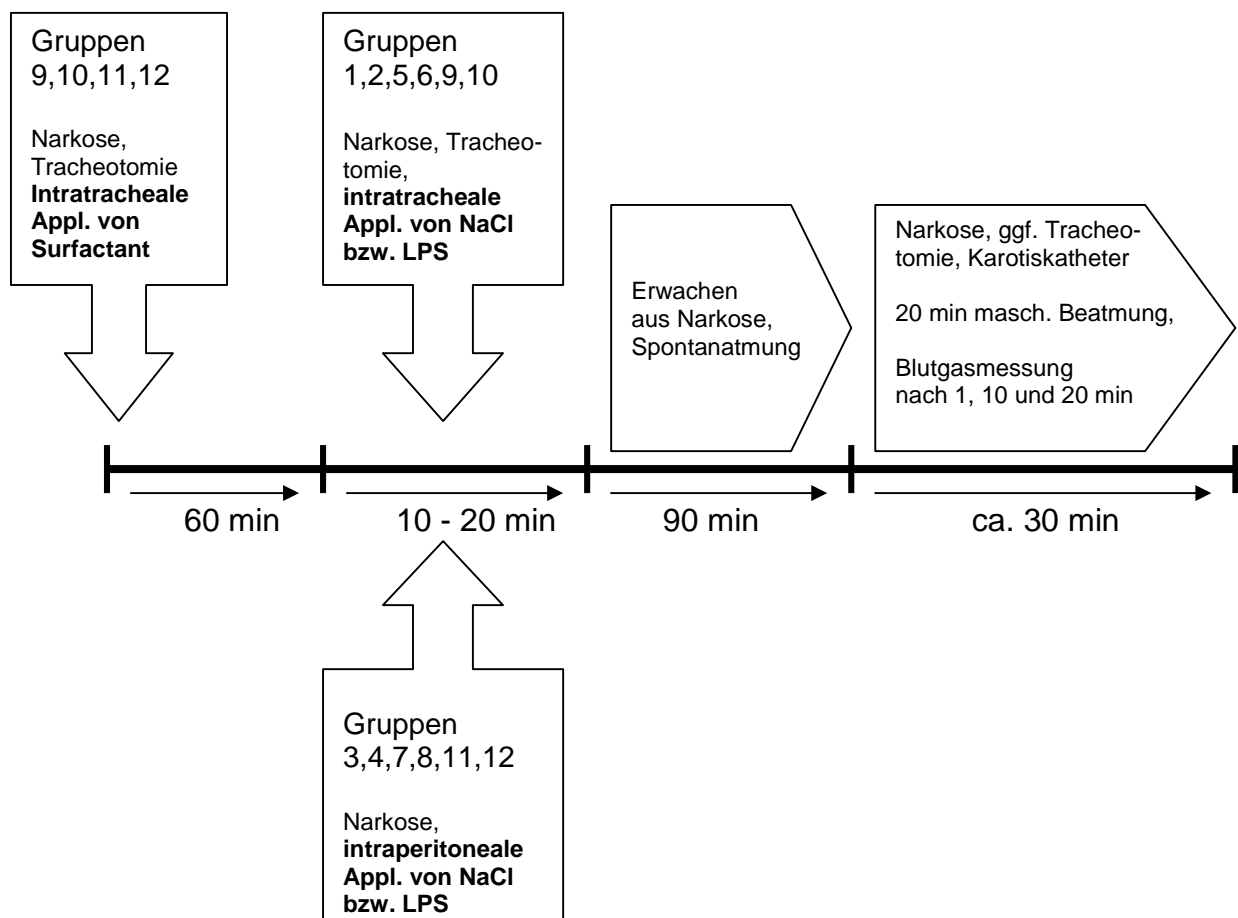


Abbildung 3.

Übersicht über die zeitliche Abfolge der operativen Verfahren und den Ablauf des Experiments.

2.3. Maschinelle Beatmung und Monitoring

Alle Tiere wurden mit der unter 2.1. beschriebenen Inhalationsnarkose anästhesiert. Nach Präparation der linken Arteria Carotis wurde zur Blutgasanalyse und zum Monitoring des Blutdrucks ein steriler Katheter aus Polyethylen in das Gefäß eingeführt. Nach diesen operativen Verfahren wurde die Zufuhr der gasförmigen Anästhesie unterbrochen und durch intraperitoneal verabreichtes Pentobarbital Natrium (60 mg/kgKG) aufrechterhalten (Nembutal; Algin BV, Maasluis, Niederlande). Die Muskelrelaxation erfolgte mittels Pancuroniumbromid, intramuskulär appliziert in einer Dosierung von 2 mg/kgKG. Danach wurden die Tiere an einen Ventilator (Servo Ventilator 300; Siemens – Elma, Solna, Schweden) angeschlossen und mit einem druckkontrollierten und zeitgesteuerten Modus mit einer Frequenz von 30 Atemzügen pro Minute beatmet. Das Inspirations-/Expirationsverhältnis betrug 1:2 und die inspiratorische Sauerstofffraktion FiO_2 1,0. Abhängig von der Gruppenzugehörigkeit (siehe Übersicht in Tabelle 1) wurde mit einem inspiratorischen Spitzendruck von 45 cm H_2O und ZEEP oder mit einem PIP von 45 cm H_2O und einem PEEP von 10 cm H_2O beatmet.

Der Blutdruck wurde über den Karotiskatheter gemessen. 1, 10 und 20 Minuten nach Beginn der maschinellen Beatmung wurden Blutproben entnommen und die Blutgase im entsprechenden Tierversuch gemessen (ABL 505 Radiometer, Kopenhagen, Dänemark). Nach einer Beatmungsdauer von 20 Minuten wurden die Tiere durch eine Überdosis Pentobarbital getötet.

2.4. Laborchemische Analysen und Bestimmung der lungenmechanischen Parameter

Vor der Tötung der Tiere wurden in tiefer Anästhesie mit einer heparinisierten Spritze 4 ml Blut über den arteriellen Katheter entnommen, anschließend bei 4 Grad Celsius und 400 g für 10 Minuten zentrifugiert. Das gewonnene und auf Eppendorf-Küvetten verteilte Serum wurde in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei - 80 Grad Celsius bis zur weiteren Analyse der Zytokine aufbewahrt.

2.4.1. Druck / Volumen – Beziehung

Anhand der Druck/Volumen-Kurve der Lunge können verschiedene lungenmechanische Parameter bestimmt werden. Um diese zu erstellen, wurde nach Eröffnung des Thorax und des Zwerchfells der Tiere die Tracheostomiekanüle an einen Drucktransducer angeschlossen, der seinerseits mit einer 1 ml und einer 20 ml Spritze versehen ist (Validyne Model DP 45-32, Validyne Engineering, Northridge, CA, USA). Die Drücke wurden mit Hilfe eines Polygraphs (Grass Model, Grass Instrument, Quincy, MA., USA) aufgezeichnet. Um alle kollabierten Alveolen zu eröffnen, wurden die Lungen zu Beginn innerhalb von 10 Sekunden bis zu einem Druck von 35 cm H₂O für 5 Sekunden mit Stickstoff insuffliert, gefolgt von der Deflation auf 0 cm H₂O. Anschließend wurden die Lungen erneut schrittweise (0,1 ml pro Schritt bis zu dem Volumen von 1 ml; 0,5 ml pro Schritt bis zu dem Druck von 35 cm H₂O) ventiliert und die Deflation in gleicher Weise durchgeführt, bis der Druck in den Lungen wieder 0 cm H₂O betrug.

2.4.2. Bestimmung der maximalen Compliance (C_{max})

Aus der Kurve erfolgte im Anschluss daran für jedes Tier die Bestimmung der maximalen Compliance. Diese ist definiert als der Abschnitt mit der größten Steigung des Deflationsschenkels der Druck/Volumen-Kurve. Die maximale Compliance ist ein Standardparameter, mit dem sich eine Aussage über die Elastizität der Lunge treffen lässt, sie wird in ml/cmH₂O/kgKG angegeben. Dazu wurde die Steigung des Deflationsschenkels der Kurve im steilsten Abschnitt berechnet (Δ Volumen in ml/kg dividiert durch Δ Druck in cm H₂O) und dann auf das Körpergewicht der Ratten in kg normiert.

2.4.3. Bestimmung des Grünwaldindex

Der Grünwald-Index, der das Surfactantsystem in situ charakterisiert, wurde ebenfalls aus der Druck/Volumen-Kurve und mit Hilfe der Formel $(2V_5 + V_{10}) / 2V_{max}$ bestimmt, wobei V_5 , V_{10} und V_{max} die Lungenvolumina bei den entsprechenden transpulmonalen Drücken von 5, 10 und 35 cm H₂O auf dem Deflationsschenkels darstellen [86].

2.4.4. Bronchoalveoläre Lavage

Im direkten Anschluss an diese Messungen erfolgte die bronchoalveoläre Lavage (BAL), bei der die Lunge fünfmal mit jeweils 10 ml körperwarmer Lösung (Kalziumchlorid (1,5mmol/l) in Kochsalz gelöst) gespült wird. Das zurück gewonnene Volumen wurde in Prozent der für die Lavage verwendeten 50 ml Lösung angegeben. Die Lavageflüssigkeit wurde dann für 10 Minuten bei 4 Grad Celsius und 400 g zentrifugiert und von dem Überstand 6 ml auf 6 sterile Eppendorf-Küvetten verteilt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und genau wie die Küvetten mit Serum bei - 80 Grad Celsius bis zur Analyse der Zytokine aufbewahrt. 30 ml des Überstandes wurden für 15 Minuten bei 40000 g ultrazentrifugiert. Dadurch trennen sich die aktiven (Large Aggregats - LA) von den inaktiven (Small Aggregats - SA) Surfactantkomponenten. Die kleinen Komponenten befinden sich in dem ultrazentrifugierten Überstand, von dem 4 x 1 ml in Eppendorf-Küvetten gesammelt wurden. Das sich am Boden des Zentrifugenröhrchens befindende Pellet, welches die aktiven Surfactantkomponenten enthält, wurde nach Abgießen des Überstandes der Lavageflüssigkeit in 2 ml Kochsalzlösung suspendiert und auf 3 Eppendorf-Küvetten verteilt.

2.4.5. Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration in der ultrazentrifugierten Lavageflüssigkeit erfolgte spectrophotometrisch bei 595 nm, nachdem 50 µl von jeder Probe mit 1550 µl destillem Wasser und 400 µl Bio-Rad Farbreagenz versetzt wurden. Das Prinzip dieser modifizierten Bradford-Methode beruht auf der Bindung des Farbreagenz (Bio-Rad Protein-Assay, München, Deutschland) mit den Proteinen. Die Absorption dieses Komplexes kann mit dem Spectrophotometer (Beckmann DU 7400, Fullerton, CA, USA) gemessen und die Proteinkonzentration in jeder Probe anhand der vorher mittels bovinen Serumalbuminen (Sigma St. Louis, Mo., USA) erstellten Standardkurve berechnet werden [87].

2.4.6. Bestimmung der Surfactantaggregate

Für die quantitative Bestimmung der Surfactantkomponenten dient die Messung der Phospholipide nach Bligh und Dyer, die sich in mehreren Schritten vollzieht [88, 89]. Zuerst werden die Phospholipide in den Surfactantproben (1ml SA, 50 µl LA auf 1ml mit Kochsalzlösung aufgefüllt) isoliert. Dies geschieht durch mehrmaliges Ausschütteln mit einer Methanol/Chloroformlösung, Zentrifugieren und Evaporieren. Die Phospholipide werden danach durch Zusatz von HClO₄ und Erhitzen auf 180 Grad Celsius zerstört und das freigewordene Phosphat bildet mit dem anschließend zuzufügenden Ammonium Molybdat einen Komplex. Nach Zugabe von Ascorbinsäure und Erhitzen auf 100 Grad Celsius bildet die Lösung eine Farbe, deren Absorption bei 800 nm gemessen wurde (Beckmann DU 7400, Fullerton, CA, USA). Die Mengen in den Proben wurden für die entsprechenden Ausgangsvolumina (SA aus 30 ml; LA aus 2ml) hochgerechnet. Für jedes Tier wurde dann der Quotient aus SA und LA berechnet. Je größer der Wert ist desto mehr inaktive Surfactantaggregate liegen vor als Hinweis für ein gestörtes Surfactantsystem.

2.4.7. Messung der Zytokine

Die Bestimmung der TNF-α Konzentrationen im Serum und der Lavageflüssigkeit jedes Tieres erfolgte im Research Center Borstel (Deutschland) in der Abteilung für pulmonale Pharmakologie unter der Leitung von Prof. Stefan Uhlig. Benutzt wurde ein für Ratten spezifischer ELISA der Firma Endogen, Woburn, Mass., USA. Bei diesem Enzymimmuntest wird TNF-α mit Hilfe von Antikörpern, die mit Enzym markiert sind, quantitativ nachgewiesen. Die Aktivität des markierenden Enzyms wird als Farbreaktion photometrisch gemessen. Zuerst wurden zweimal 50 µl jeder Probe in die Vertiefungen der mit Anti-Ratten TNF-α beladenen Platte gegeben. Die abgedeckte Platte wurde bei Raumtemperatur für eine Stunde inkubiert. Danach wurde die Platte dreimal mit einem speziellen Wasch-Puffer gewaschen und 50 µl des vorbereiteten Biotinyl-Antikörper Reagenz zu jeder Probe hinzugefügt. Nach zweistündiger Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Platte erneut dreimal gewaschen und 100 µl der vorbereiteten Streptavidin-HRP Lösung zu jeder Probe gegeben. Die Platte wurde daraufhin nochmals für 30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und nach dreimaliger

Waschprozedur wurde jede Probe mit 100 µl vorgefertigter TMB Substrat Lösung versetzt. Es schloss sich die 30 minütige Entwicklung der Platte im Dunklen bei Raumtemperatur an. Die Reaktion wurde durch Hinzufügen von 100 µl Stopp-Lösung zu jeder Probe beendet. Die Absorption wurde gemessen und die Konzentrationen von TNF-α in jeder Probe anhand der Standardkurve bestimmt

2.5. Statistische Auswertung

Die in vorliegender Studie erhobenen Messwerte werden in den Grafiken und Tabellen als Mittelwerte \pm Standardabweichung dargestellt. Alle TNF-α Daten wurden vor der Analyse logarithmisch transformiert. Zum Test der Globalhypothese, dass Surfactant und PEEP die Kompartimentalisierung der LPS-induzierten TNF-α Produktion nicht beeinflusst, wurden die Daten mittels zweifaktorieller Varianzanalyse (ANOVA) für wiederholte Messungen (die TNF-α Werte in der Lavage und im Serum des selben Tieres repräsentieren eine gepaarte Messung) mit den beiden Faktoren Behandlung (Surfactant, ja oder nein) und PEEP (0 oder 10 cm H₂O) analysiert. Bei Ablehnung ($p \leq 0,05$) der Globalhypothese, führten wir zum Vergleich der einzelnen Gruppen einen gepaarten t-Test durch und korrigierten den Fehler 1. Art nach Bonferroni-Holm. Intergruppenvergleiche aller anderen Daten erfolgten mittels einfaktorieller Varianzanalyse gefolgt von einem Tukey-Kramer *post-hoc*-Test. Unterschiede wurden bei einem $p \leq 0,05$ als signifikant angenommen.